



**Departamento de Microbiología  
Universidad de Granada**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA  
OXIDASA MULTICOBRE CuoA DE *Myxococcus*  
*xanthus***

**TESIS DOCTORAL  
MARÍA CELESTINA SÁNCHEZ SUTIL**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Celestina Sánchez Sutil  
D.L.: Gr. 193-2010  
ISBN: 978-84-692-8370-7



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA OXIDASA  
MULTICOBRE Cu<sub>o</sub>A DE *Myxococcus xanthus***

Memoria presentada por la Licenciada  
María Celestina Sánchez Sutil para  
optar al título de Doctora en Biología.  
Granada, Noviembre de 2009

María Celestina Sánchez Sutil



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

**José Muñoz Dorado**  
Catedrático de Universidad

**Juana Pérez Torres**  
Profesora Titular de Universidad



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca de Formación de Investigadores del Plan Propio concedida por la Universidad de Granada. La investigación desarrollada ha sido financiada por el proyecto Oxidasas multicobre de *Myxococcus xanthus*: regulación y función durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo (BFU 2006-00972/BMC) concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia, y por el proyecto Respuesta global al cobre en *Myxococcus xanthus* (P06-CVI-1377) concedido por la Junta de Andalucía.





## ABREVIATURAS

**ABTS.** 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).  
**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.  
**ADNc.** Ácido desoxirribonucleico complementario.  
**AEE.** Actividad enzimática específica.  
**ARN.** Ácido ribonucleico.  
**ARNm.** Ácido ribonucleico mensajero.  
**ARNr.** Ácido ribonucleico ribosómico.  
**ARNt.** Ácido ribonucleico de transferencia.  
**ATP.** Adenosina trifosfato.  
**CDF.** *cation diffusion facilitator*.  
**dATP.** Desoxiadenosina trifosfato.  
**dCTP.** Desoxicitidina trifosfato.  
**dGTP.** Desoxiguanosina trifosfato.  
**DIG\_dUTP.** Desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina.  
**DNAsa.** Desoxirribonucleasa.  
**DMP.** 2,6-dimetoxifenol.  
**DMSO.** Dimetil sulfóxido.  
**dNTP.** Desoxinucleótidos 5'-trifosfato.  
**DO<sub>600</sub>.** Densidad óptica medida a 600 nm.  
**DOPA.** Dihidroxifenilalanina.  
**EBP.** *enhancer binding protein*.  
**EDTA.** Ácido etilén diamino tetraacético.  
**FMN.** Flavín mononucleótido.  
**GDP.** Guanosina difosfato  
**GTP.** Guanosina trifosfato  
**h.** Horas.  
**HAMP.** *histidine kinases, adenyl cyclases, methyl-accepting proteins y phosphatases*.  
**HTH.** Motivo hélice-giro-hélice (del inglés *helix-turn-helix*).  
**kb.** Kilobase.  
**kDa.** Kilodalton.  
**Mb.** Megabase.  
**MBD.** Dominio de unión a metales (del inglés *metal binding domain*).  
**MCO.** Oxidasa multicobre (del inglés *multicopper oxidase*).  
**MFP.** *membrane fusion protein*.  
**min.** Minutos.  
**ms.** Milisegundos.  
**NAD<sup>+</sup>.** Dinucleótido de nicotinamida y adenina.  
**nm.** Nanómetros.  
**OMF.** *outer membrane factor*.  
**ONP.** *o*-nitrofenol.  
**ONPG.** *o*-nitrofenil-β-D-galactósido.  
**ORF.** Pauta abierta de lectura.  
**pb.** Pares de bases.  
**PCBs.** Bifenilos policlorados.  
**PCR.** Reacción en cadena de la DNA polimerasa.  
**PHAs.** Hidrocarburos aromáticos policíclicos.  
**pPD.** *p*-fenilenediamina.  
**ppm.** Partes por millón.

**ppb.** Partes por billón.  
**(p)ppGpp.** Guanosina (tetra) penta fosfato.  
**RND.** *resistance-nodulation-division*.  
**ROS.** Especies reactivas del oxígeno.  
**RT-PCR.** Reverso transcriptasa PCR.  
**SDS.** Dodecil sulfato sódico.  
**seg.** Segundos.  
**SEM.** Microscopía electrónica de barrido.  
**SOD.** Superóxido dismutasa.  
**TAT.** *Twin arginine translocation*.  
**TEM.** Microscopía electrónica de transmisión.  
**Tm.** Temperatura de fusión de oligonucleótidos.  
**TNC.** Cluster trinuclear.  
**TPR.** Repeticiones de tetratricopéptidos.  
**UAS.** *upstream activating sequence*.  
**X-gal.** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## ÍNDICE



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>A. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>A.I. MIXOBACTERIAS</b>  | <b>1</b>  |
| <b>A.I.1. Características generales de las mixobacterias</b>                           | <b>1</b>  |
| <b>A.I.2. Distribución de las mixobacterias en la naturaleza</b>                       | <b>2</b>  |
| <b>A.I.3. Taxonomía y filogenia</b>  | <b>3</b>  |
| <b>A.I.4. Movilidad</b>  | <b>4</b>  |
| A.I.4.1. Movilidad social  | 5         |
| A.I.4.2. Movilidad aventurera  | 7         |
| A.I.4.3. Regulación de la movilidad  | 8         |
| A.I.4.4. Quimiotaxias  | 9         |
| <b>A.I.5. Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i></b>                                       | <b>11</b> |
| A.I.5.1. Ciclo vegetativo  | 11        |
| A.I.5.2. Ciclo de desarrollo   | 11        |
| i) Oscilaciones rítmicas   | 13        |
| ii) Formación de cuerpos fructificantes  | 13        |
| iii) Esporulación  | 15        |
| iv) Germinación  | 15        |
| A.I.5.3. Inducción química de la esporulación  | 16        |
| <b>A.I.6. Señalización celular durante el ciclo de desarrollo de <i>M. xanthus</i></b> | <b>17</b> |
| A.I.6.1. Señales implicadas en el ciclo de desarrollo de <i>M. xanthus</i>             | 18        |
| i) Señal A   | 18        |
| ii) Señal B  | 19        |
| iii) Señal C   | 20        |
| iv) Señal D  | 21        |
| v) Señal E   | 22        |
| A.I.6.2. Respuesta estricta  | 22        |
| <b>A.I.7. Genomas de Mixobacterias</b>   | <b>23</b> |
| <b>A.II. RESPUESTA GLOBAL AL COBRE</b>   | <b>25</b> |
| <b>A.II.1. El cobre en la naturaleza</b>   | <b>25</b> |
| <b>A.II.2. El cobre como cofactor de enzimas</b>                                       | <b>26</b> |
| <b>A.II.3. Toxicidad por cobre</b>   | <b>27</b> |
| <b>A.II.4. Homeostasis y resistencia al cobre</b>                                      | <b>28</b> |
| A.II.4.1. Homeostasis del cobre en <i>Escherichia coli</i>                             | 28        |
| A.II.4.1.1. Sistema <i>cue</i>   | 29        |
| A.II.4.1.2. Sistema <i>cus</i>   | 30        |
| A.II.4.1.3. Sistemas no cromosómicos   | 32        |
| A.II.4.1.4. Otras proteínas  | 34        |
| A.II.4.2. Homeostasis del cobre en <i>Enterococcus hirae</i>                           | 34        |
| A.II.4.2.1. ATPasas de tipo P <sub>1B</sub> , CopA y CopB                              | 34        |
| A.II.4.2.2. Represor CopY  | 35        |
| A.II.4.2.3. Chaperona CopZ   | 35        |
| A.II.4.3. Homeostasis del cobre en otras bacterias                                     | 36        |
| A.II.4.3.1. <i>Bacillus subtilis</i>   | 36        |
| A.II.4.3.2. <i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium y <i>S. enterica</i> sv Typhi    | 37        |

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| A.II.4.3.3. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv vesicatoria               | 37        |
| A.II.4.3.4. <i>Campylobacter jejuni</i>                                | 37        |
| A.II.4.3.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25                       | 37        |
| A.II.4.3.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                              | 38        |
| A.II.4.3.7. <i>Lactococcus lactis</i> IL1403                           | 38        |
| A.II.4.4. Homeostasis del cobre en <i>M. xanthus</i>                   | 39        |
| <b>A.III. OXIDASAS MULTICOBRE</b>                                      | <b>41</b> |
| <b>A.III.1. Estructura de las oxidasas multicobre</b>                  | <b>41</b> |
| <b>A.III.2. Mecanismo de acción</b>                                    | <b>42</b> |
| <b>A.III.3. Especificidad de sustrato de las oxidasas multicobre</b>   | <b>43</b> |
| <b>A.III.4. Tipos de oxidasas multicobre</b>                           | <b>43</b> |
| A.III.4.1. Lacasas   | 43        |
| A.III.4.2. Ascorbato oxidasa   | 44        |
| A.III.4.3. Ceruloplasmina  | 44        |
| A.III.4.4. Otras oxidasas multicobre                                   | 44        |
| A.III.4.4.1. Resistencia al cobre (CueO, PcoA y CutO)                  | 44        |
| A.III.4.4.2. CotA  | 45        |
| A.III.4.4.3. Manganeso oxidasas (CumA, MofA, MnxG, MoxA)               | 45        |
| A.III.4.4.4. PpoA  | 46        |
| A.III.4.4.5. EpoA  | 46        |
| A.III.4.4.6. Bilirrubina oxidasa                                       | 46        |
| A.III.4.4.7. Síntesis de antibióticos (PhsA)                           | 46        |
| A.III.4.4.8. Oxidación de hierro (Fet3p, Fox1)                         | 46        |
| A.III.4.4.9. SilA  | 47        |
| <b>A.III.5. Aplicaciones de las oxidasas multicobre</b>                | <b>47</b> |
| <b>A.IV. SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES</b>                   | <b>48</b> |
| <b>A.IV.1. Histidinas quinasa</b>                                      | <b>50</b> |
| A.IV.1.1. Dominio sensor   | 50        |
| A.IV.1.2. Dominio quinasa  | 50        |
| A.IV.1.3. Clases de histidina quinasa                                  | 52        |
| A.IV.1.3.1. Histidina quinasa de clase I                               | 52        |
| A.IV.1.3.2. Histidina quinasa de clase II                              | 52        |
| <b>A.IV.2. Reguladores de respuesta</b>                                | <b>52</b> |
| A.IV.2.1. Dominio regulador  | 53        |
| A.IV.2.2. Dominio efector  | 53        |
| A.IV.2.2.1. Subfamilia OmpR/PhoB                                       | 54        |
| A.IV.2.2.2. Subfamilia NarL/FixJ                                       | 54        |
| A.IV.2.2.3. Subfamilia NtrC/DctD                                       | 54        |
| A.IV.2.3. Activación por fosforilación de los reguladores de respuesta | 56        |
| <b>A.IV.3 Regulación de los sistemas de dos componentes</b>            | <b>57</b> |
| <b>B. OBJETIVOS</b>  | <b>61</b> |
| <b>C. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | <b>65</b> |
| <b>C.I. MATERIAL</b>   | <b>65</b> |
| <b>C.I.1. Microorganismos</b>  | <b>65</b> |
| C.I.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>                              | 65        |
| C.I.1.2. Cepas de <i>Myxococcus xanthus</i>                            | 65        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>C.I.2. Medios de cultivo</b>  | <b>65</b> |
| C.I.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>                                       | <b>65</b> |
| C.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de <i>E. coli</i>          | <b>66</b> |
| C.I.2.1.1.1. Antibióticos  | <b>66</b> |
| C.I.2.1.1.2. Otros compuestos  | <b>66</b> |
| C.I.2.2. Medios de cultivo para <i>M. xanthus</i>                                    | <b>66</b> |
| C.I.2.2.1. Crecimiento vegetativo  | <b>66</b> |
| C.I.2.2.2. Ciclo de desarrollo   | <b>67</b> |
| C.I.2.2.3. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de <i>M. xanthus</i>       | <b>67</b> |
| C.I.2.2.3.1. Antibióticos  | <b>67</b> |
| C.I.2.2.3.2. Otros compuestos  | <b>67</b> |
| <b>C.I.3. Tampones y soluciones</b>  | <b>68</b> |
| <b>C.I.4. Material para biología molecular</b>                                       | <b>69</b> |
| C.I.4.1. Vectores  | <b>69</b> |
| C.I.4.2. Oligonucleótidos  | <b>69</b> |
| C.I.4.3. Reactivos   | <b>71</b> |
| C.I.4.4. Instrumentación   | <b>72</b> |
| <b>C.I.5. Bases de datos y servidores</b>  | <b>74</b> |
| <b>C.II. MÉTODOS</b>   | <b>75</b> |
| <b>C.II.1. Cultivo de microorganismos</b>  | <b>75</b> |
| C.II.1.1. Cultivo de <i>E. coli</i>  | <b>75</b> |
| C.II.1.2. Cultivo de <i>M. xanthus</i>   | <b>75</b> |
| <b>C.II.2. Preparación de muestras para microscopía</b>                              | <b>76</b> |
| C.II.2.1. Microscopía óptica   | <b>76</b> |
| C.II.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)                               | <b>76</b> |
| C.II.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)                                   | <b>77</b> |
| <b>C.II.3. Preparación de células competentes y electrocompetentes</b>               | <b>77</b> |
| C.II.3.1. Preparación de células competentes   | <b>77</b> |
| C.II.3.1.1. De <i>E. coli</i>  | <b>77</b> |
| C.II.3.2. Preparación de células electrocompetentes                                  | <b>78</b> |
| C.II.3.2.1. De <i>E. coli</i>  | <b>78</b> |
| C.II.3.2.2. De <i>M. xanthus</i>   | <b>78</b> |
| <b>C.II.4. Introducción de plásmidos en células competentes y electrocompetentes</b> | <b>78</b> |
| C.II.4.1. <i>E. coli</i>   | <b>78</b> |
| C.II.4.1.1. Transformación por el método del choque térmico                          | <b>78</b> |
| C.II.4.1.2. Electroporación  | <b>78</b> |
| C.II.4.2. <i>M. xanthus</i>  | <b>79</b> |
| C.II.4.2.1. Electroporación  | <b>79</b> |
| <b>C.II.5. Manipulación de ADN</b>   | <b>79</b> |
| C.II.5.1. Extracción de ADN  | <b>79</b> |
| C.II.5.1.1. ADN cromosómico de <i>M. xanthus</i>                                     | <b>79</b> |
| C.II.5.1.2. ADN plasmídico de <i>E. coli</i>   | <b>79</b> |
| C.II.5.2. Análisis del ADN aislado   | <b>80</b> |
| C.II.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)                                | <b>80</b> |
| C.II.5.2.2. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción                        | <b>80</b> |
| C.II.5.2.3. Reacción de ligación de ADN  | <b>80</b> |
| C.II.5.2.4. Secuenciación automática de ADN  | <b>81</b> |
| C.II.5.3. Electroforesis de ADN  | <b>81</b> |
| C.II.5.3.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa                                | <b>81</b> |
| C.II.5.3.2. Electroforesis de ADN en geles de acrilamida                             | <b>82</b> |
| C.II.5.4. Aislamiento de fragmentos de ADN   | <b>82</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b>C.II.6. Manipulación de ARN</b>   | <b>83</b>  |
| C.II.6.1. Extracción de ARN  | 83         |
| C.II.6.2. Análisis del ARN aislado (RT-PCR)  | 83         |
| <b>C.II.7. Hibridación de ácidos nucleicos</b>   | <b>84</b>  |
| C.II.7.1. Detección de fragmentos de ADN con sondas marcadas con DIG_dUTP  | 84         |
| 1) Transferencia de ADN a membranas de nylon   | 85         |
| 1.1.) Transferencia de ADN a partir de colonias bacterianas (hibridación de colonias)                                    | 85         |
| 1.2.) Transferencia de ADN a partir de un gel de agarosa: Southern blot  | 85         |
| 2) Prehibridación de membranas portadoras de ADN fijado  | 86         |
| 3) Hibridación de membranas con sondas marcadas con DIG_UTP  | 86         |
| 4) Detección con fosfatasa alcalina  | 87         |
| <b>C.II.8. Estudio del perfil de expresión de genes de <i>M. xanthus</i></b>   | <b>87</b>  |
| C.II.8.1. Construcción de una fusión entre el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y un gen de interés de <i>M. xanthus</i> | 87         |
| C.II.8.2. Determinación cualitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en <i>M. xanthus</i>                          | 88         |
| C.II.8.3. Determinación cuantitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en <i>M. xanthus</i>                         | 88         |
| C.II.8.3.1. Preparación de extractos crudos de <i>M. xanthus</i>   | 88         |
| C.II.8.3.2. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa   | 89         |
| <b>C.II.9. Construcción y caracterización de mutantes de delección en fase</b>   | <b>90</b>  |
| C.II.9.1. Construcción de mutantes de delección en fase  | 90         |
| C.II.9.2. Caracterización de mutantes de delección en fase   | 91         |
| C.II.9.2.1. Fenotipo durante el crecimiento vegetativo   | 91         |
| C.II.9.2.2. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo  | 92         |
| C.II.9.2.3. Recuento de esporas  | 92         |
| C.II.9.2.4. Germinación de esporas   | 93         |
| C.II.9.2.5. Estudio de la tolerancia a diferentes metales  | 93         |
| C.II.9.2.6. Determinación del cobre intracelular   | 94         |
| C.II.9.2.7. Determinación de actividades de la oxidasa multicobre CuoA   | 94         |
| <b>D. RESULTADOS</b>   | <b>99</b>  |
| <b>D.I. RESISTENCIA DE <i>M. xanthus</i> AL COBRE Y OTROS METALES DURANTE SU CICLO DE VIDA</b>                           | <b>99</b>  |
| <b>D.I.1. Tolerancia de <i>M. xanthus</i> al cobre</b>   | <b>99</b>  |
| D.I.1.1. Cultivos no inducidos   | 99         |
| D.I.1.2. Cultivos inducidos con cobre  | 100        |
| <b>D.I.2. Tolerancia de <i>M. xanthus</i> a otros metales</b>  | <b>102</b> |
| <b>D.II. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL COBRE EN <i>M. xanthus</i></b>                                  | <b>103</b> |
| <b>D.III. CARACTERIZACIÓN DE LA OXIDASA MULTICOBRE CuoA (MXAN3420)</b>   | <b>105</b> |
| <b>D.III.1. Análisis de la secuencia del gen <i>cuoA</i> y de la proteína que codifica</b>                               | <b>105</b> |
| <b>D.III.2. Análisis de la región genómica situada en torno a gen <i>cuoA</i></b>  | <b>108</b> |
| <b>D.III.3. Determinación del perfil de expresión del gen <i>cuoA</i></b>  | <b>112</b> |
| <b>D.III.4. Estudio de la topología de la proteína CuoA</b>  | <b>115</b> |
| <b>D.III.5. Estudio de la implicación de la oxidasa multicobre CuoA en la tolerancia al cobre de <i>M. xanthus</i></b>   | <b>117</b> |
| D.III.5.1. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen <i>cuoA</i>  | 117        |

|  |            |
|--|------------|
| D.III.5.2. Estudio de la tolerancia al cobre del mutante de delección $\Delta cuoA$  | 118        |
| D.III.5.2.1. Crecimiento vegetativo  | 118        |
| D.III.5.2.2. Ciclo de desarrollo   | 120        |
| D.III.5.2.2.1. Esporulación  | 121        |
| D.III.5.2.2.2. Germinación   | 122        |
| D.III.5.2.2.3. Ciclo de desarrollo en células inducidas con cobre  | 123        |
| <b>D.III.5.3. Actividad cuproso oxidasa en los extractos celulares de <i>M. xanthus</i></b>  | <b>124</b> |
| <b>D.III.5.4. Estudio de la tolerancia a otros metales del mutante de delección <math>\Delta cuoA</math></b>   | <b>125</b> |
| <b>D.IV. ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA OXIDASA MULTICOBRE <i>CuoA</i></b>   | <b>126</b> |
| <b>D.IV.1. Búsqueda de elementos reguladores de la oxidasa multicobre <i>CuoA</i></b>  | <b>126</b> |
| D.IV.1.1. Análisis de la secuencia de los genes <i>corSR</i> y de las proteínas que codifican  | 126        |
| D.IV.1.2. Construcción de un mutante de delección en fase para los genes <i>corSR</i>  | 129        |
| D.IV.1.3. Determinación del perfil de expresión del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corSR$   | 131        |
| <b>D.IV.2. Determinación del perfil de expresión del sistema <i>corSR</i></b>  | <b>133</b> |
| <b>D.IV.3. Autorregulación del sistema de dos componentes <i>CorSR</i></b>   | <b>135</b> |
| <b>D.IV.4. Estudio de la implicación del sistema <i>CorSR</i> en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i></b>   | <b>137</b> |
| D.IV.4.1. Crecimiento vegetativo   | 137        |
| D.IV.4.1.1. Análisis del fenotipo durante el crecimiento vegetativo de células inducidas con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre   | 139        |
| D.IV.4.2. Ciclo de desarrollo  | 139        |
| D.IV.4.3. Análisis de la implicación de los carotenoides en el fenotipo del mutante $\Delta corSR$   | 141        |
| D.IV.4.3.1. Obtención de un mutante de delección doble $\Delta corSR \Delta carB$  | 141        |
| D.IV.4.3.2. Estudio del fenotipo del mutante doble $\Delta corSR \Delta carB$  | 142        |
| D.IV.4.4. Ciclo de desarrollo en células inducidas con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre   | 143        |
| D.IV.4.4.1. Construcción de fusiones <i>lacZ</i> con los marcadores del desarrollo <i>fruA</i> , <i>mrpC</i> y <i>tps</i>  | 144        |
| D.IV.4.4.2. Análisis de la expresión de los marcadores <i>fruA</i> , <i>mrpC</i> y <i>tps</i> en el silvestre y en el mutante $\Delta corSR$   | 145        |
| D.IV.4.5. Determinación de la acumulación de cobre intracelular en el mutante $\Delta corSR$   | 146        |
| <b>D.IV.5. Otros genes regulados por el sistema regulador de dos componentes <i>CorSR</i></b>  | <b>147</b> |
| D.IV.5.1. Estudio de la regulación del gen <i>copA</i> (MXAN3415)  | 148        |
| D.IV.5.2. Estudio de la regulación de los genes <i>cuoB</i> , <i>cuoC</i> , <i>copB</i> , <i>copC</i> y los tres sistemas <i>Cus</i> y <i>Czc</i> de <i>M. xanthus</i> por el sistema <i>CorSR</i> | 150        |
| <b>D.IV.6. Análisis del dominio sensor de la histidina quinasa <i>CorS</i></b>   | <b>152</b> |
| D.IV.6.1. Estudio de la secuencia del dominio sensor de la histidina quinasa <i>CorS</i>   | 152        |
| D.IV.6.1.1. Construcción de mutantes de delección en fase del dominio sensor de la histidina quinasa <i>CorS</i> (mutantes 1 y 2)  | 152        |
| D.IV.6.1.2. Determinación del perfil de expresión del gen <i>cuoA</i> en los mutantes $\Delta corS1$ y $\Delta corS2$  | 155        |
| D.IV.6.1.3. Construcción de nuevos mutantes de delección en fase del dominio sensor de la histidina quinasa <i>CorS</i> (mutantes 3, 4, 5 y 6)   | 156        |
| D.IV.6.1.4. Determinación del perfil de expresión del gen <i>cuoA</i> en los mutantes $\Delta corS3$ , $\Delta corS4$ , $\Delta corS5$ y $\Delta corS6$  | 158        |
| <b>D.IV.7. Estudio de la interacción de la lipoproteína MXAN3417 con la histidina quinasa <i>CorS</i></b>  | <b>161</b> |
| D.IV.7.1. Análisis de la secuencia del gen MXAN3417 y de la proteína que codifica  | 161        |
| D.IV.7.2. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen MXAN3417  | 163        |
| D.IV.7.3. Análisis de la expresión del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta 3417$   | 163        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>D.IV.8. Análisis del regulador de respuesta CorR del sistema CorSR</b>  | <b>165</b> |
| D.IV.8.1. Localización de posibles sitios de unión de $\sigma^{54}$ en el cluster <i>curA</i>  | <b>165</b> |
| D.IV.8.2. Localización de dos posibles UAS en los promotores de los genes del cluster <i>curA</i> regulados por el sistema CorSR                               | <b>166</b> |
| D.IV.8.2.1. Construcción de mutantes de delección para las posibles UAS  | <b>167</b> |
| D.IV.8.2.2. Obtención de cepas portadoras de fusiones <i>lacZ</i> con los genes <i>cuoA</i> , <i>corSR</i> y <i>copA</i> en los mutantes para las posibles UAS | <b>168</b> |
| D.IV.8.2.3. Análisis de la expresión de los genes <i>cuoA</i> , <i>corSR</i> y <i>copA</i> en el mutante $\Delta$ UAS1   | <b>169</b> |
| D.IV.8.2.4. Análisis de la expresión de los genes <i>cuoA</i> , <i>corSR</i> y <i>copA</i> en el mutante $\Delta$ UAS2   | <b>171</b> |
| <br>   |            |
| <b>D.V. ESTUDIO DE OTROS GENES QUE APARECEN EN EL CLUSTER <i>curA</i></b>  | <b>173</b> |
| <br>   |            |
| <b>D.V.1. Análisis de la implicación de la lipoproteína MXAN3417 en la tolerancia al cobre de <i>M. xanthus</i></b>  | <b>173</b> |
| D.V.1.1. Crecimiento vegetativo  | <b>174</b> |
| D.V.1.2. Ciclo de desarrollo   | <b>174</b> |
| <br>   |            |
| <b>D.V.2. Estudio de la implicación del gen MXAN3414 en la tolerancia al cobre de <i>M. xanthus</i></b>  | <b>176</b> |
| D.V.2.1. Análisis de la secuencia del gen MXAN3414 y la proteína que codifica  | <b>176</b> |
| D.V.2.2. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen MXAN3414   | <b>177</b> |
| D.V.2.3. Análisis de la tolerancia al cobre del mutante de delección $\Delta$ 3414   | <b>178</b> |
| D.V.2.3.1. Crecimiento vegetativo  | <b>178</b> |
| D.V.2.3.2. Ciclo de desarrollo   | <b>178</b> |
| <br>   |            |
| <b>E. DISCUSIÓN</b>  | <b>183</b> |
| <br>   |            |
| <b>F. CONCLUSIONES</b>   | <b>201</b> |
| <br>   |            |
| <b>G. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>205</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

