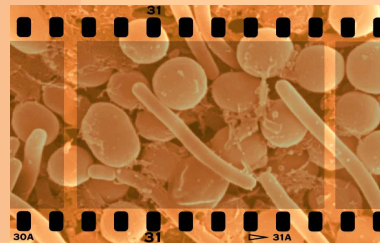


DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE GRANADA



ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL COBRE EN  
*Myxococcus xanthus* MEDIADA POR CuoB Y CuoC.  
CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE  
TIPO ECF CorE



TESIS DOCTORAL  
NURIA GÓMEZ SANTOS

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL COBRE EN  
*Myxococcus xanthus* MEDIADA POR Cu<sub>o</sub>B Y Cu<sub>o</sub>C.  
CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO  
ECF CorE

Memoria presentada por la Licenciada Nuria Gómez Santos para optar al  
título de Doctor.

Granada, Diciembre de 2009

Nuria Gómez Santos



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Nuria Gómez Santos  
D.L.: Gr. 153-2010  
ISBN: 978-84-692-8391-2

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL COBRE EN  
*Myxococcus xanthus* MEDIADA POR CuoB Y CuoC.  
CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO  
ECF CorE

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

**José Muñoz Dorado**

Catedrático de la Universidad de Granada

**Juana Pérez Torres**

Profesora Titular de la Universidad de Granada





# ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL COBRE EN *Myxococcus xanthus* MEDIADA POR Cu<sub>o</sub>B Y Cu<sub>o</sub>C. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO ECF CorE

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute por la doctoranda de una beca de Formación de Investigadores del Plan Propio de la Universidad de Granada, así como a la realización de dos estancias cortas de una duración conjunta de 5 meses en el Instituto de Tecnología Química e Biológica de la Universidad Nova de Lisboa, financiadas por una Acción Integrada concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Finalmente, la investigación llevada a cabo ha sido financiada por los proyectos “Oxidasas multicobre de *Myxococcus xanthus*: regulación y función durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo” (BFU2006-00972/BMC) y “Respuesta global al cobre en *Myxococcus xanthus*” (P06-CVI-1377), obtenidos por el Grupo de Investigación “Desarrollo Procariótico” (BIO318).



# ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL COBRE EN *Myxococcus xanthus* MEDIADA POR CuoB Y CuoC. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO ECF CorE

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido presentados a congresos nacionales e internacionales, publicados o están en preparación para su publicación:

## PUBLICACIONES

Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., Pérez, J., and Muñoz-Dorado, J. (2007) Differential expression of the three Multicopper Oxidases from *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*. 189:4887-4898.

**Gómez-Santos, N.**, Pérez, J., Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., and Muñoz-Dorado, J. (2009) CorE, a copper-dependent sigma factor. MS in preparation.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

### Orales:

**Gómez-Santos, N.**, Pérez J., and Muñoz-Dorado, J. (2009) CorE, a copper dependent sigma factor. 36<sup>th</sup> international conference on the biology of Myxobacteria. Boston (U.S.A.).

Muñoz-Dorado, J., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Extremera-León, A.L., Moraleda-Muñoz, A., and Pérez, J. (2008) Complex regulation of the copper response in *Myxococcus xanthus*. 35<sup>th</sup> international conference on the biology of Myxobacteria. Sonoma, California (U.S.A.).

Pérez, J., Extremera-León, A.L., Moraleda-Muñoz, A., Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, and Muñoz-Dorado, J. (2007) Gene redundancy in *Myxococcus xanthus* copper response. 34<sup>th</sup> international conference on the biology of Myxobacteria. Granada (Spain).

Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., **Gómez-Santos, N.**, Muñoz-Dorado, J., and Pérez, J. (2006) Biological function and regulation of the multicopper oxidase LcsA from *Myxococcus xanthus*. 3<sup>rd</sup> European meeting in oxizymes. Oeiras (Portugal).

Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Carrero-Lérida, J., and Muñoz-Dorado, J. (2005) In search of the physiological role and regulation of the three multicopper oxidases in the bacterium *Myxococcus xanthus*. COST ACTION 23E: Biotechnology in the pulp and paper industry. Biotechnology for pulp and paper manufacture: From tailor-made biocatalysts to mill application (Spain).

Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Carrero-Lérida, J., and Muñoz-Dorado, J. (2005) Characterization of three copper regulated operons in *Myxococcus xanthus*. 32<sup>th</sup> international conference on the biology of Myxobacteria. Harrison Hot Spring (Canada).

### **Posters:**

Pérez, J., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Extremera-León, A.L., Moraleda-Muñoz, A., and Muñoz-Dorado, J. (2008) Regulatory elements involved in copper response of the social bacterium *Myxococcus xanthus*. 6<sup>th</sup> international copper meeting. Cerdeña (Italy).

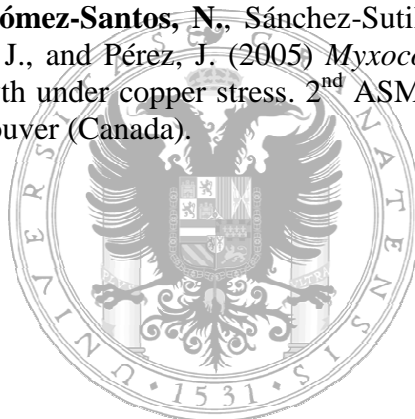
Muñoz-Dorado, J., Moraleda-Muñoz, A., Extremera-León, A.L., Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, and Pérez, J. (2008) Study of the expression profiles of genes involved in copper homeostasis in *Myxococcus xanthus*. 6<sup>th</sup> international copper meeting. Cerdeña (Italy).

**Gómez-Santos, N.**, Moraleda-Muñoz, A., Sánchez-Sutil, M.C., Pérez, J., and Muñoz-Dorado, J. (2006) Multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*: a model for applications, functions and regulation. 3<sup>rd</sup> European meeting in oxizymes. Oeiras (Portugal).

Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., and Muñoz-Dorado, J. (2006) Genes induced by copper in *Myxococcus xanthus*, a gram negative soil bacterium with a unique life cycle. 5<sup>th</sup> international copper meeting: copper and related metals in biology. Cerdeña (Italy).

Pérez, J., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A.L., and Muñoz-Dorado, J. (2006) Factors involved in the regulation of *Myxococcus xanthus* multicopper oxidases. 5<sup>th</sup> international copper meeting: copper and related metals in biology. Cerdeña (Italy).

Moraleda-Muñoz, A., **Gómez-Santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., García-Hernández, R., Muñoz-Dorado, J., and Pérez, J. (2005) *Myxococcus xanthus* development and vegetative growth under copper stress. 2<sup>nd</sup> ASM conference on prokaryotic development. Vancouver (Canada).



## COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

### Orales:

Muñoz-Dorado, J., **Gómez-santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., Extremera, A.L., y Pérez, J. (2009) Copper response regulators in *Myxococcus xanthus*. XXII congreso de la S.E.M. Almería (Spain).

Pérez, J., Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, Moraleda-Muñoz, A., and Muñoz-Dorado, J. (2009) Regulation of two multicopper oxidases in *Myxococcus xanthus*. XII conferencia sobre biotecnología de materiales lignocelulóticos: avances moleculares, enzimáticos y químicos para aplicaciones industriales y medioambientales. Alcalá de Henares (Spain).

Pérez, J., Sánchez-Sutil, M.C., **Gómez-Santos, N.**, Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., and Muñoz-Dorado, J. (2007) Oxidasas multicobre de *Myxococcus xanthus*, un ejemplo de evolución de parálogos. X Reunión de la Red Temática Biodegradación de Lignina y Hemicelulosa. Salamanca (Spain).

Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., **Gómez-Santos, N.**, Pérez, J., y Muñoz-Dorado, J. (2006) Papel fisiológico de la oxidasa multicobre LcsA de *Myxococcus xanthus*. IX Reunión de la Red Temática: Biodegradación de lignina y hemicelulosa. Sevilla (Spain).

### Posters:

Muñoz-Dorado, J., **Gómez-santos, N.**, Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A., Extremera, A.L., y Pérez, J. (2009) Copper response regulators in *Myxococcus xanthus*. XXII congreso de la S.E.M. Almería (Spain).



## AGRADECIMIENTOS

Para mí, escribir estas líneas significa mucho más que redactar unos simples agradecimientos. Implica recordar una etapa de mi vida que finaliza dentro de poco, llena de un sinfín de nuevas sensaciones. Será difícil ser breve y no divagar en la parte menos formal de esta memoria.

Quiero comenzar dando las gracias a mis directores de Tesis Juana Pérez y José Muñoz, por confiar en mí. Por haberme dado la oportunidad de iniciar este camino, guiándome y enseñándome que no es una elección fácil, aunque muy gratificante. Gracias, porque saber que después de tantos años y esfuerzo aún mantenéis esa ilusión por la investigación hace que este viaje sea mucho más interesante.

Al resto de profesores del departamento, porque de algún modo también forman parte de esta historia. Especialmente a Antonio Luis Extremera y Marina Martínez, con los que he tenido la suerte de compartir laboratorio, y a Inés Martín por repartir siempre palabras amables que alegran el día.

A la Dra. Ligia O. Martins, del Instituto de Tecnología Química e Biológica de la Universidad Nova de Lisboa. Gracias por la oportunidad de trabajar bajo tu dirección durante mi estancia allí, por tus consejos y por contagiar esa gran fuerza inigualable. Además de resultados traje conmigo muy buenos recuerdos, parte de los cuales debo a Paulo, André, Rui, Luciana, Vania, y Chen. Gracias a todos.

A mis compañeros de laboratorio, Mariceles, Aurelio, Raquel y Alfredo, porque de un modo u otro me habéis enseñado a crecer como persona. Por estar desde el principio compartiendo el día a día. También quiero dar las gracias a todos aquellos que han ido pasando a lo largo de estos años: Gloria, "Rafas", J. Antonio, Javi y María. Igualmente, a mi "laboratorio de acogida", encabezado por el Dr. Juan Manuel Ruiz. A todos sus miembros, pero sobre todo a Migue y las gemelas (Mari y Eva). Los almuerzos nunca serán iguales sin vosotros.

Quiero agradecer al resto de compañeros del departamento el haberme hecho sentir parte del mismo, sobre todo en los últimos tiempos. A Samir, Fadwa, Maria del Mar, Fernando, Teresa, Rubén ("grande" y "chico"), Carmen, Estefanía, Manolo y Platero. Gracias por todo lo que me llevo de vosotros.

Además me gustaría agradecer a MariCarmen González y Conchi Millán, del departamento de Microbiología, el estar siempre dispuestas a ayudar en todo lo necesario con una sonrisa. En este aspecto quisiera dar las gracias a Rachid (del L.A.R.) por el

apoyo recibido cuando utilicé la instalación, y a Geli (del servicio de secuenciación del departamento de Genética) por hacer que las cosas avanzasen siempre más rápido y por su interés y disposición en todo momento.

Tengo que dar las gracias a todas mis niñas, aunque sé que con estas líneas no será suficiente. Por estar conmigo siempre y apoyarme, en los momentos buenos pero sobre todo en los que no lo fueron tanto. Porque sin vosotras esto habría sido mucho más difícil. A Nieves, por su infinita confianza. Por la que depositas en mí y por dejarme hacer lo mismo. Por entenderme siempre sin necesidad de mediar palabra. A Isa, porque su fuerza y decisión por alcanzar metas me alienta cada día. Por tu grandísima amistad. Por tu luz. A Miriam, por recorrer conmigo un laaaargo camino hasta aquí, y a Nadia, por muchas cosas, pero sobre todo por escucharme cuando pintaba en servilletas! Gracias "Maris", por haber compartido conmigo cafés, dilemas y conflictos mundiales, ciencia, playas, tapas y hasta noches enteras.

A Marián, Miguel, Cristóbal, Toñi y Sergio, por haber estado antes, durante, y seguro que después de esta etapa. A Rosa y Antonia, por todo el tiempo que vivimos juntas y me habéis "soportado", y porque a pesar de la distancia seguís estando ahí. A Morad, por tu dulzura y cariño en este último tramo. No quiero olvidarme de los miembros Rutaplantagueros: gracias a Manolo por acompañarme hasta el techo de Europa. Y a Raquel y Melchor, porque sois increíbles y me transmitís cantidad de cosas buenas. Igualmente a A. Palacios. Por tu inmenso corazón, tanto en el terreno personal como profesional.

Casi para finalizar, he de expresar la mayor gratitud a mi familia. A todos y cada uno de ellos, pero especialmente a mis padres, que me han apoyado incondicionalmente en todo lo que he hecho, aunque hubiesen preferido tenerme más cerca. También a mis hermanos Carlos y Jesús, y a mis hermanas Laura y Ana Mari. A vosotras por ser mucho más que eso. Por supuesto a mi abuela María, quien habría deseado poder estar a mi lado en estos momentos. Me gustaría extender estos agradecimientos a la familia Cervilla-Medina. Gracias por vuestro interés en todo momento.

Y por supuesto a Luismi. Por tu paciencia, por apoyarme siempre y transmitirme tranquilidad cuando más la he necesitado. Por compartir conmigo mucho más que penas y alegrías, enseñarme los parajes más bellos y a pasear por el universo. Porque contigo todo es muchísimo más interesante.

A Mi Familia

A LuisMi

*“La ciencia es la asíntota de la verdad,  
se aproxima sin cesar y no la alcanza jamás”*

VICTOR HUGO (1802-1885)



## SUMMARY

*Myxococcus xanthus* is a  $\delta$ -Proteobacterium that glides on the soil, either as single cells or more typically as groups feeding cooperatively. However, under conditions of nutrient depletion, this bacterium undergoes a developmental program, unique among the prokaryotes in which cells come together in a coordinated way to produce multicellular fruiting bodies within they sporulate, converting the vegetative cells into myxospores. This aggregation and differentiation of bacteria requires a complex interaction of signals controlling gene expression in time and space, ability that has converted this deltaproteobacterium in a model for studying prokaryotic morphogenesis and differentiation.

*M. xanthus* is common in soils, rich in organic materials and rotting wood. In these niches, it has to frequently cope with toxic concentrations of copper ions, which is an essential trace element toxic in excess. The importance of maintaining copper homeostasis is further reinforced by the presence in the cells of several protein families known to control the intracellular concentration of metal ions or helping to confine them to vital roles. Moreover, in higher-order organisms, such as humans, disturbed copper homeostasis has been implicated in diseases such as Menkes and Wilson syndromes, Alzheimer's and Parkinson's diseases.

The copper response in *M. xanthus* seems to be more complex than in other bacteria. It has been reported that copper induces the accumulation of carotenoids in dark-grown cultures of *M. xanthus*, activating the transcription of the structural genes for carotenoid synthesis. Analysis of the *M. xanthus* genome has revealed a plethora of gene products with sequence similarities to proteins known to be involved in copper handling and trafficking in other organisms, most of which are redundant. This finding is indicative that copper homeostasis mechanisms in this bacterium could be different during growth and development. Among others, we have identified genes that encode three multicopper oxidases (MCOs) which have been named *cuoA*, *cuoB*, and *cuoC* (for cuprous oxidases).

The MCO family is defined by the presence of three spectroscopically different copper centers. Enzymes that belong to this family include laccases, ascorbate oxidases, and ceruloplasmin. Even though several bacterial MCOs have also been described, the biological roles of MCOs of prokaryotic origins are diverse and apparently unrelated. Some of them have been implicated in copper tolerance, and the coexistence in the *M. xanthus* genome of three paralogs for MCOs raises intriguing questions about their physiological roles in copper homeostasis along the life cycle.

The aim of this work was to study the role of two of these multicopper oxidases (CuoB and CuoC) in this bacterium, and the regulation of one of them by a novel ECF sigma factor (CorE).

CuoB is involved in the primary adaptive response to copper; hence, its promoter responds rapidly after copper addition, and its expression decreases as the expression of *cuoC* gene increases. As a result,  $\Delta$ *cuoB* mutant cells are extremely sensitive to this metal. On the contrary, CuoC seems to be responsible for the maintenance of the response. It is induced more slowly than CuoB, and its expression levels reach a plateau. CuoC also plays an important role in development, especially in the sporulation process.

These results clearly demonstrate that along with differential induction with increased copper concentrations, differences in timing of expression to adjust the cells to the Cu-regulated adaptive response justify the redundancy of these MCOs in *M. xanthus*.

CuoB is cotranscribed in the same mRNA with an outer membrane efflux protein and *corE*, an ECF RNA polymerase sigma factor. Promoter selection by alternative forms of RNA polymerase holoenzyme containing different sigma factor subunits is a primary mechanism for regulating transcription of specific genes in response to a certain stimulus or stress conditions.

ECF  $\sigma$  factors are small regulatory proteins that are quite divergent in sequence content, and CorE has the described regions conserved in this group. At least three common characteristics are shared among many ECFs. They often recognize promoter elements with an 'AAC' motif in the -35 region. In most cases, ECF are cotranscribed with a transmembrane anti- $\sigma$  having an extracytoplasmic sensory domain and an intracellular inhibitory domain. Finally and most importantly, ECF are mainly associated with extracellular functions, being related with regulation of periplasmic stress and heat shock, iron transport, metal ion efflux systems, alginate secretion and synthesis of membrane-localized carotenoids.

As many members of this family, CorE is involved in metal homeostasis. It is necessary for vegetative and developmental growth in the presence of external copper, and completely regulates expression of *cuoB* and *copB* (a  $P_{IB}$ -ATPase), also involved in copper homeostasis. Genes under control of CorE exhibits a peculiar expression profile, with a rapid induction after the copper addition, which reaches a peak at 2 h of the metal supplementation. Western blot analyses have shown that CorE levels are maintained almost constantly in the cells after the copper addition for periods of times longer than 24 h, meaning that some kind of inhibition is inactivating CorE after a copper shock. Therefore, this sigma factor is going to act when cells detect this metal stress.

CorE is different from other related ECF sigma factors previously described. Positive autorregulation does not contribute significantly to its constitutive expression. However, CorE autorregulates itself expression in a copper dependent way, condition which also activates CorE-regulated genes. It doesn't have a cognate antisigma cotranscribed, and no expression of CorE regulated gene *cuoB* was detected when CorE was overexpressed, as it should be expected if an antisigma would be sequestering CorE. Thus, this ECF sigma factor does not work with an antisigma factor. Another interesting result is the mechanism of action: it is activated by  $Cu^{2+}$ , copper oxidation state needed by CorE to bind DNA, and  $Cu^+$  inhibits its function. As far as we know, no sigma factor has been described to need metal for allowing the RNA polymerase to initiate transcription.

The peculiarity of this ECF sigma factor lies in an extra segment in the C-terminal region containing 6 cysteines, which has been named CRD (cysteine rich domain). Deletion of the CRD domain and point mutations in those cysteines have shown that this portion is required to promote gene expression and has allowed to identify the residues required to detect  $Cu^{2+}$  (abolish transcription) and  $Cu^+$  (the expression does not peak at 2 h).

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AEE	Actividad enzimática específica
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
BCS	Batocuproín sulfonato sódico
BLAST	Motor de búsqueda que emplea alineamientos locales ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
BLASTP	BLAST comparando secuencias de proteínas
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
CBPs	Proteínas que unen cobre ( <i>Copper Binding Protein</i> )
CD	Dicroísmo circular ( <i>Circular Dichroism</i> )
cpm	Cuentas por minuto
CR1	Región 1 del cobre
CRD	Dominio rico en cisteínas ( <i>Cysteine Rich Domain</i> )
CTD	Dominio carboxilo terminal ( <i>Carboxi Terminal Domain</i> )
C-terminal	Carboxilo-terminal
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
ddNTP	Didesoxinucleótido 5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMP	Dimetoxifenol
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	desoxinucleótido 5'-trifosfato
DO <sub>x</sub>	Densidad óptica medida a X nm
ECF	Factor sigma de la ARN polimerasa de función extracitoplásmica ( <i>Extracytoplasmic Function</i> )
EMSA	Retardo en la movilidad electroforética de complejos ADN-proteína ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )

FPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )
h	Hora/s
IPTG	Isopropiltiogalactósido
Kan	Kanamicina
kb	Kilobases
Mb	Megabases
MCO	Oxidasa del cobre ( <i>Multicopper Oxidase</i> )
MET	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>Transmission Electronic Microscopy</i> )
min	Minuto/s
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
NMR	Resonancia magnética nuclear
N-terminal	Amino-terminal.
OEP	Proteína de eflujo de la membrana externa ( <i>Outer Membrane Efflux Protein</i> )
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
ORF	Marco abierto de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pI	Punto isoeléctrico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR a partir de ADNc ( <i>Reverse Transcription PCR</i> )
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS
SGZ	Siringaldacina
Tet	Tetraciclina
U	Unidades
WT	Silvestre/Salvaje ( <i>Wild Type</i> )
X-Gal	5-bromo 4-cloro 3-indolil $\beta$ -D-galactósido
$\Delta x$	Mutante de delección en fase para el gen <i>x</i> .



## ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. MIXOBACTERIAS: DEPREDADORES SOCIALES</b>	3
<b>1.2. EL COBRE: DE LA QUÍMICA INORGÁNICA A LA BIOLOGÍA</b>	10
1.2.1 PAPEL DEL COBRE EN HUMANOS Y ORGANISMOS SUPERIORES	14
1.2.2 PAPEL Y RESPUESTA AL COBRE EN PROCARIOTAS	17
<b>1.3. OXIDASAS MULTICOBRE (MCOs)</b>	20
<b>1.4. TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS</b>	25
1.4.1 METALSENSORES	25
1.4.2 SUBUNIDADES SIGMA	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	41
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	43
<b>3.1. MATERIAL</b>	45
3.1.1 MICROORGANISMOS	45
3.1.1.1. CEPAS DE <i>E. coli</i> UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO	45
3.1.1.2. CEPA DE <i>M. xanthus</i> UTILIZADA EN EL PRESENTE TRABAJO	45
3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO	46
3.1.2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i>	46
3.1.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>M. xanthus</i>	46
3.1.3. SOLUCIONES Y TAMPONES	49
3.1.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR	52
3.1.4.1. VECTORES Y PLÁSMIDOS	52
3.1.4.2. OLIGONUCLEÓTIDOS	52
3.1.4.3. REACTIVOS	56
3.1.4.4. INSTRUMENTACIÓN	57
3.1.5. BASES DE DATOS Y SERVIDORES	58
<b>3.2. MÉTODOS</b>	59
3.2.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS	59
3.2.1.1. CEPAS DE <i>E. coli</i>	59
3.2.1.2. CEPAS DE <i>M. xanthus</i>	59



3.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	60
3.2.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y ELECTROCOMPETENTES	60
3.2.3.1. <i>E. coli</i>	60
3.2.3.2. <i>M. xanthus</i>	61
3.2.4. INTRODUCCIÓN DE ADN EN CÉLULAS DE <i>E. coli</i> Y <i>M. xanthus</i>	61
3.2.4.1. <i>E. coli</i> . TRANSFORMACIÓN MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO	61
3.2.4.2. <i>M. xanthus</i> . ELECTROPORACIÓN	61
3.2.5. MANIPULACIÓN DE ADN	62
3.2.5.1. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO DE <i>M. xanthus</i>	62
3.2.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i>	62
3.2.5.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR	62
3.2.5.4. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	63
3.2.5.5. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	64
3.2.5.6. LIGACIÓN DE ADN	64
3.2.5.7. DESFOSFORILACIÓN DE ADN	65
3.2.5.8. MARCAJE RADIACTIVO DE UN FRAGMENTO DE ADN	65
3.2.5.9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE ADN	65
3.2.5.10. ELECTROFORESIS DE ADN	66
3.2.5.10.1. <b>Geles de Agarosa</b>	66
3.2.5.10.2. <b>Geles de Acrilamida</b>	66
3.2.5.11. AISLAMIENTO DE ADN DE GELES DE AGAROSA	67
3.2.5.12. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	68
3.2.5.12.1. <b>Southern Blot</b>	68
3.2.5.12.2. <b>Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina</b>	68
3.2.5.12.3. <b>Prehibridación-Hibridación de Filtros con ADN</b>	69
3.2.5.12.4. <b>Detección de Fragmentos de ADN Hibridados con Sondas Marcadas con Digoxigenina mediante Reacción con Fosfatasa Alcalina</b>	69
3.2.6. MANIPULACIÓN DE ARN	70
3.2.6.1. EXTRACCIÓN DE ARN	70
3.2.6.2. RT-PCR	70
3.2.7. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS	71
3.2.7.1. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	71
3.2.7.1.1. <b>Inducción de Proteínas Recombinantes con IPTG</b>	71
3.2.7.1.2. <b>Preparación de Extractos Proteicos Inducidos</b>	71

3.2.7.1.3. <b>Purificación de Proteínas Recombinantes</b>	72
3.2.7.2. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)	72
3.2.7.3. TINCIÓN DE GELES SDS-PAGE CON AZUL COOMASSIE	73
3.2.7.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	74
3.2.7.5. INMUNODETECCIÓN POR COLORIMETRÍA DE PROTEÍNAS CON COLAS DE HIS	75
3.2.7.6. DETECCIÓN DE hCorE <i>In Vivo</i>	75
3.2.7.6.1. <b>Estudio de la Estabilidad de hCorE</b>	75
3.2.7.6.2. <b>Sobreexpresión de hCorE</b>	77
3.2.7.7. ESTUDIO DEL RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE COMPLEJOS ADN-PROTEÍNA (EMSA)	79
3.2.7.8. DICROISMO CIRCULAR	79
3.2.7.9. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CUPROSO OXIDASA	80
3.2.7.10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	81
3.2.8. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES DE <i>M. xanthus</i>	81
3.2.8.1. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES <i>lacZ</i>	81
3.2.8.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA	83
3.2.8.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA	83
3.2.8.3.1. <b>Preparación de Extractos Celulares</b>	83
3.2.8.3.2. <b>Medida De Actividad <math>\beta</math>-Galactosidasa</b>	84
3.2.9. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN EN FASE	85
3.2.9.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN EN FASE	85
3.2.9.2. INSERCIÓN DEL GEN <i>corE</i> EN UNA CEPA PORTADORA DE UNA FUSIÓN <i>cuoB-lacZ</i>	88
3.2.9.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA WT Y MUTANTES DE DELECIÓN	89
3.2.9.3.1. <b>Crecimiento Vegetativo en Medio Líquido</b>	89
3.2.9.3.2. <b>Fenotipo Durante el Ciclo de Desarrollo</b>	89
3.2.9.3.3. <b>Recuento de Esporas</b>	90
3.2.9.3.4. <b>Germinación de Esporas</b>	90
<b>4. RESULTADOS.</b>	93
<b>4.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL COBRE Y OTROS METALES DE <i>M. xanthus</i> Y RESPUESTA ADAPTATIVA REGULADA POR COBRE.</b>	95

4.1.1. SENSIBILIDAD AL COBRE EN <i>M. xanthus</i>	95
4.1.2. RESPUESTA ADAPTATIVA REGULADA POR COBRE	96
4.1.3. TOLERANCIA DE <i>M. xanthus</i> A OTROS METALES BIOLÓGICOS	98
<b>4.2 ANÁLISIS DEL GENOMA. ELEMENTOS RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN DE METALES.</b>	99
<b>4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA MCO CuoC</b>	101
4.3.1 ESTUDIO DEL OPERÓN DEL GEN <i>cuoC</i>	101
4.3.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>cuoC</i> (MXAN_3432)	102
4.3.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MCO CuoC	103
4.3.4 ESTUDIO DEL PAPEL FISIOLÓGICO DE CuoC EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i> .	104
4.3.4.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>cuoC</i>	104
4.3.4.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA <i>cuoC</i>	106
4.3.4.3. CARACTERIZACIÓN DE JM51CIF ( $\Delta cuoC$ )	108
4.3.4.3.1. <b>Crecimiento Vegetativo</b>	108
4.3.4.3.2. <b>Ciclo de Desarrollo</b>	109
4.3.4.3.3. <b>Actividad Cuproso Oxidasa en Extractos Celulares</b>	111
4.3.5 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE <i>cuoC</i>	112
<b>4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MCO CuoB</b>	114
4.4.1 REGIÓN DEL GEN <i>cuoB</i>	114
4.4.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>cuoB</i> (MXAN_3425)	115
4.4.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MCO CuoB	115
4.4.4 IMPLICACIÓN DE CuoB EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i> Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL COBRE	118
4.4.4.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>cuoB</i>	118
4.4.4.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA <i>cuoB</i>	120
4.4.4.3. CARACTERIZACIÓN DE JM51BIF ( $\Delta cuoB$ )	122
4.4.4.3.1. <b>Crecimiento Vegetativo</b>	122
4.4.4.3.2. <b>Ciclo de Desarrollo</b>	122
4.4.5. ACTIVIDAD DE CuoB	123
4.4.5.1. ACTIVIDAD CUPROSO OXIDASA EN EXTRACTOS CELULARES	123
4.4.5.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE CuoB	124

4.4.5.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE CuoB	126
4.4.6. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE <i>cuoB</i>	126
<b>4.5 CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO ECF CorE</b>	128
4.5.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>corE</i> (MXAN_3426)	128
4.5.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE CorE	128
4.5.3 IMPLICACIÓN DE CorE EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i> Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL COBRE	129
4.5.3.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>corE</i>	129
4.5.3.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA <i>corE</i>	131
4.5.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA JM51EIF ( $\Delta corE$ )	132
4.5.3.3.1. <b>Crecimiento Vegetativo</b>	132
4.5.3.3.2. <b>Ciclo de Desarrollo</b>	133
4.5.4 GENES REGULADOS POR CorE	134
4.5.5 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE <i>corE</i>	136
4.5.6 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE CorE	137
4.5.6.1. SOBREENPRESIÓN <i>In Vivo</i> DE CorE	137
4.5.6.2. UNIÓN DE CorE AL ADN	142
4.5.6.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE CorE	145
4.5.6.4. RESPUESTA DE CorE A SUCESIVOS CHOQUES POR COBRE	147
4.5.6.5. RESPUESTA DE CorE. RELACIÓN CON EL ESTADO DE OXIDACIÓN DEL COBRE	148
4.5.6.6. ANÁLISIS DE LA REGIÓN RICA EN CISTEÍNAS DE CorE	150
4.5.6.7. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA CRD DE CorE	150
4.5.6.8. MUTACIONES PUNTUALES EN EL DOMINIO CRD DE CorE	154
4.5.6.8.1. <b>Mutaciones Puntuales con Pequeño Efecto en la Función de CorE.</b>	156
4.5.6.8.2. <b>Mutaciones Puntuales que Alteran la Capacidad de Sensibilización y Desensibilización de CorE.</b>	156
4.5.6.8.3. <b>Mutación Puntual que Altera Fuertemente la Capacidad de Desensibilización de CorE.</b>	157
4.5.6.8.4. <b>Mutación Puntual que Altera Fuertemente la Capacidad de Respuesta de CorE.</b>	157

<b>5. DISCUSIÓN</b>	161
<b>5.1. HOMEOSTASIS DEL COBRE EN <i>M. xanthus</i></b>	163
<b>5.2. MCOs EN <i>M. xanthus</i></b>	165
5.2.1 IMPLICACIÓN DE CuoB Y CuoC EN LA HOMEOSTASIS DEL COBRE EN <i>M. xanthus</i>	165
<b>5.3. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR <math>\sigma</math> CorE EN <i>M. xanthus</i></b>	168
5.3.1 CorE: FACTOR $\sigma$ DE TIPO ECF	168
5.3.2 PAPEL DE CorE EN LA RESISTENCIA AL COBRE DE <i>M. xanthus</i>	169
5.3.3 GENES REGULADOS POR CorE	170
5.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE CorE	172
5.3.4.1. REGULACIÓN INDEPENDIENTE DE UN FACTOR ANTISIGMA	172
5.3.4.2. UNIÓN AL ADN DEPENDIENTE DE Cu <sup>2+</sup>	172
5.3.4.3. RESPUESTA DEPENDIENTE DEL ESTADO REDOX DEL COBRE	173
5.3.4.4. REGIÓN CRD DE CorE	175
<b>6. CONCLUSIONES</b>	183
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	189
<b>APÉNDICE</b>	213
A.1. TABLA DE CEPAS UTILIZADAS	215
A.2. TABLA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS	216
A.3. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	217
ÍNDICE DE TABLAS	217
ÍNDICE DE FIGURAS	217

# **1. INTRODUCCIÓN**

**1.1. MIXOBACTERIAS: DEPREDADORES SOCIALES**

**1.2. EL COBRE: DE LA QUÍMICA INORGÁNICA A LA BIOLOGÍA**

**1.3. OXIDASAS MULTICOBRE (MCOs)**

**1.4. TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. MIXOBACTERIAS: DEPREDADORES SOCIALES

Las mixobacterias son un grupo procariota bastante complejo, heterogéneo y con un ciclo de vida extraordinario (Fig. 1.1). Estos microorganismos se han clasificado en base a la secuencia del ARNr 16S como  $\delta$ -Proteobacterias, subdivisión que parece haberse originado hace más de 750 millones de años, mientras que la aparición de mixobacterias, algo posterior, ocurrió 100 millones de años después (Shimkets, 1993). Comparten taxón con bdellovibrios y bacterias sulfato reductoras (Shimkets *et al.*, 2005), con los que a pesar de duplicar e incluso triplicar en algunos casos su tamaño de genoma, mantienen varias características en común (Karlin *et al.*, 2006).

La especie utilizada en este estudio, *Myxococcus xanthus*, pertenece al orden *Myxococcales*, suborden *Cystobacterineae*, familia *Myxococcaceae*, género *Myxococcus* (Tabla 1.1). El orden *Myxococcales* es tan variado que incluye desde especies halófilas (género *Haliangium*) hasta cepas psicrofílicas aisladas en la Antártida o termófilas moderadas que habitan en ambientes semiáridos (Gerth y Müller, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de las mixobacterias.

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GÉNERO	
<i>Myxococcales</i>		<i>Myxococcaceae</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> <i>Corallococcus</i> <i>Myxococcus</i> <i>Pyxicoccus</i>	
		<i>Cystobacterineae</i>	<i>Archangium</i> <i>Cystobacter</i> <i>Hyalangium</i> <i>Melittangium</i> <i>Stigmatella</i>	
	<i>Sorangiineae</i>	<i>Polyangiaceae</i>	<i>Byssophaga</i> <i>Chondromyces</i> <i>Haploangium</i> <i>Jahnia</i> <i>Polyangium</i> <i>Sorangium</i>	
			<i>Nannocystaceae</i>	<i>Nannocystis</i> <i>Plesiocystis</i>
		<i>Nannocystineae</i>	<i>Haliangeaceae</i>	<i>Haliangium</i>
			<i>Kofleriaceae</i>	<i>Kofleria</i>



La especie *M. xanthus* fue identificada por primera vez en 1941 por J. M. Beebe, en cuya descripción ya se habló de un complejo ciclo de vida, con bacilos más alargados que los de otras especies del género *Myxococcus* descritas hasta el momento (como *Myxococcus virescens*), cuya envergadura media era de  $0,75 \times 6 \mu\text{m}$ , y con esporas de unas  $2 \mu\text{m}$  de diámetro. Estas esporas (mixósporas) se encontraban en unas estructuras macroscópicas esféricas o semiesféricas, de unas 300 a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, inmóviles, con un color amarillento-anaranjado cuando jóvenes, adquiriendo una tonalidad naranja más brillante cuando maduras, denominados cuerpos fructíferos o fructificantes (*fruiting bodies*).

Los cuerpos multicelulares son el resultado de la asociación de un grupo de individuos en respuesta a la escasez de nutrientes, algunos de los cuales pasarán a formar parte del agregado que dará lugar al cuerpo fructificante (perdiendo su forma bacilar y adquiriendo una forma esférica y algunas características especiales, convirtiéndose en esporas resistentes al calor, desecación, sonicación o radiación), mientras que otros quedarán fuera (células periféricas) manteniendo la forma bacilar y evitando depredación y colonización de los cuerpos por otros microorganismos (O'Connor y Zusman, 1991). En presencia de glicerol, los bacilos también son capaces de diferenciarse a formas de resistencia (Dworkin y Gibson, 1964) muy similares a las mixósporas de los cuerpos fructificantes.

La coloración es debida a la capacidad que poseen de producir un metabolito secundario conocido como DKxanteno (Meiser *et al.*, 2006), pigmento amarillo que da coloración a estas bacterias. La coloración se pensaba que era debida a la producción de carotenoides, que en un principio se identificaron como una respuesta fotoprotectora, produciendo protoporfirina IX que sería acumulada en las células en fase estacionaria (Burchard y Dworkin, 1966). Estudios posteriores demostraron que la síntesis de carotenoides se induce en presencia de luz azul (Elías-Arnanz *et al.*, 2008) y también se puede inducir mediante el contacto con sulfato de cobre, siendo su síntesis mayor cuanto menor es la temperatura de incubación, es decir, en condiciones subóptimas de crecimiento (Moraleta-Muñoz *et al.*, 2005).

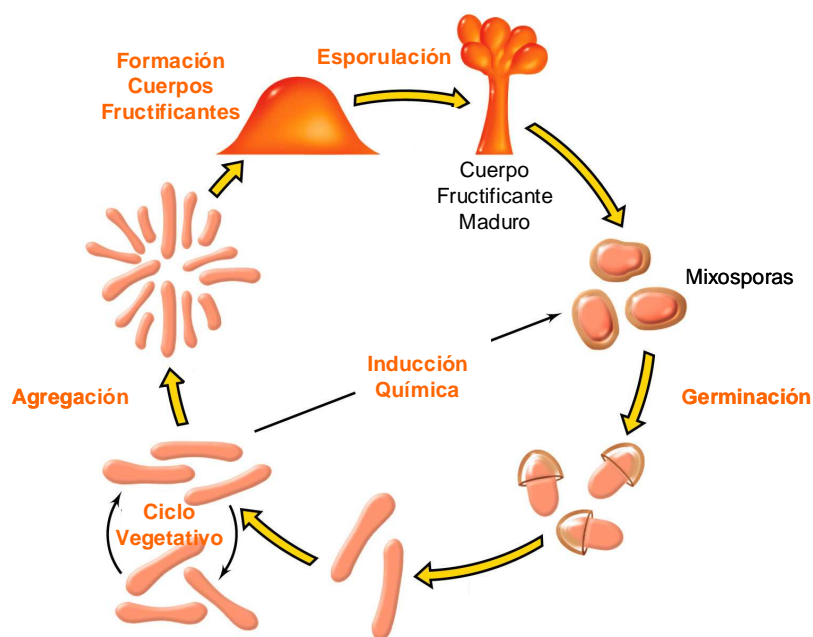


Figura 1.1. Representación del ciclo de vida de una mixobacteria

Este grupo de bacterias Gram negativas, aerobias y móviles en su mayoría, se puede encontrar fácilmente en casi cualquier hábitat (Reichenbach y Dworkin, 1992), prefiriendo los climas tropicales y templados (Dawid, 2000). Su hábitat principal es la zona superficial del suelo (Dawid, 2000; Reichenbach, 1999), donde estimaciones realizadas indican una representación menor del 1% de la microbiota edáfica autóctona, dato que podría estar siendo subestimado por los métodos de análisis utilizados (Wu *et al.*, 2005).

*M. xanthus* es una bacteria capaz de depredar otros microorganismos liberando enzimas hidrolíticas y antibióticos, incluyendo bacterias y hongos (Berleman y Kirby, 2009). Para ello necesita un soporte sólido en la naturaleza (o agar en el laboratorio) que le permita desplazarse y buscar presas, movimiento determinado por los sistemas de movilidad S y A (Berleman *et al.*, 2006; Hodgkin y Kaiser, 1979; Kaiser, 2000; Mignot *et al.*, 2007). El primero de ellos, S o social, ocurre gracias a pili de tipo IV presentes en el polo delantero de las células (Wall y Kaiser, 1999; Sun *et al.*, 2000), así como fibrillas de la matriz extracelular y lipopolisacárido O (Youderian y Hartzell, 2006). Sin embargo, mutantes defectivos en esta estructura aún son capaces de deslizarse gracias a lo que se conoce como movilidad aventurera (A), determinada por la combinación de una serie de proteínas motoras, complejos de adhesión focal y segregación (Mignot *et al.*, 2007; Wolgemuth *et al.*, 2002; Yu y Kaiser, 2007). Se han identificado unas 30 proteínas implicadas en este proceso, pero sus funciones específicas aún no han sido determinadas (Leonardy *et al.*, 2007; Rodríguez y Spormann, 1999; Youderian *et al.*, 2003)

Cada vez es más aceptada la idea de que muchas bacterias no viven formando parte de comunidades como simples integrantes individuales, sino que se producen interacciones y comunicaciones entre las células mediante la producción de metabolitos secundarios, intercambio de señales, o respuestas a agentes químicos presentes en el ambiente (Blango y Mulvey, 2009; Dunny *et al.*, 2008; Keller y Surette, 2006). *M. xanthus* muestra respuestas quimiotácticas cuya consecuencia es el cambio en la frecuencia y dirección del movimiento para acercarse o alejarse de la sustancia detectada (Shi *et al.*, 1993). Necesitan una alta densidad celular para asegurar su supervivencia en condiciones de escasez de nutrientes, y por tanto se ha favorecido el desarrollo de una estrategia de comportamiento social en la que se nutren cooperativamente formando enjambres. Estudios recientes demuestran una gran capacidad de evolución en los sistemas implicados en la búsqueda de presas para conseguir nutrientes cuando hay escasez de los mismos, que iría en detrimento de la formación de cuerpos fructificantes (Hillesland *et al.*, 2009). Los cuerpos fructificantes de las mixobacterias son órganos necesarios para la dispersión de sus células, y estas masas de esporas pueden ser transportadas por pequeños animales a un medio rico en nutrientes. De hecho, se han observado cuerpos fructificantes transportados por garrapatas (Reichenbach, 1993).

Generalmente, mientras en el medio existan nutrientes suficientes para su alimentación, los bacilos se van a dividir con normalidad aumentando la población. Pero cuando las condiciones dejan de ser favorables y la escasez de nutrientes es detectada, estos microorganismos entran en el denominado ciclo de desarrollo, en el que los bacilos se agrupan para formar las estructuras macroscópicas conocidas como cuerpos fructificantes. Los genes que regulan el inicio del ciclo de desarrollo son expresados en todas las células, mientras que los que se expresan más tardíamente sólo

lo hacen en las que formarán parte de los cuerpos fructificantes y se diferenciarán a mixósporas, y para su expresión es necesaria la señal C, que alcanza una mayor concentración en los agregados donde hay mayor densidad celular (Julien *et al.*, 2000). Por tanto las células periféricas no serán capaces de llevar a cabo el proceso de esporulación, en el que hay tres fases distintas (Fig. 1.2): una fase quiescente con movilidad pero poca agregación (0-8 horas), un período de fuerte movilidad y agregación en el que comienzan a formarse los cuerpos fructificantes (8-16 horas) y un período de maduración en el que se inicia la esporulación que dará lugar a las mixósporas (16-48 horas) (Curtis *et al.*, 2007).

El ciclo de desarrollo comienza con la respuesta estricta, desencadenada por la falta de ARNs de transferencia cargados con su correspondiente aminoácido, cuya consecuencia es la síntesis de nucleótidos altamente fosforilados, como guanosina tetra y penta fosfato o (p)ppGpp (Singer y Kaiser, 1995). También se inicia una pauta de movimiento denominada *rippling*, en la que se observan oscilaciones regulares rítmicas (Anderson y Vasiev, 2005), y que está controlada por el sistema *frz* (Blackhart y Zusman, 1985).

La agregación comienza con la asociación de cientos de bacterias que van a constituir los denominados centros de agregación sobre los que se desplazarán células dispuestas en fila. El resultado final será la formación de un cuerpo fructificante dinámico inmaduro, formado por un núcleo central de células inmóviles, con baja densidad celular, rodeado de filas de células que se desplazan siguiendo una trayectoria circular. El cuerpo fructificante madurará convirtiéndose en una estructura estática en la que los bacilos se diferenciarán a mixósporas (Sager y Kaiser, 1993). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, las cubiertas de las formas de resistencia se rompen y tiene lugar la germinación (Fig. 1.1), que culmina con el cambio de forma en las células y la posterior división celular en la que cada célula hija adquirirá una copia del cromosoma (Tzeng y Singer, 2005), reanudándose el ciclo vegetativo.

Mediante el análisis de diferentes mutantes defectivos en la formación de cuerpos fructificantes, se identificaron 5 grupos de complementación basados en la capacidad que poseían para volver a formar esas estructuras en presencia de cepas silvestres de *M. xanthus*. Estos grupos se nombraron con letras de la A a la E, estando definidos los grupos A y C por señales extracelulares que se pueden intercambiar entre células, mientras que los grupos B, D y E parecen ser consecuencia de contactos entre células a modo de estimulación.

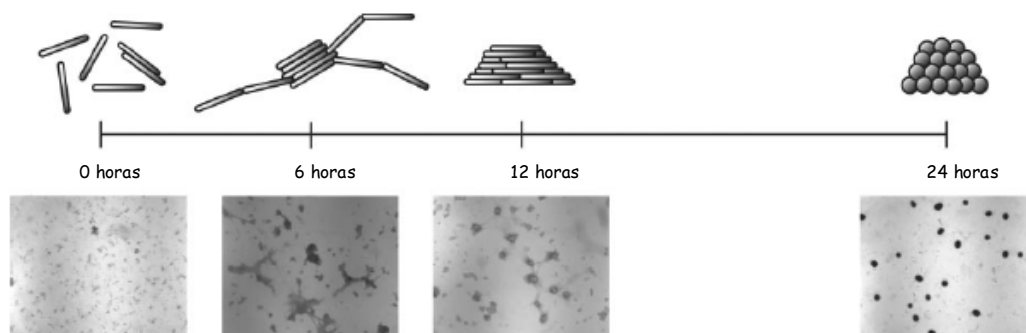


Figura 1.2. Representación temporal de la formación de cuerpos fructificantes (Tzeng *et al.*, 2006).

Debido a que la comunicación representa un coste en términos de producción de señal, este evento debe proporcionar un beneficio al individuo para que el mecanismo evolucione, y en *M. xanthus*, comportarse de una manera coordinada para formar cuerpos fructificantes proporciona un gran beneficio. En general, este proceso está mediado por dos rutas de transmisión de señales: la de la señal A, que permite la agregación celular; y la de la señal C, que implica la formación de cuerpos fructificantes (Kaiser, 2004; 2008; Keller y Surette, 2006). La señal B también es esencial para el inicio del ciclo de desarrollo (Kroos y Kaiser, 1987), pero aún no ha sido identificada. Las células incapaces de generar señal B son defectivas en el gen *bsgA*, que codifica para una proteasa (Gill *et al.*, 1993). La falta de señal D (también por identificar) bloquea la expresión de los genes tardíos, y el gen responsable de este fenotipo es *dsgA*, que codifica para el factor de inicio de la traducción IF3 (Cheng *et al.*, 1994; Kalman *et al.*, 1994). La señal E por su parte, parece estar constituida por ácidos grasos ramificados liberados a partir de componentes de la membrana, y las células defectivas en esta señal carecen del gen *esg* que codifica una deshidrogenasa de cetoácidos ramificados, bloqueándose el ciclo de desarrollo en una fase muy temprana (Downard *et al.*, 1993; Downard y Toal, 1995).

La señal A actuaría como un mecanismo *sensor de quorum*, que permite determinar si se ha alcanzado la densidad celular necesaria para la formación de cuerpos fructificantes, y son péptidos resultado de la degradación de proteínas por peptidasas, ambas expulsadas al medio extracelular. Cuando hay ciertos niveles de señal A en el medio extracelular, un sistema de dos componentes basado en una histidina quinasa (SasS) y su regulador de respuesta (SasR) inducen la expresión de genes dependientes de señal A (Kaplan y Plamann, 1996; Keseler y Kaiser, 1995) que intervendrán en la formación de cuerpos fructificantes. Esta señal es importante durante las primeras horas de formación de los cuerpos fructificantes (Kuspa *et al.*, 1992).

La señal C es un péptido de 17 kDa, resultante de la degradación externa por una proteasa de una proteína de 25 kDa (Lobedanz y Søgaard-Andersen, 2003; Rolbetzki *et al.*, 2008), y que muestra homología con enzimas de tipo alcohol deshidrogenasa (Baker, 1994; Lee *et al.*, 1995). Una célula nunca se señalizará así misma (Kaiser y Dworkin, 2008), pues es necesario el contacto entre células para que se transmita la señal (Kim y Kaiser, 1990; Sager y Kaiser, 1994), y éstas serán receptoras y a la vez transmisoras de señal C (Fig. 1.3). Cuando una célula detecta el producto digerido del gen *csgA*, incrementa los niveles producidos de esta proteína (Kim y Kaiser, 1991). Bajas concentraciones de señal C inducen oscilaciones rítmicas, concentraciones intermedias se asocian con el proceso de agregación y altas concentraciones desencadenan la esporulación (Kim y Kaiser, 1991; Kruse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1992). Esto comienza a partir de las 6 horas de iniciarse el ciclo de desarrollo, e induce una serie de cascadas de señalización en las células que origina la acumulación cada vez mayor de bacterias, incrementándose los niveles de CsgA hasta finalmente alcanzar una densidad adecuada que permita el proceso de esporulación (Kaiser, 2004; Kruse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1992).

Un papel importante de estas señales es coordinar la expresión génica con los movimientos celulares que constituyen un cuerpo fructificante (Kaiser, 2004), y se requieren muchos genes para que tenga lugar esta señalización (Velicer *et al.*, 2000), entre los que se encuentran *espA* y *espB* (Cho y Zusman, 1999b), o los dos sistemas quimiotácticos *frz* y *dif*, cuya integración juega un papel central en el control del

## 1. INTRODUCCIÓN

complicado comportamiento social de *M. xanthus* (Ward *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2000). También parece ser que el sistema de transporte Tat (*Twin arginin translocation system*), mediante el cual se exportan proteínas plegadas a través de la membrana citoplásmica, es imprescindible para la formación de cuerpos fructificantes (Kimura *et al.*, 2006). La replicación del ADN durante la fase de agregación también es esencial para que ocurra el ciclo de desarrollo, y debe existir un punto de control que asegure la integridad del cromosoma al final de esta fase (Tzeng *et al.*, 2006), y la presencia de dos copias del cromosoma en las mixósporas, asegurando la viabilidad celular durante la germinación (Tzeng y Singer, 2005).

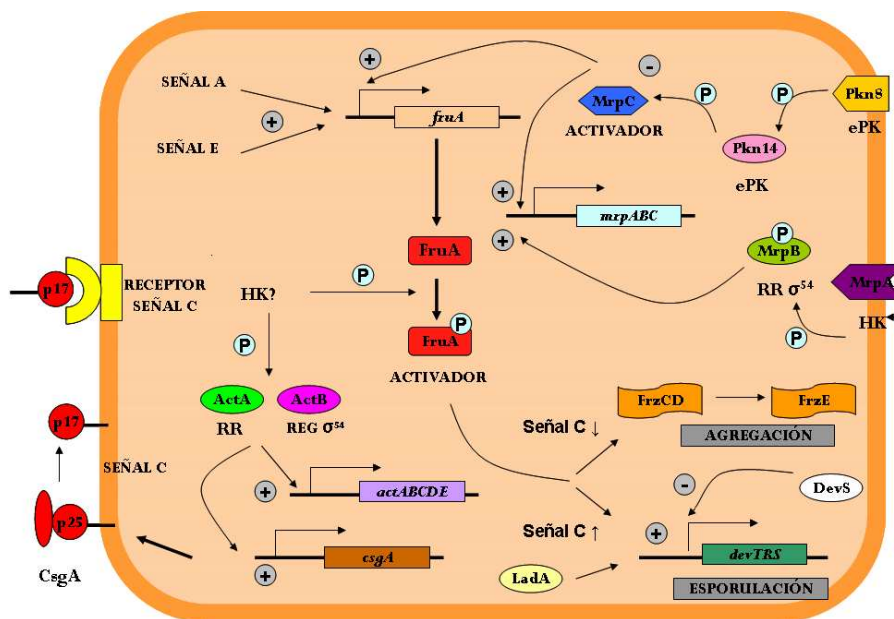


Figura 1.3. Modelo de la ruta de transducción de la señal C en *M. xanthus*. ePK: quinasa de tipo eucariota; HK: histidina quinasa; RR: regulador de respuesta; REG: regulador transcripcional. (Castañeda-García, 2007).

Estas bacterias Gram negativas presentan una fina capa discontinua de peptidoglucano (Dworkin, 1993). En general, son bacterias aerobias quimioorganotrofas (a excepción de algunas especies anaerobias del género *Anaeromyxobacter* como *A. dehalogenans*, con un ancestro aerobio a juzgar por su genoma; Sanford *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2008), mesófilas, que emplean aminoácidos como principal fuente de energía (Bretscher y Kaiser, 1978). Un grupo de especies celulolíticas pertenecientes al género *Sorangium* tienen la capacidad de metabolizar azúcares obtenidos a partir de la degradación de celulosa (Brenner *et al.*, 2005), lo cual no es habitual entre las mixobacterias, que generalmente son incapaces de crecer en presencia de hidratos de carbono como única fuente de carbono y energía (Bretscher y Kaiser, 1978; Watson y Dworkin, 1968). Son productoras de metabolitos secundarios (Weissman y Müller, 2009), entre los que se encuentran disorazoles (Hopkins y Wipf, 2009) o epotilonas producidas por *Sorangium cellulosum*, compuestos anticancerígenos (los últimos se encuentra en un avanzado estado de ensayo clínico; Bode y Müller, 2008), y sintetizan muchas sustancias activas frente a hongos y bacterias (Gerth *et al.*, 2003; Gerth y Müller, 2005). En el caso de *M. xanthus*, más del 8,5 % del genoma está dedicado al metabolismo secundario (Bode y Müller, 2008), porcentaje mayor al 4,5% que dedica otra cepa productora de metabolitos secundarios como *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002).

El genoma de la cepa DK1622 de *M. xanthus* se encuentra disponible en la base de datos de TIGR y NCBI (Goldman *et al.*, 2006). Con un alto contenido en G+C (68,9%) y 9,14 Mb, es uno de los mayores genomas entre procariontes junto a los de otras especies de mixobacterias: *S. cellulosum* (13,03 Mb), *Plesiocystis pacifica* (10,59 Mb) o *Stigmatella aurantiaca* (10,27 Mb). Estos tamaños son bastante mayores que los de cepas como *Escherichia coli* K-12 (4,6 Mb), *Bacillus subtilis* 168 (4,2 Mb), o *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (6,3 Mb), mientras que otros microorganismos con ciclos de vida complejos como *Streptomyces coelicolor* A3(2) alcanzan tamaños de genoma de 8,7 Mb y un alto contenido en G+C (72,1%). Un gran tamaño de genoma se relaciona con elevadas capacidades adaptativas y de respuesta (Konstantinidis y Tiedje, 2004; Lynch y Conery, 2003). La expansión del tamaño del genoma en mixobacterias se ha originado por duplicación génica y posterior divergencia de las nuevas copias, proporcionando el material necesario para la adquisición de nuevas funciones (Gevers *et al.*, 2004; Pushker *et al.*, 2004). El genoma de *M. xanthus* consta de una única molécula de ADN bicatenario circular, con 7380 genes identificados. El ADN codificante representan el 91,1% del total del genoma, lo que indica un fuerte proceso de selección a lo largo de la evolución (Ronning y Nierman, 2008).

*M. xanthus* es capaz de detectar una amplia variedad de señales en el ambiente que le rodea, generando respuestas adaptativas adecuadas gracias a diferentes rutas de señalización en las que intervienen sistemas de dos componentes, Ser/Thr/Tyr quinasas y activadores dependientes de  $\sigma^{54}$  entre otros (Goldman *et al.*, 2006; Jagadeesan *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2008). Como en muchas bacterias, *M. xanthus* sólo posee un factor de la familia sigma-54 (Goldman *et al.*, 2006), con la salvedad de que en este caso es esencial para el crecimiento (Keseler y Kaiser, 1997). En cuanto a la familia sigma-70, el número se eleva a 47 representantes, lo que es algo extraordinario teniendo en cuenta incluso el tamaño de genoma de esta bacteria, y 38 de ellos formarían parte del grupo ECF (Kroos e Inouye, 2008). Este alto número de factores sigma alternativos, sistemas de dos componentes y Ser/Thr/Tyr quinasas va a permitir la respuesta a un gran número de señales de manera específica.

El ciclo de vida en esta bacteria ha sido estudiado en condiciones de laboratorio, sin tener en cuenta compuestos habituales presentes en la naturaleza que pueden influir en su desarrollo. El entorno en el que crece *M. xanthus* puede presentar elevadas concentraciones de metales que resultarían tóxicas, como en el caso del cobre, y por tanto su genoma debe estar capacitado para hacer frente a esa situación. *M. xanthus* posee un alto número de genes relacionados con la homeostasis y regulación del cobre, muchos de ellos redundantes, como es el caso de los sistemas Cus o Czc, ATPasas de tipo P<sub>IB</sub> u oxidasas multicobre (MCOs), que se encuentran por triplicado.

El estudio de la adaptación al cobre en esta bacteria es muy importante e interesante por tres razones:

- 1- Presenta un complejo ciclo de vida que permite estudiar la respuesta al cobre en diversas situaciones, como son el ciclo vegetativo y el proceso de diferenciación que culmina con la formación de cuerpos fructificantes.

- 2- La sensibilidad incrementada al cobre durante el ciclo de desarrollo con respecto al crecimiento vegetativo sugiere la presencia de diferentes procesos implicados en la homeostasis del cobre en las células.

- 3- La respuesta al cobre en *M. xanthus* está relacionada con la inducción de la síntesis de carotenoides cuando el crecimiento tiene lugar en oscuridad (Moraleta-Muñoz *et al.*, 2005).

### 1.2. EL COBRE: DE LA QUÍMICA INORGÁNICA A LA BIOLOGÍA

El descubrimiento del cobre, de número atómico 29 y cuyo símbolo (Cu) proviene del latín (*cuprum*), data de tiempos prehistóricos. Hay piezas de cobre que se fechan entre 9.000 y 7.500 años a.C., encontradas en Turquía e Iraq. Presenta 29 isótopos con masas atómicas que van desde 52 a 80, siendo sólo dos de estos isótopos estables en la naturaleza. Con masas atómicas de 63 y 65, y una proporción del 69,17% y el 30,83% respectivamente, da lugar a que la masa atómica definida para este elemento sea de 63,55 g/mol. El resto son isótopos radiactivos, con períodos de semidesintegración desde 61 horas hasta menos de 1 segundo (Audi, 2003).

Es un elemento de transición con la configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$ . Junto con la plata y el oro forma parte del grupo IB de la tabla periódica, ya que los tres tienen un electrón en un orbital *s* por encima de una capa *d* completa. Esto le hace ser el segundo elemento con más conductividad, después de la plata, y de ahí su amplio uso en la industria eléctrica.

En la mayoría de compuestos que forma presenta estado de oxidación (I) o (II), como  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . Mientras que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  son estables en soluciones acuosas, neutras y expuestas a la atmósfera, los iones  $\text{Cu}^+$  sólo pueden ser mantenidos en soluciones a pH muy ácido o formando complejos (Solioz y Stoyanov, 2003).

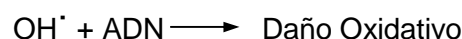
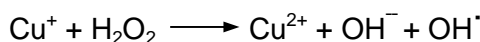
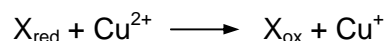
El cobre puede llegar a los suelos a través del agua de alcantarillado, de efluentes de minas, basura,... y se ha utilizado durante más de 100 años como ingrediente activo en bactericidas y fungicidas sobre frutas y vegetales (Rensing y Grass, 2003), siendo muy utilizado aún hoy en día como algicida en la depuración de ciertas aguas o para realizar aleaciones como el latón (Cu-Zn), bronce (Cu-Sn) o alpaca (Cu-Ni-Zn).

Ampliamente distribuido en la naturaleza, presenta una abundancia relativa en la corteza terrestre de 68 ppm (Solioz y Stoyanov, 2003), aunque otros autores proponen una variación de este valor entre las 2 y 100 ppm. Junto a otros metales de transición como el hierro, molibdeno, níquel y zinc, forma parte de un conjunto de nutrientes esenciales. Todos estos elementos juegan papeles importantes en el correcto funcionamiento del metabolismo, y sin unos niveles mínimos muchas de las actividades bioquímicas necesarias podrían detenerse. Pero a niveles excesivamente altos también son perjudiciales, ya que se pueden generar subproductos dañinos y estimular reacciones hidrolíticas que degradan biopolímeros (Outten *et al.*, 2000), y a diferencia de los metabolitos, no se consumen o producen durante las reacciones que llevan a cabo.

El cobre es un elemento especial, ya que es el único metal del grupo IB de la tabla periódica capaz de llevar a cabo reacciones de óxido-reducción *in vivo* (Jin *et al.*, 2008). Debido a las propiedades redox que presenta, es uno de los elementos traza esenciales, explotado por los organismos para llevar a cabo estas reacciones de transferencia de electrones.

Sin embargo, el cobre libre en las células es muy tóxico, y esta potencial letalidad ha inducido la evolución de sofisticados mecanismos para sostener unos niveles adecuados, manteniendo la toma, distribución, expulsión y transporte de cobre

con una estricta regulación (Tottey *et al.*, 2005; Cavet *et al.*, 2003). Puede contribuir a la formación de radicales hidroxilo reactivos en presencia de peróxido de hidrógeno, induciendo daño oxidativo e interfiriendo con importantes procesos celulares (Gaetke y Chow, 2003). El estrés oxidativo se va a generar por un incremento en los niveles de ROS como anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), que pueden dar lugar a daño de los componentes celulares (Nies, 1999; Store y Zheng, 2000), y que van a producirse por reacciones de tipo Haber-Weiss y Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984):



Donde  $X_{\text{red}}$  es un compuesto reducido (ej. glutation) y  $X_{\text{ox}}$  es el mismo compuesto en su estado oxidado.

Se cree que los radicales hidroxilo son responsables de un daño devastador que incluye peroxidación de lípidos en membranas, oxidación directa de proteínas y ruptura de las moléculas de ADN y ARN. Es más, la acción de ROS parece ser uno de los principales detonadores del desarrollo de cáncer, enfermedades del sistema nervioso y del envejecimiento (Halliwell y Gutteridge, 1990). Sin embargo, parece que el cobre intracelular no genera daño oxidativo al ADN en *E. coli* (Macomber *et al.*, 2007), al contrario de lo que siempre se ha pensado por la formación de superóxido o radicales hidroxilo intracelular inducida por este metal (Kimura y Nishioka, 1997; Solioz y Stoyanov, 2003).

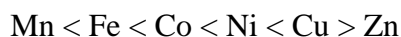
El daño generado cuando las células crecen en presencia de un exceso de cobre se debería a la inducción de otros mecanismos diferentes, siendo la respuesta más específica al metal en sí. Cuando *E. coli* crece en condiciones anaerobias también hay daño generado por cobre, y no se pueden formar estos radicales oxidantes (Outten *et al.*, 2001). Pero también es cierto que catalasas y peroxidadasas se inducen en presencia de altos niveles de cobre (Macomber *et al.*, 2007). De hecho, el daño oxidativo se generaría si el cobre estuviese libre, pero los mecanismos de regulación para este metal son tan eficaces, y las constantes de afinidad de las proteínas que van a unir cobre tan altas, que prácticamente no habrá un átomo libre de cobre en las células excepto en un breve instante tras el contacto con el metal. Se piensa que el exceso de cobre se acumularía principalmente en el periplasma, no incrementando demasiado la concentración en el citoplasma, aunque el efecto sobre un mutante para CopA (que sólo se encarga de transportar cobre del citoplasma al periplasma en *E. coli*), es un aumento de la sensibilidad a altas concentraciones de cobre, por lo que debe darse una sobrecarga de cobre en el citosol (Macomber *et al.*, 2007).

Quizás lo más probable, según defienden Macomber *et al.*, sea que el exceso de cobre se quele por ligandos que bien supriman la generación de radicales hidroxilo o aseguren su formación lejos del ADN. El  $Cu^{2+}$  será rápidamente coordinado y reducido por moléculas con grupos sulfhidrilos, incluyendo glutation y cisteínas (Gorren *et al.* 1996). Mientras que el complejo formado con el  $Cu^+$  resultante puede ser fácilmente oxidado por  $H_2O_2$ , las especies oxidativas que se forman deben aceptar inmediatamente un electrón de los grupos sulfhidrilos que han intervenido en el proceso de coordinación. El resultado sería un fallo en la liberación de radicales hidroxilos, proceso



que sería repetido hasta que se hubieran regulado los niveles de cobre intracelulares. Se ha visto que la adición de dipiridil, un quelante no sulfuroso, amplifica en gran medida la liberación de radicales hidroxilo por exceso de cobre, apoyando fuertemente la idea de que en ausencia de dipiridil, el cobre va a ser coordinado por ligandos que supriman la liberación de estos radicales (Macomber *et al.*, 2007).

Aparte de la formación de ROS, el cobre puede ejercer su efecto tóxico al desplazar a otros metales que actúan como cofactores de enzimas que intervienen en procesos clave de señalización celular, debido a la posición que ocupa en la serie Irving-Williams:



La serie Irving-William determina la afinidad de ligandos orgánicos o inorgánicos por diferentes metales de transición (Irving y Williams, 1953). El cobre es el elemento por el que más afinidad se presenta, por lo que podría sustituir otros metales si su concentración no estuviera estrictamente regulada, alterando la función de numerosas enzimas. Por ejemplo, en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 se ha descrito un sistema de incorporación de metales a dos proteínas periplásmicas que depende de la compartimentalización del plegamiento que sufren estas proteínas (Totter *et al.*, 2008). MncA une  $\text{Mn}^{2+}$ , que según la serie Irving-Williams forma complejos menos estables que el  $\text{Cu}^{2+}$  (Irving y Williams, 1953). De hecho, en este trabajo se demuestra cómo MncA es capaz de unir  $\text{Cu}^{2+}$  *in vitro* preferentemente, a menos que la concentración de  $\text{Mn}^{2+}$  la exceda. Sin embargo, una vez que ha unido  $\text{Mn}^{2+}$  no se va a intercambiar con  $\text{Cu}^{2+}$ . Lo que ocurre es que MncA se segrega por el sistema Tat, de modo que adquiere el metal en el citoplasma, donde la disponibilidad de  $\text{Mn}^{2+}$  es muy mayor que la de  $\text{Cu}^{2+}$ . Por su parte, CucA, la proteína más abundante que une  $\text{Cu}^{2+}$  en el periplasma, es segregada por el sistema Sec y adquiere el metal una vez que está en el periplasma (Totter *et al.*, 2008). Ambas proteínas son cupinas, proteínas con estructura de barril que coordinan metales a través de 3 histidinas y un glutamato (Dunwell *et al.*, 2001).

La sustitución de  $\text{Zn}^{2+}$  por  $\text{Cu}^{2+}$  en el dominio dedos de zinc de unión al ADN del receptor de estrógenos humano le impide reconocer secuencias específicas de ADN *in vitro*, y probablemente interferirá en la transducción de señales dependiente de hormonas *in vivo* (Predki y Sarkar, 1992). En *E. coli*, la delección de un gen denominado *cueO* que codifica para una oxidasa multicobre (que será tratada más adelante), relacionada con el metabolismo del cobre, desencadena una gran sensibilidad a la muerte por toxicidad de este metal cuando las células crecen en un medio de cultivo definido. Esta sensibilidad está relacionada en esta cepa con una acumulación del metal, si bien el crecimiento en presencia de cobre se puede restablecer mediante la adición de iones divalentes como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , pero no por otros metales de transición o  $\text{Mg}^{2+}$ . Esto podría explicarse por la competencia directa que existiría en transportadores de baja especificidad (Tree *et al.*, 2005), o por el reemplazo de iones que puede estar teniendo lugar cuando el cobre está en exceso en diversas proteínas, cuya función se verá comprometida al no estar cargadas con el metal adecuado.

Silver y Phung (2005) defienden que el cobre no va a estar en el interior de la célula como catión libre, y que intracelularmente será casi en exclusividad  $\text{Cu}^+$ . Rae *et al.* habían determinado en 1999 que la cantidad de cobre libre en las células de

*Saccharomyces cerevisiae* es menor a un átomo, y por tanto, el cobre que se inserte en las proteínas que lo necesiten lo hará por medio de otras proteínas, como chaperonas. La mayor parte del cobre que se encuentra en la mitocondria de esta levadura está formando parte de un complejo no proteico soluble de bajo peso molecular, denominado CuL (Winge *et al.*, 2004). Estos complejos aumentan cuando las células están en un medio rico en cobre, encontrándose también en el citoplasma.

Para CueR (un regulador transcripcional de tipo MerR de *E. coli*) se ha demostrado una afinidad por el  $\text{Cu}^+$  libre de orden zeptomolar (Changela *et al.*, 2003). Esto quiere decir que no va a haber ningún átomo libre en el interior de la célula en condiciones normales, lo cual es necesario teniendo en cuenta el daño oxidativo que este ión puede generar a través de la reacción de Fenton (Rowley y Halliwell, 1983), como se ha mencionado anteriormente. Este regulador de tipo MerR presenta dos cisteínas separadas por 8 residuos que coordinan un átomo de  $\text{Cu}^+$  (Changela *et al.*, 2003).

Como es uno de los metales más tóxicos para las células, por las razones expuestas anteriormente, la idea de que pueda existir cobre libre en el citoplasma parece que no es factible, y por tanto éste se va a encontrar unido a proteínas que van a ser las responsables del tráfico intracelular del metal (Finney y Rae *et al.*, 1999).

La detección de cobre y su transporte tienen lugar en ambientes químicamente muy diferentes. Las bacterias Gram negativas, poseen dos tipos de compartimentos: el citosol y el espacio periplásmico. Por su parte, las células eucariotas tienen muchos compartimentos y orgánulos químicamente distintos. El citosol de ambos tipos de células es un ambiente con un potencial de reducción efectivo estimado en -190 a -250 mV (en relación a un electrodo de hidrógeno), y por tanto reductor. Aunque el ambiente del citosol puede variar con el metabolismo celular y los diferentes tipos de estreses a los que estas células pueden verse sometidas, la mayoría mantienen altos niveles (~3 mM) de glutatión (pequeña molécula con grupos tioles), y componentes celulares específicos como las tioredoxinas van a preservar el citosol de células procariotas y eucariotas como un ambiente globalmente reductor. De este modo, las proteínas citosólicas raramente presentarán puentes disulfuro estables, y los motivos ricos en cisteínas de un gran número de proteínas implicadas en el transporte y detección de cobre estarán reducidos, y por tanto disponibles para la unión de  $\text{Cu}^+$  principalmente. Al contrario, el espacio periplásmico, retículo endoplasmático, así como las superficies extracelulares, son por lo general más oxidantes en ambientes aerobios (Davis y O'Halloran, 2008).

Entre las proteínas implicadas en la resistencia al cobre se encuentran las metalotioneínas. Caracterizadas por primera vez en el género de cianobacterias *Synechococcus* (Gupta *et al.*, 1992), se encuentran ampliamente distribuidas en eucariotas. En *S. cerevisiae*, el número de repeticiones del gen *CUP1*, que codifica para una metalotioneína, está directamente relacionado con la resistencia al cobre (Fogel *et al.*, 1983). Son pequeñas proteínas ricas en cisteínas que van a unir metales divalentes como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . El motivo CXC es característico de esta familia (Romero-Isart y Vasak, 2002).

Las proteínas unen metales casi exclusivamente mediante la formación de complejos de coordinación con tres grupos de átomos: S (de Cys y Met), N (de His) y O (de Asp y Glu) (Penella y Giedroc, 2005). En estos complejos de coordinación, los

electrones de valencia se encuentran deslocalizados, moviéndose libremente. Los complejos formados con  $\text{Cu}^{2+}$  en el periplasma a menudo emplean ligandos con bajo número de coordinación (Met), mientras que las Cys, con mayor número de coordinación, son más utilizadas en el citosol (Peariso *et al.*, 2003; Finney y O'Halloran, 2003), formando complejos de coordinación preferentemente con  $\text{Cu}^+$ , más flexible que el  $\text{Cu}^{2+}$  (Vila y Fernández, 2001). Por tanto, la gran mayoría de proteínas citosólicas que unen cobre (CBPs) presentarán cisteínas (Andreini *et al.*, 2008).

### 1.2.1 PAPEL DEL COBRE EN HUMANOS Y ORGANISMOS SUPERIORES

En humanos, el cobre se requiere para el funcionamiento de unas 30 proteínas implicadas en procesos vitales como la respiración, transporte de hierro, protección frente al estrés oxidativo, etc, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa, ceruloplasmina y citocromo oxidasa (Tabla 1.2; Arredondo y Nuñez, 2005; Puig y Thiele, 2002; Thurski y Thiele, 2009). Una dieta deficiente en este metal incrementa la susceptibilidad al daño oxidativo (Gaetke y Chow, 2003), pero a ciertos niveles considerados altos es tóxico, de lo cual se deduce su doble papel y la importancia en el control de la homeostasis de este metal, y demuestra una paradójica propiedad que va a demandar una regulación muy eficaz de sus niveles. Una vez el cobre ha penetrado en las células, se requieren proteínas adicionales para la unión y transporte del mismo, ya que los cationes libres intracelulares pueden resultar muy tóxicos (Rensing y Grass, 2003).

En general, en eucariotas son más conocidos los sistemas relacionados con la toma de cobre que con la destoxicación del metal, proceso más estudiado en procariontes, donde los mecanismos de entrada de metales en muchos casos son desconocidos aún (Ridge *et al.*, 2008). En eucariotas, el transporte de cobre de alta afinidad al interior de las células se da a través de una proteína denominada CTR1, muy conservada desde levaduras hasta humanos (Nose *et al.*, 2006). En *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, se conocen muy bien los mecanismos de transporte de cobre al interior de la célula, llevado a cabo por dos transportadores de alta afinidad como son CTR1 y CTR3 (Dancis *et al.*, 1994; Peña *et al.*, 2000).

Las proteínas que unen cobre juegan papeles importantes en desórdenes con síntomas neurológicos, como la enfermedad de Menkes o de Wilson, en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Brown, 2009; Strausak *et al.*, 2001) y en desórdenes relacionados con la edad (Requena *et al.*, 2001). Tienen una amplia distribución en los organismos aerobios y están implicadas en procesos vitales como la respiración, protección frente al estrés oxidativo, coagulación sanguínea o pigmentación (Puig y Thiele, 2002).

La enfermedad de Menkes es un desorden del metabolismo del cobre, recesivo y ligado al cromosoma X. La proteína MNK relacionada con la enfermedad pierde su actividad, y esto se traduce en un fallo de la transferencia de cobre a través del tracto gastrointestinal, la placenta y la sangre. Como consecuencia, el metal se acumula en células próximas a estos tejidos pero se origina una deficiencia en otros órganos vitales pues se ha limitado su absorción, incluyendo el cerebro (Huffman y O'Halloran, 2001; Strausak *et al.*, 2001; Andrews, 2002).

Por otro lado, la enfermedad de Wilson es un desorden autosómico recesivo del transporte de cobre. Los individuos afectados presentan un exceso en la acumulación de cobre en hígado y cerebro, una deficiencia en ceruloplasmina y marcados problemas en la excreción de cobre por la bilis. La proteína relacionada con la enfermedad (WND) pierde su actividad igual que en el caso de la enfermedad de Menkes, pero esta vez el cobre se acumularía en concentraciones tóxicas en cerebro e hígado, dando lugar a desórdenes neurológicos y hepáticos, pues se ha limitado su expulsión (Huffman y O'Halloran, 2001; Strausak *et al.*, 2001).

Tabla 1.2. Proteínas que unen cobre en eucariotas (Thurski y Thiele, 2009)

Enzima/Proteína	Función	Consecuencia por deficiencia
Cu,Zn Superóxido dismutasa	Eliminación de superóxido	Estrés oxidativo; hepatocarcinoma celular; neurodegeneración
Citocromo Oxidasa	Fosforilación oxidativa; producción de ATP	Déficit en respiración; cardiomiopatía; letalidad
Tirosinasa/Lacasas	Síntesis de melanina; virulencia y patogenicidad en hongos; inmunidad innata	Defectos en la pigmentación/ albinismo; virulencia reducida en hongos
Dopamina $\beta$ -hidroxilasa	Síntesis de noradrenalina	Hipoglucemia; hipotensión
Ceruloplasmina	Ferroxidasa; paso de hierro a transferrina	Aceruloplasminemia: anemia progresiva, neurodegeneración y diabetes
Lisil oxidasa	Formación de enlaces covalentes en colágeno y elastina	Aneurisma aórtico, disfunción cardiovascular
Factores de coagulación V y VIII	Coagulación de la sangre	Hemofilia
Receptor de etileno	Transducción de señales por etileno	Senescencia en las plantas, maduración de los frutos
Ace1	Factor de transcripción de <i>S. cerevisiae</i> activo en condiciones de alta concentración de cobre intracelular	Incapacidad para crecer en un medio con altos niveles de cobre

Ambas enfermedades, ampliamente reconocidas como desórdenes de la homeostasis del cobre (Camakaris *et al.*, 1999), tienen su base en dos proteínas muy relacionadas. MNK y WND (o ATP7a y ATP7b respectivamente), son ATPasas de la familia P<sub>1B</sub>. Estas proteínas transportan metales como Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup> a través de las membranas, y se han identificado tanto en procariotas como en eucariotas

(Argüello *et al.*, 2007). Este tipo de ATPasas acopla la hidrólisis de ATP al transporte de iones, proceso en el que intervienen una serie de residuos conservados (Argüello *et al.*, 2007). Aunque son responsables de los síndromes de Menkes y Wilson por diferentes mutaciones (Lutsenko *et al.*, 2007), parecen guardar más relación con ATPasas mismo tipo en procariontas que con otras de mamíferos (Bull y Cox, 1994). A pesar de que comparten un 55% de homología entre ellas (Cerpa *et al.*, 2005), el efecto que originan es completamente opuesto debido a la expresión diferencial de estas proteínas en distintos tejidos.

La implicación del cobre en el Alzheimer vendría determinada por la alteración de la ceruloplasmina, que es la proteína con mayor contenido en cobre del plasma sanguíneo según algunos autores (Solomon *et al.*, 1996), albergando aproximadamente el 95% del cobre plasmático (Puig y Thiele, 2002). Defectos en esta proteína junto a un elevado nivel de metal daría lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno y a una mayor acumulación de placas de proteína amiloide (Strausak *et al.*, 2001; Cerpa *et al.*, 2005). Algunos autores consideran que la ceruloplasmina actuaría primeramente como ferroxidasa, no siendo tan importante en el transporte del cobre, en el que estaría implicada con mayor probabilidad la albúmina del plasma (Andrews, 2002). De hecho, se han realizado experimentos en los que la falta de ceruloplasmina no hace que se presente ningún defecto en la absorción del cobre (Harris *et al.*, 1999).

La proteína priónica PrP<sup>C</sup> se ha asociado también con el metabolismo del cobre (Brown, 2009; Cerpa *et al.*, 2005; Kralovicova *et al.*, 2009), y presenta una fuerte afinidad por Cu<sup>2+</sup>. También en procesos relacionados con el cáncer se ha identificado un papel para el cobre. La aplicación de la microscopía de fluorescencia de rayos X al estudio de la angiogénesis (neoformación de vasos sanguíneos inducida en procesos tumorales) revela una dramática relocalización del cobre de los compartimentos intracelulares a los márgenes del endotelio durante el crecimiento capilar y formación de red de capilares (Finney *et al.*, 2007).

En Australia, una deficiencia de cobre en ovejas da lugar a un síndrome en estos animales. Esta deficiencia se genera por una interacción del cobre con otros componentes de la dieta como el molibdeno o sulfatos, que hacen que disminuya la absorción de cobre. La solución es dar un suplemento de cobre a estas ovejas, pero los animales son tan sensibles a la toxicidad por cobre que algunos elevan las concentraciones hepáticas del metal, de tal modo que se origina la muerte del animal (Ishmael *et al.*, 1971).

En plantas, el papel del cobre también es muy importante. Recientemente se han identificado unos microARNs implicados en su regulación, lo que demuestra la complejidad en el control de los mecanismos relacionados con la homeostasis del cobre en todos los organismos vivos (Burkhead *et al.*, 2009).

En eucariotas hay diferentes regiones promotoras implicadas en la inducción de la transcripción de genes relacionados con la homeostasis del cobre, como las secuencias MERs (*metal regulatory elements*; Koch y Thiele, 1996), CuREs (*Cu-response elements*; Labbé *et al.*, 1997), o CuSEs (*Cu-signaling elements*; Beaudoin y Labbe, 2001).