### A. INTRODUCCIÓN

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de las mixobacterias  | <b>4</b>  |
| <b>Tabla 2.</b> Características principales de los genomas secuenciados, o en proceso de secuenciación, de mixobacterias | <b>24</b> |

### B. MATERIAL Y MÉTODOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos empleados para determinar la topología de la proteína CuoA   | <b>69</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para la demostración del cluster <i>curA</i>  | <b>70</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos diseñados para el análisis del perfil de expresión, mediante el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , de diferentes genes de <i>M. xanthus</i> | <b>70</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos empleados para la construcción de mutantes de delección de <i>M. xanthus</i>   | <b>71</b> |

### C. RESULTADOS

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabla 7.</b> Tolerancia de diferentes metales de <i>M. xanthus</i> durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo                | <b>102</b> |
| <b>Tabla 8.</b> Posibles promotores de $\sigma^{54}$ identificados en el cluster <i>curA</i>  | <b>109</b> |
| <b>Tabla 9.</b> Tolerancia de diferentes metales de la bacteria $\Delta$ <i>cuoA</i> durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo | <b>125</b> |
| <b>Tabla 10.</b> Genes para los que presenta regulación el sistema regulador de dos componentes CorSR   | <b>151</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

### A. INTRODUCCIÓN

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>  | <b>12</b> |
| <b>Figura 2.</b> Mecanismos para la homeostasis del cobre en <i>E. coli</i>  | <b>29</b> |
| <b>Figura 3.</b> Modelo funcional del sistema <i>cus</i> de <i>E. coli</i>   | <b>31</b> |
| <b>Figura 4.</b> Mecanismo propuesto para la detoxificación de cobre mediada por <i>pco</i> en <i>E. coli</i>  | <b>33</b> |
| <b>Figura 5.</b> Modelo para la homeostasis del cobre en <i>E. hirae</i>   | <b>36</b> |
| <b>Figura 6.</b> Activación de la síntesis de carotenoides en <i>M. xanthus</i>  | <b>40</b> |
| <b>Figura 7.</b> Centros del cobre de la oxidasa multicobre CotA de <i>Bacillus subtilis</i>   | <b>42</b> |
| <b>Figura 8.</b> Esquema de la fosfotransferencia en un sistema regulador de dos componentes   | <b>49</b> |
| <b>Figura 9.</b> HMM Logos para cada una de las cajas H en los distintos subdominios de fosforilación/dimerización de las histidina quininas.  | <b>51</b> |
| <b>Figura 10.</b> HMM Logos de las cajas N, G1, F y G2 altamente conservadas en el subdominio catalítico de las histidina quininas.  | <b>51</b> |
| <b>Figura 11.</b> (A) Arquitectura de dominios de los reguladores de respuesta de la subfamilia NtrC/DctD. (B) El complejo $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa unido al promotor no puede iniciar la transcripción (complejo cerrado), es necesaria (C) la interacción de $\sigma^{54}$ con una <i>enhancer-binding protein</i> para formar el complejo abierto e iniciar la transcripción en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP | <b>56</b> |

### C. MATERIAL Y MÉTODOS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 12.</b> Construcción de una fusión entre el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y un gen de <i>M. xanthus</i> | <b>88</b> |
| <b>Figura 13.</b> Obtención de una cepa de <i>M. xanthus</i> portadora de una delección                               | <b>91</b> |

### D. RESULTADOS

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 14.</b> Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de <i>M. xanthus</i>  | <b>99</b>  |
| <b>Figura 15.</b> Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre de <i>M. xanthus</i>   | <b>100</b> |
| <b>Figura 16.</b> (A) Tolerancia al cobre de las células de <i>M. xanthus</i> preincubadas con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre (B) Cuerpos fructificantes de <i>M. xanthus</i> a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de 600 $\mu$ M de sulfato de cobre | <b>101</b> |
| <b>Figura 17.</b> Localización en el genoma de <i>M. xanthus</i> de las regiones del cobre 1 y 2   | <b>103</b> |
| <b>Figura 18.</b> Organización genómica estructural de la región del cobre 1 de <i>M. xanthus</i>  | <b>104</b> |
| <b>Figura 19.</b> Organización genómica estructural de la región del cobre 2 de <i>M. xanthus</i>  | <b>104</b> |
| <b>Figura 20.</b> Organización genómica de los tres sistemas Czc de <i>M. xanthus</i>  | <b>105</b> |
| <b>Figura 21.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>cuoA</i> (MXAN3420) de <i>M. xanthus</i>   | <b>106</b> |
| <b>Figura 22.</b> Organización de los dominios de las oxidasas multicobre de <i>M. xanthus</i>   | <b>108</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 23.</b> (A) Estrategia seguida para estudiar la coexpresión de los distintos genes del cluster <i>curA</i> . (B) Experimento de RT-PCR  | <b>109</b> |
| <b>Figura 24.</b> Organización genómica de los genes localizados en el cluster <i>curA</i>  | <b>110</b> |
| <b>Figura 25.</b> Esquema de la localización de los componentes del cluster <i>curA</i>   | <b>112</b> |
| <b>Figura 26.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> de <i>M. xanthus</i>  | <b>113</b> |
| <b>Figura 27.</b> Expresión del gen <i>cuoA</i> en ausencia de cobre añadido al medio a las 48 h de incubación  | <b>113</b> |
| <b>Figura 28.</b> Expresión del gen <i>cuoA</i> en presencia de cobre añadido al medio a las 48 h de incubación   | <b>113</b> |
| <b>Figura 29.</b> Expresión del gen <i>cuoA</i> en presencia de otros metales divalentes a las 48 h de incubación.  | <b>114</b> |
| <b>Figura 30.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica dependiente de cobre de la cepa JM51AZY durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo  | <b>114</b> |
| <b>Figura 31.</b> Esquema de la construcción de las fusiones <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> para el estudio de la topología de la proteína CuoA   | <b>115</b> |
| <b>Figura 32.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con un región intermedia del gen <i>cuoA</i>   | <b>116</b> |
| <b>Figura 33.</b> Análisis de la actividad $\beta$ -galactosidasa de las fusiones realizadas para el estudio de la topología de la proteína CuoA  | <b>116</b> |
| <b>Figura 34.</b> Southern blot para comprobar la obtención del mutante de delección del gen <i>cuoA</i>  | <b>117</b> |
| <b>Figura 35.</b> Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo del mutante $\Delta cuoA$  | <b>118</b> |
| <b>Figura 36.</b> Morfología y ultraestructura de las células vegetativas del silvestre y $\Delta cuoA$ crecidas en medio CTT que contiene 700 $\mu$ M de sulfato de cobre  | <b>119</b> |
| <b>Figura 37.</b> Tolerancia al cobre de las células del mutante $\Delta cuoA$ preincubadas con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre   | <b>120</b> |
| <b>Figura 38.</b> (A) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante $\Delta cuoA$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF en ausencia de cobre. (B) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante $\Delta cuoA$ en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre | <b>121</b> |
| <b>Figura 39.</b> Cuantificación de esporas para las cepas silvestre y $\Delta cuoA$  | <b>121</b> |
| <b>Figura 40.</b> Efecto del cobre en la cubierta de la espora  | <b>122</b> |
| <b>Figura 41.</b> Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y $\Delta cuoA$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de 600 $\mu$ M de sulfato de cobre  | <b>123</b> |
| <b>Figura 42.</b> Morfología de las esporas de las bacterias silvestre y $\Delta cuoA$ formadas por células crecidas previamente con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre  | <b>124</b> |
| <b>Figura 43.</b> Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares crudos de células de DZF1 y $\Delta cuoA$  | <b>125</b> |
| <b>Figura 44.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>corS</i> (MXAN3419) de <i>M. xanthus</i>  | <b>127</b> |

## Índice

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 45.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>corR</i> (MXAN3418) de <i>M. xanthus</i>  | <b>128</b> |
| <b>Figura 46.</b> Organización modular de la histidina quinasa CorS y el regulador de respuesta CorR de <i>M. xanthus</i> .   | <b>129</b> |
| <b>Figura 47.</b> Southern blot para comprobar la obtención del mutante de delección de los genes <i>corSR</i>  | <b>130</b> |
| <b>Figura 48.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corSR$ .  | <b>131</b> |
| <b>Figura 49.</b> Análisis cualitativo del perfil de expresión del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corSR$ (A) Crecimiento vegetativo (B) Ciclo de desarrollo.   | <b>132</b> |
| <b>Figura 50.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa JM51DAZY durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo  | <b>132</b> |
| <b>Figura 51.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>corS</i> de <i>M. xanthus</i>  | <b>133</b> |
| <b>Figura 52.</b> Expresión del sistema <i>corSR</i> en ausencia de cobre añadido a las 72 h de incubación  | <b>134</b> |
| <b>Figura 53.</b> Expresión del sistema <i>corSR</i> en presencia de cobre añadido a las 72 h de incubación   | <b>134</b> |
| <b>Figura 54.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica dependiente de cobre de la cepa <i>corSRlacZ</i> -WT durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo   | <b>135</b> |
| <b>Figura 55.</b> Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con los genes <i>corSR</i> en el mutante $\Delta corSR$  | <b>136</b> |
| <b>Figura 56.</b> Análisis cualitativo de la fusión <i>lacZ</i> con los genes <i>corSR</i> en la bacteria silvestre de <i>M. xanthus</i> y en el mutante $\Delta corSR$   | <b>136</b> |
| <b>Figura 57.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa <i>corSRlacZ</i> - $\Delta corSR$ durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo   | <b>137</b> |
| <b>Figura 58.</b> Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de la bacteria mutante $\Delta corSR$  | <b>138</b> |
| <b>Figura 59.</b> Inducción de la síntesis de carotenoides en el mutante $\Delta corSR$ como consecuencia de la adición de sulfato de cobre   | <b>138</b> |
| <b>Figura 60.</b> Tolerancia al cobre de las células del mutante $\Delta corSR$ inducidas con 600 $\mu$ M de sulfato de cobre   | <b>139</b> |
| <b>Figura 61.</b> (A) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante $\Delta corSR$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre (B) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y $\Delta corSR$ en medio CF con 40 $\mu$ M de sulfato de cobre | <b>140</b> |
| <b>Figura 62.</b> Southern blot para comprobar la obtención del mutante doble $\Delta corSR \Delta carB$  | <b>141</b> |
| <b>Figura 63.</b> Fenotipo del mutante doble $\Delta corSR \Delta carB$ durante el crecimiento vegetativo   | <b>142</b> |
| <b>Figura 64.</b> Cuerpos fructificantes de las cepas $\Delta corSR$ y $\Delta corSR \Delta carB$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre  | <b>143</b> |
| <b>Figura 65.</b> Fenotipo de las cepas silvestre y $\Delta corSR$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de 600 $\mu$ M de sulfato de cobre   | <b>143</b> |
| <b>Figura 66.</b> Southern blot de las fusiones <i>lacZ</i> de los genes <i>fruA</i> (A), <i>mrpC</i> (B) y <i>tps</i> (C), introducidas en el silvestre DZF1 y en el mutante $\Delta corSR$  | <b>145</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 67.</b> Expresión de las fusiones <i>lacZ</i> de los genes <i>fruA</i> , <i>tps</i> y <i>mrpC</i> en las bacterias DZF1 y $\Delta corSR$ de <i>M. xanthus</i> a partir de cultivos previamente crecidos en presencia de 600 $\mu$ M de sulfato de cobre | <b>146</b> |
| <b>Figura 68.</b> Determinación del cobre intracelular para las bacterias silvestre DZF1 y el mutante $\Delta corSR$ (JM51DIF) durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo   | <b>147</b> |
| <b>Figura 69.</b> Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa para el gen <i>copA</i> durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo  | <b>149</b> |
| <b>Figura 70.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>copA</i> en el mutante doble para los reguladores CorSR y CorE de <i>M. xanthus</i> durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo                                  | <b>150</b> |
| <b>Figura 71.</b> Expresión del sistema Cus2 en la cepa silvestre DZF1 y el mutante $\Delta corSR$ durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo   | <b>151</b> |
| <b>Figura 72.</b> Distintos mutantes de delección contruidos para el estudio del dominio sensor de la histidina quinasa CorS  | <b>153</b> |
| <b>Figura 73.</b> Southern blot para comprobar la obtención de los mutantes 1 y 2 del dominio sensor de la histidina quinasa CorS   | <b>154</b> |
| <b>Figura 74.</b> Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> en los mutantes $\Delta corS1$ y $\Delta corS2$   | <b>155</b> |
| <b>Figura 75.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corS1$ (Mut 1) y el mutante $\Delta corS2$ (Mut 2) durante el crecimiento vegetativo.  | <b>156</b> |
| <b>Figura 76.</b> Southern blot para comprobar la obtención de los mutantes 3, 4, 5, y 6 del dominio sensor de la histidina quinasa CorS  | <b>157</b> |
| <b>Figura 77.</b> Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> en los mutantes $\Delta corS3$ , $\Delta corS4$ , $\Delta corS5$ y $\Delta corS6$   | <b>158</b> |
| <b>Figura 78.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corS3$ (Mut 3) y el mutante $\Delta corS4$ (Mut 4) durante el crecimiento vegetativo   | <b>159</b> |
| <b>Figura 79.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta corS5$ (Mut 5) y el mutante $\Delta corS6$ (Mut 6) durante el crecimiento vegetativo   | <b>160</b> |
| <b>Figura 80.</b> Secuencia nucleotídica del gen MXAN3417 de <i>M. xanthus</i>  | <b>162</b> |
| <b>Figura 81.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN3417  | <b>163</b> |
| <b>Figura 82.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>cuoA</i> de <i>M. xanthus</i> en el mutante $\Delta 3417$  | <b>164</b> |
| <b>Figura 83.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta 3417$ durante el crecimiento vegetativo  | <b>164</b> |
| <b>Figura 84.</b> Localización de cuatro sitios potenciales de unión a $\sigma^{54}$ en el cluster <i>curA</i> y LOGO de la secuencia consenso de dichos sitios   | <b>165</b> |
| <b>Figura 85.</b> (A) Localización de las posibles UAS en el cluster <i>curA</i> . (B) Alineamiento de las regiones situadas por encima de los genes A (MXAN3421) y C (MXAN3419)  | <b>167</b> |
| <b>Figura 86.</b> Southern blot para la identificación de los mutantes para las posibles UAS  | <b>168</b> |



## Índice

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 87.</b> Análisis cualitativo de las fusiones <i>lacZ</i> con los genes <i>cuoA</i> , <i>corSR</i> y <i>copA</i> en la bacteria silvestre DZF1 y en el mutante $\Delta$ UAS1   | <b>169</b> |
| <b>Figura 88.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> y los genes <i>corSR</i> en el mutante $\Delta$ UAS1 durante el crecimiento vegetativo   | <b>170</b> |
| <b>Figura 89.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>copA</i> en el mutante $\Delta$ UAS1 durante el crecimiento vegetativo  | <b>170</b> |
| <b>Figura 90.</b> Análisis cualitativo de las fusiones <i>lacZ</i> con los genes <i>cuoA</i> , <i>corSR</i> y <i>copA</i> en la bacteria silvestre DZF1 y en el mutante $\Delta$ UAS2   | <b>171</b> |
| <b>Figura 91.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>cuoA</i> en el mutante $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo  | <b>172</b> |
| <b>Figura 92.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa de los genes <i>corSR</i> en el mutante $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo  | <b>172</b> |
| <b>Figura 93.</b> Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa del gen <i>copA</i> en el mutante $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo  | <b>173</b> |
| <b>Figura 94.</b> Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo del mutante $\Delta$ 3417  | <b>174</b> |
| <b>Figura 95.</b> Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre DZF1 y del mutante $\Delta$ 3417 de <i>M. xanthus</i> en medio CF en ausencia de cobre  | <b>175</b> |
| <b>Figura 96.</b> Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre DZF1 y del mutante $\Delta$ 3417 de <i>M. xanthus</i> en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre  | <b>175</b> |
| <b>Figura 97.</b> Secuencia nucleotídica del gen MXAN3414 de <i>M. xanthus</i>  | <b>176</b> |
| <b>Figura 98.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN3414  | <b>177</b> |
| <b>Figura 99.</b> Inducción de la síntesis de carotenoides en el mutante $\Delta$ 3414 como consecuencia de la adición de sulfato de cobre.   | <b>178</b> |
| <b>Figura 100.</b> Cuerpos fructificantes de las cepas DZF1 y mutante $\Delta$ 3414 de <i>M. xanthus</i> en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre  | <b>179</b> |
| <b>Figura 101.</b> Alineamiento del dominio sensor de la histidina quinasa CorS de <i>M. xanthus</i> con los dominios sensores de otras histidina quinasa presentes en <i>S. cellulosum</i> y especies del género <i>Anaeromyxobacter</i> | <b>193</b> |
| <b>Figura 102.</b> Regulación del cluster <i>curA</i> por el sistema regulador de dos componentes CorSR   | <b>197</b> |
| <b>Figura 103.</b> Resumen de las funciones del cluster <i>curA</i>   | <b>198</b> |

## **A. INTRODUCCIÓN**



## A. INTRODUCCIÓN

### A.I. MIXOBACTERIAS

#### A.I.1. Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias son un grupo de bacterias Gram negativas, en su mayoría aerobias y móviles por deslizamiento, con forma de bacilo largo y delgado, y con un tamaño relativamente grande (0.7-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho por 3-12  $\mu\text{m}$  de largo). Estos microorganismos se caracterizan porque forman unos agregados multicelulares macroscópicos de colores brillantes, conocidos como cuerpos fructificantes, en respuesta al agotamiento de nutrientes en el medio. En el interior de los cuerpos fructificantes, las células se diferencian en estructuras de resistencia conocidas como mixósporas, capaces de sobrevivir en el medio hasta germinar una vez que las condiciones vuelven a ser favorables para la bacteria. Este complejo ciclo de vida desarrollado por la mixobacterias es único entre los procariotas (Reichenbach, 2005; Whitworth, 2008).

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

El material genético de estas bacterias se encuentra organizado en uno o varios nucleoides, mientras que en el citoplasma suelen aparecer cuerpos de inclusión de polifosfato o polisacáridos de reserva. Entre los apéndices extracelulares, las mixobacterias presentan dos tipos, pili de tipo IV polares y fibrillas de disposición peritrica de naturaleza polisacáridica en contacto con la matriz extracelular. Ambas estructuras están implicadas en la movilidad por deslizamiento y en las interacciones célula-célula (Wu y Kaiser, 1995; Shimkets y Dworkin, 1997; Pelling *et al.*, 2005).

Las mixobacterias degradan y se alimentan cooperativamente de materia orgánica insoluble presente en el medio ambiente, como son proteínas desnaturalizadas, fragmentos de células y microorganismos vivos o muertos, tales como actinomicetos, cianobacterias, levaduras y hongos filamentosos. La alimentación de microorganismos vivos es llevada a cabo mediante bacteriolisis por la acción de un conjunto de exoenzimas secretadas por las células individuales para la destrucción de células vivas intactas y para la hidrólisis de almidón, xilano y quitina. El lisado producido representa la base nutricional de las mixobacterias, por lo que son conocidas como microdepredadores (Reichenbach y Dworkin, 1991; Reichenbach, 1993).

La mayoría de las mixobacterias presentan un metabolismo aerobio quimiorganotrofo, empleando aminoácidos principalmente como fuente de energía, nitrógeno y carbono (Bretscher y Kaiser, 1978). Estos aminoácidos se obtienen a partir de oligopéptidos liberados durante la hidrólisis de proteínas mediante proteasas secretadas por la propia bacteria. Estas bacterias no suelen usar hidratos de carbono como fuente de energía (Watson y Dworkin, 1968), aunque estos azúcares estimulan el crecimiento al ser utilizados como fuente de carbono (Reichenbach, 2005). Un grupo

## Introducción

minoritario de especies que pertenecen al género *Sorangium* son celulolíticas, metabolizando azúcares a partir de la degradación de celulosa.

Estas bacterias producen una enorme cantidad de sustancias naturales con actividades antifúngicas, antitumorales o antibióticas procedentes del metabolismo secundario, generando compuestos con una gran relevancia para su aplicación en la industria farmacéutica o agroquímica (Reichenbach y Höfle, 1993). Las mixobacterias generan el 5% de los compuestos conocidos con actividad biológica procedentes de microorganismos, en la mayoría de los casos, a partir de especies pertenecientes a los géneros *Sorangium*, *Myxococcus* y *Chondromyces* (Gerth *et al.*, 2003).

La mayoría de las sustancias producidas por las mixobacterias son activas frente a hongos y bacterias. Entre estas sustancias se encuentran antifúngicos como los sorafenos, antibióticos como la mixovirescina y antitumorales como las epotilonas (Gerth *et al.*, 1982; Gerth *et al.*, 1994; Gerth *et al.*, 1996; Krug *et al.*, 2008). El significado biológico para la producción de estos compuestos está relacionado con la presión competitiva ejercida en el hábitat natural de estas bacterias. Así, las mixobacterias celulolíticas como *Sorangium* suelen generar antifúngicos para competir con hongos degradadores de madera, mientras que las mixobacterias proteolíticas como *Myxococcus* producen antibióticos frente a bacterias degradadoras de materia orgánica (Gerth *et al.*, 2003).

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

### **A.I.2. Distribución de las mixobacterias en la naturaleza**

Las mixobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, dado que su enorme capacidad para desarrollar respuestas adaptativas frente a diferentes condiciones ambientales posibilita su crecimiento en una amplia diversidad de nichos ecológicos, de forma que es posible encontrarlas en casi cualquier hábitat (Reichenbach y Dworkin, 1992). Aparecen en todas las zonas climáticas, regiones de vegetación y altitudes, aunque la mayor riqueza en número de especies y densidad de población se encuentra en zonas con clima tropical y templado, mientras que en ambientes fríos, como las zonas árticas, subárticas o situadas a gran altitud, la presencia y abundancia de mixobacterias es menor (Dawid, 2000; Shimkets *et al.*, 2005).

El hábitat principal de las mixobacterias es la zona superficial del suelo, formando parte de la microbiota edáfica autóctona (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). Sin embargo, son un grupo minoritario dentro de la comunidad microbiana del suelo, y constituyen menos del 1% de las bacterias presentes en ese hábitat. No obstante, el número exacto de mixobacterias de un hábitat particular es difícil de determinar debido a que tienden a adherirse a las partículas y entre sí.

Se han encontrado mixobacterias en muchos tipos de suelos, principalmente en aquellos que tienen un rango de pH entre 5 y 8, aunque también se han hallado en suelos con pHs extremos (Dawid, 2000). Las mixobacterias parecen preferir suelos ricos en materia orgánica y con vida microbiana en general (compost, suelos de jardín, campos cultivados y bosques), actuando como colonizadores secundarios. No obstante,

estos microorganismos también se encuentran presentes sobre arena o superficies rocosas (Dawid, 2000). En la microbiota del suelo, las mixobacterias actúan como microdepredadores, ejerciendo un papel regulador de las poblaciones microbianas edáficas ya que liberan enzimas hidrolíticas y antibióticos que lisan las bacterias situadas en su entorno.

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

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

En cuanto a la temperatura, las mixobacterias son generalmente microorganismos mesófilos con una temperatura óptima de crecimiento en torno a 30-34°C, en el caso de *M. xanthus*. Sin embargo, se han aislado cepas psicrófilas en la Antártida que crecen de forma adecuada a 4°C, y cepas termófilas moderadas a partir de ambientes semiáridos que lo hacen a 42-44°C (Gerth y Müller, 2005).

Las mixobacterias son consideradas organismos aerobios estrictos aunque de forma excepcional, se han aislado varias especies pertenecientes al género *Anaeromyxobacter* a partir de suelos y sedimentos fluviales sometidos a condiciones anaerobias estrictas (Sanford *et al.*, 2002).

### A.I.3. Taxonomía y filogenia

El análisis del ARNr 16S permite encuadrar a las mixobacterias dentro de la subdivisión delta de las Proteobacterias, junto con el grupo de bdellovibrios que también son depredadoras, y el de las bacterias sulfatorreductoras (Shimkets *et al.*, 2005). Las diferencias de secuencia en las moléculas de ARNr 5S y 16S sugieren que la subdivisión delta podría haberse originado hace de 750 a 1100 millones de años, mientras que las mixobacterias aparecieron hace de 650 a 800 millones de años (Shimkets, 1993).

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

## Introducción

Así, en las  $\delta$ -proteobacterias destaca la presencia de proteínas de señalización, como reguladores dependientes de  $\sigma^{54}$  y sistemas de dos componentes. Además, suelen presentar numerosas proteínas asociadas a secreción, así como múltiples proteínas de tipo chaperona. Igualmente, estos microorganismos producen numerosas lactamasas, proteínas de biosíntesis de diguanilato cíclico y receptores de tipo TonB. Finalmente, en relación a la síntesis proteica, en las  $\delta$ -proteobacterias el conjunto de genes ribosómicos se sitúa en la región *ter* y, además, contienen dos proteínas ribosómicas gigantes S1 y un complemento especial de ARNt sintetasa específico de este grupo (Karlín *et al.*, 2006).

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

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

| ORDEN               | SUBORDEN                | FAMILIA                   | GÉNERO  |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|---|
| <i>Myxococcales</i> | <i>Cystobacterineae</i> | <i>Myxococcaceae</i>      | <i>Myxococcus</i><br><i>Anaeromyxobacter</i><br><i>Corallococcus</i><br><i>Pyxidicoccus</i>               |
|                     |                         | <i>Cystobacteraceae</i>   | <i>Archangium</i><br><i>Cystobacter</i><br><i>Hyalangium</i><br><i>Melittangium</i><br><i>Stigmatella</i> |
|                     | <i>Sorangineae</i>      | <i>Polyangiaceae</i>      | <i>Bysovorax</i><br><i>Chondromyces</i><br><i>Polyangium</i><br><i>Sorangium</i>                          |
|                     |                         | <i>Phaselicystidaceae</i> | <i>Phaselicystis</i>  |
|                     | <i>Nannocystineae</i>   | <i>Nannocystaceae</i>     | <i>Nannocystis</i><br><i>Plesiocystis</i>   |
|                     |                         | <i>Haliangeaceae</i>      | <i>Haliangium</i>   |

### A.I.4. Movilidad

Las mixobacterias muestran un comportamiento social expresado a través de la formación de enjambres, agrupaciones de miles de células que cooperan para nutrirse durante el crecimiento vegetativo, y de cuerpos fructificantes cuando las condiciones nutricionales son adversas. Estos comportamientos dependen de la capacidad de movimiento por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua de

estas bacterias. El deslizamiento se define como el movimiento de células no flageladas en la dirección de su eje longitudinal sobre una superficie (Henrichsen, 1972). En *M. xanthus*, este movimiento es acompañado por el encorvamiento de las células (Spormann y Kaiser, 1995) y la secreción de mucílago. La velocidad de este movimiento es variable, oscilando entre 1.5 y 6  $\mu\text{m}/\text{min}$ , aunque en algunas ocasiones se han observado velocidades de hasta 20  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Spormann y Kaiser, 1995), sin embargo este movimiento es lento comparado con el de las bacterias flageladas que alcanzan velocidades de unos 60  $\mu\text{m}/\text{min}$ . La velocidad del movimiento en las mixobacterias depende de la distancia entre las células, siendo mayor cuando las células se encuentran en contacto (a una distancia inferior al diámetro celular) que cuando se hallan aisladas (Spormann y Kaiser, 1995).

Durante el movimiento por deslizamiento de las mixobacterias, éstas se desplazan siguiendo un recorrido lineal, manteniendo una misma dirección a lo largo del tiempo. Sin embargo, debido a la flexibilidad de estas células, a medida que se desplazan se produce una curvatura de la célula que conduce a una desviación moderada en la ruta de desplazamiento facilitando cambios direccionales. Periódicamente, las células se detienen de manera momentánea y reanudan el movimiento en la misma dirección, o bien sufren una reversión en el sentido del desplazamiento de modo que el extremo anterior de la célula se convierte en el posterior. La reversión celular es esencial para dirigir el movimiento de las células de *M. xanthus*. La frecuencia de reversión se regula de forma estricta mediante sistemas de control quimiotácticos (Søgaard-Andersen, 2004).

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

*M. xanthus* posee dos sistemas de movilidad por deslizamiento: movilidad A o aventurera y movilidad S o social (Hodgkin y Kaiser, 1979a y b). El sistema A controla el movimiento de células individuales, y el sistema S determina el movimiento de grupos de células, por lo que, a diferencia del sistema A, requiere el contacto célula-célula. Estos sistemas de movilidad son genéticamente independientes, de manera que se pueden obtener mutantes para cada tipo de movilidad. Así, un mutante  $A^-S^-$  es totalmente inmóvil, mientras que un mutante  $A^-S^+$  conserva la movilidad social, y un mutante  $A^+S^-$  mantiene la movilidad aventurera.

#### **A.I.4.1. Movilidad social**

La movilidad social permite el movimiento de grupos de células asociadas entre sí en estrecho contacto, e implica a más de 80 genes. Este sistema de movilidad depende de tres grupos principales de genes: *pil*, *eps-eas* y *tgl*, y requiere la presencia de tres componentes celulares: pili de tipo IV, fibrillas de la matriz extracelular y lipopolisacárido o antígeno O (Youderian y Hartzell, 2006).



## Introducción

Los genes *pil* están organizados en un grupo constituido por 17 genes y codifican proteínas implicadas en la síntesis, procesamiento, transporte y ensamblaje de los constituyentes de los pili de tipo IV de *M. xanthus*, así como en la función de estos orgánulos celulares (Wu y Kaiser, 1995; Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998; Wall *et al.*, 1999). Los pili de tipo IV, completamente requeridos para la movilidad S, son apéndices extracelulares polares formados por polímeros de pilina PilA (Wu y Kaiser, 1995) generada por proteólisis del extremo N-terminal de la prepilina de tipo IV (Strom y Lory, 1993). Estos pili de tipo IV son requeridos para la adherencia de las células de *M. xanthus* a superficies sólidas. La movilidad S implica ciclos de extensión de los pili, adhesión de los mismos a la superficie sólida y retracción. PilA es una proteína soluble que se localiza en el polo delantero de la célula y atraviesa la membrana externa a través de un canal formado por la proteína PilQ, una ATPasa requerida para la actividad de los pili (Wall *et al.*, 1999, Nudleman *et al.*, 2006). PilQ forma parte de un complejo proteico que incluye al transportador PilC y a las ATPasas PilB y PilT implicadas en el ensamblaje y retracción de los pili, respectivamente (Jakovljevic *et al.*, 2008). Recientemente, se ha visto que un mutante *pilT* llevaba a cabo retracción de los pili, aunque a una frecuencia más baja, proporcionando evidencias de un mecanismo de retracción independiente de PilT en *M. xanthus*. Sin embargo, las características físicas de las retracciones de los pili de tipo IV independientes de PilT eran distintas de las retracciones en las que estaba implicada dicha proteína (Clausen *et al.*, 2009).

El gen *tgl* codifica una lipoproteína constituida por unidades repetidas de tetratricopéptidos (Rodríguez-Soto y Kaiser, 1997) que se localiza en un polo de la célula y parece ser esencial para el ensamblaje de PilQ, a la membrana externa durante la formación de los pili (Nudleman *et al.*, 2005).

Se ha visto que las mutaciones en cualquiera de los genes *pil* o *tgl* dan lugar a una ausencia de pili de tipo IV, lo que conlleva a la pérdida de movilidad social.

Por su parte, los genes *eps-eas* generan proteínas de biosíntesis y transporte del exopolisacárido de las fibrillas, junto con proteínas reguladoras (Lu *et al.*, 2005). Las fibrillas de *M. xanthus* son filamentos de disposición peritrica constituidos por proteínas y polisacáridos que recubren la superficie celular generando una matriz extracelular que interconecta las células (Behmlander y Dworkin, 1994). Aunque las fibrillas están constituidas por proteínas y polisacáridos, es el exopolisacárido el componente importante para la movilidad S (Li *et al.*, 2005b). Estas fibrillas están implicadas en procesos de interacción y de cohesión célula-célula, promoviendo el comportamiento social de *M. xanthus* durante la movilidad y el desarrollo. Asociada a la matriz extracelular se ha detectado una metaloproteasa, denominada FibA importante para la respuesta quimiotáctica durante el desarrollo (Kearns *et al.*, 2002). Las mutaciones en los genes *eps-eas* generan ausencia de fibrillas de manera que las células no presentan movilidad social y son incapaces de agregarse y de formar cuerpos fructificantes.

En adición a los genes que codifican para los pili de tipo IV y el exopolisacárido en *M. xanthus*, se ha visto que mutaciones que impiden la síntesis o ensamblaje del antígeno O del lipopolisacárido también provocan una pérdida de la movilidad social (Youderian y Hartzell, 2006). El cómo y el por qué el lipopolisacárido está implicado en el mecanismo de movilidad social permanece sin respuesta. Defectos en la producción del antígeno O resultarían en defectos en el metabolismo y/o la estructura

de la pared celular, porque el antígeno O representa una fracción significativa del carbono presente en las células Gram negativas. Alternativamente, el antígeno O participaría directamente en el proceso de extensión y retracción de los pili de tipo IV.

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

La reversión periódica en la dirección del movimiento determina la desorganización de los pili de tipo IV en un polo y su reensamblaje en el polo opuesto. Durante este cambio, la proteína FrzS, necesaria para la movilidad, se localiza sobre el polo portador de los pili y se mueve siguiendo un patrón oscilante entre ambos polos migrando a lo largo de un filamento que recorre toda la célula. Por tanto, parece que la dinámica de esta proteína regula la polaridad del movimiento durante el deslizamiento (Mignot *et al.*, 2005; Huitema y Viollier, 2006). A su vez, la frecuencia de oscilación de FrzS está controlada por el sistema quimiosensor Frz (Mignot *et al.*, 2007a).

#### **A.I.4.2. Movilidad aventurera**

La movilidad aventurera es la responsable de la movilidad de las células individuales sobre una superficie sólida y a diferencia de la movilidad social, no se comprende muy bien cómo se lleva a cabo. Se piensa que está impulsada por una combinación de proteínas motoras no identificadas, complejos de adhesión focal y secreción de mucílago (Wolgemuth *et al.*, 2002; Mignot *et al.*, 2007b). Este sistema incluye más de 30 genes entre los que destacan los grupos de genes *agl*, *agm* y *cgl* (Hartzell *et al.*, 2008).

En *M. xanthus* se han encontrado complejos porosos localizados en los extremos de la célula que parecen secretar mucílago para propulsar a la bacteria durante la movilidad aventurera, tal como ocurre en las cianobacterias (Hoiczky y Baumeister, 1998; Wolgemuth *et al.*, 2002). Estos complejos están formados por varias proteínas de transporte de biopolímeros similares a las proteínas Tol/Ton de *Escherichia coli* codificadas por genes *agl* (Youderian *et al.*, 2003), que en otras bacterias Gram negativas forman parte de complejos de transporte a través de las membranas externa e interna (Llamas *et al.*, 2003). La síntesis de mucílago depende de varias enzimas biosintéticas de tipo glicosiltransferasa codificadas por genes *agl* y *pgl* (Yu y Kaiser, 2007).

Otro grupo de genes implicado en la movilidad aventurera, *agm*, codifican proteínas que interaccionan con las proteínas de tipo Tol. AgmA, que presenta actividad acetilmuramoil L-alanina amidasa, parece estar implicada en el anclaje a la pared celular de una proteína motora de la movilidad aventurera (Youderian *et al.*,

## Introducción

2003). Varias proteasas codificadas por los genes *agmM* y *agmW*, también son requeridas para movilidad A. Estas proteínas estarían implicadas en el procesamiento de otras proteínas para la movilidad A.

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

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

Se ha descrito que en la movilidad aventurera de *M. xanthus* también es esencial la proteína AglZ, que forma complejos de adhesión focal anclados al sustrato de forma transitoria a partir de la superficie de la bacteria. Estos complejos se ensamblan en el polo delantero, desde donde mantiene una posición fija respecto al sustrato a medida que la célula se desplaza hacia delante, por lo que progresivamente se desplazan a lo largo de toda la célula, colaborando para generar la fuerza necesaria para propulsar el deslizamiento de la misma. Finalmente, cuando se revierte el sentido de movimiento, estos complejos se relocalizan con rapidez en el polo delantero (Mignot *et al.*, 2007b; Sliusarenko *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que la proteína AglZ no es un componente del motor que impulsa la movilidad aventurera, sino más bien un regulador del sistema de movilidad A. Se ha visto que AglZ interacciona con la proteína FrzCD, el componente principal del sistema quimiosensor Frz. Esta interacción ha revelado que AglZ actúa aguas arriba de la ruta Frz en la regulación de la movilidad aventurera. FrzCD parece ser un inhibidor de la movilidad A y AglZ elimina esta inhibición al interactuar con el dominio N-terminal de FrzCD. Se especula que esta interacción está favorecida cuando las células están aisladas, e inhibida cuando las células están en grupos, situación que favorece la movilidad social (Mauriello *et al.*, 2009).

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

### A.I.4.3. Regulación de la movilidad

Se ha identificado un único *locus*, denominado *mgl*, esencial para los dos sistemas de movilidad en *M. xanthus*, cuya mutación suprime completamente la capacidad de deslizamiento de esta bacteria. Además, también se ven afectadas la formación de cuerpos fructificantes y la esporulación (Stephens y Kaiser, 1987; Kroos

*et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1989). Los mutantes *mgl* no son completamente inmóviles, en realidad se mueven mediante bruscas sacudidas oscilantes sin desplazamiento neto, debido a que presentan una elevada tasa de reversión de movimiento, superior en más de diez veces a la de la cepa silvestre (Spormann y Kaiser, 1999).

Este *locus* codifica dos proteínas, MglA, una GTPasa de tipo Ras, y MglB, una proteína de tipo calmodulina (Hartzell y Kaiser, 1991a y b). MglA ejerce un papel clave en la regulación de la movilidad mediante el control en la reversión en el sentido del movimiento participando en el intercambio de GDP por GTP y su posterior hidrólisis mediante su actividad GTPasa (Hartzell y Kaiser, 1991a). Además, interacciona con la quinasa de tipo eucariota MasK para controlar la movilidad social (Thomasson *et al.*, 2002). MglB, por su parte, controla la cantidad de proteína MglA en la célula, lo que parece indicar que MglB estabilizaría a la proteína MglA o regularía su función (Hartzell y Kaiser, 1991b).

Recientemente se ha propuesto que MglA se activa a través del sistema Frz para reclutar moléculas importantes para la reversión de los dos tipos de movilidad. Además MglA es esencial para la localización de FrzS y AglZ y parece interactuar con ambas proteínas. En el caso de AglZ, cuando se delecta el gen *aglZ* la movilidad A se ve totalmente suprimida, lo que sugiere que MglA interacciona con AglZ para controlar la movilidad A (Mauriello y Zusman, 2007).

#### A.I.4.4. Quimiotaxias

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

En *M. xanthus* se han identificado dos sistemas reguladores quimiotácticos conocidos como Dif y Frz (frizzy), muy similares al sistema Che de las bacterias entéricas (Shi *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998). Ambos sistemas son esenciales para el desarrollo, dado que las células se deslizan hasta ciertos puntos para originar cuerpos fructificantes. Probablemente, estas células respondan a ciertos estímulos químicos, y por tanto, la formación de cuerpos fructificantes depende de la actividad quimiosensora aportada por estas rutas de señalización. Sin embargo, estos sistemas quimiotácticos actúan de forma independiente y desempeñan funciones celulares diferentes durante el ciclo de vida de la mixobacteria.

El sistema Dif consta de 5 proteínas quimiotácticas integradas dentro de una ruta de señalización que regula la movilidad social. Este sistema quimiosensor es el responsable de la organización de las células en grupos sociales así como de la coordinación de los movimientos de las mismas dentro de dichos grupos (Yang *et al.*, 1998). Este sistema, también regula la biosíntesis de matriz extracelular (Yang *et al.*, 2000; Black y Yang, 2004), dentro de una ruta controlada por los pili de tipo IV que, al

## Introducción

actuar como sensores, estimulan esta cascada de señalización promoviendo la producción de matriz extracelular necesaria para la movilidad social (Black *et al.*, 2006).

El sistema frizzy, por su parte, está constituido por 6 proteínas quimiosensoras codificadas por genes localizados en el mismo operón y que conforman una ruta de señalización que controla la frecuencia de reversión celular en ambos sistemas de movilidad. De hecho, los mutantes *frz* raramente muestran reversiones celulares durante el deslizamiento de la bacteria (Blackhart y Zusman, 1985a y b). Este sistema controla y coordina tanto la movilidad A como la S, aunque estos dos sistemas de movilidad son fundamentalmente diferentes. El sistema frizzy confiere a la célula la capacidad para dirigirse hacia los centros de agregación durante la formación de los cuerpos fructificantes al reducir de forma drástica la frecuencia de reversión en respuesta al intercambio de señales celulares durante el desarrollo (Shi *et al.*, 2000).

El elemento central quimiosensor del sistema frizzy es el receptor citoplasmático FrzCD, una proteína aceptora de grupos metilo, cuya metilación regulada por FrzF, una metiltransferasa con TPR (Scott *et al.*, 2008), es necesaria para la adaptación a un estímulo. Los cambios en la metilación de FrzCD sugieren que durante la agregación, esta proteína detecta el estímulo químico producido por otras células y promueve el movimiento de las bacterias hacia los centros de agregación (Geng *et al.*, 1998). FrzE es una proteína de fusión con similitud con la histidina quinasa CheA y el regulador de respuesta CheY, y es capaz de interactuar con los componentes de la maquinaria de movilidad para regular la frecuencia de reversión durante el deslizamiento (Bonner *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005a). Las proteínas FrzCD, FrzA y el dominio CheA de FrzE son esenciales para la formación de enjambres durante el crecimiento vegetativo, la respuesta a repelentes y el movimiento dirigido durante el desarrollo. El resto de componentes de la ruta frizzy, FrzB, FrzF, FrzG y el dominio CheY de FrzE son requeridos para algunas respuestas pero no para todas, de manera que no son tan esenciales dentro de esta ruta de señalización.

Se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina funciona como atrayente quimiotáctico (Kearns y Shimkets, 1998), de manera que la transducción de señales en respuesta a este fosfolípido depende del sistema Dif, en cooperación con los pili de tipo IV y la metaloproteasa FibA, promoviendo la agregación (Bonner *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2006). Recientemente se ha visto que no sólo el sistema Dif es requerido para la quimiotaxia de fosfatidiletanolamina, también es requerido el sistema Frz. El primero es necesario para la excitación mientras que el segundo interviene en la adaptación. La proteína DifA, una proteína con similitud a las proteínasceptoras de grupos metilo, no se metila si no que la transmisión de las señales a través de ella, estimula la metilación de FrzCD. Además de sistemas de detección de fosfatidiletanolamina dependientes de Dif, *M. xanthus* también posee mecanismos independientes de Dif. El mecanismo sensor dependiente de Dif suprime el incremento de metilación de FrzCD en respuesta al atrayente desacelerando o retrasando la adaptación, y lo eleva cuando la estimulación es negativa. Mientras que la detección de fosfatidiletanolamina independiente de Dif, pero dependiente de Frz, conduce a la metilación de FrzCD y la subsiguiente adaptación. Estas interacciones antagonistas son cruciales para la quimiotaxia efectiva de esta bacteria deslizante, para garantizar que la adaptación no se produzca demasiado rápido en relación con el lento movimiento de *M. xanthus* (Xu *et al.*, 2008).