### 1.2.2 PAPEL Y RESPUESTA AL COBRE EN PROCARIOTAS

Como se ha comentado anteriormente, los metales son esenciales para el correcto funcionamiento de todos los organismos vivos. En *Pseudomonas putida*, gracias a la disponibilidad del genoma se han identificado 61 ORFs susceptibles de estar relacionados con la tolerancia u homeostasis de metales, además de siete posiblemente implicados en mecanismos de resistencia, algunos de ellos implicados en el metabolismo del cobre (Cánovas *et al.*, 2003). Este metal es imprescindible para el correcto funcionamiento de numerosas proteínas, y sus niveles deben ser estrictamente regulados.

Hasta 2008, se habían caracterizado 10 cuproproteínas en procariontes, incluyendo citocromo c oxidasa, NADH deshidrogenasa, Cu,Zn superóxido dismutasa, nitrosocianina, plastocianina, Cu-nitrito reductasa, Cu-amino oxidasa, metano monooxigenasa particulada (pMMO), CotA y tirosinasa (Ridge *et al.*, 2008). Ninguna de estas proteínas es capaz de sustituir el cobre por otro ión metálico, y su biosíntesis está ligada a una toma de cobre de alta afinidad por los microorganismos que las están sintetizando. Aunque los mecanismos por los que tiene lugar esta toma de cobre son poco conocidos, sobre todo en Gram negativas, recientemente se ha identificado un sistema de toma de cobre de alta afinidad (Lewinson *et al.*, 2009).

En los últimos años, el estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis y tolerancia al cobre en bacterias ha despertado un gran interés en la comunidad científica debido a varios motivos. El primero es que al ser organismos sencillos se pueden manipular fácilmente y por tanto es más rápida y simple la caracterización de los genes y proteínas implicados en dicha homeostasis. En segundo lugar, se han descrito en algunas bacterias patógenas algunos factores de virulencia que son proteínas implicadas en el metabolismo del cobre (Gat *et al.*, 2005; Francis y Thomas, 1997). Por último, debido a que el cobre está presente en todos los medio ambientes tales como el suelo, agua, etc., se ha producido una selección de aquellas bacterias con mecanismos que ayudan a las células a la adaptación frente a diferentes concentraciones de este metal. De hecho, en los últimos años se está extendiendo el uso del cobre como biocida en veterinaria, agricultura y algunas industrias, con lo que están apareciendo cepas que presentan una gran resistencia a este metal, algunas de las cuales podrían ser patógenas de animales o plantas. Pero además, algunos investigadores han propuesto el uso del cobre como mecanismo de control bacteriano en caso de cepas que han adquirido múltiples resistencias a antibióticos (Osman y Cavet, 2008).

Los mecanismos de adaptación al cobre en procariontes son muy diversos, incluso se conoce casos en los que el mismo género presenta diferente sensibilidad al metal (Stuart, 2009), pero en general para alcanzar una adecuada homeostasis del cobre las bacterias llevan a cabo de tres procesos:

- 1- Exporte e importe de cobre
- 2- Destoxificación
- 3- Transformación del metal a una forma menos tóxica

Para coordinar todos estos sistemas, las células deben poseer reguladores transcripcionales capaces de sentir diferentes niveles de cobre y de diferenciarlo de

otros metales y disparar las respuestas fisiológicas adecuadas gracias a la acción de diversas proteínas. En bacterias, las principales familias de proteínas capaces de llevar a cabo tales procesos son:

- ATPasas de tipo P<sub>1B</sub>: proteínas transmembrana que usan la hidrólisis del ATP como energía para exportar Cu<sup>+</sup> desde el citoplasma al espacio periplásmico en bacterias Gram negativas, o al exterior en Gram positivas.
- Bombas de eflujo de tipo CBA. Este tipo de proteínas están implicadas en eflujo de metales, xenobióticos, antibióticos, etc. Están formadas estructuralmente por tres proteínas que actuando de forma coordinada y son capaces de exportar cobre desde el citoplasma y/o periplasma hasta el exterior. Las bombas de eflujo implicadas directamente en el transporte de cobre se denominan Cus, y se diferencian sólo en algunos aminoácidos de las implicadas en el transporte de otros metales, tales como el Cd, Zn o Co, a las que se conoce con el nombre de Czc.
- Oxidasas multicobre (MCOs): proteínas capaces en Gram negativas de detoxificar el espacio periplásmico, generalmente mediante la oxidación del Cu<sup>+</sup>, muy tóxico, a Cu<sup>2+</sup>, menos tóxico.

En bacterias Gram positivas, los mecanismos de homeostasis y resistencia al cobre han sido ampliamente estudiados en *Enterococcus hirae* (Solioz y Stoyanov, 2003). En esta bacteria se ha descrito un operón formado por un regulador transcripcional (*copY*), dos ATPasas con funciones diferentes (*copA* y *copB*) y una chaperona del cobre (*copZ*), conservado entre especies relacionadas con *E. hirae* (Portmann *et al.*, 2006). La ATPasa CopA está implicada en la toma de cobre, mientras que CopB lo está en su expulsión (Figura 1.4).

Este operón *cop* tiene una doble regulación: para alta y baja concentración de cobre (Wunderli-Ye y Solioz, 1999). Esto no es de extrañar, pues en el mismo operón se codifica una ATPasa implicada en la toma de cobre y otra en la expulsión de éste. Además deben existir otros componentes implicados en la regulación de las concentraciones intracelulares de cobre en diversas situaciones, ya que un mutante para *copA* resulta muy sensible al crecimiento en condiciones de baja concentración de cobre (puesto que esta proteína es la encargada de introducir Cu en ese estado), y sin embargo las células crecen sin problemas cuando se adiciona un exceso de cobre (Solioz y Stoyanov, 2003). Se propone que en esta situación el cobre pueda penetrar por difusión pasiva, no siendo necesaria la captación activa.

Los sistemas de resistencia al cobre en bacterias Gram positivas y negativas son diferentes, debido principalmente a la presencia del espacio periplásmico en el segundo grupo. Mientras que en Gram positivas parece ser suficiente la presencia de ATPasas que expulsan cobre al exterior, en bacterias Gram negativas se requieren otros complejos proteicos, como se ha comentado anteriormente. En este grupo de bacterias, las ATPasas sólo expulsarían el metal fuera del citoplasma. En el espacio periplásmico intervendrían, además, MCOs y sistemas Cus. *E. coli* presenta una ATPasa que expulsa el metal fuera del citoplasma (CopA), una MCO en el espacio periplásmico (CueO) y un sistema Cus (CusCFBA). En la figura 1.4 se recoge un esquema de los mecanismos generales de regulación del cobre en una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa.

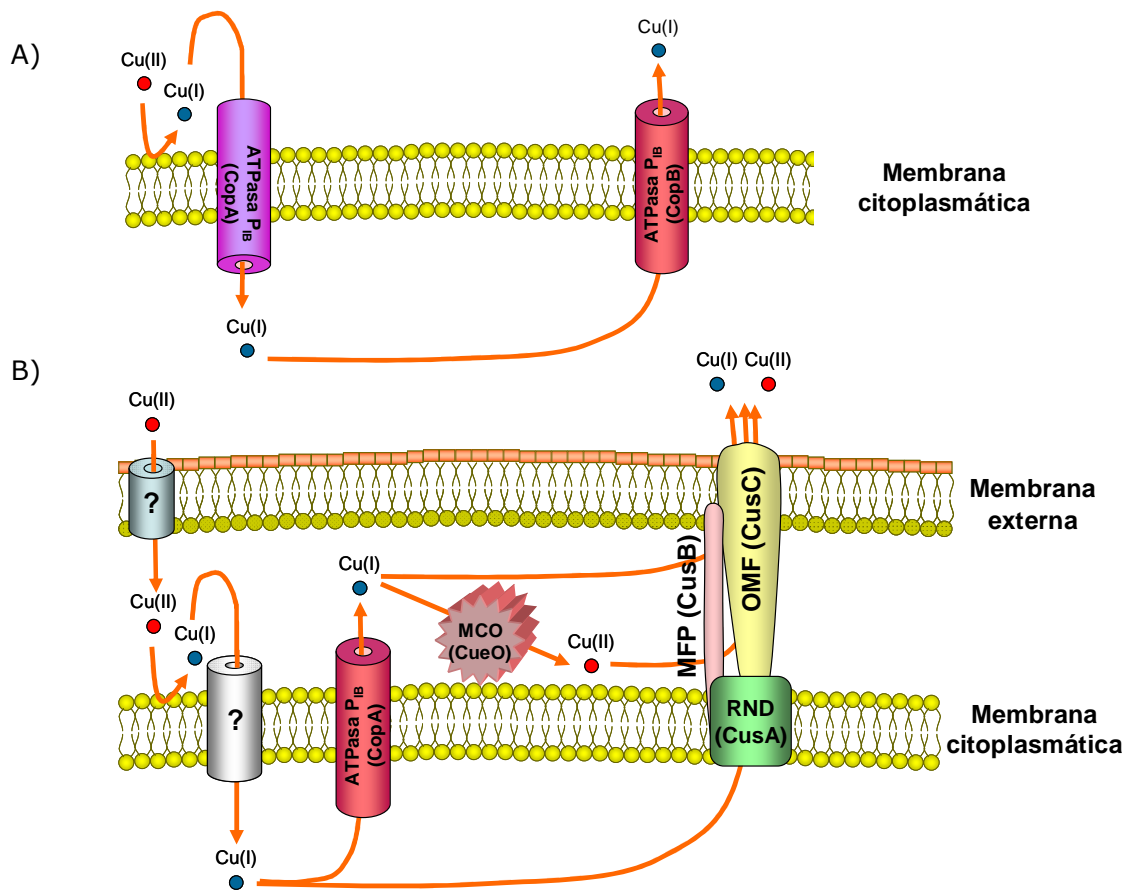


Figura 1.4. Homeostasis del cobre en A) una bacteria Gram positiva (*E. hirae*) y B) una bacteria Gram negativa (*E. coli*). El sistema Cus pertenece a la familia de transportadores CBA, y generalmente presenta tres proteínas estructurales: RND (transportador central. *Resistance, nodulation and cell division*); MFP (proteína de fusión a la membrana); OMF (factor de la membrana externa). Las proteínas que introducen cobre en la célula son desconocidas, pudiendo penetrar por difusión.

El estado de las células es muy importante en la sensibilidad que éstas presentan frente al cobre, como se ha demostrado en el caso de *E. coli*. Cuando las células crecen en condiciones anaerobias son más sensibles al metal que cuando lo hacen en presencia de oxígeno (Outten *et al.*, 2001). Los sistemas implicados en la regulación de la homeostasis del cobre presentan diferente regulación en condiciones de anaerobiosis, lo que indica que el estado fisiológico de las células va a tener un papel importante en la tolerancia al cobre. También se ha visto que en una cepa portadora de una delección para *cueO* desciende la tolerancia al cobre unas 50 veces cuando las células crecen en un medio mínimo (Grass y Rensing, 2001a; Tree *et al.*, 2005).

Además de los elementos anteriormente citados (ATPasas, bombas de eflujo y MCOs), se han descrito otras proteínas tales como chaperonas del cobre que son capaces de unir este metal y transportarlo hasta otras proteínas de forma específica (Finney *et al.*, 2007). Las concentraciones de metales de transición que mantienen las células en su interior pueden parecer tóxicas. Pero estos elementos están unidos a metaloproteínas siguiendo un mecanismo de regulación muy estricto que evita que generen algún daño a las células (Finney y O'Halloran, 2003). Las concentraciones de cobre libre en el citoplasma, teniendo en cuenta el número de proteínas con alta, media y baja afinidad que se encuentran en él, van a ser tan bajas que es casi imposible que una nueva proteína que está siendo sintetizada incorpore un solo átomo de cobre sin la



ayuda de una proteína accesoria que se lo transfiera, como chaperonas del cobre (Finney *et al.*, 2007).

Asimismo parecen tener un importante papel en bacterias metanotrofas otras proteínas denominadas metanobactinas. Son capaces de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , y aunque no se conoce el mecanismo por el que lo hacen, se propone un acoplamiento a la formación de un enlace disulfuro (Balasubramanian y Rosenzweig, 2008; Hakemian *et al.*, 2005). Incluso se han descrito otras proteínas tales como Dps en *E. coli*, implicadas en la protección frente a altos niveles de cobre, aunque su función principal sea otra (Thieme y Grass, 2009).

En el caso de *M. xanthus*, como se ha comentado anteriormente, mediante análisis “in silico” hemos detectado: i) seis bombas de eflujo de tipo CBA, tres de ellas de tipo Cus y tres CzCs, ii) tres ATPasas de tipo P<sub>IB</sub>, implicadas en el transporte de cobre, iii) tres MCOs, dos de las cuales son objeto de estudio de la presente tesis y una tercera que ha sido estudiada por M.C. Sánchez-Sutil, iv) dos sistemas de dos componentes y un regulador transcripcional implicados en la regulación de varios de los genes estructurales descritos, v) varias proteínas no caracterizadas que presentan dominios de unión al cobre y que podrían funcionar como chaperonas del cobre.

La coexistencia de este gran número de genes parálogos y el hecho de que el cobre induce en *M. xanthus* otro importante proceso fisiológico como es la carotenogénesis (Moraleda-Muñoz *et al.* 2005), indica que la respuesta al cobre en *M. xanthus* va a ser mucho más complicada que en el resto de procariontes. Esto probablemente se deba a que a lo largo de su complejo ciclo de vida las células tienen que coordinar todos sus mecanismos para adaptarse al cobre. Todas estas evidencias hacen que la bacteria *M. xanthus* sea un excelente modelo para dilucidar cómo las bacterias se adaptan a concentraciones variables de cobre en la naturaleza.

### 1.3. OXIDASAS MULTICOBRE (MCOs)

Las MCOs (*multicopper oxidases*) son proteínas que forman una familia de enzimas con capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos. El primer miembro de esta familia fue caracterizado en 1883 por Yoshida en *Rhus vernicifera* (el árbol de la laca, de ahí el nombre lacasa), lo que la ha consagrado como una de las enzimas más antiguas que se han descrito.

La familia MCOs, ampliamente distribuida en todos los reinos (Alexandre y Zhulin, 2000; Claus, 2003), está compuesta por lacasas (EC1.10.3.2), ascorbato oxidasa (EC1.10.3.3), y ceruloplasmina (ferroxidasas; EC1.16.3.1). En mamíferos, la ceruloplasmina es una glicoproteína sérica que funciona como ferroxidasa, catalizando el paso de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta enzima transporta el 95% del cobre plasmático (Puig y Thiele, 2002; Solomon *et al.*, 1996). La ascorbato oxidasa lleva a cabo la reacción de oxidación del ácido ascórbico.

Un análisis filogenético de más de 350 MCOs de hongos, insectos, plantas y bacterias ha proporcionado la base para redefinir una clasificación de esta familia de enzimas en lacasas en sentido estricto (de basidio y ascomicetos), lacasas de insectos, MCOs pigmentarias de hongos, ferroxidasas fúngicas, ascorbato oxidasas, MCOs similares a lacasas de plantas, y bilirrubina oxidasas (Hoegger *et al.*, 2006). La

asociación entre las distintas enzimas de esta nueva clasificación parece tener más que ver con el tipo de hábitat de cada organismo que con la relación filogenética entre especies.

Estas enzimas presentan diversos dominios implicados en la unión de átomos de  $\text{Cu}^{2+}$ , muy importantes para llevar a cabo su función gracias a la capacidad de intervenir en reacciones de tipo redox. En base a la organización de los diferentes dominios de unión al cobre y sus funciones, se ha realizado otra clasificación en la que se plantea la división en tres grupos: tipo nitrito reductasa (con dos dominios), tipo lacasa (con tres dominios) y tipo ceruloplasmina (con seis dominios), (Nakamura y Go, 2005; Terzulli y Kosman, 2009). El segundo y el tercer grupo se conocen comúnmente como MCOs. La rápida acumulación de secuencias de genomas en los últimos años ha revelado la existencia de nuevos tipos de proteínas que contienen estos dominios de unión al cobre, principalmente en bacterias.

Se han clasificado tres tipos de centros o dominios de unión a cobre para estas proteínas, según sus propiedades espectroscópicas (Alexandre y Zhulin, 2000; Dittmer *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 1996). Los centros tipo 1 (T1) unen un solo ión cobre y presentan un máximo de absorción en su estado oxidado a 600 nm, que da a estas proteínas su característico color azul. Los centros tipo 2 (T2) también unen un solo ión cobre, pero no muestran un patrón de absorción en el espectro visible. Los centros tipo 3 (T3) unen dos iones cobre y tienen un fuerte máximo de absorción a 330 nm. Las lacasas unen generalmente 4 iones cobre, uno en el centro T1 y tres en el centro híbrido T2/T3. El Cu del centro T1 se une al enzima generalmente mediante dos residuos de histidina y uno de cisteína, y actúa como aceptor de electrones desde el sustrato. Estos electrones serán transferidos al centro T2/T3, donde ocho residuos de histidina actuarán como ligando para los tres átomos de cobre restantes (uno de tipo 2 y dos de tipo 3), y tendrá lugar la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua (reacción básica de la cual derivan todas sus actividades), completando un ciclo catalítico (Dittmer *et al.*, 2004; Rensing y Grass, 2003; Sakurai y Kataoka, 2007; Solomon *et al.*, 1996).

En la figura 1.5 se puede observar un alineamiento de varias MCOs donde se muestran los residuos implicados en la unión del cobre que se encuentran localizados en cuatro dominios.

Proteína/Número A	2 3		3 3		1 2 3			3 1 3 1																										
	I					II				III			IV																					
CumA/AAL04024	T	T	H	W	H	G	I	G	S	Y	W	H	P	H	V	H	P	I	H	L	H	G	W	M	F	H	C	H	V	I	D	H		
CopA/P12374	T	S	I	H	W	H	G	I	G	T	Y	W	H	S	H	S	H	P	I	H	L	H	G	W	A	Y	H	C	H	L	L	Y	H	
PcoA/Q47452	T	S	I	H	W	H	G	I	G	T	Y	W	H	S	H	S	H	P	I	H	L	H	G	W	A	Y	H	C	H	L	L	Y	H	
CueO/P36649	T	T	L	H	W	H	G	L	A	T	C	W	F	H	P	H	Q	H	P	F	H	I	H	G	Y	M	A	H	C	H	L	L	E	H
EpoA/BAB64332	A	S	L	H	V	H	G	V	G	Y	W	H	Y	H	D	H	V	H	T	F	H	I	H	G	W	M	Y	H	C	H	V	Q	S	H
PhsA/Q53692	S	V	T	H	L	H	G	A	T	Q	W	W	Y	H	D	H	A	H	P	M	H	I	H	L	F	M	Y	H	C	H	L	L	E	H
CotA/P07788	T	V	V	H	L	H	G	G	A	I	L	W	Y	H	D	H	A	H	P	I	H	L	H	L	Y	V	W	H	C	H	I	L	E	H
Lacasa B/AAL07440	T	S	I	H	W	H	G	L	G	T	F	W	Y	H	S	H	F	H	P	F	H	L	H	G	W	F	L	H	C	H	I	D	F	H
Lacasa I/AF118267	T	S	I	H	W	H	G	F	G	T	F	W	Y	H	S	H	L	H	P	F	H	L	H	G	W	F	F	H	C	H	I	E	F	H
Lacasa/CAE00180	T	S	I	H	W	H	G	I	G	T	S	W	Y	H	S	H	F	H	P	M	H	L	H	G	W	L	F	H	C	H	I	A	W	H

Figura 1.5. Alineamiento de los 4 dominios del cobre de MCOs de bacterias y hongos. Los residuos de histidina y cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre han sido numerados de acuerdo con centro del cobre del que forman parte (1:T1; 2:T2; 3:T3). Los residuos invariables en todas las proteínas se muestran sobre fondo rojo, verde, azul o amarillo, según formen parte de los motivos I, II, III o IV respectivamente. Los residuos conservados en al menos 5 de las 10 proteínas alineadas se muestran sobre fondo gris. Número A: número de acceso.

Las lacasas (benzenediol:O<sub>2</sub> oxidoreductas, *p*-difenol oxidasas) oxidan fenoles, polifenoles y otros sustratos aromáticos y no fenólicos, formándose radicales reactivos como resultado de esta actividad (Claus, 2003; Dittmer *et al.*, 2004). Las lacasas más estudiadas son las fúngicas, en las que se ha determinado que están implicadas en la síntesis de antibióticos, factores de virulencia y lignificación de paredes celulares (Richardson *et al.*, 2000). Pueden oxidar una gran variedad de compuestos debido a su baja especificidad de sustrato, presentando un gran potencial biotecnológico.

La toma de hierro de alta afinidad en levaduras se lleva a cabo mediante un sistema formado por la ferroxidasa Fet3p (una MCO) y la permeasa Ftr1p, ambas implicadas en la homeostasis del cobre (Bonaccorsi di Patti *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2003). Fet3p es una proteína de membrana integral con un único dominio transmembrana. La importancia de esta enzima en la levadura del pan sugiere la unión del metabolismo del hierro y cobre (Eide, 1997; Taylor *et al.*, 2005).

Aunque el nombre lacasa se utiliza para denominar principalmente proteínas de esta familia en hongos, las enzimas que poseen tres dominios de unión al cobre de otros organismos como bacterias e insectos también se denominan lacasas, debido a que generalmente tienen actividad oxidasa frente a compuestos aromáticos (Nakamura y Go, 2005).

En insectos, las lacasas de *Manduca sexta* y *Anopheles gambiae* MsLac1, MsLac2 y AgLac1, juegan un importante papel en la esclerotización de la cutícula por oxidación de catecoles en la misma a partir de quinonas. Las tres poseen 10 histidinas y una cisteína que forman los centros de unión al cobre, así como una metionina en el centro T1 (Dittmer *et al.*, 2004).

El descubrimiento de estas enzimas en procariotas es relativamente reciente (Givaudan *et al.*, 1993), y su clasificación y funciones aún generan cierta controversia (Hoegger *et al.*, 2006). La primera “lacasa bacteriana” fue descrita en la bacteria Gram negativa del suelo *Azospirillum lipoferum*, y se dijo que podría estar implicada en el proceso de melanización (Givaudan *et al.*, 1993). Desde entonces se han descrito numerosas “lacasas bacterianas”: en *Campylobacter jejuni* se ha demostrado la presencia de una MCO implicada en la homeostasis del cobre; en *Leptothrix discophora* SS-1 se ha descrito una MCO implicada en la oxidación de Mn, en la que el hierro juega un papel fundamental en su actividad; en el patógeno oportunista *P. aeruginosa* también se ha descrito una MCO implicada en la patogenicidad de esta bacteria, cuyo papel está relacionado con el metabolismo del hierro (El Gheriany *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2008; Huston *et al.*, 2002).

Las bacterias Gram negativas deben proteger su citoplasma del posible daño causado por el efecto de elevados niveles de ciertos metales, pero también deben proteger un compartimento imprescindible para ellas como es el espacio periplásmico. CueO es una oxidasa codificada por el genoma de *E. coli*, con sitios de unión múltiple al cobre y actividad tipo lacasa, que protege el periplasma del daño inducido por cobre (Grass y Rensing, 2001a; Rensing y Grass, 2003).

CueO (Fig. 1.6) tiene una excelente actividad oxidasa de Cu<sup>+</sup>, que será central en el mecanismo por el cual protege a *E. coli*, ya que funciona *in vivo* oxidando Cu<sup>+</sup> a Cu<sup>2+</sup> en el periplasma (Grass y Rensing, 2001b; Roberts *et al.*, 2002; Sinhg *et al.*, 2004; Tree

*et al.*, 2005). Su expresión está controlada por CueR, un regulador activado por niveles intracelulares de  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Ag}^+$ , y está relacionada con la respuesta a diferentes concentraciones de cobre externo, exportándose mediante el sistema Tat al periplasma con el cobre unido a sus sitios activos, contribuyendo así a la destoxificación del metal en el citoplasma (Munson, *et al.* 2000; Petersen y Möller, 2001; Rensing y Grass, 2003; Yamamoto e Ishihama, 2005).

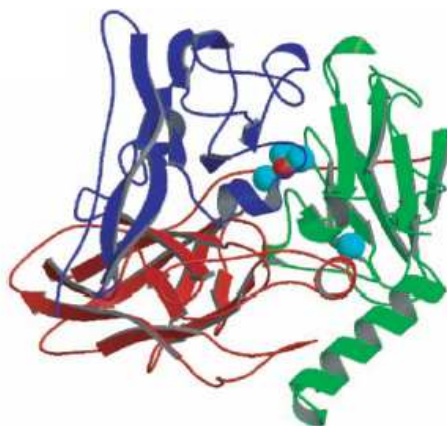


Figura 1.6. Imagen de CueO donde se observan los cuatro átomos de cobre en los centros T1 y T2/T3 representados como bolas azules. En el centro híbrido T2/T3 aparece también representado un átomo de oxígeno en rojo (Roberts *et al.*, 2002).

La proteína CotA de *B. subtilis* está implicada en la formación de la cubierta de las esporas originadas por esta bacteria (Hullo *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002). CotA es una proteína parecida a CueO de *E. coli*, y se ha sugerido que es responsable de la generación de pigmentos tipo melanina para la protección contra la radiación UV (Hullo *et al.*, 2001). Otras enzimas de esta familia también están implicadas en procesos de pigmentación, como en *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus sphaericus*, *Marinomonas mediterranea*, y *Streptomyces griseus* (Claus, 2003; Sanchez-Amat y Solano, 1997). La producción de compuestos coloreados para proteger a las células del daño oxidativo es algo común entre las bacterias. En *P. syringae*, por ejemplo, la síntesis de alginatos se induce por Cu, y estos le proporcionan un color azul brillante a las bacterias, protegiendo las células frente al estrés producido por especies reactivas de oxígeno (Keith y Bender, 1999). Los alginatos pueden formar sales con diversos compuestos, entre ellos con metales pesados como el Cu, formando sales insolubles en agua y contribuyendo así a reducir la toxicidad por este metal.

En *E. coli* y *Pseudomonas syringae* se han descrito dos plásmidos (*pco* y *cop* respectivamente) que codifican proteínas que incrementan la resistencia a la toxicidad por altas concentraciones de cobre, entre las que se encuentran dos MCOs como son PcoA o CopA (Outten *et al.*, 2000). Si el incremento de cobre agota los mecanismos cromosómicos para controlar su concentración, se disparan los mecanismos codificados por plásmidos, de modo que ésta sería la última vía de escape para destoxificar el metal (Finney y O'Halloran, 2003).

PcoA y CueO presentan una región rica en metioninas en su secuencia aminoacídica, que formaría parches hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Esta región podría estar implicada en la interacción proteína-proteína para formar dímeros (Wernimont *et al.*, 2003).

Por tanto, esta familia de enzimas ampliamente distribuidas va a desempeñar diferentes papeles gracias al amplio abanico de sustratos sobre los que pueden actuar, relacionándose con procesos muy diversos pero importantes para el desarrollo de numerosos organismos vivos. El término metalooxidasa está siendo ampliamente utilizado para diferenciar las enzimas de esta familia que son capaces de oxidar metales, como McoA de la bacteria hipertermófila *Aquifex aeolicus* (Fernandes *et al.*, 2007 y 2009). Sólo unos cuantos miembros descritos presentan una gran afinidad por iones metálicos como  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ , y las metalooxidasa mejor estudiadas son la proteína Fet3p de levaduras, ceruloplasmina humana y CueO de *E. coli* (Grass y Rensing, 2001a; Nakamura y Go, 2005; Quintanar *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2005).

Las lacasas, debido a su baja especificidad de sustrato presentan un gran potencial biotecnológico. Quizá la aplicación más conocida sea en la industria del papel y de la pasta, donde se utiliza para el blanqueo y modificación de las fibras. Sin embargo, se ha demostrado su eficacia en la decoloración y detoxificación de diferentes tipos de efluentes industriales tales como los derivados de la industria textil o los residuos de la industria olivarera (Mayer y Staples, 2002; Pérez y Moraleda-Muñoz, 2009; Raghukumar *et al.*, 2008; Riva, 2006). Las lacasas se emplean con éxito también en procesos de biorremediación de compuestos xenobióticos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). En los últimos años, se ha demostrado que pueden ser muy útiles en otros procesos como la polimerización enzimática y funcionalización de polímeros, incluso se aplica como catalizador biológico en la síntesis de compuestos farmacéuticos tales como la producción de nuevos antibióticos, derivados de hormonas o fármacos anticancerígenos (Kunamneni *et al.*, 2008; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006). Se utilizan asimismo en la estabilización de vinos y cerveza (en industria agro-alimentaria), en el procesado de zumos y en la modificación de la masa en productos de confitería (Minussi, *et al.*, 2002). Incluso se ha demostrado su utilidad en investigación para la regeneración de protoplastos en tabaco (De Marco y Roubelakis-Angelakis, 1997).

Como se ha comentado, algunas de las oxidasa multicobre de origen bacteriano presentan también capacidad para oxidar diferentes tipos de compuestos aromáticos. Debido a las grandes ventajas que presentan éstas “lacasas bacterianas” sobre las clásicas “lacasas fúngicas”, como es la facilidad de expresión en sistemas heterólogos y la potencial variabilidad debida a la versatilidad procariótica, en los últimos años ha habido un gran interés en las aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas de origen procariota. Así, se demostró la eficacia de una MCO de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 en la decoloración de pasta papelera y de otra MCO de *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 en la decoloración de colorantes textiles (Arias *et al.*, 2003; Molina-Guijarro *et al.*, 2009). También se están llevando a cabo muchos estudios sobre la aplicabilidad de CotA de *B. subtilis* en la biotransformación de diferentes tipos de colorantes sintéticos (Brissos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Es necesario profundizar en el estudio de MCOs de origen bacteriano, pues la versatilidad que los microorganismos presentan en cuanto a condiciones de crecimiento se refiere puede proporcionarnos nuevas aplicaciones de estas enzimas.

## 1.4. TRANSCRIPCIÓN EN PROCARIOTAS

### 1.4.1 METALSENSORES

Hay una serie de proteínas procariotas en las que se ha demostrado la unión al ADN de un modo dependiente de metales (el cobre entre ellos), como algunos reguladores transcripcionales (Giedroc y Arunkumar, 2007; Penella y Giedroc, 2005). Estos “receptores de metales” especializados presentan sitios de coordinación que han evolucionado de tal manera que son capaces de “sentir” iones metálicos tan específicamente que son capaces de mediar en respuestas adaptativas frente a diversos tipos de estreses de un modo totalmente selectivo (Giedroc y Arunkumar, 2007).

Estudios estructurales han revelado la existencia de 7 familias distintas de metalosensores. Entre todos sus miembros son capaces de detectar seis elementos de transición esenciales desde un punto de vista biológico (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn), así como cuatro metales pesados (Ag, Au, Cd y Hg). Otros elementos como el Pb, As, Sb y Bi también son reconocidos. Generalmente los metales que reconocen van a estar asociados a los procesos que regulan, y el análisis de las estructuras de los miembros de estas familias ha revelado que funcionan como homo-oligómeros de dímeros o tetrámeros (Liu et al., 2008; Penella y Giedroc, 2005).

La familia de reguladores MerR está implicada en numerosos procesos relacionados con metales, ya sea en su detoxificación, toma, eflujo u homeostasis, en respuesta a la presencia de un determinado metal en el citoplasma (Hobman, 2007). Las proteínas de la familia MerR actúan de la siguiente forma: generalmente están unidos al ADN, permitiendo la transcripción desde promotores no muy activos. Sin embargo son capaces de activar la expresión génica provocando un cambio de conformación en el ADN cuando unen un metal específicamente, lo que permite a la ARN polimerasa iniciar la transcripción de manera muy eficaz (Fig. 1.7; Brown *et al.*, 2003; Hobmann, 2007). En *Salmonella enterica* y *Cupriavidus metallidurans* CH34 se han descrito reguladores de tipo MerR que reconocen específicamente  $\text{Au}^+$  (Checa *et al.*, 2007; Jian *et al.*, 2009). Algunos miembros de esta familia presentes en *E. coli* se han caracterizado (Changuela *et al.*, 2003), como ZntR que une específicamente  $\text{Zn}^{2+}$  y CueR, que reconoce  $\text{Cu}^+$  pero también puede unir  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Au}^+$ , y regula la ATPasa CopA y la MCO CueO (entre otros) en respuesta a estrés por cobre (Rensing y Grass, 2003). La estructura de ambos es similar, con un motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN, un dominio de dimerización y un dominio de contacto con el metal (Changuela *et al.*, 2003), y la interacción entre los reguladores de tipo MerR y el complejo ARN polimerasa es directa (Kulkarni y Summers, 1999).

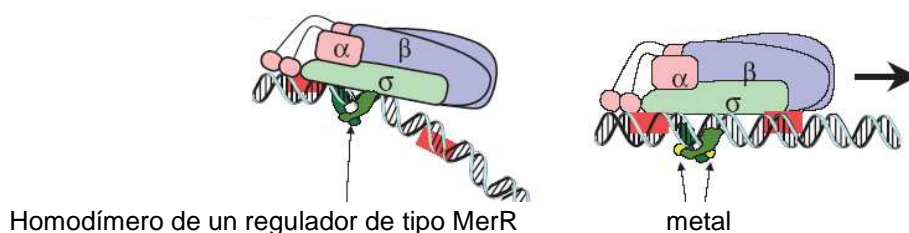


Figura 1.7. Mecanismo general de actuación de los reguladores de tipo MerR (Hobman, 2007). La transcripción tendrá lugar cuando el metal se une al homodímero del regulador MerR. Los cuadrados rojos indican las regiones promotoras -10 y -35, que serán reconocidas por la ARN polimerasa. La flecha negra indica el sentido en que tiene lugar la transcripción.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las familias ArsR/SmtB, CsoR y CopY se caracterizan por ser represores transcripcionales. Su mecanismo de acción es diferente al de los miembros de la familia MerR. En este caso se van a unir al ADN bloqueando la transcripción de ciertos genes. Cuando unen el metal por el que presentan afinidad, van a liberar la doble hélice permitiendo que se inicie la transcripción. ArsR y SmtB fueron los dos primeros miembros descritos en su familia, el primero de ellos perteneciente a *E. coli* (Wu y Rosen 1993) y el segundo a *Synechococcus* PCC 7942 (Morby *et al.*, 1993).

Por su parte, las familias Fur, DtxR y NikR regulan genes que codifican para proteínas implicadas en la toma de iones metálicos. Por tanto, los miembros de estas familias actuarán como represores, uniéndose al metal cuando se encuentra en exceso, lo que permitirá su unión al ADN y la inhibición de la transcripción de los genes que regulan, para que no incremente la captación de iones.

La figura 1.8 resume las 7 familias de metalosensores, sus funciones así como los elementos metálicos que unen. La búsqueda de este tipo de elementos reguladores en el genoma de *M. xanthus* ha permitido identificar 8 de tipo ArsR, 2 de tipo MerR, 1 de tipo CsoR, 3 de tipo CopY, y 2 de tipo Fur.

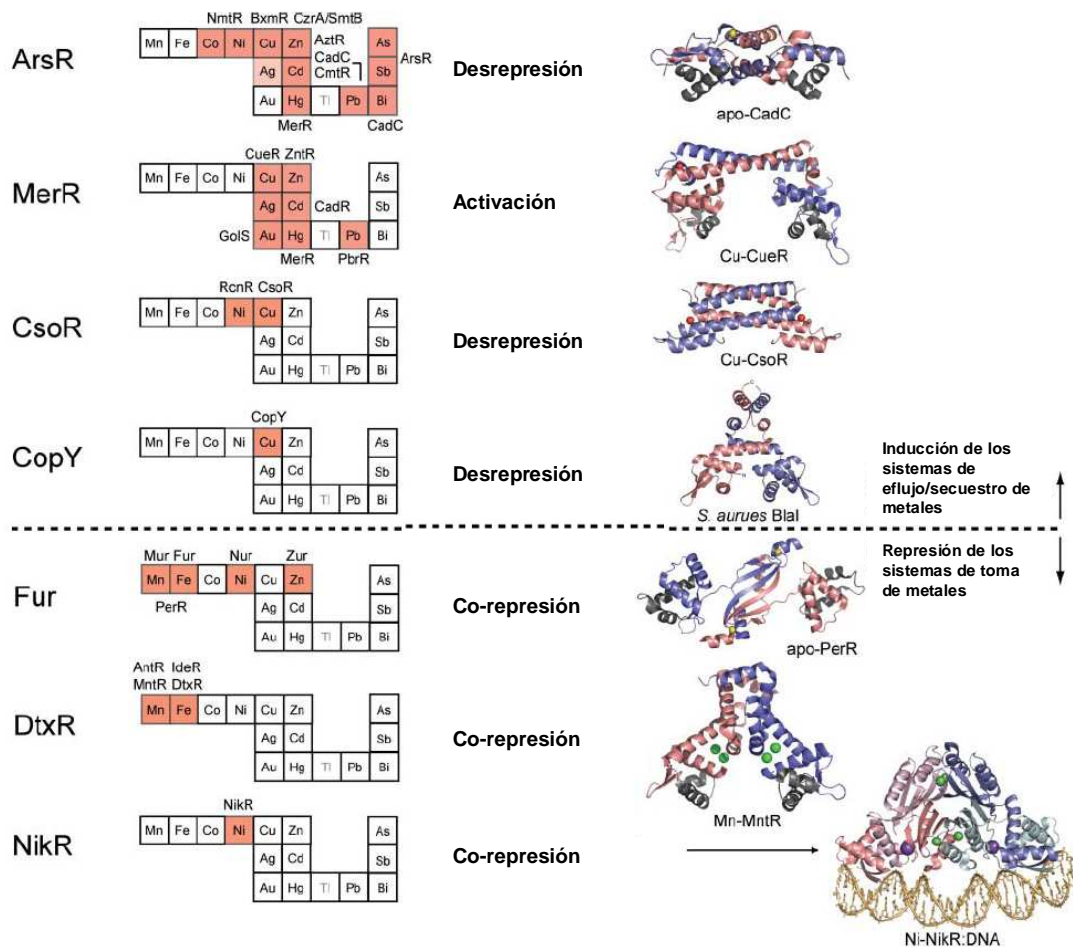


Figura 1.8. Familias de metalosensores. Los metales reconocidos por las proteínas de cada familia están sombreados en rojo. Las representaciones de las estructuras corresponden a *Staphylococcus aureus* (apo-CadC con iones  $Zn^{2+}$  representados en amarillo); *E. coli* (CueR con iones  $Cu^+$  en rojo); *Mycobacterium tuberculosis* (CsoR con iones  $Cu^+$  en rojo); *S. aureus* (BlaI como modelo de tipo CopY); *Bacillus subtilis* (apo-PerR con iones  $Zn^{2+}$  en amarillo); *B. subtilis* (MntR con iones  $Mn^{2+}$  en verde); *E. coli* (NikR con iones  $Ni^{2+}$  en verde e iones  $K^+$  reguladores en morado).

Hay bacterias muy resistentes a metales como *C. metallidurans* CH34, en la que los metalosensores identificados pertenecen a la familia de activadores MerR y familia de represores ArsR/SmtB. Pero además posee otras proteínas que regulan respuestas frente a iones metálicos, como sistemas de dos componentes y factores sigma de tipo ECF: CnrH para níquel, RpoQ y RpoR para cobre, y RpoE para una completa resistencia a metales en general (Gross *et al.*, 2007). Parece que otros tres factores sigma, RpoI, J y K también serían necesarios para la resistencia frente a metales de transición.

El análisis de un factor sigma de tipo ECF en *M. xanthus* durante el desarrollo de esta tesis doctoral ha permitido relacionarlo con la regulación y homeostasis del cobre en esta bacteria.

#### 1.4.2 SUBUNIDADES SIGMA

En bacterias, la expresión génica se regula principalmente a nivel del proceso de iniciación de la transcripción. Todas las bacterias contienen un complejo multiproteico denominado núcleo de la ARN polimerasa, capaz de unirse al ADN inespecíficamente, y que requiere un factor adicional,  $\sigma$ , para que tenga lugar el reconocimiento específico y la iniciación de la transcripción (Browning y Busby, 2004; Paget y Helmann, 2003). Al núcleo de la ARN polimerasa asociado a un factor sigma se le denomina holoenzima ARN polimerasa. De algún modo, los factores sigma están en el nivel más alto de la jerarquía de reguladores, ya que ellos determinan la capacidad de la ARN polimerasa de reconocer un determinado promotor (Cases y de Lorenzo, 2005).

Existen dos grandes familias de factores sigma: sigma-54 y sigma-70, y la mayoría de los factores sigma descritos pertenecen a la última de ellas (Lonetto *et al.*, 1992). Todas las bacterias presentan al menos un factor sigma esencial o primario, implicado en la transcripción de genes necesarios para la viabilidad celular, y la mayoría poseen además, factores sigma alternativos que las células pueden utilizar para responder frente a un estímulo específico, como diversos tipos de estreses. En la disponibilidad y actividad de estos factores sigma pueden intervenir al menos dos tipos de reguladores: antisigmas, que se unen e inhiben al factor sigma asociado impidiendo su unión al núcleo de la ARN polimerasa, y otro tipo de reguladores que alteran la actividad de una determinada holoenzima ARN polimerasa (Campbell *et al.*, 2008). Además, pueden intervenir otras proteínas como los anti-antisigmas (que inhiben la actividad de los antisigmas), coantisigmas (que actúan conjuntamente con los antisigmas) o enzimas proteolíticas que llevan a cabo regulaciones postraduccionales. Se han propuesto dos mecanismos para describir la regulación de la actividad de factores de la familia sigma-70. Mientras que la autoinhibición por el dominio N-terminal mediaría la actividad de los factores sigma primarios, las interacciones proteína-proteína mediaría la de un grupo de factores sigma alternativos denominados ECFs (*Extracytoplasmic function*). Podrían estar implicados otros mecanismos reguladores donde la actividad de los factores sigma estaría controlada por señales estimuladoras (como procesos de fosforilación-desfosforilación llevados a cabo por quinasas y fosfatasa) o mecanismos que controlen la concentración intracelular de los factores sigma localizándolos en la superficie interna de la membrana celular (Thakur *et al.*, 2007).



## 1. INTRODUCCIÓN

En procariotas, el proceso de transcripción se inicia generalmente con la asociación de una subunidad sigma al núcleo de la ARN polimerasa, formado por dos subunidades alfa, una beta, otra beta' y una omega ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ). Este complejo fue purificado al completo y descrito con las 5 subunidades por Burgess en 1969, y es suficiente para llevar a cabo los procesos de transcripción, elongación y terminación, pero es incapaz de iniciar la transcripción por sí solo. En ese mismo año se data el descubrimiento de los factores sigma por Burgess *et al.*, como subunidades que podían disociarse de la ARN polimerasa, pero que eran necesarias para el proceso de iniciación de la transcripción. Estas subunidades sigma pueden unirse al ADN independientemente del núcleo de la ARN polimerasa en muchos casos (Dombroski *et al.*, 1993).

Todos los miembros de la familia sigma-70 mantienen dos dominios conservados a pesar de las diferencias que pueda haber en secuencia (Campbell *et al.*, 2003; Siegele *et al.*, 1989). Sin embargo, la evolución estructural y funcional de diversos antisigmas proporciona mucha más flexibilidad para regular el proceso de iniciación de la transcripción (Campbell *et al.*, 2008).

Los miembros de la familia  $\sigma^{70}$  son proteínas modulares que presentan hasta cuatro regiones y subregiones dentro de éstas, que median la unión de la ARN polimerasa al ADN (Gruber y Gross, 2003). Las subregiones 2.4 y 4.2 están implicadas en el reconocimiento de los hexámeros presentes en las regiones promotoras en posiciones -10 y -35 respectivamente, y cuando está presente la subregión 3, ésta reconoce el elemento extendido en -10 (Fig. 1.9). Éste reconocimiento se suple con la unión de la región 4.2 al elemento -35 del promotor (Campbell *et al.*, 2002).

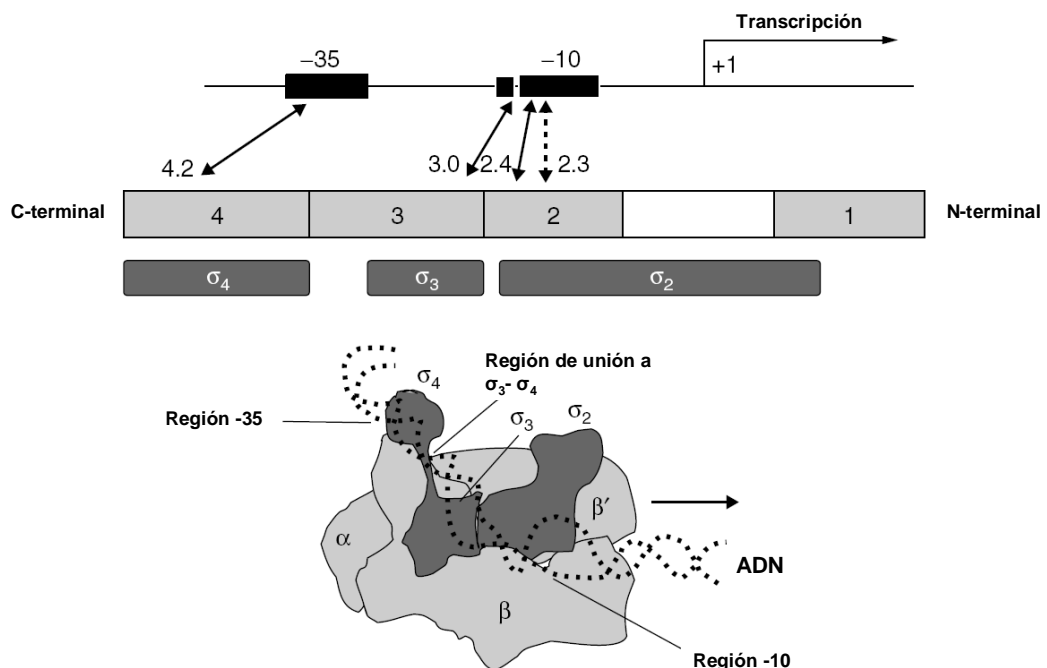


Figura 1.9. Esquema de los dominios que interaccionan con el ADN de una subunidad sigma, y regiones promotoras del ADN con las que interacciona en la holoenzima ARN polimerasa (Paget y Helmann, 2003).

La mayoría de estas subregiones presentan un dominio de unión a la ARN polimerasa y un dominio de unión al ADN. Cuando se produce la formación del complejo holoenzima ARN polimerasa (tras la unión con el factor sigma), a veces se

producen cambios conformacionales en los dominios de unión al ADN que son los que permiten el reconocimiento de promotores específicos (Browning y Busby, 2004; Murakami *et al.*, 2002; Vassylyev *et al.*, 2002). La región más conservada entre factores sigma es la 2. Aunque la secuencia de aminoácidos no sea idéntica, es muy importante el mantenimiento de la estructura terciaria en los dominios 2 y 4, que contienen los determinantes para la unión primaria a la ARN polimerasa y al ADN (Gruber y Gross, 2003). El cambio de esta estructura terciaria es lo que puede originar una diferente afinidad por un mismo promotor en factores sigma que regulan procesos idénticos en diversas condiciones.

La familia de subunidades sigma-70 ha sido dividida en varios grupos teniendo en cuenta su secuencia y función en las células (Lonetto *et al.*, 1992 y 1994; Helmann, 2002).

- **Grupo I:** Incluye proteínas esenciales para el mantenimiento de las funciones vitales de las células.
- **Grupo II:** Muy relacionado con el grupo I, aunque son proteínas prescindibles para el desarrollo vital de los microorganismos.
- **Grupo III:** Difiere más en secuencia con los anteriores, y puede ser dividido en proteínas relacionadas evolutivamente que a menudo se agrupan en base a la similitud de los procesos que regulan (choque térmico, biosíntesis de flagelos, esporulación,...).
- **Grupo IV:** También denominados ECFs (*extracytoplasmic function*), se definió gracias al estudio de SigE, un factor sigma de *S. coelicolor* (Lonetto *et al.*, 1994). El grupo IV o de ECFs es de los más divergentes en secuencia (Lonetto *et al.*, 1994, Missiakas y Raina, 1998).
- **Grupo V:** La incorporación de un quinto grupo de factores sigma en el que se incluiría la proteína TxeR de *Clostridium difficile* y otros reguladores de toxinas y bacteriocinas se ha propuesto recientemente (Helmann, 2002). Este nuevo grupo de factores sigma presenta secuencia similar a los ECFs pero con bastantes diferencias como para ser clasificados como grupo aparte (Dupuy y Matamouros, 2006).

Los miembros del grupo I poseen el mayor número de dominios, mientras que los miembros del grupo IV parecen ser la versión reducida de éstos (Gruber y Gross, 2003). Entre ambos extremos se encuentra el resto de factores sigma (Fig. 1.10).

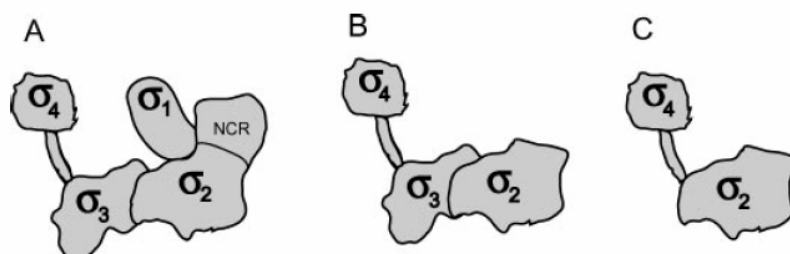


Figura 1.10. Composición de dominios de diferentes grupos de factores sigma-70. A) Dominios típicos del grupo I. B) Factor sigma-70 del grupo III. C) ECF. (Gruber y Gross, 2003). NCR: dominio no conservado ni en secuencia, estructura o tamaño, y que se encuentra entre las regiones 1.2 y 2.1.

El grupo IV de factores sigma engloba a los miembros más pequeños de la familia sigma-70 pero también a los más numerosos entre los genomas descritos hasta la fecha. Por lo general, los factores sigma de tipo ECF son proteínas no esenciales para el crecimiento normal de los microorganismos (Missiakas y Raina, 1998; Paget y Helmann, 2003), pero sí muy importantes para responder frente a ciertos tipos de estreses. Los ECFs mantienen las secuencias conservadas entre los factores sigma primarios 2.4 y 4.2, que van a reconocer las regiones promotoras -10 y -35 respectivamente, y hay análisis que demuestran que muchos de esos residuos conservados ejercen idéntica función en ambos casos, si bien otros no alteran su actividad cuando son sustituidos por alanina (Wilson y Lamont, 2006), diferencias que permitirán un reconocimiento de promotores específicamente. Muestran divergencias en la región 1, que previene la unión directa de factores sigma libres al ADN, en la región 2.3 que interacciona con la secuencia promotora -10, y en la región 3, cuya función aún no está clara.

Es muy importante comprender que un único factor sigma puede controlar la expresión de numerosos genes en respuesta a un mismo estímulo. Por ejemplo, el regulón sigB de *B. subtilis* engloba unos 200 genes (Helmann, 2006), y puede ser utilizado como diana en investigación clínica o para preservar alimentos (van Schaik y Abee, 2005). Sin embargo, parece que una característica común entre ECFs es la regulación de la transcripción de un número reducido de genes en respuesta a un estímulo muy concreto. En 2006, Alvarez-Martinez *et al.* sugirieron que SigF de *Caulobacter crescentus* va a regular un número pequeño de genes, al igual que otros ECFs descritos, proporcionando una respuesta específica (como ya introdujeron Lonetto *et al.* en 1994).

*E. coli* tiene unos 300 factores de transcripción (Ishihama, 2000), y tan sólo seis factores sigma-70: RpoD ( $\sigma^{70}$ ), RpoS ( $\sigma^S$ ), RpoH ( $\sigma^{32}$ ), FliA ( $\sigma^F$ ), RpoE ( $\sigma^E$ ) y FecI. La función y regulación de estos factores sigma sean probablemente las mejores estudiadas entre todas las eubacterias (Gruber y Gross, 2003). El principal factor sigma de *E. coli*, RpoD, es capaz de unir las regiones -35 y -10 específicamente, reconociendo inexorablemente una región espaciadora entre ellos de una determinada longitud (Dombroski *et al.*, 1996). En 1989 se identificó RpoE, aunque aún no se había determinado la clasificación del subgrupo ECFs (Erickson y Gross, 1989). De los seis factores sigma-70 que posee *E. coli*, tan sólo RpoE y FecI pertenecen al grupo ECF.

*P. aeruginosa* posee otro ECF (AlgU) con una secuencia y ruta de regulación similares a las de RpoE en *E. coli* (Raivio y Silhavy, 2001). AlgU es un determinante principal en la ruta de biosíntesis de alginatos, asociada con un incremento en la morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística que presentan infecciones pulmonares crónicas con estos microorganismos (DeVries y Ohman, 1994).

Otros ECFs como W23, SigM y SigX de *B. subtilis*, son imprescindibles para la formación del septo y la síntesis de la pared celular (Minnig *et al.*, 2003). Por otro lado, Schmid y Lidstrom comunicaron en 2002 la presencia de dos factores sigma en *Deinococcus radiodurans*, uno de ellos claramente clasificado por secuencia como ECF, implicados en la respuesta a choque térmico de esta bacteria. Este microorganismo, altamente resistente a elevadas dosis de radiación (Battista, 1997), sólo posee tres factores sigma, al menos con secuencia conservada (White *et al.*, 1999). Por tanto, la regulación de la transcripción génica debe llevarse a cabo bien mediante factores de transcripción, bien mediante otros factores sigma con secuencia más

divergente de los hasta ahora descritos, o utilizando otros mecanismos completamente nuevos.

Las bacterias de vida libre suelen poseer mayor número de ECFs que los patógenos o algunos simbioses con animales (Mittenhuber, 2002). En general, los organismos con estilos de vida más variados poseen mayor número de factores sigma. Esto les permitirá adaptarse a diferentes ambientes, y ajustar su metabolismo y procesos celulares a muchos tipos de estreses, que requerirán un amplio repertorio de mecanismos reguladores. En bacterias patógenas, muchos de los procesos relacionados con la invasión del hospedador o con la respuesta frente a ataques por parte de éste, están regulados por factores ECFs (Bashyam y Hasnain, 2004), y el estudio de la inducción de estas rutas podría ayudar a comprender el aumento en la resistencia a antibióticos de numerosas bacterias (Rowley *et al.*, 2006).

Nies determinó mediante un análisis global de todos los genomas depositados en las bases de datos en 2004, que el número medio de factores sigma en procariotas es de 5,3. Este número podría variar entre 1 y 19. Si se tienen en cuenta algunos factores descartados por no presentar total homología, este número variará entre 1 y 53, con 7,5 factores sigma de media por genoma. Las especies con más de 16 factores sigma pertenecen a cianobacterias, formadores de endosporas, simbioses formadores de nódulos en raíces o a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*, o *Leptospira*. Varios genomas han sido analizados para obtener una aproximación del número de ECFs que contienen (Bentley *et al.*, 2002; Helmann, 2002; Martínez-Bueno *et al.*, 2002), y en general este número parece no ser muy alto, a excepción del *S. coelicolor*, en cuyo ciclo de vida también se lleva a cabo un complejo proceso de esporulación (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Número de ECFs del total de factores sigma-70 en diversas bacterias

ORGANISMO	NÚMERO DE FACTORES $\sigma^{70}$	NÚMERO DE ECFs	REFERENCIA
<i>Streptomyces coelicolor</i>	63	49	(Bentley <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	24	19	(Visca <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	24	19	(Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bacillus subtilis</i>	18	7	(Gruber y Gross, 2003 ; Mascher <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	17	11	(Grosse <i>et al.</i> , 2007)
<i>Caulobacter crescentus</i>	16	13	(Nierman <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	15	10	(Oguiza <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13	10	(Cole <i>et al.</i> , 1998; Thakur <i>et al.</i> , 2007)
<i>Corinebacterium glutamicum</i>	10	5	(Nakunst <i>et al.</i> , 2007)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	9	3	(Gruber y Gross, 2003)

En *M. xanthus* se ha encontrado un solo miembro de la familia sigma-54 (RpoN) implicado en la transcripción de los genes que van a regular las primeras etapas del ciclo de desarrollo, y por tanto esencial para las células (Keseler y Kaiser, 1997). Sin embargo el número de miembros de la familia sigma-70 es mucho mayor: 47 (Goldman *et al.*, 2006). El número de factores sigma de tipo ECF que codifica el genoma de *M. xanthus* también es bastante alto: 38 (Kroos e Inouye, 2008), lo que no es de extrañar teniendo en cuenta el complejo ciclo de vida que lleva a cabo esta bacteria, que a su vez puede tener lugar en innumerables condiciones ambientales. Tan sólo tres de estos ECFs han sido bien caracterizados: CarQ, EcfA y RpoE1 (Kroos e Inouye, 2008).

CarQ regula la síntesis de carotenoides inducida por luz (Fig. 1.11; Elías-Arnanz *et al.*, 2008; Gorham *et al.*, 1996), EcfA regula la expresión de genes que intervienen al inicio del ciclo de desarrollo (Kroos e Inouye, 2008) y RpoE1 parece estar relacionado con la movilidad (Ward *et al.*, 1998).

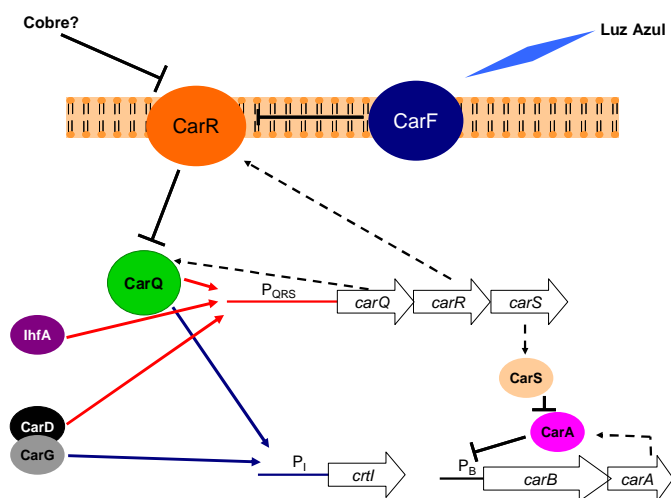


Figura 1.11. Carotenogénesis en *M. xanthus*. Los genes están representados por flechas mientras que las proteínas se representan como óvalos negros. La proteína CarA se expresa constitutivamente, y reprime P<sub>B</sub>. En respuesta a la luz o al cobre, se inicia una ruta de señalización que comienza con la interacción CarF-CarR, y liberación de CarQ (ECF), iniciándose la transcripción de los genes implicados en esta respuesta, en la que intervienen otras proteínas activadoras de la transcripción como CarD/CarG e IhfA. CarS impedirá la inhibición por CarA de la transcripción a partir de P<sub>B</sub> (Galbis-Martínez *et al.*, 2008).

Una característica en común que parecen tener la mayoría de ECFs, sobre todo en bacterias Gram negativas, es el uso de factores antisigma. Los factores antisigma que funcionan con ECFs son proteínas que suelen presentar un dominio receptor extracitoplásmico, varias regiones transmembrana y un dominio intracitoplásmico que permite la unión con su ECF, secuestrándolo hasta la llegada del estímulo (Hughes y Mathee, 1998; Missiakas y Raina, 1998).

Los factores antisigma se han mantenido a lo largo de la evolución probablemente por dos motivos principales: por un lado protegen a los factores sigma de la degradación que puedan sufrir cuando se encuentran libres en el citoplasma, y por otro lado permiten que los factores sigma estén disponibles para actuar tan pronto como sean requeridos, una vez que sean liberados (Brooks y Buchanan, 2008). En las figuras

1.12 y 1.13 se muestran dos ejemplos del mecanismo de interacción sigma-antisigma para los dos ECFs de *E. coli*.

Los ECFs PvdS de *P. aeruginosa*, PbrA de *Pseudomonas fluorescens*, PfrI y PupI de *P. putida*, y FecI de *E. coli* entre otros, están implicados en la toma de hierro, y su acción está negativamente controlada por reguladores de tipo Fur, que se unirán a las regiones promotoras de los genes que controlan estos ECFs en presencia de altas concentraciones de hierro, impidiendo su transcripción. Cuando hay escasez de hierro éste se libera de los reguladores Fur, que dejarán de estar unidos al ADN, y la detección de metal formando complejos como el citrato férrico activará los genes regulados por estos ECFs para captar más hierro. Filogenéticamente, estas proteínas no se encuentran agrupadas con RpoE de *E. coli* o AlgU de *P. aeruginosa*, y a veces se refieren a ellas como sigmas en respuesta a escasez de hierro (*iron starvation sigmas*; Leoni *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 2002).

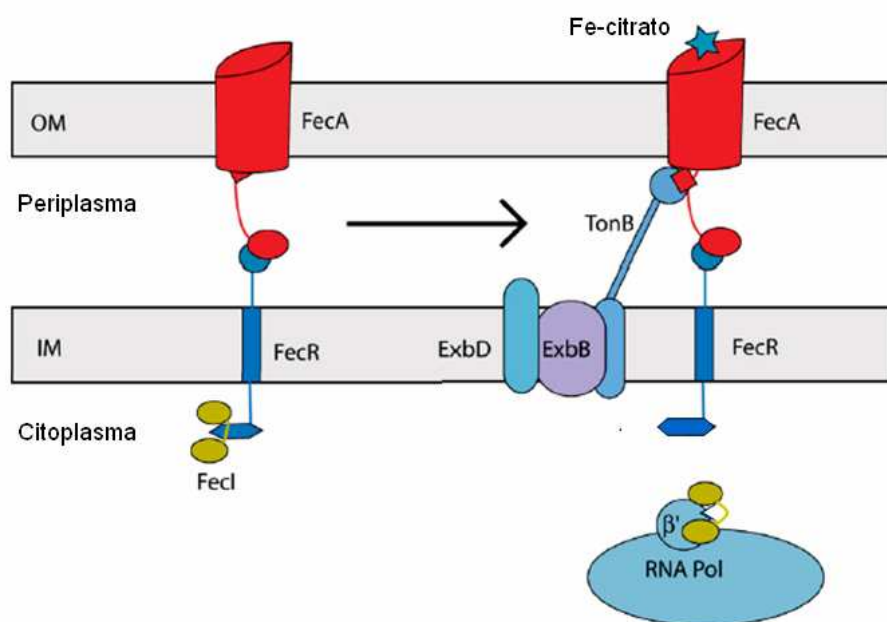


Figura 1.12. Mecanismo de señalización FecARI. La unión de Fe-citrato a FecA permite a TonB interactuar con ella. Esta interacción es necesaria para la detección del estímulo del antisigma FecR, que situado en la membrana interna, liberará al factor sigma FecI para que interactúe con la ARN polimerasa, transcribiendo los genes necesarios (Brooks y Buchanan, 2008). OM: membrana externa; IM: membrana interna.

Parece que en *P. aeruginosa* una proteasa reconoce daños en la membrana celular, y degrada el antisigma que secuestra AlgU (Wood y Ohman, 2009), algo parecido a lo que ocurre en el caso de RpoE (Fig. 1.13).

Es muy frecuente que las parejas sigma-antisigma estén reguladas por otras proteínas, como muestran las figuras 1.11, 1.12, 1.13 y 1.14. Aquellas proteínas que interactúan directamente con los factores antisigma, inhibiendo su función y por tanto liberando el ECF secuestrado, se denominan anti-antisigmas. Esta interacción dará lugar a una regulación más eficiente en respuesta a un estímulo determinado (Bashyam y Hasnain, 2004; Helmann, 2002; Hughes y Mathee, 1998). O quizás medien en la integración de señales diferentes, que deben finalizar con una respuesta similar (Fig.

## 1. INTRODUCCIÓN

1.14). En algunas bacterias, como *B. subtilis* y *M. tuberculosis*, los anti-antisigmas regulan la actividad de factores antisigma mediante un proceso de fosforilación (Beaucher *et al.*, 2002; Schaik *et al.*, 2005).

En 2003, Browning *et al.* demostraron la existencia de interacción entre CarQ y CarR, y la pérdida de estabilidad de CarR en presencia de luz, mecanismo que podría desencadenar la respuesta dirigida por CarQ al ser liberado por CarR (proteína de membrana) en *M. xanthus*. En 2008, Galbis-Martínez *et al.* demuestran la interacción de CarR con CarF, lo que refuerza la hipótesis de que esta última proteína esté actuando como anti-antisigma en respuesta a la luz azul para la pareja CarQ-CarR (Fig. 1. 11).

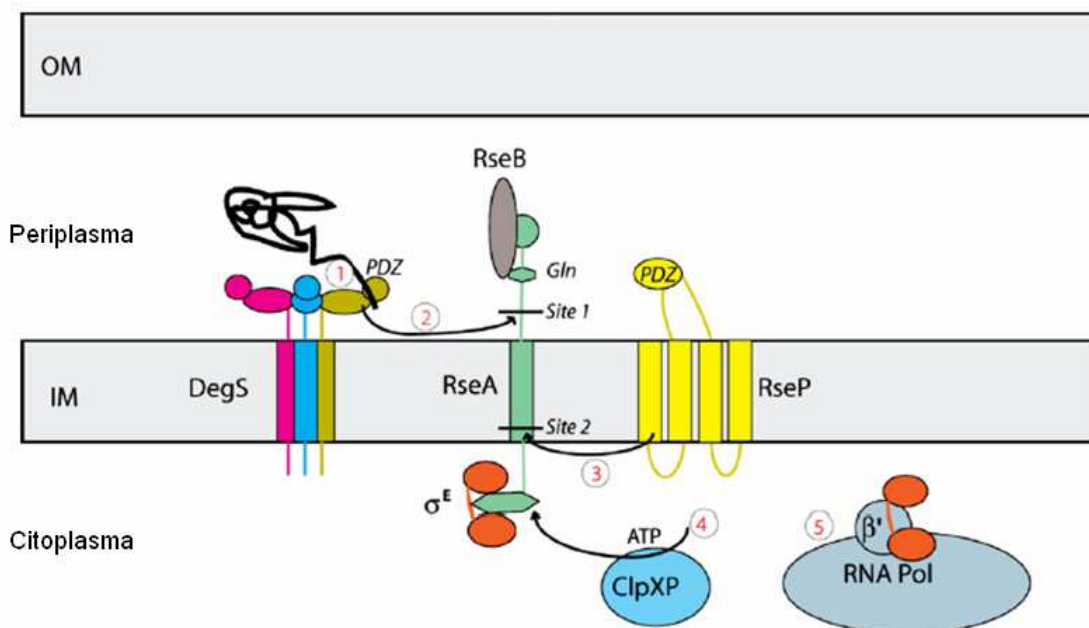


Figura 1.13. Mecanismo de activación de RpoE ( $\sigma^E$ ). (1) El dominio PDZ de la proteasa DegS reconoce el dominio CTD de una proteína que no está plegada correctamente. (2) DegS activada corta en la región *site 1* de RseA, inactivando la inhibición ejercida por RseB y permitiendo la interacción RseA-RseP. (3) RseP actúa como proteasa sobre la región *site 2* de RseA. (4) ClpXP y otras proteasas dependientes de ATP liberan  $\sigma^E$  de la porción de RseA a la que permanece unido. (5)  $\sigma^E$  se une al complejo de la ARN polimerasa y dirige la transcripción desde los promotores adecuados necesarios (Brooks y Buchanan, 2008). OM: membrana externa; IM: membrana interna.

Se han descrito otros mecanismos de actuación de las parejas sigma-antisigma, o de la regulación de estos ECFs directamente. SigE, el factor sigma de *S. coelicolor* que dio lugar a la definición de ECFs, no está regulado por un antisigma, sino por un sistema de dos componentes compuesto por el regulador de respuesta CseB y la histidina quinasa CseC (Paget *et al.*, 1999).

SigC de *Mycobacterium tuberculosis* es un ECF necesario para la virulencia y patogénesis de estas cepas (Sun *et al.*, 2004), y debido a la conservación de esta proteína en todas las especies patógenas de micobacterias, el papel en la patogénesis de estos microorganismos debe ser muy importante (Thakur y Gopal, 2005). A pesar de no poseer una gran parecido en secuencia con SigA (factor sigma-70 principal en

micobacterias), los dominios de interacción con las zonas promotoras determinados por cristalografía de rayos X son muy similares entre ambos (Thakur *et al.*, 2007). La regulación de este ECF parece tener lugar por una interacción entre los dominios 2 y 4, que va a impedir el reconocimiento de la caja Pribnow mientras no se de un cambio de conformación (algo parecido a lo que ocurre con los factores sigma primarios). Se sugiere que esto tendrá lugar mediante la unión de SigC al núcleo de la ARN polimerasa, y por tanto no necesitaría ser regulado por una proteína antisigma (Thakur *et al.*, 2007). Pero la presencia de un antisigma no debería ser completamente descartada, ya que podría estar impidiendo la interacción de SigC con la ARN polimerasa y de este modo inhibiendo su activación. En primer lugar, un análisis llevado a cabo por Rodrigue *et al.* en 2007 para determinar los promotores reconocidos por ECFs de micobacterias, permitió identificar regiones a las que se une SigC tras sobreexpresar esta proteína *in vivo*. De no existir antisigma para SigC, y puesto que las condiciones fisiológicas no se alteraron, o bien este ECF está continuamente transcribiendo genes necesarios para los procesos relacionados con la patogénesis (en cuyo lugar no estaría respondiendo a un estímulo que desencadene su actividad), o bien se rompió la proporción sigma/antisigma que inhibía su capacidad de iniciar la transcripción junto con la ARN polimerasa. En segundo lugar, en el trabajo de Thakur *et al.* de 2007, identifican 2 proteínas candidatas a actuar como antisigmas de SigC, si bien no pudieron demostrar una interacción directa entre ellas y SigC. Como ECF, debería responder frente a alguna señal, desencadenando la transcripción de genes implicados en una determinada respuesta. Aunque no se conoce el estímulo que desencadena su actividad, la transcripción a partir de un promotor al que se une se ha demostrado *in vitro*, y la secuencia 'AAC' en -35 está presente en las regiones promotoras de al menos 2 genes cuya transcripción controla (Rodrigue *et al.*, 2007).

Otro ejemplo diferente es ChrR, un antisigma específico de  $\sigma^E$  en *Rhodobacter sphaeroides*, que requiere Zn para su función. En base a la similitud en secuencia de aminoácidos, Newman *et al.* propusieron en 2001 una nueva familia de antisigmas que aparecían en  $\alpha$  y  $\gamma$ -proteobacterias. Estos factores antisigma actuarían como RsrA, que regula SigR de *S. coelicolor*, y que pertenece a la familia ZAS (*zinc-containing antisigma factors*) detectando estrés oxidativo mediante cambios en los dominios de unión a Zn. La formación de puentes disulfuro origina la pérdida del ión y un cambio conformacional que hace que se libere el ECF secuestrado, dando lugar a la transcripción de genes en respuesta a estrés oxidativo (Paget *et al.*, 2001; Zdanowski *et al.*, 2006). La detección de estrés oxidativo mediante unión de metales es una estrategia que llevan a cabo factores de transcripción como PerR o MexR (Chen *et al.*, 2008; Giedroc, 2009). ChrR y RsrA son antisigmas solubles, y por tanto difieren de la mayoría de antisigmas descritos en que no son proteínas de membrana, y van a detectar un estímulo intracitoplásmico.

También se ha observado que la pareja sigma-antisigma puede ir acompañada de un tercer miembro, un receptor dependiente de TonB localizado en la membrana externa cuyas funciones serían de transporte (sideróforos) y transducción de señales, como se ha demostrado en *P. aeruginosa* para 5 ECFs (Llamas *et al.*, 2008), o en el caso de FecR-FecI en *E. coli* (Fig. 1.12).



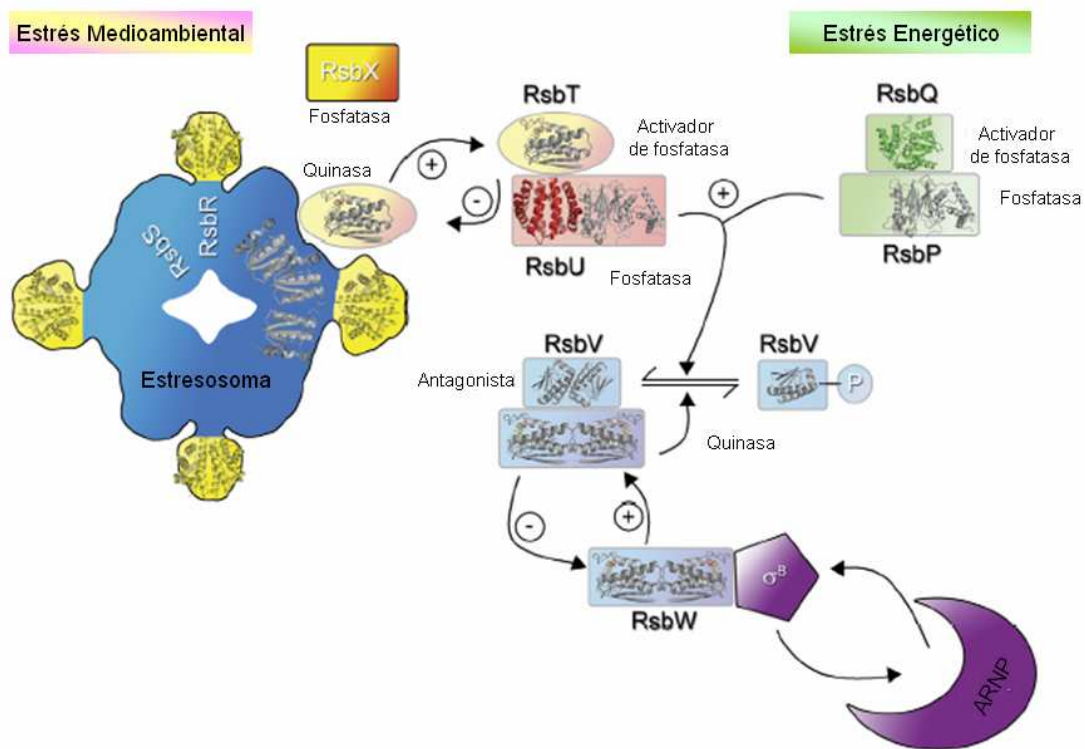


Figura 1.14. Cascada de  $\sigma^B$  en *B. subtilis*. Si no se detecta ningún estrés, RsbW estará secuestrando  $\sigma^B$ , previniendo su unión a la ARN polimerasa (ARNP). RsbW también estará inactivando a RsbV a través de su actividad quinasa. En condiciones de estrés, RsbW será secuestrada por su anti-antisigma RsbV, proteína en la que convergen las rutas de señalización en respuesta a estrés energético o medioambiental. Cuando se detecta estrés energético, RsbP se activa por RsbQ, desfosforilando RsbV (que se unirá entonces a RsbW). La detección de estrés medioambiental, algo más complicada, comienza con un complejo multiproteico denominado estresosoma, que secuestrará a RsbT en ausencia de estrés. Cuando se detecta el estímulo, RsbT se libera por fosforilación del estresosoma, activando la fosfatasa RsbU que desfosforilará a RsbV (y se unirá a RsbW liberándose  $\sigma^B$ ). La fosfatasa RsbX llevará a cabo una desfosforilación de las proteínas del estresosoma, para reiniciar el proceso (si el estrés continúa, se dará la ruta de señalización. De no ser así, RsbT volverá a ser secuestrada). (Marles-Wright y Lewis, 2007). Los símbolos  $\pm$  indican regulación positiva/negativa de  $\sigma^B$ .

RpoE2 de *Sinorhizobium meliloti* está cotranscrito con un antisigma soluble, una proteína pequeña de 55 aminoácidos, sin péptido señal y sin dominios transmembranas, lo que indica que el estímulo reconocido también debe ser intracitoplásmico (Sauviac *et al.*, 2007). Muchos factores sigma de tipo ECF se cotranscriben en el mismo ARNm con su antisigma, como es el caso de CarQ y CarR (Browning *et al.*, 2003; Hodgson, 1993), o la pareja RpoE y ChrR en dos bacterias: *R. sphaeroides* (Anthony *et al.*, 2004) y *C. crescentus* (Lourenço y Gomes, 2009). Esto parece ser habitual en las parejas sigma-antisigma (Brooks y Buchanan, 2008; Hughes y Mathee, 1998; Missiakas y Raina, 1998). En *C. crescentus*, RpoE protege a la célula del daño oxidativo causado por Cd induciendo los genes necesarios para su detoxificación (Lourenço y Gomes, 2009). RpoE está inactivo cuando no está presente el estrés que desencadena su respuesta (principalmente presencia de Cd). Esta inactivación la lleva a cabo su antisigma asociado, pero su efecto se rompe cuando RpoE es sobreexpresado.

RpoE2 se autorregula, controla su propia transcripción y se activa en respuesta a varios tipos de estreses, incluyendo temperatura, salinidad, escasez de nitrógeno o carbono. Todos los genes regulados por RpoE2 descritos en este trabajo conservan la secuencia 'AAC' en -35 (Sauviac *et al.*, 2007). Esta secuencia conservada en la región promotora -35 es una característica más compartida por otros muchos ECFs (Browning *et al.*, 2003; Dartigalongue *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1997; Martínez-Argudo *et al.*, 1998; Missiakas and Raina, 1998; Rowley *et al.*, 2006).

Otra de las características que comparten muchos ECFs es la regulación positiva de su propia síntesis (Helmann, 2002). Por ejemplo, CarQ de *M. xanthus*, así como RpoE2 de *Sinorhizobium meliloti* controlan su propia transcripción (Martínez-Argudo *et al.*, 1998; Sauviac *et al.*, 2007). Hay otros ECFs que se autorregulan pero que también son regulados por otras proteínas a partir de otros promotores, como es el caso de  $\sigma^E$  en *S. enterica* serovar Typhimurium o de RpoE en *E. coli* (Miticka *et al.*, 2003; Rouvière *et al.*, 1995). *S. coelicolor* posee un ECF (SigJ) regulado a su vez por otro ECF (SigH), (Mazurakova *et al.* 2006). Lo mismo ocurre en *C. glutamicum*, donde SigM está regulado por SigH (Nakunst *et al.*, 2007), o en *Burkholderia pseudomallei*, donde RpoH está regulado por RpoE (Vanaporn *et al.*, 2008).

En resumen, los factores sigma van a ser necesarios para la iniciación de la transcripción y el reconocimiento de promotores específicos, de manera constitutiva (con los factores sigma-70 primarios) o en respuesta a un estímulo muy concreto (procesos en los que intervienen mayoritariamente el grupo ECF de la familia sigma-70). En última instancia, los ECFs van a permitir a estos microorganismos llevar a cabo una respuesta determinada para hacer frente a una situación generalmente inesperada. La mayoría de ECFs comparten tres características principales: responden frente a un estímulo extracitoplásmico, actúan con un antisigma asociado (generalmente cotranscrito), y reconocen una secuencia 'ACC' en la región promotora -35. Pero como hemos visto en este apartado, se discutirá más adelante, y ya dijeron Browning y Busby en 2004, la única regla general en cuanto a síntesis de ARN se refiere, es que no hay reglas generales.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

*M. xanthus* es una bacteria Gram negativa que pertenece al grupo de la Mixobacterias, capaz de llevar a cabo un peculiar ciclo de vida único entre procariontes, que la ha convertido en un modelo para el estudio del desarrollo. En la naturaleza ha de llevar a cabo este ciclo de vida en presencia de componentes presentes en el suelo, entre los que se encuentra el cobre, y la elección del estudio de la respuesta al cobre en esta bacteria está fundamentada principalmente en la importancia de este metal en procesos biológicos. Por una parte, es cofactor de muchas enzimas implicadas en procesos esenciales para la vida. Por otro lado, el cobre resulta tóxico a elevadas concentraciones debido a que produce oxidación de proteínas y daños en las membranas, lípidos y ADN. Este efecto dual hace que las células deban mantener una precisa homeostasis para evitar la toxicidad del metal, controlando a la vez la existencia de unos niveles adecuados para el funcionamiento de las proteínas que lo precisen. Todas estas evidencias hacen que el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis del cobre resulte de gran interés para la comunidad científica en múltiples campos tales como la ecología, medicina, fisiología o microbiología.

En nuestro laboratorio estamos estudiando la respuesta global al cobre en esta mixobacteria. El uso de *M. xanthus* en el estudio de la homeostasis del cobre ofrece ventajas con respecto a otras bacterias: i) el hecho de que *M. xanthus* posea un ciclo de vida a lo largo del cual las células tienen que coordinar todos sus mecanismos para adaptarse al cobre en diversas situaciones, ii) la evidente gran complejidad en la respuesta al cobre de este microorganismo tanto por el número de genes estructurales implicados, como por los mecanismos de regulación que parecen estar implicados, iii) la ventaja que supone que *M. xanthus* no es una bacteria patógena y que por tanto su manipulación genética no suponga ningún riesgo para la salud o el medio ambiente. Por tanto se plantearon los siguientes objetivos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

- 1- Determinación de la resistencia al cobre en *M. xanthus*.
- 2- Identificación de proteínas relacionadas con la homeostasis del cobre en *M. xanthus*, centrada en las oxidasas multicobre.
- 3- Estudio del papel fisiológico de una MCO de *M. xanthus*, durante el ciclo de vida completo de esta bacteria en presencia o ausencia de cobre.
- 4- Estudio de la regulación transcripcional dependiente de cobre de la MCO objeto de estudio. Identificación de reguladores.
- 5- Caracterización molecular del principal regulador. Determinación del papel de esta proteína en la homeostasis del cobre en *M. xanthus*. Identificación de su mecanismo de acción.