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

El ciclo de vida de las mixobacterias es muy complejo, ya que comprende dos fases distintas: un ciclo de vida vegetativo cuando hay abundancia de nutrientes en el medio, y un ciclo de desarrollo cuando hay falta de los mismos.

#### A.I.5.1. Ciclo vegetativo

Durante el ciclo de vida vegetativo, la bacteria dispone de nutrientes en el medio y los utiliza para el propio crecimiento celular. Este crecimiento se pone de manifiesto en la progresiva elongación de las células, hasta que, finalmente, se produce la división celular mediante fisión binaria, incrementando el número de bacterias de la población microbiana. De esta forma, las mixobacterias crecen y se multiplican a expensas de los nutrientes del medio, al igual que ocurre en el resto de las bacterias (Fig. 1).

En el crecimiento vegetativo, las mixobacterias se mantienen unidas y se desplazan coordinadamente formando agrupaciones que se denominan enjambres, formadas por miles de células asociadas entre sí. En estos enjambres, las mixobacterias se alimentan de manera cooperativa de otros microorganismos, tales como bacterias y levaduras, al inducir la lisis celular siguiendo un comportamiento conocido como microdepredación (Reichenbach y Dworkin, 1992; Reichenbach, 1993) (Fig. 1). La eficiencia del ataque de *M. xanthus* depende de la disponibilidad de la presa y se incrementa cuando ésta se encuentra agrupada más densamente sobre un sustrato con mayor consistencia (Hillesland *et al.*, 2007).

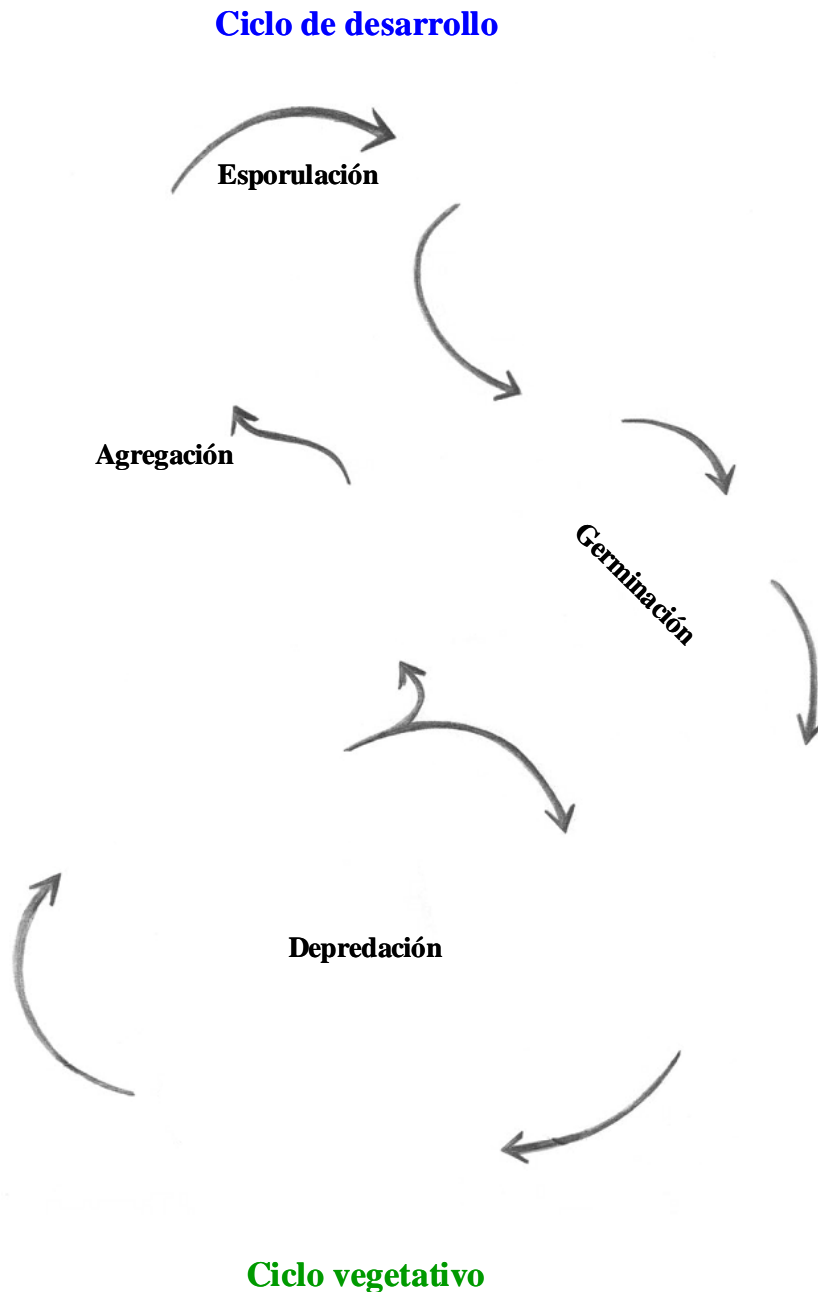
En esta estrategia de nutrición cooperativa, las mixobacterias liberan enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, glucanasas y nucleasas que actúan destruyendo células vivas intactas y células muertas, y son capaces de degradar polímeros complejos para generar nutrientes asimilables. La colaboración del enjambre en la secreción de exoenzimas potencia la capacidad degradativa de las mixobacterias, aumentando la obtención de nutrientes de manera más eficiente que una célula individual (Rosenberg *et al.*, 1977).

A lo largo del crecimiento vegetativo las mixobacterias desarrollan en ocasiones un movimiento a modo de ondulaciones rítmicas relacionado con un comportamiento depredador que permite a la comunidad de bacterias consumir de manera eficiente los sustratos disponibles. De hecho, este movimiento se induce en respuesta al contacto directo con otros microorganismos o con grandes moléculas biopoliméricas. En cambio, su inhibición conlleva una reducción drástica de la capacidad depredadora (Berleman *et al.*, 2006). Recientemente se ha encontrado que *M. xanthus* utiliza el sistema quimiosensor frizzy para regular ese movimiento a modo de ondulaciones rítmicas durante la depredación de otras especies microbianas (Berleman *et al.*, 2008).

#### A.I.5.2. Ciclo de desarrollo

En las mixobacterias, cuando se agotan los nutrientes en el medio, se induce el ciclo de desarrollo en respuesta a la privación en el aporte de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo (Dworkin, 1963; Hemphill y Zahler, 1968). Esta carencia de nutrientes constituye el estímulo inductor que desencadena los eventos necesarios que

conducen hacia el ciclo de desarrollo. Pero para que el ciclo de desarrollo tenga lugar se requiere no sólo la ausencia de nutrientes, si no también una elevada densidad celular que permita el intercambio de diversas señales entre las células (Wireman y Dworkin, 1975; Shimkets y Dworkin, 1981) y una superficie sólida para el movimiento de las células por deslizamiento (Wireman y Dworkin, 1975; Kroos *et al.*, 1988).



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

Cuando se cumplen las condiciones anteriores las células, dentro del enjambre, comienzan a moverse hacia ciertos puntos denominados centros de agregación donde se apilan unas encima de otras. Estos centros de agregación, que en principio son dinámicos, se estabilizan y reclutan células adicionales para generar montículos que progresan hacia la formación de agregados multicelulares macroscópicos llamados cuerpos fructificantes (Fig. 1). En el interior de los cuerpos fructificantes, las células

vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixósporas (Fig. 1). Este proceso requiere unas 48 horas y está mediado por una cascada temporal de genes reguladores que responden a señales intra y extracelulares (Higgs *et al.*, 2008). Cuando las condiciones vuelven a ser adecuadas, las mixósporas germinan dando lugar a células vegetativas que reanudan el ciclo vegetativo (Dworkin, 1996; Kaiser, 2004) (Fig. 1).

En *M. xanthus* el proceso de desarrollo requiere aproximadamente  $10^5$  células, así que es necesario que las células individuales no sólo controlen su propio estado nutricional a nivel celular, si no también el estado nutricional a nivel de población (Singer y Kaiser, 1995). En esta bacteria, la progresión del ciclo de desarrollo hasta el comienzo de la esporulación, ocurre en tres fases: i) fase quiescente, con alguna movilidad pero poca agregación, que dura en torno a 8 horas, ii) periodo de movilidad vigorosa, con formación de cuerpos fructificantes, que va desde las 8 hasta las 16 horas y, iii) periodo de maduración de los cuerpos fructificantes, con inicio de esporulación, que transcurre desde las 16 a las 48 horas (Curtis *et al.*, 2007).

#### i) Oscilaciones rítmicas

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

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

#### ii) Formación de cuerpos fructificantes

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

En los distintos géneros de mixobacterias, los cuerpos fructificantes presentan una disposición variada. Así, en *Myxococcus* aparecen como montículos desnudos con forma redondeada y de consistencia blanda. En *Coralloccoccus*, dichos montículos son similares pero de consistencia dura. Sin embargo, la mayoría de los géneros forma cuerpos fructificantes más complejos como es el caso de *Stigmatella* o *Chondromyces*,



## Introducción

donde se diferencia un pedúnculo que soporta uno o varios esporangiolos, o *Sorangium* donde los esporangiolos se disponen directamente asociados al propio sustrato. Además, los cuerpos fructificantes aparecen como masas coloreadas debido a que las mixobacterias sintetizan carotenoides y un pigmento amarillo denominado DKxanteno (Meiser *et al.*, 2006; Elías-Arnanz *et al.*, 2008). De hecho, la forma, tamaño, color y disposición de los cuerpos fructificantes y esporangiolos son caracteres utilizados como rasgos para la determinación de la especie (Dawid, 2000).

En *M. xanthus* se ha descrito un modelo para el proceso de formación de cuerpos fructificantes durante el ciclo de desarrollo. En esta bacteria, la formación de dichos cuerpos tiene lugar mediante el desplazamiento orientado de la mixobacterias hacia los centros de agregación donde originan agrupaciones multicelulares macroscópicas que se generan por la colisión de grupos celulares organizados en disposición paralela que se desplazan en orientaciones opuestas. Las células quedan retenidas en el punto de colisión al encontrarse rodeadas por otras células. Cuando una corriente celular se aproxima a una agrupación, ésta actúa como obstáculo mecánico que fuerza a la corriente a desplazarse sobre o alrededor de dicha agrupación. Así, las células comienzan a disponerse en filas en torno al agregado siguiendo una trayectoria circular, aportando células sobre la periferia del agregado. En un principio el agregado presenta forma elipsoidal pero al incorporarse más células en movimiento adquiere forma esférica. Tras un tiempo, las células que formaban el núcleo de cada agrupación comienzan a dispersarse penetrando dentro de las corrientes celulares periféricas (Alber *et al.*, 2004; Kaiser y Welch, 2004; Kiskowski *et al.*, 2004; Sozinova *et al.*, 2005; Sozinova *et al.*, 2006).

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

Durante la formación de los cuerpos fructificantes, tan sólo una porción minoritaria de la población inicial sobrevive en forma de mixósporas de resistencia, mientras que la mayoría de células (aproximadamente el 80%) muere mediante autólisis o muerte celular programada, principalmente al inicio del proceso de agregación (Zhang *et al.*, 2005a; Nariya e Inouye, 2008). Esta muerte celular programada, mediada por la toxina MazF, una ARNm interferasa, representa un suicidio altruista que proporciona nutrientes necesarios para la supervivencia y diferenciación del resto de células durante el desarrollo (Zhang *et al.*, 2005a; Nariya e Inouye, 2008).

### iii) Esporulación

La esporulación tiene lugar por la diferenciación de las células vegetativas contenidas en el interior de los cuerpos fructificantes en formas de resistencia denominadas mixósporas. Estas mixósporas son metabólicamente quiescentes y resistentes a la desecación, la radiación UV, el SDS, el calor moderado y la sonicación.

La conversión de bacilos vegetativos en mixósporas va normalmente acompañada de un cambio celular, a veces suave como en el caso de *Stigmatella* donde las esporas son cilíndricas, similares a los bacilos vegetativos; o a veces más drástico como en *M. xanthus* donde son casi esféricas. Este cambio morfológico conlleva una reorganización de la envuelta celular que hace a las células muy sensibles a los cambios ambientales.

Las mixósporas se caracterizan por la presencia de una gruesa cubierta constituida por proteínas y polisacáridos (White, 1993). La proteína principal de la cubierta es la proteína S, con similitud a la calmodulina y que presenta dos dominios de unión a  $Ca^{2+}$ . La proteína S es sintetizada tempranamente en el desarrollo y se secreta para alcanzar la superficie de la mixóspora (Inouye *et al.*, 1979b). Otras proteínas presentes en la spora son la proteína S1 y la proteína U. Ambas son sintetizadas durante la etapa tardía del desarrollo, pero mientras que la S1 se acumula en el interior de las esporas (Downard y Zusman, 1985; Teintze *et al.*, 1985), la proteína U es secretada y ensamblada en la superficie de la mixóspora (Inouye *et al.*, 1979a). También se han identificado otras proteínas como las proteínas estructurales C, MspA, MspB y MspC (McCleary *et al.*, 1991; Dahl *et al.*, 2007).

Las mixósporas contienen dos copias cromosómicas completas para asegurar la viabilidad celular durante la germinación. La replicación del material genético tiene lugar durante la agregación de forma que al culminar esta fase existe un punto de control que verifica la integridad cromosómica antes de progresar hacia la esporulación (Tzeng y Singer, 2005; Tzeng *et al.*, 2006).

Al comienzo de la inanición, las células acumulan lípidos que proporcionan el combustible metabólico necesario para el desarrollo de las mixósporas. Estos lípidos van desapareciendo gradualmente hasta que las células se diferencian completamente en mixósporas maduras. Además, parece que la formación de esos acúmulos lipídicos en *M. xanthus* es un paso inicial que indica el destino de las células durante la diferenciación. Se ha observado que en condiciones de falta de nutrientes hay dos poblaciones celulares: células en cuyo interior se acumulan lípidos que se diferenciarán en mixósporas, y células que no acumulan dichos lípidos y permanecerán como bacilos periféricos. Estos datos indican que los acúmulos lipídicos no sólo constituyen el combustible celular para la diferenciación, sino que además su formación representa la primera señal morfológica conocida que indica el destino de las células durante la diferenciación a mixósporas (Hoiczky *et al.*, 2009).

### iv) Germinación

Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, en presencia de nutrientes en el medio, las mixósporas germinan dando lugar a bacilos vegetativos que comienzan a crecer y dividirse de nuevo, reanudando el ciclo vegetativo. Como las mixósporas se

## Introducción

encuentran en el interior de los cuerpos fructificantes, el ciclo vegetativo no es reiniciado por una única célula, sino por una elevada densidad celular que originará un nuevo enjambre. De este modo, el ciclo de desarrollo no sólo garantiza la supervivencia celular, sino también que la degradación de macromoléculas, mediante enzimas secretadas por las células vegetativas originadas a partir de la germinación de las mixósporas, sea eficaz.

La germinación de las mixósporas requiere diversos factores tales como el  $\text{Ca}^{2+}$  y serina proteasas. Además, durante la fase inicial de la germinación se sintetizan específicamente numerosas proteínas (Otani *et al.*, 1995).

Durante la germinación, las mixósporas pierden sus características de manera secuencial, comenzando con una adquisición de susceptibilidad frente a agentes externos, seguido de la pérdida de refractibilidad y culminando con un cambio en la forma celular (Elías y Murillo, 1991). La ruptura de la cubierta de la espora se produce de forma temprana durante la germinación con la degradación de la proteína S de la cubierta (Otani *et al.*, 1995). En el interior de cada mixóspora, ambas copias cromosómicas se sitúan en extremos opuestos, presentando una polarización que facilita el reparto de los cromosomas replicados durante la división celular que tiene lugar justo tras la germinación (Tzeng y Singer, 2005).

### A.I.5.3. Inducción química de la esporulación

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

Las mixósporas producidas mediante inducción química son capaces de germinar, aunque presentan ciertas diferencias con respecto a las mixósporas producidas en el ciclo de desarrollo normal. Son menos resistentes debido a la presencia de una cubierta más delgada carente de proteínas S y C, poseen un único cromosoma sin replicar, además su tasa respiratoria es más elevada y no contienen gránulos en su interior (Hanson y Dworkin, 1974; Rosenbluh y Rosenberg, 1989b; McCleary *et al.*, 1991; Otani *et al.*, 1998; Tzeng y Singer, 2005).

La inducción química de la esporulación se produce por un bloqueo en la síntesis o ensamblaje del peptidoglucano de la pared celular por acción de agentes químicos. De hecho, durante la conversión de bacilo a espora, el glicerol activa la enzima  $\beta$ -lactamasa, implicada en el recambio de peptidoglucano de la pared, y de la misma manera, agentes que activan esta enzima como antibióticos inhibidores de la síntesis de peptidoglucano, promueven igualmente el proceso de esporulación. Estos resultados sugieren que la inducción química de la esporulación constituye una respuesta de defensa frente a agentes que dañan las cubiertas bacterianas, amenazando la supervivencia celular (O'Connor y Zusman, 1997; O'Connor y Zusman, 1999). Además, se ha observado que no sólo se bloquea la síntesis de peptidoglucano durante la formación de mixósporas producidas mediante la inducción con glicerol, sino que éste es degradado a la vez que se sintetiza la cubierta de la espora (Bui *et al.*, 2009).

Las mixóporas producidas mediante inducción química probablemente no son maduras y tan sólo desarrollan de forma parcial el programa genético activado durante el proceso de esporulación que ocurre durante el ciclo de desarrollo. De hecho, mutantes incapaces de esporular durante el ciclo de desarrollo pueden ser inducidos a hacerlo por adición de agentes químicos, lo que refleja la diferencia entre ambos procesos (Hagen *et al.*, 1978; LaRossa *et al.*, 1983). La inducción con glicerol comparte una etapa con la esporulación durante el ciclo de desarrollo que está mediada por un *locus*,  $\Omega 7536$ , cuya expresión se ajusta al momento de cambio de forma celular y cuya mutación inhibe de forma simultánea ambos procesos de esporulación, al bloquear el cambio en la morfología celular. Por tanto, el mutante permanece siempre como células alargadas (Licking *et al.*, 2000).

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

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

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

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

### A.I.6.1. Señales implicadas en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*

#### SEÑAL A

La señal A está constituida por una mezcla de aminoácidos y péptidos originados por acción de proteasas secretadas por la mixobacteria que hidrolizan proteínas presentes en el exterior celular (Kuspa *et al.*, 1992a y b; Plamann *et al.*, 1992). El análisis de la actividad de los aminoácidos durante la transmisión de la señal A ha permitido identificar aquellos que poseen una actividad más elevada y son: tirosina, prolina, triptófano, fenilalanina, leucina e isoleucina (Shimkets, 1999).

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

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

Se ha propuesto un modelo funcional para la ruta de señalización necesaria para la producción de la señal A. Según este modelo, el agotamiento de nutrientes es captado por una proteína sensora y transmitido a la histidina quinasa *AsgA* que se autofosforila. A continuación, la señal se transfiere a través de una o varias proteínas por fosfotransferencia mediada por *AsgD* (Cho y Zusman, 1999), hasta alcanzar al regulador transcripcional *AsgB* y a la aminohidrolasa *AsgE*, que reconocen las señales procedentes de *AsgA* y actúan de manera independiente. Por un lado, la proteína *AsgB* fosforilada actúa como activador transcripcional sobre los promotores reconocidos por el factor  $\sigma$  *AsgC* de la ARN polimerasa, desencadenando la expresión de los genes necesarios para la generación de la señal A. Los genes diana regulados por esta ruta probablemente corresponden a genes que codifican para las propias proteasas extracelulares. Por otro lado, la proteína *AsgE* controla otra señal que aún no ha sido identificada (Garza *et al.*, 2000).

Entre los genes cuya expresión es dependiente de la señal A, se encuentran *sasB*, *sasA* y *rodK*. El locus *sasB* incluye los genes *sasSR* que forman un sistema

regulador de dos componentes donde SasS es una histidina quinasa que detecta el nivel extracelular de señal A, y si es adecuado, fosforila al regulador de respuesta de tipo NtrC, SasR. La activación de SasR induce la expresión de genes que se encuentran reprimidos por la proteína SasN durante el crecimiento vegetativo. La proteína SasN es un regulador negativo codificada por el gen *sasN*, localizado también en el *locus sasB* (Keseler y Kaiser, 1995; Kaufman y Nixon, 1996; Yang y Kaplan, 1997; Xu *et al.*, 1998). El *locus sasA*, por su parte, incluye los genes *rfbABC* que son importantes para la síntesis del lipopolisacárido antígeno O (Guo *et al.*, 1996), aunque no está clara cuál es la función de este lipopolisacárido en la recepción de la señal A. Por último, el producto del gen *rodK* actúa como un temporizador del ciclo de desarrollo que se encarga de inhibir la señal A durante el desarrollo tardío (Rasmussen *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006).

## SEÑAL B

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

Los mutantes incapaces de producir señal B se encuentran afectados en un único *locus* denominado *bsgA*. Este gen codifica la proteína BsgA, una proteasa dependiente de ATP similar a la proteasa Lon de *E. coli* (Gill *et al.*, 1993), y es esencial para la liberación de aminoácidos intracelulares necesarios para la biosíntesis de nuevas proteínas durante el desarrollo (Gottesman y Maurizi, 2001). Además, esta proteasa es necesaria para el procesamiento del activador MrpC, el cual activa la expresión del regulador del desarrollo FruA de la señal C durante el desarrollo (Nariya e Inouye, 2006).

Se ha descrito la existencia de mutaciones que suprimen los defectos que presentan en el desarrollo los mutantes *bsg*. Estas mutaciones se han localizado sobre los genes *spdRS* (Hager *et al.*, 2001; Tse y Gill, 2002) y *bcsA* (Cusick *et al.*, 2002; Cusick y Gill, 2005). Los productos de estos genes se asocian con dos rutas de señalización diferentes e independientes entre sí, relacionadas con la señal B. En el primer caso, los genes *spdRS* codifican un sistema regulador de dos componentes constituido por la histidina quinasa SpdS y el regulador de respuesta de tipo NtrC, SpdR. Esta ruta regula negativamente la expresión de los genes del desarrollo dependientes de la señal B y ejerce un efecto represor suprimido por la proteasa BsgA en presencia de señal B (Hager *et al.*, 2001; Tse y Gill, 2002). En la segunda ruta interviene la proteína BcsA, una enzima monooxigenasa dependiente de flavina que igualmente actúa como represor sobre el desarrollo en función de la densidad celular (Cusick *et al.*, 2002; Cusick y Gill, 2005).

## SEÑAL C

La señal C se encuentra asociada a la superficie celular de *M. xanthus* (Shimkets y Rafiee, 1990), ya que estas bacterias presentan en su membrana este factor. De ahí, que la transmisión de esta señal requiera un contacto directo entre las células, actuando sólo si las bacterias se encuentran densamente empaquetadas y alineadas de forma regular (Kim y Kaiser, 1990a). Los mutantes para la producción de señal C se encuentran afectados en un único *locus* llamado *csgA* (Shimkets y Asher, 1988). La pérdida de este gen bloquea la producción de señal C en respuesta al agotamiento de nutrientes, por lo que estos mutantes originan agregados rudimentarios y no esporulan.

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

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

La señal C controla de forma positiva la expresión del gen *csgA*, lo que determina que el número de moléculas de señal C aumente de forma progresiva a lo largo del ciclo de desarrollo (Kim y Kaiser, 1990b). El gen *csgA* se expresa durante el crecimiento vegetativo, pero incrementa su expresión en respuesta al agotamiento de nutrientes y la respuesta estricta (Crawford y Shimkets, 2000a). Más tarde, la expresión de *csgA* es intensificada por el operón *act* que codifica para cuatro proteínas que incluyen el sistema ActA/ActB y las proteínas ActC y ActD (Gronewold y Kaiser, 2001). En esta ruta de señalización, la presencia de señal C estimula al regulador de respuesta ActA, que a su vez activa al regulador dependiente de  $\sigma^{54}$ , ActB, para potenciar la expresión del operón *act* desde un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  y la completa expresión de *csgA* (Gronewold y Kaiser, 2007). Las proteínas ActC y ActD están implicadas en la temporalidad de la expresión del gen *csgA*, es decir, en que su expresión ocurra en el momento correcto (Gronewold y Kaiser, 2001).

Se ha propuesto un modelo global para la ruta de transducción de señales de la señal C: ante el agotamiento de nutrientes, la señal C es percibida por una proteína sensora desconocida de tipo histidina quinasa que a su vez activa el regulador de respuesta FruA mediante fosforilación. La proteína FruA pertenece a la subfamilia de reguladores de respuesta FixJ que presenta un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al ADN y es una proteína esencial implicada en la regulación de la agregación,

formación de cuerpos fructificantes y esporulación en *M. xanthus* (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehaug *et al.*, 1998). La señalización dependiente de la señal C se ramifica a partir de FruA en dos rutas distintas: el sistema frizzy, que controla la agregación y fructificación y el sistema *dev* que determina la esporulación (Bonner y Shimkets, 2001).

Al inicio del desarrollo, con bajos niveles de señal C, la proteína FruA poco fosforilada tan sólo es capaz de activar la ruta de señalización frizzy que conduce a la agregación celular. En un principio, se producen reversiones periódicas en la dirección de deslizamiento generando ondulaciones rítmicas, pero a medida que se incrementa la señal C, la frecuencia de reversión descende y las bacterias comienzan a moverse en la misma dirección. Entonces las células se disponen en cadenas, estableciendo contactos célula-célula e intercambiando niveles de señal C crecientes que evitan la reversión del movimiento durante el proceso de agregación (Søgaard-Andersen y Kaiser, 1996; Jelsbak y Søgaard-Andersen, 2002). A medida que las células se agregan dentro del cuerpo fructificante se incrementan los niveles de señal C por contacto entre las bacterias, a la vez que el sistema regulador mediado por las proteínas Act potencia la producción de la señal C. Una vez que se alcanzan altos niveles de señal C, la proteína FruA adquiere un elevado nivel de fosforilación, consiguiendo activar la vía de señalización *dev* necesaria para que se desencadene la esporulación (Kaplan, 2003). El operón *dev*, cuya expresión es controlada por FruA, consta de cinco genes donde al menos tres, *devTRS*, son esenciales para la esporulación (Kroos *et al.*, 1990; Thöny-Meyer y Kaiser, 1993; Boysen *et al.*, 2002).

## SEÑAL D

Hasta el momento se desconoce la identidad de la señal D. Se ha visto que mezclas de ácidos grasos que incluyen la autocida AMI, funcionan de forma adecuada durante la complementación en ausencia de esta señal (Rosenbluh y Rosenberg, 1989a). La señal D es necesaria en una etapa avanzada del ciclo de desarrollo, ya que su ausencia bloquea la expresión de los genes tardíos del mismo. Los mutantes carentes de señal D son el resultado de la alteración de un único *locus* denominado *dsgA*. Los mutantes de inserción de *dsgA* son letales (Cheng y Kaiser, 1989b), mientras que mutantes puntuales presentan un ciclo de desarrollo interrumpido, en donde apenas hay agregación y la esporulación está reducida (Cheng y Kaiser, 1989a), pero las células crecen vegetativamente al no tener efecto en la viabilidad de la mismas. Estos hechos reflejan la posibilidad de que las mutaciones puntuales sigan permitiendo la producción de proteínas ligeramente modificadas que mantienen alguna función, mientras que las inserciones de material genético exógeno originan mutaciones inviables (Dworkin, 1996).

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



### SEÑAL E

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

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

#### A.I.6.2. Respuesta estricta

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

Los aminoácidos son la principal fuente de carbono, nitrógeno y energía para *M. xanthus* (Dworkin, 1962), por tanto su limitación juega un papel clave para iniciar el desarrollo (Dworkin, 1963). La carencia de aminoácidos activa la respuesta estricta al detener la síntesis proteica debido a la incapacidad del ribosoma para leer un codón que carece de su respectivo ARNt cargado. En ese momento, la proteína RelA se asocia al ribosoma y comienza a sintetizar nucleótidos altamente fosforilados de tipo guanósina tetra y penta fosfato, (p)ppGpp, que actúan como alarma (Singer y Kaiser, 1995). La capacidad de acumular (p)ppGpp es absolutamente dependiente de la proteína RelA y del sensor del nivel de nutrientes Nsd (Brenner *et al.*, 2004).

La respuesta estricta es necesaria para el inicio del desarrollo multicelular en *M. xanthus*, ya que estimula la expresión de un conjunto de genes específicos necesarios para que este proceso tenga lugar (Singer y Kaiser, 1995). De hecho, los mutantes *relA* son incapaces de expresar ninguno de los genes dependientes del desarrollo ante la limitación de nutrientes (Harris *et al.*, 1998). En este sentido, se ha demostrado que la acumulación de (p)ppGpp por la respuesta estricta induce la producción de las señales

A y C que son esenciales para el inicio del desarrollo, actuando como un sistema sensor que promueve la progresión hacia el desarrollo ante la limitación de nutrientes.

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

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

En la decisión de continuar con el crecimiento vegetativo o progresar hacia el ciclo de desarrollo están implicadas dos proteínas, SocE y CsgA. La proteína SocE mantiene el crecimiento vegetativo al inhibir la respuesta estricta. De hecho, la expresión de SocE se inhibe al iniciarse el desarrollo debido al efecto represor ejercido por la respuesta estricta. En cambio, la proteína CsgA promueve el ciclo de desarrollo, tratando de prolongar en el tiempo la respuesta estricta. En este sentido, esta proteína se acumula a partir del inicio del desarrollo ya que su expresión se ve estimulada por dicha respuesta (Crawford y Shimkets, 2000a, Crawford y Shimkets, 2000b).

Dependiendo de la relación existente entre SocE y CsgA en las células, éstas tomarán una alternativa u otra. Si la densidad celular es suficientemente alta, la señal C será transmitida al mismo tiempo que disminuye el nivel de SocE como resultado de la respuesta estricta. Como CsgA estimula a RelA, la respuesta estricta se prolongará a lo largo del desarrollo. Pero si la densidad celular no es lo suficientemente elevada como para generar un cuerpo fructificante, la concentración interna de CsgA no alcanzará el nivel que permita mantener la respuesta estricta, de modo que los niveles de SocE aumentarán de nuevo y las células se decantarán por el crecimiento vegetativo en lugar del desarrollo (Crawford y Shimkets, 2000a).

### **A.I.7. Genomas de Mixobacterias**

El genoma de la cepa DK1622 de *M. xanthus* ha sido secuenciado recientemente (Número de acceso NC\_008095) (Goldman *et al.*, 2006) por Monsanto y

## Introducción

TIGR (The Institute for Genomic Research; <http://www.tigr.org>), mientras que la secuenciación de los genomas de *Sorangium cellulosum* So ce56 (Número de acceso NC\_010162) (Schneiker *et al.*, 2007) y *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C (Número de acceso NC\_007760) (Thomas *et al.*, 2008) ha sido llevada a cabo por la Universidad de Bielefeld (<https://www.uni-bielefeld.de>) y DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org>), respectivamente. También se ha completado la secuenciación del genoma de otras 3 mixobacterias, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1, *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 y *Anaeromyxobacter* sp K, que no han sido objeto de publicación hasta el momento. Además, se está efectuando la secuenciación de otros genomas de mixobacterias que se encuentran disponibles en forma de fragmentos genómicos (Tabla 2).

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

El contenido en G+C de todos los genomas de mixobacterias es muy elevado, estando comprendido entre el 67-74% (Tabla 2). El número de genes oscila entre 4346 de *A. dehalogenans* 2CP-C y 9367 en *S. cellulosum*, de acuerdo con el tamaño del genoma de cada especie, dado que la porción de cromosoma destinada a codificar estos genes se sitúa en todos los casos entre el 85 y 90% (Tabla 2).

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

| Mixobacteria                               | Suborden               | Tamaño (Mb) | Genes | % GC | % codificante | Estado         |
|--|------------------------|-------------|-------|------|---------------|----------------|
| <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C | <i>Cystobacterinae</i> | 5.0         | 4419  | 74   | 90            | Completo       |
| <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1 | <i>Cystobacterinae</i> | 5.0         | 4573  | 74   | 90            | Completo       |
| <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5        | <i>Cystobacterinae</i> | 5.3         | 4562  | 73   | 89            | Completo       |
| <i>Anaeromyxobacter</i> sp K               | <i>Cystobacterinae</i> | 5.1         | 4557  | 74   | 90            | Completo       |
| <i>Haliangium ochraceum</i> DMS 14365      | <i>Nannocystineae</i>  | 9.4         | 7115  | 69   | 86            | 45 fragmentos  |
| <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622           | <i>Cystobacterinae</i> | 9.1         | 7388  | 68   | 90            | Completo       |
| <i>Myxococcus fulvus</i> HW-1              | <i>Cystobacterinae</i> |             |       | 68   |               |                |
| <i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1         | <i>Nannocystineae</i>  | 10.6        | 8526  | 70   | 89            | 237 fragmentos |
| <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56        | <i>Soranginae</i>      | 13.0        | 9703  | 71   | 86            | Completo       |
| <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1      | <i>Cystobacterinae</i> | 10.3        | 8586  | 67   | 85            | 579 fragmentos |

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

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

En este sentido, *M. xanthus* es capaz de detectar una amplia variedad de señales en el ambiente que le rodea, generando respuestas adaptativas adecuadas, y además posee un complejo sistema de intercambio de señales necesario para la coordinación de las células a lo largo del ciclo de vida de la bacteria. Por tanto, las rutas de señalización en este microorganismo se encuentran muy desarrolladas, apareciendo un enorme número de genes que codifican proteínas implicadas en estas rutas, como activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , sistemas de dos componentes y Ser/Thr/Tyr quinasas (Goldman *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008).

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

## A.II. RESPUESTA GLOBAL AL COBRE

### A.II.1. El cobre en la naturaleza

El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza y tiene una abundancia relativa en la corteza terrestre de 68 ppm (Solioz y Stoyanov, 2003). Está presente en

diferentes minerales destacando la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) o la malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ), y fue el primer metal en ser trabajado por las sociedades humanas (Osman y Cavet, 2008). El agua natural tiene una concentración de 4-10  $\mu\text{g Cu/l}$ , en su mayoría unido a materia orgánica. La concentración natural de cobre en el suelo es de alrededor de 30 mg/kg. Este metal es liberado al aire de forma natural en el polvo arrastrado por el viento, por volcanes e incendios forestales, y por actividades humanas tales como la fundición de cobre, la producción de hierro y acero, y las incineradoras municipales. El contenido de cobre en la atmósfera oscila entre los 5-20  $\text{ng Cu/cm}^3$  (Gaetke y Chow, 2003).

Este metal es un elemento traza esencial tanto para procariontas como para eucariotas. Los iones Cu pueden existir en estado oxidado como ión cúprico, Cu(II), o en estado reducido como ión cuproso, Cu(I). El Cu(I) y el Cu(II) son los iones monovalentes y divalentes respectivamente y tienen capacidad para unirse a moléculas orgánicas. Ambos iones poseen una tendencia similar a formar complejos con muchos ligandos orgánicos. El Cu(I) se une a bases suaves tales como tioles, grupos alquilo, cianidas o fosfinas, mientras que el Cu(II) forma complejos con ligandos adicionales a Cu(I), incluyendo sulfato y nitrato (Osman y Cavet, 2008).

### A.II.2. El cobre como cofactor de enzimas

El uso de cobre en los sistemas biológicos empezó a ocurrir desde la liberación de oxígeno a la atmósfera hace 2.7 miles de millones de años, causando la oxidación de la forma insoluble en agua, Cu(I), a la forma soluble, Cu(II) (Fraústo da Silva y Williams, 1993). Como consecuencia, las proteínas que requieren cobre están ampliamente distribuidas en los organismos aerobios.

Las funciones biológicas del cobre están estrechamente relacionadas con sus propiedades como metal de transición (Solioz y Stoyanov, 2003). El alto potencial redox del par Cu(I)/Cu(II) lo hace útil y adaptable para las enzimas, y muchas enzimas del cobre trabajan en el rango de 0.2-0.8 V, capacitándolas para oxidar directamente sustratos tales como superóxidos, ascorbato, catecoles y fenolatos (Crichton y Pierre, 2001).

El cobre está usualmente unido a las proteínas a través de las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, metionina o histidina (Xue *et al.*, 2008), y funciona como cofactor, siendo requerido para propiedades estructurales y catalíticas de una gran variedad de enzimas importantes incluyendo citocromo *c* oxidasa, tirosinasa, *p*-hidroxifenil piruvato hidrolasa, dopamina beta hidroxilasa, lisil oxidasa y Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) (Uauy *et al.*, 1998; Turnlund, 1999). Estas enzimas están implicadas en numerosos procesos biológicos requeridos para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento.

Este metal también puede actuar como grupo prostético de enzimas microbianas implicadas en la reducción de los óxidos nitroso y nítrico. Otra clase de proteínas de cobre son las plastocianinas y las azurinas que actúan como transportadores de electrones (Solioz y Stoyanov, 2003).

Las proteínas de cobre están ampliamente distribuidas en organismos aerobios y principalmente tienen dos funciones: transferencia de electrones y transporte de

dioxígeno. Además, estas proteínas también están implicadas en procesos vitales tales como la respiración, transporte de hierro, protección del estrés oxidativo, coagulación de la sangre y pigmentación (Puig y Thiele, 2002).

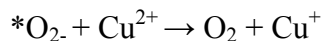
En el caso de las enzimas bacterianas que requieren cobre parece que la localización de las mismas es extracitoplasmática y suelen encontrarse principalmente en el periplasma o embebidas en la membrana citoplasmática.

### A.II.3. Toxicidad por cobre

Como se ha dicho anteriormente, el cobre es necesario para la actividad de una gran variedad de enzimas fisiológicamente importantes, la mayoría de las cuales catalizan reacciones redox. Como un cofactor en múltiples reacciones redox, el cobre también está implicado en la producción de especies radicales potencialmente dañinas a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Cerpa *et al.*, 2005).

El modo de toxicidad por cobre no está del todo claro, aunque se han propuesto varios mecanismos. La base de estas teorías es la capacidad de los iones cobre libres (que normalmente están unidos a proteínas) para participar en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Tanto el cúprico como el cuproso pueden participar en reacciones de oxidación y reducción. En una reacción conocida como “reacción de Haber-Weiss”, el Cu(II) puede ser reducido a Cu(I) en un primer paso, en presencia de superóxido (\*O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o agentes reductores tales como el ácido ascórbico o el glutatión. En un segundo paso de esta reacción, el Cu(I) es capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo (OH<sup>•</sup>) desde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este segundo paso de la reacción de Haber-Weiss es conocido como reacción de Fenton (Gaetke y Chow, 2003).

Reacción de Haber-Weiss:



El radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) es el agente oxidante más poderoso que existe en los sistemas biológicos, y es capaz de reaccionar prácticamente con todas las moléculas biológicas (Buettner, 1993). Produce daño en los fosfolípidos y enzimas, también puede atacar las bases del ADN, preferentemente residuos de guanina, y puede romper los enlaces fosfodiéster del ADN de cadena simple por modificación de los azúcares de desoxirribosa (Solioz y Stoyanov, 2003).

Otra de las ROS en cuya formación también interviene el cobre es el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).

Una de las consecuencias más conocidas de la toxicidad por exceso de cobre es el daño peroxidativo de los lípidos de membrana. La peroxidación ocurre por la reacción de los radicales lípidos y el oxígeno para formar radicales peroxilo que dañarían las células por cambios en la fluidez y permeabilidad de las membranas o por ataque directo del ADN u otras moléculas intracelulares tales como proteínas (Mattie y Freedman, 2001).

## Introducción

El cobre parece ser mucho más tóxico bajo condiciones anaeróbicas, posiblemente debido a la reducción del Cu(II) a Cu(I), el cual puede difundir a través de la membrana citoplasmática causando un aumento en la acumulación de cobre (Osman y Cavet, 2008).

Similar al exceso de cobre, la deficiencia del mismo también incrementa la susceptibilidad celular al daño oxidativo.

### A.II.4. Homeostasis y resistencia al cobre

Como se ha visto, el cobre es esencial pero puede ser tóxico incluso a bajas concentraciones. Para hacer frente a esta dualidad, la homeostasis del cobre debe estar perfectamente regulada (Outten *et al.*, 2001). Por esta razón, todos los organismos tienen mecanismos para controlar las concentraciones intracelulares de cobre. Estos mecanismos deben ir encaminados a evitar la toxicidad mediada por cobre, mientras mantienen un suministro de este metal a las enzimas que lo requieren. Para conseguir esto, las células presentan reguladores transcripcionales que detectan cobre y deben distinguir este metal de otros iones metálicos, y responder a niveles por encima o por debajo de un valor umbral desencadenando una respuesta fisiológica apropiada tal como el importe de cobre, el exporte o la detoxificación (Osman y Cavet, 2008). El conjunto de estas actividades mantiene la cuota celular de este metal dentro de un rango aceptable, dependiendo de las condiciones de crecimiento y estrés (Outten *et al.*, 2001).

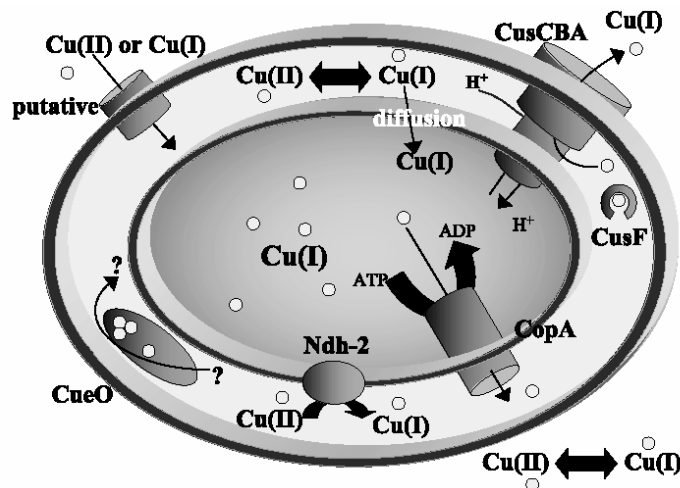
Recientemente se han implicado alteraciones en la homeostasis del cobre en enfermedades tales como el Alzheimer, la fibrosis quística o el parkinson (Rensing y Grass, 2003). Otros desórdenes en la homeostasis del cobre son las enfermedades de Wilson y Menkes. La primera se debe a una acumulación de cobre a niveles tóxicos en el hígado, la sangre y el cerebro, conduciendo a desórdenes hepáticos y neurológicos. La enfermedad de Menkes por su parte, resulta de una deficiencia y falta de incorporación de cobre a las enzimas clave, debido a que no se produce una correcta absorción de cobre en el intestino (Huffman y O' Halloran, 2001).

Actualmente se están llevando a cabo estudios de la homeostasis del cobre en bacterias. Los estudios más profundos se han llevado a cabo en *Escherichia coli* y *Enterococcus hirae*, aunque también se han realizado estudios en otras bacterias, la mayoría de los cuales están enfocados hacia la caracterización de los mecanismos de detoxificación.

#### A.II.4.1. Homeostasis del cobre en *E. coli*

*E. coli* es una bacteria aerobia facultativa y entérica que vive en el tracto digestivo de animales de sangre caliente. La concentración de cobre puede ser alta en el tracto digestivo, particularmente en el estómago y el duodeno. Sin embargo, se ha mostrado que bajo condiciones anaeróbicas ácidas, las cuales prevalecen en esa parte del tracto digestivo, el cobre llega a ser mucho más tóxico. Así, las bacterias intestinales pueden haber desarrollado elaborados mecanismos para la homeostasis del cobre como una adaptación a su nicho ecológico específico, el intestino animal (Rensing y Grass, 2003).

En *E. coli*, han sido identificados dos sistemas cromosómicos implicados en la tolerancia al cobre: el sistema *cue* (de Cu *efflux*) y el sistema *cus* (de Cu-*sensing*). Ambos catalizan la eliminación del exceso de cobre desde la célula (Fig. 2) (Grass y Rensing, 2000; Outten *et al.*, 2000a; Outten *et al.*, 2001; Rensing y Grass, 2003).



**Figura 2.** Mecanismos para la homeostasis del cobre en *E. coli* (Rensing y Grass, 2003).

#### A.II.4.1.1. Sistema *cue*

El sistema *cue* está formado por una proteína matorreguladora de respuesta al cobre, CueR, que regula la expresión de dos genes, *copA* y *cueO* (Outten *et al.*, 2000b, Outten *et al.*, 2001).

CopA es una ATPasa de tipo P translocadora de cobre con una homología significativa con los transportadores de cobre eucarióticos de humanos y levaduras. Esta proteína es el componente central de la homeostasis del cobre en *E. coli* y tiene un papel en el exporte de cobre bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Rensing y Grass, 2003). Perteneció al subgrupo de ATPasas tipo P<sub>1B</sub> dentro de la familia de ATPasas de tipo P. Este subgrupo de ATPasas se caracteriza por transportar un amplio rango de metales pesados tales como Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> o Co<sup>2+</sup>, a través de las membranas biológicas. Este subgrupo, además, tiene características estructurales tales como secuencias señal de unión a metales en sus segmentos transmembrana, una organización topológica con ocho o seis dominios transmembrana, y dominios reguladores citoplasmáticos de unión a metales, que las distingue de otras P-ATPasas homólogas. Consecuente con su especificidad de sustrato y su dirección de transporte, es decir, eflujo de metales desde el citoplasma, las P<sub>1B</sub>-ATPasas confieren tolerancia a metales en arqueas y bacterias, mientras que en eucariotas superiores estas ATPasas son responsables de la absorción de micronutrientes y su distribución (Argüello *et al.*, 2007).