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAL**

### **3.2. MÉTODOS**





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. MICROORGANISMOS

###### 3.1.1.1. CEPAS DE *E. coli* UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

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

*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15]*

**TOP10** (Invitrogen)

*F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*

Estas cepas han sido utilizadas para realizar transformaciones con mezclas de ligación (para clonar fragmentos de ADN), productos de PCR para introducir mutaciones puntuales en el gen *corE*, así como con vectores y plásmidos (para su amplificación). Ambas son deficientes en sistemas de recombinación y restricción, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos incorporados a estas bacterias. Además, la cepa JM109 permite la selección de clones por  $\alpha$ -complementación en aquellos vectores que porten la subunidad  $\alpha$  del gen para la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

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

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

Esta cepa se ha utilizado para la expresión heteróloga de las proteínas CuoB y CorE. Posee una copia del gen para la ARN polimerasa del fago T7, regulada por el promotor *lacUV5* (que se induce por IPTG). Los genes clonados bajo el control del promotor de esta ARN polimerasa serán por tanto transcritos de manera dependiente de IPTG. Carece de las proteasas Lon y OmpT, lo cual reduce la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en esta cepa. Además posee una mutación en el gen *rne* que codifica para una ARNasa, lo que genera un incremento en la estabilidad de los ARNm.

###### 3.1.1.2. CEPA DE *M. xanthus* UTILIZADA EN EL PRESENTE TRABAJO

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

*pilQ1*

Esta cepa ha sido empleada como mixobacteria silvestre, al ser capaz de completar el ciclo de desarrollo con normalidad a pesar de presentar una mutación *pilQ1* sobre los pili de tipo IV. Esta mutación afecta ligeramente a la movilidad social favoreciendo su cultivo en medio líquido (evitando la formación de agregados). Todas las cepas de *M. xanthus* obtenidas durante este estudio derivan de ella (Tabla A1).

#### 3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

##### 3.1.2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

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

Triptona (Difco): 10 g/L  
Extracto de levadura (Difco): 5 g/L  
NaCl: 5 g/L  
Bacto-agar (Difco) para medio sólido: 15 g/L  
pH 7,2

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

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

###### **Compuestos adicionados a los medio de cultivo una vez autoclavados:**

AMPICILINA (50 µg/mL) (Sigma)

Empleado en la selección de bacterias portadoras de plásmidos con el gen para la β-lactamasa (marcador de resistencia a ampicilina).

KANAMICINA (25 µg/mL) (Sigma)

Selección de bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico.

TETRACICLINA (25 µg/mL) (Sigma)

Selección de bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico.

5-BROMO-4-CLORO-3-INDOL-B-D-GALACTOPIRANÓSIDO  
(40 µg/mL) (Biosinth AG)

Este compuesto es un sustrato de la enzima β-galactosidasa. Cuando esta enzima degrada tal compuesto, se origina un producto azulado visible. Ha sido empleado en la selección blanco/azul de colonias originadas en procesos de transformación en las etapas iniciales de clonación de fragmentos (posible gracias al proceso de α-complementación). Permite diferenciar aquellas bacterias que no han incorporado el inserto (azules), de las que si lo han hecho (blancas).

ISOPROPIL-B-D-TIOGALACTOPIRANÓSIDO (0,1-1 mM) (Promega)

Utilizado para inducir la expresión de genes bajo el control de promotores de tipo *lac* en los sistemas de expresión pET-24a(+) y pET200/D-TOPO (Invitrogen).

3.1.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA *M. xanthus*

**Medio CTT** (Hodgkin y Kaiser, 1977. Crecimiento vegetativo)

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

**Medio CF** (Hagen *et al.*, 1978. Ciclo de desarrollo)

Tris-HCl pH 7.6: 10 mM  
K<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> pH 6.8: 1 mM  
MgSO<sub>4</sub>: 8 mM  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,2 g/L  
Bacto-casitona (Difco): 0,15g/L  
Citrato sódico: 2g/L  
Piruvato sódico: 1g/L (adicionar tras autoclavar)  
Bacto-agar (Difco): 15 g/L

**Compuestos adicionados a los medios de cultivo una vez autoclavados:**

KANAMICINA (40 u 80 µg/mL) (Sigma)

Utilizado como marcador selectivo, permitió el aislamiento de cepas portadoras de fusiones *lacZ* o de intermediarios merodiploides durante el proceso de delección de un determinado gen utilizado a una concentración de 80 µg/mL. Una vez confirmadas las cepas positivas en cada caso, se utilizó a una concentración de 40 µg/mL para mantenerlas durante sucesivas resiembras.

TETRACICLINA (15 µg/mL) (Sigma)

Permitió el aislamiento de cepas portadoras de plásmidos con diferentes construcciones relacionadas con el gen *corE*, tras haber sido electroporados en la cepa JM51EBZY ( $\Delta$ *corE* *cuoB-lacZ*).

#### 5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL-B-D-GALACTOPIRANÓSIDO (100 µg/mL) (Biosinth AG)

Al igual que se explicó en la página anterior, 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 aquellas bacterias portadoras de fusiones *lacZ*.

#### GALACTOSA (10 mg/mL) (Fluka)

Incorporada a los medios de cultivo para la obtención de mutantes de delección en fase. Las bacterias portadoras del gen *galk* que codifica para la enzima galactoquinasa de *E. coli* ven inhibido su crecimiento en presencia de galactosa, ya que esta enzima la transforma en un análogo no metabolizable (Ueki *et al.*, 1996). Así, se pueden seleccionar las células que han eliminado el casete que confiere resistencia a kanamicina y la enzima galactoquinasa (posibles mutantes de delección) de las que no lo han hecho.

#### SULFATO DE COBRE (Panreac)

Adicionado a los medios de cultivo en un rango de concentraciones desde 0,02-2 mM, permitió identificar el efecto de este metal sobre diversos mutantes de delección tanto en medio sólido como líquido, así como el estudio de expresión de varios genes mediante el uso de fusiones *lacZ*.

#### NITRATO DE PLATA (0,05 mM) (Panreac)

Utilizada en el estudio de inhibición de CorE por un agente mimético del Cu<sup>+</sup>, mediante el seguimiento de expresión de la fusión *cuoB-lacZ* en la cepa JM51BZY.

#### BATOCUPROÍNA DISULFONATO SÓDICO (0,05 mM) (Sigma)

Agente quelante específico de cobre en su estado reducido, fue utilizado en el estudio de inhibición de CorE por Cu<sup>+</sup>.

#### ASCORBATO (1 mM) (Sigma)

Utilizado en exceso con relación a la cantidad de sulfato de cobre en el medio de cultivo, permite incrementar la proporción de cobre reducido. Utilizado en el estudio de inhibición de CorE por Cu<sup>+</sup>.

#### PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (Sigma)

Utilizado en una curva de crecimiento para determinar el efecto de un tipo de estrés oxidativo sobre el mutante de delección para *corE*, en un rango de concentraciones desde 0,01-0,05 mM.

## 3.1.3. SOLUCIONES Y TAMPONES

Tabla 3.1. Soluciones y tampones

Tampones/ Soluciones	Composición
BB, tampón	Tris-HCl pH 7,5: 20 mM; MgCl <sub>2</sub> : 2 mM; BSA 0,25 mg/mL; DTT 0,5 mM; Glycerol 15% (v/v); KCl 40 mM
Depurinización, solución para Southern blot	HCl: 0,25N
Desnaturalización, solución para Southern blot (Sambrook y Russell, 2001)	NaCl: 1,5M; NaOH: 0,5M
Lisis, solución para preparación de ADN cromosómico	Tris-HCl pH 8: 10 mM; EDTA: 1 mM; NaCl: 350 mM; SDS 2%(p/v)
Maleico, tampón	NaCl: 150 mM; Ácido Maleico pH 7,5: 100 mM
Neutralización, solución para Southern blot (Sambrook y Russell, 2001)	Acetato Sódico pH 5,5: 3M
PBS 1X	NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4: 2 mM
Reactivo de bloqueo 10%	10g del reactivo (Roche) en 100 mL de tampón maleico
Reactivo de bloqueo para Western blot	5% leche desnatada; 0,02% azida sódica en PBS
Solución de bloqueo 1X para detección con fosfatasa alcalina	Dilución 1:10 del reactivo de bloqueo en tampón maleico
Solución de desarrollo del color	200 µL de la solución de NBT/BCIP del <i>DIG DNA Detection and Labeling Kit</i> en 10 mL de tampón de detección
Solución de equilibrado I	2X SSC; 0,1% SDS
Solución de equilibrado II	0,1X SSC; 0,1% SDS
Solución de lavado para detección con fosfatasa alcalina	3% (p/v) Tween 20 en tampón maleico
Solución de prehibridación e hibridación	DIG Easy Hyb (Roche)
Solución de transferencia	Tris-HCl: 0,025 M; 0,15 M glicina; 20% metanol (pH 8,1-8,4)
Solución tinción geles SDS-PAGE I	25% Isopropanol; 10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie
Solución tinción geles SDS-PAGE II	10% Isopropanol, 10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Solución tinción geles SDS-PAGE III	10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie
Solución tinción geles SDS-PAGE IV	10% ácido acético glacial
SSC 20X (Sambrook y Russell, 2001)	NaCl 3M; Citrato Sódico pH 7,0: 0,3M
TAE 1X (Sambrook y Russell, 2001)	Tris-acetato : 40 mM ; EDTA pH 8: 1 mM
Tampón de carga 5X para SDS-PAGE	Tris-HCl pH 6,8: 125 mM; DTT: 250 mM; 5% (p/v) SDS; 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 25% (v/v) glicerol; DTT: 250 mM; 5% (p/v) SDS
Tampón de carga 5X para electroforesis de ADN (Sambrook y Russell, 2001)	Azul de Bromofenol: 0.25% (p/v); Xileno Cianol 0.25% (p/v); Glicerol 30% (p/v)
Tampón de carga LB	Tris-HCl pH 7,5; 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 25% (v/v) glicerol
Tampón de detección con fosfatasa alcalina	Tris-HCl: 0,1M; NaCl: 0,1M; MgCl <sub>2</sub> pH 9,5: 50 mM
Tampón de dilución	TBST 1X; 1% (p/v) leche desnatada en polvo
Tampón de electroforesis SDS-PAGE	Tris 25 mM; glicina 192 mM; 0.1% (p/v) SDS
Tampón de electroforesis Tris-Glicina	Tris 25 mM; glicina 200 mM; pH8
Tampón PK 10X	Tris-HCl 400 mM; MgCl <sub>2</sub> 100 mM; DTT 50 mM; BSA 0,5 mg/mL
Tampón Z	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,0: 100 mM; KCl 10 mM; MgSO <sub>4</sub> 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM
TBE 0,5 X(Sambrook y Russell, 2001)	Tris-borato : 45 mM ; EDTA pH 8: 1 mM
TBS 1X	Tris-HCl 20 mM; NaCl pH 7,5: 140 mM
TBST 1X	TBS 1X; 0,1% (v/v) Tween-20
TE 1X (Sambrook y Russell, 2001)	Tris-HCl pH 7,4: 10 mM ; EDTA pH 8: 1 mM
TM, tampón	Tris-HCl pH 7,6: 10 mM ; MgSO <sub>4</sub> : 1 mM

---

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

Tampón TM

Tampón TE

#### **Electroforesis de ADN**

TAE 1X

TBE 0.5X

Tampón de carga 5X

#### **Southern blot**

Solución de despurinización

Solución de desnaturalización

Solución de neutralización  
SSC 20X  
Solución de prehibridación e hibridación  
Tampón maleico  
Solución de equilibrado I  
Solución de equilibrado II  
Solución de lavado  
Solución de bloqueo  
Tampón de detección  
Solución de desarrollo del color

**Purificación de proteínas**

Preparación de extractos: Tris-HCl pH 7,5 20 mM  
Purificación de proteínas: Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 0,5M e imidazol 250 mM

**Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE**

Tampón de electroforesis SDS-PAGE  
Tampón de carga 5X

**Tinción de geles de proteínas**

Solución I  
Solución II  
Solución III  
Solución IV

**Western blot**

Solución de transferencia  
PBS 1X  
Reactivo de bloqueo  
TBS 1X  
TBST 1X  
Tampón de dilución  
Tampón de detección  
Solución de desarrollo del color

**Retardo en la movilidad electroforética (EMSA)**

Tampón BB  
Tampón de electroforesis PAGE  
Tampón de carga LB  
Tampón PK

**Determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa**

Tampón Z



#### 3.1.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR

##### 3.1.4.1. VECTORES Y PLÁSMIDOS (ver también Apéndice; Tabla A.2)

**pBJ113** (Julien *et al.*, 2000): 5 kb, derivado de pUC118. Útil para obtención de mutantes de delección en fase. Contiene el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5 (1,3 kb) y el gen *galK* de *E. coli* (1,5 kb) que confiere sensibilidad a galactosa.

**pET200/D-TOPO** (Invitrogen): 5,74 kb. Vector de expresión útil para sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Marcador de resistencia a kanamicina; cola de 6 residuos de histidina fusionada en el extremo N-terminal de las proteínas expresadas con él (permite purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-níquel).

**pET-24a(+)** (Novagen): 5,3 kb. Vector de expresión útil para sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Marcador de resistencia a kanamicina; posibilidad de obtener proteínas recombinantes con cola de 6 residuos de histina en extremo C-terminal y cola T7 en extremo N-terminal, sólo una o ninguna.

**pKY481** (Cho y Zusman, 1999a): 8,3 kb. Empleado para la construcción de fusiones transcripcionales y/o traduccionales entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen diana cuyo perfil de expresión es desconocido. Marcador de resistencia a kanamicina; una vez integrado en el genoma, la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa dependerá del promotor del gen diana fusionado.

**pUC10** (Inouye, 1990): 4,2 kb. Utilizado para obtener un vector derivado de pUC19 con resistencia a tetraciclina. Fragmento *SalI* de 1,44 kb que codifica para un gen de resistencia a tetraciclina.

**pUC19** (Vieira y Messing, 1982): 2,69 kb. Utilizado para obtener un vector derivado con resistencia a tetraciclina. Confiere resistencia a ampicilina.

**pALECBlac** (Extremera-León, A.L.): 9,1 kb. Empleado en la obtención de las cepas JM51ECBlac (*copB-lacZ* en JM51EIF). Marcador de resistencia a kanamicina.

**pALECzC1,2 y 3** y **pALECus1,2 y3** (Extremera-León, A.L.): 9,1 kb. Empleados en el estudio de la regulación de diversos genes por *corE* (obtención de fusiones *lacZ* para los genes *czc1*, *czc2*, *czc3*, *cus1*, *cus2* y *cus3* en  $\Delta$ *corE*). Marcador de resistencia a kanamicina.

##### 3.1.4.2. OLIGONUCLEÓTIDOS

En este apartado se recogen las secuencias de cebadores empleados durante la realización de esta Tesis Doctoral para diversas reacciones de amplificación por PCR (clonación de fragmentos, mutagénesis dirigida, secuenciación...). Las secuencias se presentan en orientación 5'→3', con sitios para enzimas de restricción resaltados en negrita y subrayado cuando los posean, y sólo subrayados en el caso de los nucleótidos añadidos para efectuar clonaciones en el vector pET200/D-TOPO. Todos los oligonucleótidos fueron suministrados por la casa comercial Sigma- Genosys.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

NOMBRE	SECUENCIA	AMPLIFICA O ANILLA EN ...	APLICACIÓN
LcsCK LcsCB2	<b>CTGGTACCTTCGGGCGCGTGGACGTGG</b> <b>TGGGATCCATGCTCCGCCGCGTCAGCG</b>	Fragmento hacia el extremo 5' del gen <i>cuoC</i> (CuoC1)	Plásmido pBJ113ΔCuoC (mutante de delección en fase para <i>cuoC</i> )
LcsCE LcsCB	<b>CTGAATTCTGCTCCCCCTTCCCCTGGC</b> <b>GTGGATCCCACCTCGGACGAGCTGCGC</b>	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>cuoC</i> (CuoC2)	
LcsCB4	<b>CGGGGATCCATTCCGGGGCGCAACCAGTC</b>	Dentro del gen <i>cuoC</i>	Plásmido pKY481-CuoC (Junto con LcsCK) ( <i>cuoC-lacZ</i> )
LCSBBAM2 LCSBXBA	<b>CTGGGATCCATGGTGGTGTGTCCTCTC</b> <b>CGGTCTAGAGCACGGCGGTGGAGCTGGAG</b>	Fragmento hacia el extremo 5' del gen <i>cuoB</i> (CuoB1)	Plásmido pBJ113ΔCuoB (mutante de delección en fase para <i>cuoB</i> )
LcsBEco LcsBBam	<b>CCCGAATTC</b> ACTCGGGCTCCTGCCGGCTTG <b>GGAGGATCC</b> CAATCCGGACGTGCGCTTTG	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>cuoB</i> (CuoB2)	
LcsBKpn LcsBBamA	<b>CGCGGTACCCCGTGGCCGAAGCCGAGAAC</b> <b>CTGGGATCCATGGTGGTGTGTCCTCTCA</b>	Fragmento hacia el extremo 5' del gen <i>cuoB</i>	Plásmido pKY481-CuoB ( <i>cuoB-lacZ</i> )
LcsBOp ECFR	<b>TAATGGTCGATGACCGCGTTG</b>	<i>corE</i>	Coexpresión de <i>cuoB</i> por RT-PCR
LcsBOp OMF LcsBOp OMR	<b>AGTCCTTGAAGGCCGTTACG</b> <b>AGGAGTTGCTCCAGCGCCGAG</b>	MXAN_3424	
LcsCOp LcsCR	<b>GTGGACTCGACCGTTGTAGCC</b>	<i>cuoC</i>	
LcsCOp OMF LcsCOp OMR	<b>CTGTCTCTGGAGTTGCCCATC</b> <b>CATCCAGTAGTCGCGGACGGC</b>	MXAN_3431	Coexpresión de <i>cuoC</i> por RT-PCR
CorEcTOPOf CorEcTOPOr	<b>CACCATGAGCGACATGAATCAGGG</b> <b>TCATGCCTTCGCGCTCCC</b>	<i>corE</i>	Plásmido pETTOPOCorE (Expresión heteróloga de hCorE)
LcsBECFK LcsBECFB	<b>GTTGGTACCATCCGAAGCGTCCGCGCG</b> <b>ATGGGATCCATGCCGTTACAGGTACAGGG</b>	Fragmento hacia el extremo 5' del gen <i>corE</i> (CorE1)	Plásmido pBJ113ΔCorE (mutante de delección en fase para <i>corE</i> )
LcsBECFB2 LcsBECFH	<b>GGAGGATCCGGGCTGCGGGAGCGCGAAGG</b> <b>CCTAAGCTTGCGGCCGGGAAACGCTCCC</b>	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>corE</i> (CorE2)	
CorElacZBamR	<b>ATGGGATCCATGCCGTTACAGGTACAGGGAC</b>	Al inicio de <i>corE</i>	Plásmido pKY481-CorE (Junto con LcsBECFK) ( <i>corE-lacZ</i> )

ECFmutW5r ECFmutW5f	<b>TAGGATCC</b> GAAACCTCCAACCTGTTTCTTG <b>CCGGTACC</b> ATCCCATGAAGGGCGGAAAG	Fragmento hacia el extremo 5' de la región CRD de CorE (CorEcrd1)	Plásmido pBJ113ΔCorEcrd (mutante de delección en fase para la región CRD de CorE)
ECFmutW3f ECFmutW3r	<b>CGGGATCC</b> ATGACCTGACCGCGGCTCC <b>GGAAAGCTT</b> CTCCTCCCACGTCCTGCC	Fragmento hacia el extremo 3' de la región CRD de CorE (CorEcrd2)	
F5' AraCKpn R5' AraCBam	<b>GAGGGTACCC</b> CGGAATGCGGTCAACTGG CGT <b>GGATCC</b> ATAGTCTATGTCCGTCGCG	Fragmento hacia el extremo 5' del gen <i>araC</i>	Plásmido pBJ113ΔAraC (mutante de delección en fase para <i>araC</i> ) Plásmido pKY481-AraC ( <i>araC-lacZ</i> )
F3' AraCBam R3' AraCPst	<b>TACGGATCCT</b> ACGTAGCGAGCCACATGAC <b>CCGCTGCAG</b> GGATGATTCATCTGGTTCGCG	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>araC</i>	Plásmido pBJ113ΔAraC (mutante de delección en fase para <i>araC</i> )
D5263- UpstreamF D5263- UpstreamR	<b>CCGGTACC</b> GGGAGCGCTGCTGTTACC <b>CCGGATCC</b> ATCGCGGTGCATCAGCGGG	Fragmento hacia el extremo 5' MXAN_5263	Plásmido pBJ113Δ5263 (mutante de delección en fase para MXAN_5263) Plásmido pKY481-526 ( <i>5263-lacZ</i> )
D5263- DownstreamF D5263- DownstreamR	<b>GCGGATCC</b> ACTGTAACCGGGGCCAGGC <b>GACTGCAGC</b> CTCGGTGGTGCTCATGGC	Fragmento hacia el extremo 3' MXAN_5263	Plásmido pBJ113Δ5263 (mutante de delección en fase para MXAN_5263)
MXAN_3426FSeq MXAN_3426RSeq	CGTGCGCTTTGGTTGATGGC CTCCGCGCGGCTTGGCTG	Región que engloba <i>corE</i>	Secuenciar <i>corE</i> a partir del genoma de Myxococcus
CorEDownstreamBamR	<b>CAGGGATCC</b> ATGTTCGCTTTGGAGCCGCGG	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>corE</i>	Plásmido pNG00 (Con primer LcsBECFK) (Introducción de <i>corE</i> en JM51EBZY y base para mutagénesis dirigida de CorE)
OarKpn pKY481Bam	<b>ACGGGTACC</b> GTTCCCTGGACGCGAGCCTC <b>TTCGGATCC</b> ATAACCAGACCCCTCCAAGGTG	Fragmento hacia el extremo 5' de <i>oar</i>	Plásmido pNG06 y pNG08 ( <i>corE</i> bajo el control del promotor de <i>oar</i> )
CuoB.NdeForward CuoB.BamReverse	CACACCC <b>ATATG</b> ACCGCAGACAGTTCATTC CCT <b>GGATCCT</b> CAACCAAAGCGCACGTCCG	<i>cuoB</i>	Plásmido pNGCuoB24a (Expresión de CuoB en pET24a sin cola de Histidina)
3422EMSA265F 3422EMSA265R	CGCGTGCCGAGGGCTGAGC GCCCGCGAGCTAGCGGGTC	265pb por delante de MXAN_3421	Sonda radiactiva para EMSA con hCorE
CorEpUC10.1F CorEpUC10.1R	CCT <b>GGATCC</b> CATGAGCGACATGAATCAGGG <b>GCGAAGCTT</b> TTCATGCCTTCGCGCTCCCG	Gen <i>corE</i>	Plásmido pNG06 ( <i>corE</i> bajo el control del promotor de <i>oar</i> )
CorEC181AF CorEC181AR	CAGTTGGAGGTTTCGGCCGGTACGTGCGCCTC GAGGCGCACGTACCGGCCGAAACCTCCAACCTG	<i>corE</i>	Plásmido pNG181 (Mutar en CorE Cys181 a Ala)

CorEC184AF CorEC184AR	TTCGTGCGGTACGGCCGCCTCGCACGGC GCCGTGCGAGGCGGCCGTACCGCACGAA	<i>corE</i>	Plásmido pNG184 (Mutar en CorE Cys 184 a Ala)
CorEC189AF CorEC189AR	CGCCTCGCACGGCGCTCTGGACTGCACG CGTGCAGTCCAGAGCGCCGTGCGAGGCG	<i>corE</i>	Plásmido pNG189 (Mutar en CorE Cys 189 a Ala)
CorEC192AF CorEC192AR	CGGCTGTCTGGACGCCACGTGCGCGACG CGTCGCGCACGTGGCGTCCAGACAGCCG	<i>corE</i>	Plásmido pNG192 (Mutar en CorE Cys 192 a Ala)
CorEC194AF CorEC194AR	TCTGGACTGCACGGCCGCGACGCAGGGC GCCCTGCGTCGCGGCCGTGCAGTCCAGA	<i>corE</i>	Plásmido pNG194 (Mutar en CorE Cys 194 a Ala)
CorEC206AF CorEC206AR	GGCCGGGGGCGCCGGGAGCGCG CGCGCTCCCGGCGCCCCGGCC	<i>corE</i>	Plásmido pNG206 (Mutar en CorE Cys 206 a Ala)
CorEHisTagBamF CorEHisTagPstR	GCGGGATCCTCATCATCATCATCATGGTAT GCTCCTGCAGTCATGCCTTCGCGCTCCCGC	<i>corE</i>	Plásmido pNG05 y pNG08 (expresión de hCorE en <i>M. xanthus</i> )
CorEDownstreamSalR	CAGGTCGACATGTCGCTTTGGAGCCGCGG	Fragmento hacia el extremo 3' del gen <i>corE</i>	Plásmido pNG03 (Con primer LcsBECFK) (Introducción de <i>corE</i> <sub>ΔCRD</sub> en JM51EBZY)
SeqSDM	GGTACATGACGATGGGGCAGG	<i>cuoB</i>	Secuenciar región interna de productos de PCR en las reacciones de mutagénesis dirigida (una vez secuenciados con los cebadores universales pUCFor-47 y pUCRev)

#### 3.1.4.3. 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 transferencia de ADN (Southern blot).

**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 y polinucleótido quinasa.

**GE Healthcare:** Columnas *HisTrap*<sup>TM</sup>HP para purificar proteínas con colas de histidina. Columnas *illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns* para purificar AND marcado radiactivamente de nucleótidos marcados no incorporados.

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

**Millipore:** Filtros VSWP02500 para diálisis de muestras y membranas 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 aislamiento de DNA plasmídico a mediana escala. *Wizard*<sup>®</sup> *Genomic DNA purification Kit* para extracción de DNA cromosómico. IPTG.

**Roche Molecular Biochemicals:** Endonucleasas de restricción, seroalbúmina bovina (BSA), lisozima, ARNasa, ADN ligasa del bacteriófago T4, desoxirribonucleótidos, *High Pure*<sup>TM</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*.

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

**Sigma (Molecular Biology Reagents):** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), persulfato amónico, fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF), benzamidina, bolas de vidrio para la sonicación de muestras, dietilpirocarbonato (DEPC), *o*-Nitrofenol (ONPG) y la mayoría de reactivos utilizados en la preparación de soluciones y tampones.

**Stratagene:** Pfu Ultra<sup>®</sup> HF

**Takara:** ADN polimerasa Hot Star<sup>®</sup> Ultra.

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

## 3.1.4.4. INSTRUMENTACIÓN

## INCUBACIÓN DE 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® Shaker-Model G2*

## ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

**Biometra:** *Biometra Fastblot fast semi-dry blotting* para transferencia de proteínas  
**Bio-Rad:** Fuente de alimentación *Power Pac 300*, sistema de electroforesis vertical *Mini-Protean® 3 Cell* y cubetas para electroforesis vertical  
**Cosmo Bio Co. Ltd.:** Sistema ultracompacto de electroforesis horizontal *Mupid-2®*  
**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

## 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*

## 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 (*Quantity One™ Gel Doc XR System*) y termociclador *MJ MINI Personal Thermal Cycler*  
**Crison:** pHmetro *GLP 22*  
**Hansatech :** Oxígrafo  
**Hausser Scientific:** Cámara de recuento *Petroff Hausser 3900*  
**Hewlett Packard:** Escáner. *HP Scanjet 8300*  
**Misonix Inc.:** Sonicador *Microson™ Ultrasonic Homogenizer XL2007*  
**Olympus:** Cámara fotográfica digital modelo *Camedia-5060 Wide Zoom*

**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  $-80^{\circ}\text{C}$  *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

#### 3.1.5. BASES DE DATOS Y SERVIDORES

**ESPrict 2.2:** Alineamientos. (<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/cgi-bin/ESPrict.cgi>)

**ExpASY:** Identificación y caracterización de proteínas de *M. xanthus*. Comparación de 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>)

**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)) y (<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, TIGR y PROSITE:** Identificación de dominios presentes en proteínas.

(<http://pfam.sanger.ac.uk>), (<http://blast.jcvi.org/web-hmm/>),

(<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>).

**Pubmed:** Búsqueda de información bibliográfica y de secuencias aminoacídicas de proteínas depositadas en la base de datos. BLASTP con secuencias completas de genomas (para ver si existe sintenia). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) y (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>).

**Science Direct, ISI Web of knowledge<sup>SM</sup> y SCOPUS:** Búsqueda de información bibliográfica. (<http://www.sciencedirect.com/>), (<http://www.accesowok.fecyt.es/wos/>) y (<http://www.scopus.com/home.url>).

**SOSUI, SignalP 3.0 Server y TatP 1.0 Server:** Predicción de péptido señal. (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>), (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>)

**WebLOGO:** Esquema de alineamientos en función de la conservación de residuos. (<http://weblogo.berkeley.edu/>)

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

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

#### 3.2.1.1. CEPAS DE *E. coli*

El crecimiento de esta bacteria se llevó a cabo en medios LB o SOC (este último en el caso del crecimiento tras choques térmicos previo al crecimiento en medios selectivos). Las condiciones más usuales de crecimiento fueron 37°C y 200 rpm. El cultivo en medio sólido se llevó a cabo en medio LB con de Bacto-agar (Difco) al 1,5% sembrando en estría o con espátula de Driglasky. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con ampicilina, kanamicina o tetraciclina, así como con X-Gal.

Para la conservación de cepas de *E. coli*, 0,8 mL de cultivo líquido mezclado con glicerol al 20% (p/v) fue congelado en alícuotas a -80°C.

#### 3.2.1.2. CEPAS DE *M. xanthus*

### Crecimiento vegetativo

Esta bacteria fue cultivada en medio CTT líquido a 30°C y 300 rpm. En el caso de cultivos en medio sólido se adicionó Bacto-agar (Difco) al 1,5% y se incubaron a 30°C, sembrando en estría, gotas de cultivo concentrado o sobrecapa en medio semisólido. El medio CTT se utilizó para el crecimiento vegetativo de las bacterias en todos los casos. En el caso de cepas portadoras de fusiones *lacZ* se adicionó kanamicina. En el de cepas portadoras de plásmidos con mutaciones puntuales para CorE, sobreexpresión *in vivo* de CorE o expresión *in vivo* de CorE con cola de histidina en el extremo N-terminal, se adicionó tetraciclina. Este medio también se utilizó para obtener extractos de la bacteria correspondientes al crecimiento vegetativo a partir de medio sólido suplementado con cobre.

Para conservar cepas de *M. xanthus* las células fueron conservadas a -80°C en alícuotas de 1 mL con glicerol al 20% (p/v).

### Ciclo de desarrollo

La inducción de formación de cuerpos fructificantes, para estudiar el fenotipo o la expresión de genes mediante el uso de cepas portadoras de fusiones *lacZ*, se desarrolló en el medio pobre en nutrientes CF. Partiendo de cultivos en medio CTT líquido, las células se concentraron a DO<sub>600</sub> de 15 en gotas de 10 o 20µL según el caso, y se incubaron a 30°C. Este medio presenta una pequeña cantidad de nutrientes que permite varias etapas de división celular antes de que se desencadene el ciclo de desarrollo.



#### 3.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las células fueron cultivadas en medio CTT líquido y concentradas en tampón TM a una  $DO_{600}$  de 15. Se cultivaron en medio CTT o CF con las características indicadas en cada experimento (ver Resultados, Fig. 4.12 y 4.16), siendo incubadas 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): Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 h a 4°C. Seguidamente, se sometieron a 3 lavados de 15 min cada uno en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). A continuación, fueron postfijadas con tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% durante 2 h y posteriormente deshidratadas con gradientes crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100%), manteniendo las muestras 15 min en cada uno de ellos. Una vez deshidratadas, se infiltraron en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y resina Epon durante 2 h (en agitación) y finalmente se incluyeron en resina pura Epon durante un día. Tras llevar a cabo un proceso de polimerización a 60°C, se realizaron cortes semifinos de una micra que fueron teñidos con toluidina (para observación de las muestras a microscopía óptica) y cortes ultrafinos de 500-700 Å utilizando un ultramicrotomo Ultracut E, que fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación a MET.

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

#### 3.2.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y ELECTROCOMPETENTES

##### 3.2.3.1. Obtención de células competentes de *E. coli*

Mediante el tratamiento con  $CaCl_2$ , las paredes celulares se hacen permeables, lo que permite que el DNA penetre desde el medio externo al interior celular cuando las células se someten a un choque térmico.

Se tomó un cultivo líquido en medio LB de *E. coli* durante la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0,5-1$ ). Se centrifugó un volumen determinado a 4000 rpm, 10 min a 4°C. Las células precipitadas fueron resuspendidas en 1×volumen de  $MgSO_4$  previamente enfriado, e incubadas 15 min en hielo picado. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendieron en 0,5×volumen de  $CaCl_2$  50 mM; Tris-HCl 10 mM pH8, también previamente enfriado. Incubadas 15 min en hielo y repetido el tratamiento anterior (centrifugación y resuspensión), se resuspendieron en 0,05×volumen de  $CaCl_2$  50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, y glicerol al 20% (p/v). Finalmente, las células competentes obtenidas fueron repartidas en alícuotas de 50 µL y conservadas a -80°C hasta su uso.

### 3.2.3.2. Obtención de células electrocompetentes de *M. xanthus*

Las células se crecieron en medio líquido CTT a 30°C y 300 rpm., hasta que alcanzaron una  $DO_{600} = 0,5-0,6$ . Para cada electroporación se tomó 1,5 mL de cultivo en un tubo eppendorf estéril y se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 min a 10000 rpm. A continuación, se realizó un lavado de células con 1 mL de agua MilliQ® estéril a temperatura ambiente y finalmente se resuspendieron en 40  $\mu$ L de agua MilliQ® estéril, de modo que la densidad celular fuera aproximadamente de  $1,5 \times 10^2$  células/mL. Estas células, listas para ser transformadas por electroporación, debían ser utilizadas inmediatamente.

## 3.2.4. INTRODUCCIÓN DE ADN EN CÉLULAS DE *E. coli* Y *M. xanthus*

### 3.2.4.1. *E. coli*. TRANSFORMACIÓN MEDIANTE 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. Para ello, una alícuota de células competentes de *E. coli* se mezcló con 1-10 ng de plásmido y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico manteniéndolas durante 90 s a 42°C. Tras el choque, se recuperaron las células añadiendo 0,4 mL de medio SOC o LB sin antibiótico y se incubaron durante 1 h a 200 rpm de agitación (si la muestra utilizada era mezcla de ligación) o durante 30 min (si la transformación se había llevado a cabo con plásmido purificado para replicarlo), para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia al antibiótico conferido por el plásmido. Finalmente, las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico para el cual el plásmido confería resistencia.

### 3.2.4.2. *M. xanthus*. ELECTROPORACIÓN

Se siguió el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell (1995). A las células electrocompetentes de *M. xanthus* se les adicionó 1  $\mu$ g de ADN plasmídico, previamente dializado durante 30 min en un filtro Millipore. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación Pulser® Cuvette de 1 mm de ancho y las células fueron electroporadas bajo las siguientes condiciones: 0.65 KV; 400  $\Omega$ ; 12.25 kV/cm; 25  $\mu$ Fd, con una longitud de pulso de 8,6-9,5 ms. Rápidamente se recuperan las células añadiendo 1 mL de CTT líquido sin antibiótico y fueron transferidas a un tubo de vidrio estéril que contenía 1,5 mL de medio CTT sin antibiótico, de manera que 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 seleccionable). Finalmente, alícuotas de distintos volúmenes fueron mezcladas con 4,5 mL medio CTT semisólido y sembradas en medio CTT sólido con el antibiótico correspondiente (kanamicina o tetraciclina). Estas placas fueron incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias (4-10 días).

#### 3.2.5. MANIPULACIÓN DE ADN

##### 3.2.5.1. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO DE *M. xanthus*

El aislamiento de ADN cromosómico a partir de diferentes cepas de *M. xanthus* se consiguió mediante la utilización del kit de purificación de Promega (*Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA purification kit*). A partir de 2 mL de cultivo crecido en medio CTT líquido con una DO<sub>600</sub> de 1 aproximadamente que fue centrifugado a velocidad máxima en una microcentrífuga de mesa, se rompieron las células 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 con sulfato amónico. El material genético obtenido se deshidrató para su precipitación con isopropanol y fue lavado con etanol al 70%, para finalmente ser rehidratado en 30-100 µL de TE.

##### 3.2.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

Siguiendo el procedimiento propuesto por el kit de purificación de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche, se recogieron las células crecidas en medio LB sólido o líquido (suplementado con el antibiótico adecuado), y se lisaron en un medio fuertemente alcalino que se neutralizó tras 5 min, precipitando proteínas y ADN genómico. Tras centrifugar, el ADN plasmídico permaneció en el sobrenadante y fue purificado utilizando un filtro proporcionado por el kit que poseía una matriz capaz de retenerlo, siendo recuperado mediante elución utilizando tampón TE.

##### 3.2.5.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

El método descrito por Saiki *et al.* (1988) permite la obtención de un elevado número de copias de una secuencia concreta, generadas por una enzima ADN polimerasa termoestable, a partir de un par de oligonucleótidos complementarios a una zona del ADN utilizado como molde que flanquea la región que se quiere amplificar.

Para clonación de fragmentos, las parejas de cebadores utilizadas habían sido diseñadas de manera que se incorporaron sitios de restricción cohesivos y diferentes en ambos extremos, que permitieran una inserción orientada en el vector de clonación o expresión deseado (salvo en el caso excepcional de la clonación de CorE en el pET200/D-TOPO, donde no se necesitan sitios de restricción).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, adicionando los siguientes componentes:

- 50 pmoles de cada cebador
- 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 25 µL de tampón 2X (que contiene MgCl<sub>2</sub>)
- 10% de DMSO
- 2,5 U de polimerasa *Hot Star<sup>®</sup>*
- 15-30 ng de ADN molde (plasmídico o cromosómico)
- Agua MilliQ<sup>®</sup> hasta completar 50 µL

Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3.3. Las muestras fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación, cada uno integrado por tres etapas secuenciales: desnaturalización del ADN molde, hibridación con los cebadores y elongación del fragmento deseado por la ADN polimerasa. La temperatura de hibridación se calculó teniendo en cuenta la temperatura de fusión de los cebadores.

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™ PCR Product Purification Kit* de Roche siguiendo sus instrucciones y se continuó con el proceso para el que se requería (digestión con enzimas de restricción y clonación, secuenciación...)

Tabla 3.3. Condiciones para la amplificación por PCR

FASE	CICLOS	TEMPERATURA(°C)	TIEMPO(min)
DESNATURALIZACIÓN	1	94	10
AMPLIFICACIÓN	30		
Desnaturalización	1	94	0,5
Hibridación	1	45-68	1
Elongación	1	72	2
ELONGACIÓN	1	72	12

#### 3.2.5.4. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la introducción de mutaciones puntuales en el gen *corE*, las parejas de oligonucleótidos fueron diseñadas utilizando el programa proporcionado por Stratagene QC (<http://labtools.stratagene.com/QC>). Ambos cebadores contendrían las sustituciones necesarias para obtener la mutación deseada, y una longitud de unas 10 bases a cada lado de esa región.

La reacción de PCR llevada a cabo para obtener las sustituciones deseadas se hizo teniendo en cuenta las condiciones mostradas en la Tabla 3.4. Las muestras se sometieron entre 16-18 ciclos de amplificación, según se deseara la sustitución de un solo aminoácido o dos, respectivamente. El volumen de reacción final fue de 50  $\mu$ L, adicionando los siguientes componentes:

- 125 ng de cada cebador
- 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 5  $\mu$ L de tampón 10X de la enzima Pfu Ultra<sup>®</sup> HF
- 10% de DMSO
- 2,5 U de polimerasa Pfu Ultra<sup>®</sup> HF
- 15-30 ng de ADN molde (plasmídico)
- Agua MilliQ<sup>®</sup> hasta completar 50  $\mu$ L

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *DpnI* durante 2 h a 37°C para degradar el ADN molde de doble cadena (metilado y hemimetilado), manteniendo las nuevas copias portadoras de la mutación deseada (no metiladas). Esta mezcla de reacción fue finalmente utilizada para transformar células competentes de *E. coli*

siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Se llevó a cabo una extracción de plásmidos a pequeña escala en algunas de las colonias obtenidas. Estos clones fueron secuenciados para comprobar la introducción de la mutación deseada, y posteriormente amplificados a gran escala para finalmente ser electroporados en *M. xanthus*.

Tabla 3.4. Condiciones para la amplificación por PCR en el proceso de mutagénesis dirigida

FASE	CICLOS	TEMPERATURA(°C)	TIEMPO(segundos)
DESNATURALIZACIÓN	1	95	30
AMPLIFICACIÓN	16-18		
Desnaturalización	1	95	30
Hibridación	1	55	60
Elongación	1	68	60/kb

#### 3.2.5.5. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

La digestión de ADN con endonucleasas de tipo II, que realizan cortes en el ADN mediante el reconocimiento de secuencias palindrómicas, puede generar fragmentos con extremos cohesivos o romos. Los fragmentos digeridos con la misma enzima de restricción presentarán extremos compatibles, que facilitarán el proceso de ligación.

La digestión con una única enzima de restricción se realizó mediante una reacción que incorpora 5-10 U de endonucleasa por cada  $\mu\text{g}$  de ADN, en el tampón adecuado para cada enzima suministrado por la casa comercial. La digestión de 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 que no fue posible realizar la reacción simultáneamente por diferencias en requerimientos para la actividad de 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 (generalmente 37°C durante 2 h).

#### 3.2.5.6. LIGACIÓN DE ADN

La reacción de ligación de fragmentos de ADN fue catalizada por la enzima ADN ligasa, procedente del bacteriófago T4. Esta enzima une de forma covalente, mediante enlaces fosfodiéster, extremos compatibles de ADN (ya sean cohesivos o romos). En general, esta reacción ha sido utilizada para introducir diferentes segmentos de ADN en vectores plasmídicos.

La reacción de ligación se llevó a cabo con 20 ng de vector junto con 40 ng del fragmento a clonar, en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . En esta reacción se incorporó tampón ligasa (con  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP necesarios para la reacción) suministrado por la casa comercial y agua milliQ<sup>®</sup> hasta completar el volumen final. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 5 min y posteriormente se enfrió en hielo durante 10 min. A continuación, se añadió 1 unidad de ligasa y se incubó durante al menos 16 h a 16°C. Finalmente, esta mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* competentes. Los transformantes positivos fueron seleccionados mediante aislamiento en medios con el antibiótico al cual confería resistencia el vector utilizado, y posteriormente se realizaron preparaciones plasmídicas a pequeña escala. Estos

plásmidos aislados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (teñidos con bromuro de etidio), y aquellos que presentaban un incremento en tamaño adecuado fueron sometidos a análisis de restricción. En determinados casos, además, se procedió a secuenciar los plásmidos para confirmar ausencia de mutaciones indeseadas.

En aquellos casos en que no se conseguía clonar el fragmento de ADN en el vector deseado, se incrementó la proporción de inserto con respecto al vector.

#### 3.2.5.7. DESFOSFORILACIÓN DE ADN

Para hidrolizar los grupos fosfato en posición 5' de ADN de doble cadena se utilizó fosfatasa alcalina de gamba siguiendo las indicaciones de la casa comercial (10 min a 37°C seguido de inactivación durante 20 min a 65°C). Esta reacción es muy utilizada en la desfosforilación de vectores para impedir su recircularización (sobre todo cuando se trabaja con enzimas de restricción que originan extremos romos o cuando se lleva a cabo la digestión con una única enzima de restricción), e incrementar la tasa de clonación. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizó para la construcción de un plásmido con resistencia a tetraciclina derivado de pUC19 (para insertar el casete de resistencia al antibiótico) y para desfosforilar el producto de PCR que sería marcado radiactivamente para el experimento de EMSA.

#### 3.2.5.8. MARCAJE RADIATIVO DE UN FRAGMENTO DE ADN

Tras amplificar por PCR, purificar y desfosforilar el fragmento de ADN que va a ser posteriormente utilizado como sonda en experimentos de EMSA, se procedió al marcaje radiactivo. Para ello se utilizó la polinucleótido quinasa de T4 (MBI Fermentas) y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP, de manera que la enzima incorporara fósforo marcado radiactivamente en cada extremo 5' del ADN de doble cadena obtenido como producto de PCR.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, con 5  $\mu$ L de tampón PK 10X, 10 U de polinucleótido quinasa, 5  $\mu$ L de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (4500 Ci/mmol; 10 mCi/mL) y al menos 200 ng del ADN a ser marcado (o 10 pmoles). Pasada 1 h de incubación a 37°C se detuvo la reacción durante 20 min a 65°C, y la mezcla de marcaje se pasó a través de unas columnas proporcionadas por GE Healthcare para separar el ADN marcado de los nucleótidos no incorporados, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (*illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns*). Se determinó el número de cuentas por min (cpm) antes y después de pasar la muestra por estas columnas para determinar la eficiencia del marcaje en el laboratorio de análisis radiactivo (LAR) de la Facultad de Ciencias (Universidad de Granada), utilizando un contador de centelleo Beckman Coulter, LS 6500. Finalmente se utilizó en la reacción para el ensayo de unión proteína-ADN una cantidad de sonda equivalente a 0,5 nM (1,8 ng de sonda con 265pb-13000 cpm).

#### 3.2.5.9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE ADN

El ADN fue secuenciado en el servicio técnico del 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 5 pmol de oligonucleótido en un volumen final de 20  $\mu$ L. La polimerasa empleada fue *AmpliTaq*<sup>®</sup> FS (capaz de incorporar eficientemente los ddNTPs terminadores marcados con fluorescencia *BigDye*<sup>™</sup> constituyentes del kit *ABI PRISM BigDye*<sup>™</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, en el que se llevó a cabo la reacción durante 25-50 ciclos de amplificación.

#### 3.2.5.10. 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, migrando del polo negativo al polo positivo debido a las características de estas moléculas. Durante este estudio se han realizado dos tipos de electroforesis utilizando diferentes matrices:

##### 3.2.5.10.1. Geles de Agarosa

Utilizada cuando se pretendía discernir entre fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 0,5 y 25 kb. Se utilizaron geles de agarosa al 0,7 % en tampón TAE 1X en los que se cargaron las muestras (previa adición de tampón de carga 5X para electroforesis de ADN), y se sometieron a un campo eléctrico en un tanque horizontal con el mismo tampón TAE 1X.

Las electroforesis se realizaron generalmente a 100 V durante 25-30 min, utilizando el sistema ultracompacto de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup>. Cuando se pretendía purificar un fragmento de ADN del gel de agarosa o analizar el ADN cromosómico mediante Southern blot se utilizaron geles preparativos, empleando 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 15-25 V (en función del tamaño de los fragmentos). En todos los casos, el marcador de peso molecular utilizado fue ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción HindIII (*Molecular Weight Marker II* de Roche).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/mL en 1X TAE) durante 10 min. Este compuesto se intercala entre las hebras de ADN y permite la observación de fragmentos con diferente movilidad electroforética cuando el gel es expuesto a luz ultravioleta, pudiendo identificar tamaño y concentración por comparación del lugar de migración e intensidad de fluorescencia con el marcador de peso molecular utilizado.

##### 3.2.5.10.2. 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. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, esta técnica ha sido empleada principalmente en el análisis de productos de RT-PCR y en el estudio de la unión de CorE al ADN (EMSA). 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	8,0 mL
H <sub>2</sub> O MilliQ <sup>®</sup>	36,28 mL
Tris-Glicina 10X o TBE 0,5X	5,00 mL
Persulfato amónico 10%	0,40 mL
TEMED	0,02 mL

Tras su polimerización, el gel fue transferido a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón Tris-Glicina (para EMSA) o TBE (para RT-PCR), desarrollándose la electroforesis a voltaje constante (100 V) durante 60-90 min. El gel fue secado durante 60-90 min utilizando un secador de geles a 80°C, y posteriormente los fragmentos separados durante la electroforesis se observaron mediante autorradiografía por exposición de una película fotográfica sobre el gel dentro de un casete metálico sellado en oscuridad y mantenido a -80°C (para minimizar la dispersión de la radiactividad emitida). Esta película fue revelada en oscuridad tras 1, 2 o 3 días de exposición (dependiendo de la actividad del isótopo radiactivo en el momento del ensayo).

Cuando se utilizó este tipo de electroforesis para observar fragmentos no marcados radiactivamente, el gel fue teñido con bromuro de etidio en las mismas condiciones que en la electroforesis de agarosa, y el marcador de peso molecular 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).

### 3.2.5.11. AISLAMIENTO DE ADN DE GELES DE AGAROSA

La técnica de electroelución fue empleada para el aislamiento de fragmentos de ADN de más de 0,5 kb a partir de una mezcla obtenida como producto de digestiones con enzimas de restricción o de PCRs inespecíficas. La electroforesis se llevó a cabo en un gel preprativo de agarosa como se ha descrito previamente. La separación de los fragmentos fue verificada mediante una breve tinción del gel con bromuro de etidio y observación con luz ultravioleta. A continuación, se cortó la porción de gel que contenía el fragmento de ADN a purificar y se introdujo en una membrana de diálisis (previamente tratada y conservada en frío en etanol al 50%) lavada con agua MilliQ<sup>®</sup>, cerrada por un extremo con una pinza y llena con tampón TBE 0,5X. Tras introducir la porción de gel, se eliminó la mayor cantidad posible de tampón y se selló el extremo opuesto con otra pinza, sin que quedasen burbujas de aire en el interior de la membrana. La membrana sellada con la porción de gel en el interior se introdujo en un tanque de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup> con tampón TBE 0,5X y se electroeluyó el ADN en oscuridad durante una hora a voltaje constante (100 V), tras lo que se dio un pulso con polaridad invertida de 30 s para separar el ADN de la membrana, caso de encontrarse parcialmente adherido. Finalmente se extrajo todo el tampón del interior de la membrana de diálisis y se purificó con el kit *High Pure*<sup>™</sup> *PCR Product Purification Kit* de Roche, comprobando el resultado de la operación y la concentración del fragmento purificado en un gel de agarosa.



#### 3.2.5.12. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

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.

##### 3.2.5.12.1. Southern Blot

La transferencia de ADN a filtros de nylon se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Southern (1975) basada en la transferencia de ácidos nucleicos desnaturalizados desde un gel de agarosa a un soporte sólido. El ADN cromosómico a analizar fue digerido con alguna endonucleasa de restricción que generara fragmentos con un tamaño fácilmente identificable, en los que se encontraría la secuencia a detectar posteriormente mediante hibridación con una sonda específica.

Estos cromosomas digeridos fueron utilizados para llevar a cabo una electroforesis en gel preparativo de agarosa, que permitió tomar una fotografía junto a una regla para identificar posteriormente el tamaño de las bandas que apareciesen, por comparación con las bandas del marcador de peso molecular utilizado. A continuación, el gel fue sometido a una serie de lavados en agitación a temperatura ambiente:

Solución de depurinización (3 min)  
Solución de desnaturalización (15 min)X2  
Solución de neutralización (30 min)  
2X SSC (5 min al menos)

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 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 Hybond N<sup>+</sup> de un tamaño ligeramente superior, que previamente había sido sumergida en agua MilliQ<sup>®</sup> y posteriormente en 2X SSC. Sobre este montaje se depositaron tres piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana, humedecidas en 2X SSC. Por último se depositaron servilletas de papel secas, que fueron sustituidas periódicamente y permitían la subida de la solución 20X SSC de la bandeja hacia ellas, produciéndose la transferencia del ADN desde el gel hasta la membrana. Para asegurar la transferencia, sobre las servilletas de papel se colocó un peso de unos 500 g y se mantuvo así durante una noche, tras lo que se recuperó el filtro (señalando sobre él el contorno del gel).

Esta membrana fue lavada en agitación durante 10 min en 2X SSC y secada a temperatura ambiente, para finalmente fijar el ADN a la membrana mediante incubación a 80°C durante 2 h. Este filtro fue reservado hasta su uso en los procesos de prehibridación e hibridación con una sonda específica marcada con digoxigenina.

##### 3.2.5.12.2. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina

Utilizando un fragmento específico de ADN, amplificado por PCR, purificado y desnaturalizado para su uso como molde en la síntesis de hebras complementarias por

parte del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, se obtuvo la sonda empleada en la hibridación específica de ácidos nucleicos. Previamente al marcaje de la sonda, la concentración de la misma fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Para el marcaje se utilizó el kit *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche Molecular Biochemicals. En presencia de hexanucleótidos que hibridan al azar con el ADN molde y añadiendo una mezcla de dNTPs con DIG\_dUTP, que es incorporado como media cada 20-25 nucleótidos del nuevo ADN sintetizado, las sondas fueron obtenidas tras 2-12 h de incubación a 37°C.

Para llevar a cabo esa reacción, 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, 1 mM GTP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG\_dUTP, pH 7,5) y 2 U de polimerasa *Klenow*. La reacción de marcado fue detenida adicionando 2 µL de EDTA 0,2 M pH 8,0 y el ADN marcado fue precipitado añadiendo 2 µL de LiCl 4 M y 60 µL de etanol absoluto, incubando a -80°C durante al menos 30 min. Tras centrifugar en frío durante 15 min, se realizó un lavado con etanol al 70%, centrifugación y eliminación del etanol, tras lo que se dejó secar al aire la sonda. El ADN marcado fue resuspendido en tampón TE y mantenido hasta su utilización a -20°C.

#### 3.2.5.12.3. Prehibridación-Hibridación de Filtros con ADN

Tras la fijación del ADN, las membranas fueron humedecidas en 2X SSC e 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 entre 8 y 15 mL de solución de prehibridación, en función del tamaño del soporte utilizado para introducir la membrana.

A continuación se procedió a hibridar la membrana con una sonda específica. Esto se llevó a cabo en el mismo horno, 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 siempre se utilizaron 8 mL de solución, a los que se le adicionaron de 40 a 200 ng de sonda marcada previamente hervida durante 10 min para lograr su desnaturalización, y enfriada en 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, y otras dos veces con la solución de equilibrado II durante 15 min cada vez, para eliminar toda la sonda no unida específicamente.

#### 3.2.5.12.4. Detección de Fragmentos de ADN Hibridados con Sondas Marcadas con Digoxigenina mediante Reacción con Fosfatasa Alcalina

Este procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo presente en el kit *DIG DNA Labeling and Detection* de Roche Molecular Biochemicals, para realizar la detección inmunológica de fragmentos de ADN a los que se ha unido una sonda marcada con DIG\_dUTP. Todas las incubaciones y lavados descritos a continuación fueron efectuados en agitación a temperatura ambiente. La membrana fue sumergida 5 min en tampón de lavado e incubada durante 30 min en solución de bloqueo 1X, tras lo que se incubó durante 30 min con fuerte agitación en 50 mL de solución de bloqueo 1X a la que se habían añadido 5 µL (dilución 1:10000) de

anticuerpo *anti-DIG-AP* (anticuerpo policlonal ovino antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina). Tras esta incubación, la membrana fue lavada dos veces durante 15 min cada vez en tampón de lavado (para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la sonda marcada) y el filtro fue equilibrado 5 min en al menos 20 mL de tampón de detección. Por último, la membrana fue incubada en solución de desarrollo del color (NBT/BCIP) en oscuridad, en una bolsa de plástico termosellada. Como consecuencia de la reacción enzimática originada por la fosfatasa alcalina, la formación de un precipitado violeta indicó la presencia de ADN complementario a la sonda utilizada. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua MilliQ®. El filtro se secó al aire y se escaneó para obtener una imagen de las bandas reveladas.

#### 3.2.6. MANIPULACIÓN DE ARN

##### 3.2.6.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Las extracciones de ARN se llevaron a cabo utilizando el kit *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche), con las precauciones necesarias requeridas por la fácil degradación que sufre esta molécula por contaminaciones con ARNasas (por tanto todo el material y soluciones utilizadas para este fin fueron tratadas con DEPC al 0,1% (v/v) a excepción del agua MilliQ®, a la que se le adicionó al 1% (v/v), manteniéndose durante 1 h a 37°C, o bien durante toda la noche a temperatura ambiente).

Las células fueron cultivadas a 30°C y 300 rpm en medio CTT líquido hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1. A continuación, se recogieron 3 mL de cultivo por centrifugación a 10000 g durante 10 min y temperatura ambiente, se realizó un lavado en tampón TM y se concentraron nuevamente las células en el mismo tampón a una D.O.<sub>600</sub> de 15. Una vez obtenida la muestra, ésta fue tratada siguiendo las indicaciones del kit: lisis en un medio fuertemente desnaturalizante, degradación del ADN celular con ADNasa libre de ARNasa (kit *DNA-free*<sup>TM</sup> de Ambion), y purificación del ARN celular utilizando un filtro con una matriz capaz de unir el ARN de forma selectiva, eluyéndose posteriormente en un volumen de 50 µL con agua libre de ARNasas.

##### 3.2.6.2. RT-PCR

Esta técnica fue utilizada para generar ADNc de doble cadena a partir de ARN, utilizando un oligonucleótido complementario a una secuencia de interés y la actividad de la enzima transcriptasa inversa.

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 y 0,5 mM de cada uno de los dNTPs hasta alcanzar un volumen final de 20 µL. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 min, se enfrió otros 5 min en hielo y se añadió el tampón de la enzima 1X y DTT 10 mM, volviendo a calentar a 42°C durante 2 min. Finalmente, se incorporaron 200 U de la enzima *SuperScript II RNasa H Reverse Transcriptase*, incubándose 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, y los productos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 5%.

Una vez se había obtenido el ADN complementario al ARN cuyo oligonucleótido utilizado anillaba en él, se procedió a amplificar por PCR una región que permitiera identificar qué genes habían sido cotranscritos en el mismo ARNm, utilizando como molde 2  $\mu$ L de ADNc y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.5.3. de esta sección. Un esquema de este proceso se puede ver en Resultados, Fig. 4.7.

### 3.2.7. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

#### 3.2.7.1. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para conseguir este fin, el primer paso necesario es tener el gen de la proteína deseada en un vector de expresión. En el transcurso de esta Tesis Doctoral dos han sido los vectores de este tipo utilizados: pET24a(+) y pETTOPO. En ellos se han introducido los genes *cuoB* y *corE* respectivamente, como se indica en los apartados 4.3.6.1 y 4.4.6.1. Una vez conseguidos estos plásmidos, es necesario realizar una inducción de la síntesis de proteínas para obtener gran cantidad de las mismas, y preparar los extractos celulares para finalmente proceder a la purificación de CuoB y CorE con una cola de polihistidina en el extremo N-terminal (hCorE).

##### 3.2.7.1.1. Inducción de Proteínas Recombinantes con IPTG

Células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) Star<sup>TM</sup> fueron transformadas 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, dos o ninguna cola de 6 histidinas en el extremo N y/o C-terminal. La presencia de estas histidinas facilita la posterior purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-níquel.

El cultivo transformado se adicionó a 50 mL de medio LB fresco con kanamicina, y se incubó a 37°C y 200 rpm de agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0,5-0,8. En este momento, el cultivo se mantuvo durante 15 min a la temperatura óptima de inducción para cada caso antes de adicionar IPTG a una concentración final de 0,1-1 mM. Es en este instante 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.

##### 3.2.7.1.2. Preparación de Extractos Proteicos Inducidos

En el caso de la purificación de CorE fue suficiente el procesamiento de 1 L de cultivo por obtenerse un alto rendimiento de inducción y estar la mayoría de la proteína CorE en la fracción soluble. Este cultivo inducido con IPTG 0,1 mM durante 6 h a 37°C fue recogido por centrifugación a 10000 g durante 15 min a 4°C y posteriormente congelado a -20°C hasta la ruptura de las células en prensa francesa. Para ello, en primer lugar se adicionó una mezcla de ADNasaI (10  $\mu$ g/mL de extracto), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) e inhibidores de proteínas (leupeptina y antipaina a 2  $\mu$ g/mL de extracto) al cultivo anteriormente centrifugado y resuspendido en Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Las células

fueron rotas pasando el cultivo dos o tres veces por una prensa francesa a 9000 psi (~ 612 atm o 62 MPa). Tras este proceso se obtiene un extracto proteico crudo formado por una mezcla de proteínas celulares entre las que se encontraba la proteína inducida (fracción total). Este lisado se centrifugó a 13000 g durante 30 min a 4°C para separar la fracción insoluble (precipitado) de la fracción soluble (sobrenadante). Esta última se repartió en diferentes alícuotas para conservarlas a -20°C hasta el momento de llevar a cabo el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad.

#### 3.2.7.1.3. Purificación de Proteínas Recombinantes

La purificación de hCorE recombinante se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTrap<sup>TM</sup>HP suministrada por GE Healthcare, en el centro ITQB de la Universidad Nova de Lisboa, durante una estancia realizada en el laboratorio de la Dra. L.O. Martins. Esta columna porta cationes metálicos de níquel capaces de retener de forma selectiva a proteínas portadoras de colas de histidina, como ocurre en este caso con hCorE. La capacidad de unión de las proteínas a la columna es dependiente de la concentración de imidazol, quedando retenidas a concentraciones bajas y siendo eluidas al incrementar su concentración.

Todo el proceso de purificación se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución o FPLC (Akta-FPLC; Amersham Biosciences). Las soluciones utilizadas en este sistema fueron preparadas con agua milliQ<sup>®</sup>, filtradas y degasificadas con una bomba de vacío durante al menos 30 min. Las columnas HisTrap<sup>TM</sup>HP con 1 mL de lecho fueron equilibradas con 5 volúmenes de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y cloruro sódico 0,5 M e imidazol 30 mM a un flujo constante de 1 mL/min, teniendo en cuenta la limitación de presión indicada por la casa comercial para la columna. A continuación se hizo pasar todo el extracto por la columna a flujo constante de 0,2 mL/min, y se mantuvo hasta que dejaron de pasar proteínas no unidas a la columna. El siguiente paso fue realizar un gradiente lineal con imidazol para eluir las proteínas (30 mM-250 mM) a un flujo constante de 0,5 mL/min, utilizando dos tampones idénticos al de equilibrado, uno de ellos con una concentración de imidazol de 250 mM. Volúmenes de 1 mL fueron separados por un colector de fracciones, y las alícuotas cuya detección a 280 nm indicó presencia de proteínas fueron posteriormente analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie. La columna fue lavada con un tampón con alta concentración de imidazol (0,5-1 M), separada del aparato de FPLC y conservada en etanol al 20% (v/v) antes de su almacenamiento a 4°C. Las fracciones con hCorE fueron unidas y concentradas por ultrafiltración mediante centrifugación utilizando una membrana con un límite de exclusión de 10 kDa. Finalmente, la proteína fue equilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y parte de ella se transfirió a una membrana mediante Western blot para realizar una inmunodetección, tras lo que se midió su concentración y se conservó en diferentes alícuotas con glicerol al 15% a -80°C.

#### 3.2.7.2. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles desnaturizantes con SDS permite separar las proteínas presentes en un extracto en función de su peso molecular, siendo mayor la migración en el gel cuanto menor es el tamaño de la proteína. Estos geles están formados por la polimerización de monómeros de acrilamida, generando cadenas lineales entrecruzadas entre sí por monómeros de bisacrilamida. 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 de este compuesto que se une a las proteínas es proporcional a la concentración de las mismas, dando la intensidad de color observada una idea de la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

Estos geles están compuestos por dos porciones bien diferenciadas, que deben ser preparadas secuencialmente. La porción inferior, denominada gel separador, representa la fracción donde se producirá la separación electroforética de las proteínas presentes en la muestra analizada en función de su peso molecular, siendo teñida al final del proceso. La porción superior o gel concentrador constituye la zona donde se producirá la concentración de proteínas contenidas en el extracto, para que se produzca una separación homogénea de las mismas en el gel separador partiendo todas del mismo punto. En este trabajo todos los geles SDS-PAGE utilizados estaban compuestos por un gel separador al 17,5% de acrilamida junto con un gel concentrador al 5% de acrilamida:

Tabla 3.5. Composición de los geles SDS-PAGE utilizados en este estudio

COMPONENTES	GEL SEPARADOR (mL)	GEL CONCENTRADOR (mL)
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>	-	6,28
10% Persulfato amónico	0,067	0,050
TEMED	0,0067	0,005

Los componentes de la solución fueron mezclados siguiendo el orden en que aparecen en la Tabla, e inmediatamente después de la adición del persulfato amónico y TEMED la mezcla correspondiente al gel separador fue vertida entre dos placas de cristal hasta que su nivel se situó a 2-3 cm del borde. A continuación, se adicionó suavemente agua MilliQ<sup>®</sup> para eliminar posibles burbujas, mantener húmedo el gel y crear una superficie lisa y sin menisco. Una vez que el gel separador polimerizó se retiró el agua que se había incorporado y se adicionó la mezcla del gel concentrador colocando finalmente el peine que daría forma a los pocillos en el gel para cargar las muestras. Tras la completa polimerización de la porción superior, el gel se transfirió a un tanque vertical conteniendo tampón de electroforesis SDS-PAGE, y se cargaron las muestras tras ser hervidas durante 10 min en tampón de carga 5X. La electroforesis se realizó a amperaje constante (30 mA), hasta que el azul de bromofenol salió del gel al tampón de electroforesis.

### 3.2.7.3. TINCIÓN DE GELES SDS-PAGE CON AZUL COOMASSIE

Finalizada la separación electroforética de las proteínas, los geles fueron incubados de modo secuencial en agitación y a temperatura ambiente, en cuatro soluciones con diferente proporción de ácido acético glacial para llevar a cabo su tinción (ver Tabla 3.1). De este modo, el gel se mantuvo en la solución I durante una noche, 8 h en la solución II y de nuevo toda la noche en la solución III. Finalmente se introdujo en la solución IV para desteñir las zonas donde no había proteínas en el gel y

umentar así el contraste. En este paso, para facilitar la eliminación de exceso de azul Coomassie, se introdujo una esponja de 2cm aproximadamente de diámetro que absorbiera el colorante. Los geles fueron secados sobre papel Whatman 3MM a 80°C durante 3 h en un secador de geles.

#### 3.2.7.4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

La proteína recombinante hCorE expresada a partir del vector pET200/D-TOPO porta una cola de histidina en la región N-terminal, lo que permite su detección mediante el empleo de anticuerpos específicos Anti-His. Para esta detección fue necesario transferir las proteínas a un soporte sólido a partir de un gel SDS-PAGE mediante Western blot y llevar a cabo una inmunodetección por colorimetría. Este procedimiento se llevó a cabo también para detectar la expresión de hCorE *in vivo* en respuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre, o regulada por un promotor constitutivo.

La transferencia de proteínas a una membrana se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Burnette (1981), utilizando un aparato de transferencia semi-seca y membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 µm, capaces de retener proteínas con un peso molecular superior a 10 kDa. Las incubaciones del gel y la membrana en las distintas soluciones empleadas en esta técnica fueron realizadas, salvo en los casos en que se indica lo contrario, a temperatura ambiente y en agitación.

Como primer paso, una vez realizada una electroforesis SDS-PAGE con las muestras a analizar, la porción de gel separador fue incubada durante 30 min en solución de transferencia. Mientras tanto se preparó una membrana de PVDF con un tamaño ligeramente superior al del gel, sumergiéndola en metanol absoluto durante 15 s y lavándola durante 2 min con agua MilliQ®. A continuación, se incubó en solución de transferencia durante 5 min.

Una vez tratados gel y membrana se procedió al montaje para llevar a cabo la transferencia. 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 separador. Otras cuatro piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana fueron depositadas finalmente habiendo sido igualmente humedecidas en la solución de transferencia. Por último se colocó la placa correspondiente al polo negativo del dispositivo de transferencia y ésta se realizó a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> durante 90 min.

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, tras lo que se lavó con agua MilliQ® hasta visualizar las proteínas y anotar las posiciones de los pesos moleculares presentados por el patrón utilizado. Para desteñir completamente la membrana, se utilizó una solución de NaOH 0,1 N y finalmente la membrana se incubó con el reactivo de bloqueo a 4°C durante toda la noche en agitación. Tras lavar la membrana tres veces durante 5 min cada vez con la solución de lavado se procedió a realizar la inmunodetección.

### 3.2.7.5. INMUNODETECCIÓN POR COLORIMETRÍA DE PROTEÍNAS CON COLAS DE HISTIDINA

Para detectar la proteína fijada a la membrana de PVDF, ésta se incubó durante 2 h en tampón de dilución con el anticuerpo *Anti-His G-AP* (ya que la cola estaba fusionada en el extremo N-terminal) conjugado con fosfatasa alcalina. A continuación, el filtro se lavó 4 veces durante 5 min cada vez utilizando solución de lavado, y una vez más durante 5 min en TBS para eliminar los restos de detergente, tras lo que fue equilibrada durante 10 min en tampón de detección. Finalmente, para efectuar el revelado, la membrana se incubó en una bolsa de plástico termosellada que contenía la solución de desarrollo del color (NBT/BCIP) y se mantuvo 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-terminal. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua MilliQ®.

### 3.2.7.6. DETECCIÓN DE hCorE *In Vivo*

Para determinar la expresión de hCorE por células de *E. coli* en un momento determinado se siguió la siguiente estrategia: se realizó un cultivo celular en condiciones control y otro en el que se sometieron las células a algún tratamiento (en nuestro caso, presencia de sulfato de cobre). Estos cultivos fueron incubados por un tiempo determinado y recogidos bien por centrifugación (a partir de medio líquido), bien con ayuda de una espátula (a partir de medio sólido). A continuación, las células fueron resuspendidas en tampón TM con una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF y benzamidina), sometidas a sonicación (22,5 kHz) y centrifugadas a 13000g durante 30 min a 4°C. De este modo separamos los restos celulares de nuestra proteína de interés (en este caso hCorE, soluble en el citoplasma). Una vez obtenido este extracto crudo de proteínas, se midió su concentración y se realizó una electroforesis SDS-PAGE donde se cargó en cada pocillo una cantidad idéntica de proteínas (100 µg en la Fig. 4.49 y 60µg en la Fig. 4.47, con hCorE sobreexpresada). Tras la electroforesis, el siguiente paso fue llevar a cabo un Western blot (como se ha indicado en apartados anteriores) con un anticuerpo que reconozca específicamente nuestra proteína de interés. Para obtener este anticuerpo específico hay que relizar una serie de pasos que permitan, generalmente, inmunizar a un conejo frente a nuestra proteína para que produzca anticuerpos que la reconozcan, y posteriormente aislar esos anticuerpos. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se siguió una estrategia similar durante todo el proceso de detección de hCorE *in vivo*, aunque no fue necesaria la obtención de anticuerpos frente a nuestra proteína, por introducirse ésta con una cola de histidina en el extremo N-terminal en una cepa de *M. xanthus* portadora de una delección para *corE* (de modo que pudiese ser utilizado el anticuerpo *Anti-His G-AP*). Dos fueron los casos en los que se llevó a cabo la detección de hCorE *in vivo*:

#### 3.2.7.6.1. Estudio de la Estabilidad de hCorE

Para determinar si CorE sufría degradación durante la incubación de las células en presencia de cobre, se realizó la siguiente construcción: se amplificó un fragmento por PCR utilizando como molde el plásmido pETTOPOCorE y la pareja de oligonucleótidos CorEHisTagBamF/CorEHisTagPstR (Tabla 3.2). Este fragmento, con la secuencia para *corE* con una cola de histidina en el extremo N-terminal, fue digerido con las enzimas BamHI/PstI e introducido en un plásmido digerido con las mismas



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

enzimas de restricción, que portaba un marcador de resistencia a tetraciclina y un fragmento de unas 800 pb correspondiente a una región del genoma justo anterior a *corE* (Fig. 3.1). Este plásmido fue introducido en un mutante de delección para *corE* portador de una fusión *cuoB-lacZ* (Fig. 3.2). La proteína CorE con una cola de histidina en el extremo N-terminal fue detectada como se ha descrito anteriormente. Se realizó una medida densitométrica de la intensidad de las bandas reveladas para CorE con el software diferentes Quantity One<sup>TM</sup>. El porcentaje de estas bandas se calculó tomando como referencia (100%) una banda superior, correspondiente a una proteína cuya intensidad es constante en todas las condiciones probadas.

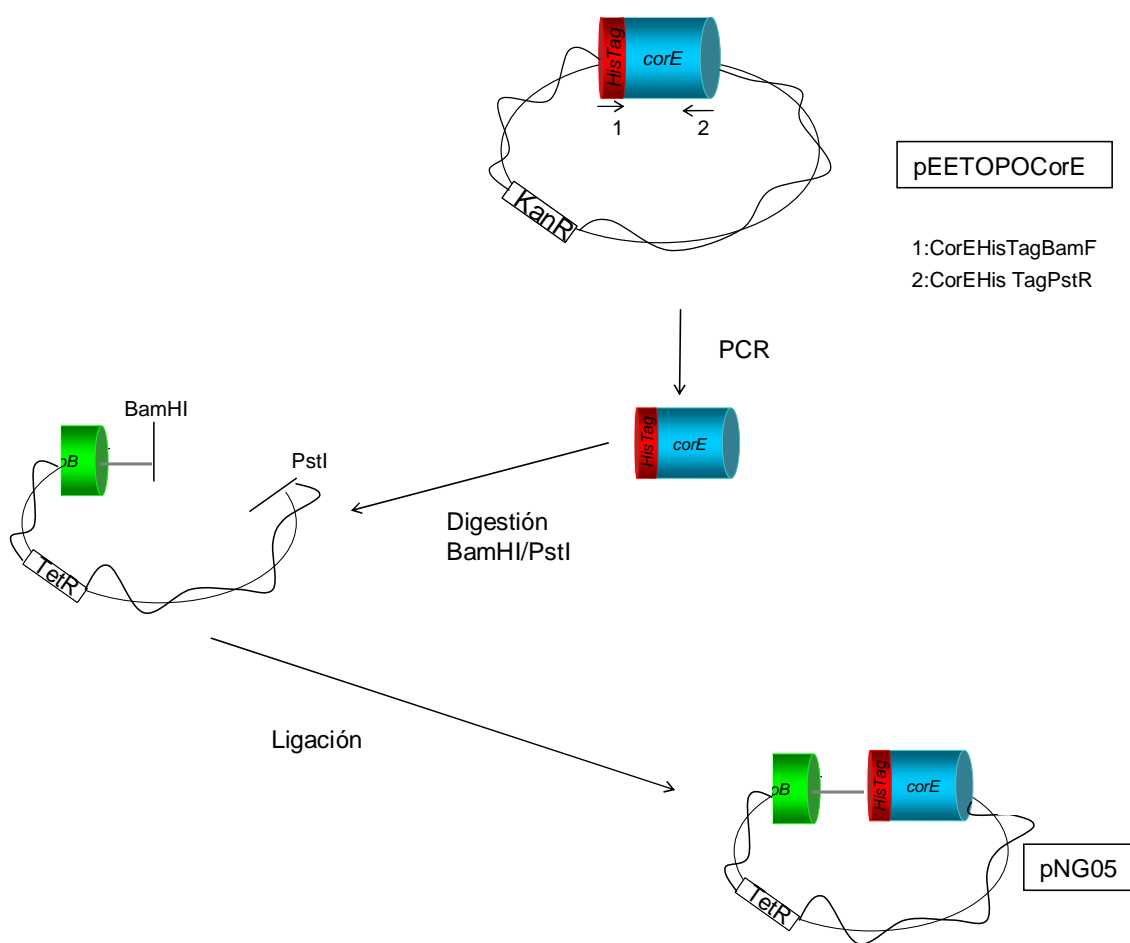


Figura 3.1. Construcción del plásmido pNG05. El plásmido resultante porta un marcador de resistencia a tetraciclina, y el gen *corE* con una secuencia que codificará para una cola de polihistidina en su extremo N-terminal, clonado en fase con un fragmento situado en el genoma justo por encima de *corE*. El gen *corE* está representado por un barril de color azul. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real en pb. Kan<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por diferentes plásmidos.

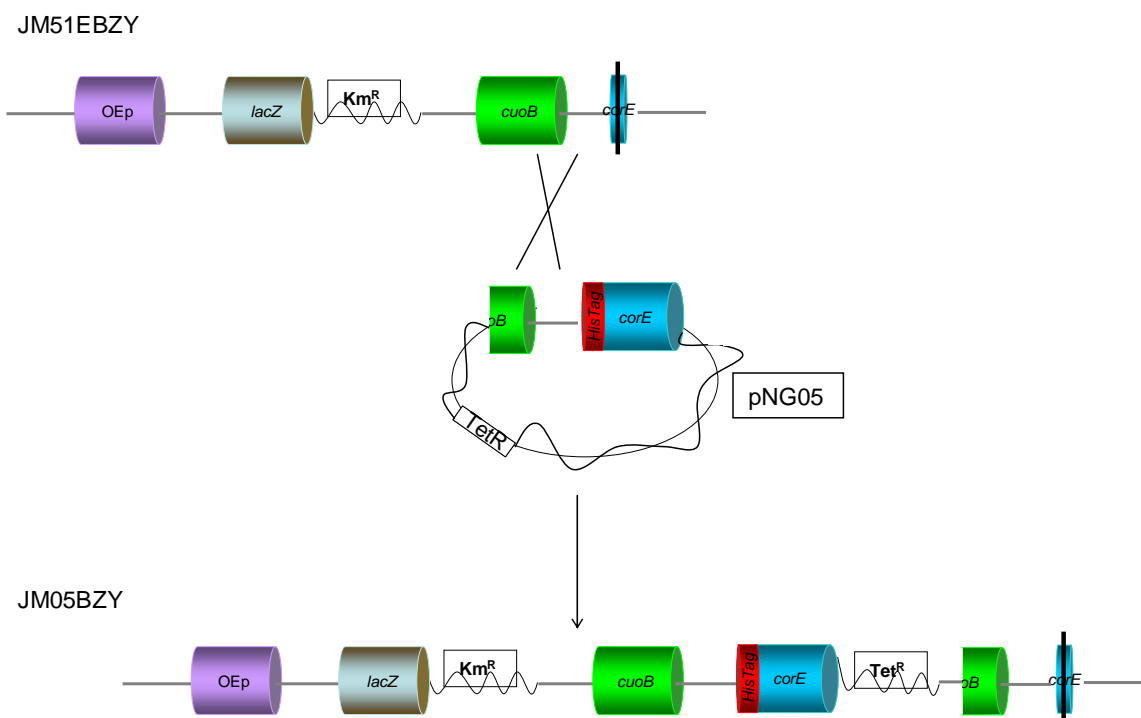


Figura 3.2. Esquema de la construcción portada por la cepa JM05BZY. El plásmido pNG05 fue electroporado en la cepa JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*), y la cepa resultante JM05BZY fue seleccionada en medios suplementados con kanamicina y tetraciclina. Los genes están representados por barriles de diversos colores, mostrando en su interior el nombre de cada gen. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real de los genes. La delección de *corE* está representada por un segmento azul con una línea negra vertical. OEp: MXAN\_3424; *lacZ*: gen *lacZ* de *E. coli*. Km<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por diferentes plásmidos.

### 3.2.7.6.2. Sobreexpresión de hCorE

En este caso, el plásmido pNG05 fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y BamHI y purificado (Fig. 3.3). Asimismo, un fragmento de unas 600 pb justo por encima del gen *oar* (Martínez-Cañamero *et al.*, 1993), previamente amplificado con la pareja de oligonucleótidos pKY481Bam/*oar*Kpn (Tabla 3.2), fue digerido con las mismas enzimas de restricción. La ligación de ambos dio lugar al plásmido pNG08, que fue introducido en la cepa JM51EBZY, de manera que la única copia de *corE* estuviese bajo el control del promotor de *oar* (Fig. 3.4). La determinación de la sobreexpresión de hCorE en esta cepa se hizo mediante Western blot como se ha descrito anteriormente.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

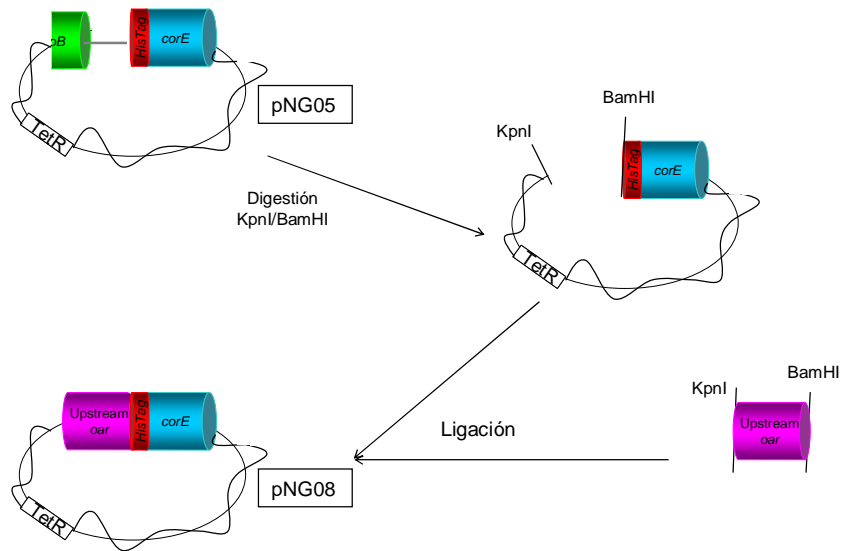


Figura 3.3. Construcción del plásmido pNG08. El plásmido resultante porta un marcador de resistencia a tetraciclina, y el gen *corE* con una secuencia que codificará para una cola de polihistidina en su extremo N-terminal, clonado en fase con un fragmento situado en el genoma justo por encima de *oar*. El gen *corE* está representado por un barril de color azul. Upstream *oar*: región anterior a *oar* en el genoma. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real en pb. Tet<sup>R</sup> indica resistencia a tetraciclina.