La principal función de CopA es la destoxificación de Cu(I) del citoplasma. Se ha visto que los mutantes a los que les falta esta proteína son hipersensibles a cobre en presencia o ausencia de oxígeno, mientras que la tolerancia a otros metales no está afectada (Rensing *et al.*, 2000, Outten *et al.*, 2001). Estos mutantes muestran un



## Introducción

descenso del eflujo de cobre y acumulan dicho metal en el citoplasma (Petersen y Moller, 2000).

El segundo elemento del sistema *cue* es la proteína CueO, una oxidasa multicobre que se encarga de proteger a las enzimas periplásmicas del daño inducido por cobre, ya que convierte el Cu(I) en Cu(II) que es menos tóxico (Grass y Rensing, 2001). El análisis de la secuencia de CueO reveló un motivo *twin-arginine* dentro de la secuencia líder que es reconocido por la maquinaria Tat de translocación de proteínas. La ruta Tat transporta proteínas completamente plegadas con sus cofactores ya unidos antes de la translocación al periplasma. Por tanto, la carga de cobre de CueO en el citoplasma con el posterior transporte al periplasma podría contribuir a la destoxificación citoplasmática de cobre. Sin embargo, se ha visto que esta destoxificación del citoplasma por parte de CueO es menor, ya que la ATPasa CopA puede transportar cobre a través de la membrana plasmática de una manera más eficiente (Rensing y Grass, 2003).

La expresión tanto de *cueO* como de *copA* es inducida en respuesta a elevados niveles de cobre por la acción del regulador transcripcional CueR (*Cu efflux regulator*), que pertenece a la familia MerR de reguladores transcripcionales de respuesta a metales (Outten *et al.*, 2000b). Otros miembros de esta familia incluyen el detector de Zn, ZntR; el de Hg, MerR; Cd, CadR; Pb, PbrR y Co, CoaR. Estas proteínas se unen a los promotores de sus genes diana en presencia y ausencia de sus metales efectores. En presencia de elevados iones metálicos, activan alostéricamente el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa, mientras que en ausencia de iones metálicos estas proteínas causarían una ligera represión (Osman y Cavet, 2008).

CueR es el sensor intracelular de Cu(I) que activa la expresión de *copA* y *cueO* en *E. coli*, pero hay otras bacterias que poseen sistemas de tolerancia al cobre bajo el control de proteínas de tipo CueR. Por ejemplo *Pseudomonas putida*, *Rhizobium leguminosarum* y *Salmonella typhimurium*. En el caso de *S. typhimurium*, hay dos proteínas de tipo CueR. La primera ha sido designada como SctR o CueR, presenta un 91 % de identidad con CueR de *E. coli*, y se caracteriza porque media la expresión de la respuesta al cobre de la oxidasa multicobre CuiD y la ATPasa de tipo P<sub>IB</sub>, CopA, que confiere resistencia al cobre. La segunda proteína ha sido designada como GolS y está asociada con la resistencia al oro (Kim *et al.*, 2002; Checa *et al.*, 2007, Espariz *et al.*, 2007).

En adición a la regulación de la respuesta al cobre por CueR, CopA parece estar bajo el control de otros reguladores transcripcionales que incluyen CpxR el cual responde a estreses de la envuelta celular (Outten *et al.*, 2000b).

El sistema *cue* es el primero que actúa. Si las concentraciones de cobre siguen aumentando entra en funcionamiento el segundo sistema: el sistema *cus* (Finney y O' Halloran, 2002).

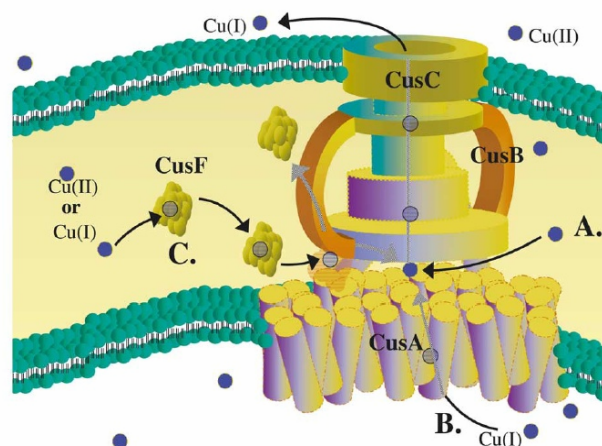
### A.II.4.1.2. Sistema *cus*

Mientras que el sistema *cue* confiere tolerancia bajo unos niveles de cobre de moderados a altos, el sistema *cus* es requerido bajo condiciones extremas de estrés por

cobre y es particularmente importante en ambientes anaeróbicos (Osman y Cavet, 2008).

El sistema *cus* se localiza en el cromosoma de *E. coli*, al igual que el sistema *cue*, y está formado por dos operones que se transcriben en direcciones opuestas. Un operón codifica el sistema regulador de dos componentes CusRS, que activa la expresión del segundo operón, *cusCFBA*, en respuesta a elevadas concentraciones de cobre (Munson *et al.*, 2000). Este sistema también puede ser activado por plata, aunque a concentraciones más altas que las observadas para el cobre (Outten *et al.*, 2001).

El operón *cusCFBA* codifica proteínas requeridas para el eflujo de cobre (Fig. 3). La proteína principal de este operón, CusA, es un miembro de la superfamilia de proteínas RND (*resistance-nodulation-division*), la cual es una familia de proteínas unidas a la membrana, transportadoras de protones. Las proteínas RND, que suelen estar formadas por más de 1000 aminoácidos, están compuestas de cuatro dominios, dos de ellos hidrofóbicos y dos hidrofílicos. Los dos dominios hidrofílicos están localizados en el periplasma y contactarían con otras subunidades de las proteínas del sistema de eflujo (Grass y Rensing, 2001; Franke *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Modelo funcional del sistema *cus* de *E. coli* (Rensing y Grass, 2003).

Como se ha mencionado, la proteína CusA es el componente central del complejo *cusCFBA*, está formada por 12 dominios transmembrana y se encarga del exporte de iones metálicos a la vez que importa protones, como se ha visto para su homólogo CzcA de *Ralstonia* (Goldberg *et al.*, 1999); y además, es esencial para la resistencia al cobre mediada por el sistema *cus*, ya que una delección de *cusA* no difiere en sensibilidad al cobre de una delección de *cusCFBA* completa.

La proteína CusB pertenece a la familia de proteínas MFP (*membrane fusion proteins*) (Fig. 3) y CusC es un factor OMF (*outer membrane factor*) (Fig. 3). Ambas proteínas, junto con CusA interactúan para formar un canal activo extendido en el periplasma y que conecta el citoplasma con la membrana externa permitiendo el transporte de cobre (Grass y Rensing, 2001; Franke *et al.*, 2003).

Una característica única de los transportadores de Cu/Ag de tipo CBA es la presencia de una pequeña proteína periplásmica de 110 aminoácidos llamada CusF. Esta

## Introducción

proteína es una metalochaperona periplásmica que transporta Cu(I), o Ag(I), al complejo *cusCBA*, ya que interacciona con CusB y CusC, y facilita la destoxicación de cobre/plata en el periplasma (Franke *et al.*, 2003; Rensing y Grass, 2003).

Parece ser que el sistema *cus* transporta Cu(I), o Ag(I), directamente desde el citoplasma a través de la envuelta celular al medio extracelular proporcionando resistencia a estos metales (Rensing y Grass, 2003; Osman y Cavet, 2008).

Los sistemas transportadores de metales de tipo CBA han sido caracterizados no sólo en *E. coli*, si no también en *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Synechococcus* y *Salmonella*. De hecho parecen estar muy extendidos en las bacterias Gram negativas, ya que a diferencia de las Gram positivas, no sólo necesitan proteger el citoplasma, si no que también deben translocar metales a través de la membrana externa para proteger el compartimento periplásmico del daño inducido por metales, y probablemente estos sistemas confieran resistencia adicional a ciertos metales pesados (Rensing y Grass, 2003).

El segundo operón del sistema *cus* codifica el sistema regulador de dos componentes CusRS, donde CusS es la histidina quinasa unida a la membrana citoplasmática que probablemente detecta iones cobre en el periplasma, y CusR el regulador de respuesta localizado en el citoplasma que activa la transcripción de *cusCFBA* (Munson *et al.*, 2000). Este sistema parece monitorizar el estrés en la envuelta celular y se piensa que responde a Cu(I) (Osman y Cavet, 2008).

### A.II.4.1.3. Sistemas no cromosómicos

Se ha visto que algunas cepas de *E. coli* pueden sobrevivir en medios ricos en cobre con concentraciones que sobrepasan la capacidad de los sistemas homeostáticos del cobre codificados por el cromosoma. Tales cepas poseen un plásmido que confiere resistencia al cobre (Rensing y Grass, 2003).

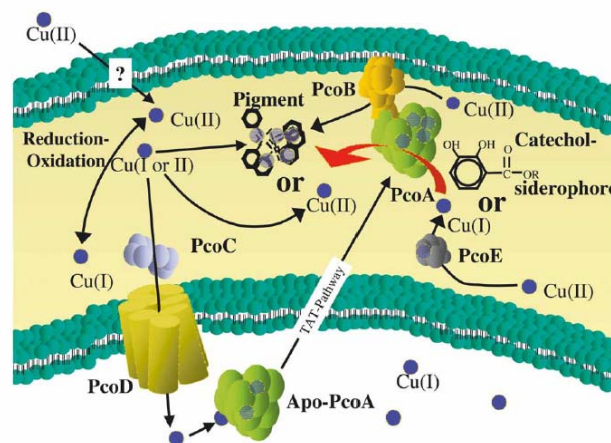
Este plásmido conjugativo llamado pRJ1004 confiere resistencia al cobre y fue aislado de *E. coli* en la flora del intestino de cerdos alimentados con una dieta suplementada con sulfato de cobre como un promotor del crecimiento. Este plásmido contiene un determinante llamado *pco* (*plasmid-encoded copper resistance*) formado por siete genes, *pcoABCDRSE*, que proporcionan resistencia al cobre (Brown *et al.*, 1995).

Los genes *pcoABCD* codifican para cuatro proteínas: PcoA que es la proteína central y pertenece a las oxidasas multicobre, su compañera putativa, PcoC, la proteína PcoD que al parecer transporta cobre a través de la membrana citoplasmática, y PcoB que es una proteína de membrana externa. Estas cuatro proteínas protegen al periplasma del estrés por cobre.

El determinante *pco* contiene otro gen, *pcoE*, que no forma parte del operón *pcoABCD* sino que se localiza más lejos aguas abajo en el plásmido. La proteína PcoE es una chaperona periplásmica cuya función es unir cobre, y no parece ser estrictamente requerida para la resistencia al cobre, pero reduce el tiempo de recuperación ante un estrés por este metal en las células de *E. coli* (Brown *et al.*, 1995).

Por último, el determinante *pco* contiene los genes *pcoRS* que codifican un sistema regulador de dos componentes, PcoRS, requerido para la expresión inducible por cobre de los genes *pco*. PcoS es una histidina quinasa con dos dominios transmembrana con péptidos que se extienden dentro del periplasma. Cuando los niveles de cobre del medio aumentan, esta quinasa fosforila a PcoR, su regulador de respuesta afín, que actúa como activador transcripcional de los genes *pcoABCD*. Sin embargo, se ha visto que para la expresión de *pcoE* es requerido el sistema cromosómico CusRS y no el sistema plasmídico *pcoRS* (Munson *et al.*, 2000). No está claro por qué *pcoE* está bajo el control de un circuito regulador cromosómico separado, pero parece ser que esta regulación cruzada proporciona una manera de unir la resistencia al cobre con la homeostasis de dicho metal (Outten *et al.*, 2000a).

El mecanismo de detoxificación de cobre proporcionado por el sistema *pco* es desconocido. Se ha propuesto un modelo (Fig. 4) en el que el cobre entraría en el periplasma por un mecanismo desconocido, posiblemente a través de OmpC y OmpF. La función de la proteína de membrana externa PcoB no se ha dilucidado todavía. Consecuentemente, el cobre sería detoxificado al ser secuestrado por sideróforos o bien, el Cu(I) sería oxidado a Cu(II) que es menos tóxico por la oxidasa multicobre PcoA. Con el fin de introducir cobre en los sitios catalíticos dentro de PcoA, PcoC y PcoD el cobre debería ser transportado a través de la membrana citoplasmática con PcoC entregando cobre a PcoD. PcoE, por su parte, uniría cobre en el periplasma y posiblemente lanza cobre a PcoA (Rensing y Grass, 2003).



**Figura 4.** Mecanismo propuesto para la detoxificación de cobre mediada por *pco* en *E. coli* (Rensing y Grass, 2003).

*Pseudomonas syringae* pv *tomato* presenta un plásmido, llamado pPT23D, similar al de *E. coli* que contiene una familia de genes llamada *cop*, la cual confiere resistencia al cobre. El sistema *cop* contiene seis genes, *copABCDRS*, organizados en dos operones, *copABCD* y *copRS*. Estos genes son homólogos a los genes *pco* de *E. coli* (Rensing y Grass, 2003). Sin embargo, a pesar de su similitud, los genes *pcoABCD* de *E. coli* estarían implicados en el eflujo de cobre, mientras que los genes *copABCD* de *P. syringae* pv *tomato* intervendrían en el secuestro de dicho metal. Además, no se ha encontrado un homólogo del gen *pcoE* de *E. coli* en *P. syringae*. Por otro lado, se ha visto que los genes *copRS* no sólo son homólogos a los genes *pcoRS* del sistema *pco* de *E. coli*, sino que también son homólogos de los genes *cusRS* del sistema *cus* de *E. coli*, y de los genes *silRS* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Munson *et al.*, 2000).

### A.II.4.1.4. Otras proteínas

En *E. coli* hay otras proteínas que se han relacionado con la resistencia al cobre e incluyen los productos de los genes *cutABCDEF*. Estos genes fueron caracterizados en un estudio preliminar con mutantes de *E. coli* sensibles al cobre y parecen estar implicados en la entrada, el almacenaje intracelular, la distribución y el eflujo de cobre (Rouch *et al.*, 1989). Sin embargo, pocos de estos genes se han unido directamente con el metabolismo, transporte o regulación del cobre. De estos seis genes estructurales, el locus *cutA* y los genes *cutC*, *cutE* y *cutF* han sido clonados y se les ha asignado una función putativa. Estas proteínas podrían tener un papel secundario tal como la reducción de metioninas en CueO, alteración de porinas o asegurar el correcto plegamiento de las proteínas en el periplasma. A pesar de esto, estas proteínas tienen una ligera influencia en los niveles de resistencia al cobre con la excepción de CutE. El gen *cutE* codifica una apolipoproteína N-aciltransferasa, y parece que CutE funcionaría en la acilación de CusC y otras apolipoproteínas requeridas para la tolerancia al cobre. Sin embargo, muchos de los genes *cut* están probablemente directa o indirectamente implicados en la homeostasis del cobre (Rogers *et al.*, 1991; Fong *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995).

### A.II.4.2. Homeostasis del cobre en *Enterococcus hirae*

La homeostasis del cobre en *E. hirae* se ha estudiado y revisado ampliamente. El sistema de homeostasis de este metal en esta bacteria consiste en cuatro genes organizados en un operón llamado *cop*. Este operón permite a *E. hirae* crecer en un amplio rango de concentraciones de cobre. Los cuatro genes del operón *cop* son *copYZAB* y codifican para cuatro proteínas: CopY es un represor que responde a cobre, CopZ es una chaperona del cobre, y CopA y CopB son ATPasas de tipo P<sub>1B</sub>. CopA transporta cobre hacia dentro de la célula, mientras que CopB expulsa cobre desde la célula (Solioz y Stoyanov, 2003). A continuación vamos a ver cada uno de estos componentes con más detalle.

#### A.II.4.2.1. ATPasas de tipo P<sub>1B</sub>, CopA y CopB

Las proteínas CopA y CopB son ATPasas de tipo P<sub>1B</sub> y como se dijo anteriormente estas ATPasas se encargan de transportar metales pesados a través de las membranas biológicas (Argüello *et al.*, 2007).

Se había propuesto que CopA era una proteína que intervenía en el importe de cobre al interior de la célula (Solioz y Stoyanov, 2003), mientras que proteínas similares de otros microorganismos tienen una clara función en el exporte de dicho metal (Rensing *et al.*, 2000). Sin embargo, recientes hallazgos ponen en duda que CopA sea una proteína que importa este metal.

Como la mayoría de las ATPasas que transportan metales pesados, CopA posee un sitio de unión a metales en el extremo N-terminal con el motivo consenso CxxC. Se ha podido comprobar que la mutación de las dos cisteínas del motivo CxxC a serina afectaban a la interacción de CopA con la chaperona CopZ, sugiriendo una función de este motivo de unión a metales N-terminal en la transferencia de cobre desde la ATPasa a otros componentes celulares (Solioz y Stoyanov, 2003).

La proteína CopB se encarga del transporte de Cu(I) y Ag(I) permitiendo una resistencia al cobre. Esta proteína, a diferencia de CopA, no presenta el motivo CxxC en su extremo N-terminal de unión a metales, pero si tiene una región rica en histidinas en ese extremo N-terminal que funcionaría como motivo dominio de unión a metales (Solioz y Stoyanov, 2003).

#### A.II.4.2.2. Represor CopY

En las diferentes especies bacterianas se han desarrollado varios mecanismos de regulación de la resistencia y tolerancia al cobre. Algunos ejemplos de estos sistemas de regulación que ya se han mencionado anteriormente son el sistema *cop* de *P. syringae* y *pco* de *E. coli*, regulados por sistemas reguladores de dos componentes, o bien el gen *copA* de *E. coli* regulado por el activador de tipo MerR, CueR. En el caso de *E. hirae*, el operón *cop* está regulado por el represor que responde a cobre CopY, una proteína de 145 aminoácidos (Solioz y Stoyanov, 2003). El modelo actual indica que a bajas concentraciones de cobre, CopY está presente como un homodímero que contiene Zn(II) y está unido a la región operador-promotor de *copYZBA* reprimiendo la transcripción. En presencia de cobre la chaperona del cobre CopZ dona Cu(I) a CopY desplazando el Zn(II), liberando la unión al ADN y permitiendo la transcripción del operón *cop*. La región carboxi-terminal de CopY posee un motivo CXCXXXXCXC de unión a metales. Cada ión de Zn(II) está coordinado a las cuatro cisteínas en la forma represora de CopY y es reemplazado por dos iones de Cu(I) en la forma no unida al ADN (Cobine *et al.*, 2002).

Las proteínas represoras de tipo CopY no están ampliamente distribuidas entre las bacterias pero se han asociado con *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutants* y *Streptococcus gordinii*, todas ellas son Gram positivas (Osman y Cavet, 2008).

#### A.II.4.2.3. Chaperona CopZ

Las chaperonas del cobre son miembros de un diverso grupo de proteínas implicadas en la entrega intracelular de cobre. Estas proteínas son solubles y son receptores intracelulares de metales que unen cobre y lo llevan a la proteínas diana, protegiendo dicho metal de los quelantes intracelulares (Outten *et al.*, 2000a). Estudios en levaduras sugieren que las chaperonas son requeridas *in vivo* porque las concentraciones intracelulares de cobre son extremadamente bajas, requiriendo una interacción directa proteína-proteína para la entrega del cobre a las proteínas que lo precisen (O'Halloran y Culotta, 2000).

La chaperonas de levaduras Atx1 y Atox1 (Hah1) en humanos interaccionan y le ceden el cobre a una ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> específica de cobre para el transporte de éste a través de la membrana (O'Halloran y Culotta, 2000). De manera similar, la chaperona del cobre CCS es la fuente primaria de cobre para la Cu,Zn SOD (Sod1) de levaduras y mamíferos. CCS interacciona físicamente con Sod1 para insertar el ión de cobre en el sitio activo de la enzima (Culotta *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2001). En *E. coli* no se han encontrado secuencias similares con chaperonas conocidas del cobre. Sin embargo, algunas bacterias poseen homólogos de Atx1, por ejemplo Atx1 de *Synechocystis* PCC 6803 (Tottey *et al.*, 2002), CopZ de *Bacillus subtilis* (Radford *et al.*, 2003), CopZ de *E. hirae* (Magnani y Solioz, 2005) y GolB de *Salmonella typhimurium* (Checa *et al.*, 2007)

## Introducción

CopZ interacciona con el transportador CopA, que le suministra cobre al importarlo al interior de la célula, y transfiere este cobre al represor CopY para liberarlo del ADN y permitir la transcripción de los genes *cop*. Pero CopZ también transfiere cobre al transportador CopB para expulsarlo de la célula (Fig. 5) (Osman y Cavet, 2008).

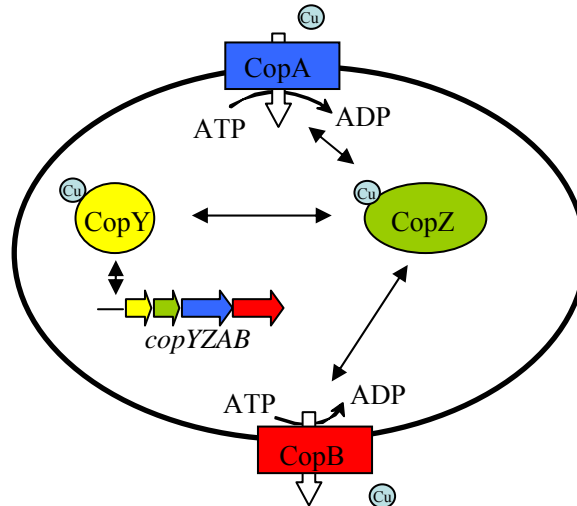


Figura 5. Modelo para la homeostasis del cobre en *E. hirae*.

### A.II.4.3. Homeostasis del cobre en otras bacterias

Como se ha comentado con anterioridad, los estudios más profundos en la homeostasis del cobre en bacterias se han llevado a cabo en *E. coli* y *E. hirae*. Sin embargo, actualmente se están realizando estudios en otras bacterias donde se han encontrado sistemas homólogos a los de *E. coli* y *E. hirae*.

#### A.II.4.3.1. *Bacillus subtilis*

En la bacteria *B. subtilis* también se han estudiado ampliamente los sistemas implicados en la homeostasis del cobre. Cuando esta bacteria se encuentra en presencia de un exceso de cobre, se induce un sistema de eflujo específico codificado por el operón *copZA* (Gaballa y Helmann, 2003). Este sistema está formado por CopZ, una chaperona del cobre que entrega dicho metal al otro elemento del sistema, CopA, una ATPasa de eflujo de tipo P<sub>IB</sub>. Estudios previos de la regulación del operón *copZA* habían mostrado que un regulador de tipo MerR llamado CueR era el responsable de la regulación de este operón (Gaballa *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la designación de CueR como regulador del operón *copZA* en *B. subtilis* era incorrecta y se ha identificado una proteína perteneciente a la familia CsoR, una familia de represores bacterianos de respuesta a Cu(I) (Liu *et al.*, 2007), que media la expresión de los genes *copZ* y *copA*. Al parecer, el detector citoplasmático de cobre, CsoR, desencadena el exporte de cobre por la ATPasa CopA a la cual le entrega el cobre la chaperona CopZ (Smaldone y Helmann, 2007). Pero en *B. subtilis* se ha descrito otro sistema implicado en la resistencia al cobre, entre otros metales. Este segundo sistema comprende el regulón CzcA que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de tipo ArsR/SmtB e incluye a la proteína CadA, una ATPasa de tipo P que confiere resistencia a Cd(II), y la proteína CzcD, una proteína de la familia de

transportadores CDF (*cation diffusion facilitator*) que confiere resistencia al Zn(II), Cu, Ni(II) y Co(II) (Moore *et al.*, 2005).

#### A.II.4.3.2. *Salmonella enterica* sv Typhimurium y *S. enterica* sv Typhi

En los genomas de las bacterias *S. enterica* sv Typhimurium y *S. enterica* sv Typhi se han encontrado homólogos de los componentes del sistema *cue* de *E. coli*. Así, en ambas bacterias se ha identificado un regulador de tipo MerR llamado CueR/SctR, una oxidasa multicobre designada como CuiD y un transportador de tipo P<sub>1B</sub> denominado CopA. Sin embargo, en estas bacterias no se ha encontrado ningún componente similar a los del sistema *cus* (Espariz *et al.*, 2007). Además, *S. enterica* sv Typhimurium contiene un segundo sistema similar a *cue*, denominado *gol*. Este sistema, que incluye una ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> (GolT), una proteína putativa de unión a metales (GolB) y un regulador transcripcional (GolS), proporciona a la bacteria resistencia a oro pero no tolerancia al cobre (Checa *et al.*, 2007). Sin embargo, en ausencia del principal transportador de cobre, CopA, la proteína GolT proporciona resistencia a cobre ya que contribuye a transportar el exceso de este metal al exterior del citoplasma, reduciendo la toxicidad de este elemento (Espariz *et al.*, 2007).

#### A.II.4.3.3. *Xanthomonas axonopodis* pv vesicatoria

En la bacteria patógena de plantas *X. axonopodis* pv vesicatoria, antes conocida como *X. campestris* pv vesicatoria, se han encontrado cepas que presentan resistencia a cobre. Dichas cepas poseen un plásmido que contiene genes que confieren resistencia a este metal y están relacionados con los operones *cop* de *P. syringae* y *pco* de *E. coli*. Sin embargo, dicho plásmido, en lugar de contener los sistemas *copRS* y *pcoRS* que determinan la expresión inducible por cobre de dichos operones en *P. syringae* y *E. coli*, contiene un gen, *copL*, requerido para la expresión inducible por cobre de la oxidasa multicobre *copA*, situada aguas abajo de dicho gen. El gen *copL* codifica una proteína de 122 aminoácidos rica en residuos de histidina y cisteína, lo que sugiere que interacciona directamente con el cobre. La proteína CopL es similar a los reguladores de respuesta de otros sistemas reguladores bacterianos tanto por el tamaño como por la presencia de motivos conservados alrededor del residuo de aspártico fosforilable (Voloudakis *et al.*, 2005).

#### A.II.4.3.4. *Campylobacter jejuni*

En *C. jejuni* también se han llevado a cabo estudios de los sistemas implicados en la homeostasis del cobre. En esta bacteria se ha identificado una oxidasa multicobre (Cj1516) homóloga a la proteína CueO de *E. coli*, y una ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> (Cj1161) homóloga a CopA. La oxidasa multicobre Cj1516 de *C. jejuni* lleva a cabo la oxidación de cobre en el periplasma, pero en colaboración con la ATPasa Cj1161, la proteína Cj1516 puede eliminar y detoxificar cobre del citoplasma. Estas dos proteínas, Cj1515 y Cj1161, parecen ser los principales componentes del sistema de homeostasis del cobre en *C. jejuni* (Hall *et al.*, 2008).

#### A.II.4.3.5. *Pseudomonas fluorescens* SBW25

Otra bacteria donde se han realizado estudios de homeostasis del cobre es *P. fluorescens* SBW25. Esta bacteria posee dos sistemas implicados en la homeostasis de



## Introducción

este metal. Uno de ellos es el sistema *cue*, el cual está formado por una ATPasa de tipo P<sub>1</sub> denominada CueA (Zhang y Rainey, 2007) y una chaperona del cobre homóloga a la chaperona CopZ de *E. hirae*. Este sistema está regulado por la proteína CueR, un homólogo de los activadores transcripcionales de tipo MerR (Zhang y Rainey, 2008). El otro sistema implicado en la homeostasis del cobre en *P. fluorescens* SBW25 es el sistema *cop*. Este sistema es homólogo del sistema *copABCD* de *P. syringae* pv *tomato*, sin embargo en *P. fluorescens* SBW25 sólo están presentes los genes *copCD* que codifican para una proteína periplásmica, CopC, y una proteína de membrana con ocho hélices transmembrana, CopD, que están implicadas en la entrada de cobre al interior de la célula. La expresión de dichas proteínas está regulada por el sistema de dos componentes CopRS (Zhang y Rainey, 2008). Los sistemas *cop* y *cue* son los elementos principales de la homeostasis del cobre en *P. fluorescens* SBW25 pero dichos sistemas desempeñan un papel diferente. Así, el sistema *cop* permite a la bacteria crecer en ambientes donde los niveles de cobre son limitantes, de manera que la célula adquiere este metal a través de las proteínas CopCD bajo el control del sistema CopRS. Sin embargo, en ambientes en los que las cantidades de cobre son elevadas, el exceso de metal es transportado fuera de la célula a través del sistema *cue* bajo el control del regulador de tipo MerR, CueR (Zhang y Rainey, 2008). Esto es similar a los sistemas descritos en *E. hirae* (Solioz y Stoyanov, 2003), sin embargo, los orígenes evolutivos de los componentes de la homeostasis del cobre en *P. fluorescens* SBW25 son bastante diferentes.

### A.II.4.3.6. *Pseudomonas aeruginosa*

En *P. aeruginosa*, se ha descrito la existencia de los genes *pcoAB* (PA2065 y PA2064) implicados en la tolerancia al cobre, que son homólogos de los genes *copAB* de *P. syringae* pv *tomato*, sin embargo, no presenta los genes *copCD* presentes en esta última. La proteína PcoA de *P. aeruginosa* tiene un dominio oxidasa multicobre similar a CueO de *E. coli*, y participaría en la oxidación de Cu(I) a Cu(II) que es menos tóxico. *P. aeruginosa* posee también una ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> (PA3920) homóloga a CopA de *E. coli*, importante para la tolerancia al cobre en esta bacteria, ya que un mutante para dicha proteína presenta una gran sensibilidad a este metal. También se ha descrito la existencia de un sistema regulador de dos componentes (PA2809 y PA2810) homólogo al sistema CopRS de *P. syringae* que parece ser importante para el crecimiento de *P. aeruginosa* en situaciones de estrés por cobre (Teitzel *et al.*, 2006).

### A.II.4.3.7. *Lactococcus lactis* IL1403

Un pariente muy próximo de *E. hirae*, la bacteria del ácido láctico *L. lactis* IL1403, posee un regulón denominado CopR que controla la expresión dependiente de cobre de 11 genes organizados en 4 genes monocistrónicos, *ytjD*, *lctO*, *copB* e *ydiD*; y dos operones, *yahCD-yaiAB* y *copRZA* (Magnani *et al.*, 2008). El gen *copR* es el primer gen del operón *copRZA* y codifica el represor CopR, que regula el regulón CopR. Este operón también codifica la chaperona CopZ y la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub>, CopA. Dicho operón es muy similar al operón *copyZAB* de *E. hirae* pero se diferencia de éste en que en *L. lactis* la segunda ATPasa de tipo P<sub>1B</sub>, CopB, es codificada por el gen *copB*, localizado en otro lugar diferente del genoma. El operón *copRZA* de *L. lactis* confiere resistencia al cobre, al parecer porque funciona exportando cobre desde el citoplasma. Lo mismo ocurre con la proteína CopB que parece tener una función en el transporte de cobre como la proteína CopB de *E. hirae* con quien presenta homología. El gen *ytjD*,

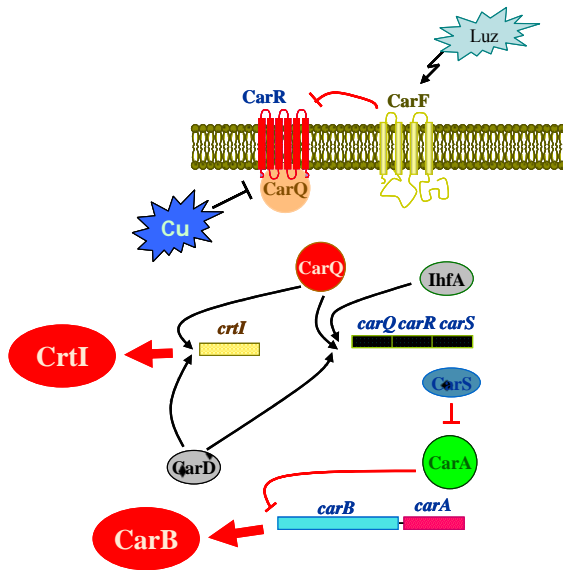
por su parte, codifica una proteína perteneciente a la familia de las nitrorreductasas, YtjD, y es inducida fuertemente por cobre. *lctO* codifica una lactato oxidasa que también es inducida por cobre, al igual que YtjD, pero el papel de estas dos proteínas en la homeostasis de este metal no está muy claro. El operón *yahCD-yaiAB* codifica, por orden, una proteína de función desconocida, una fosfolipasa/ carboxiesterasa hipotética, una glioxilasa I y una flavoproteína oxigenasa putativa, pero la función que dicho operón tiene en el metabolismo del cobre no se conoce hasta el momento. Por último, el gen *ydiD* codifica una proteína con similitud a las proteínas NADH-azorreductasas dependientes de FMN, y aunque es regulada por el represor CopR y dependiente de cobre. El papel que desempeña esta proteína en la homeostasis de este metal tampoco está muy claro (Magnani *et al.*, 2008).

#### A.II.4.4. Homeostasis del cobre en *M. xanthus*

El hábitat natural de *M. xanthus* es el suelo rico en materia orgánica y material vegetal en descomposición, en particular madera en estado de putrefacción, cortezas y líquenes. En estos nichos, esta bacteria se encuentra con frecuencia con altos niveles de compuestos aromáticos resultantes de la degradación de lignina y con altas concentraciones de metales procedentes de la polución industrial. Uno de estos metales es el cobre, que se acumula especialmente en suelos agrícolas debido a que se utiliza en la agricultura desde hace más de 100 años para controlar algunas enfermedades de plantas. Esto significa que *M. xanthus* lleva a cabo su ciclo de vida en presencia de concentraciones relativamente altas de este metal de transición. Como se ha explicado con anterioridad, el cobre es un elemento traza esencial pero puede ser tóxico incluso a bajas concentraciones, es por ello que la homeostasis del cobre en esta bacteria debe estar muy bien regulada.

La respuesta al cobre en *M. xanthus* parece ser más compleja que en otras bacterias. Se ha demostrado que el cobre induce la acumulación de carotenoides en cultivos crecidos en oscuridad de *M. xanthus*, activando la transcripción de los genes estructurales para la síntesis de carotenoides (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005). Ningún otro metal o agente oxidativo, puede mimetizar el efecto del cobre en la síntesis de carotenoides. Esto quiere decir que la inducción se produce directamente por el cobre. Hasta ahora, la luz azul era el único agente ambiental conocido capaz de inducir la carotenogénesis en *M. xanthus*. En la Fig. 6 se muestra la activación de la síntesis de carotenoides en dicha bacteria.

Como ocurre con la luz azul (Fig. 6), el cobre activa la transcripción de los genes estructurales para la síntesis de carotenoides a través de la activación transcripcional del operón *carQRS*. Los genes estructurales para la síntesis de carotenoides, están localizados en dos loci diferentes: el operón *carB*, que contiene seis genes, y el gen *crtI* (Fontes *et al.*, 1993; Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993; Botella *et al.*, 1995). El producto del gen *carQ* codifica para un factor sigma ECF, requerido para la expresión de su propio operón, *carQRS*, y el gen *crtI* (Fontes *et al.*, 1993; Gorham *et al.*, 1996; Martínez-Argudo *et al.*, 1998). En ausencia de cobre (o de luz azul), la transcripción de *carQRS* y *crtI* es muy baja porque *carQ* se encuentra secuestrado por el factor antisigma CarR (Gorham *et al.*, 1996; Browning *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Activación de la síntesis de carotenoides en *M. xanthus* (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005).

Por otra parte, la expresión de *carB* es muy baja porque su promotor se encuentra reprimido por la proteína CarA (Fig. 6), codificada por uno de los cinco genes que constituyen el operón *carA* localizado aguas abajo de *carB* (Whitworth y Hodgson, 2001; Cervantes y Murillo, 2002). En presencia de luz azul, la proteína CarR es inactivada por la acción de la proteína CarF que parece detectar la señal luminosa (Browning *et al.*, 2003; Fontes *et al.*, 2003). Sin embargo, en presencia de cobre, la proteína CarR es inactivada de alguna manera no dependiente de CarF, de modo que CarQ se libera y activa la expresión de su propio operón y del gen *crtI*. Esto causa la expresión de la proteína CarS, el tercer gen del operón *carQRS*. CarS interacciona con CarA contrarrestando su efecto represor sobre el promotor del operón *carB* (Whitworth y Hodgson, 2001; López-Rubio *et al.*, 2002; López-Rubio *et al.*, 2004; Pérez-Marín *et al.*, 2004). La desrepresión del operón *carB* mediada por CarS y la activación de *crtI* mediada por CarQ conducen a la acumulación de carotenoides, cuya función se ha propuesto que es la protección contra el estrés oxidativo, ya que elimina el oxígeno singlete, una ROS originada por la luz y el cobre (Ossola *et al.*, 1997; Gaetke y Chow, 2003).

Junto a los elementos reguladores que se han mencionado en el párrafo anterior, dos factores transcripcionales globales, CarD e IhfA (Fig. 6) también participan en la carotenogénesis inducida por luz o por cobre. CarD es una proteína de tipo A del grupo de alta movilidad, requerida para la activación de los promotores del operón *carQRS* y del gen *crtI* (Nicolás *et al.*, 1994; Nicolás *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 2001; Galbis-Martínez *et al.*, 2004). IhfA, por su parte, es la subunidad  $\alpha$  del *Integration Host Factor*, una proteína de tipo histona que es requerida para la activación del promotor del operón *carQRS* (Moreno *et al.*, 2001).

En adición a la carotenogénesis, también se ha demostrado que el cobre induce otros mecanismos celulares desconocidos que confieren tolerancia a este metal durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* (Moraleda-Muñoz, 2005). El estudio de alguno de estos mecanismos es precisamente uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral. Concretamente vamos a profundizar en el estudio de una oxidasa multicobre.

### A.III. OXIDASAS MULTICOBRE

Las oxidasas multicobre (MCOs) son enzimas que están críticamente implicadas en la homeostasis del cobre (Sitthisak *et al.*, 2005). Esta familia de enzimas usan múltiples átomos de cobre como cofactores y los acoplan a la oxidación de un sustrato para la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Solomon *et al.*, 1996). Estas enzimas muestran actividad oxidasa para un amplio rango de sustratos y han sido implicadas en la biosíntesis de antibióticos, esporulación, tolerancia al cobre, morfogénesis, oxidación de manganeso y oxidación de hierro (Rensing y Grass, 2003).

#### A.III.1. Estructura de las oxidasas multicobre

Las oxidasas multicobre acoplan la oxidación de un electrón del sustrato a la completa reducción del oxígeno molecular a agua empleando una unidad funcional formada por cuatro átomos de cobre que pueden ser de tres tipos de acuerdo con sus características espectroscópicas y funcionales: un cobre tipo 1 (T1), un cobre tipo 2 (T2) y un par de cobres de tipo 3 (T3) (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2008).

El cobre T1 es el llamado cobre “azul” y tiene un espectro de absorción a 610 nm. Es el aceptor primario de electrones. Este cobre confiere el típico color azul de las oxidasas multicobre, el cual resulta de la intensa absorción electrónica causada por la unión covalente del átomo de cobre con el azufre de una cisteína (Solomon *et al.*, 1996; Enguita *et al.*, 2003; Claus, 2004).

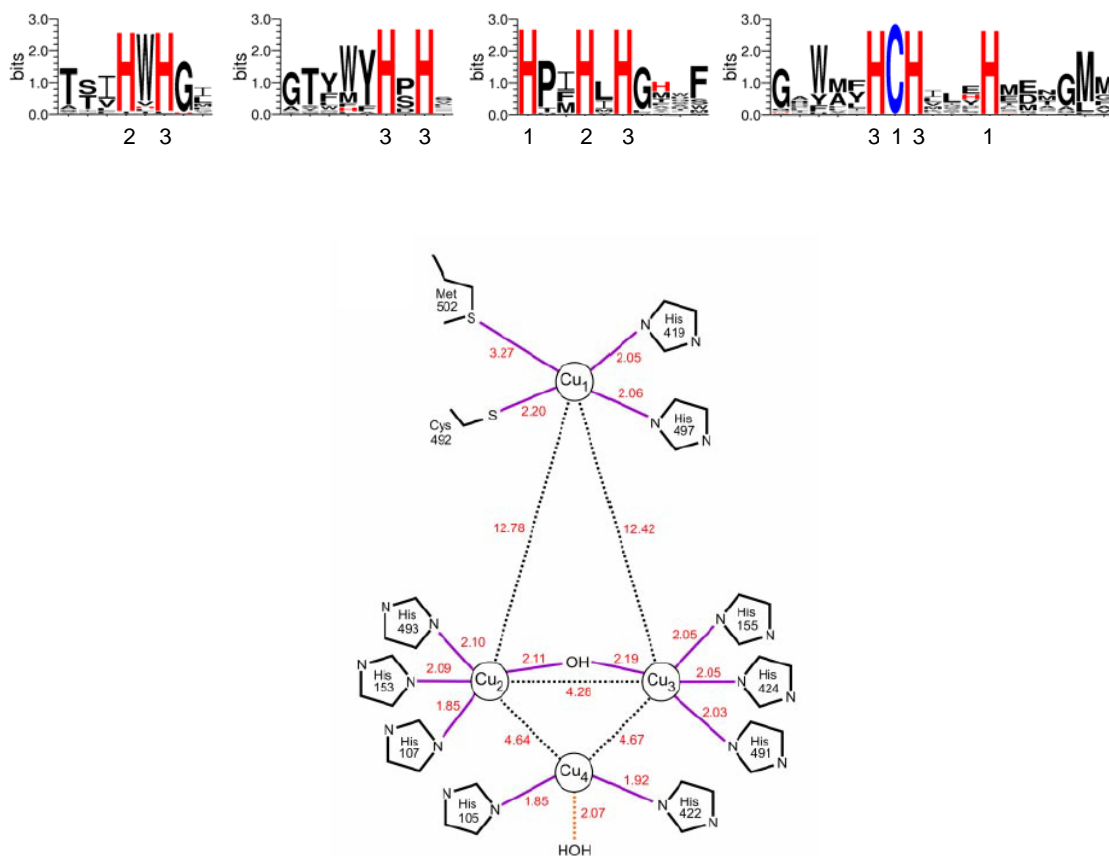
El cobre T2 es el cobre “no azul” o cobre normal y no muestra absorción en el espectro visible.

El cobre T3 está constituido por dos átomos de cobre acoplados formando un centro binuclear y presenta un máximo de absorción en torno a 330 nm.

Este centro binuclear de cobres T3 junto con el cobre T2 forman un cluster trinuclear (TNC). En este cluster tiene lugar la unión del oxígeno y la reducción del mismo a agua (Solomon *et al.*, 1996).

Aunque se pueden hallar grandes diferencias en las secuencias de las diferentes oxidasas multicobre conocidas, los aminoácidos responsables de la coordinación de los átomos de cobre están muy conservados en estas proteínas. Se trata de un conjunto de diez histidinas y una cisteína que se distribuyen del mismo modo en la cadena polipeptídica formando cuatro dominios de unión al cobre (Fig. 7) (Thurston, 1994).

El cobre T1 se caracteriza porque tiene dos histidinas y una cisteína como ligandos conservados y como ligando axial tiene una metionina en el caso de las oxidasas multicobre bacterianas, o una leucina o fenilalanina en el caso de las lacasas fúngicas (Fig. 7). Ha sido ampliamente discutido que este ligando en posición axial influye fuertemente en el potencial de oxidación del enzima, posiblemente proporcionando el mecanismo para regular su actividad. El centro trinuclear de cobres T2 y T3 está coordinado por ocho histidinas que se sitúan en un patrón de cuatro motivos conocidos como HXH (His-X-His). En uno de estos motivos, X es la cisteína unida al cobre T1 y cada una de las histidinas se une a los cobres T3 (Fig. 7) (Solomon *et al.*, 1996).



**Figura 7.** Centros del cobre de la oxidasa multicobre CotA de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2003). En la parte superior se muestran los cuatro dominios de unión al cobre así como la distribución de las diez histidinas y la cisteína conservadas, indicando el átomo de cobre en cuya coordinación están implicadas.

### A.III.2. Mecanismo de acción

En el proceso de reducción del  $O_2$  a  $H_2O$  por parte de las oxidasas multicobre se ha propuesto la siguiente reacción: en primer lugar la enzima oxida las moléculas de sustrato con el cobre T1 por la transferencia de un electrón. Se necesitan cuatro electrones para la completa reducción de la enzima. A continuación, los cuatro electrones son transferidos en pasos de dos electrones al  $O_2$  por los cobres T3, probablemente a través de la formación de un intermediario peróxido. La reducción del oxígeno da lugar a la liberación de agua. La reoxidación del cobre T1 está mediada por el cobre T2 (Claus, 2003; Solomon *et al.*, 1996, Solomon *et al.*, 2008).

Durante el proceso de reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ , primero se forma superóxido, seguido de la formación de peróxido. Cuando el tercer electrón es suministrado al peróxido, la unión O-O se rompe y se forma  $O^{2-}$  y  $O^{\bullet}$ . Al aceptar el cuarto electrón,  $O_2$  es convertido a  $2 O^{2-}$ . Sin embargo, las oxidasas multicobre son capaces de convertir directamente el  $O_2$  a  $H_2O$  sin liberar ROS fuera de la molécula de proteína. Por lo tanto, las oxidasas multicobre no se tienen que acoplar con otras proteínas tales como la SOD y la catalasa para eliminar esas ROS. Los únicos centros activos que son capaces de realizar una oxidación de cuatro electrones del dióxígeno en los sistemas biológicos son

el centro hemo-Cu de las oxidasas terminales y el cluster trinuclear de las oxidasas multicobre (Sakurai y Kataoka, 2007).