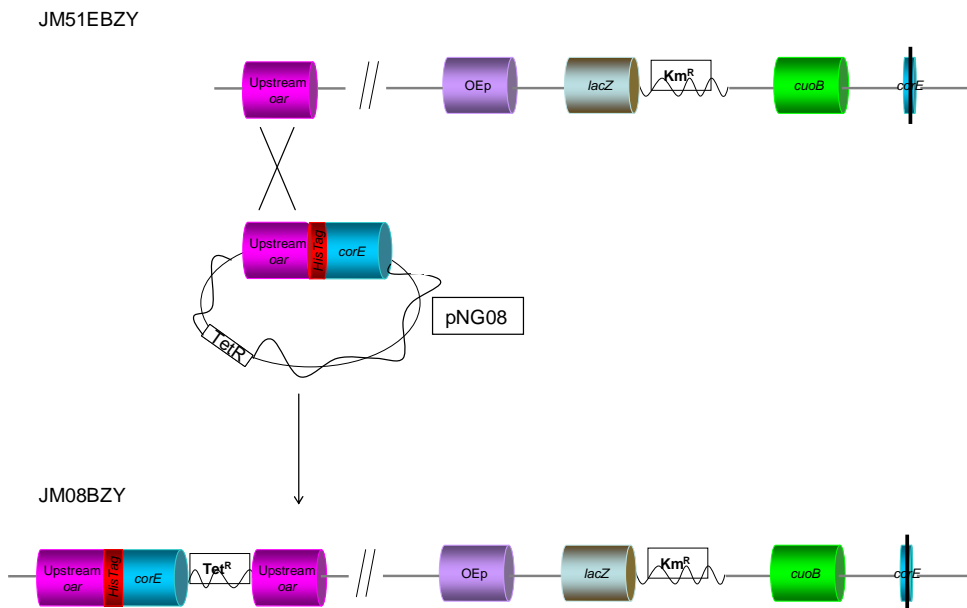


Figura 3.4. Esquema de la construcción portada por la cepa JM08BZY. El plásmido pNG08 fue electroporado en la cepa JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*), y la cepa resultante JM08BZY fue seleccionada en medios suplementados con kanamicina y tetraciclina. Los genes están representados por barriles de diversos colores, mostrando en su interior el nombre de cada gen. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real de los genes. La delección de *corE* está representada por un segmento azul con una línea negra vertical. OE<sub>p</sub>: MXAN\_3424; *lacZ*: gen *lacZ* de *E. coli*; Upstream *oar*: región anterior a *oar* en el genoma. Km<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por diferentes plásmidos. Las líneas oblicuas indican discontinuidad en el genoma.

### 3.2.7.7. ESTUDIO DEL RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE COMPLEJOS ADN-PROTEÍNA (EMSA)

Esta técnica posibilita la detección de formación de complejos proteína-ADN, mediante la observación por autorradiografía de la radiactividad desprendida por una sonda de ADN marcada con  $^{32}\text{P}$ . Si la proteína a analizar presenta afinidad por la sonda marcada, la incubación de ambos y posterior electroforesis en geles de acrilamida (3.2.5.10.2) originará una banda con menor movilidad electroforética que la sonda que no ha sido incubada por la proteína.

Para llevar a cabo este ensayo, un fragmento anterior al sitio de unión al ribosoma de *copB* fue amplificado mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 3422EMSA265F/3422EMSA265R (Tabla 3.2). Tras purificar, desfosforilar (apartado 3.2.5.7.) y marcar radiactivamente (apartado 3.2.5.8.), se llevó a cabo la incubación en tampón BB de hCorE 500 nM y 0,5 nM de sonda marcada radiactivamente (13000 cpm), añadiendo un ADN competidor en exceso (500 veces más que de sonda marcada), en este caso polidIdC. En determinadas ocasiones, se adicionó BCS (como quelante específico de  $\text{Cu}^+$ ) o sulfato de cobre 0,1 mM. Se llevaron a cabo reacciones control sin adicionar proteína, cobre o BCS. Tras 10 min de incubación a 30°C, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 5% que había sido previamente sometido a electroforesis para eliminar cualquier resto que quedara en los pocillos y permitir una distribución homogénea de las bandas en el gel. El proceso finaliza con la detección de las bandas radiactivas como se describe en el apartado 3.2.5.10.2.

### 3.2.7.8. DICROISMO CIRCULAR

La técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD) es un método muy valioso a la hora de determinar estructuras secundarias de proteínas. Esta técnica se basa en la capacidad que tienen las proteínas de desviar un haz de luz polarizada formado por dos semihaces circulares, uno hacia la derecha y otro hacia la izquierda. Las diferencias en estos haces tras pasar por la muestra generan un espectro característico para determinadas estructuras. La estructura de hélice  $\alpha$  presenta un espectro de dicroísmo circular característico, con un máximo positivo a 190 nm y dos mínimos negativos a 208 y 222 nm (Moffit, 1956).

Para llevar a cabo este análisis, el espectro de CD en el ultravioleta lejano fue medido en un espectropolarímetro Jasco-720, utilizando una cubeta de cuarzo de 0,01 cm en un rango de 190-250 nm, y una concentración de proteína de 5,5  $\mu\text{M}$  en tampón Tris-HCl 20 mM pH7,5. Tres espectros con la proteína hCorE y otros tres sólo con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5 fueron determinados a intervalos de 0,2 nm.

Los datos obtenidos fueron contrastados con los de otras proteínas depositadas en bases de datos, cuya estructura secundaria ha sido previamente determinada por cristalografía de rayos X. Para ello se utilizó el servidor DICHROWEB (Lobley *et al.*, 2002). La calidad en la asociación de estos parámetros (NRMSD) fue determinada con los algoritmos CDSSTR, SELCON3 y CONTINLL, y el algoritmo finalmente utilizado para obtener una estimación de la estructura secundaria de hCorE por ser aquel que proporcionaba un valor menor de NRMSD fue CONTINLL. Este algoritmo, desarrollado por Provencher y Glockner en 1981 utiliza un tipo de regresión para asociar una combinación lineal de espectros de composición conocida con uno de

composición desconocida. En este modelo, los datos de proteínas rastreados son aquellos que presentan una menor desviación de NRMSD con respecto al espectro problema, siendo utilizados sólo aquellos que se ajustan fuertemente al espectro de nuestra proteína en cuestión (en este caso 7).

#### 3.2.7.9. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CUPROSO OXIDASA

El consumo de oxígeno en una reacción de oxidación permite determinar esta actividad enzimática. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, la determinación de actividad cuproso oxidasa se ha llevado a cabo en extractos celulares de la cepa silvestre DZF1, así como en tres mutantes de delección para los genes *cuoA*, *cuoB* y *cuoC*, constituyendo objeto de estudio en el presente trabajo únicamente los dos últimos de estos tres genes.

En primer lugar, fue necesario obtener extractos celulares de *M. xanthus* que constituirían la parte enzimática de la reacción. Para ello, todas las cepas fueron crecidas en 100 mL de medio CTT líquido, en un matraz Erlenmeyer de 1 L para asegurar una buena aireación, hasta una  $DO_{600}$  de 0,8-1. En este punto, las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas y concentradas en tampón TM a una  $DO_{600}$  de 15, tras lo que 200  $\mu$ L (en gotas de 20  $\mu$ L) fueron incubados por placa, cuyos medios sólidos habían sido preparados con o sin adicionar sulfato de cobre. Estas células fueron incubadas a 30°C y recogidas a diferentes tiempos, cuando pasaron a ser congeladas a -20°C, y posteriormente lisadas como se ha descrito en el apartado 3.2.7.3.2., con la salvedad de que el tampón utilizado fue TM. Finalmente se determinó la concentración de proteínas siguiendo el método descrito en el apartado siguiente (3.2.7.10).

El ensayo de actividad enzimática fue llevado a cabo mediante el uso de un oxígrafo (Hansatech), en el laboratorio MET. encabezado por la Dra. L.O. Martins, utilizando el software Oxigraph Plus V.1.01., que permite determinar el oxígeno disuelto en una fase líquida. Las tasas iniciales de actividad fueron calculadas a partir de curvas proporcionadas por el oxígrafo de concentración de oxígeno en función del tiempo. La calibración del aparato se llevó a cabo utilizando ditionito de sodio. El sustrato utilizado, Cu(I), fue añadido a la reacción como un complejo que libera Cu(I) en solución ( $[Cu(I)(MeCN)_4]PF_6$ ). Cada vez que se realizaba una sesión de medidas, se preparaba la solución de Cu(I) en acetonitrilo desgasificado y purgado con argón. Esta solución se introducía en el oxígrafo para realizar las medidas con ayuda de una jeringa Hamilton de 0,1 mL (manteniendo la anaerobiosis), iniciando así la reacción. Las determinaciones de actividad se llevaron a cabo con la siguiente mezcla de reacción:

Acetato sódico	100 mM pH5
Acetonitrilo	5%
Extracto celular	0,1 mg/mL
$[Cu(I)(MeCN)_4]PF_6$	0,5 mM

Controles sólo con extracto celulares o sólo con el sustrato también se llevaron a cabo, y la actividad se expresó como nmol de Cu(I) oxidado por min y mg de proteína tras realizar medias con valores de seis medidas diferentes obtenidas a partir de dos cultivos independientes.

### 3.2.7.10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay*. La concentración de las muestras analizadas se determinó frente a una curva patrón de BSA, realizada simultáneamente cada vez que se determinaba concentración de proteínas en una muestra, para aumentar la fiabilidad del método. Para realizar esta determinación se preparó una dilución 1:5 del reactivo *Bio-Rad Protein Assay* en agua MilliQ®, y se utilizó 1 mL de esta dilución al que se añadieron 10 µL de muestra (de concentración conocida para realizar la curva patrón, o de muestra diluida para determinar su concentración). Tras mezclar dilución de reactivo con muestras, se dejó incubar entre 5-30 min teniendo la precaución de que todas las muestras fuesen incubadas el mismo tiempo, y se procedió a medir a 595 nm en un espectrofotómetro que permitía calcular la concentración proteica inmediatamente gracias a la aplicación *Cary Win UV Concentration*.

### 3.2.8. ANÁLISIS 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 *M. xanthus* ha permitido establecer el momento y el nivel de expresión de varios genes analizados a lo largo del ciclo de vida de esta bacteria, y en diversas condiciones de crecimiento. Asimismo ha permitido determinar el papel de CorE en la regulación de varios genes, el efecto de diversos choques con cobre sobre su actividad, los cambios de expresión en genes regulados por CorE en función del estado de oxidación del cobre, y el efecto que sobre esta proteína han causado diversas mutaciones puntuales. En primer lugar se introduciría el plásmido portador de la fusión *lacZ* correspondiente para posteriormente realizar un análisis cualitativo que determinara las condiciones de expresión y finalmente una cuantificación del nivel de expresión en términos de actividad β-galactosidasa.

#### 3.2.8.1. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES *lacZ*

Para la construcción de estas fusiones se utilizó el vector pKY481(Cho y Zusman, 1999a). Este vector posee el gen *lacZ* de *E. coli* completo (cuyo producto génico es la β-galactosidasa), *lacY* (que codifica para una permeasa), y un gen de resistencia a kanamicina que permite realizar una selección de las bacterias que han incorporado el plásmido. Además, posee un sitio de clonación múltiple (MCS) que permite clonar un fragmento de ADN en fase con el gen *lacZ*, de manera que obtendremos una fusión transcripcional (si ningún aminoácido de otra proteína diferente a la β-galactosidasa es traducido finalmente) o traduccional (si el resultado final es una proteína de fusión), que nos permita estimar la expresión del gen fusionado como actividad β-galactosidasa, ya que esta proteína quedará bajo el control del promotor del gen que hemos fusionado.

La construcción de plásmidos portadores de fusiones *lacZ* implicó la clonación de un fragmento de unas 800 pb localizado delante del gen cuya expresión se deseaba conocer. Ese fragmento fue amplificado por PCR empleando oligonucleótidos específicos que incorporasen sitios de restricción útiles en el proceso de clonación en fase (generalmente KpnI en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'), utilizando como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus*. El producto de PCR sería digerido con las

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

enzimas adecuadas, al igual que el vector pKY481, y se produciría la clonación en fase con el gen *lacZ* de *E. coli* (Fig. 3.5).

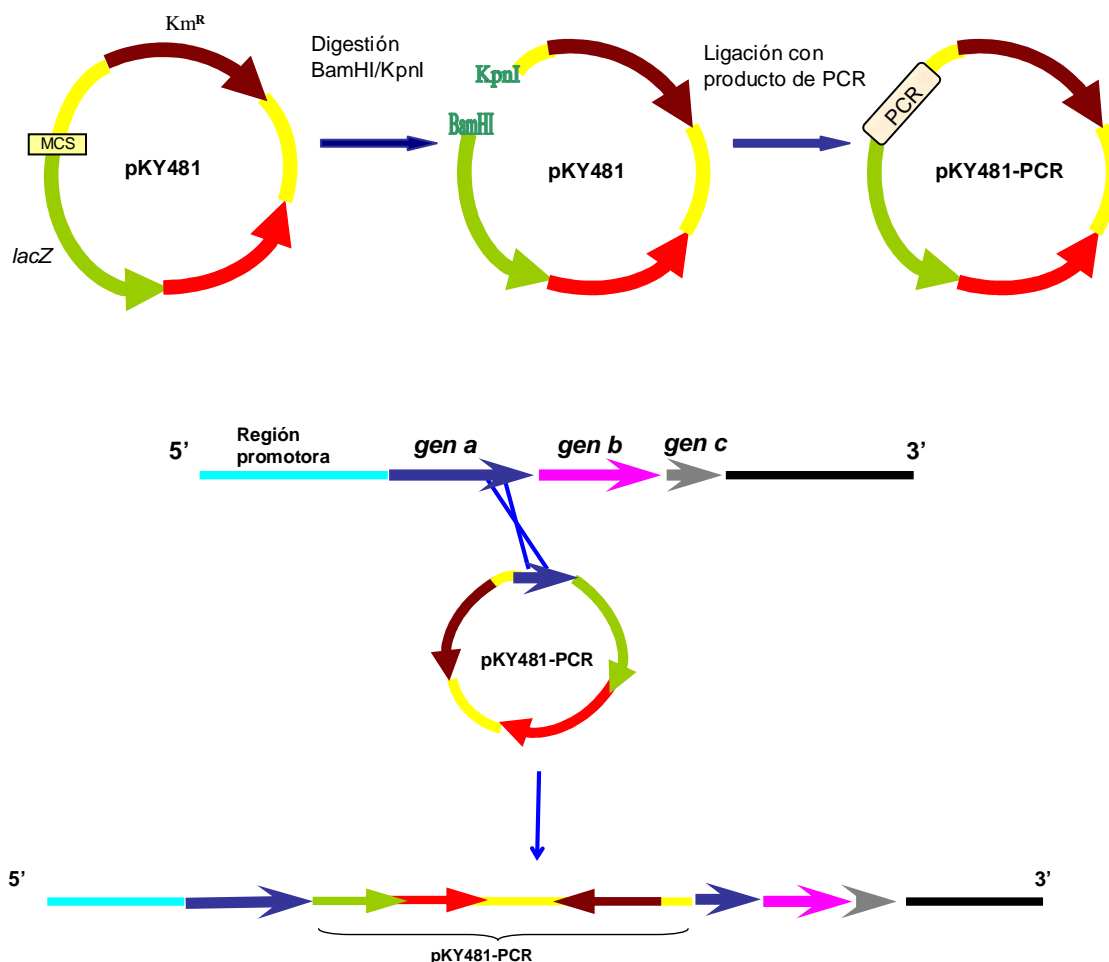


Figura 3.5. Construcción de una fusión entre un gen (*gen b*) de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*. La región amplificada por PCR queda duplicada tras el proceso de recombinación, y la expresión del gen que codifica para la proteína  $\beta$ -galactosidasa (representado por una flecha verde) queda bajo el control de la región promotora del gen que ha sido fusionado. Gen de resistencia a kanamicina: flecha marrón; gen *lacY*: flecha roja. MCS: Sitio de clonación múltiple.

Una vez finalizada la construcción, el plásmido resultante sería electroporado en una cepa de *M. xanthus*. 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 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.

3.2.8.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD  $\beta$ -GALACTOSIDASA

En este caso, los medios sólidos utilizados fueron suplementados con X-Gal a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En ellos se depositó una gota de 10  $\mu\text{L}$  de cultivo con la cepa deseada, concentrado a una  $\text{DO}_{600}$  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 estimación acerca del nivel total de expresión de esos genes.

En el caso del uso de placas con un gradiente continuo de sulfato de cobre, los medios fueron preparados de la siguiente manera: en primer lugar se utilizaron placas cuadradas ( $10 \times 10$  cm), colocando uno de los lados de la base sobre una pipeta de cristal de 0,5 mL (de este modo se consigue que la placa esté inclinada). A continuación se vierte sobre ella (siempre en condiciones de esterilidad), 30 mL del medio deseado, suplementado con la máxima concentración que se quiere alcanzar del metal y X-Gal (Fig. 3.6 A). Una vez solidificada esta capa de medio, las placas son colocadas en posición horizontal, y se añade una nueva capa de medio (30 mL), suplementada sólo con X-Gal (Fig. 3.6 B). El gradiente continuo se formará por difusión vertical del metal entre la capa inferior y la superior (Fig. 3.6 C).

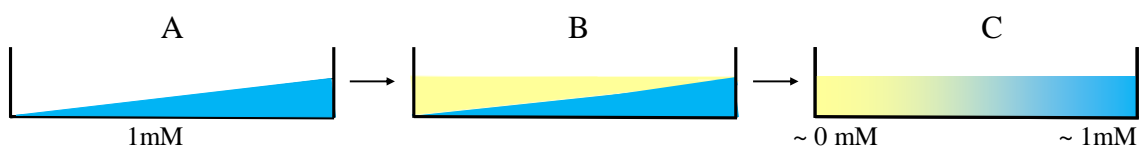


Figura 3.6. Esquema de la preparación de placas con medio de cultivo sólido en el que se alcanza un gradiente continuo entre 0 y 1 mM de sulfato de cobre.

3.2.8.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD  $\beta$ -GALACTOSIDASA

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

## 3.2.8.3.1. Preparación de Extractos Celulares

Para obtener un extracto celular de células portadoras de fusiones *lacZ*, las bacterias fueron cultivadas en medio líquido CTT con kanamicina a 30°C y 300 rpm de agitación hasta que los cultivos alcanzaron una  $\text{DO}_{600}$  de 1. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente, lavadas y concentradas a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 en TM. Posteriormente, se sembraron en placas de medio sólido (CTT o CF) a razón de 200  $\mu\text{L}$  de cultivo por placa en gotas de 20  $\mu\text{L}$ . 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 (22,5 kHz). Para ello, las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu\text{L}$  de tampón TM y sonicadas durante 5 min a intervalos de 30 s para romper las membranas celulares mediante la aplicación de ultrasonidos. Durante la sonicación, las muestras se mantuvieron en hielo. Para posibilitar su ruptura, aquellos cultivos donde se había iniciado la formación de cuerpos



fructificantes (células crecidas en medio CF, a partir de 24 h) fueron sonicados en presencia de bolas de vidrio (Sigma), que previamente habían sido equilibradas en tampón TM. Tras la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 20 min a 4°C, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, del que se realizó una dilución para determinar la concentración de proteínas, y se prepararon alícuotas que se conservaron a -20°C hasta el momento de efectuar la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, que no sobrepasaría una semana para evitar degradación (Kirazov *et al.*, 1993).

En el caso del experimento de la respuesta de CorE ante sucesivos choques por cobre (4.4.6.3), la metodología fue similar aunque con alguna pequeña modificación. Las células fueron incubadas en medio líquido del mismo modo que se ha descrito anteriormente, e igualmente sembradas en placas con 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub> a razón de 200  $\mu$ L de cultivo con una DO<sub>600</sub> de 15, tras lo que fueron siendo recogidas muestras a diferentes tiempos. Transcurridas 24 h de incubación, un lote de estas células fue recogido, resuspendido en medio CTT líquido con 0,3 mM de sulfato de cobre, y concentrado nuevamente a DO<sub>600</sub> de 15 por centrifugación y resuspensión en CTT con 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub>, para volver a ser sembrado en placas con la misma concentración de metal. De ambos lotes de placas (los que llevaban 24 h de incubación y los que se habían vuelto a sembrar) se continuaron tomando muestras, que fueron tratadas tal y como se ha descrito anteriormente para la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Un esquema de este diseño experimental se muestra en la Fig. 4.56 de la sección Resultados.

#### 3.2.8.3.2. Medida De Actividad $\beta$ -Galactosidasa

Para la determinación de actividad se utilizó una concentración de extracto celular entre 15-100  $\mu$ g/ $\mu$ L, según la actividad cualitativa observada previamente. Se prepararon diluciones de los extractos con un volumen final de 50  $\mu$ L en tampón TM, que fueron adicionadas para iniciar la reacción a 450  $\mu$ L de tampón Z con ONPG a razón de 1 mg/mL, preparado extemporáneamente, obteniendo un volumen final de reacción de 500  $\mu$ L. Puesto que el producto de la reacción origina un color amarillo, y los extractos de *M. xanthus* poseen una tonalidad similar, se preparó un lote paralelo de muestras con tampón Z sin el sustrato ONPG como control negativo (450  $\mu$ L de tampón Z y 50  $\mu$ L de extracto). En ambos casos las mezclas se incubaron en un baño a 37°C hasta que el desarrollo del color amarillo adquiriera una intensidad medida a DO<sub>420</sub> entre 0,6-0,9 o hasta un máximo de 180 min de incubación, momento en que la reacción se detenía adicionando 500  $\mu$ L de carbonato cálcico 1 M. A continuación se procedió a la lectura espectrofotométrica de las muestras a 420 nm, usando blancos adecuados para cada lote (uno con tampón Z exclusivamente y otro con tampón Z y ONPG), en los que los 50  $\mu$ L de muestra se sustituyen por tampón TM. Estas dos muestras utilizadas como blancos constituían otros dos controles negativos.

Finalmente, usando como medida de DO<sub>420</sub> la diferencia entre las muestras incubadas en tampón Z con y sin ONPG, las actividades se determinaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Específica} = (213 \cdot A_{420}) \cdot (\text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{mg/mL})^{-1}$$

Donde 213 deriva del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm en nanomoles de *o*-nitrofenol producidos; *mL*

es el volumen de extracto utilizado en la determinación de la actividad; *min* representa el tiempo (en min) durante el cual las muestras permanecen en incubación a 37°C y *mg/mL* es la concentración de proteínas en la muestra.

Por tanto, la actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresa finalmente como nanomoles de *o*-nitrofenol (ONP) producidos por min y por miligramo de proteína.

### 3.2.9 CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN EN FASE

#### 3.2.9.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE DELECIÓN EN FASE

La obtención de mutantes de delección en fase en el transcurso de este trabajo ha implicado la eliminación de los genes prácticamente al completo, excepto en la construcción del mutante de delección para la región CRD de CorE, donde sólo fue delecionada una secuencia correspondiente a 30 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína. Generalmente el codón de iniciación del gen a deleccionar se mantiene en fase con un sitio de restricción BamHI, y a continuación se conserva una región cercana al extremo 3' del gen donde se conserva el codón de terminación. La pauta de lectura no se altera, de modo que la expresión de los genes que puedan ser transcritos en el mismo ARNm no se vea afectada.

La obtención de estos mutantes sensibles a kanamicina fue posible mediante el uso del vector pBJ113 (Julien *et al.*, 2000), que porta dos marcadores selectivos. El vector contiene un casete con un gen de resistencia a kanamicina y el gen *galK*, el cual codifica para una galactoquinasa. Ambos genes se encuentran en un operón bajo el control del promotor del gen de resistencia a kanamicina, el cual es utilizado para la selección positiva en el primer paso de obtención del mutante, es decir, en la obtención de las cepas intermediarias merodiploides. Por su parte el gen *galK* es empleado para efectuar la selección de aquellas cepas que han eliminado el casete, puesto que las células portadoras de este gen no crecen adecuadamente en presencia de galactosa.

En este vector se clonaron dos fragmentos de aproximadamente 800 pb cada uno, correspondientes a fragmentos situados por encima y debajo del gen que se quiere deleccionar (Fig. 3.7). Una vez obtenida esta construcción, el plásmido (designado normalmente como pBJ113- $\Delta$ *gen*) era electroporado en una cepa de *M. xanthus* sensible a kanamicina (bien una cepa silvestre o un mutante de delección) y estas células cultivadas a 30°C en medio sólido CTT suplementado con kanamicina (80  $\mu$ g/mL), de modo que en este medio sólo pudieran crecer aquellas que hubiesen incorporado el plásmido. Este entrecruzamiento se podía producir en el primer o segundo producto de PCR clonado. En ambos casos se produce la incorporación del plásmido completo y como consecuencia se obtiene una duplicación de los fragmentos amplificados por PCR (Fig. 3.8).

Tras varios días de incubación, algunas de las colonias que crecieron en el medio con kanamicina fueron seleccionadas como presuntas positivas y analizadas mediante Southern blot, para comprobar que habían incorporado el plásmido en el lugar correcto.

El siguiente paso consistía en la escisión del casete, para lo que se cultivaban las células en medio sin antibiótico durante 24-48 h, y se realizaban diluciones seriadas

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

(hasta  $10^{-4}$ ) en medio CTT sólido con galactosa al 10%. Al eliminar la presión selectiva se favorece la pérdida del casete por entrecruzamiento entre las regiones duplicadas. De nuevo, este proceso de recombinación se puede producir entre el primer o segundo producto de PCR y sus respectivas regiones homólogas en el cromosoma de la mixobacteria. Como consecuencia de ello se producirá la liberación del casete, y dependiendo de la región en que se dé la recombinación, obtendremos cepas con fenotipo silvestre, o se obtendrá el mutante de delección en fase para el gen deseado (Fig. 3.8). Las bacterias capaces de metabolizar la galactosa y por tanto crecer en un medio suplementado con este azúcar, pero no en presencia de kanamicina, fueron seleccionadas para ser analizadas por Southern blot en busca de alguna que portara la delección para el gen de interés.

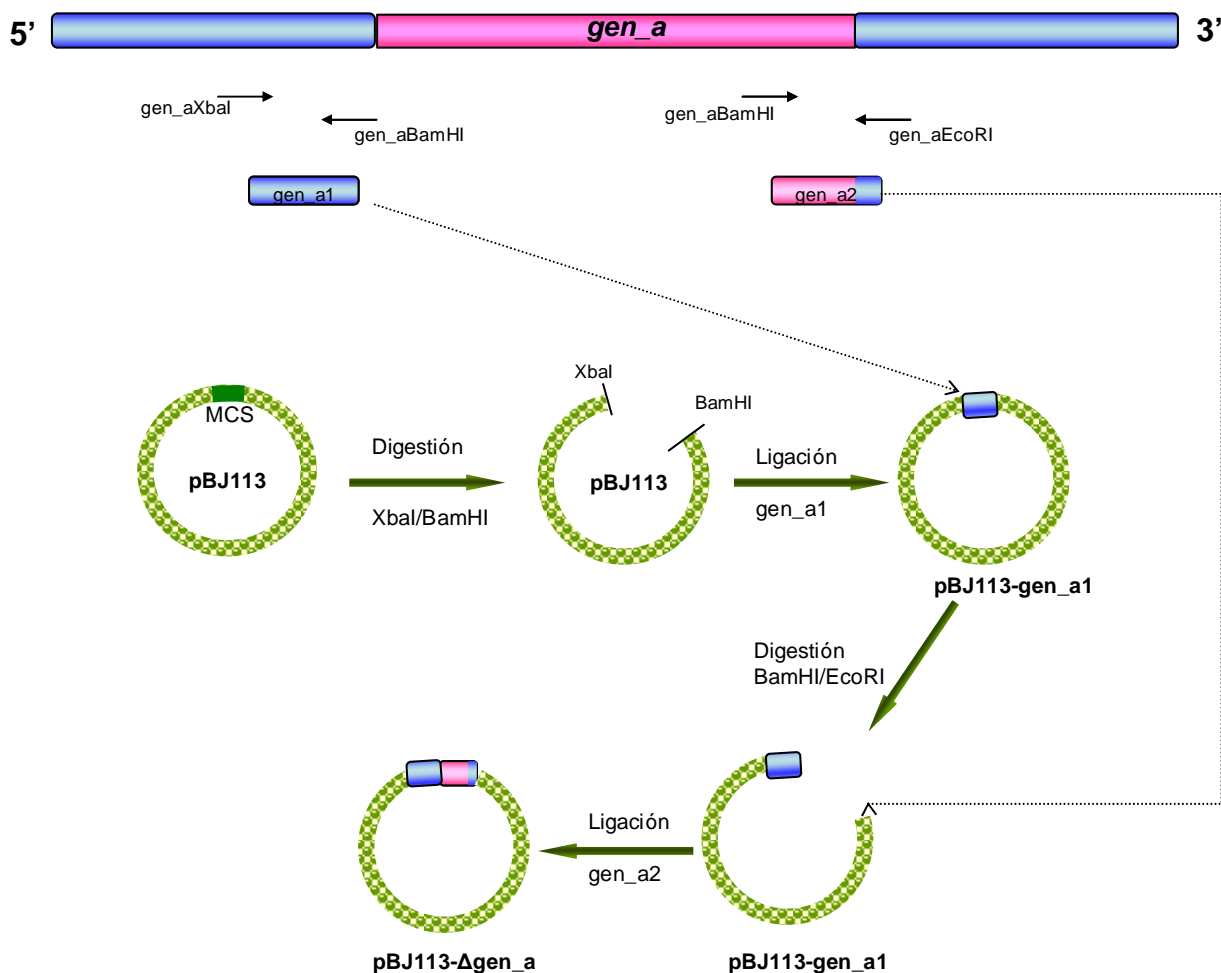


Figura 3.7. Construcción de un plásmido para la obtención de mutantes de delección en fase en *M. xanthus*. MCS: sitio de clonación múltiple. Detalles en el texto.

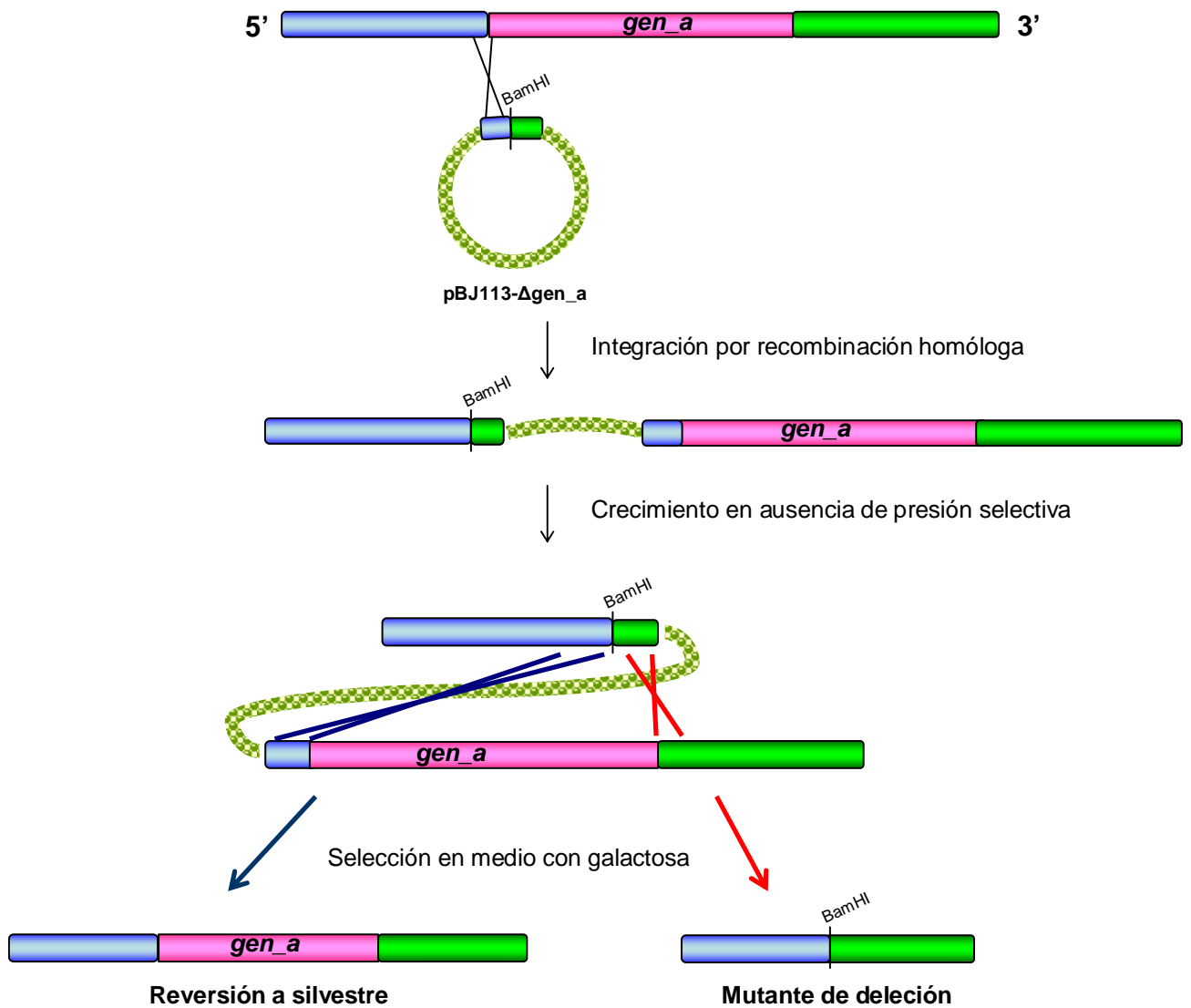


Figura 3.8. Construcción de una cepa de *M. xanthus* portadora de una delección en fase para un gen. La integración del plásmido por recombinación homóloga puede tener lugar en cualquiera de los dos fragmentos presentes en el plásmido pBJ113- $\Delta$ *gen\_a* (azul o verde), llegando a obtener el mismo resultado tras el segundo evento de recombinación (cepas silvestres y mutantes de delección). En el esquema se representa sólo la recombinación inicial en una de las dos regiones.

#### 3.2.9.2. INSERCIÓN DEL GEN *corE* EN UNA CEPA PORTADORA DE UNA FUSIÓN *cuoB-lacZ*

Para estudiar el efecto de CorE sobre la regulación de *cuoB*, así como para conocer su mecanismo de acción, se han llevado a cabo diversas construcciones sobre la cepa JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*). La finalidad es reintroducir el gen *corE* en una cepa carente de él y analizar en las cepas obtenidas la expresión de la fusión *cuoB-lacZ* mediante la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa (puesto que como se verá en la sección Resultados, la expresión del gen *cuoB* está completamente regulada por CorE).

El gen *corE* ha sido insertado en dos posiciones diferentes del genoma: ocupando su lugar correspondiente y bajo el control del promotor del gen *oar* (Martínez-Cañamero *et al.*, 1993). Además, ha sido insertado como WT (es decir, sin sufrir ninguna modificación), con una cola de histidina en el extremo N-terminal (como se ha visto en los apartados 3.2.7.6.1 y 3.2.7.6.2) o con uno o varios tripletes codificantes para cisteína sustituidos por tripletes codificantes para alanina (es decir, con alguna mutación puntual. Ver apartado 3.2.5.4)

En el caso de la inserción de la copia WT de *corE*, se construyó el plásmido pNG00 (ver Apéndice; Tabla A.2). Sólo fue necesario un paso de clonación, ya que el fragmento amplificado de 1,5 kb englobaba una región de unas 800 pb justo por encima del gen *corE* hasta unas 30 pb justo tras el codón de terminación de *corE*. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando como molde ADN cromosómico de la cepa silvestre y la pareja de oligonucleótidos LcsBECFK/CorEDownstreamBamR (Tabla 3.2), y el plásmido resultante de la clonación de este fragmento, portador de un gen de resistencia a tetraciclina, fue denominado pNG00. La doble selección con kanamicina y tetraciclina en los medios de cultivo donde se incubaban las células de la cepa JM51EBZY (resistentes a kanamicina) electroporadas con estos plásmidos, permitía introducir una copia del gen *corE* en el genoma, que controlaría la expresión de la fusión *cuoB-lacZ*. La cepa obtenida se denominó JM00BZY (*corE'* *cuoB-lacZ*). El plásmido pNG00 fue utilizado como molde en las reacciones de mutagénesis dirigida en *corE*, y los plásmidos resultantes de estas reacciones confirmados positivos por secuenciación fueron introducidos, del mismo modo, en la cepa JM51EBZY para analizar el efecto de tales mutaciones como cambios de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

La construcción de las cepas portadoras de *hcorE* (que codificarán CorE con una cola de histidina en el extremo N-terminal) se ha descrito en el apartado 3.2.7.6.

Para construir la cepa JM06BZY (*oar-corE'* *cuoB-lacZ*), donde el gen *corE* se encuentra bajo el control del promotor del gen *oar* (Martínez-Cañamero *et al.*, 1993), el plásmido pNG06 fue electroporado en la cepa JM51EBZY. Este plásmido porta un fragmento idéntico al clonado en el plásmido pNG08 (ver apartado 3.2.7.6.2), codificando una secuencia justo anterior al gen *oar*, y el gen *corE*, amplificado utilizando como molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *M. xanthus*, y la pareja de oligonucleótidos CorEpUC10.1F/CorEpUC10.1R (Tabla 3.2). Ambos fragmentos se encontraban uno a continuación del otro y en fase, en el plásmido pNG06 (ver Apéndice; Tabla A.2).

En la Tabla A.1 (Apéndice) se encuentra el genotipo de todas las cepas obtenidas.

### 3.2.9.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA WT Y MUTANTES DE DELECIÓN

#### 3.2.9.3.1. Crecimiento Vegetativo en Medio Líquido

La realización de curvas de crecimiento con la cepa silvestre permitió determinar su comportamiento frente al cobre. La comparación entre curvas de crecimiento de la cepa silvestre y de los diferentes mutantes de delección obtenidos en el presente trabajo permitió caracterizar la sensibilidad al cobre provocada por la falta de alguno o varios de esos genes.

Las células fueron inoculadas en tubos con 5 mL de medio CTT e incubadas a 30°C en agitación (300 rpm) durante una noche. Tras determinar la  $DO_{600}$  de los cultivos, las muestras fueron diluidas en tubos que contenían 5 mL de medio CTT líquido con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (indicadas en cada caso en la sección resultados) a una  $DO_{600}$  de partida de 0,05. Tras unos instantes de agitación, se tomó la primera medida que determinaría el valor de absorbancia correspondiente al tiempo 0. Varias medidas fueron tomadas periódicamente en estos cultivos para determinar su  $DO_{600}$  en un espectrofotómetro *Spectronic 20D+*.

Cuando se realizaron experimentos con células preinducidas, el cultivo inicial se llevó a cabo en medio CTT líquido suplementado con una concentración subinhibitoria de sulfato de cobre durante 24 h, a una  $DO_{600}$  de partida de 0,05, tras lo que se procedió a actuar del mismo modo que se ha explicado anteriormente (diluyendo las muestras en tubos con 5 mL de medio líquido y diferentes concentraciones de metal).

#### 3.2.9.3.2. 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 células en un medio de cultivo pobre en nutrientes, capaz de inducir el desarrollo multicelular en *M. xanthus*, tomando como control a la bacteria silvestre. Un cultivo crecido a una  $DO_{600}$  de 1 de cada cepa se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 22°C. El precipitado celular se lavó con tampón TM para eliminar los restos de medio de cultivo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, resuspendiendo por último las células en TM a una  $DO_{600}$  final de 15. A continuación, se tomaron 10  $\mu$ L del cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas petri de 5,5 cm de diámetro con 8 mL de medio CF. Las muestras fueron incubadas a 30°C y se llevó a cabo un seguimiento a la lupa de forma periódica del transcurso del ciclo de desarrollo para cada cepa hasta las 96 h de incubación, tomando fotografías a lo largo del tiempo.

Cuando se realizaron experimentos con células preinducidas la metodología fue similar, aunque el cultivo inicial se llevó a cabo en medio CTT líquido suplementado con una concentración subinhibitoria de sulfato de cobre durante 24 h, a una  $DO_{600}$  de partida de 0,05, tras lo que se procedió a actuar del mismo modo que se ha explicado anteriormente (centrifugando, lavando con tampón TM y poniendo gotas de 10  $\mu$ L del cultivo concentrado).

#### 3.2.9.3.3. Recuento de Esporas

El estudio de la esporulación en cepas de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo se ha centrado en el recuento del número de mixósporas producidas cuando las células son incubadas en un medio pobre en nutrientes, estableciendo una comparación con las esporas generadas por la cepa silvestre en las mismas condiciones. En este caso, el medio fue suplementado además en ciertas ocasiones con sulfato de cobre en las concentraciones indicadas.

Las cepas de mixobacteria cuyo número de mixósporas se iba a determinar fueron cultivadas del mismo modo que se ha indicado para analizar el fenotipo durante el ciclo de desarrollo (apartado anterior), con la salvedad de que se cultivaron 200  $\mu$ L distribuidos en 10 gotas, en placas de 8 cm de diámetro con 20 mL de medio. Las placas fueron incubadas a 30°C y transcurridas 72 h se recogieron muestras raspando la superficie del medio con ayuda de una espátula. A continuación, se procedió a su sonicación (22,5 kHz) para eliminar los bacilos presentes en las mismas y dispersar las esporas que se encontrasen agregadas. Para ello, las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de tampón TM y sonicadas durante 1,5 min en pulsos de 30 s. Antes de proceder a su recuento, las muestras sonicadas fueron diluidas 100 veces en tampón TM. El recuento se efectuó en una cámara *Petroff-Hausser*, y el resultado se expresó como número de esporas/placa.

#### 3.2.9.3.4. Germinación de Esporas

La eficiencia de germinación en medios ricos de las esporas producidas por diferentes cepas de *M. xanthus* ha podido ser determinada siguiendo el procedimiento descrito por Wu *et al.* (1998), utilizando 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 sonicadas nuevamente durante 30 s (para dispersar las esporas que se encontrasen agrupadas). Posteriormente, las muestras fueron diluidas 1:100000 en tampón TM y 50  $\mu$ L de muestra diluída fueron adicionados a 5 mL de medio CTT semisólido mantenido en sobrefusión en un baño a 50°C. Tras homogeneizar la muestra, el medio con las esporas se distribuyó uniformemente sobre una placa con 20 mL de medio CTT sólido. Estas 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 en la esporulación, por su parte, fue calculada dividiendo el número de esporas viables entre el número de esporas contadas en la muestra de partida.







## **4. RESULTADOS**

**4.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL COBRE Y OTROS METALES DE *M. xanthus* Y RESPUESTA ADAPTATIVA REGULADA POR COBRE.**

**4.2 ANÁLISIS DEL GENOMA. ELEMENTOS RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN DE METALES**

**4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MCO Cu<sub>o</sub>C**

**4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MCO Cu<sub>o</sub>B**

**4.5. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO ECF CorE**



## 4. RESULTADOS.

### 4.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL COBRE Y OTROS METALES DE *M. xanthus* Y RESPUESTA ADAPTATIVA REGULADA POR COBRE.

Los primeros ensayos realizados en relación con la homeostasis del cobre en *M. xanthus* tuvieron como finalidad determinar la tolerancia de esta bacteria al cobre durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo, en dos condiciones diferentes. En una primera tanda de experimentos, las células se incubaron en medio líquido en ausencia de cobre (cultivos no inducidos). En el segundo lote de experimentos, las células fueron preincubadas con una concentración no letal de cobre para inducir los mecanismos de resistencia al metal (cultivos inducidos), ya que se ha demostrado que son inducibles (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005).

#### 4.1.1. SENSIBILIDAD AL COBRE EN *M. xanthus*

Para estudiar la sensibilidad al cobre durante la fase de crecimiento vegetativo se realizaron curvas de crecimiento en medio CTT líquido, mientras que para el ciclo de desarrollo se incubaron en medio sólido CF (ver Material y Métodos; 3.2.9.2.). Como se observa en la Fig. 4.1, las células de la cepa WT fueron capaces de crecer de manera similar en medio líquido tanto en ausencia de cobre como con concentraciones de cobre de hasta 0,4 mM. Cuando la concentración de sulfato de cobre presente en los medios de cultivo superaba 0,4 mM, la tasa de crecimiento fue menor, y cuando ésta fue igual o mayor a 1 mM no se detectó crecimiento (aunque las células eran viables).

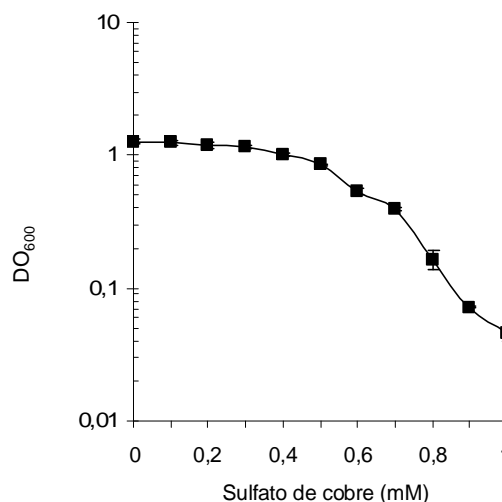


Figura 4.1. Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*. Las células fueron incubadas durante 24 h a 30°C en medio CTT líquido. Las barras de error indican desviaciones estándar.

Para estudiar la sensibilidad al cobre durante el ciclo de desarrollo las células se preincubaron en medio CTT líquido en ausencia de cobre antes de inocular los cultivos concentrados en medio CF (inductor del desarrollo) suplementado o no con cobre (ver

## 4. RESULTADOS

Material y Métodos; 3.2.9.2.). Como se muestra en la Fig. 4.2, las células de la cepa WT fueron capaces de formar agregados con una concentración máxima de sulfato de cobre presente en los medios de 0,06 mM. Con concentraciones mayores de cobre las células no fueron capaces de crecer.

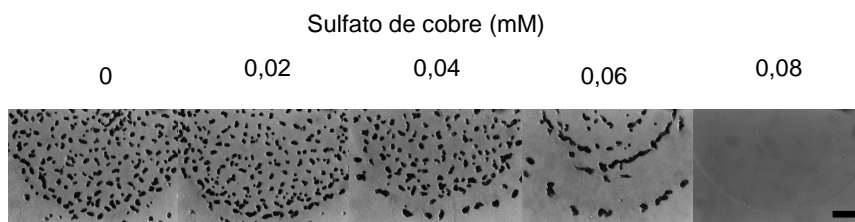


Figura 4.2. Cuerpos fructificantes de la cepa WT de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Las células fueron concentradas a una DO<sub>600</sub> de 15 e incubadas a 30°C durante 72 h. Barra: 1 mm.

También se analizó la capacidad de esporulación y eficiencia en la germinación de esta bacteria en presencia de cobre, obteniéndose un descenso en la producción de mixósporas a medida que incrementa la concentración de cobre presente en los medios de cultivo (Fig. 4.3). Asimismo, el porcentaje de germinación también se redujo al aumentar la concentración de cobre, siendo del 11% en ausencia de cobre y del 0,3 % en presencia de 0,06 mM de sulfato de cobre.

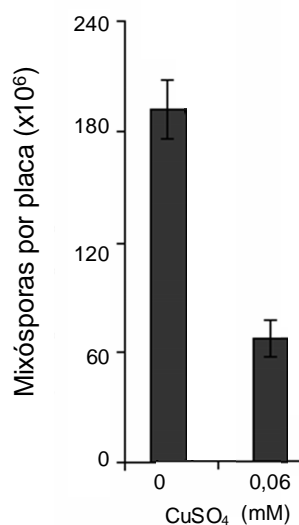


Figura 4.3. Cuantificación del número de esporas en la cepa WT de *M. xanthus*. Las células fueron crecidas en medio CF y tratadas como se describe en el apartado Material y Métodos.

La relación entre la tolerancia al cobre presentada por las células durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo se definió como un cociente de tolerancia al cobre. En este caso se obtuvo un valor próximo a 17.

### 4.1.2. RESPUESTA ADAPTATIVA REGULADA POR COBRE

Ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que los mecanismos de resistencia al cobre son inducibles (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005), se llevó a cabo un segundo lote de experimentos en los que se determinó la tolerancia al cobre durante las

dos fases del ciclo de vida de *M. xanthus* cuando las células habían sido preincubadas en presencia de una concentración de cobre suficientemente alta como para inducir los mecanismos implicados en la resistencia al metal, pero que no resultara tóxica. En este caso los experimentos fueron llevados a cabo del mismo modo que los descritos anteriormente, con la salvedad de que las células fueron preincubadas en presencia de 0,6 mM de sulfato de cobre. Las células preadaptadas fueron capaces de tolerar hasta 2 mM de sulfato de cobre presente en medio líquido CTT (Fig. 4.4). Durante el ciclo de desarrollo, la tolerancia al cobre incrementó drásticamente, formando agregados con concentraciones de hasta 2,5 mM (Fig. 4.5).

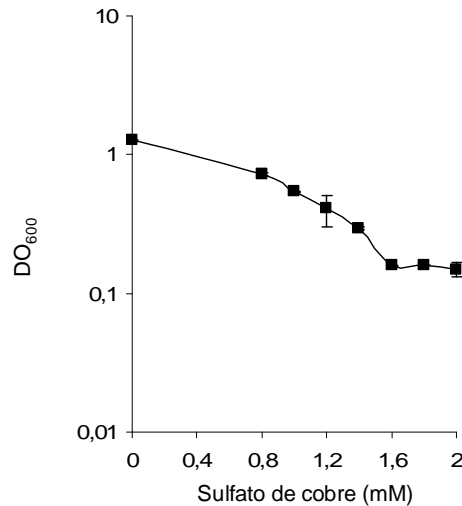


Figura 4.4. Tolerancia al cobre de células de *M. xanthus* preincubadas con 0,6 mM de sulfato de cobre e incubadas durante 24 h a 30°C con concentraciones superiores de este metal. Las barras de error indican desviaciones estándar.

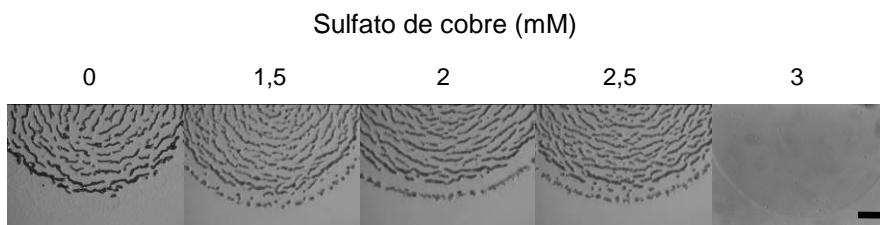


Figura 4.5. Cuerpos fructificantes de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Las células fueron crecidas previamente en presencia de 0,6 mM de sulfato de cobre, y posteriormente concentradas a una DO<sub>600</sub> de 15 e incubadas a 30°C durante 72 h. Barra: 1 mm.

Ya que *M. xanthus* es una bacteria social que se enfrenta con más facilidad a los cambios ambientales cuando está formando una comunidad que cuando está aislada, quisimos determinar si el incremento en tolerancia al cobre de las células durante el ciclo de desarrollo con respecto a las células crecidas en medio líquido podía estar relacionado con la concentración inicial de cultivo con la que se inicia cada experimento (DO<sub>600</sub> de 0,05 para curvas de crecimiento y de 15 para medios sólidos). Así, se determinó la sensibilidad al cobre con células preincubadas con cobre en medio CTT sólido (partiendo al igual que en los ensayos para el ciclo de desarrollo de una DO<sub>600</sub> de

15). En este caso las células presentaron la misma sensibilidad al cobre que cuando fueron crecidas en medio líquido.

Estos resultados muestran que la inducción de los mecanismos relacionados con la resistencia al cobre es capaz de amplificar la tolerancia a este metal 2,5 veces durante el crecimiento vegetativo, y tanto como 41,7 veces durante el ciclo de desarrollo.

#### 4.1.3. TOLERANCIA DE *M. xanthus* A OTROS METALES BIOLÓGICOS

Además del estudio de la resistencia al cobre, se decidió abordar la tolerancia de esta bacteria a otros metales muy importantes para llevar a cabo diversos procesos en la célula como Ni, Zn, Co, Cd, Fe y Ag. El análisis con estos metales se llevó a cabo durante el ciclo de vida al completo de *M. xanthus*. Cuando la cepa WT se incubó en presencia de otros metales, se determinó el cociente de tolerancia para cada uno de ellos (tolerancia a un metal de los cultivos durante el crecimiento vegetativo con respecto a la que presentan durante el ciclo de desarrollo). Cuando la cepa WT se incubó en presencia de otros metales, se observó que este cociente era mucho mayor para el cobre que para cualquiera de los metales ensayados (Tabla 4.1). La adición de ascorbato en exceso (1 mM) a los medios suplementados con sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) permite favorecer la presencia de  $\text{Cu}^+$ . En estas condiciones, la sensibilidad al cobre de las células durante el ciclo de desarrollo fue mayor que en ausencia de ascorbato.

Tabla 4.1. Tolerancia de células de *M. xanthus* a diferentes metales durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo.

Metal	Máxima concentración de metal (mM) que permite la viabilidad en el medio		Cociente de tolerancia (CTT/CF)
	CTT	CF	
$\text{Cu}^{2+}$	1,0	0,06	17,0
$\text{Cu}^+$	1,0	0,04	25,0
$\text{Ni}^{2+}$	6,0	4,0	1,5
$\text{Zn}^{2+}$	0,5	0,5	1,0
$\text{Co}^{2+}$	1,0	4,0	0,25
$\text{Cd}^{2+}$	0,3	0,1	3,0
$\text{Ag}^+$	0,25	0,05	5,0
$\text{Fe}^{2+}$	7,0	7,0	1,0
$\text{Fe}^{3+}$	2,0	1,0	2,0

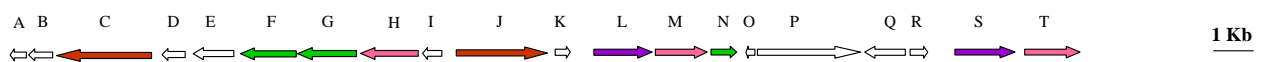
El hecho de que las células durante el desarrollo sean bastante más sensibles a cobre que en el ciclo vegetativo sugiere que *M. xanthus* debe ajustar de forma muy precisa las concentraciones de este metal en las células a lo largo del ciclo de vida.

Estos resultados nos condujeron a abordar el estudio de la respuesta global al cobre en *M. xanthus*, comenzando con análisis *in silico* que nos permitieran determinar elementos presentes en el genoma relacionados con la homeostasis del cobre. Algunos de ellos fueron estudiados con mayor detalle desde un punto de vista funcional y son objeto del desarrollo de esta Tesis Doctoral.

## 4.2 ANÁLISIS DEL GENOMA. ELEMENTOS RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN DE METALES.

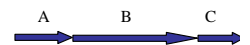
Gracias a la secuenciación del genoma de *M. xanthus* (Goldman *et al.*, 2006) ha sido posible determinar la existencia de regiones que acumulan genes con dominios conservados implicados en la homeostasis del cobre (Fig. 4.6A). Una de estas regiones ha sido denominada CR1 y tiene un tamaño de 26,5 kb. En esta región se encuentran los genes que codifican para las tres proteínas que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

### CR1:



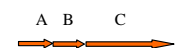
- A: Proteína hipotética
- B: Proteína similar a citocromo c
- C: ATPasa de tipo  $P_{IB}$  (MXAN\_3415)
- D: Lipoproteína
- E: Lipoproteína
- F: Regulador de respuesta dependiente de Sigma-54 (MXAN\_3418)
- G: Histidina quinasa (MXAN\_3419)
- H: *CuoA* (MXAN\_3420)
- I: Proteína con dominio cupredoxina
- J: ATPasa de tipo  $P_{IB}$  (MXAN\_3422)
- K: Proteína hipotética conservada
- L: Proteína de eflujo de la membrana externa (MXAN\_3424)
- M: *CuoB* (MXAN\_3425)
- N: *CorE* (MXAN\_3426)
- O: Chaperona del cobre
- P: Sulfatasa
- Q: Regulador transcripcional de tipo AraC
- R: Tioesterasa
- S: Proteína de eflujo de la membrana externa (MXAN\_3431)
- T: *CuoC* (MXAN\_3432)

### Otro sistemas Cus:

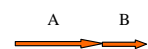


- A: *CusC3* (MXAN\_6176)
- B: *CusA3* (MXAN\_6177)
- C: *CusB3* (MXAN\_6178)

### Sistemas Czc:



- A: *CzcC1* (MXAN\_3447)
- B: *CzcB1* (MXAN\_3448)
- C: *CzcA1* (MXAN\_3449)

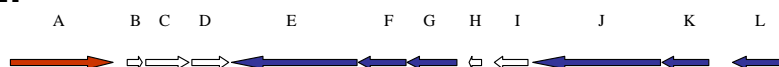


- A: *CzcA2* (MXAN\_3672)
- B: *CzcB2* (MXAN\_3671)



- A: *CzcB3* (MXAN\_7438)
- B: *CzcA3* (MXAN\_7437)
- C: *CzcC3* (MXAN\_7436)

### CR2:



- A: ATPasa de tipo  $P_{BI}$  (MXAN\_0979)
- B: Proteína hipotética
- C: Proteína con dominio de unión hierro-azufre
- E: *CusA1* (MXAN\_0983)
- F: *CusB1* (MXAN\_0984)
- G: *CusC1* (MXAN\_0985)
- H: Proteína hipotética
- I: N-acetilmuroil-L-alanina amidasa
- J: *CusA2* (MXAN\_0988)
- K: *CusB2* (MXAN\_0989)
- L: *CusC2* (MXAN\_0990)

Figura. 4.6A: Regiones del genoma de *M. xanthus* que acumulan genes relacionados con la homeostasis de metales (sobre todo cobre). Además de la regiones del cobre 1 (CR1) y 2 (CR2), un sistema Cus y tres Czc se encuentran dispersos en el genoma.



Como se puede observar en la Fig. 4.6B, todos estos genes (a excepción de los que van a codificar el sistema Cus3), se encuentran distribuidos en dos zonas del genoma.

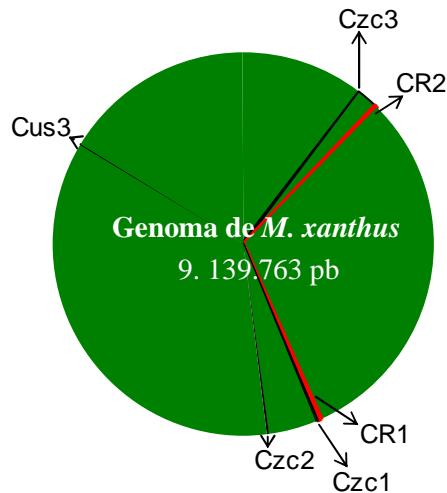


Figura 4.6B. Representación de la posición que ocupan en el genoma de *M. xanthus* los genes relacionados con la homeostasis de metales que aparecen en la Fig. 4.6. Las regiones del cobre 1 y 2 aparecen en rojo. Las líneas negras corresponden a sistemas Cus y Czc. Los tamaños y posiciones son proporcionales, considerando que el círculo completo representa los 9.139.763 pb que posee el genoma de *M. xanthus*.

El interés por las oxidasas multicobre de *M. xanthus* y su papel en la homeostasis del cobre nos llevó a centrarnos en el estudio inicial de dos de las tres que presenta esta bacteria. CuoB y CuoC fueron abordadas al inicio de este estudio, centrándonos en una de ellas. El análisis de su regulación a nivel transcripcional nos permitió identificar un factor sigma de tipo ECF (CorE) que presenta una secuencia atípica en esta familia de proteínas, relacionada con la unión de metales.

### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA MCO *CuoC*

#### 4.3.1 ESTUDIO DEL OPERÓN DEL GEN *CuoC*

El análisis *in silico* de la región génica en que se encuentra el gen que codifica para *CuoC* parece indicar que solamente dos genes forman parte del mismo operón: *cuoC* y un gen que codifica para una proteína de eflujo de la membrana externa (MXAN\_3431). Estos dos genes serían coexpresados en una unidad transcripcional formada por un ARN mensajero de tipo policistrónico (Fig. 4.7).

La proteína de eflujo de la membrana externa está constituida por 502 residuos. Presenta un peso molecular y pI teóricos de 55 kDa y 6,1 respectivamente. Mantiene dos dominios conservados identificados como PF02321 (E-valor =  $2,3 \times 10^{-12}$  y  $2,6 \times 10^{-16}$ ), pertenecientes a una familia de proteínas denominada OEP (*Outer membrane efflux protein*), que forman canales triméricos que permiten el transporte al exterior de una amplia variedad de sustratos en bacterias Gram negativas. Ejemplos de proteínas pertenecientes a esta familia son la proteína de respuesta a estrés TolC de *E. coli* o la proteína FusA de *Campilobacter jejuni*, y parecen estar implicadas en la resistencia a metales pesados (Rensing y Grass, 2003). Presenta con ellas un 15,2 y 16,4 % de identidad respectivamente.

Para definir los genes que forman parte del operón, se empleó la técnica de RT-PCR. Por el pequeño tamaño del transcrito sólo fue necesaria una reacción de RT-PCR, siguiendo la estrategia expuesta en la Fig. 4.7A, para así verificar la coexpresión del gen *cuoC* con el MXAN\_3431.

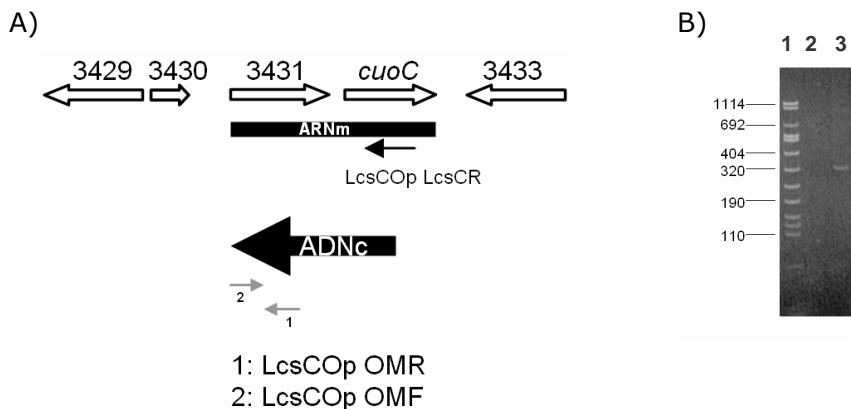


Figura 4.7. Análisis mediante RT-PCR para confirmar la expresión de los genes *cuoC* y MXAN\_3431. A) Las flechas indican el sentido de la retrotranscripción a partir del punto de unión del cebador sobre el ARNm o de transcripción a partir del ADNc. B) Producto de PCR utilizando como molde ADNc obtenido con el oligonucleótido LcsCOP LcsCR, y la pareja de oligonucleótidos LcsCOP OMR y LcsCOP OMF. Calle 1: Marcador de peso molecular VIII; calle 2: control negativo; calle 3: PCR a partir de ADNc.

A partir de ARN aislado de un cultivo en fase de crecimiento vegetativo de la cepa silvestre de *M. xanthus* se siguió el procedimiento descrito en la sección Material y Métodos para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa. Con el ADNc obtenido se realizó una amplificación usando la pareja de oligonucleótidos LcsCOP OMR y LcsCOP OMF. El fragmento obtenido a partir de esta amplificación presentaba el tamaño esperado de 327 pb, como se observa en la Fig. 4.7B. Como control negativo se utilizó muestra de ARNm sin retrotranscribir.

4.3.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *cuoC* (MXAN\_3432)

En principio se encontraron dos posibles candidatos a codón de inicio de la traducción para el ARNm de *cuoC*. Uno de ellos (CTG) con un posible sitio de unión al ribosoma o secuencia de Shine-Dalgarno GAGGG a 4 pb; el otro (ATG) no presentaba ninguna secuencia candidata de unión al ribosoma cercana. Además, el sistema de secreción de la proteína sería diferente si funcionara uno u otro codón de iniciación: sería secretada por el sistema Tat (*Twin-arginin translocation*) si el codón de iniciación fuera el CTG; si éste fuera ATG sería secretada por el sistema Sec o del péptido señal.

Para verificar el sistema de secreción utilizado para CuoC, y así determinar el codón de iniciación, se construyó una fusión traduccional entre *cuoC* y el gen *lacZ* de *E. coli* siguiendo la estrategia general descrita en el apartado Material y Métodos. Esta fusión se llevó a cabo en un codón situado tras las dos señales de secreción, de manera que la proteína quimérica pudiera ser secretada al espacio periplásmico. El sistema Tat transloca proteínas completamente plegadas, mientras que el sistema Sec secreta las proteínas sin plegar (Berks *et al.*, 2005). Para que la enzima  $\beta$ -galactosidasa sea activa, debe plegarse correctamente de forma tetramérica (Gött y Boos, 1988), y por tanto la proteína quimérica será activa si es secretada por el sistema Tat, pero inactiva si lo es por el sistema Sec. Al observar la expresión cualitativa de  $\beta$ -galactosidasa para la cepa portadora de la fusión *lacZ* de *cuoC* (JM51CDWZY) se comprobó que ésta era activa (Fig. 4.8B). Como control se utilizaron dos fusiones para otra MCO secretada por el sistema Sec: CuoA. Una transcripcional (fusionando el codón de inicio de *cuoA*) y otra traduccional (utilizando un codón localizado tras la secuencia del péptido señal), esquematizadas en la Fig. 4.8A. Como se puede observar en la Fig. 4.8B, la fusión transcripcional era activa mientras que la proteína quimérica no lo era, como era de esperar al ser CuoA secretada por el sistema Sec.

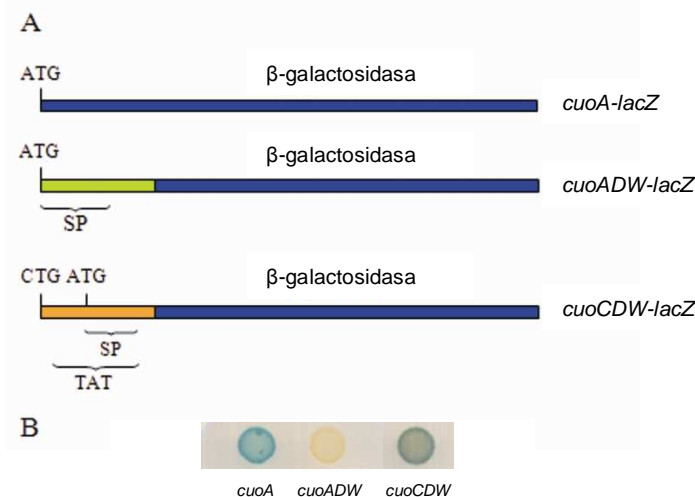


Figura 4.8. Determinación del codón de inicio de la traducción y el sistema de secreción utilizado por CuoC. A) Características de las tres fusiones construídas entre *cuoA* y *cuoC* y el gen *lacZ* de *E. coli*. La fusión *cuoA-lacZ* se encuentra en la cepa JM51AZY; *cuoADW-lacZ* en JM51ADWZY; *cuoCDW-lacZ* en JM51CDWZY. TAT: péptido reconocido por el sistema de secreción Tat. SP: péptido señal reconocido por el sistema Sec. B) Análisis cualitativo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en las bacterias portadoras de las fusiones anteriores. Estas bacterias se incubaron durante 24 h en placas con medio CTT al cual se adicionó 0,6mM de sulfato de cobre y 100mg/mL de X-gal.

Por tanto, el análisis de la secuencia del gen que codifica para la MCO CuoC reveló la presencia de un ORF con 1386 pb, codificando para una proteína de 461 residuos aminoacídicos. El triplete considerado como codón de inicio de la traducción corresponde a una secuencia CTG, alternativo al usual ATG. Cuoc es secretada por el sistema Tat, y presenta un motivo de secreción TRRSML (Fig 4.9).

El uso de codones de este gen es el esperado para los genes de *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 1989), con un elevado contenido en G+C (85,3% de los tripletes presentan G/C en su tercera posición). La región situada justo por encima del codón de iniciación, compuesta por un segmento de 97 pb no presenta secuencias conservadas propias de regiones promotoras de la transcripción, lo cual no es extraño ya que este gen se coexpresa con la proteína de eflujo de la membrana externa (MXAN\_3431) que se encuentra hacia el extremo 5' del gen, y por tanto la región promotora estará delante del MXAN\_3431.

TGAACCCGAGCGCGCACCGGGCCGTGAGCATGACGCCCTGGAGCTCGGGAGCGCAGGGGGGCCCTGGAAACTCTCCGGCATTGGAGCCGAGGGAACG

```

1 - CTG ACG CGG CGG AGC ATG CTT GCC ACG GCG GGA GCC ACG CTC ACG GGA GGC TCG CTG CTG CTG AGT GGC TCC GCT GCG CGC GCC CAG TCA - 90
1 - M T R R S M L A T A G A T L T G G S L L L S G S A A R A Q S - 30
91 - GCC GTC TCA GGC GCA CGT GGG CCT CGC GAG GGC TCC GCG GCT GAC ACC GGC CAG CGG TAT GCG CGG CAG GAC TGG TTG CGC CCC GGA ATG - 180
31 - A V S G A R G P R E G S A A D T G Q R Y A R Q D W L R P G M - 60
181 - CCC GAC CGG GAC TAC CGG CCC GTG GTG GTG CCC AAT GGC TCC AAG CTG CCG TGG AAG GTC GTG GAC AAC GTG AAG GTC TTC CAC CTG GTG - 270
61 - P D R D Y R P V V V P N G S K L P W K V V D N V K V F H L V - 90
271 - GCC GAG GAG GTG GCG CAT GAG TTT GCC CCG GGA CTG AAA GCC TTC TGC TGG GGC TAC AAC GGT CGA GTC CAC GGG CCC ACC ATC GAA GCG - 360
91 - A E E V A H E F A P G L K A F C W G Y N G R V H G P T I E A - 120
361 - GTG GAG GGG GAC CGG GTG CGC ATC TAC GTC ACG AAC CGG CTA CCC GCG GCC ACC ACC ATC CAC TGG CAC GGA CTC CTG GTG CCC AGC GGT - 450
121 - V E G D R V R I Y V T N R L P A A T T I H W H G L L V P S G - 150
451 - ATG GAT GGC GTG GGC GGC CTC AGC CAG AAG TCC ATC GCT CCT GGC GAG ACG TTT CCG TAC GAG TTC ACC CTG CGC CAG CGC AGT ACG AAC - 540
151 - M D G V G G L S Q K S I A P G E T F R Y E F T L R Q A S T N - 180
541 - ATG TAT CAC TCG CAC CAT GAC GAG ATG ACG CAG ATT GGC CTC GGG ATG ACG GGC ATG TTC ATC ATC CAC CCG CGC CGA CCT GTG GGG CCC - 630
181 - M Y H S H H D E M T Q I G L G H T G M F I I H P R R P V G G P - 210
631 - CGC GTC GAC CGG GAC TTC GTC ATC CTC CTG CAT GAA TGG CGC ATC GAT GTC GGC ACG GAG CGA CCC AAT CCG AAT GAG ATG ACG GAC TTC - 720
211 - R V D R D F V I L L H E W R I D V G T E R P N P N E M T D F - 240
721 - AAC GTG CTC ACC ATG AAC GCG AAG GCG TTC CCG GGC ACG GAG TCG CTC GTG GTG CGC CAG GGT GAG CGG GTG CGC ATC CGG TTG GGC AAC - 810
241 - N V L T M N A K A F P G T E S L V V R Q G E R V R I R L G N - 270
811 - CTG AGC CCG CAG AAC CAT CAC CCC ATC CAC CTG CAC GGT TTC CAC TTC CGT ATC ACC GAA ACG GAT GGC GGG CGC GTC CCC GAG TCC GCG - 900
271 - L S P Q N H H P I H L H G F H F R I T E T D G G R V P E S A - 300
901 - CAG CAG CCG GAG GGA ACG GTG CTC GTC CCC GTG GGC AGC ACA CGT GTC ATC GAG TTC GTG GCG GAC GTG CCC GGG GAC TGG GCC CTG CAC - 990
301 - Q Q P E G T V L V P V G S T R V I E F V A D V P G D W A L H - 330
991 - TGT CAC ATG ACG CAC CAC ATG ATG AAT CAG ATG GGC CAT GCG TTC CCC AAT ATG ATT GGC GTG AAG CCG GGG AGC CTG GAC GCG AGG GTC - 1080
331 - C H M T H H H N Q H G H A F P N H I G V K P G S L D A R V - 360
1081 - CGC ACG CTG CTA CCG GGC TAC ATG ACG ATG GGC CAG ACG GGG ATG GCG GAG ATG GGC GAG ATG GGG ATG CCC ATT CCG CCC AAC TCC ATT - 1170
361 - R T L L P G Y M T H G Q T G M A E M G E M G M P I P P N S I - 390
1171 - CCC ATG CTG GGG GCC CAG GGC AAG CAC GAT TAC ATC ACG GCG GGA GGC ATG TTC ACC GTG CTC AAG GTT CGC GAA CGG TTG GAG AGC TAC - 1260
391 - P M L G A Q G K H D Y I T A T E S L V L K V R E R L E S Y - 420
1261 - GCG GAC CCT GGC TGG TAC GAC AAC CCA CCT GGC ACG CTG GCG GTG GCG GCC ACC TCG GAC GAG CTG CGC CGG GAC GGT ATC GAC GTG AAC - 1350
421 - A D P G W Y D N P P G T L A V A A T S D E L R R R D G I D V N - 450
1351 - GCC CCG GCC CTG GTC GAT CCC GGC GCA CCG GCC TGA
451 - A P A L V D P G A P A *

```

Figura 4.9. Secuencia de codones del gen *cuoC*. El codón de terminación del gen anterior aparece en rojo, y el probable sitio de unión al ribosoma en azul. El codón alternativo de iniciación aparece enmarcado en verde y el motivo de secreción del sistema Tat en rojo.

#### 4.3.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MCO CuoC

CuoC presenta una secuencia aminoacídica de 461 residuos, con un peso molecular y pI estimado de 50,33 kDa y 6,93 respectivamente.

Cuando la secuencia de aminoácidos de esta proteína fue comparada con otras depositadas en las bases de datos, se observó que presentaba las 4 regiones típicas de unión al cobre para este tipo de enzimas, así como una zona rica en metioninas en su extremo carboxilo terminal común a la que presentan otras MCOs (Fig. 4.10).

## 4. RESULTADOS

La proteína CuoC tiene una localización periplásmica, ya que carece de dominios transmembrana y posee un péptido señal bien definido para el sistema Tat (Kimura *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

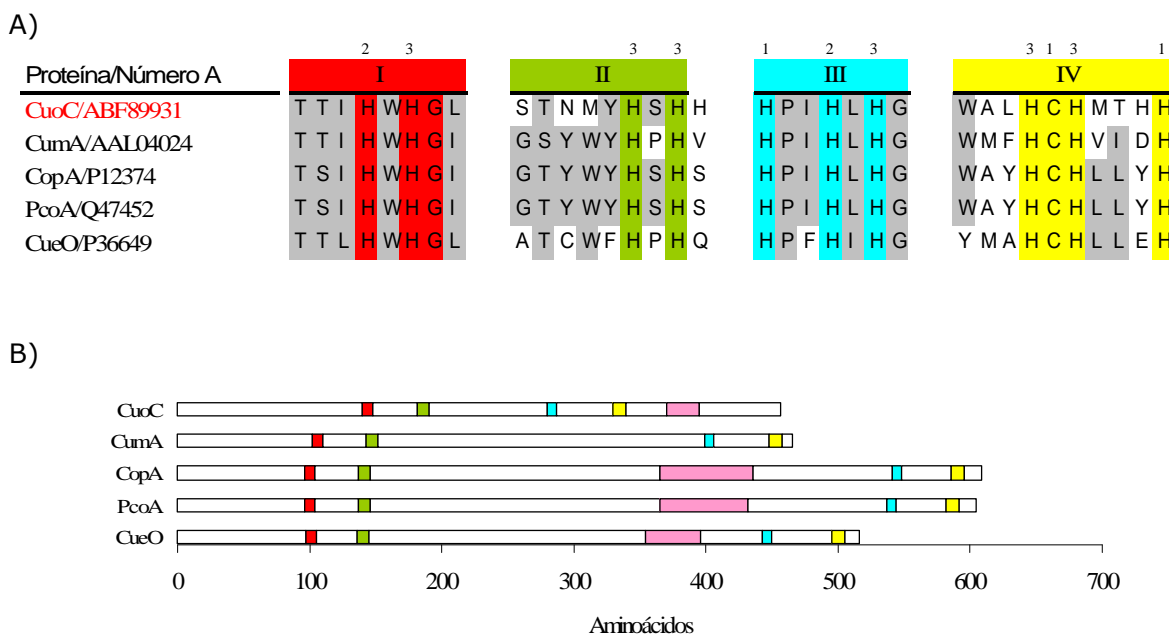


Figura 4.10. A) Alineamiento de los 4 dominios del cobre de CuoC con los de otras MCOs de bacterias. Los residuos histidina y cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre han sido numerados de acuerdo con centro del cobre del que forman parte (1:T1; 2:T2; 3:T3). Los residuos invariables en todas las proteínas se muestran sobre fondo rojo, verde, azul o amarillo, según formen parte de los motivos I, II, III o IV respectivamente. Los residuos conservados en al menos tres de las cinco proteínas alineadas se muestran sobre fondo gris. Número A: número de acceso. B) Representación esquemática de los motivos de MCOs de *M. xanthus*, algunas bacterias. Los cuatro dominios del cobre están representados con los mismos colores que en A. Los motivos ricos en metioninas de varias MCOs están representados como rectángulos rosas.

### 4.3.4 ESTUDIO DEL PAPEL FISIOLÓGICO DE CuoC EN EL CICLO DE VIDA DE *M. xanthus*.

Para estudiar el papel de CuoC, una MCO de *M. xanthus*, se realizó una fusión entre *cuoC* y el gen *lacZ* de *E. coli* que permitiera dilucidar el tiempo, niveles y estado de expresión de esta MCO en diferentes condiciones de crecimiento. Asimismo se obtuvo un mutante de delección en fase para *cuoC* para comprender un poco mejor su papel fisiológico en esta deltaproteobacteria y conocer su implicación en relación con el ciclo de vida en presencia de cobre. Por último, se intentó determinar qué regulador era el responsable de la expresión de CuoC, construyendo fusiones traduccionales en diversos mutantes de delección en fase para distintos reguladores transcripcionales.

#### 4.3.4.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE *cuoC*

El perfil y nivel de expresión de *cuoC* se determinó utilizando la cepa portadora de la fusión traduccional JM51CDWZY que permitió conocer el codón de iniciación de la traducción para CuoC (Fig. 4.8). El análisis cualitativo indicaba que presentaba expresión constitutiva y se inducía con altas concentraciones de sulfato de cobre

añadido al medio, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 4.11).

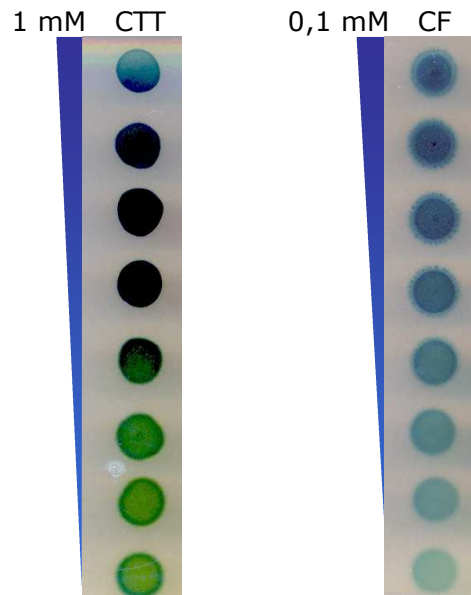


Figura 4.11. Actividad cualitativa  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (CTT) y el ciclo de desarrollo (CF) de la cepa portadora de la fusión traduccional *cuoC-lacZ*. Los medios de cultivo fueron preparados con un gradiente continuo creciente de sulfato de cobre, cuya concentración máxima se indica en la figura para cada caso. Las células se incubaron a 30°C durante 48 h.

Para determinar los niveles de expresión, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa presente en extractos celulares de esta cepa tras su crecimiento en medios a los que se había adicionado diferentes concentraciones de sulfato de cobre. La cuantificación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado Material y Métodos. Como se puede observar en la Fig. 4.12, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo se mantiene un nivel basal de expresión en ausencia de cobre que se ve inducido por la adición de altas concentraciones de sulfato de cobre durante el crecimiento celular en medio CTT.

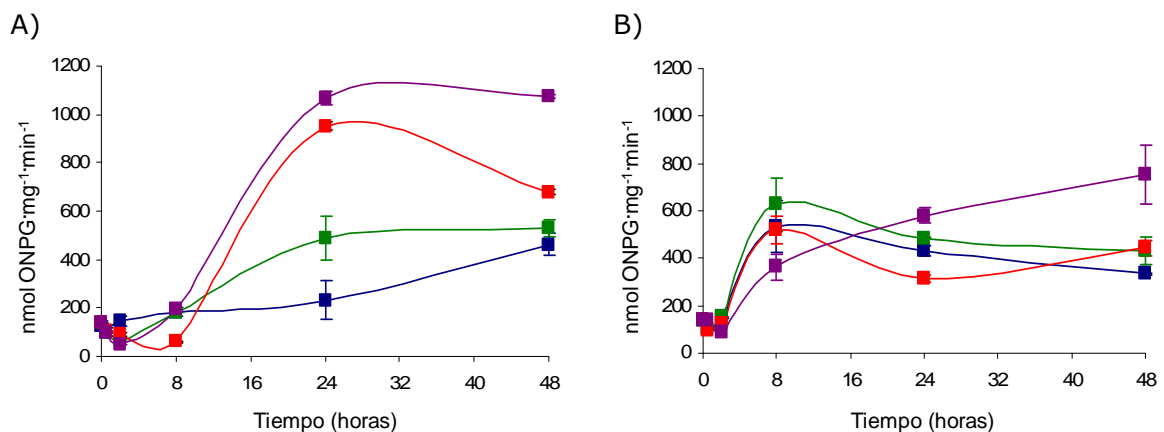


Figura 4.12. Actividad específica  $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51CDWZY durante A) crecimiento vegetativo (medio CTT) y B) ciclo de desarrollo (medio CF). Las células fueron incubadas en los medios sin adicionar sulfato de cobre (azul) o con diferentes concentraciones del metal. CTT: 0,3mM (verde); 0,6mM (rojo); 0,8mM (violeta). CF: 0,02mM (verde); 0,04mM (rojo); 0,06mM (violeta).

Durante el ciclo de desarrollo, los niveles de sulfato de cobre utilizados deben ser menores, ya que en estas condiciones las células son mucho más sensibles al metal. En este caso se observa un incremento en la expresión inducido por el ciclo de desarrollo, siendo prácticamente independiente de la adición de cobre al medio de cultivo.

### 4.3.4.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA *cuoC*

La obtención de este mutante de delección implica la eliminación del gen prácticamente al completo (93%), conservando solamente 33 codones incluyendo el de inicio y el de terminación del gen. Se mantiene el codón de iniciación en fase con un sitio de restricción BamHI, y a continuación se conserva una región cercana al extremo 3' del gen donde se conserva el codón de terminación. La pauta de lectura no se altera, evitando posibles efectos polares.

Este mutante sensible a kanamicina fue obtenido mediante la utilización del vector pBJ113 (como se describe en el apartado Material y Métodos), que permite la obtención de mutantes de delección en fase utilizando dos marcadores selectivos. En el vector pBJ113 se clonaron dos fragmentos amplificados por PCR, uno de 881 pb y otro de 711 pb, correspondiendo respectivamente a un fragmento que engloba el codón CTG en posición +1 del gen *cuoC* (denominado *CuoC1*) y otro fragmento aguas abajo del mismo gen incluyendo el codón de terminación (*CuoC2*).

El primer fragmento (*CuoC1*) se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos *LcsCK* y *LcsCB2* (ver Tabla 3.2). Una vez se comprobó que su tamaño era el adecuado, fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*, al igual que el vector pBJ113. Ambos, vector y producto de PCR *CuoC1*, se sometieron a ligación, de manera que se obtuvo el plásmido pBJ113-*CuoC1*. Por otro lado, para la obtención del segundo brazo, se llevó a cabo igualmente la amplificación por PCR del fragmento de 711 pb *CuoC2* que, usando los oligonucleótidos *LcsCB/LcsCE* (Tabla 3.2). Este fragmento y el plásmido pBJ113-*CuoC1* fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y el segundo fragmento fue clonado obteniéndose el plásmido pBJ113 $\Delta$ *cuoC* necesario para la construcción de una cepa con una delección en fase del gen *cuoC*.

Una vez obtenida la construcción anterior, el plásmido se electroporó en *M. xanthus*. Las células electroporadas fueron cultivadas medio sólido suplementado con kanamicina como se describe en el apartado Material y Métodos, de modo que en este medio sólo podían crecer aquellas que hubieran incorporado el plásmido que contiene el gen de resistencia a kanamicina (Fig. 3.8).

Tras varios días de incubación, algunas de las colonias que crecieron en el medio con kanamicina fueron seleccionadas como presuntas positivas y analizadas mediante Southern blot, para comprobar que habían incorporado el plásmido pBJ113 $\Delta$ *cuoC* (Fig. 4.13A). A esta cepa se le denominó  $\Delta$ *cuoC*Intermediario.

El siguiente paso consistió en la escisión del casete. Para que esto tuviera lugar se procedió al cultivo de  $\Delta$ *cuoC*Intermediario en medio sin antibiótico. Al eliminar la presión selectiva se favorece la pérdida del casete por entrecruzamiento entre las regiones duplicadas (Fig. 3.8). Como se explica en el apartado Material y Métodos, este

entrecruzamiento se puede producir entre el primer o segundo producto de PCR y sus respectivas regiones homólogas del cromosoma de la mixobacteria. Como consecuencia de ello se producirá la liberación del gen de resistencia a kanamicina y del gen de la galactoquinasa. Dependiendo de la región en que se produzca el entrecruzamiento obtendremos cepas con fenotipo silvestre, o se obtendrá el mutante de delección en fase para este gen (Fig. 3.8). Aquellas bacterias en las que tuviera lugar esta recombinación homóloga serían sensibles a kanamicina y podrían metabolizar la galactosa, creciendo más rápidamente en un medio suplementado con dicha sustancia.

Las colonias que crecieron en el medio con galactosa también fueron cultivadas en medio suplementado con kanamicina para comprobar que habían perdido completamente la resistencia al antibiótico y no había restos de cepa intermediaria. Finalmente se consiguieron ocho bacterias sensibles a kanamicina, que podían crecer en presencia de galactosa. Estas bacterias se analizaron nuevamente por Southern blot (Fig. 4.13B).

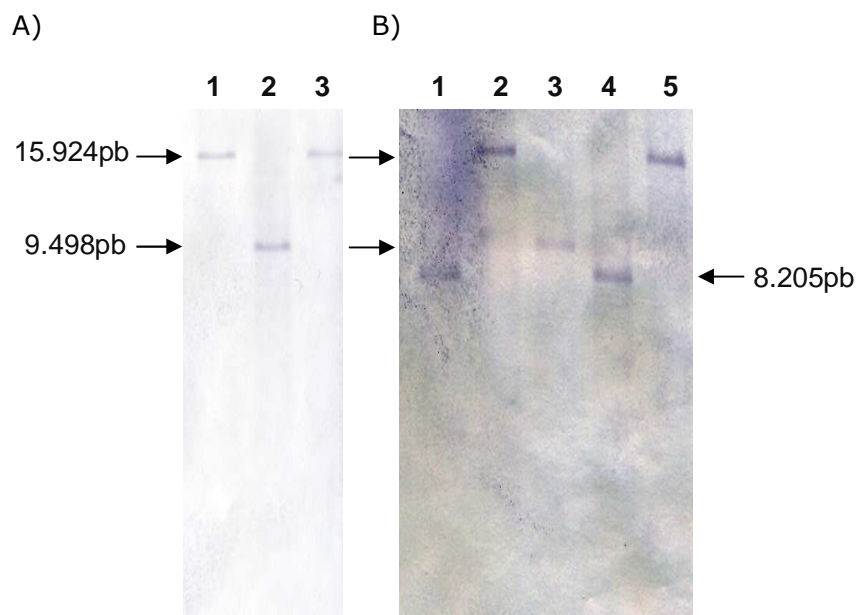


Figura 4.13. Comprobación de la cepa portadora de una delección para *cuoC* JM51CIF mediante Southern blot. A) Comprobación de cepas intermediarias, portadoras del plásmido pBJ113 $\Delta$ *cuoC* (calles 1 y 3) y de la cepa silvestre (control, calle 2). B) Comprobación de posibles mutantes de delección para *cuoC* (calles 1, 2, 4 y 5) y de la cepa silvestre (control, calle 3). En ambos casos, la digestión de cromosomas se realizó con la enzima de restricción PstI y la hibridación se llevó a cabo con el producto de PCR *CuoC1* marcado con digoxigenina.

Todos los cromosomas fueron digeridos con la enzima de restricción PstI, y la sonda empleada para el revelado de la membrana fue el producto de PCR *CuoC1* marcado con digoxigenina. La sonda debía hibridar con un fragmento PstI del cromosoma de la cepa control DZF1 de 9.498 pb, mientras que en el caso de los posibles mutantes de delección hibridaría con un fragmento PstI de 8.205 pb. Esta disminución en el tamaño del fragmento identificado se debía a la eliminación de 1.293 pb del gen *cuoC*, correspondiente a 431 aminoácidos. La cepa portadora de esta delección se denominó JM51CIF.



4.3.4.3. CARACTERIZACIÓN DE JM51CIF ( $\Delta cuoC$ )

Para conocer el efecto de la delección de *cuoC* en el ciclo de vida de *M. xanthus*, se analizaron diversas características de la cepa portadora de la delección tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, comparando su comportamiento con el de la cepa silvestre DZF1.

## 4.3.4.3.1. Crecimiento Vegetativo

Tanto la cepa JM51CIF como la cepa silvestre fueron crecidas en medio CTT líquido con diferentes concentraciones de sulfato de cobre, para determinar el efecto de la pérdida de *CuoC* en *M. xanthus* en estas condiciones. Como se muestra en la Fig. 4.14, la delección de este gen afecta de algún modo el crecimiento de las células en presencia de altas concentraciones de sulfato de cobre, aunque las diferencias no son muy acusadas con respecto a la cepa silvestre.

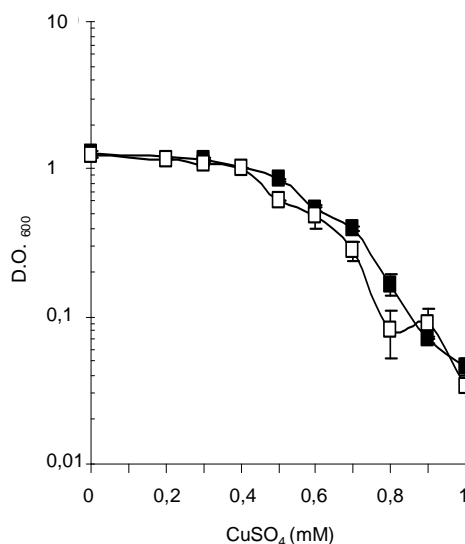


Figura 4.14. Efecto del cobre en el crecimiento de *M. xanthus*. La cepa silvestre DZF1 está representada por cuadrados negros (■) mientras que el mutante de delección para *cuoC* JM51CIF está representado por cuadrados blancos (□). Estas células se cultivaron en ausencia de cobre y fueron diluidas a una densidad óptica de 0,05 medida a 600nm, en medio de cultivo fresco al que se habían adicionado previamente las concentraciones de sulfato de cobre indicadas en cada caso.  $DO_{600}$  determinada tras 24 h de incubación. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Sin embargo la morfología de parte de estas células presentaba alteraciones, y la proporción de células afectadas era mayor cuanto más alta era la concentración de cobre utilizada en el medio de cultivo. Estas formas celulares alteradas aparecían esféricas en lugar de tener el aspecto bacilar típico de *M. xanthus* y aunque podían detectarse en la cepa silvestre, se requerían concentraciones mayores (0,9 mM) y aparecían en menor proporción que en el caso de  $\Delta cuoC$ , donde podían detectarse a partir de 0,7 mM de sulfato de cobre (Fig. 4.15).

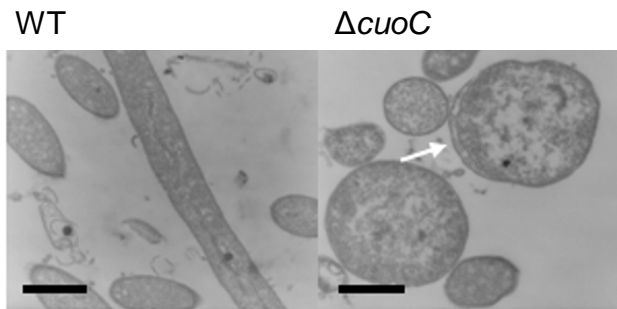


Figura 4.15. Morfología y ultraestructura de las células vegetativas de la cepa WT o el mutante de delección JM51CIF crecidos en medio CTT con 0,7 mM de sulfato de cobre. Las fotografías fueron tomadas mediante MET tras 72 h de incubación. La flecha blanca indica una forma celular atípica en el mutante de delección para *cuoC*. Barras: 0,5 mm.

#### 4.3.4.3.2. Ciclo de Desarrollo

El análisis de la estirpe  $\Delta cuoC$  durante el ciclo de desarrollo en ausencia de cobre adicionado al medio de cultivo CF mostró un retraso en la formación de cuerpos fructificantes, manteniéndose cierta anomalía en los mismos incluso tras 72 h de incubación (Fig. 4.16), comparado con la cepa silvestre. Este retraso y anomalías fue acompañado de un descenso en la cantidad de mixósporas, de las que se hizo un recuento tal y como se explica en el apartado Material y Métodos, reduciéndose a 1/3 de las que presentaba la cepa silvestre en las mismas condiciones (Fig. 4.17A). Además, la capacidad de germinación se redujo incluso en mayor proporción (Fig. 4.17B): tan sólo un 0,39% de las mixósporas de  $\Delta cuoC$  fueron capaces de germinar, mientras que en el caso de la cepa WT lo lograban un 11% de las mismas.

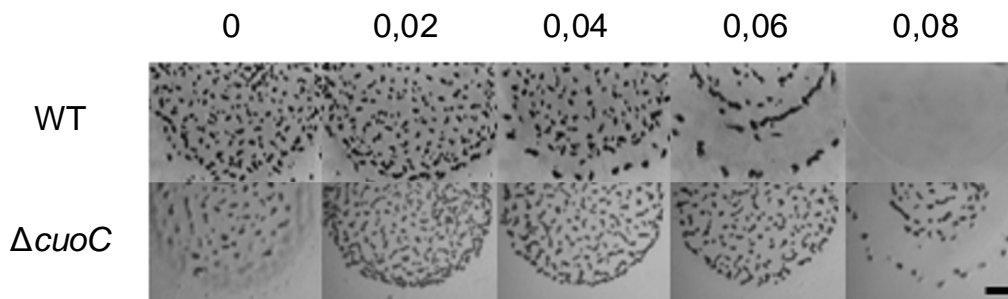


Figura 4.16. Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes. Las células incubadas durante 24 h en ausencia de cobre fueron concentradas a  $DO_{600}$  de 15, y gotas de 10  $\mu L$  de este cultivo concentrado se incubaron en medio CF durante 72 h a 30°C con las concentraciones de sulfato de cobre (mM) indicadas en cada caso. Barra: 1 mm

En presencia de sulfato de cobre, la cepa silvestre presenta una reducción en el número de esporas a medida que aumenta la concentración del metal. Sin embargo, el mutante de delección para *cuoC* presentó incluso una mayor cantidad de mixósporas con 0,06 mM de sulfato de cobre que en ausencia del metal (Fig. 4.17A), formando esporas capaces de germinar incluso con 0,08 mM (concentración no tolerada por la cepa silvestre). No obstante, la germinación de esporas obtenidas con 0,06 mM de sulfato de cobre estaba altamente afectada, y tan sólo un 0,032% de las mismas fueron capaces de originar colonias en un medio rico en nutrientes (Fig. 4.17B).

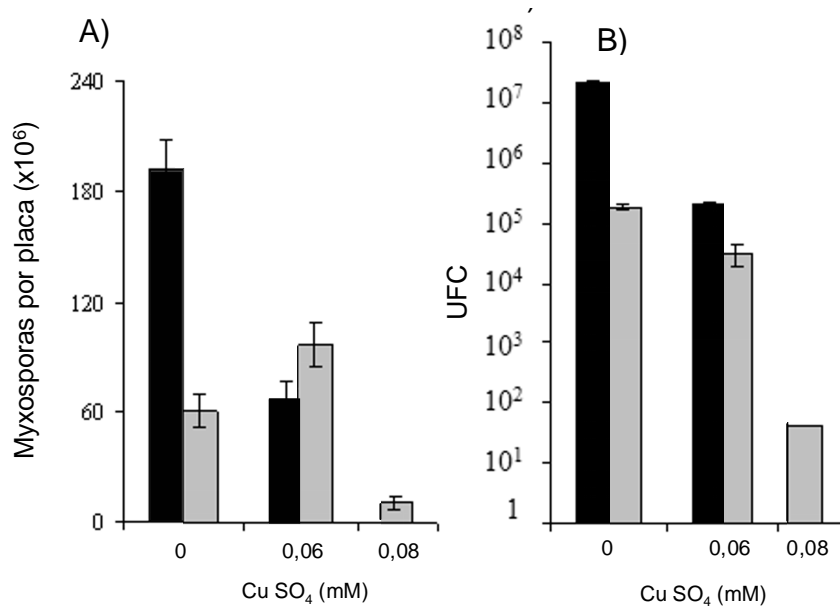


Figura 4.17. Cuantificación de mixósporas (A) y germinación de las mismas (B) en la cepa silvestre (barras negras) o el mutante de delección para *cuoC* (barras grises). UFC: unidades formadoras de colonias.

Cuando las mixósporas de  $\Delta cuoC$  y de la cepa silvestre fueron estudiadas mediante MET se observó que éstas eran idénticas en todas las concentraciones de cobre que fueron utilizadas, manteniendo el mutante para *cuoC* la cubierta de las mixósporas inalterada incluso en condiciones de crecimiento con 0,08 mM de sulfato de cobre (Fig. 4.18).

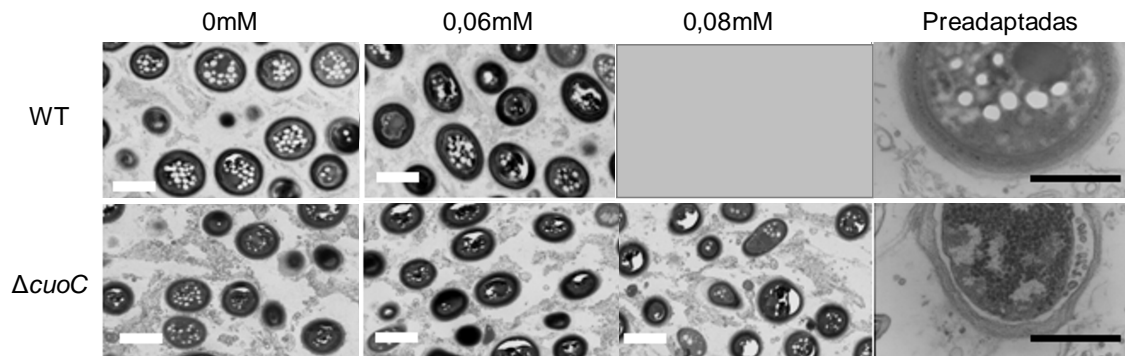


Figura 4.18. Efecto del cobre en la cubierta de la espora. La cepa silvestre (WT) y el mutante de delección para *cuoC* ( $\Delta cuoC$ ) fueron cultivados en medio CF con las concentraciones de cobre indicadas en cada caso, y los cuerpos fructificantes recogidos y tratados como se describe en el apartado Material y Métodos. Fotografías a MET. Las mixósporas formadas a partir de células preadaptadas al cobre fueron obtenidas de cultivos crecidos en medio CF suplementado con 2 mM de sulfato de cobre en el caso de la cepa silvestre, y en el caso de  $\Delta cuoC$  con 1,5 mM de sulfato de cobre, ya que este mutante no forma cuerpos fructificantes con concentraciones superiores. Barras blancas: 1 mm. Barras negras: 0,5 mm.

Tan sólo se observó deterioro de la cubierta de la espora cuando las células fueron incubadas con concentraciones de cobre mucho más elevadas de las que toleran estas cepas normalmente durante el ciclo de desarrollo. Bajo estas condiciones, la cepa  $\Delta cuoC$  fue incapaz de agregar y esporular con concentraciones de sulfato de cobre superiores a 1,5 mM, mientras que la cepa WT lo conseguía con concentraciones que

alcanzaban 2,5 mM. Las esporas obtenidas para JM51CIF con 1,5 mM presentaban una cubierta deteriorada como se puede observar en la Fig. 4.18.

Esta inusual resistencia al cobre se consigue preincubando los cultivos en medio líquido durante 24 h en presencia de una concentración subletal de sulfato de cobre, como puede ser 0,6 mM. Análisis realizados en nuestro laboratorio han determinado que los mecanismos de resistencia al cobre son inducibles, y por tanto al tratar las células de este modo se consigue un estado de preadaptación al cobre, donde *M. xanthus* es capaz de tolerar mayores concentraciones del metal como se mostró anteriormente en esta sección.

#### 4.3.4.3.3. Actividad Cuproso Oxidasa en Extractos Celulares

Es conocida la capacidad que presentan las MCOs de oxidar una amplia variedad de compuestos aromáticos (fenólicos y no fenólicos) y metales, como los iones cuprosos. Para determinar si *M. xanthus* presentaba estas funciones se estudiaron diversas actividades enzimáticas en extractos celulares de WT crecidos en presencia o ausencia de cobre. No se observó oxidación con ninguno de los compuestos aromáticos utilizados con estos extractos (ABTS, SGZ, DMP), pero se pudo medir actividad cuproso oxidasa en extractos celulares de la cepa silvestre y de varios mutantes de delección, entre ellos JM51CIF.

Para medir la oxidación de iones cuprosos en estos extractos, las células se incubaron durante 24 h en ausencia y presencia de cobre (0,6 mM), ya que este último tratamiento permitía observar altos niveles de inducción para *cuoC*. Como se muestra en la Fig. 4.19, los niveles de actividad específica (medidos como nmol de Cu (I) oxidado por minuto y mg de proteína) que se alcanzaban al medir en extractos celulares de la cepa silvestre y el mutante de delección cuando no se adicionaba cobre a los medios de cultivo, eran muy similares. Sin embargo, se producía una reducción en la actividad al comparar extractos celulares de la cepa silvestre y del mutante de delección crecidos con 0,6 mM de sulfato de cobre. En la cepa silvestre se observaba un incremento de más de 3 veces en la actividad cuproso oxidasa al crecer las células en presencia de esa concentración de cobre durante 24 h. En el caso de  $\Delta cuoC$ , este incremento fue de tan sólo 1,2 veces. Por tanto, la actividad de *CuoC* estaba desempeñando un importante papel en la detoxificación de este metal en las condiciones de cultivo empleadas.

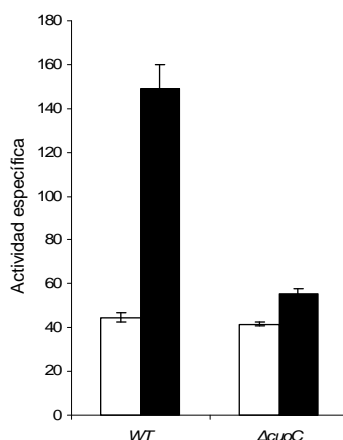


Figura 4.19. Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares de la cepa WT y el mutante de delección para *cuoC* en ausencia (barras blancas) o presencia de 0,6 mM de sulfato de cobre (barras negras). Las células fueron incubadas durante 24 h a 30°C.

4.3.5 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *cuoC*

Para abordar este trabajo, se introdujo el plásmido con la fusión traduccional *cuoC-lacZ* en diversos mutantes de delección para reguladores transcripcionales (3 de ellos situados en la región CR1).

Los mutantes de delección en fase utilizados durante este estudio fueron:

GEN	PRODUCTO GÉNICO	CEPA
MXAN_3426	Factor sigma de tipo ECF CorE	JM51EIF
MXAN_3429	Regulador transcripcional de tipo AraC	JM51AraCIF
MXAN_3419-3418	Sistema de dos componentes CorSR1	JM51DIF
MXAN_5263	Factor sigma de tipo ECF	JM51E2IF

El mutante de delección para CorSR1 había sido obtenido en nuestro laboratorio previamente por A. Moraleda-Muñoz. Los otros tres mutantes de delección fueron obtenidos en el transcurso de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, estos mutantes de delección fueron caracterizados en relación al cobre, tanto durante el crecimiento vegetativo (realizando curvas de crecimiento en cultivo líquido) como durante el ciclo de desarrollo (estudiando la sensibilidad al metal y el efecto sobre la formación de cuerpos fructificantes).

El cultivo en medio líquido durante 24 h de estos mutantes y de la cepa silvestre WT permitió identificar que el mutante para *corE* presentaba una mayor sensibilidad a altas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 4.20). El crecimiento en presencia de altas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  no se ve afectado cuando se delecionan los genes correspondientes al regulador de tipo AraC, el factor sigma de tipo ECF MXAN\_5263, o el sistema de dos componentes CorSR1.

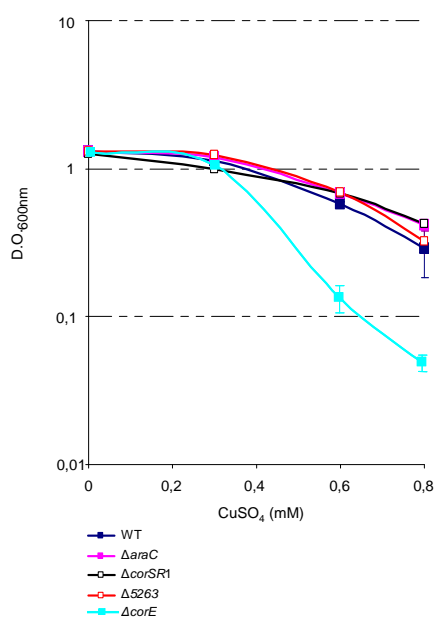


Figura 4.20. Curvas de crecimiento de la cepa WT y los mutantes de delección para los genes *corE*, *araC*, *corSR1* y MXAN\_5263.

En cuanto al ciclo de desarrollo, el mutante para *corE* presentó igualmente la máxima sensibilidad al metal (datos no mostrados). El mutante para *corSR1* también había sido caracterizado en nuestro laboratorio, y se muestra más sensible que la cepa silvestre durante el ciclo de desarrollo a altas concentraciones de cobre. Los mutantes sencillos para el regulador de tipo AraC o MXAN\_5263 no presentaron grandes diferencias con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados).

Por último, se determinó cualitativamente el perfil de expresión de los reguladores AraC y MXAN\_5263 para ver si presentaba un patrón dependiente de cobre. Estos ensayos mostraron que el factor sigma de tipo ECF MXAN\_5263 presenta una expresión inducida por el ciclo de desarrollo (Fig. 4.21A), mientras que el regulador de tipo AraC no mostró niveles de expresión detectables mediante el análisis de actividad  $\beta$ -galactosidasa, en ausencia o presencia de cobre, tanto durante el crecimiento vegetativo (datos no mostrados) como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 4.21B).

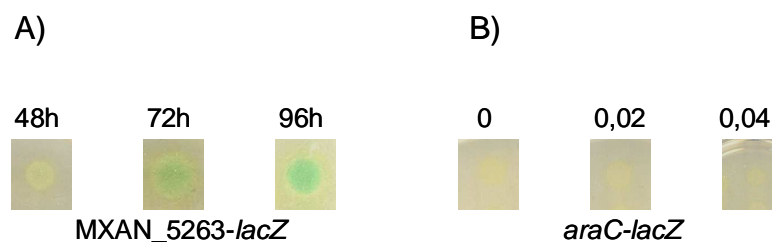


Figura 4.20'. Detección de actividad cualitativa  $\beta$ -galactosidasa durante el ciclo de desarrollo (medio CF) de las cepas portadoras de fusiones transcripcionales para los genes A) MXAN\_5263 a diferentes tiempos de incubación y B) regulador de tipo AraC durante 96 h de incubación con diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> (mM).

Por tanto, los reguladores transcripcionales utilizados para este estudio engloban dos implicados en la resistencia al cobre (*CorE* y *CorSR1*), uno inducible mediante el ciclo de desarrollo (MXAN\_5263), y otro de función no relacionada con el cobre o con el ciclo de vida de *M. xanthus* (*AraC*).

Aunque los niveles de expresión de *cuoC* se reducían en todos ellos de la misma forma, en ningún caso desaparecían los niveles basales de expresión presentes en esta cepa, manteniéndose en todas ellas (datos no mostrados). Es decir, o no existe un único regulador para esta MCO, o no se ha podido localizar, o presenta una ruta de regulación múltiple.

## 4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MCO *CuoB*

### 4.4.1 REGIÓN DEL GEN *cuoB*

El análisis *in silico* de la región génica en que se encuentra el gen que codifica para *CuoB* parece indicar que tres genes forman parte del mismo operón: *cuoB* (MXAN\_3425), un gen que codifica para una proteína de eflujo de la membrana externa (MXAN\_3424), y un factor sigma de la ARN polimerasa de tipo ECF al que se ha denominado *CorE* (MXAN\_3426).

La proteína de eflujo de la membrana externa está constituida por 486 residuos, con un peso molecular teórico de 52,6 kDa. Pertenece a la misma familia de proteínas OEP que la proteína de eflujo que se cotranscribe con *cuoC*, con la que mantiene un 35,3 % de identidad, portando dominios conservados identificados como PF02321 (E-valor =  $5,6 \times 10^{-11}$  y  $2,3 \times 10^{-15}$ ). Por otro lado, *CorE* es un factor sigma de la ARN polimerasa que será analizado en el siguiente apartado con más detalle.

Para definir los genes que forman parte del mismo operón, se empleó la técnica de RT-PCR. Por el pequeño tamaño del transcrito sólo fue necesaria una reacción de RT-PCR, siguiendo la estrategia expuesta en la Fig. 4.21A, para así verificar la coexpresión de los genes MXAN\_3431, *cuoB* y *corE*.

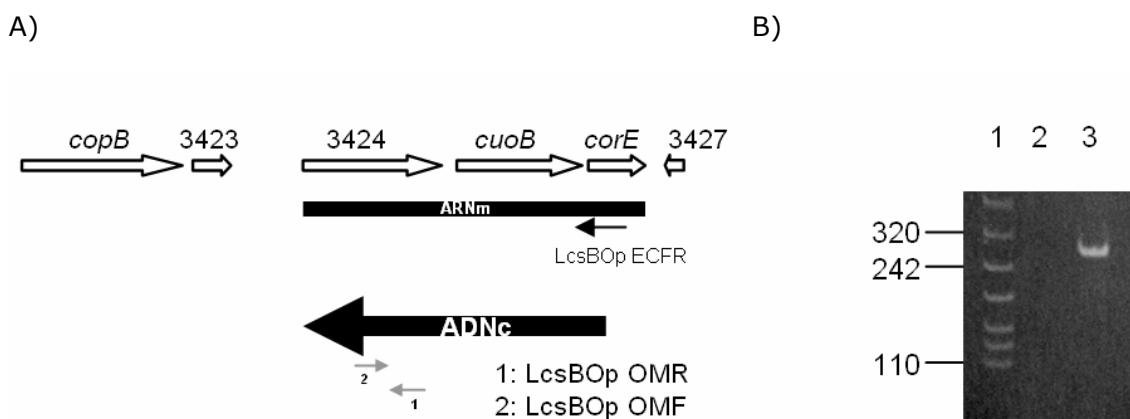


Figura 4.21. Análisis mediante RT-PCR para confirmar la expresión de los genes MXAN\_3424, *cuoB* y *corE*. A) Las flechas indican el sentido de la retrotranscripción a partir del punto de unión del cebador sobre el ARNm o de transcripción a partir del ADNc. B) Producto de PCR utilizando como molde ADNc obtenido con el oligonucleótido LcsBOp ECFR, y la pareja de oligonucleótidos LcsBOp OMR y LcsBOp OMF. Calle 1: Marcador de peso molecular VIII; calle 2: control negativo; calle 3: PCR a partir de ADNc.

A partir de ARN aislado de un cultivo en fase de crecimiento vegetativo de la cepa silvestre de *M. xanthus* se siguió el procedimiento descrito en la sección Material y Métodos para llevar a cabo la reacción de transcripción inversa. Con el ADNc obtenido se realizó una amplificación usando la pareja de oligonucleótidos LcsBOp OMR y LcsBOp OMF (Tabla 3.2). El fragmento obtenido a partir de esta amplificación presentaba el tamaño esperado de 286 pb, como se observa en la Fig. 4.21B. Como control negativo se utilizó muestra de ARNm sin retrotranscribir.

#### 4.4.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *cuoB* (MXAN\_3425)

El análisis de la secuencia del gen que codifica para la MCO CuoB reveló la presencia de un ORF con 1.323 pb (Fig. 4.22), codificando para una proteína de 440 residuos aminoacídicos. El triplete considerado como codón de inicio de la traducción corresponde a una secuencia ATG con un sitio probable de unión al ribosoma (AGAGG) 10 pb hacia el extremo 5', y presenta un uso de codones típico de *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 1989), con el 88% de los tripletes conteniendo G o C en su tercera posición. La región situada justo por encima del codón de iniciación, compuesta por un segmento de 43 pb no presenta secuencias conservadas propias de regiones promotoras de la transcripción. Estas secuencias deberán estar delante del MXAN\_3424, que se coexpresa en el mismo ARNm.

TGACCTTCGCATTACGGCACTTCGACATTGAGAGGACACACCACC

```

1 - ATG GAC CGC AGA CAG TTC ATT CAG CTC GGC GCG CTC GCT GGG GGC ACG CTG GTC GCA AGC CAA GCC CTC GCG CAA GGA CAG TCC CAC GCC - 90
1 - M D R R Q F I Q L G A L A G G T L V A S Q A L A Q G Q S H A - 30
91 - GTG CCT TCC GCT CCC GTC AGC GCA CGC GGC AGG ACG CCG AGC ATC GTC GCT CCG GGC GGG CAG GTG GCC GTC ACC ACG CCC AAC GGC TTC - 180
31 - V P S A P V S A R A R T P S I V A P G G Q V A V T T P N G S - 60
181 - ACG CTA CCC TGG AGG AAG GTG GGG GGC GTG AAG GTG GGC CAC CTG GTG GCC ATG CCT GTG AAG CAC ACC TTC GCC CCT GGG CTG GAG GTG - 270
61 - T L P W R K V G G V K V G H L V A M P V K H T F A P G L E V - 90
271 - GAA GCG TGG GGC TAC AAC GGC TCG ACG CCA GGG CCC ACC ATC GAG GCG GTG GAG GGA GAG CGC CTT CGC ATC TAC GTC ACC AAC CGG CTG - 360
91 - E A W G Y N G S T P G P T I E A V E G E R L R I Y V T N R L - 120
361 - CCT GAG CCG ACC ACC GTG CAC TGG CAC GGG CTC ATC ATT CCC AAT GGC ATG GAT GGC GTG TCC GGG CTG AAC CAG CGC CCC ATC GCC CCC - 450
121 - P E P T T V H W H G L I I P N G M D G V S G L N Q R P I A P - 150
451 - GGA GAA ACG TTC GCC TAC GAG TTC ACG CTG AAC CAG CCG GGC ACG TAC ATG TAT CAC CCG CAC TAC GAC GAG ATG ACC CAG ATG GCG CTG - 540
151 - G E T F A Y E F T L N Q P G T Y M Y H P H Y D E M T Q M A L - 180
541 - GGG ATG ATG GGC ATG TTC ATC GTC CAT CCG AAG CGT CCG CGC GGC CCG AAG GTG GTC CGC GAC TTC GCG CTG ATG ACG CAC GAG TGG AAG - 630
181 - G M M G M F I V H P K R P R G P K V V R D F A L M T H E W K - 210
631 - GTG CTT CCA GGC ATG GCG CCG CCG GAC CCC AAC GCG ATG AGC GAC TTC AAT GTC CTC ACG TTC AAC TCC AAG GCC TTC CCG GCC ACC GAG - 720
211 - V L P G M R R P D F N V L T F N S K A F P A T E - 240
721 - CCG CTC GTG ATC GGA CGC AGG GAG CCG GTG CGC ATC CCG CTG GGG AAT CTG TCC GCC ATG GAC CAC CAC CCC ATT CAC CTG CAT GGC CTG - 810
241 - P L V I G R R E R V R I R L G N L S A M D H H P I H L H G L - 270
811 - TCC TTC GAA ATG ACG GGG ACG GAT GGG GGC TTC GTC CCC GAG TCC GCC CGC TAC CCG GAG ACT TCG ATC CTG GTG CCG GTG GGG AGC ACC - 900
271 - S F E H T G T D G G F V P E S A R Y P E T S I L V P V G S T - 300
901 - CCG GTC ATC GAG TTC GTC GCG GAC GAA CCG GGT GAC TGG GCC ATG CAC TGC CAC ATG ACC CAC CAC GTG ATG AAC CAG ATG GGA CAC GCG - 990
301 - R V I E F V A D E P A M H C M T H H V M N Q M G H A - 330
991 - GGT CCG GTG ACG CTG GGC GCT GAC GCA CCG GCC ATC GAC CCG CCG GTG CAG GCG CTG GTG CCG GGG TAC ATG ACG ATG GGG CAG GAT GGC - 1080
331 - G P V T L G A D A R A I D R R V Q A L V P G Y M T M G Q D G - 360
1081 - ATG GGC GGC ATG GAA GAG ATG GGC ATG CCA ATG CCG GCC AAC AGC ATT CCC ATG AAG GGC GGA AAG GGG CCC TTC GGC CCC ATC GAC ATG - 1170
361 - M G M G M P M P A N S I P M K G G K G P F I D M - 390
1171 - GGC GGC ATG TTC ACG CTC CTC AAG GTG CGC GAG AAC CCG GAC ACC GAG GAT GGG AGC GGC TGG TAC GTG CAC CCG AAG GGG ACG GTG GCG - 1260
391 - G G M F T L L K V R E N P D T E D G S G W Y V H P K G T V A - 420
1261 - GAA AAG GCC GAC CCG GTG CGC ATG GAC GCG GAC GGC ATC AAT CCG GAC GTG CGC TTT GGT TGA
421 - E K A D P V R M D A D G I N P D V R F G *

```

Figura 4.22. Secuencia de codones del gen *cuoB* al completo. El motivo de secreción reconocido por el sistema Tat aparece enmarcado en rojo. El probable sitio de unión al ribosoma aparece en azul y el codón de terminación del gen anterior en rojo.

#### 4.4.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA MCO CuoB

CuoB presenta una secuencia aminoacídica de 440 residuos, con un peso molecular y pI estimado de 47,7 kDa y 6,68 respectivamente.

Cuando la secuencia de aminoácidos de esta proteína fue comparada con otras depositadas en las bases de datos, se observó que presentaba las 4 regiones típicas de unión al cobre para este tipo de enzimas (Fig. 4.23), así como una zona rica en metioninas en su extremo carboxilo terminal común a la que presentan otras MCOs como las proteínas CopA de *Agrobacterium tumefaciens* y *Bradyrhizobium japonicum*, o la MCO1 de *Rhizobium meliloti* (Fig. 4.24).



## 4. RESULTADOS

La proteína CuoB tiene una localización periplásmica, ya que carece de dominios transmembrana y posee un péptido señal bien definido para el sistema Tat (Lee *et al.*, 2006, Bendtsen *et al.*, 2005) en su extremo N-terminal formado por los aminoácidos RRQFI, seguido de una región hidrofóbica (Fig. 4.22).

La similitud con CuoC es del 69%. Ambas presentan una distancia relativamente corta entre los dominios II y III (Fig. 4.23B) y una región rica en metioninas en sus extremos C-terminales. Además muestran una identidad del 56,18% cuando sus secuencias proteínicas son comparadas.

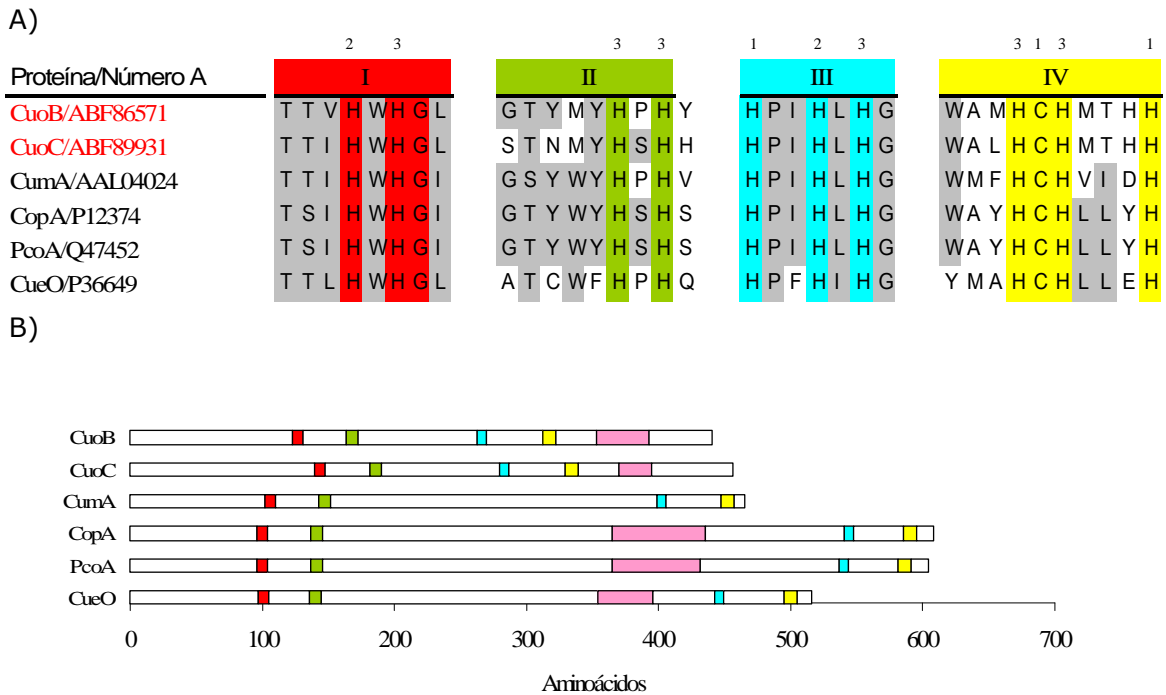


Figura 4.23. A) Alineamiento de los 4 dominios del cobre de CuoB y CuoC con los de otras MCOs de bacterias. Los residuos histidina y cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre han sido numerados de acuerdo con centro del cobre del que forman parte (1:T1; 2:T2; 3:T3). Los residuos invariables en todas las proteínas se muestran sobre fondo rojo, verde, azul o amarillo, según formen parte de los motivos I, II, III o IV respectivamente. Los residuos conservados en al menos tres de las cinco proteínas alineadas se muestran sobre fondo gris. Número A: número de acceso. B) Representación esquemática de los motivos de MCOs de *M. xanthus*, algunas bacterias. Los cuatro dominios del cobre están representados con los mismos colores que en A). Los motivos ricos en metioninas de varias MCOs están representados como rectángulos rosas.

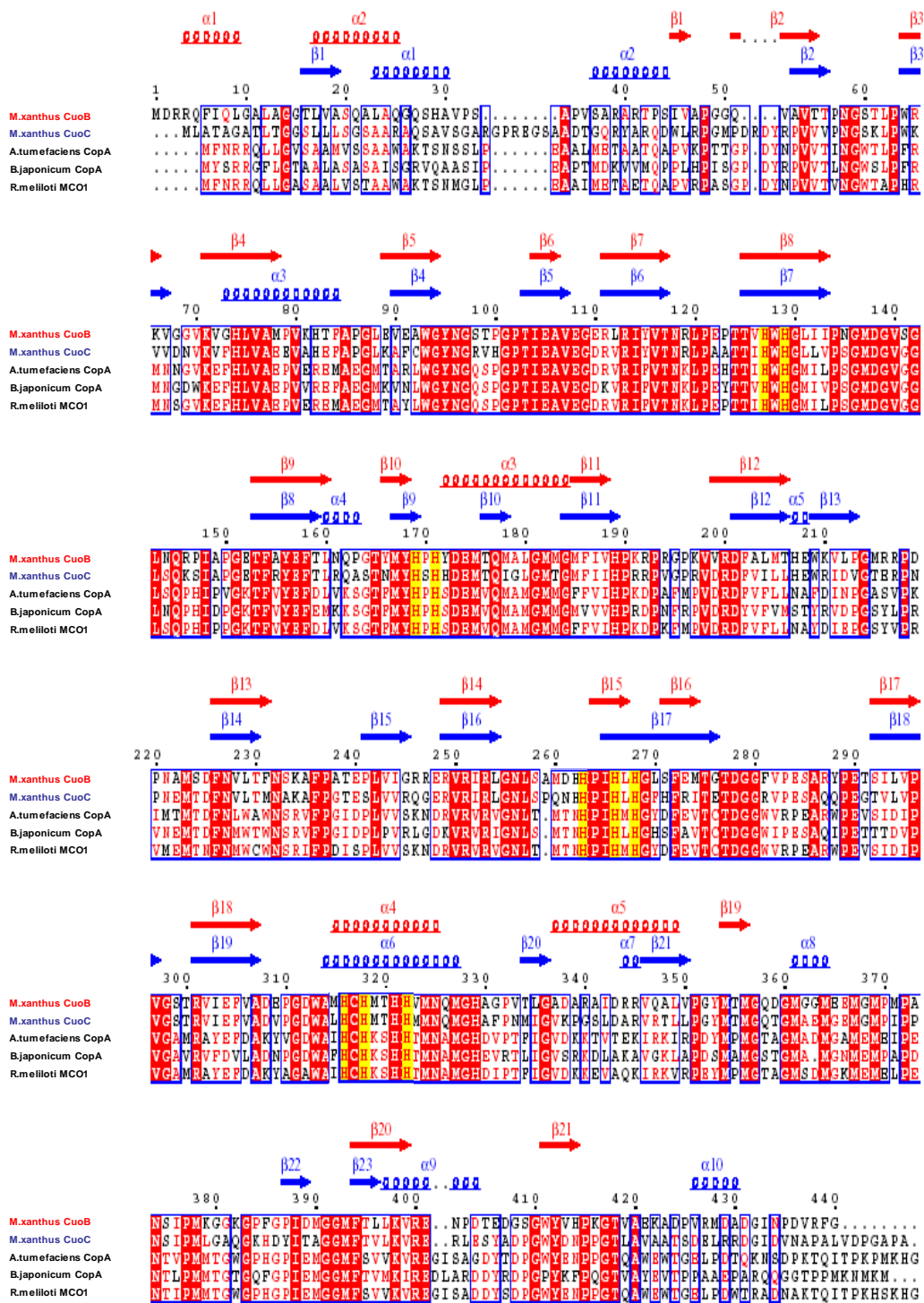


Figura 4.24. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las MCOs CuoB y CuoC de *M. xanthus* y otras MCOs. En rojo sobre fondo amarillo aparecen aminoácidos conservados pertenecientes a las regiones ricas en histidina características de algunas MCOs, correspondientes a las 4 regiones de unión del Cu. El resto de aminoácidos conservados se muestran en blanco sobre fondo rojo. En la parte superior se muestra la probable estructura secundaria de la proteína CuoB de *M. xanthus* en rojo, y de CuoC en azul. Las flechas corresponden a hojas  $\beta$  mientras que las estructuras helicoidales a hélices  $\alpha$ .

#### 4.4.4 IMPLICACIÓN DE *CuoB* EN EL CICLO DE VIDA DE *M. xanthus* Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL COBRE

Como se comentó anteriormente, este tipo de proteínas pueden estar implicadas en el metabolismo, regulación y homeostasis del cobre en diversos organismos. Para estudiar el papel de *CuoB*, al igual que en el caso de *CuoC*, se realizó una fusión transcripcional entre el codón de inicio de *cuoB* y el gen *lacZ* de *E. coli*. Asimismo se obtuvo un mutante de delección en fase para *cuoB* y se consiguió determinar qué regulador era el responsable de su expresión.

##### 4.4.4.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE *cuoB*

El perfil y nivel de expresión de *cuoB* se determinó utilizando la cepa portadora de la fusión transcripcional JM51BZY. Esta cepa fue obtenida siguiendo el protocolo descrito en el apartado Material y Métodos para la obtención de fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli*. Para ello se amplificó una región situada justo antes del codón de iniciación con la pareja de oligonucleótidos LcsBKpn y LcsBBamA (Tabla 3.2), obteniéndose un fragmento de 818 pb que fue digerido posteriormente con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Este fragmento fue insertado en un vector pKY481 digerido con las mismas enzimas de restricción (obteniéndose el plásmido pKY481-*CuoB*), e introducido en el genoma de *M. xanthus* mediante electroporación y recombinación homóloga. Posteriormente se comprobó mediante la técnica de Southern blot que la construcción se había integrado correctamente (Fig. 4.25).

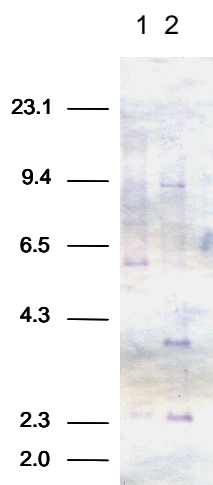


Figura 4.25. Comprobación de la cepa portadora de una fusión transcripcional para *cuoB* JM51BZY mediante Southern blot. Los cromosomas de la cepa silvestre y de la cepa portadora de la fusión fueron digeridos con la enzima de restricción *XhoI*, y posteriormente hibridados con una sonda que cubría una región algo mayor que la utilizada para construir la fusión transcripcional. En el caso de la cepa silvestre (calle 1) aparecen dos bandas (2.588 y 5.438 pb), puesto que existe un sitio *XhoI* en el fragmento utilizado como sonda. En el caso de la cepa JM51BZY (calle 2) aparecen tres bandas (2.588, 3.879 y 9.376 pb), pues el plásmido aporta un nuevo sitio *XhoI*. Los números de la izquierda corresponden a kb del patrón de pesos moleculares utilizados.

El análisis cualitativo de esta cepa (mediante su crecimiento en medios de cultivo sólidos suplementados con X-Gal; Fig. 4.26), así como las posteriores determinaciones cuantitativas (medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa; Fig. 4.27) mostraban una expresión no detectable (al menos por estas técnicas) de este gen en

ausencia de cobre, ni durante el crecimiento vegetativo como tampoco en el ciclo de desarrollo.

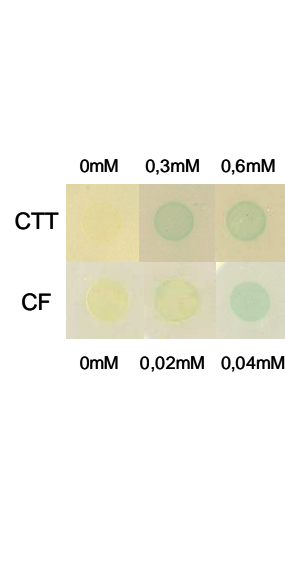


Figura 4.26. Actividad cualitativa  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (CTT) y el ciclo de desarrollo (CF) de la cepa portadora de la fusión transcripcional *cuoB-lacZ* JM51BZY. Los medios de cultivo fueron preparados con las concentraciones indicadas en el panel derecho o con un gradiente continuo creciente de sulfato de cobre cuya concentración máxima se indica en la figura para cada caso. Las células se incubaron a 30°C durante 24 h en el panel izquierdo, y durante 2 h en el derecho.

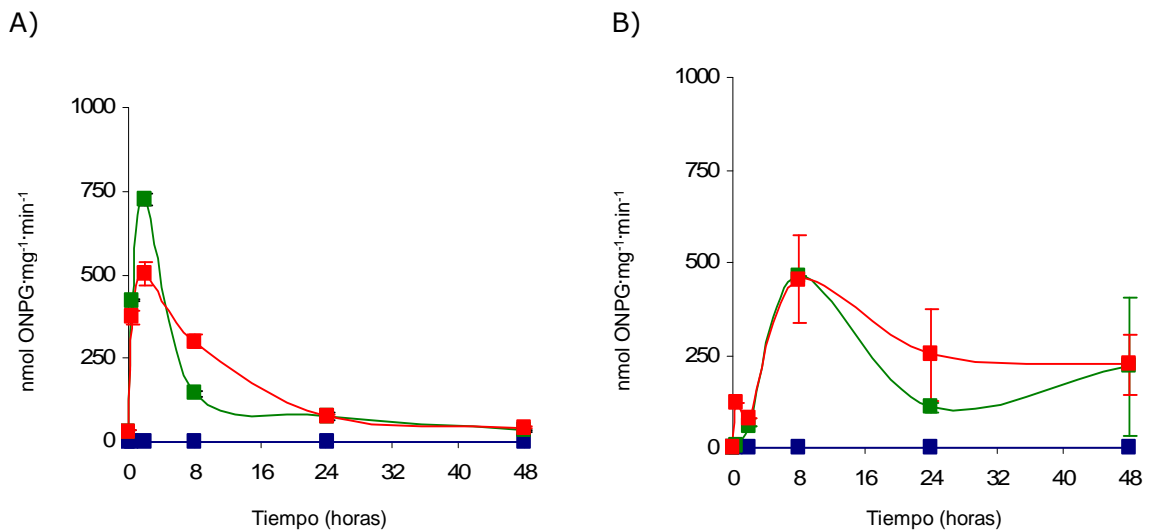


Figura 4.27. Actividad específica  $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51BZY durante A) crecimiento vegetativo (medio CTT) y B) ciclo de desarrollo (medio CF). Las células fueron incubadas en los medios sin adicionar sulfato de cobre (azul) o con diferentes concentraciones del metal. CTT: 0,3 mM (verde); 0,6 mM (rojo). CF: 0,02 mM (verde); 0,04 mM (rojo).

La inducción del promotor de *cuoB* presentó una respuesta dependiente de cobre durante el crecimiento vegetativo, alcanzando máximos niveles de actividad con 0,3 mM de cobre que con 0,6 mM, lo que indica que va a responder eficientemente frente a bajas concentraciones de cobre. Esta inducción alcanzaba un máximo de actividad a las dos h de exposición al metal, disminuyendo posteriormente esos niveles de manera

drástica (casi 9 veces en el caso de 0,6 mM de sulfato de cobre, y unas 12 veces en el caso de 0,3 mM de cobre), lo que sugiere que esta MCO forma parte de la respuesta primaria al cobre. Otros metales como Ag, Au, Cd, Co, Fe, Ni, y Zn, no fueron capaces de inducir *cuoB*.

Durante el ciclo de desarrollo la expresión se mostró algo diferente, alcanzándose valores inferiores de actividad. Hay que destacar que la concentración de cobre utilizada fue 10 veces menor que en el caso del crecimiento vegetativo, pues las células son más sensibles al metal en esta etapa del desarrollo. La inducción por cobre no se produjo de manera tan rápida, alcanzándose actividades máximas tras 8 h de incubación (en lugar de 2 h como en el crecimiento vegetativo). Además, las concentraciones de cobre utilizadas promovían los mismos niveles de expresión, sin que existiera una dependencia con la concentración utilizada. Por otro lado, el descenso en los niveles de expresión conforme aumentaba el tiempo de incubación no fue tan drástico como en el caso del crecimiento vegetativo (1,5-1,7 veces).

##### 4.4.4.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA *cuoB*

La obtención de este mutante de delección implica la eliminación del gen prácticamente al completo (98%), conservando solamente 11 codones que contienen el codón de inicio y el de terminación del gen. Se mantiene el codón de iniciación en fase con un sitio de restricción BamHI, y a continuación se conserva una región cercana al extremo 3' del gen donde se conserva el codón de terminación. La pauta de lectura no se altera, evitando posibles efectos polares en los genes que se encuentran por debajo de *cuoB*.

Este mutante sensible a kanamicina fue obtenido mediante la utilización del vector pBJ113 (como se describe en el apartado Material y Métodos), del mismo modo que han sido construidos los mutantes de delección anteriormente mencionados. En el vector pBJ113 se clonaron dos fragmentos amplificados por PCR, uno de 905 pb y otro de 812 pb, correspondiendo respectivamente a un fragmento que engloba el codón ATG en posición +1 del gen *cuoB* (denominado CuoB1) y otro fragmento hacia el final del mismo gen incluyendo el codón de terminación (fragmento CuoB2).

El primer fragmento (CuoB1) se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos LcsBXba/LcsBB2 (ver Tabla 3.2). Una vez que se comprobó que la amplificación se había producido correctamente, fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y BamHI, al igual que el vector pBJ113. Ambos, vector y producto de PCR CuoB1, se sometieron a ligación, de manera que se obtuvo el plásmido pBJ113-CuoB1. Esta construcción fue comprobada mediante digestiones de restricción. Por otro lado, para la obtención del segundo fragmento, se llevó a cabo igualmente la amplificación por PCR del fragmento de 812 pb CuoB2 que contiene el codón terminación del gen *cuoB*, usando los oligonucleótidos LcsBB/LcsBE (Tabla 3.2). Este fragmento y el plásmido pBJ113-CuoB1 fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y el segundo fragmento fue clonado obteniéndose el plásmido pBJ113 $\Delta$ *cuoB* necesario para la construcción de una cepa con una delección en fase del gen *cuoB*.

Una vez obtenida la construcción anterior, y realizadas las pertinentes digestiones de comprobación, el plásmido se electroporó en *M. xanthus*. Las células

electroporadas fueron cultivadas en medio sólido suplementado con kanamicina como se describe en el apartado Material y Métodos, de modo que sólo pudiera crecer aquellas células que hubieran incorporado el plásmido con el gen de resistencia a kanamicina (Fig. 3.7).

Tras varios días de incubación, algunas de las colonias que crecieron en el medio con kanamicina fueron seleccionadas como presuntas positivas y analizadas mediante Southern blot, para comprobar que habían incorporado el plásmido pBJ113 $\Delta$ cuoB. A esta cepa se le denominó  $\Delta$ cuoBIntermediario.

El siguiente paso consistió en la escisión del casete, eliminando la presión selectiva (apartado Material y Métodos; Fig. 3.8). Las colonias que crecieron en el medio con galactosa también fueron cultivadas en medio suplementado con kanamicina para comprobar que habían perdido completamente la resistencia al antibiótico y no había restos de cepa intermediaria. Finalmente se consiguieron ocho bacterias sensibles a kanamicina, que podían crecer en presencia de galactosa. Estas bacterias se analizaron nuevamente por Southern blot (Fig. 4.28).

Todos los cromosomas fueron digeridos con la enzima de restricción XhoI, y la sonda empleada para hibridar la membrana fue el producto de PCR CuoB1 marcado con digoxigenina. La sonda debía hibridar con un fragmento XhoI del cromosoma de la cepa control DZF1 de 2.582 pb, mientras que en el caso de los posibles mutantes de delección hibridaría con un fragmento XhoI de 1.292 pb. Esta disminución en el tamaño del fragmento identificado se debía a la eliminación de 1290 pb del gen *cuoB*, correspondiente a 430 aminoácidos. La cepa cuyo análisis por Southern blot presentó un tamaño de 1292 pb en la calle 4 de la Fig. 4.28 fue seleccionada, y como portadora una delección en fase para *cuoB* se le denominó JM51BIF.

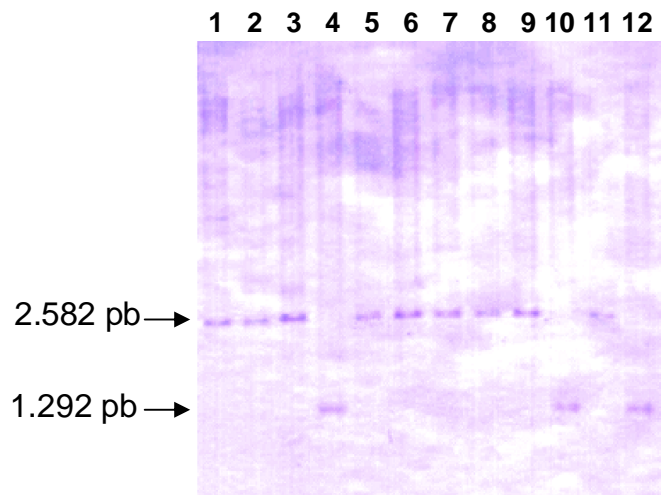


Figura 4.28. Comprobación de la cepa portadora de una delección para *cuoB* JM51BIF mediante Southern blot. Posibles mutantes de delección para *cuoB* (calles 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 12) y cepa silvestre (calles 2, 5, 8 y 11). La digestión de cromosomas se realizó con la enzima de restricción XhoI y la hibridación se llevó a cabo con el producto de PCR CuoB1 marcado con digoxigenina. El tamaño de los fragmentos se indica en la figura.

4.4.4.3. CARACTERIZACIÓN DE JM51BIF ( $\Delta cuoB$ )

Para conocer el efecto de la delección de *cuoB* en el ciclo de vida de *M. xanthus*, se analizaron diversas características de la cepa portadora de la delección tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, comparando su comportamiento con el de la cepa silvestre.

## 4.4.4.3.1. Crecimiento Vegetativo

Tanto el mutante de delección para *cuoB* como la cepa silvestre fueron crecidas en medio CTT líquido con diferentes concentraciones de cobre, para determinar el efecto de la pérdida de *CuoB* *in vivo* en *M. xanthus*. Como se muestra en la Fig. 4.29, la delección de este gen hace que la cepa mutante sea mucho más sensible frente al cobre, inhibiéndose su crecimiento cuando las concentraciones de sulfato de cobre utilizadas alcanzan los 0,5 mM, mientras que la cepa silvestre es capaz de tolerar concentraciones de hasta 0,9 mM.

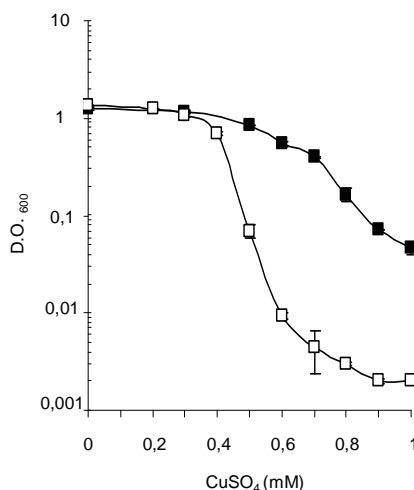


Figura 4.29. Efecto del cobre en el crecimiento de *M. xanthus*. La cepa silvestre DZF1 está representada por cuadrados negros (■) mientras que el mutante de delección para *cuoB* JM51BIF está representado por cuadrados blancos (□). Estas células se cultivaron en ausencia de cobre y fueron diluidas a una densidad óptica de 0,05 medida a 600nm, en medio de cultivo fresco al que se habían adicionado previamente las concentraciones de sulfato de cobre indicadas en cada caso.  $DO_{600}$  determinada tras 24 h de incubación. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

## 4.4.4.3.2. Ciclo de Desarrollo

El análisis de la estirpe  $\Delta cuoB$  durante el ciclo de desarrollo en ausencia de cobre adicionado al medio de cultivo CF mostró un retraso en la formación de cuerpos fructificantes, recuperándose parcialmente tras 48 h de incubación (Fig. 4.30), comparado con la cepa silvestre. El número y capacidad de germinación de las mixósporas obtenidas a partir de células cultivadas sin adición de cobre fueron similares a los obtenidos en el caso de la cepa silvestre (Fig. 4.16).

En presencia de cobre,  $\Delta cuoB$  presenta una reducción en el número de esporas conforme aumenta la concentración del metal muy similar a la cepa WT (ver apartado 4.1). La capacidad de germinación de esporas tampoco presentó diferencias significativas cuando ambas estirpes fueron comparadas. Asimismo, no se apreció

ningún tipo de alteración al observar las mixósporas a MET, ya proviniesen de crecimiento en medios de cultivo suplementados o no suplementados con sulfato de cobre. Sin embargo, el mutante de delección para *cuoB* fue mucho más sensible que la cepa silvestre, igual que se observó durante el crecimiento vegetativo, no tolerando concentraciones superiores a 0,03 mM (Fig. 4.30), mientras que la cepa silvestre soporta concentraciones de hasta 0,06 mM.

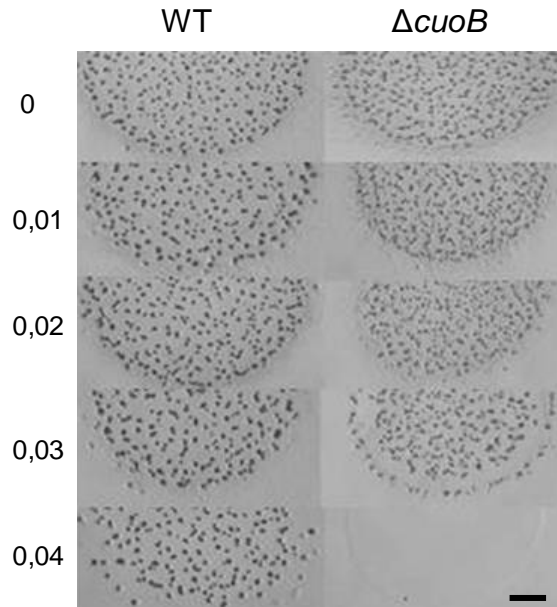


Figura 4.30. Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes. Las células incubadas durante 24 h en ausencia de cobre fueron concentradas a  $DO_{600}$  de 15, y gotas de 10  $\mu$ L de este cultivo concentrado se incubaron en medio CF durante 48 h a 30°C con las concentraciones de sulfato de cobre (mM) indicadas en cada caso. Barra: 1 mm

#### 4.4.5 ACTIVIDAD DE Cu<sub>o</sub>B

##### 4.4.5.1. ACTIVIDAD CUPROSO OXIDASA EN EXTRACTOS CELULARES

Como en el caso de Cu<sub>o</sub>C, se trató de identificar el efecto de la delección de *cuoB* en la actividad cuproso oxidasa que presentaban los extractos celulares de la cepa silvestre comparada con el mutante de delección para esta MCO. Para medir la oxidación de iones cuprosos en estos extractos, las células se incubaron durante 1 y 24 h en ausencia y presencia de cobre, y se utilizó una concentración de sulfato de cobre inferior a la empleada en el caso del mutante para *cuoC* que no afectara la viabilidad celular (0,3 mM).

Al determinar la oxidación de iones Cu<sup>+</sup> en extractos del mutante de delección para *cuoB* y compararlos con los resultados obtenidos para la cepa silvestre, se observó con sorpresa un incremento de actividad en el mutante de delección. Como se observa en la Fig. 4.31A, tras una hora de incubación en ausencia o presencia del metal (tiempo donde se alcanzaban altos niveles de expresión para *cuoB*), la actividad cuproso oxidasa para  $\Delta cuoB$  fue de 2 a 3 veces superior que en el caso de la cepa silvestre. Este incremento se mantuvo en ausencia de cobre tras 24 h de incubación (Fig. 4.31B),



## 4. RESULTADOS

alcanzándose los mismos niveles de actividad para ambas cepas cuando las células fueron cultivadas en presencia de 0,3 mM de sulfato de cobre pasado este tiempo.

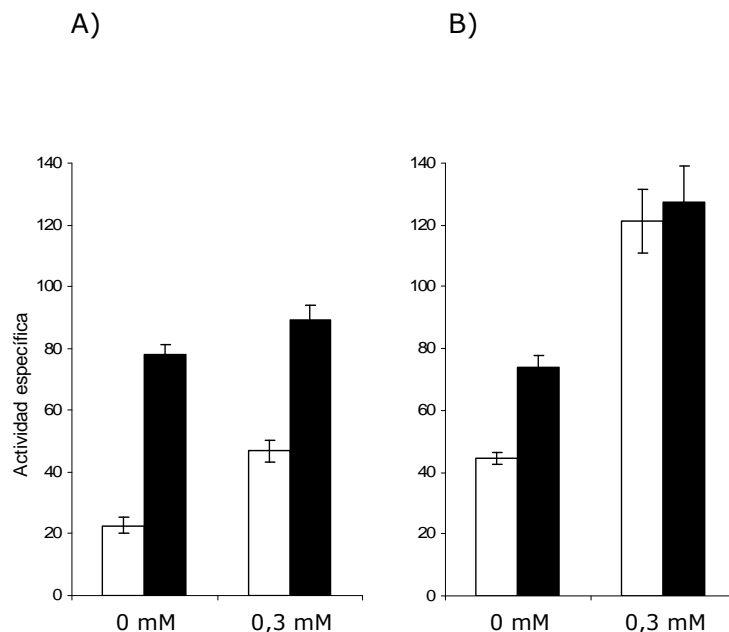


Figura 4.31. Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares de la cepa WT (barras blancas) y el mutante de delección para *cuoB* (barras negras) en ausencia o presencia de 0,3 mM de sulfato de cobre, recogidos tras diferentes tiempos de incubación. A) Las células fueron incubadas durante 1 h a 30°C. B) Cultivos incubados durante 24 h a la misma temperatura.

### 4.4.5.2. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE *CuoB*

Ya que los resultados de actividad obtenidos con los extractos celulares no eran claros, se decidió trabajar con la proteína purificada. Para demostrar que *CuoB* es una MCO, y determinar frente a qué tipo de sustratos presenta mayor especificidad, el gen que codifica para esta proteína fue clonado un vector de expresión que permitiera obtener altos niveles de inducción de esta proteína, utilizando cultivos de *E. coli*. Para ello se amplificó mediante PCR el gen *CuoB*, utilizando la pareja de oligonucleótidos *CuoB.NdeForward* y *CuoB.BamReverse* (Tabla 3.2), que permitían incorporar dos sitios de restricción en cada extremo (*NdeI* y *BamHI*) y de este modo insertar el fragmento así amplificado en la orientación correcta. El vector utilizado para tal fin, pET24a, fue digerido con las mismas enzimas de restricción y se llevó a cabo el proceso de ligación. A continuación, el producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* de la cepa JM109, gracias a las cuales se consiguió un clon positivo denominado pNGCuoB24a. Este plásmido fue secuenciado con los oligonucleótidos universales T7 y T7Rev, y se comprobó que no portaba mutaciones indeseadas. Para sobreexpresar la proteína se transformó la cepa BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) de *E. coli* (ver Material y Métodos; 3.1.1).

Para comprobar que la proteína se expresaba en grandes cantidades, se llevó a cabo un ensayo en el que se inducía la síntesis de *CuoB* en *E. coli* (detallado en el apartado 3.2.7; Material y Métodos). El análisis mediante SDS-PAGE de las muestras anteriores permitió identificar la sobreexpresión de una proteína con un peso molecular

aproximado de 37 kDa, menor al esperado para CuoB (47,7 kDa), y la mayor parte de la proteína sobreexpresada se encontraba en la fracción insoluble (Fig. 4.32).

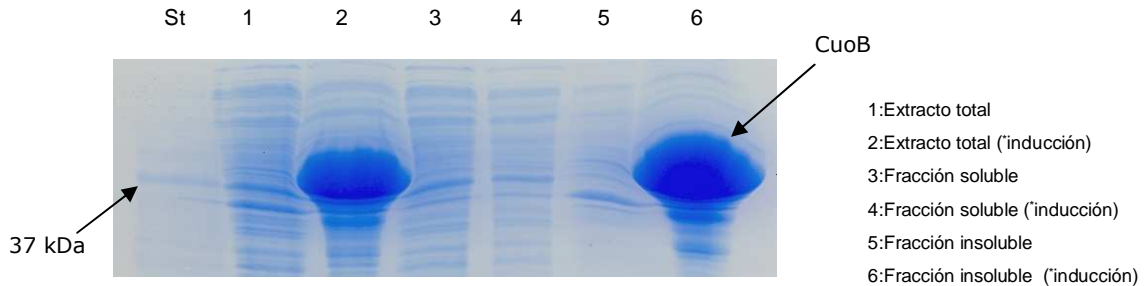


Figura 4.32. SDS-PAGE teñido con azul comassie, que muestra la sobreexpresión de CuoB. Los cultivos fueron incubados a 30°C hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0,7, donde se recogió una muestra de la que se obtuvo el extracto total y las diferentes fracciones. En ese punto se llevó a cabo la inducción, adicionando IPTG 0,1 mM y manteniendo las células en cultivo durante 6 h más. Posteriormente se recogieron estos cultivos y se obtuvo el extracto total y las diferentes fracciones (\*inducción). El peso molecular corresponde al marcador utilizado (St).

La expresión de CuoB ha sido puesta a punto por Durao, P. y Chen, Z.J. en el MET (*Microbial and Enzyme Technology*), laboratorio dirigido por la Dra. Martins de la Universidad Nova de Lisboa. Allí, la proteína ha sido sobreexpresada en *E. coli*, utilizando la misma cepa (BL21 Star<sup>TM</sup>), pero coexpresando el vector pNGCuoB24a con el plásmido pGro7, que porta los genes para las chaperonas GroES-GroEL. La expresión conjunta de estas chaperonas mejora el plegamiento de proteínas.

Las condiciones de inducción han sido 30°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,6; inducción con 0,1 mM de IPTG y 250 mM de  $CuCl_2$ ; mantenimiento de la incubación en agitación (160 rpm) durante 4 h a 25°C; continuación de la incubación a 25°C durante aproximadamente 12 h (por la noche) sin agitación. Este tratamiento mejora la obtención de MCOs con los 4 átomos de cobre que deben portar (Durao *et al.*, 2008). Posteriormente, se recogieron los cultivos mediante centrifugación y las células fueron lisadas utilizando una prensa francesa. Tras centrifugar este lisado, el sobrenadante (que contenía la fracción soluble) fue utilizado para purificar CuoB. Esto se llevó a cabo mediante dos pasos de purificación: un primer paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas con SP-Sefarosa; y un segundo paso de filtración en gel, utilizando columnas cargadas con Superdex 75 HR 10/30. Todas las purificaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando un sistema FPLC (Akta-FPLC; Amersham Biosciences).

La proteína así obtenida fue comprobada mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) tras una digestión con tripsina, con un valor de identificación de 80, cubriendo un 30% de la secuencia. Además, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando columnas de Superosa 12<sup>TM</sup> 10/300 GL. Esto permitió identificar que CuoB estaba formando dímeros, pues se obtuvo un peso molecular experimental de la proteína en su conformación nativa de 102 kDa.

4.4.5.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE *CuoB*

En el mismo laboratorio (MET), se ha estudiado la especificidad de sustrato de *CuoB*. Los ensayos de actividad con la proteína heteróloga han demostrado que ésta presenta cierta actividad frente al sustrato aromático no fenólico ABTS, pero las mayores actividades observadas han sido las que llevan a cabo la oxidación de hierro y cobre: cuproso oxidasa y ferroxidasa (Tabla 4.2). Por tanto, *CuoB* formaría parte de las metalooxidases dentro de la familia MCOs.

Tabla 4.2. Especificidad de sustrato de la proteína recombinante *CuoB*

SUSTRATO	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{cat}(\text{min}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(\text{M}^{-1}\text{min}^{-1})$
<b>Cu(I)</b>	43 ± 7	225 ± 14	520 × 10 <sup>4</sup>
<b>Fe(II)</b>	96 ± 25	434 ± 14	450 × 10 <sup>4</sup>
<b>ABTS</b>	88 ± 20	55 ± 13	63 × 10 <sup>4</sup>
<b>DMP</b>	1240 ± 122	5 ± 1	0.4 × 10 <sup>4</sup>

4.4.6 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *cuoB*

Para abordar esta idea, se introdujo el plásmido con la fusión transcripcional *cuoB-lacZ* en diversos mutantes de delección para reguladores transcripcionales. Los mutantes de delección en fase utilizados durante este estudio fueron:

GEN	PRODUCTO GÉNICO	CEPA
MXAN_3426	Factor sigma de tipo ECF CorE	JM51EIF
MXAN_3419-3418	Sistema de dos componentes CorSR1	JM51DIF

El plásmido portador de la fusión *cuoB-lacZ* fue electroporado en estos mutantes de delección, y las colonias que fueron capaces de crecer en medio suplementado con kanamicina fueron analizadas mediante Southern blot para comprobar que habían incorporado la construcción correctamente (datos no mostrados).

Posteriormente, se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las estirpes seleccionadas, portadoras de la fusión *lacZ* para *cuoB*, y que fueron denominadas JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*) y JM51DBZY ( $\Delta corSR1$  *cuoB-lacZ*). Esta actividad se comparó con la que presentaba la cepa silvestre con el mismo plásmido (JM51BZY), mediante el análisis cualitativo, cultivando las tres cepas en medios a los que se había adicionado diferentes concentraciones de sulfato de cobre.

Como muestra la Fig. 4.33A, la expresión de  $\beta$ -galactosidasa para *cuoB* en el mutante del sistema de dos componentes CorSR1 era, al menos cualitativamente, idéntica a la mostrada por la cepa silvestre portadora de la misma fusión transcripcional. Sin embargo, en el caso del mutante para *corE* con la fusión de *cuoB* no se podía observar coloración azul en las placas en todo el gradiente de concentraciones. Este resultado fue corroborado mediante la cuantificación de esta actividad en extractos celulares. Por tanto, CorE está regulando completamente la transcripción de *cuoB*.

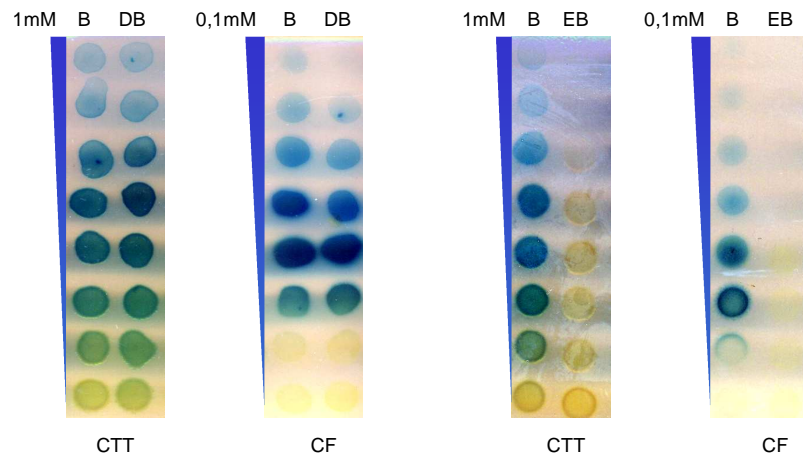


Figura 4.33. Actividad cualitativa  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (CTT) y el ciclo de desarrollo (CF) de varias estirpes portadoras de la fusión transcripcional *cuoB-lacZ*. Los medios de cultivo fueron preparados con un gradiente continuo creciente de sulfato de cobre, cuya concentración máxima fue de 1 mM en el caso del medio CTT y de 0,1 mM para CF. La zona de máxima concentración se representa por la base mayor del triángulo adyacente a cada figura. Las células se incubaron a 30°C durante 48 h. B: JM51BZY (*cuoB-lacZ*); DB: JM51DBZY ( $\Delta corSR1$  *cuoB-lacZ*); EB: JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*).

## 4.5 CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR SIGMA DE TIPO ECF *CorE*

Ya que la expresión de la MCO *CuoB* está regulada por *CorE*, factor sigma de la ARN polimerasa de tipo ECF con el que se coexpresa (Fig. 4.21), se decidió profundizar en su estudio.

El estudio en profundidad de *CorE* ha permitido demostrar que esta proteína está implicada en la homeostasis del cobre en *M. xanthus*, regulando la expresión de genes implicados en este proceso. No actúa con un antisigma, como ocurre en la inmensa mayoría de ECFs descritos hasta la fecha; necesita cobre para unirse al DNA (al menos *in vitro*), lo que también es algo excepcional tratándose de un factor sigma; su mecanismo de actuación está regulado por el estado de oxidación del cobre, y presenta un sistema de sensibilización/desensibilización que le permite responder rápidamente frente a una situación de estrés generada por cobre.

### 4.5.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *corE* (MXAN\_3426)

El análisis de la secuencia del gen que codifica para *CorE* reveló la presencia de un ORF con 636 pb, codificando para una proteína de 211 residuos aminoacídicos, con un uso de codones típico de *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 1989) al presentar G/C en la tercera posición en el 83 % de los tripletes (Fig. 4.34). La región situada justo por encima del codón de iniciación, compuesta por un segmento de 58 pb no presenta secuencias conservadas propias de regiones promotoras de la transcripción, lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta que *corE* se coexpresa con MXAN\_3424 y *cuoB*. Sin embargo, como será demostrado más adelante, debe existir una región promotora interna en esa región puesto que *CorE* regula completamente la expresión de *cuoB* pero no la suya propia.

TGA**TGGCGAAGGGGGCAGAGGACGGCTTGACCAGGTCCTGTGCTCCGTACCTGAACGGC**

```

1 - ATG AGC GAC ATG AAT CAG GGA GCG GGT GCG GAG AGC GAT GGC GTG GTG CGG CCC CTG TCC GCC GAC GTC ATT TCC AGT CTG GTG GAG AAC CAC - 93
1 - M S D M N Q G A G A E S D G V V R P L S A D V I S S L V E N H - 31

94 - CGG GAG TTC TTG CGC TTC CTC GAG CGT CGG GTT GGG AGC CGC GCG GTG GCG GAA GAC ATC CTT CAG GAT GCG TTC GTC CGT GGC ATG GGC AAG - 186
32 - R E F L R F L E R R V G S R A V A E D I L Q D A F V R G M G K - 62

187 - GCG GAG ACG CTC CGC GAA GAT GAG TCG CTG ACG GCA TGG TTC TAC AGC GTG CTG CGC AAC GCG GTC ATC GAC CAT TAC CGG CGT CGT GGC ACG - 279
63 - A E T L R E D E S L T A W F Y S V L R N A V I D H Y R R R G T - 93

280 - ACG GAG CGC GCG CTG GCT TCG CTG GCC AGC GAG CTC GAG GAG GGC CAT GCG CCG GAA GCG GAA CTG GCG CAG GCT GTT TGC CAG TGC GTG GGC - 372
94 - T E R A L A S L A S E L E E G H A P E A E L A Q A V C Q C V G - 124

373 - CGG CTG GCC GGC ACC CTC AAG CCC GAG TAT GCC GAG GCG CTG CGG CGT GTG GAG GTG GAG GGC GTC AGC GTC CCG GCT TTC GCC CTG GAG GCG - 465
125 - R L A G T L K P E Y A E A L R R V E V E G V S V P A F A L E A - 155

466 - GGC ATC ACG TCC AAC AAC GCG GCG GTG CGA CTG CAC CGT GCT CGC AAG GCG CTC AAG AAA CAG TTG GAG GTT TCG TGC GGT ACG TGC GCC TCG - 558
156 - G I T S N N A A V R L H R A R K A L K K Q L E V S C G T C A S - 186

559 - CAC GGC TGT CTG GAC TGC ACG TGC GCG ACG CAG GGC GCC GAG AAG AAG GCC GGG GGC TGC GGG AGC GCG AAG GCA TGA
187 - H G C L D C T C A T Q G A E K K A G G C G S A K A *
```

Figura 4.34. Secuencia de codones del gen *corE*. El codón de terminación del gen *cuoB* se muestra en rojo. La secuencia probable de unión al ribosoma se muestra en azul.

### 4.5.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE *CorE*

*CorE* presenta una secuencia aminoacídica de 211 residuos, con un peso molecular y pI estimados de 22,6 kDa y 6,24, respectivamente.

Cuando la secuencia de aminoácidos de esta proteína fue comparada con otras depositadas en las bases de datos, se observó que presentaba las 2 regiones típicas

conservadas en la subfamilia ECF de factores sigma de la ARN polimerasa, definidas por los dominios registrados en la base de datos PFAM (Finn *et al.*, 2008) como PF04542 (E-valor =  $3,2 \times 10^{-14}$ ), correspondiente a la región 2 de sigma 70, que es considerado el dominio más conservado de toda la proteína y que está implicado en el reconocimiento y unión de la región promotora -10; y PF08281, perteneciente a la región 4.2 de sigma 70 (E-valor =  $4,3 \times 10^{-6}$ ), con un motivo hélice-giro-hélice (HTH) implicado en la unión de la región -35 de los promotores reconocidos por los factores sigma 70 (Fig. 4.35). Además, también presenta el dominio sigma 70-ECF, definido en las bases de datos PROSITE y TIGR como PS01063 y TIGR02937 (Hulo *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2009).

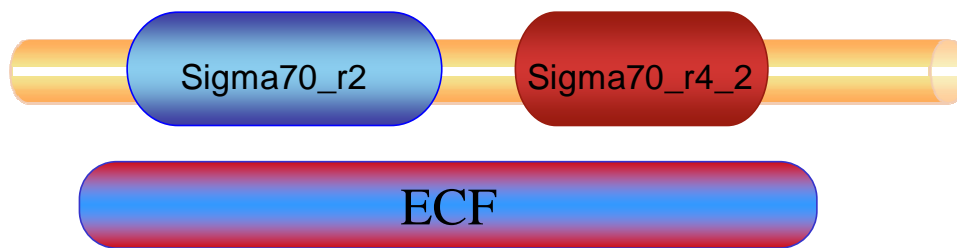


Figura 4.35. Esquema de los dominios conservados en CorE. La proteína está representada por el cilindro naranja (211 aminoácidos), y sobre ella se encuentran en proporción los dominios conservados de la región 2 y 4.2 de los factores sigma 70 (en azul y rojo respectivamente). El dominio ECF está representado igualmente de manera proporcional a los aminoácidos que lo componen (englobando la región 2 y 4.2).

Esta proteína tiene una región en su extremo carboxilo terminal que representa un dominio extra no observado en los factores sigma 70 descritos actualmente (ECFs o no ECFs). El estudio de este dominio será detallado en apartados posteriores dentro de la caracterización de CorE.

La proteína CorE tiene una localización citoplásmica, ya que carece de dominios transmembrana y no posee péptidos señal ni para el sistema Sec ni para el sistema Tat.

### 4.5.3 IMPLICACIÓN DE CorE EN EL CICLO DE VIDA DE *M. xanthus* Y RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL COBRE

Para determinar el efecto que CorE pudiera estar ejerciendo en la respuesta al cobre de *M. xanthus*, se realizó una fusión transcripcional entre el codón de inicio de *corE* y el gen *lacZ* de *E. coli* que permitiera identificar el tiempo y características de expresión de este gen. Asimismo se obtuvo un mutante de delección en fase para *corE* gracias al cual se pudo analizar el efecto de la ausencia de CorE en *M. xanthus*, y demostrar que esta proteína es esencial para la respuesta al cobre de esta bacteria.

#### 4.5.3.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE *corE*

El perfil y nivel de expresión de *corE* se determinó utilizando la cepa portadora de la fusión transcripcional JM51EZY. Esta cepa fue obtenida siguiendo el protocolo descrito en el apartado Material y Métodos para la obtención de fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli*. Para ello se amplificó una región situada justo antes del codón de

#### 4. RESULTADOS

iniciación con la pareja de oligonucleótidos LcsBECFK y LcsBECFB, obteniéndose un fragmento de 836 pb que fue digerido posteriormente con las enzimas de restricción KpnI y BamHI. Este fragmento fue insertado en un vector pKY481 digerido con las mismas enzimas de restricción, e introducido de forma estable en el genoma de *M. xanthus* mediante electroporación y recombinación homóloga. Posteriormente se comprobó mediante la técnica de Southern blot que la construcción se había integrado correctamente (Fig. 4.36).

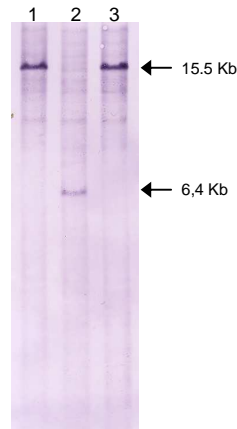


Figura 4.36. Comprobación de posibles cepas portadoras de una fusión transcripcional para *corE* JM51EZY mediante Southern blot. Los cromosomas de la cepa silvestre y de las cepas posibles portadoras de la fusión fueron digeridos con la enzima de restricción PstI y posteriormente hibridados con una sonda de 836pb que corresponde al mismo fragmento utilizado para construir esta fusión transcripcional. En el caso de la cepa silvestre (calle 2) aparece una banda de 6,4 kb. En el caso de las dos colonias analizadas como posibles positivos (calles 1 y 3), aparece una banda de 15,5 kb, resultado de la integración del plásmido portador de la fusión (9,1 kb).

El análisis cualitativo de esta cepa (mediante su crecimiento en medios de cultivo sólidos suplementados con X-Gal; Fig. 4.37) mostraban una expresión indetectable de  $\beta$ -galactosidasa en ausencia de cobre, como ocurría en el caso de *cuoB*. Sin embargo, las posteriores determinaciones cuantitativas (medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa; Fig. 4.38) mostraron una expresión detectable de este gen en ausencia de cobre, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo.

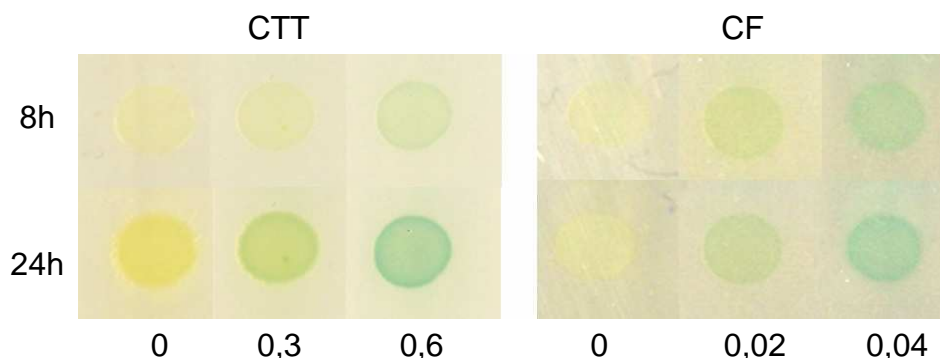


Figura 4.37. Actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (CTT) y el ciclo de desarrollo (CF) de la fusión transcripcional *corE-lacZ*. Los medios de cultivo fueron preparados con las concentraciones de sulfato de cobre indicada en cada caso (mM). Las células se incubaron a 30°C durante 8 y 24 h como se indica en la figura.



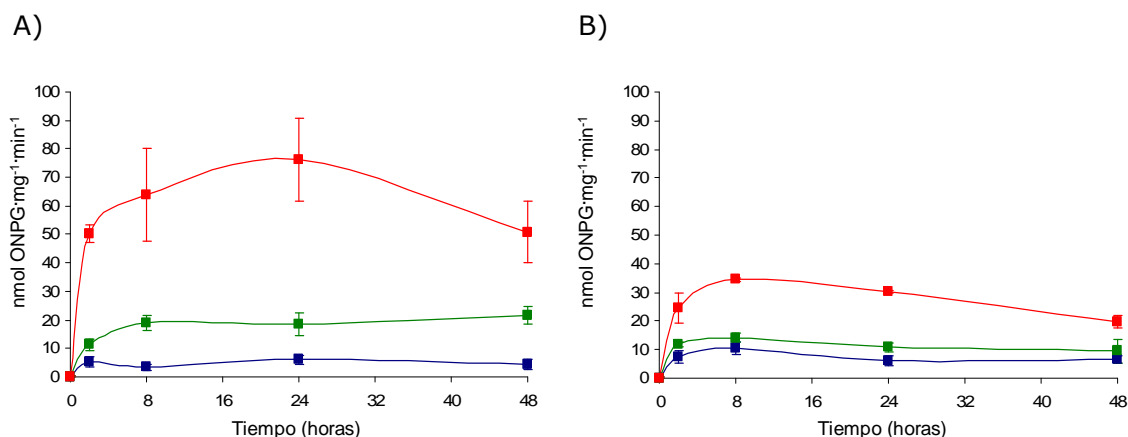


Figura 4.38. Actividad específica  $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51EZY durante A) crecimiento vegetativo (medio CTT) y B) ciclo de desarrollo (medio CF). Las células fueron incubadas en los medios sin adicionar sulfato de cobre (azul) o con diferentes concentraciones del metal. CTT: 0,3 mM (verde); 0,6 mM (rojo). CF: 0,02 mM (verde); 0,04 mM (rojo).

En presencia de cobre se producía una inducción del promotor de *corE* dependiente de la concentración de metal en ambas fases del crecimiento, aumentando los niveles de actividad cuando las concentraciones de sulfato de cobre incrementaban en el medio de cultivo. Esta inducción alcanzaba un máximo de actividad a las 2 h de exposición al metal tras lo cual se mantenían los niveles en torno a valores muy cercanos, tanto durante el crecimiento vegetativo como en el ciclo de desarrollo.

#### 4.5.3.2. MUTANTE DE DELECIÓN EN FASE PARA *corE*

La obtención de este mutante de delección implica la eliminación del gen prácticamente al completo (95%), conservando solamente 33 codones que contienen el codón de inicio y el de terminación del gen. Se mantiene el codón de iniciación en fase con un sitio de restricción BamHI, y a continuación se conserva una región cercana al extremo 3' del gen donde se conserva el codón de terminación. La pauta de lectura no se altera, evitando posibles efectos polares en las regiones hacia el extremo 3' de este gen.

Este mutante sensible a kanamicina fue obtenido siguiendo la misma estrategia utilizada para construir los mutantes de delección anteriormente descritos. En el vector pBJ113 se clonaron dos fragmentos amplificados por PCR, uno de 838 pb (CorE1) que engloba el codón ATG de inicio de la traducción, y otro de 834 pb (CorE2) que incluye el codón de terminación.

El primer fragmento (CorE1) se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos LcsBECFK/LcsBECFB (ver Tabla 3.2), fue digerido con las enzimas de restricción adecuadas e insertado en el vector pBJ113 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido pBJ113-CorE1. El segundo fragmento fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos LcsBECFB2/LcsBECFH (Tabla 3.2), digerido con las enzimas BamHI/HindIII e introducido en pBJ113-CorE1 con extremos compatibles. De este modo se obtuvo el plásmido pBJ113 $\Delta$ corE necesario para la construcción de una cepa con una delección en fase del gen *corE*.

Obtenida la construcción anterior y realizadas las pertinentes digestiones de comprobación, el plásmido se electroporó en *M. xanthus* y se esperó a que aparecieran



colonias resistentes a kanamicina, que fueron analizadas por Southern blot. Una de estas colonias que presentaba el plásmido incorporado correctamente y a la que se denominó  $\Delta corE$  Intermediario (Fig. 4.39), fue tratada como se ha descrito en el apartado Material y Métodos para favorecer la recombinación homóloga y obtener el mutante definitivo de delección para *corE*.

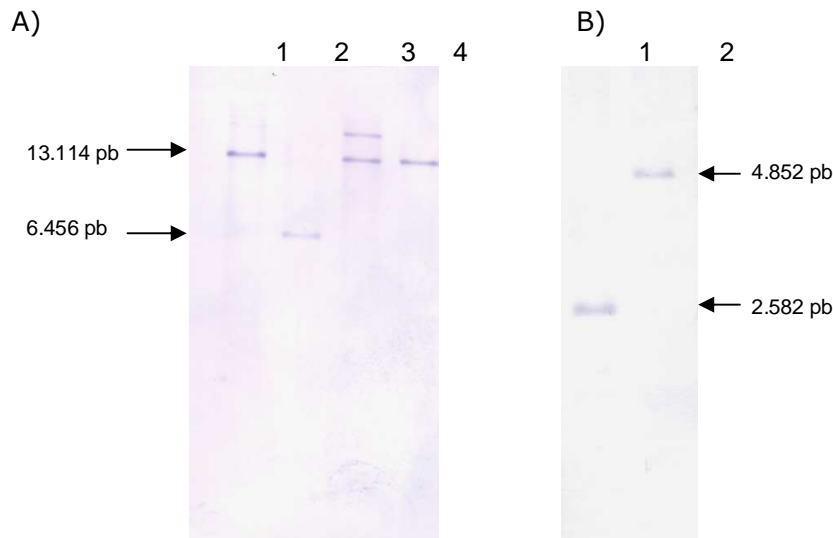


Figura 4.39. Comprobación del intermediario y mutante definitivo para *corE*. A) Posibles cepas portadoras del plásmido pBJ113 $\Delta corE$ . La cepa cuyo cromosoma fue analizado por Southern blot en la calle 1 se utilizó para la obtención del mutante definitivo. Calles 1, 3 y 4: cromosomas de posibles intermediarios. Calle 2: cromosoma de la cepa silvestre utilizado como control. Todos los cromosomas fueron digeridos con PstI e hibridados con la sonda CorE2. B) Southern blot del mutante de delección en fase para *corE* (calle 2) JM51EIF. El incremento de tamaño en este caso, de la banda que aparece en el cromosoma del mutante de delección con respecto a la que se obtiene para la cepa silvestre (calle 1), se debe a la desaparición de un sitio XhoI al deleccionarse en gen. Esta enzima de restricción fue utilizada para digerir los cromosomas que fueron hibridados posteriormente con la sonda CorE1.

Finalmente se consiguieron ocho bacterias sensibles a kanamicina, que podían crecer en presencia de galactosa. Estas bacterias se analizaron nuevamente por Southern blot, y como se puede observar en la Fig. 4.39, se obtuvo el mutante de delección para *corE*, que se denominó JM51EIF.

#### 4.5.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA JM51EIF ( $\Delta corE$ )

El mutante de delección para *corE* fue analizado en diversas situaciones y se comparó su comportamiento con el de la cepa silvestre DZF1, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, en ausencia y presencia de sulfato de cobre a diferentes concentraciones.

##### 4.5.3.3.1. Crecimiento Vegetativo

Para determinar el efecto de la delección de *corE* en *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo se llevó a cabo una curva de crecimiento, en la que tanto la cepa JM51EIF como la cepa silvestre fueron crecidas en medio CTT líquido con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Como se muestra en la Fig. 4.40A, la delección de

este gen hace que la cepa mutante sea mucho más sensible frente al cobre, inhibiéndose su crecimiento cuando las concentraciones de sulfato de cobre utilizadas alcanzan los 0,6 mM, mientras que la cepa silvestre es capaz de tolerar concentraciones de hasta 0,8-0,9 mM. Para comprobar que el efecto de este aumento en la sensibilidad al cobre de la cepa mutante no era una mera respuesta al estrés oxidativo que puede generar el metal, se realizó una curva de crecimiento con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (Fig. 4.40B). La tolerancia presentada a este estrés fue similar a la mostrada por la cepa silvestre.

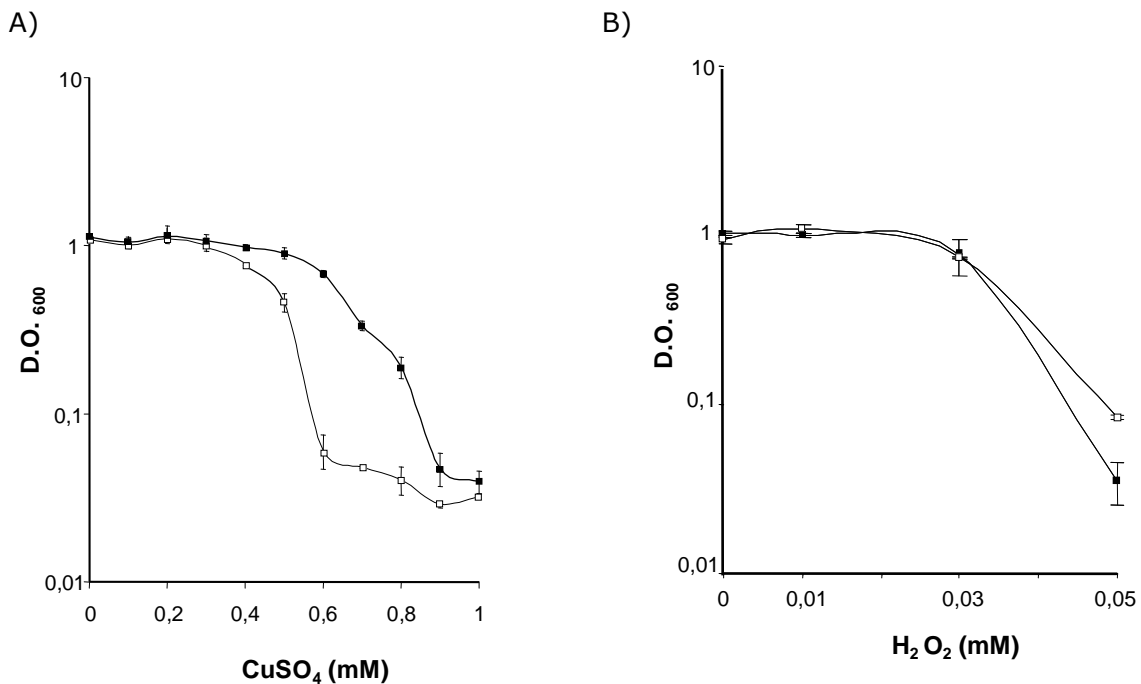


Figura 4.40. Curvas de crecimiento en dos cepas de *M. xanthus*. A) Efecto del cobre. B) Efecto del peróxido de hidrógeno. La cepa silvestre DZF1 está representada por cuadrados negros (■) mientras que el mutante de delección para *corE* JM51EIF está representado por cuadrados blancos (□). Estas células se cultivaron en ausencia de cobre y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y fueron diluidas a una densidad óptica de 0,05 medida a 600nm, en medio de cultivo fresco al que se habían adicionado previamente las concentraciones de sulfato de cobre o peróxido de hidrógeno indicadas en cada caso. DO<sub>600</sub> determinada tras 24 h de incubación. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

#### 4.5.3.3.2. Ciclo de Desarrollo

El análisis de la stirpe  $\Delta corE$  durante el ciclo de desarrollo en ausencia de cobre adicionado al medio de cultivo CF mostró un retraso en la formación de cuerpos fructificantes, recuperándose parcialmente tras 72 h de incubación y completamente tras 96 h (Fig. 4.41), comparado con la cepa silvestre.

En presencia de cobre, el mutante de delección para *corE* fue mucho más sensible que la cepa silvestre, igual que se observó durante el crecimiento vegetativo, no tolerando concentraciones superiores a 0,04 mM de CuSO<sub>4</sub> (Fig. 4.41).

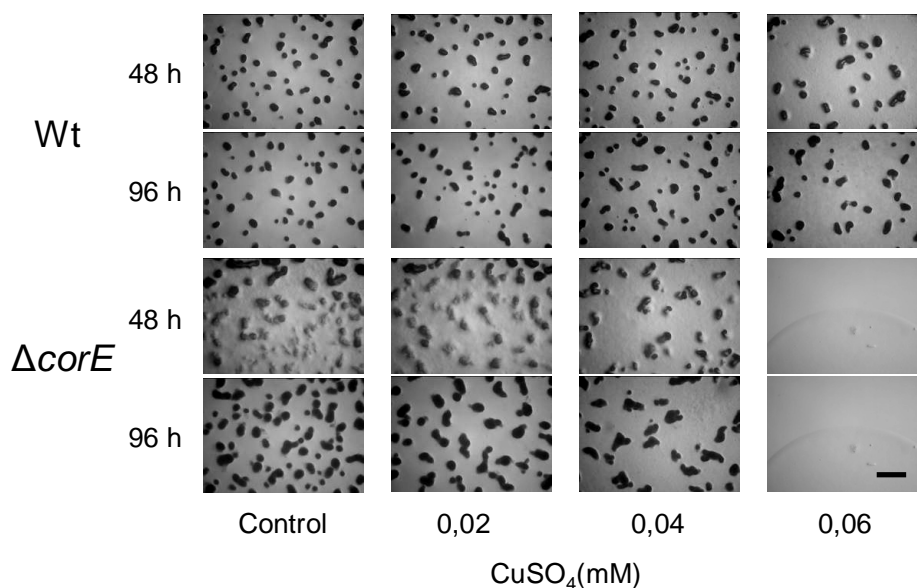


Figura 4.41. Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes. Las células incubadas durante 24 h en ausencia de cobre se concentraron a  $DO_{600}$  de 15, y gotas de 10  $\mu\text{L}$  de este cultivo concentrado se incubaron en medio CF por 96 h a 30°C con las concentraciones de sulfato de cobre (mM) indicadas en cada caso. Barra: 1 mm.

#### 4.5.4 GENES REGULADOS POR CorE

La construcción de diversas fusiones transcripcionales entre genes relacionados con la respuesta al cobre en *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli* permitió identificar genes completamente regulados por CorE. Los genes utilizados para tal propósito fueron los correspondientes a tres sistemas Cus (*Cu-sensing*), complejos multiproteicos que atraviesan ambas membranas y el espacio periplásmico y que se encargan de expulsar metales (mayoritariamente cobre aunque también hay sistemas capaces de responder frente a otros metales) desde el citoplasma o el periplasma; tres sistemas de tipo Czc (*Co-Zn-Cd*), también implicados en el transporte de metales hacia el exterior de la célula; tres ATPasas de tipo  $P_{IB}$ , relacionadas con la homeostasis del cobre; tres MCOs, implicadas en la oxidación de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  en el periplasma y el propio gen *corE*. Todos los plásmidos utilizados para analizar estas fusiones en el mutante de delección para *corE* fueron construidos por A.L. Extremera, a excepción de los plásmidos para las fusiones transcripcionales de *cuoA* (A. Moraleda), y *cuoB*, *cuoC* y *corE* (realizadas como parte de esta Tesis Doctoral). Las fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli* en la cepa WT de los diferentes elementos estructurales se han llevado a cabo en nuestro laboratorio como parte de una investigación paralela. En la Tabla 4.3 se muestra un resumen donde se recoge el comportamiento de los genes analizados y la regulación que CorE pueda ejercer sobre ellos. A continuación se tratarán con más detalles los resultados de la regulación de aquellos genes cuya expresión está completamente controlada por CorE, así como su propia regulación transcripcional.

Tabla 4.3. Regulación génica por CorE

GEN	INDUCCIÓN POR COBRE	REGULACIÓN POR CorE
<i>cus1</i>	Sólo en vegetativo	No
<i>cus2</i>	Sí	No
<i>cus3</i>	Sí	No
<i>czc1</i>	No	No
<i>czc2</i>	Sí	No
<i>czc3</i>	No	No
<i>copA</i>	Sí	Parcial (completa con CorSR1)
<i>copB</i>	Sí	Total
<i>copC</i>	No	No
<i>cuoA</i>	Sí	No
<i>cuoB</i>	Sí	Total
<i>cuoC</i>	Sí	No
<i>corE</i>	Sí	Parcial

Como se expuso anteriormente, la MCO CuoB está completamente regulada por CorE, al menos mediante el análisis cualitativo de expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 4.33). La cuantificación de esta actividad en la cepa portadora de una fusión para *cuoB* y una delección para *corE*, comparada con la cuantificación de esta actividad en una cepa silvestre portadora de la misma fusión confirmó este resultado (Fig. 4.42A). El análisis de otra fusión transcripcional para uno de los genes de la CR1, *copB*, (cuya fusión en la cepa silvestre fue analizada por A. Moraleda-Muñoz en nuestro laboratorio), mostró que esta ATPasa también se encuentra completamente regulada por CorE, ya que los niveles de expresión  $\beta$ -galactosidasa en presencia de cobre se vuelven indetectables cuando se analizan en una cepa portadora de la fusión *copB-lacZ* y una delección para *corE* (Fig. 4.42B).

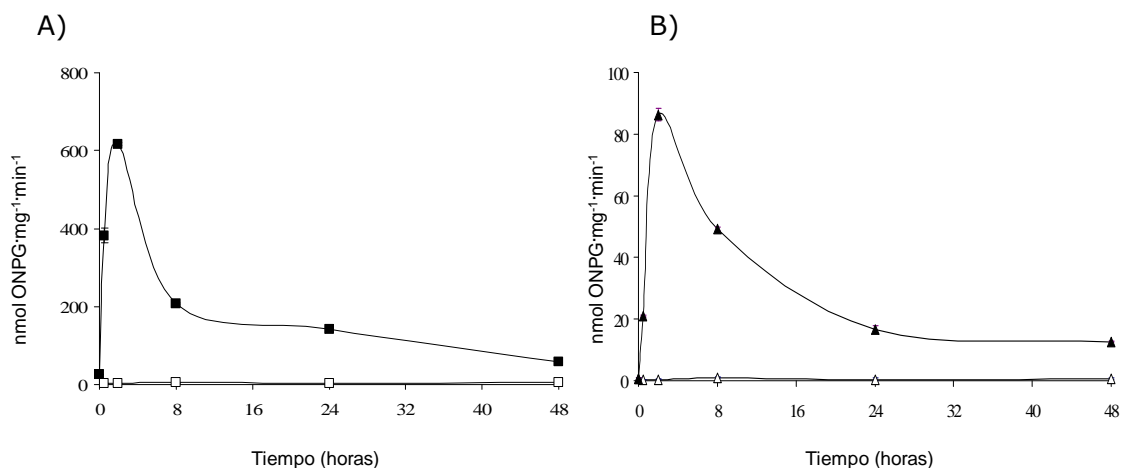


Figura 4.42. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de dos genes completamente regulados por CorE. A) Fusión *cuoB-lacZ* en la cepa silvestre (■) y en el mutante de delección para *corE* (□). B) Fusión *copB-lacZ* en la cepa silvestre (▲) y en el mutante de delección para *corE* (Δ). En ambos casos las células fueron cultivadas a 30°C y recogidas a diferentes tiempos para realizar las medidas de actividad. El medio de cultivo empleado fue CTT suplementado con 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub>. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

4.5.5 ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *corE*

Cabe destacar la regulación parcial que ejerce CorE sobre su propia expresión. Como se muestra en la Fig. 4.43A, durante el crecimiento vegetativo y en ausencia de metal, los niveles de expresión son los mismos para la fusión *corE-lacZ* tanto en la cepa silvestre como en el mutante de delección para *corE*. Sin embargo, cuando se adiciona sulfato de cobre a este medio de cultivo los niveles de expresión de esta fusión transcripcional se ven reducidos entre 19 y 7 veces tras 2 y 8 h de incubación respectivamente en el mutante de delección con relación a la cepa silvestre (Fig. 4.43B). En el caso del ciclo de desarrollo se observó el mismo comportamiento, reduciéndose los niveles de actividad cuando se aplicó una concentración de sulfato de cobre de 0,04 mM de 3-4 veces entre las 2 y 24 h de incubación (datos no mostrados).

Esto indica que CorE ejerce una regulación sobre su propia expresión dependiente de cobre, pero que debe existir otro/s regulador/es que controlen por completo su expresión, tanto en ausencia del metal como en presencia de éste a largo plazo.

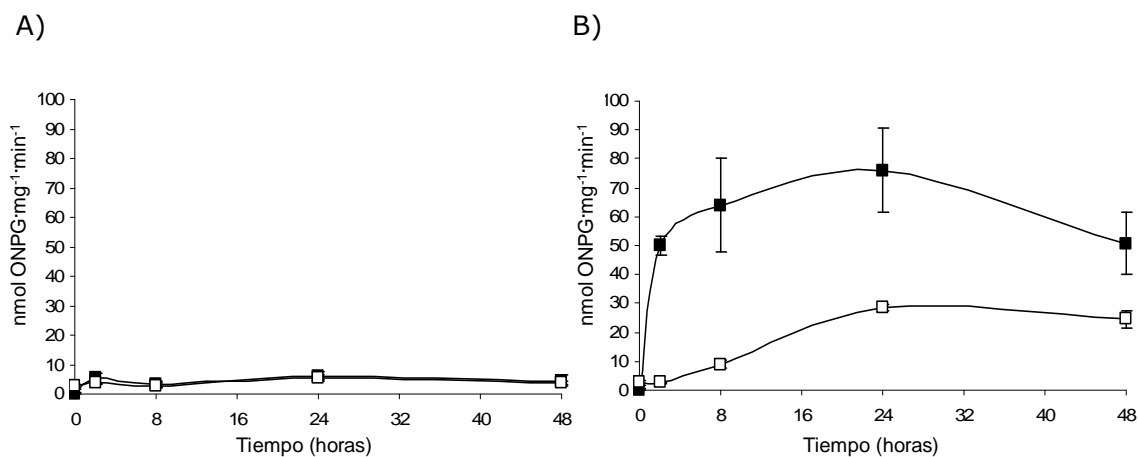


Figura 4.43. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *corE-lacZ* en la cepa silvestre (■) y en el mutante de delección para *corE* (□). Las células fueron cultivadas a 30°C y recogidas a diferentes tiempos para realizar las medidas de actividad. El medio de cultivo empleado fue CTT A) sin adicionar metal o B) suplementado con 0,6 mM de CuSO<sub>4</sub>. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos independientes por triplicado.

Ya que CorE no regula completamente su expresión, se intentó determinar qué otro/s posible/s regulador/es estaban implicados en la regulación transcripcional de *corE*. Para abordar este estudio se introdujo el plásmido portador de la fusión *corE-lacZ* en diversos mutantes de delección obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, a excepción del mutante para el sistema de dos componentes CorSR1:

GEN	PRODUCTO GÉNICO	CEPA
MXAN_3419-3418	Sistema de dos componentes CorSR1	JM51DIF
MXAN_3426-3419-3418	CorE y CorSR1	JM51EDIF
MXAN_3429	Regulador transcripcional de tipo AraC	JM51AraCIF
MXAN_5263	Factor sigma de tipo ECF	JM51E2IF

Como se observa en la Fig. 4.44, en ningún caso se producía pérdida completa de actividad  $\beta$ -galactosidasa, así que ninguno de estos reguladores es el responsable directo de la transcripción de *corE* que persiste tras deleccionar su propio gen.

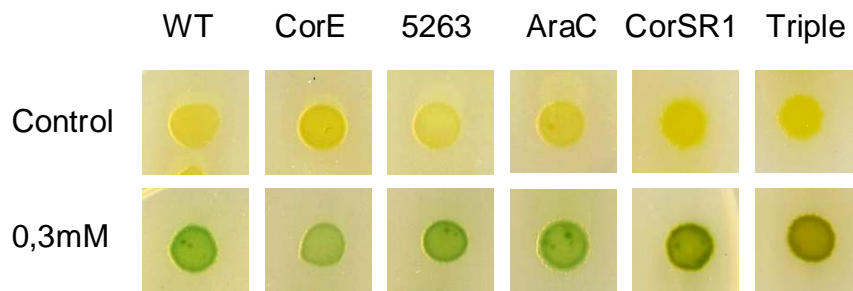


Figura 4.44. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *corE-lacZ* en diversas cepas. Las células fueron crecidas durante 24 h en medio líquido, concentradas a  $DO_{600}$  de 15 y crecidas en medio CTT con X-Gal, suplementado con sulfato de cobre a la concentración indicada o sin adicionar metal (control). WT: cepa silvestre; CorE: mutante de delección para *corE*; 5263: mutante de delección para MXAN\_5263; AraC: mutante de delección para MXAN\_3429; CorSR1: mutante de delección para el sistema de dos componentes *corSR1*; Triple: mutante triple de delección para el sistema *corSR1* y *corE*.

#### 4.5.6 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE CorE

Para intentar dilucidar el mecanismo de acción de CorE se abordaron diferentes cuestiones mediante el uso de diversas técnicas, como la sobreexpresión *in vivo* de CorE para determinar si funciona con un factor antisigma como la mayoría de ECFs; el análisis del retardo en la movilidad electroforética de complejos ADN-proteína (EMSA) presentado por CorE en diferentes condiciones para estudiar su capacidad de unión al ADN *in vitro*; el seguimiento de CorE mediante Western blot para determinar su estabilidad *in vivo*; el estudio de la expresión de un gen regulado por CorE en diferentes condiciones para determinar su capacidad de respuesta frente a diversos choques por cobre o diferentes estados de oxidación del mismo; y finalmente, delección de un dominio rico en cisteínas que presenta CorE en su extremo C-terminal y mutaciones puntuales de esas cisteínas para estudiar el papel que esa región puede estar desempeñando en la actividad de CorE.

##### 4.5.6.1. SOBREENPRESIÓN *In Vivo* DE CorE

Como se ha expuesto en el inicio de esta memoria (Introducción), los factores sigma de tipo ECF tienen un mecanismo de acción particular. Suelen actuar conjuntamente con un factor antisigma que los mantiene secuestrados, impidiendo que puedan formar el complejo holoenzima de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de genes. Cuando el factor antisigma detecta un estímulo adecuado mediante su dominio sensor situado fuera del citoplasma, se produce la disociación sigma-antisigma y se libera el primero, dándose la transcripción de genes en respuesta al estímulo detectado.

Sigma y antisigma suelen formar parte del mismo operón, siendo cotranscritos en el mismo ARNm. Como se determinó previamente (página 114), *corE* se encuentra formando parte de un operón en el que se cotranscribe con *cuoB* y MXAN\_3424. Ninguno de los productos proteicos de estos genes presenta similitud con los factores antisigma previamente descritos. Por el contrario, mantienen dominios conservados que

definen estas proteínas como pertenecientes a otras familias (MCO y OEP), como ya se expuso en apartados anteriores.

El análisis de la CR1 tampoco reveló la presencia de ninguna proteína candidata a ser un factor antisigma. Pero se podía abordar el estudio de la presencia de alguna proteína de este tipo asociada a CorE codificada por el genoma de *M. xanthus* de la siguiente manera: sigma y antisigma deben ser codificados en proporciones 1:1. El efecto de muchos de estos factores ECFs se ha podido determinar mediante diversas estrategias, entre ellas la de delecionar el gen para el factor antisigma, permitiendo que el factor ECF asociado esté siempre libre y pueda ejercer su función aunque no esté presente el estímulo que habitualmente desencadena su respuesta. En nuestro caso, decidimos sobreexpresar CorE en *M. xanthus*, consiguiendo alterar esa proporción de modo que pudiese quedar CorE libre, no asociado a un posible antisigma. De ser así, en ausencia de cobre en el medio de cultivo los genes regulados por CorE debían expresarse, pues no sería necesario que el factor antisigma detectara el estímulo para liberar CorE.

Para conseguir nuestro objetivo, el gen *corE* fue insertado en el genoma de *M. xanthus* bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo, como es el del gen *oar* (Martinez-Cañamero *et al.*, 1993), y cuya fusión *oar-lacZ* en *M. xanthus* puede observarse en la Fig. 4.45A. Así, CorE estaría siendo expresado a altos niveles de una forma independiente de cobre. Para llevar a cabo esta construcción se utilizó una estrategia similar a la empleada en el caso del seguimiento de la estabilidad de CorE. Un fragmento de 605 pb fue amplificado mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos pKY481Bam/*oar*Kpn, digerido con las enzimas de restricción adecuadas y clonado en fase con el gen *corE* amplificado por PCR con la pareja de oligonucleótidos CorEpUC10.1F/CorEpUC10.1R, portando extremos BamHI-HindIII. El vector resultante resistente a tetraciclina, denominado pNG06, fue introducido en una cepa portadora de una fusión *cuoB-lacZ* con una delección de *corE* (JM51EBZY), cuyo esquema se representa en la Fig. 4.45B. Por tanto, el único lugar de recombinación correcto se encuentra entre las regiones homólogas que preceden al gen *oar*. Como los plásmidos finalmente integrados en esta cepa (pKY481-CuoB y pNG06) son derivados de pBR322, pueden compartir regiones homólogas y originarse algún evento de recombinación entre ellos.

El análisis mediante Southern blot de las colonias resultantes resistentes a kanamicina y tetraciclina permitió identificar aquellas que habían incorporado la construcción en la región del genoma correcta (Fig. 4.46) y seleccionar una, que se denominó JM06BZY (*oar-corE'* *cuoB-lacZ*).

Como control, se realizó una construcción similar (Fig. 4.47A), donde el gen *corE* fue clonado en el mismo vector derivado de pUC19, portador de un gen de resistencia a tetraciclina. Un fragmento de 1,5 kb fue amplificado mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos LcsBECFK/CorEDownstreamBamR. Este fragmento engloba una región de 825 pb anteriores a *corE* hasta 34 pb tras el codón de terminación para *corE*. El plásmido resultante denominado pNG00 fue introducido en una cepa con el mismo genotipo que en el caso de la inserción de pNG06 ( $\Delta$ *corE cuoB-lacZ*), y la cepa resultante, analizada mediante Southern blot.

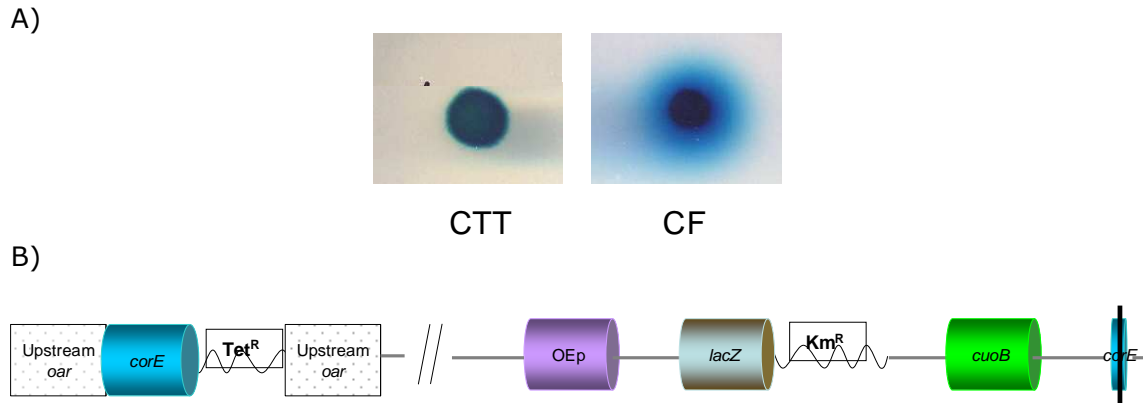


Figura 4.45. Fusión *oar*. A) Actividad cualitativa  $\beta$ -galactosidasa de una cepa de *M. xanthus* portadora de la fusión transcripcional *oar-lacZ*. Las células fueron concentradas a  $DO_{600}$  de 15 e incubadas durante 8 h en medio CTT y CF. B) Representación esquemática de la construcción portada por la cepa JM06BZY. Los genes están representados por barriles de diversos colores, mostrando en su interior el nombre de cada gen. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real de los genes. La delección de *corE* está representada por un segmento azul con una línea negra vertical. OE<sub>p</sub>: MXAN\_3424; *lacZ*: gen *lacZ* de *E. coli*. Km<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por los diferentes plásmidos. Upstream *oar*: región del genoma anterior al gen *oar*. Las líneas oblicuas indican discontinuidad en el genoma.

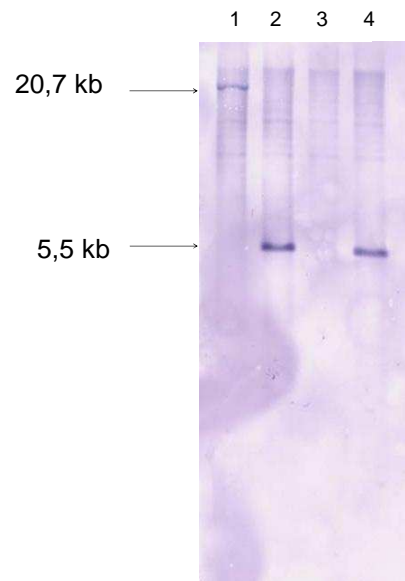


Figura 4.46. Southern blot para la identificación de la cepa JM06BZY (*oar-corE'* *cuoB-lacZ*). CONTROLES: Calle 1: ADN cromosómico de la cepa silvestre DZF1. Calle 3: ADN cromosómico de la cepa JM51EBZY ( $\Delta$ *corE* *cuoB-lacZ*). POSIBLES POSITIVOS: Calles 2 y 4: ADN cromosómico de dos cepas resistentes a kanamicina y tetraciclina obtenidas tras electroporar el plásmido pNG06 a la cepa JM51EBZY. Todos los cromosomas fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI y el filtro al que fueron transferidos fue hibridado con una sonda marcada a partir de un fragmento de ADN amplificado por PCR que contiene la secuencia génica de *corE*. Por este motivo no se observa ninguna banda en la calle 3. Los tamaños de las bandas observadas se indican en la figura (kb).



#### 4. RESULTADOS

También se pudo comprobar por PCR, ya que la amplificación de una región que contenga el gen *corE* insertado en su lugar de origen debía generar una banda mayor en aquellas cepas que hubiesen integrado el plásmido en el lugar correcto (puesto que se habría reinsertado el gen *corE*), mientras que de haberse producido la recombinación en otra región del genoma o entre los dos plásmidos que acabarían integrados en la cepa (pKY481-CuoB y pNG00), esta banda debe ser 636 pb menor (tamaño de *corE*). Una cepa confirmada por Southern blot fue analizada por PCR (Fig. 4.47B) mediante amplificación con la pareja de oligonucleótidos LcsBKpn/CorEDownstreamBamR, y tomándose como correcta se utilizó en el siguiente experimento, denominándose JM00BZY (*corE'* *cuoB-lacZ*).

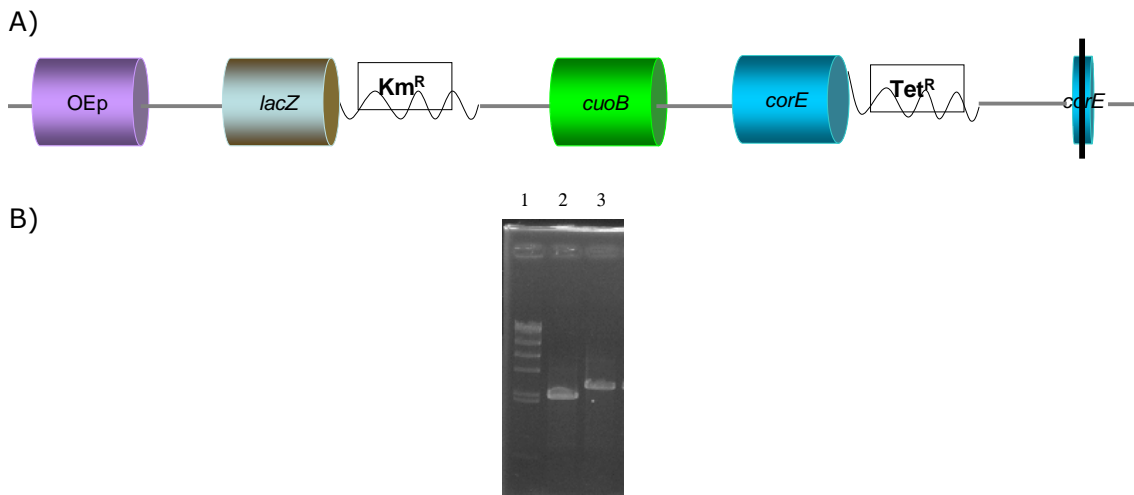


Figura 4.47. Construcción de JM00BZY. A) Representación esquemática de la construcción portada por la cepa JM00BZY. Los genes están representados por barriles de diversos colores, mostrando en su interior el nombre de cada gen. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real de los genes. La delección de *corE* está representada por un segmento azul con una línea negra vertical. OE<sub>p</sub>: MXAN\_3424; *lacZ*: gen *lacZ* de *E. coli*. Km<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por los diferentes plásmidos. B) PCR de una cepa portadora de la construcción anterior previamente analizada por Southern blot. Calle 1: marcador de peso molecular ( $\lambda$  HindIII); calle 2: PCR utilizando como molde ADN de la cepa JM51EBZY como control; calle 3: PCR utilizando como molde ADN de una posible cepa JM00BZY. El incremento de tamaño confirma la integración del gen *corE* en su lugar de origen en el cromosoma.

Los resultados del estudio cualitativo (Fig. 4.48A) y cuantitativo (Fig. 4.48B) comparado de las dos cepas anteriores (JM00BZY y JM06BZY) mostraron perfiles similares, tanto en ausencia como en presencia de 0,3 mM CuSO<sub>4</sub> en los medios de cultivo. Por tanto la sobreexpresión de CorE no permitió la inducción de *cuoB* en ausencia de cobre, lo que significa que CorE no actúa con un antisigma.

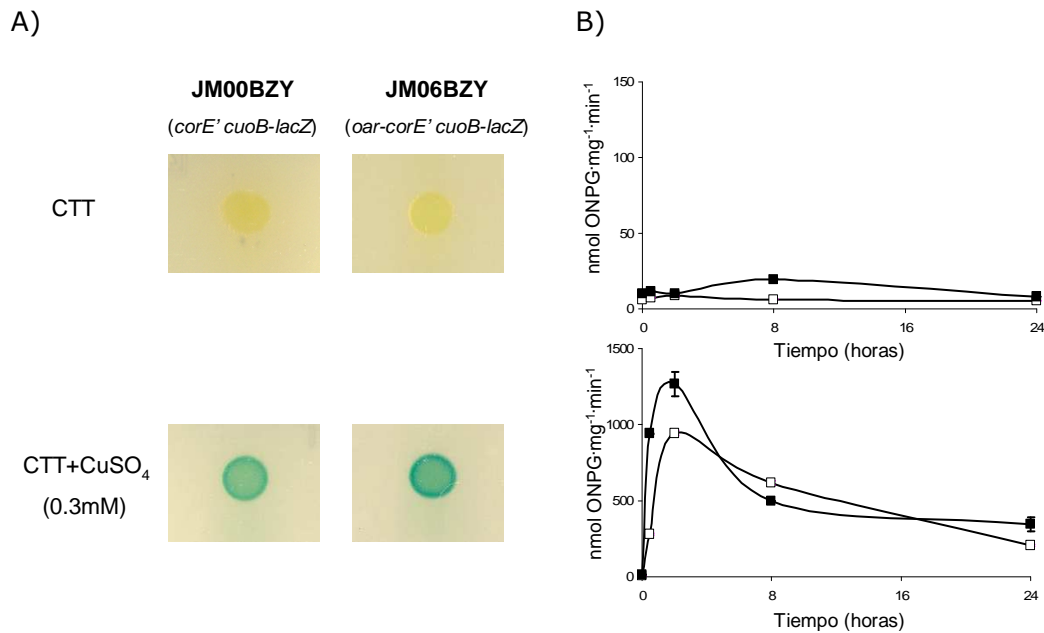


Figura 4.48. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas JM00BZY y JM06BZY. A) Determinación cualitativa de actividad  $\beta$ -galactosidasa para ambas cepas incubadas en los medios de cultivo indicados en la figura (suplementados con X-Gal para observar desarrollo de color). Las células fueron incubadas durante 24 h a 30°C. B) Cuantificación de actividad  $\beta$ -galactosidasa para ambas cepas. La gráfica superior corresponde a la actividad determinada en extractos celulares previamente incubados en medio CTT sin adicionar metal, mientras que las células recogidas para medir la actividad que se representa en la gráfica inferior fueron cultivadas en medio CTT al que se había adicionado cobre (0,3 mM CuSO<sub>4</sub>). JM00BZY (■); JM06BZY (□). Nótese la diferencia de escala para cada gráfica.

Para corroborar que CorE estaba siendo sobreexpresada se llevo a cabo la detección de CorE con una cola de polihistidina en el extremo N-terminal, controlada por el promotor de *oar*.

Esta construcción se consiguió digiriendo el plásmido pNG05 con las enzimas de restricción KpnI-BamHI, tras lo que se obtenían dos fragmentos de distinto tamaño. Se purificó el fragmento mayor (vector con resistencia a Tet y *hcorE*) del menor (CorE1), y se ligó el primero con el fragmento de 605 pb amplificado mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos pKY481Bam/*oar*Kpn digerido con las mismas enzimas de restricción, utilizado para construir pNG06. De este modo se obtuvo el plásmido pNG08, donde una región anterior a *oar* se encuentra clonada en fase con el gen *corE* portando una cola de histidina en su extremo N-terminal (equivalente a la construcción pNG05). Este plásmido pNG08 fue electroporado en la cepa JM51EBZY ( $\Delta$ *corE cuoB-lacZ*), y las colonias resultantes resistentes a kanamicina y tetraciclina fueron analizadas por Southern blot (datos no mostrados). Se eligió una que portaba la construcción correcta y se denominó JM08BZY (*oar-hcorE'* *cuoB-lacZ*).

Como se puede observar en la Fig. 4.49, la cantidad de proteína CorE expresada en la cepa JM08BZY era mucho mayor que en la cepa JM05BZY, tanto en ausencia como en presencia de sulfato de cobre adicionado al medio de cultivo. La actividad de estas proteínas fue analizada mediante la medida de  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose el mismo perfil y valores que cuando se analizaron las cepas equivalentes donde CorE no porta cola de histidina (JM00BZY y JM06BZY; Fig. 4.48).

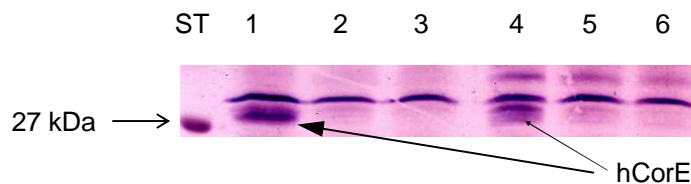


Figura 4.49. Western blot para la detección de hCorE. Las cepas JM08BZY (*oar-hcorE'* *cuoB-lacZ*; calles 1 y 4), JM05BZY (*hcorE'* *cuoB-lacZ*; calles 2 y 5) y JM00BZY (*corE'* *cuoB-lacZ*; calles 3 y 6) fueron incubadas durante 24 h en medio CTT líquido (calles 1-3) y posteriormente los cultivos se concentraron a  $DO_{600}$  de 15 y se incubaron en medio CTT con 0,3 mM  $CuSO_4$  durante 2 h (calles 4-6). ST: marcador de peso molecular (27 kDa). Las bandas correspondientes a hCorE se indican con una flecha.

#### 4.5.6.2. UNIÓN DE CorE AL ADN

Se consideró primordial el estudio de la capacidad de unión de CorE al ADN, puesto que al ser un factor sigma de la ARN polimerasa, debería observarse la unión de esta proteína con la región promotora de alguno de los genes regulados por él. Para llevar a cabo este trabajo, en primer lugar se realizó la expresión heteróloga de la proteína con una cola de histidina en el extremo N-terminal utilizando *E. coli* como organismo productor. Se amplificó mediante PCR el gen CorE, utilizando la pareja de oligonucleótidos CorEcTopoR/CorEcTopoF (Tabla 3.2) y se introdujo en el vector pET200/D-TOPO<sup>®</sup> utilizando el paquete Champion<sup>™</sup> pET Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit proporcionado por Invitrogen, con lo que se obtuvo el plásmido de expresión pETTOPOCorE. La ausencia de mutaciones no deseadas se comprobó mediante secuenciación.

Para sobreexpresar la proteína se transformó la cepa BL21 Star<sup>™</sup> (DE3) de *E. coli*. Para comprobar que la proteína se expresaba en grandes cantidades, se llevó a cabo un ensayo en el que se indujo la síntesis de CorE, y el análisis mediante SDS-PAGE de las muestras anteriores permitió identificar la sobreexpresión de una proteína con un peso molecular algo mayor del esperado para CorE (aproximadamente 35 kDa en lugar de 26,7 kDa), posiblemente debido a distintos efectos que alteren la movilidad electroforética (Fig. 4.50A). La mayor parte de la proteína sobreexpresada se encontraba en la fracción soluble, la cual se tomó para purificar mediante cromatografía de afinidad en columnas cargadas con níquel, que presenta afinidad por secuencias de polihistidina (HisTrap<sup>™</sup>HP). Como se muestra en la Fig. 4.50B, la proteína obtenida (hCorE) presentaba una pureza mayor del 95%.

Para determinar si hCorE purificada presentaba la estructura típica de este tipo de proteínas, ricas en hélices alfa, o si su estructura había sufrido algún tipo de alteración durante el proceso de purificación, se llevó a cabo un análisis de dicroísmo circular (CD) en el centro ITQB de la Universidad Nova de Lisboa (bajo la supervisión de A.T. Fernandes), como se detalla en el apartado Material y Métodos. El espectro CD de hCorE en la región del ultravioleta lejano mostró una estructura secundaria rica en hélices- $\alpha$  (prácticamente el 100% de la proteína) con muy pocas o ninguna lámina- $\beta$  (Tabla 4.4; Fig. 4.51), como fue predicho mediante una estimación de la estructura secundaria basada en el algoritmo CONTINLL (Provencher, S.W. y Glockner, J., 1981), utilizando el servidor DichroWeb (Whitmore, L. y Wallace, B.A., 2004).

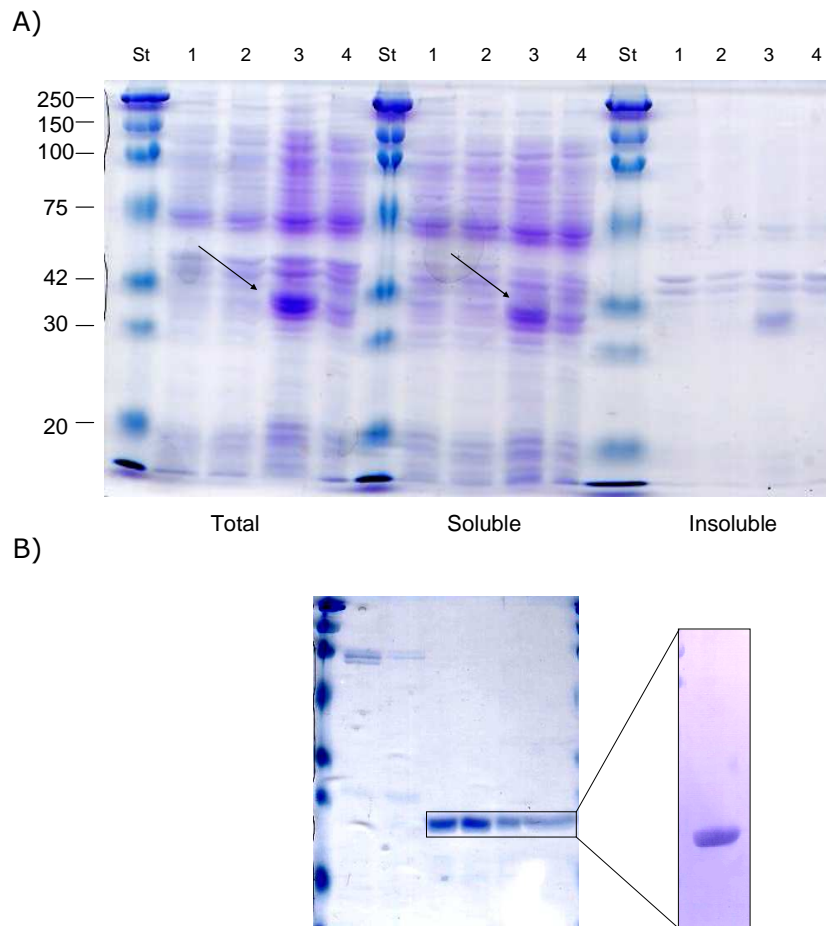


Figura 4.50. SDS-PAGE teñido con azul comassie, que muestra la sobreexpresión y purificación de hCorE. A) Los cultivos fueron incubados a 37°C hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0,8, donde se recogió una muestra de la que se obtuvo el extracto total y las diferentes fracciones (calles 1 y 2). En ese punto se llevó a cabo la inducción, adicionando IPTG 0,1 mM y manteniendo las células en cultivo durante 6 h más (calles 3). Un cultivo paralelo al inducido se mantuvo en incubación sin adicionar IPTG y fue recogido igualmente tras 6 h como control (calles 4). Esto cultivos fueron procesados para obtener el extracto total y las diferentes fracciones. Los números corresponden a pesos moleculares (kDa) del marcador utilizado (St). B) Purificación de la fracción soluble del ensayo anterior. Las fracciones recogidas de esta purificación que presentaban mayoritariamente proteína hCorE (recuadradas en el gel), eluidas con diferente concentración de imidazol, fueron reunidas y dializadas para eliminar el imidazol. El resultado se muestra a la derecha, en la imagen de una calle de un gel SDS-PAGE ampliada.

Tabla 4.4. Estimación de la estructura secundaria de hCorE a partir del espectro de dicromismo circular. El cálculo se realizó utilizando el algoritmo CONTINLL.

RESULTADO	HÉLICES- $\alpha$ (%)	LÁMINAS- $\beta$ (%)	GIROS(%)	DESORDENADA(%)	TOTAL (100%)
1	96,2	0	3,8	0	100
2	98,8	0,1	1,1	0	100

1: Resultado más similar de entre todas las estructuras de proteínas utilizadas en la comparación

2: Media de todas las proteínas con resultados concordantes de CD

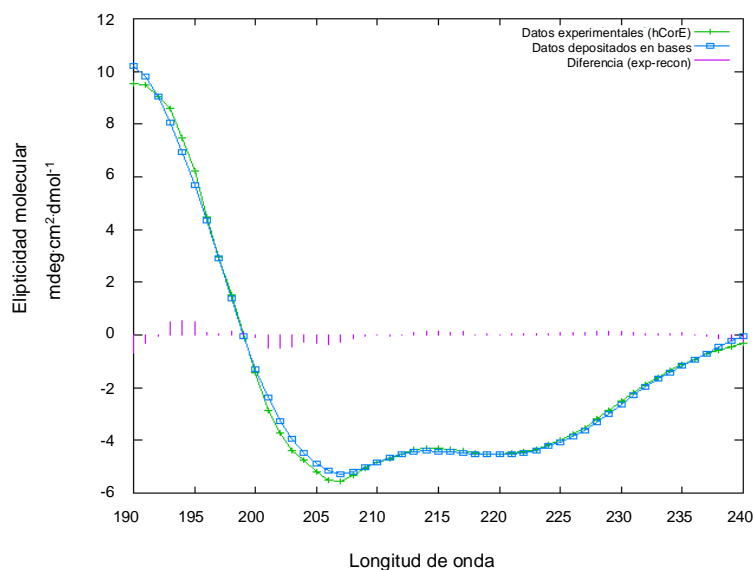


Figura 4.51. Dicroísmo circular para hCorE purificada en el ultravioleta lejano. Los datos del espectro fueron recogidos en una cubeta de cuarzo de 1 mm desde 190 a 240 nm utilizando hCorE (5  $\mu$ M) en tampón Tris-HCl pH 7,5. El resultado de las diferencias entre el espectro de hCorE (línea verde) y el espectro calculado por el algoritmo CONTINLL basado en espectros de proteínas con estructura secundaria conocida (línea azul) se muestra en la gráfica (líneas violetas).

Esta proteína fue posteriormente utilizada para la técnica EMSA como se describe en la sección Material y Métodos, con la cual se observa la radiación emitida por una sonda marcada con  $^{32}$ P mediante autorradiografía. Las diferencias en migración de la sonda se asumen como la unión de la proteína utilizada en el ensayo al ADN (en presencia de un exceso de ADN inespecífico que actúa como competidor, en este caso polidIdC). Como se observa en la Fig. 4.52, la presencia de cobre en la reacción de unión era imprescindible para observar retardo en la movilidad electroforética. Además de cobre, era necesaria la adición de un quelante específico para  $\text{Cu}^+$  como el BCS o batocuproina disulfonato sódico, lo que hace pensar que es el Cu en su estado de oxidación (II) el que promueve la unión de CorE al ADN.

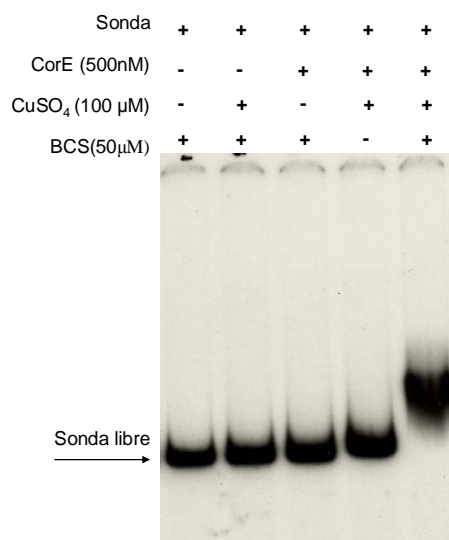


Figura 4.52. EMSA. hCorE se une a la region promotora de *copB* solo en presencia de cobre y BCS (última calle). Las muestras fueron incubadas con una sonda marcada radiactivamente como se describe en el apartado Material y Métodos.

## 4.5.6.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE CorE

Como se ha mostrado en resultados previos, los genes regulados completamente por CorE presentan un perfil de expresión muy similar, el cual alcanza un máximo tras 2 h del contacto de las bacterias con el cobre adicionado a los medios (Fig. 4.42). Posteriormente, los niveles de expresión descienden de manera drástica, hasta alcanzar (según la concentración de cobre aplicada) niveles muy próximos a los basales, y sin embargo la expresión de *corE* se mantiene en el tiempo (Fig. 4.43). Este efecto podría deberse bien a una degradación de CorE conforme aumenta el tiempo tras el contacto con el metal, o bien a algún tipo de inhibición de la proteína que impida que siga ejerciendo su función adecuadamente.

Para determinar si CorE sufría degradación en función del tiempo, se utilizó la siguiente estrategia (detallada en el apartado 3.2.7.6. de la sección Material y Métodos): el gen *corE* con una cola de polihistidina en su extremo N-terminal fue amplificado a partir del plásmido pETTOPOCorE con la pareja de oligonucleótidos CorEHisTagBamF/CorEHisTagPstR, clonado en fase con el producto de PCR CorE1 en un vector con resistencia a tetraciclina derivado de pUC19, e introducido en una cepa de *M. xanthus* portadora de una delección para *corE* (de manera que al introducir el nuevo plásmido la cepa resultante sólo portara una copia de nuestro gen, situada en su lugar de origen) y de una fusión *cuoB-lacZ* (que permitiera determinar la actividad de la nueva proteína introducida mediante el análisis de actividad  $\beta$ -galactosidasa). La cepa resultante (ver Fig. 4.53), fue comprobada mediante Southern blot y PCR, pero además la reintroducción de CorE hace la expresión de la fusión *cuoB-lacZ*, no detectable en ausencia de CorE, se restablezca (lo que permite identificar cepas que han restaurado el fenotipo). La cepa portadora de la construcción correcta se denominó JM05BZY, y fue crecida en medios de cultivo suplementados o no con sulfato de cobre, recogiendo y tratándose las células como se indica en el apartado Material y Métodos, para llevar a cabo el análisis mediante Western blot de CorE y la cuantificación densitométrica de las bandas.

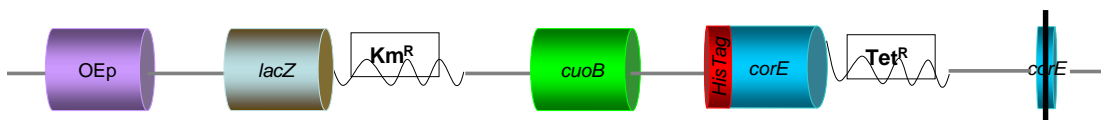


Figura 4.53. Representación esquemática de la construcción portada por la cepa JM05BZY. Los genes están representados por barriles de diversos colores, mostrando en su interior el nombre de cada gen. El tamaño del esquema no es proporcional al tamaño real de los genes. La delección de *corE* está representada por un segmento azul con una línea negra vertical. OE<sub>p</sub>: MXAN\_3424; *lacZ*: gen *lacZ* de *E. coli*. Km<sup>R</sup> y Tet<sup>R</sup> indican la resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente portada por diferentes plásmidos.

Como se muestra en la Fig. 4.54, no existe degradación de CorE conforme aumenta el tiempo de incubación de las células en presencia de sulfato de cobre. Este resultado, sumado al perfil de expresión de *corE* (Fig. 4.38) que presenta un incremento tras pocas horas de contacto con el metal y posteriormente un mantenimiento de la expresión, y a un análisis *in silico* (ExpASY: ProtParam. Gasteiger *et al.*, 2005) de la estabilidad de CorE que determina una vida media mayor a 10 h (en *E. coli in vivo*), indican que CorE no está sufriendo una degradación tal que haga descender los niveles de expresión de los genes regulados por este factor sigma del modo en que lo hacen.



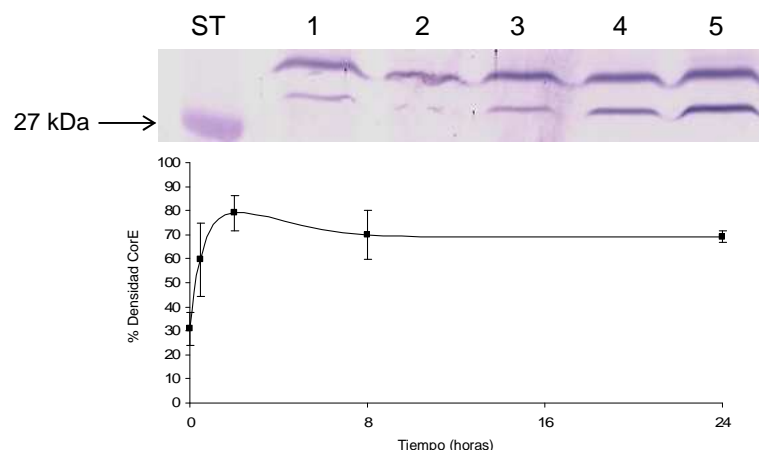


Figura 4.54. Western blot para la detección de hCorE. La proteína con la cola de histidina en el extremo N-terminal presenta un peso molecular de 27,8 kDa y un pI de 5,47. La banda superior de mayor intensidad corresponde con una proteína de *M. xanthus* reconocida por el anticuerpo utilizado en todas las muestras analizadas (expresen o no hCorE). La cepa JM05BZY fue incubada durante 24 h en medio CTT líquido (calle 1) y posteriormente los cultivos se concentraron a  $DO_{600}$  de 15 y se incubaron en medio CTT con 0,3 mM  $CuSO_4$  durante 30 minutos (calle 2), 2 h (calle 3), 8 h (calle 4) y 24 h (calle 5). ST: marcador de peso molecular (27 kDa). La gráfica representa el porcentaje de densidad de la banda correspondiente a CorE con respecto a la densidad de la banda superior, determinado por densitometría con el software Quantity One<sup>TM</sup>. Las barras de error representan la desviación estándar de medidas independientes, a partir de membranas obtenidas en dos experimentos diferentes.

Por otro lado, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *cuoB-lacZ* en esta cepa, y el resultado fue similar al obtenido cuando se realizó la cuantificación de la cepa WT portadora de la fusión *cuoB-lacZ* (Fig. 4.27), con un máximo de actividad a las 2 h y una respuesta dependiente de cobre, como se muestra en la Fig. 4.55. Con este experimento se demuestra igualmente que CorE con una cola de histidina en su extremo N-terminal es capaz de llevar a cabo su función correctamente *in vivo* y que no se degrada. Sin embargo, los genes que se encuentran bajo su control siguen disminuyendo sus niveles de expresión tras alcanzar el máximo a las 2h de contacto con el metal.

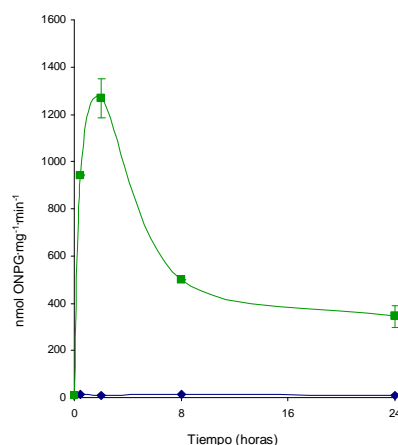


Figura 4.55 Actividad  $\beta$ -galactosidasa medida en extractos celulares de la cepa JM05BZY. Las células fueron concentradas a  $DO_{600}$  de 15 y cultivadas en medio CTT sólido a 30°C suplementado con 0,3 mM de sulfato de cobre (línea verde) o sin adicionar metal (línea azul). Se recogieron muestras a diferentes tiempos para determinar actividad  $\beta$ -galactosidasa en cada una de ellas. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres medidas independientes.

## 4.5.6.4. RESPUESTA DE CorE A SUCESIVOS CHOQUES POR COBRE

Teniendo en cuenta los resultados del apartado anterior, se decidió determinar si CorE sería capaz de proporcionar nuevamente una respuesta frente a continuos contactos de las células con cobre, y si esa respuesta sería del mismo tipo que la inicial (es decir, un rápido incremento en los niveles de expresión seguidos de una disminución de los mismos). Este experimento se llevó en paralelo con dos cepas, una portadora de una fusión *cuoB-lacZ*; otra de una fusión *corE-lacZ*. De este modo se podría comparar si la respuesta generada por CorE, mediante la inducción de un gen cuya expresión está regulada por él mismo, seguiría un patrón idéntico de expresión al del propio gen *corE* o no. Un esquema de los pasos llevados a cabo en este experimento se muestra en la Fig. 4.56.

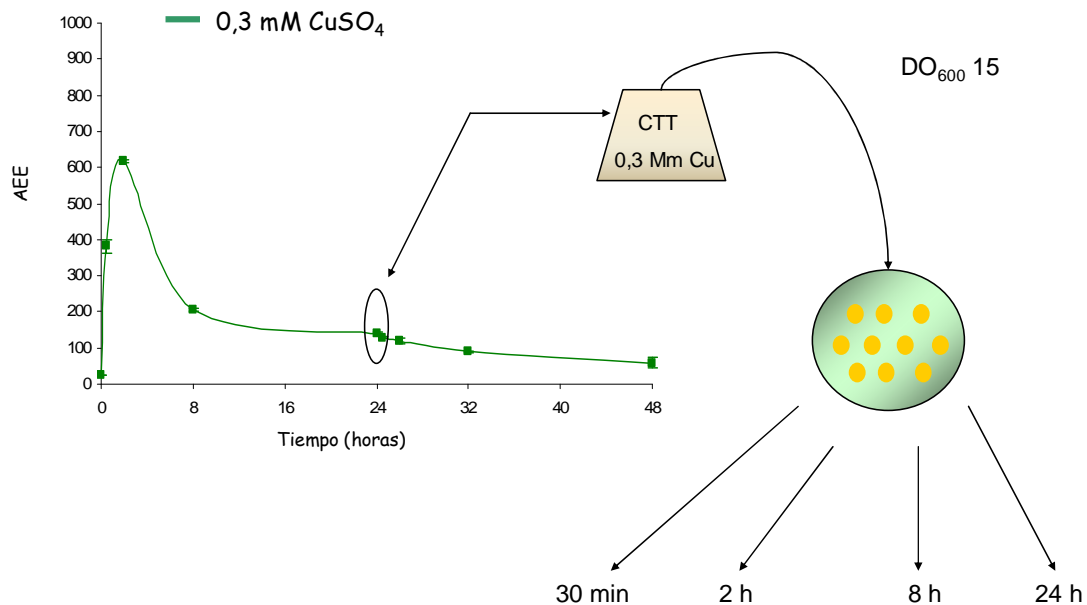


Figura 4.56. Esquema del diseño experimental utilizado en el estudio de la respuesta de CorE frente a diversos choques por cobre. Dos lotes de placas fueron incubados a 30°C, de los que se recogieron muestras a diferentes tiempos hasta alcanzar 48 h de incubación. Uno de ellos fue sometido a un único choque por cobre mientras que el otro fue sometido a dos.

Como se muestra en la Fig. 4.57A, la fusión *cuoB-lacZ* presentó un rápido incremento de actividad β-galactosidasa cuando las células fueron sometidas a un nuevo choque con sulfato de cobre. Esta respuesta fue muy similar a la generada frente a un primer contacto con el metal, aumentando los niveles de actividad 6 veces en ambas ocasiones. Sin embargo, el mismo experimento llevado a cabo con la fusión *corE-lacZ* (Fig. 4.57B) nunca proporcionó un incremento de actividad 2 veces superior. Esta capacidad de respuesta de la fusión *cuoB-lacZ* frente a sucesivos nuevos contactos con cobre, al menos hasta tres veces (se han realizado ensayos en los que se ha repetido el ciclo de sucesivos choques durante tres veces, y en cada uno de ellos la actividad β-galactosidasa cuantificada mostró perfiles similares de inducción. Datos no mostrados), y la diferencia en los niveles de inducción alcanzados con respecto a los presentados por el propio gen *corE* (mucho menores), indican que esta proteína es capaz de sensibilizarse frente a un primer contacto con el metal, incrementando eficazmente la transcripción de los genes que regula, y sufriendo posteriormente un proceso de



desensibilización que hace que la expresión de esos genes regulados por CorE descienda.

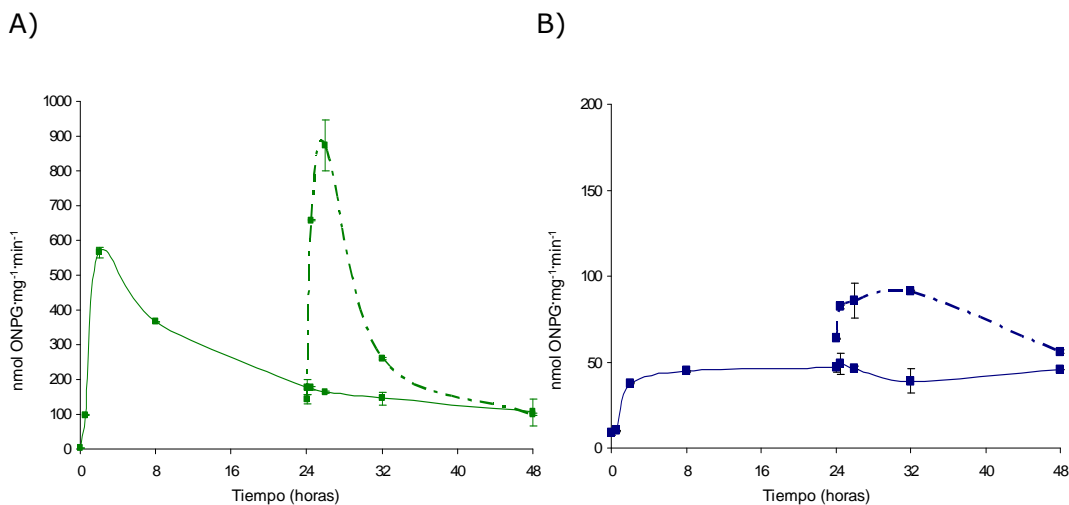


Figura 4.57. Actividad  $\beta$ -galactosidasa para las fusiones A) *cuoB-lacZ* y B) *corE-lacZ*. Las células fueron cultivadas durante 24 h en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 1, concentradas a  $DO_{600}$  de 15 y cultivadas en medio CTT sólido suplementado con 0,3 mM de sulfato de cobre. Se recogieron muestras a diferentes tiempos para determinar actividad  $\beta$ -galactosidasa (hasta 48 h de incubación; líneas continuas). Tras 24 h de incubación a 30°C, se tomaron células que se volvieron a concentrar a  $DO_{600}$  de 15 para ser sometidas a un nuevo choque con 0,3 mM de  $CuSO_4$ , siendo recogidas nuevamente a diferentes tiempos para determinar actividad  $\beta$ -galactosidasa (hasta 24 h de incubación; líneas discontinuas).

#### 4.5.6.5. RESPUESTA DE CorE. RELACIÓN CON EL ESTADO DE OXIDACIÓN DEL COBRE

Ya que CorE es una proteína estable, capaz promover una respuesta rápida tras el contacto con cobre (y posteriormente sufrir algún proceso de inactivación), y presenta una unión al ADN dependiente de  $Cu^{2+}$ , se planteó la siguiente hipótesis: CorE podría responder frente a  $Cu^{2+}$  en el citoplasma y ser inhibido cuando ese  $Cu^{2+}$  es reducido a  $Cu^+$ . El cobre se va a encontrar generalmente en el interior de las células unido a proteínas (Finney *et al.*, 2003; Rae *et al.*, 1999), pero ante un rápido incremento en la concentración intracelular de este metal debido a un choque con cobre es posible que la concentración de  $Cu^{2+}$  incremente momentáneamente, lo que estaría permitiendo que CorE fuese capaz de llevar a cabo su función, es decir, de activarse e iniciar la transcripción de los genes que se encuentran bajo su regulación para ejercer una rápida respuesta. Posteriormente, este  $Cu^{2+}$  puede ser reducido a  $Cu^+$  en el citoplasma, inactivándose CorE o reduciendo su capacidad de respuesta.

De ser esta hipótesis cierta, un agente quelante específico para  $Cu^+$  podría incrementar los niveles de transcripción para los genes regulados por CorE, mientras que un metal mimético de  $Cu^+$  como la plata, cuyo estado de oxidación es (I), reduciría su actividad. Igualmente se puede utilizar algún compuesto como ascorbato, que reduzca el  $Cu^{2+}$  presente en el medio, para que se incremente la proporción de su forma reducida con respecto a la oxidada.

Así, se planteó llevar a cabo el siguiente experimento: la cepa portadora de una fusión *cuoB-lacZ* fue incubada en medio CTT sólido. Se prepararon diferentes lotes de

placas a las que se había adicionado bien sólo cobre, cobre y BCS, cobre y plata, cobre y ascorbato, o solamente plata, BCS o ascorbato como control. La recogida de muestras y determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa se llevó a cabo como se ha descrito con anterioridad y se detalla en el apartado Material y Métodos.

Como muestra la Fig. 4.58, el perfil de expresión en todos los casos donde había cobre en el medio de cultivo fue el mismo (máximo alcanzado a las 2 h de incubación). Los niveles de actividad más altos se obtuvieron en presencia de BCS y cobre, incrementándose el máximo alcanzado 3 veces con respecto a la misma medida realizada en extractos de esta cepa incubados sólo con cobre. Por el contrario, el máximo de actividad a las 2 h de incubación se redujo en un 45% cuando había ascorbato en el medio de cultivo y en un 60% cuando se había adicionado plata además de sulfato de cobre. Este resultado se comprobó tanto cuantitativa (Fig. 4.58A) como cualitativamente (Fig. 4.58B).

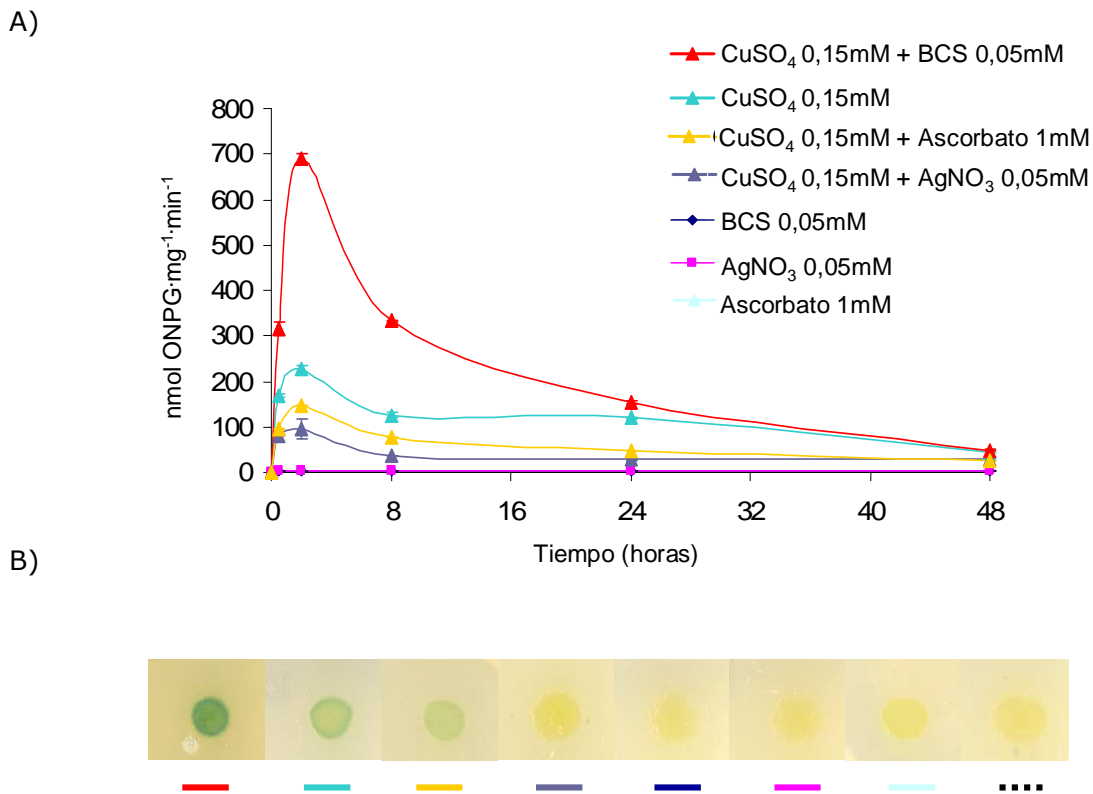


Figura 4.58. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51BZY (*cuoB-lacZ*). A) Cuantificación de la actividad a diferentes tiempos en extractos totales de *M. xanthus*. Las células fueron incubadas en medio CTT sólido suplementados con diferentes compuestos y/o metales (colores idénticos hacen referencia al compuesto indicado). B) Visualización cualitativa de la expresión de enzima  $\beta$ -galactosidasa tras 24 h de incubación a 30°C, mediante formación de color por actuación de la enzima sobre el compuesto X-Gal. Las líneas de colores hacen referencia a los mismos compuestos del panel superior adicionados a los medios. La línea discontinua hace referencia a medio CTT sin adicionar ningún compuesto.

Por tanto, estos resultados sumados a los de apartados anteriores, indican que es el cobre en su estado de oxidación (II) el que desencadena directamente la respuesta de CorE, y no un factor antisigma que medie en la ruta de esta proteína detectando el metal y liberándola posteriormente.

## 4.5.6.6. ANÁLISIS DE LA REGIÓN RICA EN CISTEÍNAS DE CorE

CorE presenta en su extremo C-terminal una región rica en residuos de cisteína que no está definida como motivo conservado en ninguna de las bases de datos consultadas (PFAM, ExPASy o TIGR), aunque mantiene cierta homología (E-valor = 0,67) con el dominio PF07975 (C1\_4), que se encuentra en la familia de proteínas a la que pertenece p44, una de las subunidades del factor de transcripción eucariota TFIIF.

Como se muestra en la Fig. 4.59A, la representación en forma de HMM-Logo del alineamiento para diversas proteínas que presentan este dominio permite diferenciar dos regiones en el mismo, una con dos cisteínas muy bien conservadas y otra con seis. Si comparamos la última porción de este dominio y el dominio rico en cisteínas de CorE, que se ha denominado CRD (del inglés *cysteine rich domain*), podemos observar cómo se mantienen 8 aminoácidos de un total de 26 (30%), conservándose invariablemente en la misma posición 5 cisteínas de las 6 que presenta CorE en la región CRD (Fig. 4.59B).

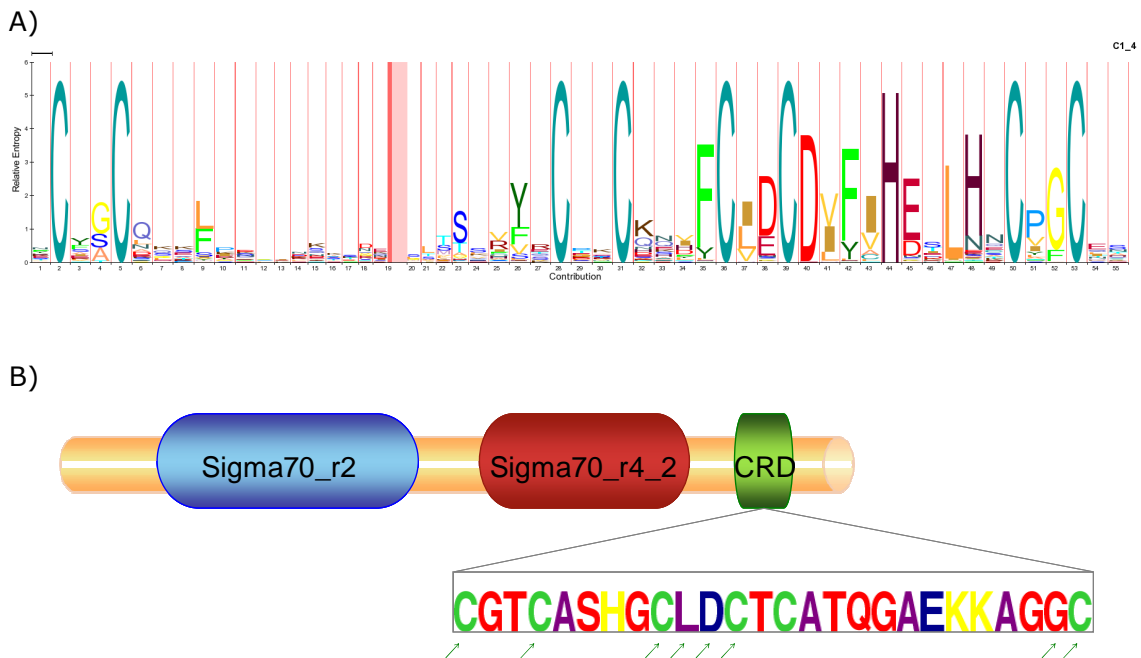


Figura 4.59. Secuencias ricas en cisteínas encontradas en proteínas relacionadas con la transcripción. A) Representación en forma de HMM Logo del PF07975 (C1\_4). B) Esquema de los dominios conservados en CorE y del dominio CRD. La secuencia completa de la proteína está representada por el cilindro naranja. Los diferentes dominios conservados indicados en la figura están representados a escala, de manera proporcional a los aminoácidos que los componen. La secuencia de aminoácidos corresponde al dominio CRD que presenta homología con PF07975. Las flechas indican los aminoácidos conservados.

## 4.5.6.7. MUTANTE DE DELECCIÓN EN FASE PARA CRD DE CorE

Ya que todo parece indicar que CorE va a detectar directamente la presencia de cobre, presenta una secuencia rica en cisteínas, y estos residuos pueden formar complejos de coordinación con metales, se decidió construir un mutante de delección en fase para la región CRD de CorE y determinar el efecto sobre los genes regulados por CorE de este mutante *in vivo*. Además, hay descritas secuencias CX<sub>7</sub>C, CX<sub>9</sub>C y CX<sub>10</sub>C

que son responsables de la unión de metales monovalentes y divalentes en reguladores de tipo MerR (Changuela *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo este experimento, se amplificó una región anterior y posterior al dominio CRD. Con la pareja de oligonucleótidos ECFmutW5f/ECFmutW5r se obtuvo el fragmento CorEcrd1, y con la pareja ECFmutW3f/ECFmutW3r el fragmento CorEcrd2, que fueron digeridos con las enzimas de restricción pertinentes y clonados en el vector pBJ113 con extremos compatibles. El proceso para obtener el mutante de delección carente de esta región CRD fue el mismo que se describe en el apartado Material y Métodos. Finalmente y tras comprobar varias colonias por Southern blot, se obtuvo el mutante de delección en fase deseado, denominado JM51WIF ( $\Delta corE_{CRD}$ ). Además, se comprobó mediante secuenciación utilizando como molde el genoma de esta cepa, a partir de un producto de PCR con la pareja de oligonucleótidos MXAN\_3426FSeq/MXAN\_3426RSeq. En la Fig. 4.60 se representa esquemáticamente la proteína que será finalmente codificada en este mutante de delección.

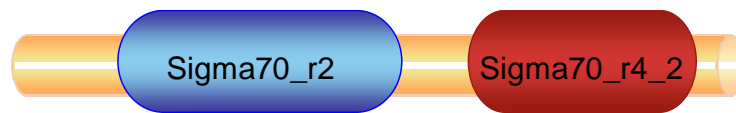
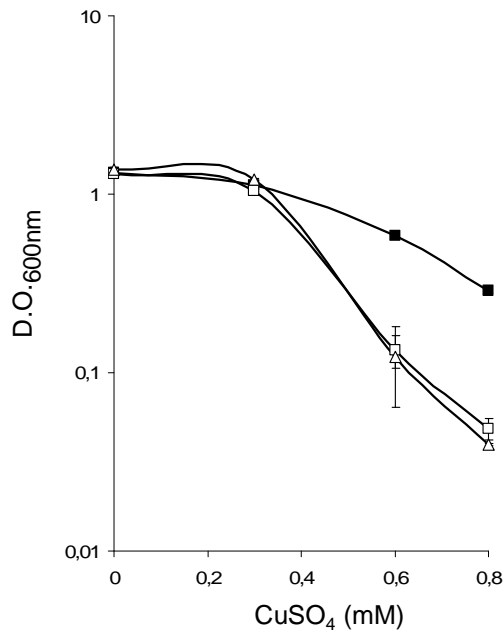


Figura 4.60. Representación esquemática de la proteína CorE mutante expresada en la cepa JM51WIF ( $\Delta corE_{CRD}$ ). Los dominios conservados que se indican en azul y rojo ocupan una parte proporcional de la proteína en el esquema a los residuos aminoacídicos que los componen.

Se determinó el fenotipo de este mutante tanto durante el crecimiento vegetativo (realizando curvas de crecimiento en medio líquido, Fig. 4.61A) como durante el ciclo de desarrollo, observando la formación de cuerpos fructificantes y la resistencia al cobre (Fig. 4.61B). En ambos experimentos, el comportamiento de este mutante de delección fue idéntico al del mutante de delección para *corE*.

Para determinar si la delección de esta región afectaba la expresión de los genes regulados por CorE, se construyeron dos fusiones *lacZ* en esta cepa, una para el gen *cuoB* y otra para el gen *copB*, electroporando los mismos plásmidos utilizados para construir las fusiones en la cepa silvestre. Las colonias positivas tras comprobación por Southern blot fueron analizadas en términos de actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto cualitativamente (Fig. 4.62) como cuantitativamente (Fig. 4.63). Además, el gen *corE* con la región CRD deleccionada fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos LcsBECFK/CorEDownstreamSalR a partir de cromosoma de la cepa JM51WIF, y se construyó un plásmido similar a pNG00, que se denominó pNG03 (Apéndice, Tabla A.2). La inserción de este plásmido en la cepa JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*) no fue capaz de restaurar la expresión de la fusión *cuoB-lacZ*.

A)



B)

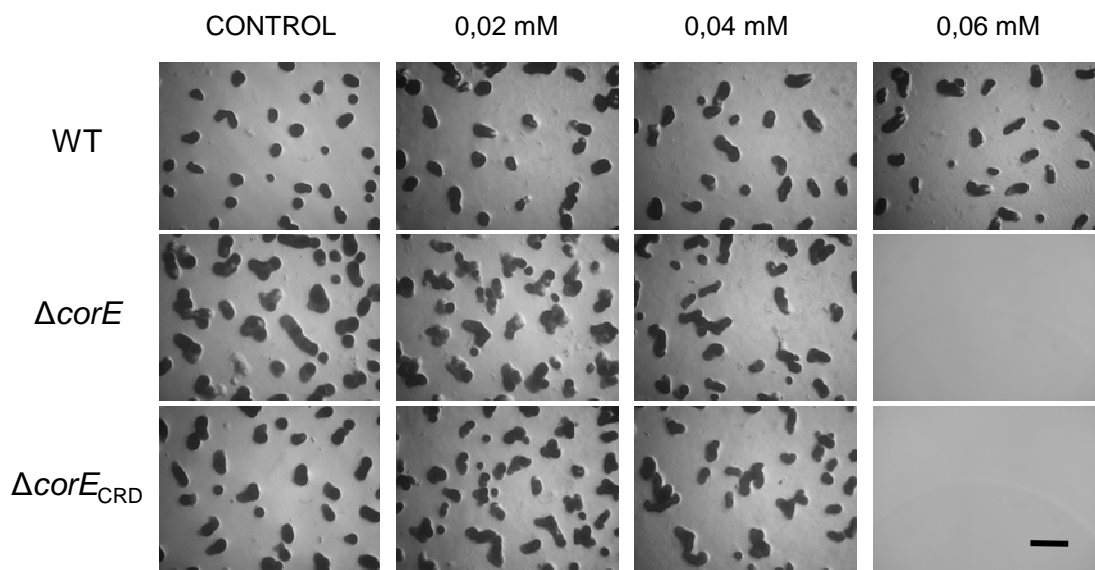


Figura 4.61. Fenotipo de la cepa JMWIF ( $\Delta corE_{CRD}$ ). A) Formación de cuerpos fructificantes en medio CF suplementado con diferentes concentraciones de  $CuSO_4$  (indicadas sobre cada fila. Control: sin adicionar metal). Las cepas DZF1 (WT), JM51EIF ( $\Delta corE$ ) y JM51WIF ( $\Delta corE_{CRD}$ ) fueron incubadas en estos medios de cultivo 96 h a 30°C tras ser concentradas a  $DO_{600}$  de 15. Barra: 1 mm. B) Curvas de crecimiento en medio líquido de las mismas cepas. La  $DO_{600}$  que se muestra fue tomada tras 24 h de incubación en los medios suplementados con las concentraciones de sulfato de cobre indicadas en cada caso.



## 4.5.6.8. MUTACIONES PUNTUALES EN EL DOMINIO CRD DE CorE

Para llevar a cabo estas mutaciones se siguió el protocolo proporcionado por Invitrogen (en su kit *QuickChangeII*<sup>®</sup> *site-directed mutagenesis*. Detalles en Material y Métodos). Las mutaciones se realizaron sobre el plásmido pNG00 utilizando los oligonucleótidos que para tal efecto fueron diseñados y se recogen en la Tabla 3.2. Una vez fueron confirmados por secuenciación de ADN los plásmidos portadores de las mutaciones deseadas, se electroporaron en la cepa JM51EBZY ( $\Delta corE$  *cuoB-lacZ*), y las colonias obtenidas resistentes a kanamicina y tetraciclina fueron comprobadas mediante Southern blot y PCR exactamente igual que se hizo con la cepa JM00BZY. Las cepas obtenidas fueron designadas como se muestra a continuación:

CEPA	GENOTIPO
SDM181BZY	<i>corE</i> <sup>C181A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>
SDM184BZY	<i>corE</i> <sup>C184A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>
SDM189BZY	<i>corE</i> <sup>C189A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>
SDM192BZY	<i>corE</i> <sup>C192A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>
SDM194BZY	<i>corE</i> <sup>C194A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>
SDM206BZY	<i>corE</i> <sup>C206A</sup> <i>cuoB-lacZ</i>

Los plásmidos y las mutaciones que porta cada uno se encuentran en la Tabla 3.2 (Material y Métodos), y una representación de la posición de cada una de las cisteínas mutadas en la región CRD se recoge en la Fig. 4.64A.

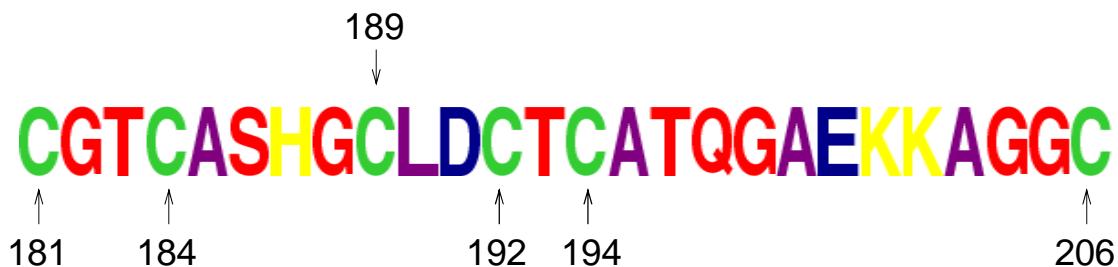


Figura 4.64. Esquema de las diferentes mutaciones puntuales realizadas en CorE. Los números de tres cifras indican la posición de cada una de las cisteínas en la proteína (mismos números que se identifican en el plásmido y la cepa que porta cada una de las mutaciones).

El control de CorE sobre la regulación de la transcripción de *cuoB* permitió seguir el efecto de cada una de estas mutaciones mediante la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *cuoB-lacZ*. Las determinaciones cualitativas (Fig. 4.65) y cuantitativas mostraron importantes diferencias en cuanto a la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas portadoras de proteínas CorE mutadas, con respecto a la determinación de  $\beta$ -galactosidasa en extractos celulares de una cepa que posee CorE en su conformación nativa (WT). Se observaron cuatro efectos principales:

- 1- Incremento de los niveles basales de expresión (en ausencia de cobre).
- 2- Pérdida de actividad  $\beta$ -galactosidasa prácticamente por completo.
- 3- Pérdida de una rápida sensibilización al cobre.
- 4- Pérdida de desensibilización pasado un tiempo tras el contacto con el metal.

## 4. RESULTADOS

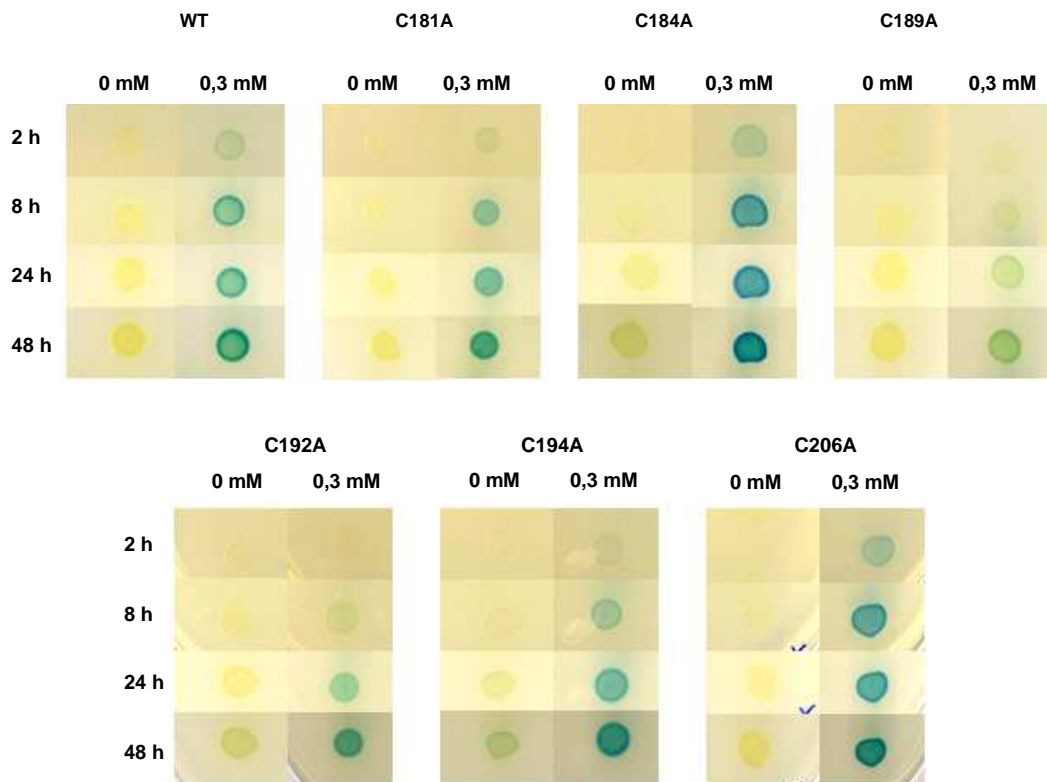


Figura 4.65. Actividad  $\beta$ -galactosidasa para diferentes cepas de *M. xanthus*. Cada una de estas cepas porta una fusión *cuoB-lacZ*, y se le ha introducido el gen para CorE con la secuencia original (WT) o con alguna mutación que resulte en un cambio de una cisteína por alanina (indicadas en la figura). Las células fueron concentradas a  $DO_{600}$  de 15 e incubadas a diferentes tiempos a 30°C, en medio CTT con (0,3 mM) o sin cobre adicional.







#### 4. RESULTADOS

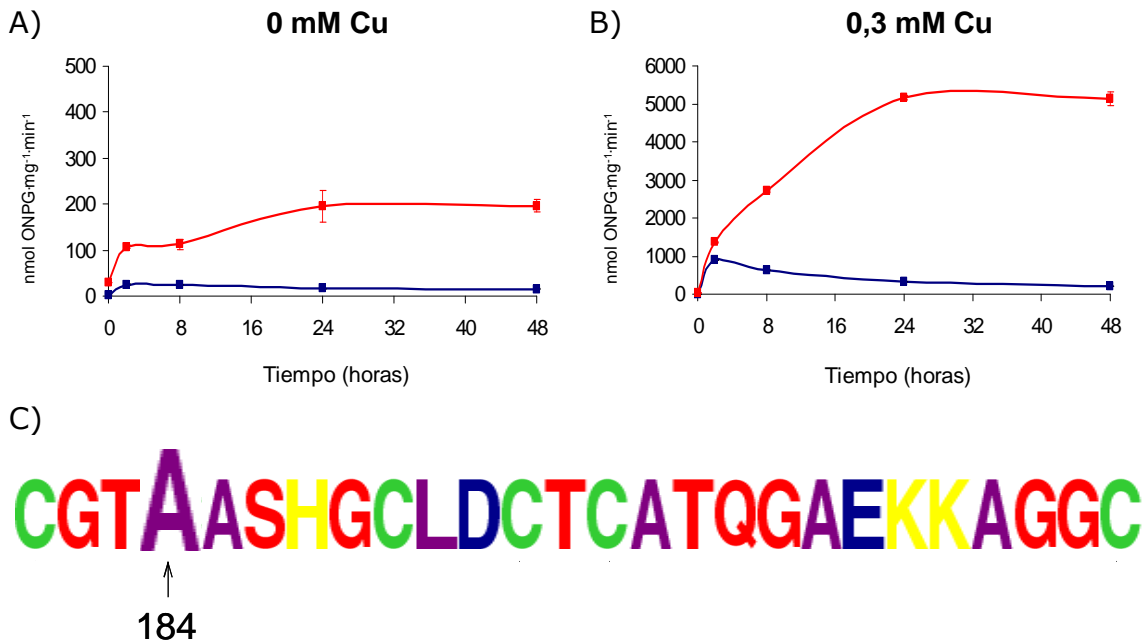


Figura 4.68. Actividad específica  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *cuoB-lacZ* para cepas de *M. xanthus* portadoras de CorE WT (línea azul) y CorE<sup>C184A</sup> (línea roja). Las células fueron incubadas en medio CTT a una DO<sub>600</sub> de partida de 15, a 30°C, durante los tiempos cuya medida se representa en la gráfica. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres medidas independientes. A) Medios sin cobre adicionado. B) Medios con 0,3 mM de sulfato de cobre. Nótese la diferencia en escala de ambas gráficas. C) Posición de la mutación puntual en el dominio CRD.

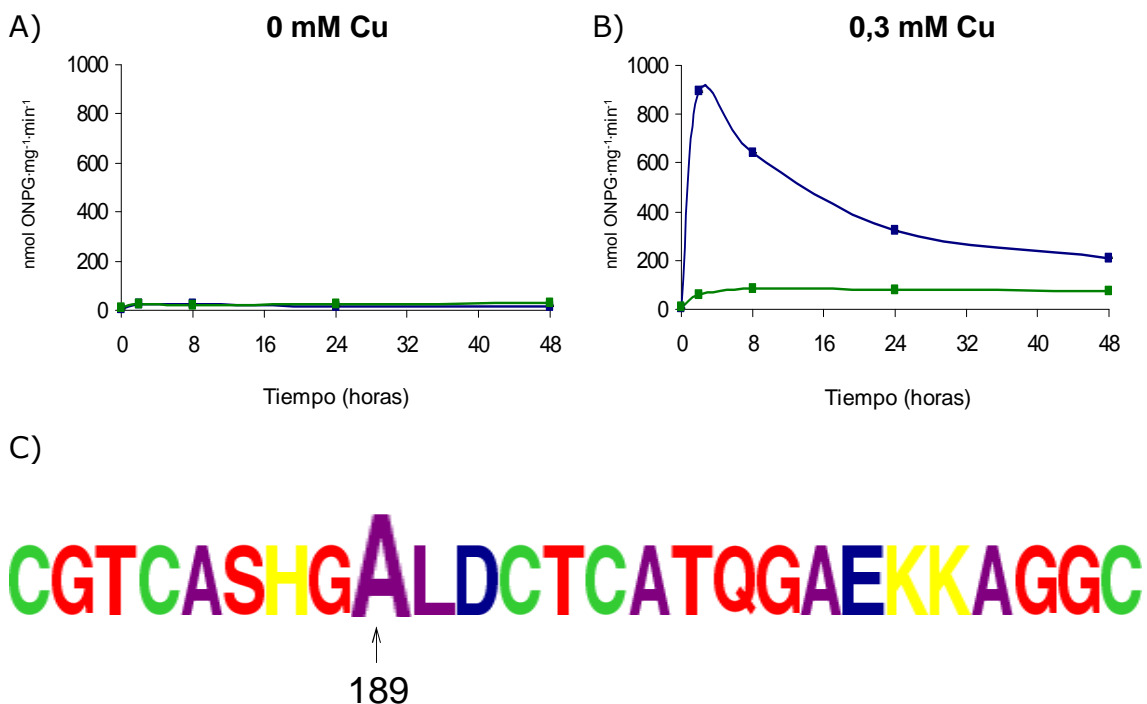


Figura 4.69. Actividad específica  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *cuoB-lacZ* para cepas de *M. xanthus* portadoras de CorE WT (línea azul) y CorE<sup>C189A</sup> (línea verde). Las células fueron incubadas en medio CTT a una DO<sub>600</sub> de partida de 15, a 30°C, durante los tiempos cuya medida se representa en la gráfica. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres medidas independientes. A) Medios sin cobre adicionado. B) Medios con 0,3 mM de sulfato de cobre. C) Posición de la mutación puntual en el dominio CRD.





## **5. DISCUSIÓN**

**5.1. HOMEOSTASIS DEL COBRE EN *M. xanthus***

**5.2. MCOs EN *M. xanthus***

**5.3. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR  $\sigma$  CorE EN *M. xanthus***



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. HOMEOSTASIS DEL COBRE EN *M. xanthus*

Las mixobacterias son microorganismos muy comunes en la naturaleza, sobre todo en la zona superficial del suelo. Debido a los constantes cambios que se originan en su medio habitual de crecimiento, deben poseer mecanismos que permitan hacer frente a estas continuas alteraciones. Es por ello que se ha favorecido a lo largo de la evolución el desarrollo de un complejo ciclo de vida que les permite responder frente al agotamiento de nutrientes, soportando condiciones adversas gracias a su comportamiento social. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, las mixósporas que se han formado en el proceso de esporulación podrán germinar, lo que conducirá a la formación de un nuevo grupo de individuos que crecerá vegetativamente y se nutrirá de un modo cooperativo (Dworkin, 1996; Kaiser, 2003).

Entre las condiciones adversas a las que tienen que hacer frente estas bacterias se encuentra la presencia de metales pesados como el cobre. Este metal, en cantidades elevadas en determinados suelos como consecuencia de actividades humanas, tiene un interesante papel dual debido a su efecto tóxico pero a la vez esencial en las células. De hecho, se conocen numerosos sistemas tanto en organismos eucariotas como procariotas que presentan un estrecho y riguroso control con objeto de mantener unos niveles intracelulares adecuados (Burkhead *et al.*, 2009; von Rozycki y Nies, 2008; Yamamoto e Ishihama, 2005). Por otro lado, este metal está relacionado con diversas enfermedades humanas y con la virulencia de varios patógenos, por lo que están siendo objeto de estudio numerosos procesos de transporte y regulación de la homeostasis del cobre en mamíferos (Bertinato y L'Abbé, 2004; Nies, 1999; Puig y Thiele, 2002; Strausak *et al.*, 2001). En cuanto a la respuesta al cobre en procariotas, dos son las bacterias cuyos mecanismos se conocen en mayor profundidad: *E. coli* y *E. hirae* (Rensing y Grass, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003). Es importante resaltar que ninguna de estas bacterias lleva a cabo procesos de diferenciación celular, por lo que el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia y homeostasis del cobre en *M. xanthus* podría revelar la existencia de mecanismos y rutas de regulación ausentes en los dos microorganismos anteriores. El conocimiento de la respuesta al cobre en procariotas contribuirá sin duda al conocimiento de la respuesta a este metal en muchos otros sistemas vivos.

Gracias a la secuenciación del genoma de *M. xanthus* (Goldman *et al.*, 2006) ha sido posible determinar la existencia de regiones que acumulan genes con dominios conservados implicados en la homeostasis del cobre. Una de estas regiones, denominada CR1 y que contiene 26,5 kb, engloba diversas proteínas que han sido objeto de estudio en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. La CR1 representa un 0,29% del genoma de *M. xanthus*, y además hay otras regiones donde se encuentran sistemas Cus y Czc inducibles por cobre, que incrementarán esta proporción hasta el 0,61%, permitiendo a esta bacteria hacer frente a un estrés originado por este metal. En el genoma de *M. xanthus* se han identificado sistemas relacionados con la homeostasis de metales por triplicado: tres sistemas Cus, tres Czc, tres ATPasas de tipo P<sub>IB</sub> y tres MCOs (Fig. 4.6). 5 de estos 9 genes se encuentran en la CR1. Según los trabajos consultados, esta redundancia génica no parece ser una situación muy común. *P. putida*, una bacteria con un alto número de genes implicados en la resistencia a metales pesados, posee algunos sistemas duplicados que pueden estar ejerciendo la misma función o responder ante diferentes condiciones. En el caso del cobre, presenta 2 operones capaces de quelarlo (Cánovas *et al.*, 2003).



En 2003, Banci y Rosato realizaron un análisis global de todos los genomas depositados hasta la fecha en bases de datos, encontrando 350 proteínas diferentes implicadas en la unión del cobre. Hasta esa fecha, tan sólo se disponía de la estructura de 14 de esas proteínas, 10 por NMR y 4 por cristalografía de rayos X. Tan sólo 5 de esas proteínas pertenecían a procariotas: *E. hirae*, *B. subtilis* (3 de ellas) y *P. syringae*. En 2008, Andreini *et al.* volvieron a realizar un análisis similar con un volumen mayor de información. Determinaron que el tamaño medio del proteoma para un organismo (procariota o eucariota) relacionado con el cobre es menor del 1%. En el mismo año, Ridge *et al.* analizaron 450 genomas de bacterias y 35 de arqueas para determinar la frecuencia de transportadores y proteínas relacionados con el cobre, obteniendo como resultado que en muchos organismos que no presentan proteínas que unan cobre existen, sin embargo, transportadores para expulsar el exceso de este metal que puedan encontrarse en su entorno. *M. xanthus* presenta, como hemos visto previamente, numerosos genes implicados en la homeostasis del cobre que le permitirán hacer frente a un ambiente con concentraciones fluctuantes de este metal durante su ciclo de vida al completo.

Los metales de transición, entre ellos el cobre, tienen un papel muy importante como cofactores de determinadas enzimas, catalizando reacciones de intercambio de electrones, uniendo sustratos y estabilizando estructuras proteicas. Estos iones no son producidos ni consumidos durante tales reacciones, lo que sitúa el estudio del metabolismo de los metales de transición en una interfaz única entre la química y la biología, dando lugar a la definición de metaloproteoma como la unidad funcional de la biología de los metales de transición (Thiele y Gitlin, 2008; Williams, 2001).

Se ha determinado que las células que han entrado en el ciclo de desarrollo son entre 15-17 veces más sensible al cobre que aquellas que crecen vegetativamente. Las células, durante el proceso de diferenciación que tiene lugar en el ciclo de desarrollo, van a sufrir grandes cambios a nivel de la envuelta para cambiar de forma y transformarse en mixósporas (Yang *et al.*, 2008). Estas alteraciones podrían ser las responsables de la extrema sensibilidad al cobre que presenta *M. xanthus* durante el desarrollo. Además, son células fisiológicamente diferentes, ya que presentan niveles de energía más bajos que las células vegetativas. En otras ocasiones se ha demostrado que el estado de las células altera la sensibilidad al cobre, lo que apoya la idea de que el estado fisiológico de las células es un factor muy importante para la tolerancia al cobre (Outten *et al.*, 2001; Tree *et al.*, 2005).

Sin embargo, cuando los mecanismos de respuesta al cobre han sido inducidos previamente durante el crecimiento vegetativo, las células son capaces de resistir concentraciones mucho mayores en el ciclo de desarrollo (hasta 2-2,5 mM), resistencia al cobre similar a la que presenta *E. coli* (Franke *et al.*, 2003). La redundancia génica en esta bacteria permitirá la adaptación a diferentes situaciones de estrés por cobre durante largos periodos de tiempo.

El análisis de diversos mutantes de delección en fase para genes relacionados con la homeostasis del cobre en *M. xanthus* permitió identificar varios realmente importantes para la supervivencia de esta bacteria en presencia de altas concentraciones del metal, como *cuoB* y *corE*, o *cuoA* y *corSR1* (Sánchez-Sutil, 2009). De entre los reguladores de *M. xanthus* que podrían estar relacionados con la homeostasis del cobre hay al menos dos (CorE y CorSR1) que están directamente implicados. El análisis de la respuesta al cobre mediada por las MCOs CuoB y CuoC, y por el factor sigma CorE, será tratado en apartados posteriores.

## 5.2. MCOs EN *M. xanthus*

El análisis del genoma de esta  $\delta$ -Proteobacteria ha revelado la presencia de tres MCOs. Debido a la gran variedad de funciones en las que estas enzimas están implicadas, se ha investigado el papel que desempeñan en *M. xanthus* y las posibles razones de esta redundancia génica en el cromosoma, siendo objeto de esta Tesis Doctoral CuoB y CuoC.

El análisis de la secuencia aminoacídica de CuoB y CuoC reveló la presencia de una región rica en metioninas próxima a los centros del cobre, presente en aquellas MCOs que proporcionan resistencia frente al cobre. PcoC, proteína codificada por el plásmido pco que permite a *E. coli* tolerar elevadas concentraciones de cobre, es capaz de unir Cu(I) y Cu(II) en una región rica en metioninas (Peariso *et al.*, 2003). Se ha propuesto que este dominio podría tener una función reguladora, uniendo cobre y activando las enzimas; o que podría actuar como mediador en interacciones proteína-proteína (Roberts *et al.*, 2003). Además, CuoB y CuoC presentan secuencias de secreción reconocidas por el sistema Tat, y por tanto serán transportadas al periplasma completamente plegadas y unidas a su cofactor (Lee *et al.*, 2006). Estas dos características indican que ambas proteínas van a poder ejercer un papel de destoxicación del cobre presente en el citoplasma durante su translocación al periplasma como ocurre en el caso de *E. coli* con CueO (Rensing y Grass, 2003). *M. xanthus* presenta otra MCO, CuoA, cuya homología con CuoB y CuoC es menor (Sánchez-Sutil, 2009). No presenta esa región rica en metioninas, y además se secreta por el sistema Sec (por tanto incorporará el cobre en el periplasma).

### 5.2.1. IMPLICACIÓN DE CuoB Y CuoC EN LA HOMEOSTASIS DEL COBRE EN *M. xanthus*

Los niveles y perfil de expresión para CuoB y CuoC son algo diferentes durante el ciclo de desarrollo, pero más aún en el crecimiento vegetativo, indicando que estas proteínas van a ejercer papeles distintos en respuesta a la toxicidad por cobre (Fig. 4.12 y 4.27). CuoB presenta un perfil de expresión que alcanza un pico tras las primeras horas de contacto con el metal, mientras que CuoC presenta una expresión basal e inducción por cobre mantenida a lo largo del tiempo. Por su parte, la tercera MCO de *M. xanthus*, *cuoA*, no tiene expresión basal pero sí que se induce en presencia de cobre a niveles mayores que *cuoC*, incrementando los niveles de expresión a lo largo del tiempo (Sánchez-Sutil, 2009) CuoC se expresa en ambas etapas del ciclo de vida en ausencia de metal, y sin embargo el mutante de delección para este gen no parece ser esencial para el desarrollo de las células. En cambio, durante el ciclo de desarrollo se observa un retraso en la formación de cuerpos fructificantes para esta cepa, así como una reducción en el número de esporas y deficiencias en la capacidad de germinación de éstas. Por su parte, CuoB sufre una rápida inducción durante el crecimiento vegetativo, proporcionando una respuesta primaria a la toxicidad por cobre. Es por ello que el mutante de delección para *cuoB* es mucho más sensible que cualquiera de los mutantes de delección para las otras dos MCOs de *M. xanthus*, cuyos niveles de expresión incrementan y se mantienen a lo largo del tiempo. Sin embargo también presenta este mutante una sensibilidad mayor que la cepa silvestre o el mutante de delección para *cuoC* durante el ciclo de desarrollo, donde los niveles de expresión para las fusiones *cuoB-lacZ* y *cuoC-lac-Z* son bastante similares en presencia de concentraciones crecientes de sulfato de cobre. Una

explicación para estas diferencias podría radicar en la actividad específica que lleve a cabo cada MCO. Por otro lado, los mecanismos de regulación para ambos genes serán diferentes. De hecho, mientras que el regulador de *CuoB* ha sido identificado como el canónico factor sigma *CorE*, aún no se conoce el/los regulador/es de *CuoC*.

Las formas esféricas que se observan en las células vegetativas del mutante para *cuoC* en presencia de cobre sugieren pérdida de peptidoglucano (Fig. 4.15), algo que no ocurre en otros microorganismos en los que se ha estudiado la respuesta al cobre, como en *E. coli*. Este comportamiento puede ser atribuido a la peculiar estructura del peptidoglucano que presenta *M. xanthus*, formado por parches conectados por puentes sensibles al tratamiento con SDS y proteasas (Dworking, 1993). Además, la cubierta de la espora cuando las células llevan a cabo el ciclo de desarrollo en presencia de 1,5 mM de  $\text{CuSO}_4$  se ve alterada, lo que indica que *CuoC* estará ejerciendo un papel importante en la destoxificación del metal a nivel del periplasma, puesto que las proteínas y polisacáridos que forman la cubierta de la espora deben pasar del citoplasma al exterior a través del periplasma (Inouye *et al.*, 1979), y en este transporte pueden sufrir alteraciones cuando el cobre no está siendo adecuadamente destoxificado. *cotA* de *B. subtilis* es una MCO que va a formar parte de la cubierta de la espora pero cuya síntesis no es inducible por cobre (Martins *et al.*, 2002). *CuoC* podría estar ejerciendo una función similar, ya que se induce en ausencia de metal. Pero también se induce fuertemente por cobre durante el crecimiento vegetativo, por lo que debería estar ejerciendo otro papel en la protección de las células frente a altas concentraciones de cobre.

En varios sistemas se han descrito regulaciones múltiples para proteínas implicadas en la respuesta al cobre. En *E. coli* hay un sistema de dos componentes que media en la respuesta frente a diversos tipos de estreses que dañan la envuelta celular y en la regulación de *copA*, uno de los genes relacionados con la respuesta al cobre junto a *cueO* y *cusC* en *E. coli* (Raivio y Silhavy, 1999; Yamamoto e Ishihama, 2005). Además hay otros tres reguladores relacionados con la homeostasis del cobre, uno de ellos (*CueR*) también regulará la expresión de *CopA* (Fig. 5.1).

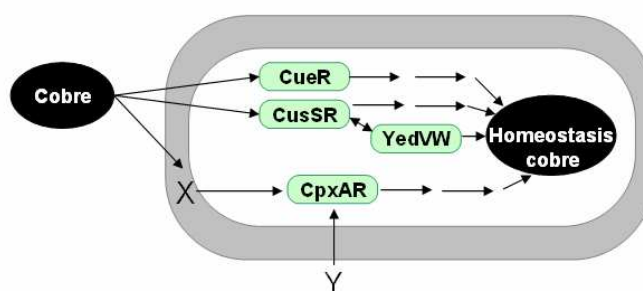


Figura 5.1. Organización del estímulo del cobre. Representación de una célula de *E. coli* (en gris el periplasma). Hay un gran número de regulones implicados en la homeostasis del cobre. X e Y representan efectores no identificados que van a detectar diversos tipos de estreses. *CusSR*, *CpxAR* y *YedVW* son sistemas de dos componentes. *CueR* es un regulador de tipo *MerR*. (Modificado de Yamamoto e Ishihama, 2005).

La presencia de tres MCOs en *M. xanthus* parece tener una explicación temporal, induciéndose cada una de ellas en diferentes momentos del ciclo de vida, frente a diversas concentraciones de cobre. Pero además podría existir una diferencia funcional, presentando cada una de ellas diversas actividades enzimáticas, cosa que sólo

podrá ser demostrada con la purificación y caracterización de cada una de estas enzimas. Los datos de actividad cuproso oxidasa en extractos celulares indican que CuoC va a contribuir a través de esta actividad (al menos durante el crecimiento vegetativo), en presencia de elevadas concentraciones de cobre (Fig. 4.19). Sin embargo la medida de actividad cuproso oxidasa en extractos del mutante para *cuoB* con respecto a la obtenida para la cepa silvestre no se ve disminuida, sino que incluso incrementa tanto en ausencia como en presencia de cobre (Fig. 4.31). El hecho de que los niveles de actividad sean en ocasiones mayores en el mutante de delección podría deberse a una fuerte inducción de las otras dos MCOs que posee *M. xanthus* cuando la actividad de CuoB, que parece ser la responsable de la respuesta primaria frente a la toxicidad generada por este metal, es abolida. Los niveles tras 24 h de incubación en presencia de 0,3 mM de sulfato de cobre son coherentes con los resultados previos de inducción del promotor para *cuoB*, ya que a esa concentración y tiempo de incubación se reduce la expresión de *cuoB* a niveles casi imperceptibles. Los datos preliminares obtenidos con CuoB purificada indican que esta MCO es una metalooxidasa, lo que indica que protegerá a las células de *M. xanthus* de la toxicidad por cobre mediante actividad cuproso oxidasa (Tabla 4.2).

Se propone que de los genes cromosómicos en *E. coli* el sistema *cue* funciona como un sistema primario de eflujo de cobre, y que el sistema *cus* solo se activa cuando los sistemas primarios han sido desbordados y no son suficientes para controlar la situación. Por tanto, el sistema *cue* conferirá resistencia al cobre bajo condiciones de moderada/alta concentración de cobre, mientras que el sistema *cus* aumentará la tolerancia bajo condiciones de estrés extremo por cobre (Outten *et al.*, 2001). Un ejemplo similar podría ser válido en el caso de *M. xanthus*, en el que CuoB formaría parte del sistema primario de detoxificación de cobre.

*Pseudomonas fluorescens* SBW25 también posee dos sistemas, uno que se activa en ambientes donde hay escasez del metal facilitando la entrada del poco cobre que haya; otro cuando las concentraciones son altas, detoxificando (Zhang y Raine, 2008). En eucariotas, el factor de transcripción MTF1 se encarga de inducir la transcripción de metalotioneínas cuando se une a metales. En *Drosophila*, MTF-1 parece activar la síntesis de CTR1, proteína que introduce cobre en las células cuando hay escasez del metal. MTF-1 tiene, por tanto, un papel dual al activar mecanismos de respuesta frente a bajas y altas concentraciones de cobre (Selvaraj *et al.*, 2005).

Hay sistemas para otros metales en los que también existen diferentes mecanismos de regulación. El regulador presente en *Helicobacter pylori*, NikR, reconoce dos tipos de promotores, unos con alta afinidad que van a dar lugar a la síntesis de proteínas relacionadas con el níquel (Dosanjh *et al.*, 2007) y otros con baja afinidad, para otro tipo de proteínas (Dosanjh *et al.*, 2009).

*M. xanthus* posee tres genes parálogos que codifican tres MCOs, que están ejerciendo papeles diferentes y presentarán diferente regulación. Según datos obtenidos en nuestro laboratorio, CuoA tendría un importante papel en la detoxificación del periplasma y sería necesaria para la resistencia a altas concentraciones de cobre, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo (Sánchez-Sutil, 2009). Por su parte, CuoB sería esencial en la respuesta primaria al estrés generado por cobre, y CuoC tendría un importante papel durante el desarrollo, especialmente en el proceso de esporulación.

### 5.3. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR $\sigma$ CorE EN *M. xanthus*

#### 5.3.1 CorE: FACTOR $\sigma$ DE TIPO ECF

Del análisis de CorE se ha deducido que es una proteína de *M. xanthus* catalogada como factor sigma de tipo ECF (o del grupo IV), ya que contiene los dominios conservados en este grupo (Campbell *et al.*, 2002; Paget y Helmann, 2003). La familia Sigma-70 está subdividida en 5 grupos, de acuerdo con la clasificación que propuso Helmann en 2002, siendo el grupo IV o de ECFs el más emergente, con numerosos representantes a los que se van sumando nuevos miembros a una gran velocidad (Cheng *et al.*, 2008; Kawano *et al.*, 2009; Lourenco y Gomes, 2009; Potvin *et al.*, 2008).

Su localización se ha determinado citoplasmática (Resultados, sección 4.5.1 y 4.5.2). Sin embargo, el gen *corE* se cotranscribe con los genes *cuoB* y MXAN\_3424 (Fig. 4.21), ninguno de los cuales codificaría una proteína similar a un antisigma, y por tanto este ECF no cumpliría una de las características comunes de este tipo de proteínas. Es habitual que los factores sigma del grupo IV se cotranscriban con una proteína que actúe como antisigma (Brooks y Buchanan, 2008; Helmann, 2002; Hughes y Mathee, 1998; Missiakas y Raina, 1998), aunque también se han descrito ECFs en los que el factor antisigma no se encuentra en el mismo operón (Thakur *et al.*, 2007).

En el caso de CorE no existe una autorregulación completa de su expresión (Fig. 4.43), aunque tampoco se ha observado en otros ECFs, incluyendo PbrA de *P. fluorescens* o FecI de *E. coli* (Brooks y Buchanan, 2008; Sexton *et al.*, 1996). Sin embargo, CorE regula su propia expresión dependiente de sulfato de cobre (Fig. 4.43B), condición que también activa, por ejemplo, los genes *cuoB* y *copB* cuya expresión depende completamente de CorE (Fig. 4.42). CorE es, por tanto, responsable de la inducción temprana en respuesta al cobre de su propio gen y de aquellos que regula. En el caso de RpoE de *E. coli*, existe una doble regulación consistente en una transcripción basal a partir de un promotor no dependiente de RpoE, y una transcripción a partir de un promotor dependiente de RpoE, mayor que la basal y única en respuesta a estrés térmico, lo que asegura una continua producción de RpoE bajo diferentes condiciones metabólicas y ambientales (Cheng *et al.*, 2008). Este podría ser el caso de CorE, con una autorregulación parcial dependiente de cobre y una regulación basal y en respuesta a cobre de manera más tardía dependiente de otra subunidad de la ARN polimerasa y quizás de algún otro factor de transcripción, que reconozcan otro promotor diferente. La existencia de otro/s regulador/es que controlen la expresión de CorE asegurará unos niveles mínimos de proteína en la célula que permita hacer frente a una situación de estrés por cobre.

Para intentar localizar algún posible regulador de *corE*, se introdujo la fusión transcripcional *corE-lacZ* en diversos mutantes de delección para reguladores transcripcionales con diversos perfiles de expresión (inducibles por cobre, por el ciclo de desarrollo o sin un patrón definido). En ningún caso se observó pérdida de actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *corE-lacZ*, indicando que ninguna de estas proteínas está controlando completamente la expresión de CorE (Fig. 4.44). Por tanto, el mecanismo de regulación de la expresión de esta proteína debe ser dilucidado para arrojar luz sobre la regulación global del cobre en *M. xanthus*.

No se ha demostrado que CorE actúe como un factor sigma *sensu stricto*, pero la homología con otros factores sigma como RpoE, PvdS o CarQ, la presencia de los motivos PF04542 y PF08281 absolutamente conservados en todos los miembros de la familia sigma-70 que indica un margen ínfimo de mutación a lo largo de la evolución (Campbell *et al.*, 2008), así como la necesidad de esta proteína para promover la transcripción de ciertos genes, apuntan en esa dirección. En 1993 se conoció la secuencia de CarQ (McGowan; referenciado en Gorham *et al.*, 1996), y en 1994 Lonetto *et al.* lo clasificaron como ECF. Hasta 1996 Gorham *et al.* no propusieron el mecanismo de actuación CarQ-CarR, y esa interacción no fue demostrada hasta 2003, cuando Browning *et al.* también demostraron la actividad de CarQ como factor sigma, promoviendo la transcripción a partir de una región promotora *in vitro*.

*M. xanthus* presenta una extraordinaria complejidad genómica y funcional que no es una excepción en el caso del número de factores sigma que puede codificar (47 proteínas serían catalogadas como factores de la familia Sigma-70). 28 de estos factores serían clasificados como ECFs, aunque Kroos e Inouye elevan este número hasta 38 (Kroos e Inouye, 2008). Este alto número de ECFs refleja la versatilidad de esta bacteria para responder a cambios en su entorno y el complejo ciclo de vida que va a llevar a cabo.

### 5.3.2 PAPEL DE CorE EN LA RESISTENCIA AL COBRE DE *M. xanthus*

CorE está implicado en la homeostasis del cobre en *M. xanthus*, al igual que otros miembros del grupo ECF lo están en la homeostasis de metales (Grosse *et al.*, 2007; Nies, 2004). Es imprescindible para el ciclo de vida al completo de esta bacteria en presencia de cobre, como demuestra la sensibilidad presentada por la cepa  $\Delta corE$  tanto durante el crecimiento vegetativo (Fig. 4.40A) como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 4.41). Por otro lado, las curvas de crecimiento realizadas en medio CTT líquido sin adicionar ningún compuesto no muestran diferencias entre las cepas WT y el mutante de delección para *corE*. Es decir, este ECF es dispensable en condiciones de crecimiento normales, como es habitual para los factores sigma alternativos (Missiakas y Raina, 1998; Pager y Helmann, 2003). Sin embargo, en un medio pobre en nutrientes, las células sufrirán algún tipo de alteración que impide una correcta formación de los cuerpos fructificantes en el mutante de delección para *corE*, posiblemente porque en ese estado se necesite una activación de los mecanismos de destoxificación de metales. De hecho, cuando las células carentes de CorE crecen en medio CF adicionado con BCS (un quelante específico para  $Cu^+$ ), presentan un retraso ligeramente menor en la formación de cuerpos fructificantes (datos no mostrados). El hecho de que el proceso de fructificación se recupere cuando incrementan las concentraciones de sulfato de cobre adicionadas a los medios, puede venir determinado por la inducción de otros genes (como los regulados por el sistema de dos componentes CorSR1) que realicen funciones similares a los regulados por CorE, supliendo su carencia cuando consiguen ser inducidos, dando sentido a la redundancia génica presente en *M. xanthus* para estos genes.

En relación a otros tipos de estreses que podrían ser generados por la presencia de un exceso de cobre, como el simulado con la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo, tampoco se observaron diferencias cuando se realizaron curvas de crecimiento con la cepa WT y el mutante de delección para *corE* (Fig. 4.40B). Además, la construcción de una fusión transcripcional entre el gen *corE* y el gen *lacZ* de *E. coli*

demuestra que su expresión se induce a medida que incrementan las concentraciones de cobre en el medio en ambas fases del ciclo de vida (Fig. 4.38). Por tanto, CorE va a tener un importante papel en la homeostasis del cobre en *M. xanthus*.

### 5.3.3 GENES REGULADOS POR CorE

El papel que CorE va a desempeñar en la homeostasis del cobre viene dado, en última instancia, por la función que llevarán a cabo los genes que regula. El análisis de diversas fusiones transcripcionales entre genes de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli* ha revelado que este ECF va a ejercer un control parcial sobre la transcripción de la ATPasa de tipo P<sub>IB</sub> CopA y la suya propia (como se ha comentado previamente). Los genes *copB* y *cuoB* presentan una expresión inducible por cobre completamente regulada por CorE, pues los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa se vuelven indetectables cuando estas fusiones se analizan en una cepa portadora de una mutación en fase para *corE* (Fig. 4.42). Ya que el mutante de delección para *corE* es más resistente al cobre que el mutante para *cuoB*, podría ocurrir que se indujeran otros sistemas de respuesta al cobre debido a la ausencia de las proteínas cuya expresión va a controlar CorE, o bien a que aún se mantenga cierta expresión basal del gen *cuoB*. Por tanto, se propone CorE como regulador principal en el caso de *cuoB* y *copB*, y la presencia de un promotor interno desde el que se regule la expresión de *corE*, puesto que *cuoB* y *corE* se cotranscriben en el mismo ARNm (Fig. 4.21).

Los perfiles de expresión de *cuoB* y *copB* dependientes de cobre y controlados por CorE son idénticos: un rápido incremento en la expresión tras el contacto con sulfato de cobre, alcanzando un pico a las dos horas de incubación de las células, seguido de un descenso igualmente rápido que equipara los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa tras 48 h a los iniciales. En el caso de los tres genes codificados por el cromosoma de *E. coli* implicados en la respuesta al cobre *copA*, *cueO* y *cusC*, se ha visto que presentan un máximo de expresión a los 5 minutos de la adición del metal, tras lo que desciende la expresión y vuelven a presentar unos niveles idénticos a los iniciales pasados 30 minutos (Yamamoto e Ishihama, 2005). Teniendo en cuenta que el tiempo de generación de *E. coli* es de unos 20 minutos y el de *M. xanthus* de 4 h, el perfil de expresión en ambas especies en relación con el ciclo de división celular para estos genes no es tan distinto como podría parecer, y por tanto, en ambos casos está teniendo lugar una respuesta primaria frente a un exceso de cobre en el medio en la que intervienen, al menos, estos tríos de genes. Para que se de una respuesta así de rápida, los reguladores que controlan estos genes deben ser capaces de responder a un estímulo que tiene lugar justo tras la adición de cobre, y que no perdura demasiado, puesto que luego los niveles de expresión descienden igual de rápido que aumentaron. En *E. coli*, la transcripción del gen *spy* está regulada por los sistemas de dos componentes CpxAR y BaeSR (Yamamoto *et al.*, 2008). La respuesta dependiente de CpxAR es inducida por cobre y tiene lugar poco después del contacto con el metal. La dependiente de BaeSR es dependiente de zinc, y ocurre tras una exposición prolongada al metal. Estos autores proponen que será necesaria la detección de ciertos daños en la envuelta celular para que se produzca la inducción de los genes en respuesta al Zn.

La inducción de la expresión de los genes regulados por CorE parece depender única y exclusivamente de cobre y no de otros metales. En el caso de las fusiones *lacZ* para *cuoB* y *copB*, se realizaron ensayos en los que estas cepas fueron crecidas en medios de cultivo suplementados con otros metales, como Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe

(Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>), Au<sup>+3+</sup> y Ag<sup>+</sup>. En ningún caso se pudo apreciar expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa, por lo que la expresión de estos genes y el papel que CorE va a desempeñar están exclusivamente relacionados con el cobre, más concretamente con Cu<sup>2+</sup>, pues además de los resultados que evidencian este hecho y serán discutidos con posterioridad, el uso de Ag<sup>+</sup> como agente mimético de Cu<sup>+</sup> no produjo inducción de estos genes. Hay sistemas muy específicos para el cobre, como los de *E. hirae* o los de *E. coli* (Rensing y Grass, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003). En otros casos también se ha descrito una alta especificidad para otros metales, como por ejemplo en el caso de Gols de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, regulador de tipo MerR específico para el oro (Checa *et al.*, 2007), muy similar a CueR de *E. coli* (este último, menos específico, responde a cobre, aunque también puede unir Au y Ag).

En base a las regiones promotoras de los genes regulados por CorE, se trató de identificar las posibles secuencias reconocidas por este ECF. El alineamiento de estas tres regiones no permitió identificar ninguna secuencia conservada. Así mismo, la búsqueda del elemento 'AAC', conservado en la región -35 reconocida por muchos ECFs (Helmann, 2002), tampoco reportó ningún resultado favorable. La secuencia conocida como *cop box*, cuya secuencia es TACAnnTGTA (Portmann *et al.*, 2004) tampoco se ha localizado en estas regiones. La búsqueda bioinformática de posibles promotores es complicada, debido a la capacidad de la mayoría de factores sigma de tolerar varios desemparejamientos en relación a una secuencia consenso. Por tanto, es relativamente difícil asociar sin ambigüedades un gen con un factor sigma que regule su expresión.

Hay casos descritos en los que diferentes secuencias pueden generar la misma respuesta de una proteína reguladora. Por ejemplo, MerR y PbrR son reguladores tipo MerR de *C. metallidurans*. Estas proteínas son capaces de activar la transcripción, en respuesta a metales, de genes presentes en otras bacterias con promotores reconocidos por reguladores de tipo MerR, pero cuyas secuencias difieren de las que presentan los promotores que reconocen en su cepa de origen (Julian *et al.*, 2008). A veces también hay solapamiento en la regulación de genes por diferentes ECFs (Mascher *et al.*, 2007). Generalmente esto ocurre cuando las secuencias -35 y -10 reconocidas por estos factores sigma son similares y conservan el motivo 'AAC' en -35. La secuencia que reconozca CorE no va a ser la típica descrita hasta ahora para la mayoría de ECFs, como tampoco lo es su mecanismo de acción.

Aún así, hay ECFs para los que se ha demostrado el reconocimiento de secuencias atípicas. Por ejemplo, la secuencia 'AAC' no está presente en las regiones -35 de los promotores reconocidos por PvdS en la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Swingle *et al.*, 2008), ni en la región promotora de *fecA* reconocida por FecI de *E. coli* (Enz *et al.*, 1995) ni en muchos de los genes regulados por RpoE en esta misma bacteria (Dartigalongue *et al.*, 2001), o aquellos en respuesta a estrés oxidativo regulados por SigM en *C. glutamicum* (Nakunst *et al.* 2007), como tampoco lo está en las regiones promotoras de los genes regulados por CorE.

Las regiones promotoras reguladas por CorE deben ser determinadas mediante técnicas como *footprinting* y *primer extension*. Además, el uso de la técnica ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) o el sistema de dos plásmidos puesto a punto en *E. coli*, que permiten hacer un rastreo del genoma completo, facilitará la identificación del regulón controlado por CorE.



### 5.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE CorE

La homeostasis de metales en todos los microorganismos requiere regulación a nivel transcripcional (Penella y Giedroc, 2005). Las proteínas metaloreguladoras unen iones metálicos directamente y reprimen, desreprimen o activan la transcripción de operones que codifican bombas de eflujo específicas para ciertos metales y/o transportadores de membrana, reductasas, proteínas de transporte citoplásmicas o periplásmicas, proteínas que quelan metales o reguladores transcripcionales de repuesta a metales (Silver y Phung, 1996 y 2005). Esta respuesta transcripcional a metales parece estar regulada en bacterias principalmente por factores citoplasmáticos, sistemas reguladores de dos componentes y en menor medida, por ECFs (Hobman, 2007), donde se incluiría CorE de *M. xanthus*.

#### 5.3.4.1. REGULACIÓN INDEPENDIENTE DE UN FACTOR ANTISIGMA

La mayoría de los miembros del grupo ECF de factores sigma responden frente a un estrés citoplasmático en combinación con un factor antisigma que detecta el estímulo (Hughes y Mathee, 1998). Sigma y antisigma van a ser cotranscritos en el mismo ARNm en la mayoría de los casos, pero en lo que respecta a CorE no se cumple esta premisa. En el caso de  $\sigma^C$  (*sigC*) de *Mycobacterium tuberculosis* tampoco se ha encontrado antisigma cotranscrito, y algunos autores proponen que tampoco funcione con un antisigma, aunque no se ha demostrado (Thakur *et al.*, 2007).

En el caso de CorE no existe antisigma que lo libere en presencia de cobre, ya que la sobreexpresión de CorE *in vivo* no produjo un incremento en los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *cuoB-lacZ* (Fig. 4.48). Ni siquiera la adición externa de sulfato de cobre incrementó los niveles de actividad, indicando que la cantidad de proteína no es un factor determinante en la regulación de la respuesta primaria al cobre por CorE. La sobreexpresión de RpoE en *C. crescentus* hace que se induzcan los genes que están regulados por él en respuesta a diferentes tipos de estrés, al igual que la de FecI (Enz *et al.*, 1995; Lourenço y Gomes, 2009). Igualmente, Rodrigue *et al.* sobreexpresaron una serie de ECFs en *M. tuberculosis* para determinar los promotores que estaban reconociendo sin necesidad de conocer el estímulo necesario para que cada ECF iniciara la transcripción, evitando el efecto de sus antisigmas.

El mecanismo de actuación de CorE sería diferente de todos los propuestos hasta ahora para factores sigma de tipo ECF (Brooks y Buchanan, 2008), y no necesitaría ninguna proteína que controle su actividad. Como se ha visto en el apartado Introducción, el mecanismo de acción de algunos ECFs es diferente al estándar sigma-antisigma, aunque siempre parece haber una proteína implicada que module la actividad del ECF, lo que pone de manifiesto la gran variabilidad que existe entre proteínas reguladoras de la transcripción génica.

#### 5.3.4.2. UNIÓN AL ADN DEPENDIENTE DE $\text{Cu}^{2+}$

Los resultados de los experimentos de retardo en la movilidad electroforética llevados a cabo con hCorE, sostienen que esta proteína es capaz de unirse al ADN sólo en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , puesto que la presencia de BCS además de sulfato de cobre adicionada a la reacción de unión fue necesaria para observar un retardo en la movilidad electroforética (Fig. 4.52). Este quelante específico de  $\text{Cu}^{2+}$  se ha utilizado desde hace

muchos años para realizar determinaciones de  $\text{Cu}^+$  (Zak, 1958), ya que presenta una fuerte afinidad por el  $\text{Cu}^+$ , mientras que por el  $\text{Cu}^{2+}$  es muy débil (Xiao *et al.*, 2004). Por ello se utiliza cuando se quiere discernir entre  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , debido a que a veces es muy complicado mantener este metal en uno de sus estados de oxidación en los tampones y condiciones utilizados en experimentación; o cuando se quieren realizar determinaciones de  $\text{Cu}^+$ . Por ejemplo, para el regulador transcripcional de levaduras Mac1p se ha demostrado una dependencia de  $\text{Cu}^+$  mediante el uso de BCS. Si los niveles de  $\text{Cu}^+$  incrementan se disocia del ADN, pero la unión al ADN es dependiente de  $\text{Cu}^+$ , ya que cuando se utiliza BCS en los ensayos de EMSA, se deshace el complejo proteína-ADN (Heredia *et al.*, 2001), cosa que no ocurre cuando se utiliza un quelante de iones divalentes como EDTA. De este modo inducirá la expresión de genes necesarios para la captación de cobre cuando hay escasez, reduciéndose la transcripción cuando los niveles de cobre intracelulares aumentan.

Otros metales como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Au}^{+3+}$  no fueron capaces de provocar un retardo en la movilidad electroforética de la sonda utilizada en ensayos de EMSA con CorE, indicando que no son capaces de promover la unión de la proteína al ADN. Ni siquiera el uso de  $\text{Ag}^+$ , que se utiliza como agente mimético de  $\text{Cu}^+$  por presentar un radio atómico muy parecido, pudo permitir la formación de complejos proteína-ADN, lo que refuerza la idea de que es el cobre en su estado de oxidación (II) el que promueve la unión de CorE al ADN. En el caso de la expresión de CopA en *E. coli*, positivamente regulada por CueR e inducida de manera proporcional a la concentración de iones  $\text{Cu}^+$ , se produce una mayor inducción cuando se utiliza plata (Rensing *et al.*, 2000). La adición de  $\text{Ag}^+$  también mimetiza el efecto de  $\text{Cu}^+$  sobre Mac1p *in vitro* (Heredia *et al.*, 2001).

La especificidad en el reconocimiento de  $\text{Cu}^{2+}$  ha sido demostrada en otras proteínas, como en la proteína priónica PrP. La afinidad mostrada por  $\text{Cu}^{2+}$  es tan selectiva que no presenta apenas capacidad de unión a  $\text{Cu}^+$ , ni a otros metales divalentes (Stöckel *et al.*, 1998).

Hay muchos reguladores transcripcionales que necesitan metales para unirse al ADN, tanto en procariontes (Giedroc y Arunkumar, 2007; Penella y Giedroc, 2005), como en eucariotes (Gralla *et al.*, 1991; Thiele, 1988; Zhou y Thiele, 1991), donde se conocen factores de transcripción que requieren cobre para unirse al ADN como ACE1 de *S. cerevisiae* o AMT1 de *Candida glabrata*. Incluso se han descrito factores sigma cuya respuesta se ve fuertemente inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ , como RpoQ *C. metallidurans* (Grosse *et al.*, 2007). Pero no se conoce ningún factor sigma que requiera de un metal para permitir que se inicie el proceso de transcripción. Una pregunta aún por resolver es si esta necesidad de metal está restringida a la unión de CorE al ADN o si también es necesaria para una correcta interacción con el núcleo de la ARN polimerasa, incrementando su afinidad para permitir la correcta formación de la holoenzima.

#### 5.3.4.3. RESPUESTA DEPENDIENTE DEL ESTADO REDOX DEL COBRE

Puesto que los genes regulados por CorE presentan una rápida inducción en respuesta al cobre, pero también un rápido descenso posteriormente, se planteó la posibilidad de que CorE pudiera estar sufriendo algún tipo de degradación. Aunque los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *corE-lacZ* se mantienen constantes una vez alcanzado el máximo de expresión a las 2 h tras el contacto con cobre (Fig.

4.38), la estabilidad de la proteína podría sufrir alguna alteración y esa ser la causa del descenso en los niveles de expresión de los genes que regula. Los resultados del Western blot para la detección de hCorE en *M. xanthus* en presencia de 0,3 mM de sulfato de cobre (Fig. 4.54) demuestran que no hay degradación evidente de hCorE, y por tanto el descenso en la expresión de los genes que regula se deberá a algún tipo de inhibición de CorE. En el caso de  $\sigma^S$  de *E. coli*, incluso disminuyendo los niveles de ARNm en condiciones de escasez de nutrientes, se produce un incremento en la estabilidad de la proteína que aumenta la relación proteína/ARNm (Zgurskaya *et al.*, 1997).

CorE va a sufrir un proceso de sensibilización cuando las células se encuentran, de repente, en un medio con una alta concentración de cobre. Una vez que se han inducido los mecanismos de respuesta frente a esa toxicidad, debe darse algún proceso que inhiba su actividad, reduciéndose la expresión de los genes que regula. Esta hipótesis se corroboró al someter a las células a sucesivos choques por cobre. Aunque los niveles de expresión de *corE* ni siquiera se duplicaron ante un nuevo choque, la expresión de *cuoB* volvió a presentar un pico como si del primer contacto con el metal se tratara (Fig. 4.57). Se propuso que esa sensibilización/desensibilización de CorE podría estar relacionada con el estado de óxido-reducción del cobre en la célula. Como se comentó en el capítulo Introducción, el cobre libre en las células es muy tóxico, lo que ha dirigido la evolución de mecanismos que mantengan una estricta regulación, impidiendo que en condiciones normales el metal se encuentre libre en el citoplasma (Cavet *et al.*, 2003; Rae *et al.*, 1999). Pero cuando las células son sometidas a un choque por cobre éste podría alcanzar el citoplasma, penetrando  $\text{Cu}^{2+}$  inmediatamente tras el choque. El ambiente reductor intracelular y la unión a proteínas van a ser los principales mecanismos que evitarán la permanencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en el citoplasma (Rae *et al.*, 1999), pero ese rápido estado de transición podría ser una señal para activar los mecanismos de la respuesta primaria al estrés generado por cobre: activación de CorE por  $\text{Cu}^{2+}$ , e inducción de (al menos) *cuoB*, *copB* y *copA*. Eso explicaría porqué los genes cuya expresión está regulada por CorE presentan un pico cuando comienza el estrés por cobre.

La expresión de una metano monooxidasa soluble en metanotrofos está controlada por el estado redox de MmoS, una proteína sensora que forma parte de un sistema de dos componentes (Ukaegbu *et al.*, 2006; Ukaegbu y Rosenzweig, 2009), y depende de  $\sigma^{54}$ . En ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , predomina la forma reducida de MmoS, incrementándose la transcripción de sMMO (soluble).

La actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión *cuoB-lacZ* en presencia de BCS y cobre fue máxima (cuando la proporción  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  es mínima), y menor en presencia de ascorbato y cobre (proporción  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  máxima) o mínima cuando se adicionó plata al medio de cultivo (como agente mimético de  $\text{Cu}^+$ ). El efecto de la plata sobre la inhibición de una butano monooxigenasa de *Pseudomonas butanovora* fue el mismo en condiciones aerobias que el observado en condiciones anaerobias para el  $\text{Cu}^+$  (Doughthy *et al.*, 2008). En condiciones anaeróbicas se precisa una menor concentración de sulfato de cobre para reprimir la transcripción de este gen que en condiciones aeróbicas, puesto que se favorece la presencia de  $\text{Cu}^+$  al no ser oxidado. En condiciones de aerobiosis, la adición de un exceso de ascorbato reduce la concentración de sulfato de cobre necesaria para conseguir el mismo efecto que en anaerobiosis, puesto que se incrementa la proporción de cobre en su forma reducida. Del mismo modo, la inducción de los genes

regulados por CorE estaría siendo inhibida por  $\text{Cu}^+$ , y su actividad dependerá del estado redox del cobre en la célula (Fig. 4.58).

En un análisis global del proteoma de diversos organismos (Andreini *et al.*, 2008) se determinó que la mayoría de proteínas implicadas en transporte y homeostasis de cobre unen  $\text{Cu}^+$ , y que aquellas proteínas capaces de unir  $\text{Cu}^{2+}$  también unirán  $\text{Cu}^+$ , en un estado de oxidación-reducción fluctuante. Podría ocurrir que CorE una  $\text{Cu}^{2+}$  activándose, y  $\text{Cu}^+$  inactivándose; o que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  conlleve un proceso de reducción a  $\text{Cu}^+$  que produzca la inhibición de la proteína, formando complejos de coordinación con los mismos o diferentes residuos. La cristalización de CorE en presencia de cobre en sus dos estados de oxidación podría arrojar luz sobre los residuos implicados en el reconocimiento de este ión y los cambios conformacionales que se puedan producir en la estructura de la proteína.

#### 5.3.4.4. REGIÓN CRD DE CorE

Como se expuso en la sección Resultados, CorE presenta un región rica en cisteínas en su extremo C-terminal (CRD). En CorE las cisteínas representan el 3,8% del total de aminoácidos de la proteína, lo que supera incluso la frecuencia teórica esperada. El uso de este aminoácido a lo largo de la evolución ha sido reducido por motivos aún no determinados, de manera que la frecuencia de cisteínas en los proteomas actuales es bastante inferior a la esperada (Brooks y Fresco, 2002; Miseta y Csutora, 2000). La proporción esperada de cisteínas en una proteína, calculada matemáticamente (teniendo en cuenta que hay dos codones de un total de 61 que codifican para este aminoácido) va a estar entre el 3,23-3,28% (según diferencias en el %GC), si bien los resultados observados varían en función de la complejidad del grupo taxonómico estudiado: desde un 0,5% en arqueas al 1,03-1,13% en *E. coli*, *P. aeruginosa* o cianobacterias, llegando a un 2,26% en mamíferos (Miseta y Csutora, 2000).

Un análisis de todas las secuencias de genomas completos y de 3 genomas incompletos de mixobacterias depositadas en la base de datos del NCBI, mediante BLASTP, permitió identificar 17 factores sigma de tipo ECF que compartían una región con CorE dentro del dominio CRD, englobando 5 de las 6 cisteínas. La representación gráfica de este alineamiento múltiple en forma de HMM Logo de la Fig. 5.2 muestra que 4 de esas 5 cisteínas están absolutamente conservadas entre estos ECFs. Por tanto, esta región debe tener un papel muy importante para haber sido mantenida en estos microorganismos, que incluyen 9 ECFs pertenecientes a  $\alpha$ -Proteobacterias (2 en *Roseovarius* sp. TM1035, 3 en *Roseovarius* sp. 217, 1 en *Mesorhizobium* sp. BNC1, 1 en *Phenylobacterium zucineum* HLK1, 1 en *Roseobacter litoralis* Och 149, y 1 en *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1) 5 a  $\delta$ -Proteobacterias (2 en *Myxococcus xanthus* DK 1622, 1 en *Sorangium cellulosum* 'So ce 56', 1 en *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 y 1 en *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5), uno a la clase Acidobacteria (*Acidobacterium capsulatum* ATCC 51196), otro a Verrucomicrobiae (*Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136) y el último a la clase Opitutae (*Opitutus terrae* PB90-1).

Asimismo, un estudio de las regiones genómicas de estos ECFs que comparten con CorE esta CRD permitió identificar la existencia de cierta sintenia entre 9 de las 13 especies a las que pertenecen estos factores sigma (Fig. 5.3).

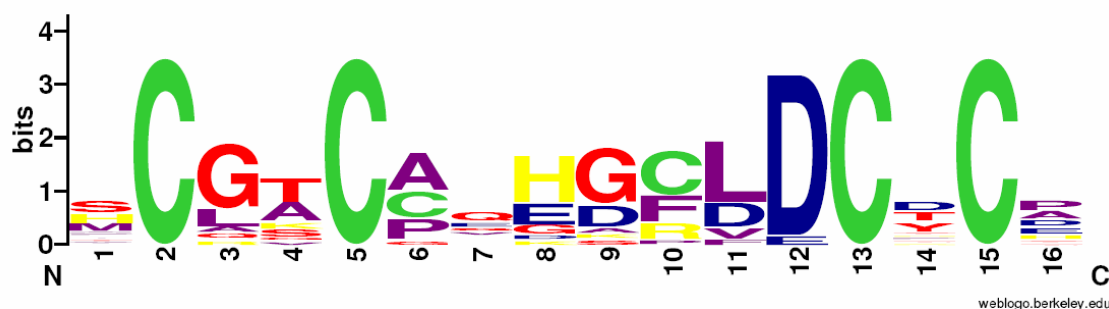


Figura 5.2. HMM-Logo de la región CRD en procariotas. El alineamiento se realizó utilizando la secuencia de aminoácidos de regiones CRD pertenecientes a 17 ECFs canónicos. El logo fue generado con WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) utilizando 16 de estas secuencias aminoacídicas de diferentes especies dentro de las clases  $\alpha$  y  $\delta$ -Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobiae y Opitutae.

Existe una alta similitud entre la región del genoma donde se encuentra CorE en *M. xanthus* y el ECF con CRD en *Stigmatella aurantiaca*. En ambos casos está presente una OEP, una MCO y un ECF, muy probablemente en el mismo operón (demostrado en el caso de *M. xanthus*). Estos tres genes también mantienen homología en *Rhodopseudomonas palustris*. Por otro lado, 4 cepas presentan estos ECFs con una ATPasa también relacionada con la homeostasis de metales, y que en el caso de *M. xanthus* está parcialmente regulada por CorE (flecha violeta: *copA*). Hay una situación particular en la que no se conserva ninguno de los genes mencionados anteriormente distintos a ECFs, pero aparecen dos ECFs con CRD en la misma región del genoma separados por tan sólo un gen (*Roseovarius* sp. TM1035 y *Roseovarius* sp. 217).

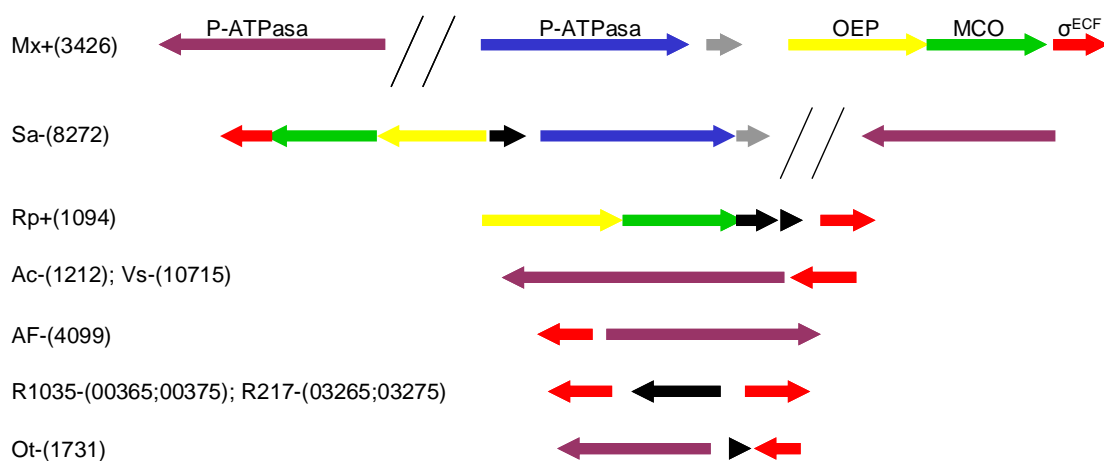


Figura 5.3. Sintenia entre las regiones de genomas que contienen ECFs con CRD. Las flechas representan genes, y aquellas que muestran el mismo color indican que las proteínas que codifican tienen una alta homología. Los genes en negro no comparten homología. Los números entre paréntesis reflejan la localización en el genoma de cada factor sigma de tipo ECF. Mx, *Myxococcus xanthus*; Sa, *Stigmatella aurantiaca*; Rp, *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1; AC, *Acidobacterium capsulatum* ATCC-51196; Vs, *Verrucomicrobium spinosum* DSM-4136, AF, *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5; R1035, *Roseovarius* sp. TM1035; R217, *Roseovarius* sp. 217; Ot, *Opitutus terrae* PB90-1. + y - indica que los genes están codificados en la hebra directa o reversa, respectivamente. Las barras inclinadas representan discontinuidad en el genoma. P-ATPasa, P<sub>IB</sub>-ATPasa; OEP, proteína de eflujo de la membrana externa; MCO, oxidasa del cobre;  $\sigma^{\text{ECF}}$ , factor sigma de la ARN polimerasa con un dominio rico en cisteínas.

Se conocen proteínas en eucariotas que requieren cobre para unirse al ADN, como ACE1 y AMT1, factores de transcripción implicados en el metabolismo del cobre, con regiones conservadas ricas en cisteínas necesarias para la unión del cobre y el ADN (Gralla *et al.*, 1991; Thiele, 1988; Zhou y Thiele, 1991). Igualmente en levaduras, Mac1p contiene dos regiones de unión a metales típicas: CXXC y CXC. Estos motivos están localizados en los dominios de activación y unión al ADN respectivamente (Heredia *et al.*, 2001; Jungmann *et al.*, 1993). Estas dos secuencias son idénticas a las que se mantienen conservadas en todos los ECFs de procariotas que presentan ese segmento extra rico en cisteínas (Fig. 5.2). Las secuencias CXXC están sobrerrepresentadas en un gran número de especies, y este efecto es más pronunciado entre organismos más primitivos, con un 21% del total de las cisteínas de arqueas formando parte de estos motivos (Miseta y Csutora, 2000).

Las secuencias CXXC y CXC en la región CRD de CorE se encuentran absolutamente conservadas en 16 ECFs de bacterias, y en 9 de estos casos, además, hay cierta sintenia (Fig. 5.2 y 5.3). Aunque esta región puede parecer en principio un segmento extra que podría no afectar la estructura de la proteína al ser eliminada (Fig. 5.4), el efecto de delecionar la región CRD de CorE es la ausencia de transcripción en los genes regulados por esta proteína (Fig. 4.62 y 4.63). Los resultados obtenidos mediante el análisis de cepas portadoras de CorE con diversas mutaciones puntuales han demostrado que la sustitución de una sola cisteína puede abolir casi por completo la expresión de *cuoB*, lo que demuestra la importancia de esta región para el correcto funcionamiento de este ECF.

```

CorE  MSDMNQAGAEESDGVVRLSADVISSLVENHREFLRFLERRVGSRAVAEDILQDAFVRGM
RpoE  --MSEQLTDQVLVERVQKGDQKAFNLLVWRYQHKVASLVSRVYVPSGDVDPVQEAFFIKAY
      :*  :.      *:*  . . . . . *:*  : :  *  *  . . . .  *:*:*:*:.

CorE  GKAETLREDESILTAWFYSLVRNAVIDHYRRRGTTTERALASLASELEEG-----HA
RpoE  RALDSFRGDSAFYTWLYRIAVNTAKNYLVAQGRPPSSDVAIEAENFESGGALKEISNP
      ::*  *:*  : : *:*  *  :.  : :  :*  :  *  *  *  :  :

CorE  PEAE LAQAVCQVGRLAGTLKPEYAEALRRVEVEGVSVPFALEAGITSNMAAVRLHRAR
RpoE  ENLMLSEELRQIVFRFTEISLPEDLRMAITLRELDGLSYEEIAAIMDCPVGTVRSRIFRAR
      :  *:*  :  *  *  *  :*  :  *  :  *:*:*  :*  . . . . .  *:*:*

CorE  KALKKQLEVSCGTCASHGCLDCTCATQGAEEKKAGGCGSAKA
RpoE  E AIDNKVQPI IRR-----
      :*  : : : :

```

Figura 5.4. Alineamiento entre las secuencias proteicas de dos factores sigma de la ARN polimerasa de tipo ECF. La región encuadrada presente en el extremo C-terminal corresponde con el dominio CRD de CorE.

La asociación de estos ECFs en la misma región del genoma con genes relacionados con la homeostasis de metales podría indicar que estos factores sigma también van a estar implicados en la regulación de metales de manera similar a CorE. En el caso de uno de los ECFs de *M. xanthus* que comparte esa región CRD con CorE, cuyo mutante de delección y fusión transcripcional fueron construidos (MXAN\_5263; Fig. 4.20 y 4.20') no se ha observado sintenia, ni tampoco inducción en respuesta a cobre. Este ECF parece estar formando operón con el gen MXAN\_5264, que conserva el dominio designado con el PFAM01545, lo que clasifica su producto génico como una proteína integral de membrana que confiere resistencia a metales divalentes. El análisis de este ECF, así como de los genes que pueda estar regulando, permitirá ampliar el conocimiento de la respuesta a metales en *M. xanthus*.

CorE no es necesario para responder frente a estrés causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4.40B), y por tanto debe sentir el cobre directamente mediante la formación de complejos de coordinación, o indirectamente (generándose algún cambio conformacional en la proteína inducido por la presencia de cobre). En cualquier caso, los residuos presentes en la región CRD parecen los más adecuados para detectar la presencia de un incremento en los niveles de cobre intracelulares. Hay casos en que los factores antisigma que regulan ECFs poseen cisteínas que son reducidas en respuesta a estrés oxidativo. Esta reacción genera formación de enlaces disulfuro entre los radicales -SH, que provoca un cambio de conformación liberando el ECF asociado, como en el caso de algunos antisigmas (Nakunst *et al.*, 2007; Zdanowski *et al.*, 2006). Además, en el caso de *S. coelicolor* se ha demostrado que el motivo ZAS (HXXXCXXC) presente en RsrA está implicado, junto a otra cisteína cercana en la proteína, en la coordinación de un átomo de Zn que va a intervenir en la detección de ese estrés oxidativo participando en una reacción de oxidación, cuyo final es la formación de un enlace disulfuro entre dos cisteínas (una del dominio ZAS y otra que no forma parte de él) y la pérdida del átomo coordinado (Paget *et al.*, 2001; Zdanowski *et al.*, 2006).

Las mutaciones puntuales llevadas a cabo en la región CRD de CorE mostraron que en todos los casos existía cierta alteración en la capacidad de iniciar la transcripción por este ECF. Sólo en dos casos no se perdió la capacidad de sensibilización/desensibilización de CorE cuando se comparó la expresión de actividad β-galactosidasa en cepas portadoras de la fusión *cuoB-lacZ* y proteínas mutantes o WT de CorE. Cuando las cisteínas en posiciones 181 y 206 fueron sustituidas individualmente por alaninas, el perfil de expresión se mantuvo (aunque con variaciones en los niveles de actividad alcanzados), alcanzando un pico al poco tiempo de contacto con el metal. En ambos casos este máximo se desplazó de las 2 a las 8 h, y los niveles de actividad fueron reducidos en un 50% en el caso de la mutación C181A (Fig. 4.66).

Cuando se determinó esta actividad en los mutantes C192A y C194A se observó una absoluta pérdida de la rápida sensibilización en presencia de cobre (Fig. 4.67), indicando que estas cisteínas podrían estar participando en el reconocimiento de Cu<sup>2+</sup>. Además, los últimos análisis de la expresión de *cuoB-lacZ* en estos mutantes cuando las células son cultivadas en presencia de Ag<sup>+</sup> indican que han perdido capacidad de inhibición por Cu<sup>+</sup> (datos no mostrados). Es decir, han perdido la capacidad de sensibilización/desensibilización. Además, se ha visto que el efecto de una sustitución doble C192A-C194A es muy similar (datos no mostrados), lo que hace pensar que estarán actuando conjuntamente.

En el caso de la sustitución C184A, aunque incrementó la expresión basal también mantuvo una alta capacidad de inducción en presencia de 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub> (Fig. 4.68). Esta sustitución permitió alcanzar los máximos niveles de actividad β-galactosidasa sin que tuviese lugar un descenso a lo largo del tiempo, apuntando en la dirección de que va a desempeñar un importante papel en el proceso de desensibilización de CorE.

Por último, la mutación C189A redujo en más del 90% la actividad con respecto a la cepa silvestre (Fig. 4.69). Aunque no se perdió por completo la capacidad de inducción, se redujo en gran medida. Esta cisteína va a ser primordial en la detección de cobre.

La formación de complejos de coordinación entre numerosos residuos puede dar lugar a la sustitución de un residuo reactivo por otro cuando alguno es reemplazado por alanina. En el caso de CmtR (*M. tuberculosis*) hay dos cisteínas principalmente implicadas en el proceso de unión de Cd(II)/Pb(II). Una tercera cisteína aumenta la estabilidad de este complejo, pero no es imprescindible para la formación del mismo en este regulador transcripcional de tipo ArsR/SmtB. Sin embargo esta tercera cisteína es absolutamente necesaria en el proceso de unión alostérica a la región promotora reconocida por CmtR (Wang *et al.*, 2005).

Muchas son las dudas acerca de cuáles son los determinantes que hacen que un metal reconozca, o sea reconocido por la secuencia de una proteína específicamente, y se forme un complejo de coordinación (Kožíšek *et al.*, 2008; Sigel y McCormick, 1970). Generalmente las cisteínas funcionan como parejas o tríos para unir metales, en complejos de coordinación (Sevier y Kaiser, 2002). Las cisteínas en posiciones 181, 184 y 189 podrían estar formando un grupo que funcione conjuntamente, y las situadas en posiciones 192 y 194 una pareja. El que no se pierda por completo la capacidad de respuesta al cobre en ninguno de los casos puede ser debido a que se establezcan otros enlaces alternativos entre los residuos que hay en el dominio CRD.

La función de estos motivos CXXC o CXC en CorE podría no ser la coordinación de cobre directamente, sino la oxidación de sus radicales -SH y formación de puentes disulfuro en presencia de una mayor concentración de metal oxidado, como se ha comentado con anterioridad que ocurre en otras proteínas. Podría darse esta situación tras incrementar bruscamente los niveles de cobre, momento en el que el estado redox del citoplasma sufriría variaciones que permitieran estos cambios en la proteína, detectando el estímulo y dando lugar a la transcripción de los genes en respuesta al este estrés. Este tipo de estrés puede ser simulado mediante la adición de diamida, que origina una situación en la que se favorece la formación de puentes disulfuro. Así se podría descartar uno de los dos mecanismos de acción para CorE.

En condiciones de crecimiento normales se requieren metalochaperonas para pasar metales a las proteínas que lo necesiten, ya que no van a estar libres, siendo necesaria una interacción directa proteína-proteína (O'Halloran y Culotta, 2000). La metalochaperona CCS encargada de pasar átomos de cobre o zinc a la superóxido dismutasa SOD1 en humanos, sufre un cambio conformacional inducido por la unión del cobre en la región C-terminal MXCXXC, que le confiere la capacidad de liberar el cobre en contacto con la SOD1, transfiriéndoselo (Rae *et al.*, 2001). Algunos autores han publicado que en el citoplasma de bacterias Gram negativas no se han identificado chaperonas específicas del cobre, incluyendo *E. coli*. (Zhang y Rainey, 2008), aunque sí que se han identificado en bacterias Gram positivas (como CopZ de *E. hirae*). La presencia de una proteína de este tipo en la CR1 de *M. xanthus*, justo a continuación del gen *corE* aunque en sentido inverso (Fig. 4.6), puede hacer pensar que en caso de que CorE una cobre mediante el dominio CRD, podría ser necesaria la actuación de esta metalochaperona. Podría ocurrir que en CorE tenga lugar la inactivación por reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en la propia proteína CorE, o que esta metalochaperona pasara  $\text{Cu}^+$  a CorE cuando se ha normalizado la situación en el interior celular, desplazando el  $\text{Cu}^{2+}$  unido. Aunque también podría ser necesaria para la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  ante un choque por cobre. La construcción de un mutante de delección en fase para este gen determinará si está desempeñando algún papel en la respuesta de CorE.



Las metalochaperonas SCO1 y SCO2 de humanos pueden unir de modo estable  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , estando implicados residuos de cisteínas en su coordinación. Se ha demostrado que un residuo de Asp muy conservado en proteínas Sco de eucariotas es imprescindible para su correcto funcionamiento. La presencia de este residuo es fundamental para la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  pero no de  $\text{Cu}^+$  (Horng *et al.*, 2005). Estos autores proponen que estas proteínas van a funcionar como donadores de  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ .

Para la unión estable de  $\text{Cu}^{2+}$  es un requisito imprescindible la presencia de más de dos ligandos (Andreini *et al.*, 2008), lo que ocurre en la región CRD. El  $\text{Cu}^+$  es más flexible y prefiere formar complejos de coordinación con átomos de azufre (Met y Cys), mientras que el  $\text{Cu}^{2+}$  lo hace preferentemente con nitrógeno (His) (Vila y Fernández, 2001) En la región CRD no hay ninguna His conservada (aunque CorE presenta una entre las cisteínas 184 y 189), pero existe un Asp muy conservado que podría formar complejos de coordinación a través de un átomo de oxígeno (Giedroc y Arunkumar, 2007; Penella y Giedroc, 2005). La mutación de estos residuos de aspártico e histidina podrían indicar si están ejerciendo algún efecto en la coordinación del cobre en la proteína WT, o mimetizando el papel de algún residuo en los mutantes de sustitución.

Algunos factores antisigma pertenecientes a la familia ZAS son solubles y presentan un mecanismo de acción inusual entre el resto de factores antisigmas descritos (Gruber y Gross, 2003), detectando el estímulo mediante la formación de puentes disulfuro en residuos de cisteínas presentes en la molécula (Nakunst *et al.*, 2007; Zdanowski *et al.*, 2006). Por ejemplo, ChrR de *Rhodobacter sphaeroides* actúa de este modo con el ECF  $\sigma^E$  detectando la presencia de oxígeno singlete (Campbell *et al.*, 2007). Si la región CRD de CorE funcionara como inhibidor (es decir, como los antisigma descritos hasta la fecha), la pérdida de esas cisteínas debería generar una transcripción continuada. Pero como se ha mostrado en los experimentos llevados a cabo mediante mutagénesis dirigida, en todos los casos se necesita cobre para aumentar la expresión de los genes regulados por CorE, aunque a veces las mutaciones originen un incremento en los niveles basales de expresión.

El dominio CRD podría tener un papel similar al de la región 1.1 presente sólo en el grupo I de factores sigma de la familia sigma-70 (Gruber y Gross, 2003), y cuya autoinhibición enmascara los determinantes de unión al ADN en moléculas libres. La región 1 de los factores sigma primarios no se encuentra en ECFs, lo que permitiría que pudiesen unirse al ADN en ausencia de polimerasa, y puede que por ello hayan evolucionado los sistemas sigma-antisigma de manera conjunta. Sin embargo, aunque CorE no funciona con un antisigma, no es capaz de unirse al ADN sin que haya  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio. O bien el dominio CRD podría tener un papel similar al de los factores tipo MerR si estuviese implicado en la interacción con la ARN polimerasa para permitir la transcripción de los genes que regula (Hobman, 2007).

El estudio de otro elemento CXC entre los dominios sigma-70 de CorE 2.4 y 4.2 (Fig. 5.5), absolutamente conservado en las proteínas de tipo procarionta que conservan la secuencia CRD, arrojará luz a la función de CorE.

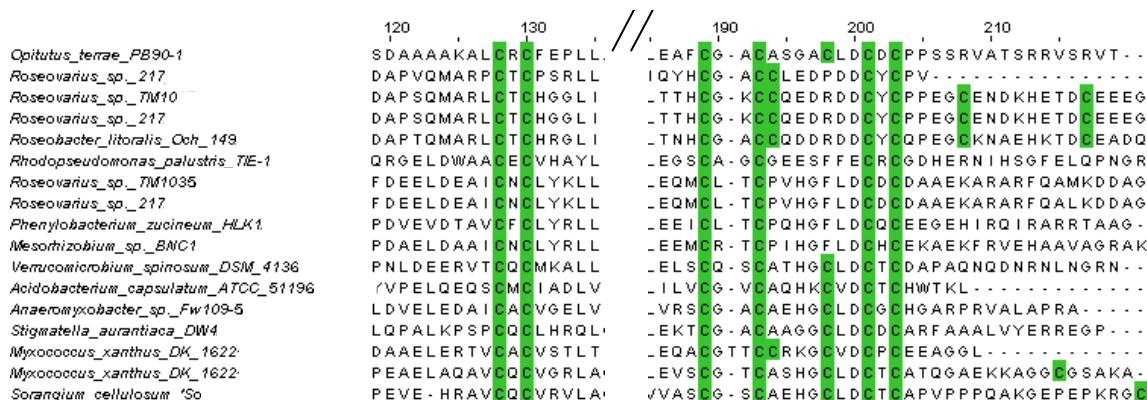


Figura 5.5. Alineamiento de ECFs con región CRD. Se muestran dos regiones del alineamiento cuyas posiciones aminoacídicas se indican en la parte superior de la figura. A la derecha se indica la especie a la que pertenece cada proteína. Las líneas oblicuas indican discontinuidad en el alineamiento. Sobre fondo verde se representan los residuos de cisteína.

Todos estos resultados demuestran que CorE va a promover una respuesta específica frente al cobre, sensibilizándose y desensibilizándose rápidamente de acuerdo con el estado redox del cobre en el citoplasma de las células. La presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  parece ser el desencadenante para la respuesta de este ECF, probablemente siendo reconocida a través del dominio CRD, promoviendo la transcripción de genes cuyos productos permitirán la destoxicación de este metal. Para su funcionamiento no es necesaria la presencia de un factor antisigma, pues esta proteína va a ser incapaz de unirse al ADN en ausencia del estímulo adecuado.

A pesar de que el cobre ha tenido un papel muy importante en la sociedad durante milenios, con un papel crítico en numerosas enfermedades, los mecanismos implicados en el metabolismo, adquisición y distribución de este metal han sido identificados en un periodo relativamente reciente (Kim *et al.*, 2008). Aún queda un gran abanico de preguntas relacionadas con la homeostasis del cobre que deben encontrar respuesta, muchas de las cuales contribuirán a mejorar el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson.



## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

- 1- La tolerancia al cobre en *M. xanthus* es 17 veces menor durante el desarrollo que durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta respuesta son inducibles, y su activación permite igualar la resistencia de la bacteria a lo largo del ciclo de vida.
- 1- *Copper tolerance in M. xanthus is 17 times lower during development than during vegetative growth. However, mechanisms involved in this response are inducible and their activation in this bacterium allows reaching same copper resistance rates along the life cycle.*
- 2- El genoma de *M. xanthus* posee una gran cantidad de genes relacionados con la homeostasis del cobre, entre los que se encuentran aquellos que codifican para las oxidasas multicobre CuoB y CuoC.
- 2- *M. xanthus genome harbours a plethora of genes related with copper homeostasis, two of them which code for two multicopper oxidases (CuoB and CuoC).*
- 3- CuoC se expresa de manera constitutiva y se induce por cobre durante el crecimiento vegetativo y por el agotamiento de nutrientes en el ciclo de desarrollo, por lo que proporciona una protección permanente que confiere resistencia a este metal a lo largo de todo el ciclo de vida, y especialmente durante el proceso de esporulación.
- 3- *CuoC has basal expression and it is induced by copper during growth and by starvation in development, thus it plays an important role conferring permanent protection against copper along the life cycle and especially in the sporulation process.*
- 4- CuoB es sumamente importante en la homeostasis del cobre de *M. xanthus*, siendo necesaria para hacer frente a un exceso de este metal al estar implicada en la respuesta primaria desencadenada por este metal.
- 4- *CuoB is very important in M. xanthus copper homeostasis, and it is essential to cope with toxic concentrations of copper ions, being involved in the primary adaptive response to this metal.*
- 5- CuoB es una metalooxidasa que va a proteger el periplasma de *M. xanthus* ante un estrés por cobre a través de su actividad cuproso oxidasa.
- 5- *CuoB is a metallo-oxidase, and it is involved in periplasm detoxification through cuprous oxidase activity.*
- 6- CorE es un factor sigma de tipo ECF que regula la expresión de genes involucrados en la respuesta primaria al cobre como la oxidasa multicobre CuoB, y regula parcialmente su propia expresión.
- 6- *CorE is an RNA polymerase ECF sigma factor that promotes the transcription of genes involved in the primary adaptive response to copper like the multicopper oxidase cuoB, and it partially regulates its own expression.*

- 7- CorE no funciona con un antisigma que lo inactive. El perfil de los genes regulados por él, su perfil de expresión y su estabilidad en la célula indican que la proteína oscila entre un estado activo y otro inactivo.
- 7- *CorE does not have a cognate antisigma factor. The expression profiles exhibited by CorE regulated genes, its own expression profile and its stability in vivo point the direction that CorE fluctuates between an active and an inactive state.*
- 8- El estado activo de CorE tiene lugar en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , y el estado inactivo en presencia de  $\text{Cu}^+$ . De hecho, sólo se une a los promotores que reconoce en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .
- 8- *CorE is modulated by the redox state of copper, being active in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and inactive when it detects  $\text{Cu}^+$ . In fact, it needs  $\text{Cu}^{2+}$  to bind DNA promoter regions.*
- 9- El dominio rico en cisternas presente en CorE es responsable de la actividad de esta proteína. Los residuos de cisteína presentes en esta región están implicados en el reconocimiento del metal, siendo dos de ellos imprescindibles para la actividad de CorE dependiente de cobre: C189 para el reconocimiento de  $\text{Cu}^{2+}$  y sensibilización, y C184 para el reconocimiento de  $\text{Cu}^+$  y desensibilización.
- 9- *The CorE cysteine rich domain directs the activity of this protein. Cysteine residues in this region are involved in copper recognition, and two of them are essential for CorE copper dependent activity. C189 is mandatory to sensitize CorE, sensing  $\text{Cu}^{2+}$ , and C184 is very important to desensitize CorE, detecting  $\text{Cu}^+$ .*







## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agranoff, D.D., y Krishna, S. (1998) Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol* 28: 403-412.
- Alexandre, G., y Zhulin, I.B. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotech* 18: 41-42.
- Alvarez-Martinez, C.E., Baldini, R.L., y Gomes, S.L. (2006) A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. *J Bacteriol* 188: 1835-1846.
- 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.
- Andrews, N.C. (2002) Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol* 6:181-186.
- Anthony, J.R., Newman, J.D., y Donohue, T.J. (2004) Interactions between the *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and its anti-sigma factor, ChrR. *J Mol Biol* 341: 345-360.
- Arguello, J.M., Eren, E., y Gonzalez-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P<sub>1B</sub>-ATPases. *Biometals* 20: 233-248.
- Arredondo, M., y Nuñez, M.T. (2005) Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 26: 313-327.
- Audi, G (2003). The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nucl Phys A* 729: 3-128.
- 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.
- Balasubramanian, R., y Rosenzweig, A.C. (2008) Copper methanobactin: a molecule whose time has come. *Curr Opin Chem Biol* 12: 245-249.
- Banci, L., y Rosato, A. (2003) Structural genomics of copper homeostasis. *Acc Chem Res* 36: 215-221.
- Barre, O., Mourlane, F., y Solioz, M. (2007) Copper induction of lactate oxidase of *Lactococcus lactis*: a novel metal stress response. *J Bacteriol* 189: 5947-5954.
- Bashyam, M. D., y Hasnain, S. E. (2004) The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect Genet Evol* 4: 301-308.
- Battista, J. R. (1997). Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol* 51: 203-224.
- Bauer, C.G., Kuehn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe, C.R., y Scheller, F.W. (1999) New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius J Anal Chem* 364: 179-183.
- Beaudoin, J., y Labbe, S. (2001) The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J Biol Chem* 276: 15472-15480.
- Beebe, J.M. (1941) The morphology and cytology of *Myxococcus xanthus*, N. SP. *J Bacteriol* 42: 193-223.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., y Brunak, S. (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6: 167–175.
- Berks, B. C., Palmer, T., y Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* 8: 174–181.
- Berleman, J. E., y Kirby, J. R. (2009). Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol Rev* 33: 942–957.
- 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.
- Bertinato, J., y L'Abbé, M.R. (2004) Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J Nutr Biochem* 15: 316-322.
- Blackhart, B.D., y Zusman, D.R. (1985) “Frizzy” genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8767-8770.
- Blango, M. G., y Mulvey, M. A. (2009) Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr Opin Microbiol* 12: 177–181.
- Bode, H. B., y Muller, R. (2008) Secondary metabolism in Myxobacteria. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:259-282.
- Brenner, D.J., Staley, J.T., y Krieg, N.R. (2005) Classification of prokaryotic organisms and the concept of speciation. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Brenner, D.J., Staley, J.T., Krieg, N.R., y Garrity, G., eds. 2ª ed. Springer New York, NY. pp: 27–32.
- Bretscher, A.P., y Kaiser, D.T. (1978) Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J Bacteriol* 133:763-768.
- Brissos, V., Pereira, L., Munteanu, F.D., Cavaco-Paulo, A., y Martins, L. O. (2009) Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. *Biotechnol J* 4: 558–563.
- Brooks, B.E., y Buchanan, S.K. (2008) Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1930-1945.
- Brooks, D.J., y Fresco, J.R. (2002) Increased frequency of cysteine, tyrosine, and phenylalanine residues since the last universal ancestor. *Mol Cell Proteomics* 1: 125–131.
- Brown, D. R. (2009) Brain proteins that mind metals: a neurodegenerative perspective. *Dalton Trans* 4069–4076.
- Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P., y Hobman, J.L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27: 145–163.
- Browning, D.F., y Busby, S.J.W. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol.* 2: 1-9.
- Browning, D.F., Whitworth, D.E., y Hodgson, D.A. (2003) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Mol Microbiol* 48: 237-251.

- Bull, P.C., y Cox, D.W. (1994) Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy metal transport. *Trends Biochem Sci* 10: 246-252.
- Burgess, R.R. (1969) Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 244: 6168-6176.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., y Bautz, E.K. (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43-46.
- Burkhead, J.L., Reynolds, K.A.G., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., y Pilon, M. (2009) Copper homeostasis. *New Phytol* 182: 799–816.
- 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.
- Camakaris, J., Voskoboinik, I., y Mercer, J.F. (1999) Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 225-232.
- Campbell, E.A., Westblade, L.F., y Darst, S. A. (2008) Regulation of bacterial RNA polymerase  $\sigma$  factor activity: a structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 11: 121–127.
- Campbell, E.A., Greenwell, R., Anthony, J.R., Wang, S., Lim, L., Das, K., Sofia, H.J., Donohue, T.J., Darst, S.A. (2007) A conserved structural module regulates transcriptional responses to diverse stress signals in bacteria. *Mol Cell* 27: 793–805.
- Campbell, E.A., Tupy, J.L., Gruber, T.M., Wang, S., Sharp, M.M., Gross, C.A., Darst, S.A. (2003). Crystal structure of *Escherichia coli*  $\sigma^E$  with the cytoplasmic domain of its anti- $\sigma$  RseA. *Mol Cell* 11:1067–1078.
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., y Darst, S.A. (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9: 527-539.
- Canovas, D., Cases, I., y de Lorenzo, V. (2003) Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 5: 1242-1256.
- Cases, I., y de Lorenzo, V. (2005) Promoter transcription in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* 3: 105-118.
- Castañeda-García, A. (2007) Análisis de las proteínas quinasas de tipo eucariota de *Myxococcus xanthus*: caracterización molecular de la proteína PksA (Mxan5696). Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada, Granada. pp: 21.
- Cavet, J. S., Borrelly, G. P., y Robinson, N. J. (2003) Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol Rev* 27: 165–181.
- Cerpa, W., Varela-Nallar, L., Reyes, A.E., Minniti, A.N., e Inestrosa, N.C. (2005) Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? *Mol Aspects Med* 26: 405-420.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., y Mondragon, A.(2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 301: 1383-1387.
- Checa, S.K., Espariz, M., Pérez Audero, M.E., Botta, P.E., Spinelli, S.V., y Soncini, F.C. (2007) Bacterial sensing and detoxification of gold salts. *Mol Microbiol* 63: 1307–1318.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Chen, H., Hu, J., Chen, P. R., Lan, L., Li, Z., Hicks, L. M., Dinner, A.R., y He, C. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13586-13591.
- Cheng, C.Y., Shieh, S.Y., Hsu, C.C., y Yang, M.T. (2008) Characterization and transcriptional analysis of an ECF sigma factor from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS Microbiol Lett* 289: 250-257.
- 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.
- 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 *espAB* locus. *Mol Microbiol* 34: 714-725.
- Claus, H. (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* 179: 145-150.
- Cobine, P.A., Ojeda, L.D., Rigby, K.M., y Winge, D.R. (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 279:14447-14455.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., y Barrell, B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-44.
- Cooksey, D.A. (1994) Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 14: 381-386.
- 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.
- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., y Klausner, R. D. (1994) *J Biol Chem* 269: 25660-25667.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D., and Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276: 20866-20875.
- Davis, A.V., y O'Halloran, T. V. (2008) A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol* 4: 148-151.
- Dawid, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* 24:403-427.
- De Marco, A., y Roubelakis-Angelakis, K.A. (1997) Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution of regenerating protoplasts. *Phytochemistry* 46: 421-425.
- DeVries, C.A., y Ohman, D.E. (1994). Mucoïd to-nonmucoïd conversion in alginate producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J Bacteriol* 176:6677-6687.

- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu Y-C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., y Kanost, M.R. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 29-41.
- Dombroski, A.J., Johnson, B.D., Lonetto, M., y Gross, C.A. (1996) The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8858-8862.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., y Gross, C.A. (1993) The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. *Cell Mol Biol Res*. 39: 311-317.
- Dosanjh, N.S., West, A.L., y Michel, S.L. (2009) *Helicobacter pylori* NikR's interaction with DNA: a two-tiered mode of recognition. *Biochemistry* 48: 527-536.
- Dosanjh, N.S., Hammerbacher, N.A., y Michel, S.L. (2007) Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA) DNA interaction: metal ion requirements and sequence specificity. *Biochemistry* 46: 2520-2529.
- Doughty, D.M., Kurth, E.G., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J., y Bottomley P.J. (2008) Evidence for involvement of copper ions and redox state in regulation of butane monooxygenase in *Pseudomonas butanovora*. *J Bacteriol* 190: 2933-2938.
- 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., 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.
- Dunny, G. M., Brickman, T. J., y Dworkin, M. (2008) Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays* 30:296-298.
- Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R., y Goodenough, P.W. (2001) Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci* 26: 740-746.
- Dupuy, B., y Matamouros, S. (2006) Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase sigma-factors. *Res Microbiol*157: 201-205.
- Durão, P., Chen, Z., Silva, C.S., Soares, C.M., Pereira, M.M., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Bento, I., Lindley, P.F., y Martins, L.O. (2008) Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. *Biochem J* 412: 339-346.
- Durão, P., Chen, Z., Fernandes, A. T., Hildebrandt, P., Murgida, D. H., Todorovic, S., Pereira, M. M., Melo, E. P., Martins, L.O. (2008) Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: Characterization of fully copper loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem*, 13: 183-193.
- Dworkin, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* 60: 70-102.
- Dworkin, M. (1993) Cell surfaces and appendages. En: *Myxobacteria II*. Dworkin, M., y Kaiser, D., eds. ASM Press, Washington, DC. pp: 63-83.
- El Gheriany, I.A., Bocioaga, D., Hay, A. G., Ghiorse, W. C., Shuler, M. L., y Lion, L. W. (2009) Iron requirement for Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. *Appl Environ Microbiol* 75: 1229-1235.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Elías-Arnanz, M., Fontes, M., y Padmanabhan, S. (2008) Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex regulatory network. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp: 211-225.
- Elías-Arnanz, M. y Murillo, F.J. (1991) Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *J Gen Microbiol* 137:381-388.
- Enz, S., Braun, V., y Crosa, J.H. (1995) Transcription of the region encoding the ferric dicitrate-transport system in *Escherichia coli*: similarity between promoters for fecA and for extracytoplasmic function sigma factors. *Gene* 163: 13-18.
- Erickson, J.W., y Gross, C.A. (1989) Identification of the  $\sigma^E$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate a factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev* 3: 1462-1471.
- Fernandes, A. T., Martins, L. O. y Melo, E.P. (2009) The hyperthermophilic nature of the metallo-oxidase from *Aquifex aeolicus*. *Biochim Biophys Acta* 1794: 75–83.
- Fernandes, A.T., Soares, C.M., Pereira, M.M., Huber, R., Grass, G., Martins, L.O. (2007) A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J* 274: 2683–2694.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., 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* 36: 281-288.
- Finney, L., Mandava, S., Ursos, L., Zhang, W., Rodi, D., Vogt, S., Legnini, D., Maser, J., Ikpatt, F., Olopade, O.I., y Glesne, D. (2007) X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2247–2252.
- Finney, L.A., y O'Halloran, T.V. (2003) Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300: 931-936.
- Fogel, S., Welch, J., Cathala, G., y Karin, M. (1983). Gene amplification in yeast: CUP1 copy number regulates copper resistance. *Curr Genet* 7: 347–355.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., y Nies, D.H. (2003) Molecular analysis of the copper-transporting CusCFBA efflux system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:3804–3812.
- Frausto da Silva, J.J.R., y Williams, R.J.P. (2001) *The Biological Chemistry of Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, New York. p: 575.
- Gaetke, L.M., y Chow, C.K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
- Galbis-Martínez, L., Galbis-Martínez, M., Murillo, F.J., y Fontes, M. (2008) An anti-antisigma factor in the response of the bacterium *Myxococcus xanthus* to blue light. *Microbiology* 154: 895-904.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., y Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. En: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. pp: 571-607.
- Gat, O., Mendelson, I., Chitlaru, T., Ariel, N., Altboum, Z., Levy, H., Weiss, S., Grosfeld, H., Cohen, S., Shafferman, A. (2005) The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant. *Mol Microbiol* 58: 533-551.

- 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.
- Giedroc, D.P. (2009) Hydrogen peroxide sensing in *Bacillus subtilis*: it is all about the (metallo)regulator. 73: 1-4.
- Giedroc, D.P., y Arunkumar, A.I. (2007) Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans* 3107-3120.
- 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.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L., y Bally, R. (1993) Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere – evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett* 108: 205-210.
- 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., HinkleG., 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 U S A* 103: 15200-15205.
- Gorham, H.C., McGowan, S.J., Robson, P.R.H., y Hodgson, D.A. (1996) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: Light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol Microbiol* 19: 171-186.
- Gorren, A.C.F., Schrammel, A., Schmidt, K, y Mayr, B. (1996) Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch Biochim Biophys* 330:219-228.
- Gött, P., y Boos, W. (1988) The transmembrane topology of the *sn*-glycerol 3-phosphate permease of *Escherichia coli* analysed by *phoA* and *lacZ* protein fusions. *Mol Microbiol* 2:655-663.
- Gralla, E.B., Thiele, D.J., Silar, P., y Valentine, J.S. (1991) ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8558-8562.
- Grass, G., y Rensing, C. (2001a) CueO is a multicopper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 902-908.
- Grass, G., y Rensing, C. (2001b) Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 2145-2147.
- Grosse, C., Friedrich, S., y Nies, D. H. (2007) Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J Molec Microbiol Biotecnol* 12: 227-240.
- Gruber, T.M., y Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57: 441-466.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Gupta, A., Whinon, B.A., Morby, A.P., Huckle, J.W., y Robinson, N.J. (1992) Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC 6301 selected for tolerance to cadmium. *Proc R Soc London B* 248: 273-281.
- Hakemian, A.S., Tinberg, C.E., Kondapalli, K.C., Telser, J., Hoffman, B.M., Stemmler, T.L., y Rosenzweig, A.C. (2005) The copper chelator methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b binds Cu(I). *J Am Chem Soc* 127: 17142-17143.
- Hall, S.J., Hitchcock, A., Butler, C.S., y Kelly, D.J. (2008) A multicopper oxidase (Cj1516) and a copA homologue (Cj1161) are major components of the copper homeostasis system of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 190: 8075-8085.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J.M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem J*. 219: 1-4.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K., y Gitlin, J.D. (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10812-10817.
- Helmann, J.D. (2006) Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* sigmaW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds. *Sci Prog* 89:243-266.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* 46: 47-110.
- Heredia, J., Crooks, M., y Zhu, Z. (2001) Phosphorylation and Cu<sup>+</sup> coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J Biol Chem* 276: 8793-8797.
- Hillesland, K.L., Velicer, G.J., y Lenski, R.E. (2009) Experimental evolution of a microbial predator's ability to find prey. *Proc R Soc Lond B* 276:459-467.
- Hobman, J.L. (2007) MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol Microbiol* 63: 1275-1278.
- Hodgkin, J., y Kaiser, D. (1979) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol Gen Genet* 171: 177-191.
- Hodgkin, J., y Kaiser, D. (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 2938-2942.
- Hodgson, D.A. (1993) Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: genetic analysis of the *carR* region. *Mol Microbiol* 7: 471-488.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.I., Thacker, J.R., y Kües, U. (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* 273: 2308-2326.
- Hopkins, C.D., y Wipf, P. (2009) Isolation, biology and chemistry of the disorazoles: new anti-cancer macrodiolides. *Nat Prod Rep* 26: 585-601.
- Hong, Y-C., Leary, S.C., Cobine, P.A., Young, F.B.J., George, G.H., Shoubridge, E.A., y Winge, D.R. (2005) Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J Biol Chem* 280: 41122-41124.

- Huang, X.J., Decatur, A., Sorokin, A., y Helmann, J.D. (1997) The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. *J Bacteriol* 179: 2915-2921.
- Huffman, D.L., y O'Halloran, T.V. (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 70: 677-701.
- Hughes, K.T., y Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 52: 231-286.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuče, B.A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S., y Sigrist, C.J. (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* 36: 245-249.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R.D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Quinn, A.F., Selengut, J.D., Sigrist, C.J., Thimma, M., Thomas, P.D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C.H., and Yeats, C. (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* 37: 211-215.
- Inouye, M., Inouye, S. y Zusman, D.R. (1979) Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: pattern of protein synthesis. *Dev Biol* 68: 579-591.
- 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.
- Irving, H.M.N.H., y Williams, R.J.P. (1953). The stability of transition-metal complexes. *J Chem Soc*: 3192-3210.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNAPolymerase. *Annu Rev Microbiol* 54: 499-518.
- Ishmael, J., Gopinath, C., y Howell, J.M. (1971) Experimental chronic copper toxicity in sheep-histological and histochemical changes during development of lesions in liver. *Res Vet Sci* 12: 358-366.
- Jagadeesan, S., Mann, P., Schink, C.W., y Higgs, P. (2009) A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* 284: 21435-21445.
- Jian, X., Wasinger, E.C., Lockard, J.V., Chen, L.X., y He, C. (2009) Highly sensitive and selective gold(I) recognition by a metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. *J Am Chem Soc* 131: 10869-10871.
- Jin, Y.H., Dunlap, P.E., McBride, S.J., Al-Refai, H., Bushel, P.R., y Freedman, J.H. (2008) Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet* 4: e1000053.
- Julian, D.J., Kershaw, C.J., Brown, N.L., y Hobman, J.L. (2008) Transcriptional activation of MerR family promoters in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Antonie Van Leeuwenhoek*.96: 149-159
- Julien, B., Kaiser, A.D., y Garza, A. (2000) Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9098-9103.
- Jungmann, J., Reins, H.-A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R. Kosman, D., y Jentsch, S. (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* 12: 5051-5056.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Kaiser, D. (2008): Myxococcus: from single-cell polarity to complex multicellular patterns. *Annu Rev Genet* 42: 109-130.
- Kaiser, D. (2004). Signaling in Myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* 58: 75-98.
- Kaiser, D. (2003) Coupling cell movement to multicellular development in Myxobacteria. *Nature* 1: 45-54.
- Kaiser, D. (2000) Bacterial motility: how do pili pull? *Curr Biol* 10: 777-780.
- Kaiser, D., y Dworkin, M. (2008) From glicerol to the genome. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp: 3-15.
- 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.
- Kang, J.G., Paget, M.S., Seok, Y.J., Hahn, M.Y., Bae, J.B., Hahn, J.S., Kleanthous, C., Buttner, M.J., y Roe, J.H. (1999) RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J* 18: 4292-4298.
- Karlin, S., Brocchieri, L., Mrazek, J. y Kaiser, D. (2006) Distinguishing features of delta-proteobacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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.
- Kawano, H., Takahashi, H., Abe, F., Kato, C., y Horikoshi, K. (2009) Identification and characterization of two alternative sigma factors of RNA Polymerase in the deep-sea piezophilic bacterium *Shewanella violacea*, Strain DSS12. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 200-202.
- Keller, L., y Surette, M.G. (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4: 249-258.
- Keseler, I.M., y Kaiser, D. (1997)  $\sigma^{54}$ , a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1979-1984.
- Kim, B.E., Nevitt, T., y Thiele, D.J. (2008) Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 4: 176-185.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1991) C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J Bacteriol* 173:1722-1728.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990) C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Cell* 61:19-26.
- Kimura, Y., Saiga, H., Hamanaka, H., y Matoba, H. (2006) *Myxococcus xanthus* twin-arginine translocation system is important for growth and development. *Arch Microbiol* 184: 387- 396.
- Kimura, T., y Nishioka, H. (1997) Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 389: 237-242.
- Kirazov, L.P., Venkov, L.G., y Kirazov, E. P. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation. *Anal Biochem* 208: 44-48.
- Koay, M., Zhang, L., Yang, B., Maher, M.J., Xiao, Z., y Wedd, A.G.(2005) CopC protein from *Pseudomonas syringae*: Intermolecular transfer of copper from both the copper(I) and copper(II) sites. *Inorg Chem* 44: 5203-5205.

- Koch, K.A., y Thiele, D.J. (1996) Autoactivation by a *Candida glabrata* copper metalloregulatory transcription factor requires critical minor groove interactions. *Mol Cell Biol* 16: 724–734.
- 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 U S A* 101:3160-3165.
- Kosman, D. J. (2002) Fet3p, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism. En: *Advances in Protein Chemistry*. Valentine, J. S., y Gralla, E., eds. Elsevier, New York, NY., p: 221.
- Kožíšek, M., Svatoš, A., Buděšínský, M., Muck, A., Bauer, M.C., Kotrba, P., Ruml, T., Havlas, Z., Linse, S., y Rulíšek, L. (2008) Molecular design of specific metal-binding peptide sequences from protein fragments: theory and experiment. *Chem-Eur J* 14: 7836-7846.
- Kralovicova, S., Fontaine, S.N., Alderton, A., Alderman, J., Vala-Ragnarsdottir, K., Collins, S.J., y Brown, D.R. (2009) The effects of prion protein expression on metal metabolism. *Mol Cell Neurosci* 41: 135–147.
- Kroos, L., e Inouye, S. (2008) Transcriptional regulatory mechanisms during *Myxococcus xanthus* development. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:149-168.
- 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.
- Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N.M., Søgaaard-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.
- Kulkarni, R.D., y Summers, A.O. (1999) MerR cross-links to the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\sigma^{70}$  subunits of RNA polymerase in the preinitiation complex at the *merTPCAD* promoter. *Biochemistry* 38: 3362-3368.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2008) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb Cell Fact.* 20:7-32.
- Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992) A-Signaling and cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* 174: 7360-7369.
- Labbé, S., Zhu, Z., y Thiele, D. J. (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* 272: 15951–15958.
- 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, P.A., Tullman-Ercek, D., Georgiou, G. (2006) The bacterial Twin-Arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60: 373–95.
- Leonardy, S., Freymark, G., Hebener, S., Ellehauge, E., andy Sogaard-Andersen, L. (2007) Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J* 26: 4433–4444.
- Lewinson, O., Lee, A.T., y Rees, D.C. (2009) A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4677–4682.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Li, S.F., Lee, B.U., y Shimkets, L.J. (1992) *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev.* 6: 401-410.
- Lin, S.J., Pufahl, R.A., Dancis, A., O'Halloran, T.V., y Culotta. V.C. (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* 272: 9215-9220.
- Liu, T., Chen, X., Ma, Z., Shokes, J., Hemmingsen, L., Scott, R.A., y Giedroc, D.P. (2008) A Cu(I)-sensing ArsR family metal sensor protein with a relaxed metal selectivity profile. *Biochemistry* 47: 10564-10575.
- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C., Ratledge, C., y Bitter, W. (2008) Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* 67: 458-472.
- Lobley, A., Whitmore, L., y Wallace, B.A. (2002). DICHROWEB: An interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18: 211–212.
- Lonetto, M., Gribskov, M., y Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174: 3843-3849.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., y Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7573-7577.
- Lourenço, R.F., y Gomes, S.L. (2009) The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigma(E)-ChrR system in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 72: 1159-1170.
- Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., y Dmitriev, O.Y. (2007) Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87: 1011-1046.
- Lynch, M., y Conery J.S.T (2003) The origins of genome complexity. *Science* 302: 1401-1404.
- Macomber, L., Rensing, C., y Imlay, J.A. (2007) Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189:1616–1626.
- Magnani, D., Barre, O., Gerber, S.D., y Solioz, M. (2008) Characterization of the CopR regulon of *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol* 190: 536-545.
- Marles-Wright, J., y Lewis, R.J. (2007) Stress responses of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* 17: 755-760.
- Martinez-Argudo, I., Ruiz-Vazquez, R.M., y Murillo, F.J. (1998) The structure of an ECF-sigma-dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 30: 883-893.
- Martinez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M., y Ramos, J.L. (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* 4: 842-855.
- Martinez-Cañamero, M., Muñoz-Dorado, J., Farez-Vidal, E., Inouye, M., and Inouye, S. (1993) Oar, a 115-kilodalton membrane protein required for development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 175: 4756-4763.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., y Henriques, A.O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem* 277: 18849–18859.

- Mascher, T., Hachmann, A.B., y Helmann, J.D. (2007) Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol* 189: 6919-6927.
- Mazurakova, V., Sevcikova, B., Rezuchova, B., y Kormanec, J. (2006) Cascade of sigma factors in Streptomyces: identification of a new extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma_J$  that is under the control of the stress-response sigma factor H in *Streptomyces coelicolor* A32. *Arch Microbiol* 186: 435-446.
- Mayer, A.M., y Staples, R.C. (2002) Laccase: new function to and old enzyme. *Phytochem* 60: 551-565.
- McGowan, S.J. (1993) Further genetic studies of the *carQRS* region of *Myxococcus xanthus*. PhD Thesis, University of Warwick, Coventry, UK.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaes, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., y Wattiez, R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 385-410.
- 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.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Minnig, K., Barblan, J.L., Kehl, S., Moller, S.B., y Mauel, C. (2003) In *Bacillus subtilis* W23, the duet sigma(X) sigma(M), two sigma factors of the extracytoplasmic function subfamily, are required for septum and wall synthesis under batch culture conditions. *Mol Microbiol* 49: 1435-1447.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., y Duran, N. (2002) Potential application of laccase in the food industry. *Trends Sci Technol* 13: 205-216.
- Miseta, A., y Csutora, P. (2000) Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol Biol Evol* 17: 1232-1239.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 28: 1059-1066.
- Miticka, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Humphreys, S., Farn, J., Roberts, M., y Kormanec, J. (2003) Transcriptional analysis of the *rpoE* gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor  $\sigma^E$  in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 226: 307-314.
- Mittenhuber, G. (2002) An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4:77-91.
- Moffit, W. (1956) The optical rotatory dispersion of simple polypeptides II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42: 736-746
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén, F., Moya, R., Hernández, M., y Arias, E. (2009) Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int Microbiol* 12: 13-21.
- 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.
- Morby, A.P., Turner, J.S., Huckle, J.W., Robinson, N.J. (1993) SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Res* 21: 921-925.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- 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.
- Murakami, K.S., Masuda, S., y Darst, S.A. (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296: 1280-1284.
- Nakamura, K., y Go, N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol Life Sci* 62: 2050-2060.
- Nakunst, D., Larisch, C., Huser, A.T., Tauch, A., Puhler, A., y Kalinowski, J. (2007) The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J Bacteriol* 189: 4696-4707.
- Newman, J.D., Anthony, J.R., y Donohue, T.J. (2001) The importance of zinc-binding to the function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an anti-sigma factor. *J Mol Biol* 313: 485-99.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 730-750.
- Nose, Y., Rees, E.M., y Thiele, D.J. (2006) Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci* 31: 604-607.
- O'Connor, K. A., y Zusman, D.R. (1991) Development in *Myxococcus xanthus* involves differentiation into two cell types, peripheral rods and spores *J Bacteriol* 173: 3318-3333.
- O'Halloran, T.V., y Culotta, V.C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 275: 25057-25060.
- Oguiza, J.A., Kiil, K., y Ussery, D.W. (2005) Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas syringae*. *Trends Microbiol* 13: 565-568.
- Osman, D., y Cavet, J.S. (2008) Copper homeostasis in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 65: 217-247.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale, and T. V. O'Halloran. (2001). The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 30670-30677.
- Outten, W.F., Outten, C.F., y O'Halloran, T.V. (2000) Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. En: *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. y Hengge-Aronis, R., eds. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., pp: 145-157.
- Paget, M.S., y Helmann, J.D. (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4: 203.
- Paget, M.S., Bae, J-B., Hahn, M-Y., Li, W., Kleanthous, C., Roe, J-H., y Buttner, M.J. (2001) Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch. *Mol Microbiol* 39: 1036-1047.
- Paget, M.S., Leibovitz, E., y Buttner, M.J. (1999) A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 33: 97-107.
- Peariso, K., Huffman, D.L., Penner-Hahn, J.E., y O'Halloran, T.V. (2003) The PcoC copper resistance protein coordinates Cu(I) via novel S-methionine interactions. *J Am Chem Soc* 125: 342-343.

- Peña, M.M.O., Puig, S., y Thiele, D.J. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* 275: 33244–33251.
- Penella, M.A., y Giedroc, D.P. (2005) Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals* 18: 413-428.
- Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., Correia dos Santos, M.M., Robalo, M.P. Martins, L.O. (2009) Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *J Biotechnol* 139: 68–77.
- Pérez, J., y Moraleda-Muñoz, A. (2009) Fungal Lignocellulolytic Enzymes: Applications in Biodegradation and Bioconversion. En: En: *Micofactories*. Bentham e-Books. *In press*.
- Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Muller, R., y Muñoz-Dorado, J. (2008) Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15950-15955.
- Portmann, R., Poulsen, K.R., Wimmer, R., y Solioz, M. (2006) CopY-like copper inducible repressors are putative 'winged helix' proteins. *Biometals* 19: 61-70.
- Portmann, R., Magnani, D., Stoyanov, J.V., Schmechel, A., Multhaup, G., y Solioz, M. (2004) Interaction kinetics of the copper-responsive CopY repressor with the *cop* promoter of *Enterococcus hirae*. *J Biol Inorg Chem* 9: 396–402.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., y Levesque, R.C. (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 32: 38-55.
- Predki, P.F., y Sarkar, B. (1992) Effect of replacement of “zinc finger” zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem* 267: 5842–5846.
- Provencher, S.W., y Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20: 33-37.
- Puig, S., y Thiele, D.J. (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* 6: 171-180.
- Pushker, R., Mira, A. y Rodríguez-Valera, F. (2004) Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biol* 5:R27.
- Quintanar, L., Stoj, C., Taylor, A.B., Hart, P.J., Kosman, D.J., y Solomon, E.I. (2007) Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner. *Acc Chem Res* 40: 445–452.
- Rae, T.D., Torres, A.S., Pufahl, R.A., y O'Halloran, T.V. (2001) Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem* 276: 5166-5176.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., y O'Halloran, T.V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., y Verma, A. (2008) Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. *Crit Rev Microbiol* 34: 189-206.
- Raivio TL, Silhavy T.J. (1999) The  $\sigma^E$  and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol* 2: 159–165.
- Raivio, T.L., y Silhavy, T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 55: 591-624.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Reichenbach, H. (2005) *Myxococcales*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Brenner, D.J., Staley, J.T., Krieg, N.R., y Garrity, G., eds. 2ª ed. Springer New York, NY. pp: 1059-1072.
- Reichenbach, H. (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* 1: 15-21.
- Reichenbach, H. (1993) En *Myxobacteria II*. Dworkin, M., y Kaiser, D., eds. ASM Press, Washington, DC. pp: 13-62.
- 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.
- Rensing, C., y Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27:197-213.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., y Rosen, B.P. (2000) CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 652-656.
- Requena, J.R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E.R., Prusiner, S.B., y Levine, R.L. (2001) Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa (29-231) prion protein. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7170-7175.
- Ridge, P.G., Zhang, Y., Gladyshev, V.N. (2008) Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS ONE* 3: e1378.
- Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24: 219-226.
- Roberts, S.A., Wildner, G.F., Grass, G., Weichsel, A., Ambrus, A., Rensing, C., y Montfort, W.R. (2003) A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* 278: 31958-31963.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C., y Montfort, W.R. (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 99: 2766-2771.
- Rodrigue, S., Brodeur, J., Jacques, P.E., Gervais, A.L., Brzezinski, R., y Gaudreau, L. (2007) Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays. *J Bacteriol* 189: 1505-1513.
- Rodriguez, 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-Couto, S., y Toca-Herrera, J.L. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24: 500-513.
- Rolbetzki, A., Ammon, M., Jakovljevic, V., Konovalova, A., y Sogaard-Andersen, L. (2008) Regulated secretion of a protease activates intercellular signaling during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev Cell* 15: 627-634.
- Romero-Isart, N., y Vasak, M. (2002). Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem* 88: 388-396.
- Ronning, C.M., y Nierman, W.C. (2008) The genomes of *Myxococcus xanthus* and *Stigmatella aurantiaca*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:285-298.
- Rouvière, P.E., De Las Peñas, A., Meccas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E., y Gross, C.A. (1995) *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor,  $\sigma^E$ , in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 1032-1042.

- Rowley, D.A., y Halliwell, B. (1983) Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? *Arch Biochem Biophys* 225: 279-284.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J., y Roberts, M. (2006) Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4: 383-394.
- Sager, B., y Kaiser, D. (1993) Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3690-3694.
- 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.
- Sakurai, T., y Kataoka, K. (2007) Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol Life Sci* 64: 2642-2656.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Amat, A., y Solano, F. (1997) A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem Biophys Res Comm* 240: 787-792.
- Sánchez-Sutil, M.C. (2009) Caracterización molecular de la oxidasa multicobre CuoA de *M. xanthus*. Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.
- 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.
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K., y Bruand, C. (2007) An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 189: 4204-4216.
- Schaik, W.V., Tempelaars, M.H., Zwietering, M.H., de Vos, W.M., y Abee, T. (2005) Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating  $\sigma^B$  activity in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 187: 5846-5851.
- Schmid, A.K., y Lidstrom, M.E. (2002) Involvement of two putative alternative sigma factors in stress response of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 184: 6182-6189.
- Selvaraj, A., Balamurugan, K., Yepiskoposyan, H., Zhou, H., Egli, D., Georgiev, O., Thiele, D.J., y Schaffner, W. (2005) Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev* 19: 891-896.
- Sevier, C.S., y Kaiser, C.A. (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 836-847.
- 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., 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.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Shi, X., Stoj, C., Romeo, A., Kosman, D. J., y Zhu, Z. (2003) Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 50309–50315.
- Shimkets, L.J. (1993) The myxobacterial genome. En: *Myxobacteria II*. Dworkin, M., y Kaiser, D., eds. ASM Press, Washington D.C. pp:85-107.
- 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.
- Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., y Gross, C.A. (1989) Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* 206: 591-603.
- Sigel, H., y McCormick, D.B. (1970) Discriminating behavior of metal ions and ligands with regard to their biological significance. *Acc Chem Res* 3: 201-208.
- Silver, S., y Phung, L.T. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 587–605.
- 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.
- Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C., y Montfort, W.R. (2004) Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186: 7815-7817.
- Solioz, M., y Stoyanov, J.V. (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* 27: 183-195.
- Solomon, E.L., Sundaram, U.M., y Machonkin, T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96: 2563-2605.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37: 7185-7193.
- Store, G., y Zheng, M. (2000) Oxidative stress. En: *Bacterial Stress Responses*. Store, G. y Hengge-Aronis, R., eds. ASM Press, Washington D.C. pp: 47-59.
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., y Brown, N.L. (2001) CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 39: 502-511.
- Strausak, D., Mercer, J.F.B., Dieter, H.H., Stremmel, W., y Multhaup, G. (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 55: 175-185.
- Strickland, M. S., Thompson, N. E., y Burgess, R. R. (1988) Structure and function of the sigma-70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Monoclonal antibodies: localization of epitopes by peptide mapping and effects on transcription. *Biochemistry* 27: 5755-5762.
- Stuart, R. K., Dupont, C.L., Johnson, D.A., Paulsen, I.T., y Palenik, B. (2009) Coastal strains of marine *synechococcus* species exhibit increased tolerance to copper shock and a distinctive transcriptional response relative to those of open-ocean strains. *Appl Environ Microbiol* 75: 5047–5057.
- Sun, H., Zusman, D.R., y Shi, W. (2000) Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr Biol* 10: 1143– 1146.

- Sun, R., Converse, P.J., Ko, C., Tyagi, S., Morrison, N.E. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor *sigC* is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol Microbiol* 52: 25–38.
- Swingle, B., Thete, D., Moll, M., Myers, C.R., Schneider, D.J., y Cartinhour, S. (2008) Characterization of the PvdS-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals regulon members and insights regarding PvdS function in other pseudomonads. *Mol Microbiol* 68: 871-889.
- Taylor, A.B., Stoj, C.S., Ziegler, L., Kosman, D.J., y Hart, P.J. (2005) The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15459–15464.
- Terzulli, A.J., y Kosman, D.J. (2009) The Fox1 ferroxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*: a new multicopper oxidase structural paradigm. *J Biol Inorg Chem* 14: 315–325.
- Thakur, K.G., Joshi, A.M., y Gopal, B. (2007) Structural and biophysical studies on two promoter recognition domains of the extra-cytoplasmic function sigma factor sigma(C) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282: 4711-4718.
- Thakur, K.G., y Gopal, B. (2005) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of two domains of a bilobed extra-cytoplasmic function sigma factor SigC from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr F* 61: 779–781.
- Thiele, D.J., y Gitlin, J.D. (2008) Assembling the pieces. *Nat Chem Biol* 4: 145-147.
- Thiele, D.J. (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8: 2745-2752.
- Thieme, D., y Grass, G. (2009) The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis. *Microbiol Res* doi:10.1016/j.micres.2008.12.003
- 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* 3: e2103.
- Totter, S., Waldron, K.J., Firbank, S.J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T.R., Gray, J., Banfield, M.J., Dennison, C., y Robinson, N.J. (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* 455: 1138-1142.
- Totter, S., Harvie, D.R., y Robinson, N.J. (2005) Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc Chem Res* 38: 775–783.
- Tree, J.J., Kidd, S.P., Jennings, M.P., y McEwan, A.G. (2005) Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 1205-1210.
- Turski, M.L., y Thiele, D.J. (2009) New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J Biol Chem* 284: 717-721.
- 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 U S A* 102:14428-14433.
- 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.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Ukaegbu, U.E., y Rosenzweig, A.C. (2009) Structure of the redox sensor domain of *Methylococcus capsulatus* (Bath) MmoS. *Biochemistry* 48: 2207–2215.
- Ukaegbu, U.E., Henery, S., y Rosenzweig, A.C. (2006) Biochemical characterization of MmoS, a sensor protein involved in copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase. *Biochemistry* 45:10191–10198.
- van Schaik, W., y Abee, T. (2005) The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol* 16: 218-224.
- Vanaporn, M., Vattanaviboon, P., Thongboonkerd, V., y Korbsrisate, S. (2008) The rpoE operon regulates heat stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett* 284: 191–196.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., y Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417: 712–719.
- Velicer, G.J., Kroos, L., y Lenski, R.E. (2000) Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* 404: 598-601.
- 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.
- Vila, A.J., y Fernández, C.O. (2001) Copper in electron transfer proteins. En: *Handbook on Metalloproteins*. Bertini, I., Sigel, A., y Sigel, H., eds. CRC Press. New York. pp: 813-855.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., y Lamont, I.L. (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 45: 1177-1190.
- von Rozycki, T., y Nies, D.H. (2008) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Wall, D., y Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32: 1–10.
- Wang, Y., Hemmingsen, L., y Giedroc, D.P. (2005) Structural and functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CmtR, a PbII/CdII-sensing SmtB/ArsR metalloregulatory repressor. *Biochemistry* 44: 8976-8988.
- Ward, J.M., Lew, H., Treuner-Lange, A., y Zusman, D.R. (1998) Regulation of motility behaviour in *Myxococcus xanthus* may require an extracitoplasmic-function sigma factor. *J Bacteriol* 180: 5668-5675.
- Watson, B.F., y Dworkin, M. (1968) Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 96:1465-1473.
- Weissman, K.J., y Müller, R. (2009) A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg Med Chem* 17: 2121–2136.
- Wernimont, A.K., Huffman, D.L., Finney, L.A., Demeler, B., O'Halloran, T.V., y Rosenzweig, A.C. (2003) Crystal structure and dimerization equilibria of PcoC, a methionine-rich copper resistance protein from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* 8: 185–194.
- White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Minton, K.W., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Nelson, K.E., Salzberg, S., Smith, H.O., Venter, J.C., y Fraser, C.M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571–1577.

- Whitmore, L., y Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32: 668-673.
- Williams, R.J.P. (2001) Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev* 216: 583–595.
- Wilson, M.J., y Lamont, I.L. (2006) Mutational analysis of an extracytoplasmic-function sigma factor to investigate its interactions with RNA polymerase and DNA. *J Bacteriol* 188: 1935-1942.
- Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D., y Oster, G. (2002) How myxobacteria glide. *Curr Biol* 12: 369–377.
- Wood, L. F., y Ohman, D. E. (2009) Use of cell wall stress to characterize  $\sigma^{22}$  (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 72: 183–201.
- Wu, J., y Rosen, B.P. (1993) Metalloregulated expression of the ars operon. *J Biol Chem* 268: 52–58.
- 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, 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.
- Wunderli-Ye, H., y Solioz, M. (1999) Effects of promoter mutations on the in vivo regulation of the cop operon of *Enterococcus hirae* by copper(I) and copper(II). *Biochem Biophys Res Commun* 259: 443-449.
- Xiao, Z., Loughlin, F., George, G., Howlett, G.J., y Wedd, A.G. (2004) C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctrl from *Saccharomyces cerevisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster: Sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking *J Am Chem Soc* 126: 3081–3090.
- Yamamoto, K., e Ishihama, A. (2005) Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* 56: 215-227.
- Yamamoto, K., Ogasawara, H., e Ishihama, A. (2008) Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 133: 196–200.
- Yang, Z., Duan, X., Esmailiyan, M., y Kaplan, H.B. (2008) Composition, structure, and function of the *Myxococcus xanthus* cell envelope. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:229-239.
- 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.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc* 43: 472–486.
- Youderian, P., y Hartzell, P.L. (2006) Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics* 172:1397-1410.
- 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.
- Yu, R., y Kaiser, D. (2007) Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol* 63: 454–467.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Zak, B. (1958) Simple procedure for the single sample determination of serum copper and iron. *Clin Chim Acta* 3: 328-334.
- Zdanowski, K., Doughty, P., Jakimowicz, P., O'Hara, L., Buttner, M.J., Paget, M.S., y Kleanthous, C. (2006) Assignment of the zinc ligands in RsrA, a redox-sensing ZAS protein from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry* 45: 8294-8300.
- Zgurskaya, H.I., Keyhan, M., y Matin, A. (1997) The  $\sigma^S$  level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol Microbiol* 24: 643-651.
- Zhang, X.X., y Rainey, P.B. (2008) Regulation of copper homeostasis in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environ Microbiol* 10: 3284-3294.
- Zhang, Y.Q., Li, Y.Z., Wang, B., Wu, Z.H., Zhang, C.Y., Gong, X., Qiu, Z.J., y Zhang, Y. (2005) Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl Environ Microbiol* 71: 3331-3336.
- Zhou, P., y Thiele, D.J. (1991) Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6112-6116.

## **APÉNDICE**



## APÉNDICE

### A.1. TABLA DE CEPAS UTILIZADAS

Tabla A.1. Cepas de *M. xanthus* presentes en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

CEPAS	DESCRIPCIÓN
JM51AraCIF	$\Delta araC$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51BIF	$\Delta cuoB$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51CIF	$\Delta cuoC$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51DIF <sup>b</sup>	$\Delta corSR1$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51E2IF	$\Delta MXAN\_5263$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51EAraCIF	$\Delta corE-araC$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51EDIF	$\Delta corE-corSR1$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51EE2IF	$\Delta corE-MXAN\_5263$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51EIF	$\Delta corE$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51WIF	$\Delta corE_{CRD}$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>s</sup>
JM51AraCCZY	$\Delta araC cuoC-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51AraCEZY	$\Delta araC corE-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51AraCZY	<i>araC-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51BZY	<i>cuoB-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51CZY	<i>cuoC-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51CAlac <sup>b</sup>	<i>copA-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51CBlac <sup>b</sup>	<i>copB-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51DBZY	$\Delta corSR1 cuoB-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51DCZY	$\Delta corSR1 cuoC-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51DEZY	$\Delta corSR1 corE-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51EZY	<i>corE-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51EBZY	$\Delta corE cuoB-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECZY	$\Delta corE cuoC-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECAlac <sup>b</sup>	$\Delta corE copA-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECBlac <sup>b</sup>	$\Delta corE copB-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECus1ZY	$\Delta corE cus1-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECus2ZY	$\Delta corE cus2-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECus3ZY	$\Delta corE cus3-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECzc1ZY	$\Delta corE czc1-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECzc2ZY	$\Delta corE czc2-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51ECzc3ZY	$\Delta corE czc3-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51EDCALac <sup>b</sup>	$\Delta corE-corSR1 copA-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51EDEZY	$\Delta corE-corSR1 corE-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51EEZY	$\Delta corE corE-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51E2ZY	<i>MXAN_5263-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
JM51E2CZY	$\Delta MXAN\_5263 cuoC-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51E2E2ZY	$\Delta MXAN\_5263 MXAN\_5263-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51E2EZY	$\Delta MXAN\_5263 corE-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51WBZY	$\Delta corE_{CRD} cuoB-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM51WCBlac	$\Delta corE_{CRD} copB-lacZ$ Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
JM00BZY	<i>corE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
JM03BZY	<i>corE</i> <sup>ΔCRD</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
JM05BZY	<i>hcorE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>

JM06BZY	<i>oar-corE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
JM08BZY	<i>oar-hcorE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM181BZY	<i>corE</i> <sup>C181A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM184BZY	<i>corE</i> <sup>C184A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM189BZY	<i>corE</i> <sup>C189A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM192BZY	<i>corE</i> <sup>C192A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM194BZY	<i>corE</i> <sup>C194A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
SDM206BZY	<i>corE</i> <sup>C206A</sup> <i>cuoB-lacZ</i> Gal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>

<sup>a</sup> Gal<sup>r</sup> indica que la cepa es capaz de crecer en presencia de galactosa.

<sup>b</sup> Cepas construidas por otros miembros de nuestro laboratorio.

## A.2. TABLA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Tabla A.2. Plásmidos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN
pBJ113ΔaraC	ΔaraC Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔcorE	ΔcorE Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔcorE <sub>CRD</sub>	ΔcorE <sub>CRD</sub> Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔcorSR1 <sup>a</sup>	ΔcorSR1 Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔcuoB <sup>a</sup>	ΔcuoB Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔcuoC	ΔcuoC Km <sup>r</sup>
pBJ113ΔMXAN_5263	ΔMXAN_5263 Km <sup>r</sup>
pALECBlac	<i>copB-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECus1lac	<i>cus1-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECus2lac	<i>cus2-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECus3lac	<i>cus3-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECzc1lac	<i>czc1-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECzc2lac	<i>czc2-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pALECzc3lac	<i>czc3-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pKY481-AraC	<i>araC-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pKY481-CorE	<i>corE-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pKY481-CuoB	<i>cuoB-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pKY481-CuoCDW	<i>cuoCDW-lacZ</i> Km <sup>r</sup>
pKY481-MXAN_5263	MXAN_5263-lacZ Km <sup>r</sup>
pNG00	<i>corE</i> <sup>WT</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG03	<i>corE</i> <sup>ΔCRD</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG05	<i>hcorE</i> Tet <sup>r</sup>
pNG06	<i>oar-corE</i> Tet <sup>r</sup>
pNG08	<i>oar-hcorE</i> Tet <sup>r</sup>
pNG181	<i>corE</i> <sup>C181A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG184	<i>corE</i> <sup>C184A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG189	<i>corE</i> <sup>C189A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG192	<i>corE</i> <sup>C192A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG194	<i>corE</i> <sup>C194A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNG206	<i>corE</i> <sup>C206A</sup> Tet <sup>r</sup>
pNGCuoB24a	pET24a con <i>cuoB</i> Km <sup>r</sup>
pETTOPOCorE	pET200/D-TOPO con <i>corE</i> Km <sup>r</sup>

<sup>a</sup>Plásmidos construidos por otros miembros de nuestro laboratorio

### A.3. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

#### ÍNDICE DE TABLAS

##### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación taxonómica de las mixobacterias	3
<b>Tabla 1.2.</b> Proteínas que unen cobre en eucariotas	15
<b>Tabla 1.3.</b> Número de ECFs en diversas bacterias	31

##### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla 3.1.</b> Soluciones y tampones	49
<b>Tabla 3.2.</b> Oligonucleótidos utilizados en este estudio	53
<b>Tabla 3.3.</b> Condiciones para la amplificación por PCR	63
<b>Tabla 3.4.</b> Condiciones para PCR (mutagénesis dirigida)	64
<b>Tabla 3.5.</b> Composición de los geles SDS-PAGE	73

##### 4. RESULTADOS

<b>Tabla 4.1.</b> Tolerancia de <i>M. xanthus</i> a diferentes metales	98
<b>Tabla 4.2.</b> Especificidad de sustrato de la proteína recombinante Cuob	126
<b>Tabla 4.3.</b> Regulación génica por CorE	135
<b>Tabla 4.4.</b> Estimación de la estructura secundaria de hCorE a partir del espectro de dicroísmo circular	143

#### ÍNDICE DE FIGURAS

##### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.1.</b> Ciclo de vida de una mixobacteria	4
<b>Figura 1.2.</b> Formación de cuerpos fructificantes	6
<b>Figura 1.3.</b> Modelo de la ruta de transducción de la señal C en <i>M. xanthus</i>	8
<b>Figura 1.4.</b> Homeostasis del cobre en <i>E. coli</i> y <i>E. hirae</i>	19
<b>Figura 1.5.</b> Dominios de unión al cobre en MCOs	21
<b>Figura 1.6.</b> Imagen de CueO	23
<b>Figura 1.7.</b> Mecanismo de actuación de los reguladores tipo MerR	25
<b>Figura 1.8.</b> Familias de metalosensores	26
<b>Figura 1.9.</b> Subunidad sigma: dominios que interactúan con el ADN y regiones promotoras con las que interactúa en la holoenzima ARN polimerasa	28
<b>Figura 1.10.</b> Dominios de diferentes factores sigma-70	29
<b>Figura 1.11.</b> Carotenogénesis en <i>M. xanthus</i>	32
<b>Figura 1.12.</b> Mecanismo de señalización FecARI	33
<b>Figura 1.13.</b> Mecanismo de activación de RpoE ( $\sigma^E$ )	34
<b>Figura 1.14.</b> Cascada de $\sigma^B$ en <i>B. subtilis</i>	36

##### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 3.1.</b> Construcción del plásmido pNG05 ( <i>hcorE</i> )	76
<b>Figura 3.2.</b> Construcción de la cepa JM05BZY ( <i>hcorE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> )	77
<b>Figura 3.3.</b> Construcción del plásmido pNG08 ( <i>oar-hcorE</i> )	78
<b>Figura 3.4.</b> Construcción de la cepa JM08BZY ( <i>oar-hcorE'</i> <i>cuoB-lacZ</i> )	78

<b>Figura 3.5.</b> Construcción de una fusión lacZ	82
<b>Figura 3.6.</b> Preparación de placas de gradiente	83
<b>Figura 3.7.</b> Construcción de plásmidos para obtener mutantes de delección en fase en <i>M. xanthus</i>	86
<b>Figura 3.8.</b> Construcción de un mutante de delección en fase en <i>M. xanthus</i>	87
4. RESULTADOS	
<b>Figura 4.1.</b> Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de <i>M. xanthus</i> .	95
<b>Figura 4.2.</b> Cuerpos fructificantes de la cepa WT de <i>M. xanthus</i>	96
<b>Figura 4.3.</b> Número de esporas en la cepa WT de <i>M. xanthus</i>	96
<b>Figura 4.4.</b> Tolerancia al cobre de cultivos preinducidos	97
<b>Figura 4.5.</b> Ciclo de desarrollo de cultivos preinducidos	97
<b>Figura 4.6A.</b> Regiones del genoma de <i>M. xanthus</i> que acumulan genes relacionados con la homeostasis de metales	99
<b>Figura 4.6B.</b> Posición en el genoma de <i>M. xanthus</i> de genes relacionados con la homeostasis de metales	100
<b>Figura 4.7.</b> RT-PCR del operón que engloba <i>cuoC</i>	101
<b>Figura 4.8.</b> Determinación del codón de iniciación y sistema de secreción utilizado por <i>CuoC</i>	102
<b>Figura 4.9.</b> Secuencia de codones del gen <i>cuoC</i>	103
<b>Figura 4.10.</b> Alineamiento de los 4 dominios del cobre y representación esquemática de los motivos presentes en MCOs de <i>CuoC</i> y otras MCOs de bacterias	104
<b>Figura 4.11.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa cualitativa de la cepa portadora de la fusión traduccional <i>cuoC-lacZ</i> JM51CDWZY	105
<b>Figura 4.12.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51CDWZY	105
<b>Figura 4.13.</b> Comprobación de la cepa JM51CIF ( $\Delta cuoC$ )	107
<b>Figura 4.14.</b> Curva de crecimiento de varias cepas en presencia de cobre (WT y $\Delta cuoC$ )	108
<b>Figura 4.15.</b> Células vegetativas a MET (WT y JM51CIF en medio CTT con 0,7mM de sulfato de cobre)	109
<b>Figura 4.16.</b> Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes de WT y JM51CIF	109
<b>Figura 4.17.</b> Cuantificación de mixósporas y germinación de las mismas en las cepas WT y JM51CIF	110
<b>Figura 4.18.</b> Efecto del cobre en la cubierta de la espora de cepas WT y JM51CIF	110
<b>Figura 4.19.</b> Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares de las cepas WT y JM51CIF	111
<b>Figura 4.20.</b> Curvas de crecimiento en presencia de cobre de la cepa WT y mutantes de delección para <i>corE</i> , <i>araC</i> , <i>corSR1</i> , MXAN_5263	112
<b>Figura 4.20'.</b> Detección de actividad $\beta$ -galactosidasa durante el ciclo de desarrollo de cepas portadoras de fusiones transcripcionales para los genes MXAN_5263 y <i>araC</i>	113
<b>Figura 4.21.</b> RT-PCR del operón que engloba <i>cuoB</i>	114
<b>Figura 4.22.</b> Secuencia de codones del gen <i>cuoB</i>	115
<b>Figura 4.23.</b> Alineamiento de los 4 dominios del cobre y representación esquemática de los motivos presentes en MCOs de <i>CuoB</i> , <i>CuoC</i> y otras MCOs de bacterias	116
<b>Figura 4.24.</b> Alineamiento de <i>CuoB</i> y <i>CuoC</i> con otras MCOs	117
<b>Figura 4.25.</b> Southern blot de la cepa JM51BZY ( <i>cuoB-lacZ</i> )	118

<b>Figura 4.26.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa cualitativa de la cepa JM51BZY	119
<b>Figura 4.27.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51BZY	119
<b>Figura 4.28.</b> Southern blot de la cepa JM51BIF ( $\Delta cuoB$ )	121
<b>Figura 4.29.</b> Curva de crecimiento de varias cepas en presencia de cobre (WT y $\Delta cuoB$ )	122
<b>Figura 4.30.</b> Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes de WT y JM51BIF	123
<b>Figura 4.31.</b> Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares de las cepas WT y JM51BIF	124
<b>Figura 4.32.</b> SDS-PAGE. Expresión heteróloga de CuoB	125
<b>Figura 4.33.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de varias estirpes portadoras de la fusión transcripcional <i>cuoB-lacZ</i> (JM51BZY, JM51DBZY, JM51EBZY)	127
<b>Figura 4.34.</b> Secuencia de codones del gen <i>corE</i>	128
<b>Figura 4.35.</b> Dominios conservados en CorE	129
<b>Figura 4.36.</b> Southern blot de la cepa JM51EZY ( <i>corE-lacZ</i> )	130
<b>Figura 4.37.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa cualitativa de la cepa JM51EZY	130
<b>Figura 4.38.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51EZY	131
<b>Figura 4.39.</b> Southern blot de la cepa JM51EIF ( $\Delta corE$ )	132
<b>Figura 4.40.</b> Curva de crecimiento de varias cepas en presencia de cobre y peróxido de hidrógeno (WT y $\Delta corE$ )	133
<b>Figura 4.41.</b> Efecto del cobre en la formación de cuerpos fructificantes de WT y JM51BIF	134
<b>Figura 4.42.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de dos genes completamente regulados por CorE. Fusiones <i>cuoB-lacZ</i> y <i>copB-lacZ</i> en las cepas WT y $\Delta corE$	135
<b>Figura 4.43.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>corE-lacZ</i> en las cepas WT y $\Delta corE$	136
<b>Figura 4.44.</b> Actividad cualitativa $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>corE-lacZ</i> en diversas cepas (WT, $\Delta corE$ , $\Delta MXAN_5263$ , $\Delta araC$ , $\Delta corSR1$ , $\Delta corE-corSR1$ )	137
<b>Figura 4.45.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de una cepa portadora de la fusión transcripcional <i>oar-lacZ</i> y esquema de la construcción portada por la cepa JM06BZY ( <i>oar-corE' cuoB-lacZ</i> )	139
<b>Figura 4.46.</b> Southern blot de la cepa JM06BZY ( <i>oar-corE' cuoB-lacZ</i> )	139
<b>Figura 4.47.</b> Cepa JM00BZY ( <i>corE' cuoB-lacZ</i> ). Esquema de la construcción y comprobación por PCR	140
<b>Figura 4.48.</b> Actividad cualitativa y cuantitativa $\beta$ -galactosidasa de las cepas JM00BZY y JM06BZY	141
<b>Figura 4.49.</b> Western blot para la detección de hCorE en las cepas JM08BZY ( <i>oar-hcorE' cuoB-lacZ</i> ), JM05BZY ( <i>hcorE' cuoB-lacZ</i> ) y JM00BZY ( <i>corE' cuoB-lacZ</i> )	142
<b>Figura 4.50.</b> SDS-PAGE. Expresión heteróloga de hCorE	143
<b>Figura 4.51.</b> Dicroísmo circular para hCorE purificada	144
<b>Figura 4.52.</b> EMSA para hCorE	144
<b>Figura 4.53.</b> Representación esquemática de la construcción portada por la cepa JM05BZY ( <i>hcorE' cuoB-lacZ</i> )	145
<b>Figura 4.54.</b> Western blot y estimación densitométrica de hCorE	146
<b>Figura 4.55.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa en JM05BZY	146
<b>Figura 4.56.</b> Diseño experimental para estudiar la respuesta de CorE a sucesivos choques por cobre	147
<b>Figura 4.57.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa para las cepas JM51BZY y JM51EZY sometidas a sucesivos choques con cobre	148
	219



<b>Figura 4.58.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de la cepa JM51BZY dependiente del estado redox del cobre	149
<b>Figura 4.59.</b> Secuencias ricas en cisteínas encontradas en proteínas relacionadas con la transcripción. HMM Logo del PF07975 y esquema de los dominios conservados en CorE y del dominio CRD	150
<b>Figura 4.60.</b> Esquema de la proteína $\Delta$ CorE <sub>CRD</sub>	151
<b>Figura 4.61.</b> Fenotipo de la cepa JMWIF ( $\Delta$ corE <sub>CRD</sub> ) durante el ciclo de desarrollo y crecimiento vegetativo con o sin CuSO <sub>4</sub>	152
<b>Figura 4.62.</b> Actividad cualitativa $\beta$ -galactosidasa de cepas portadoras de fusiones <i>cuoB-lacZ</i> o <i>copB-lacZ</i>	153
<b>Figura 4.63.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de las cepas JM51EBZY ( $\Delta$ corE <i>cuoB-lacZ</i> ) y JM51WBZY( $\Delta$ corE <sub>CRD</sub> <i>cuoB-lacZ</i> )	153
<b>Figura 4.64.</b> Esquema de las diferentes mutaciones puntuales realizadas en CorE	154
<b>Figura 4.65.</b> Actividad cualitativa $\beta$ -galactosidasa para diferentes cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de CorE WT o con diversas mutaciones puntuales	155
<b>Figura 4.66.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>cuoB-lacZ</i> para diferentes cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de CorE WT o con mutaciones puntuales (C181A y C206A)	156
<b>Figura 4.67.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>cuoB-lacZ</i> para diferentes cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de CorE WT o con mutaciones puntuales (C192A y C194A)	157
<b>Figura 4.68.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>cuoB-lacZ</i> para diferentes cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de CorE WT o con la mutación puntual C184A	158
<b>Figura 4.69.</b> Actividad específica $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>cuoB-lacZ</i> para diferentes cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de CorE WT o con la mutación puntual C189A	158
5. DISCUSIÓN	
<b>Figura 5.1.</b> Organización del estímulo del cobre en <i>E. coli</i>	166
<b>Figura 5.2.</b> HMM-Logo de la región CRD en procariontas	176
<b>Figura 5.3.</b> Sintenia entre las regiones de genomas que contienen ECFs con dominios CRD	176
<b>Figura 5.4.</b> Alineamiento entre las secuencias proteicas de dos factores sigma de la ARN polimerasa de tipo ECF (CorE y RpoE)	177
<b>Figura 5.5.</b> Alineamiento de ECFs con región CRD	181