### A.III.3. Especificidad de sustrato de las oxidasas multicobre

Las interacciones de las oxidasas multicobre con sus sustratos se pueden dividir en dos categorías: aquellas que tienen una baja especificidad y las que tienen una alta especificidad de sustrato. La mayoría de oxidasas multicobre tienen una especificidad de sustrato bastante amplia como pueden ser las lacasas que pueden oxidar una gran variedad de sustratos tales como difenoles, aryl diaminas y aminofenoles. Sin embargo, aquellas oxidasas multicobre que oxidan metales como el Fe(II), Cu(I) o Mn(II), es decir, las metalo-oxidasas tienen un alto grado de especificidad de sustrato (Solomon *et al.*, 1996; Sakurai y Kataoka, 2007).

### A.III.4. Tipos de oxidasas multicobre

Los miembros más destacados de las oxidasas multicobre son las lacasas, la ascorbato oxidasa de plantas y la ceruloplasmina de mamíferos (Solomon *et al.*, 1996), aunque recientemente se han aislado y caracterizado otras oxidasas multicobre.

#### A.III.4.1. Lacasas

Las lacasas (*p*-difenoil:dioxígeno oxidorreductasas EC 1. 10.3.2) son las más simples dentro de las oxidasas multicobre (Solomon *et al.*, 1996). Son un grupo de proteínas muy diversas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos tales como fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos (Claus, 2003). Estas proteínas usan el oxígeno molecular para oxidar estos compuestos por la transferencia de un electrón dando lugar a radicales reactivos (Claus, 2004).

Desde el punto de vista de la evolución, las lacasas son unas proteínas muy antiguas. La primera lacasa fue descrita por Yoshida en 1883, descubierta en el látex del árbol de la laca (*Rhus vernicifera*) como un componente para oxidar y polimerizar diversos lípidos fenólicos. Pero no fue hasta 1985 cuando fue caracterizada por Bertrand como una oxidasa que contiene metales. Esto las convierte en unas de las enzimas más antiguas que hay descritas (Mayer y Staples, 2002, Sakurai y Kataoka, 2007).

Las lacasas se han dividido siempre en dos grupos: aquellas que pertenecen a las plantas superiores, y las lacasas fúngicas, aunque hoy día se han descrito lacasas en insectos y en bacterias (Solomon *et al.*, 1996). La primera bacteria donde fue identificada actividad lacasa fue *Azospirillum lipoferum*, aumentando la posibilidad de que las lacasas no estuvieran restringidas a los eucariotas (Givaudan *et al.*, 1993).

En el caso de las lacasas de plantas su principal función es la formación de lignina, que forma la pared celular; mientras que las lacasas fúngicas llevan a cabo la degradación de este compuesto. En el caso de las lacasas presentes en insectos, su función es la formación de la cutícula externa (Nakamura y Go, 2005; Sakurai y Kataoka, 2007).

Debido a que las lacasas catalizan un amplio rango de reacciones enzimáticas y tienen una amplia especificidad de sustrato, han ganado una considerable importancia biotecnológica (Claus, 2003). Aunque las lacasas habían sido encontradas siempre en plantas y hongos, actualmente sólo las lacasas fúngicas presentan aplicaciones biotecnológicas. Las aplicaciones recientes que se les han atribuido a estas enzimas han sido: deslignificación de la pulpa, blanqueamiento textil, destoxificación de efluentes, eliminación de compuestos fenólicos de vinos y transformación de antibióticos y esteroides (Alexandre y Zhulin, 2000).

### **A.III.4.2. Ascorbato oxidasa**

La ascorbato oxidasa se localiza en plantas superiores. La función biológica de esta enzima no se conoce completamente. Su expresión se ve aumentada con la luz y con heridas mecánicas, y lo más probable es que sea responsable de la defensa frente a oxidantes relacionados con la función del ascorbato o la vitamina C (Nakamura y Go, 2005). También se ha visto que aumenta durante el período de desarrollo y parece ser que funciona en la división celular (Sakurai y Kataoka, 2007). Para que la ascorbato oxidasa sea estable y pueda funcionar es necesario la formación de homodímeros, a diferencia de las lacasas que se pliegan y funcionan como monómeros (Nakamura y Go, 2005).

### **A.III.4.3. Ceruloplasmina**

La ceruloplasmina es la más compleja de las oxidasas multicobre (Solomon *et al.*, 1996) y juega un papel vital en el metabolismo del hierro en mamíferos, incluidos los humanos. Para ser usado en la formación de hemoglobina, el hierro tiene que estar unido a la transferrina, y además debe estar en la forma oxidada. En el suero sanguíneo, la ceruloplasmina oxida Fe(II) a Fe(III), así el hierro del suero puede ser usado para la formación de hemoglobina. La ceruloplasmina también actúa como antioxidante, eliminando radicales libres del oxígeno del suero (Aouffen *et al.*, 2004).

### **A.III.4.4. Otras oxidasas multicobre**

#### **A.III.4.4.1. Oxidasas multicobre implicadas en la resistencia al cobre (CueO, PcoA y CutO)**

Como se explicó con anterioridad, la homeostasis del cobre ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*. Uno de los elementos clave para mantener la homeostasis de este metal en dicha bacteria es la oxidasa multicobre CueO que forma parte del sistema *cue*. Se trata de una proteína periplásmica cuya función es oxidar Cu(I) a Cu(II) que es menos tóxico, confiriendo resistencia a este metal (Rensing y Grass, 2003). Pero CueO no sólo lleva a cabo esta función, si no que además se ha visto que cataliza la oxidación de *p*-fenilenediamina (*p*PPD), 2,6-dimetoxifenol (DMP) y otros sustratos comunes de las lacasas, y también posee actividad ferroxidasa. Estas propiedades hacen de CueO un atractivo sistema modelo para estudiar las oxidasas multicobre bacterianas (Grass y Rensing, 2001). Además, se ha visto que CueO puede proteger de la toxicidad del cobre mediante la oxidación de enterobactina, un sideróforo natural de *E. coli*, que intensifica la toxicidad de los iones cobre ya que funciona como un agente reductor de Cu(II). Esta oxidación de enterobactina por parte de CueO se ve intensificada en presencia de un exceso de iones cobre (Grass *et al.*, 2004).

Pero *E. coli* posee otro sistema de resistencia al cobre, el sistema *pco*, que contiene otra oxidasa multicobre, PcoA, cuya función es oxidar Cu(I) a Cu(II), que es excretado al exterior celular. Además, PcoA también posee actividad fenol oxidasa (Djoko *et al.*, 2008).

*Rhodobacter capsulatus*, una bacteria púrpura, contiene una oxidasa multicobre, CutO, que confiere tolerancia al cobre no sólo bajo condiciones aeróbicas como ocurre con CueO, si no también bajo condiciones anaeróbicas. Además, se ha demostrado que CutO puede oxidar compuestos mono y difenólicos, sustratos de algunas oxidasas multicobre (Wiethaus *et al.*, 2006).

#### A.III.4.4.2. CotA

Las cubiertas de las endosporas bacterianas proporcionan una enorme durabilidad contra daños físicos y químicos, y permiten a las bacterias sobrevivir miles e incluso millones de años en ambientes adversos. *Bacillus subtilis* forma una endospora con una cubierta formada por 30 tipos de polipéptidos. Una de estas proteínas es CotA que presenta similitudes con las oxidasas multicobre (Nakamura y Go, 2005). CotA está muy relacionada con la manganeso oxidasa MofA de *Leptothrix discophora* y CumA de *Pseudomonas putida*, la cual es esencial para la oxidación de manganeso. Se ha visto que *B. subtilis* es capaz de oxidar iones Mn(II), pero ni CotA ni otras proteínas de la cubierta de la endospora están implicadas en la oxidación de metales a diferencia de CumA. Parece ser que CotA es responsable de la formación de un pigmento de tipo melanina para la protección contra la radiación UV y el peróxido de hidrógeno (Hullo *et al.*, 2001).

#### A.III.4.4.3. Manganeso oxidasas (CumA, MofA, MnxG, MoxA)

Algunas proteínas de la cubierta de la endospora de las bacterias son capaces de oxidar iones Mn(II). Una de estas proteínas es CumA, la cual presenta similitud con las lacasas, y sus homólogos están distribuidos en las cepas de *Pseudomonas*. Algunas cepas de *Pseudomonas* son capaces oxidar Mn(II) y otras no. *Pseudomonas putida* tiene dos oxidasas multicobre, CumA y CumB, codificadas en el mismo operón. CumA contribuye a la oxidación de manganeso, mientras que CumB es necesaria para el crecimiento óptimo de la célula (Brouwers *et al.*, 1999).

*Leptothrix discophora* es también capaz de oxidar Mn(II) y Fe(II) gracias a la presencia de la proteína MofA, una proteína de la cubierta de la espora también homóloga a las oxidasas multicobre (Corstjens *et al.*, 1992),

*Bacillus* SG-1 tiene un cluster de siete genes, designados como *mnx*, implicados en la oxidación de manganeso. Uno de estos genes, *mnxG*, codifica la proteína MnxG, una oxidasa multicobre capaz de oxidar Mn(II) a Mn(III), y Mn(III) a Mn(IV) (Dick *et al.*, 2008).

*Pedomicrobium* sp ACM 3067 es una cepa del género *Pedomicrobium* capaz de oxidar manganeso gracias a la presencia de la proteína MoxA, una proteína homóloga también de las oxidasas multicobre (Ridge *et al.*, 2007).



## Introducción

### A.III.4.4.4. PpoA

*Marinomonas mediterranea* es una bacteria marina que presenta una polifenol oxidasa llamada PpoA, homóloga a las oxidasas multicobre. Esta proteína parece estar implicada en la formación de un pigmento del tipo de la melanina. Se ha visto que esta proteína es capaz de oxidar un amplio rango de sustratos tanto de las lacasas como de las tirosinasas. Es una proteína de membrana y oxida tirosina, L-DOPA, DMP y siringaldazina. Además de actividad lacasa, esta proteína tiene actividad tirosina hidroxilasa. Parece ser que además de los cuatro motivos de unión del cobre, tiene otros dos cluster ricos en histidina que podrían estar implicados en la unión el cobre y ser la causa de su actividad tirosina hidroxilasa (Sánchez-Amat *et al.*, 2001).

### A.III.4.4.5. EpoA

En *Streptomyces griseus* se ha caracterizado una oxidasa multicobre a la que se ha denominado EpoA. Se trata de una fenol oxidasa extracitoplasmática, que como otras lacasas es capaz de oxidar *N, N'*- dimetil-*p*-fenilenediamina. También cataliza la oxidación de DOPA para producir melanina y además está implicada en la diferenciación celular de esta bacteria, ya que una sustancia sintetizada a partir de DOPA como producto intermediario en la producción de melanina es capaz de inducir la formación de micelio aéreo mediada por EpoA. Se ha visto que esa actividad oxidasa aumenta en presencia de cobre y del factor A, una sustancia autorreguladora que actúa disparando el desarrollo (Endo *et al.*, 2002; Endo *et al.*, 2003).

### A.III.4.4.6. Bilirrubina oxidasa

La oxidasa multicobre bilirrubina oxidasa ha sido purificada y caracterizada de dos especies de hongos: *Myrothecium verrucaria* y *Trachyderma tsudondae*. Esta enzima oxida bilirrubina, así como otros tetrapirroles. A diferencia de las lacasas, puede también oxidar difenoles y aryl diaminas (Solomon *et al.*, 1996).

### A.III.4.4.7. Síntesis de antibióticos (PhsA)

La proteína PhsA (fenoxazinona sintasa) ha sido purificada de la bacteria *Streptomyces antibioticus* e identificada en otras cepas de *Streptomyces*. Esta proteína está implicada en la síntesis del antibiótico actinomicina, pero también puede catalizar la condensación oxidativa de otros *o*-aminofenoles así como la oxidación de *o*-difenoles y *p*-aminofenoles (Solomon *et al.*, 1996).

### A.III.4.4.8. Oxidación de hierro (Fet3p, Fox1)

El Fe(II) es potencialmente tóxico bajo condiciones aeróbicas ya que promueve la formación de radicales hidroxilo altamente reactivos a través de las reacciones de Haber-Weiss. Por tanto la oxidación de Fe(II) es especialmente importante como protección contra la formación de ROS (Wiethaus *et al.*, 2006; Huston *et al.*, 2008).

Fet3p es una proteína unida a la membrana extracelular de *Saccharomyces cerevisiae*. Posee un alto grado de homología con otras oxidasas multicobre bien caracterizadas, sobre todo en las regiones de unión del cobre y se caracteriza por poseer una actividad ferroxidasa (oxidación de Fe(II) a Fe(III)) dependiente de cobre. Además

de la oxidación de hierro, Fet3p oxida también compuestos fenólicos y Cu(I) a Cu(II) (Solomon *et al.*, 1996).

El alga *Chlamydomonas reinhardtii* expresa una ferroxidasa putativa llamada Fox1. Esta enzima presenta una alta homología con la ceruloplasmina humana y al igual que ésta, está implicada en la oxidación de Fe(II) a Fe(III) (Terzulli y Kosman, 2009).

#### A.III.4.4.9. SilA

En *Streptomyces ipomoea* se ha caracterizado una oxidasa multicobre denominada SilA que pertenece al grupo de las lacasas. Esta proteína presenta una amplia especificidad de sustrato dependiente de pH. Así, a pH ácido oxida ABTS y ferrocianuro, y a pH alcalino, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las lacasas descritas, oxida preferentemente compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

### A.III.5. Aplicaciones de las oxidasas multicobre

Las oxidasas multicobre, especialmente las lacasas fúngicas exhiben una amplia especificidad de sustrato y son capaces de oxidar un amplio rango de compuestos orgánicos que incluyen fenoles y aminas aromáticas (Alexandre y Zhulin, 2000; Claus, 2003). Esta amplia especificidad de sustrato confiere a estas enzimas unas características idóneas para su utilización en diferentes aplicaciones biotecnológicas. Se utilizan en la industria papelera para blanqueo de pasta de papel y en el destintado de fibras recicladas. Son útiles también en la industria alimentaria porque participan en la estabilización e incremento de la calidad de algunas bebidas. En la industria textil se aplican para blanquear fibras de algodón y colorantes textiles. Hay además, muchos estudios encaminados hacia la degradación de compuestos aromáticos problemáticos para el medio ambiente como los colorantes textiles, bifenilos policlorados (PCBs), clorofenoles e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Pérez y Moraleda-Muñoz, 2009).

Además de las lacasas fúngicas, recientemente se ha demostrado, la utilidad de las lacasas de *Streptomyces* en los procesos de blanqueo de pasta de papel, abriendo la posibilidad de que las lacasas bacterianas también puedan jugar un importante papel en el desarrollo de estas aplicaciones (Arias *et al.*, 2003). Distintas cepas de *Streptomyces* son capaces de atacar oxidativamente las unidades estructurales de la lignina (Hernández-Coronado *et al.*, 1997) hasta lograr en algunos casos su mineralización (Berrocal *et al.*, 1997). Asimismo se ha demostrado que la mayor parte de las cepas, degradan el componente hemicelulolítico de los sustratos. En función de estas capacidades se ha demostrado su utilidad en el biopasteo de paja de trigo y de astillas de madera de distinta naturaleza (Berrocal *et al.*, 2000; Berrocal *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005).

La bilirrubina oxidasa y la ascorbato oxidasa han sido utilizadas en un test clínico para ver el funcionamiento del hígado y en el pretratamiento de la muestra para eliminar el efecto inhibitorio del ascorbato, respectivamente. Se ha explorado también la formación de pigmentos por parte de las oxidasas multicobre, y recientemente se ha visto que la bilirrubina oxidasa y la CueO pueden dar lugar a tintes que no funcionan como mutágenos. También se ha estudiado la transferencia de electrones entre proteínas

redox y electrodos debido a su posible aplicación en el campo de la biotecnología que implica biosensores y biorreactores (Sakurai y Kataoka, 2007).

### A.IV. SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES

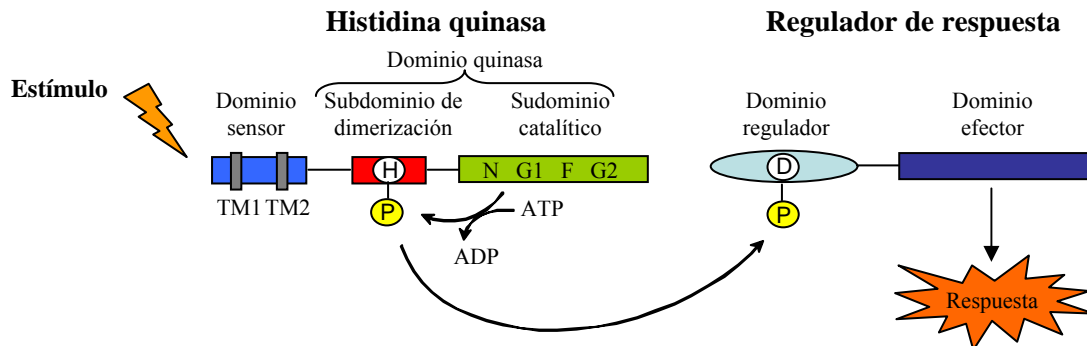
Los sistemas para controlar la homeostasis del cobre en bacterias presentan diversos tipos de mecanismos de regulación. Uno de estos mecanismos son los sistemas reguladores de dos componentes, como el sistema CusRS que regula la expresión del sistema *cus* en *E. coli* y que detecta cambios en el nivel de cobre en el periplasma poniendo en funcionamiento dicho sistema.

Las bacterias se suelen encontrar con frecuencia diversos cambios en sus condiciones de vida, ya sean cambios en los niveles de nutrientes y toxinas, acidez, temperatura, osmolaridad, humedad y otras muchas condiciones que pueden cambiar de manera rápida e inesperada (Parkinson, 1995). Como consecuencia, muchas especies bacterianas caracterizadas contienen numerosos sistemas de señalización que permiten acoplar una serie de respuestas adaptativas a estímulos ambientales específicos. La abundancia de proteínas de transducción de señales en bacterias se ha subestimado, ya que las principales familias de proteínas de señalización identificadas en eucariotas tienen papeles minoritarios en bacterias. Sin embargo, las bacterias tienen su propio repertorio de componentes de señalización (Galperin, 2005). El más extendido de estos mecanismos son los sistemas reguladores de dos componentes, que están basados en una ruta conservada de fosfotransferencia entre una proteína histidina quinasa y un regulador de respuesta. (Hoch, 2000). Estas rutas se emplean para la regulación de una amplia variedad de procesos celulares como metabolismo, movilidad, quimiotaxis, transporte de nutrientes, adaptación a agentes de estrés, virulencia, diferenciación y desarrollo (Bekker *et al.*, 2006), lo que explica la extensa variedad de dominios sensores diferentes que aparecen en las histidina quinasa.

Cuando la histidina quinasa detecta una señal o cambios en el medio ambiente, se autofosforila, en un proceso dependiente de ATP, en un residuo conservado de histidina. A continuación transfiere ese grupo fosfato a un residuo conservado de aspártico de su regulador de respuesta afín, el cual ejerce cambios en la fisiología celular para dar una respuesta, que a menudo consiste en el control de la expresión génica. El regulador de respuesta es el elemento control fundamental dentro de estas rutas ya que su estado de fosforilación controla su actividad, y por tanto, la respuesta a la señal. La Fig. 8 representa un esquema básico y existen numerosas variaciones (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim y Forst, 2001; West y Stock, 2001, Tropel y van der Meer, 2004).

Una versión más compleja de este proceso de transferencia del grupo fosfato lo constituyen los fenómenos de fosfotransferencia His-Asp-His-Asp, que implican múltiples etapas de transferencia del fosfato y, a menudo, más de dos proteínas (Perraud *et al.*, 1999). La mayoría de estos sistemas de fosfotransferencia implican quinasa híbridas en la que los dominios que contienen los residuos de histidina y aspártico que se fosforilan están presentes en una misma proteína. Los dominios de fosfotransferencia que contienen residuos de histidina (HPt) desempeñan un papel esencial en la transferencia de grupos fosfato desde las histidina quinasa híbridas hasta los reguladores de respuesta citoplasmáticos. Estos sistemas de fosfotransferencia más extensos proporcionan mayor versatilidad en las estrategias de señalización y un mayor

número de sitios potenciales de regulación. La presencia de estas quinasas híbridas es más frecuente en eucariotas, mientras que los sistemas reguladores de dos componentes en procariontes generalmente usan un esquema simple de fosfotransferencia (West y Stock, 2001).



**Figura 8.** Esquema de la fosfotransferencia en un sistema regulador de dos componentes.

Muchos genomas bacterianos secuenciados codifican numerosos sistemas reguladores de dos componentes. El número de estos sistemas se ve incrementado con el tamaño del genoma y la complejidad del estilo de vida del organismo. Algunas bacterias no contienen sistemas reguladores de dos componentes como por ejemplo *Mycoplasma* y *Candidatus Blochmannia floridanus*. Otras muchas contienen varias docenas como *Bacillus anthracis* y *E. coli*, y sólo unas pocas contienen más de cien como *M. xanthus* y las cianobacterias (Gao *et al.*, 2007). En el caso de *M. xanthus* se ha visto que posee 133 histidina quinasas y 139 reguladores de respuesta, así como 36 quinasas híbridas (Shi *et al.*, 2008). Los genes que codifican histidina quinasas y reguladores de respuesta afines suelen encontrarse adyacentes en el genoma (Mizuno, 1997; Fabret *et al.*, 1999).

Los sistemas reguladores de dos componentes se agrupan en subfamilias en función de su organización génica, arquitectura de los dominios, relaciones filogenéticas y las respuestas a un amplio rango de estímulos ambientales que incluyen la entrada y metabolismo de citrato (Cit), respiración aeróbica (Arc), osmorregulación (EnvZ/OmpR), esporulación inducida por estrés (Kin/Spo), biosíntesis de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (Lyt), metabolismo del nitrato y nitrito (Nar), regulación del nitrógeno (Ntr), regulación del fosfato (Pho), reconocimiento del huésped para la invasión del patógeno (Vir), y la quimiotaxis (Che) (Koretke *et al.*, 2000). En este sentido, las cuatro grandes subfamilias de sistemas de dos componentes presentes en *M. xanthus* son las de tipo CheAY, PhoBR, NtrBC y NarXL.

Las histidina quinasas y los reguladores de respuesta son proteínas modulares que contienen múltiples dominios homólogos y heterólogos, y pueden estar organizadas de diferentes maneras para construir una amplia variedad de circuitos de transducción de señales (Stock *et al.*, 1989; Parkinson y Kofoid, 1992; Hoch y Silhavy, 1995; Goudreau y Stock, 1998).

### A.IV.1. Histidina quinasas

En los sistemas reguladores de dos componentes típicos, la histidina quinasa sensora es la proteína que detecta el estímulo externo y transmite esa información a su regulador de respuesta afín por un evento de fosforilación (Stock *et al.*, 2000). Las histidina quinasas constituyen una amplia familia de proteínas de señalización capaces de catalizar la fosforilación de residuos de histidina a partir de ATP. La gran mayoría de las histidina quinasas son proteínas homodiméricas con un dominio sensor N-terminal periplásmico que está acoplado a un dominio quinasa C-terminal citoplasmático que contiene el residuo de histidina fosforilable. Los dominios sensores son variables en secuencia ya que los estímulos medioambientales que deben ser detectados son muy diversos, mientras que los dominios quinasa están más conservados dentro de esta familia de proteínas (Mascher *et al.*, 2006).

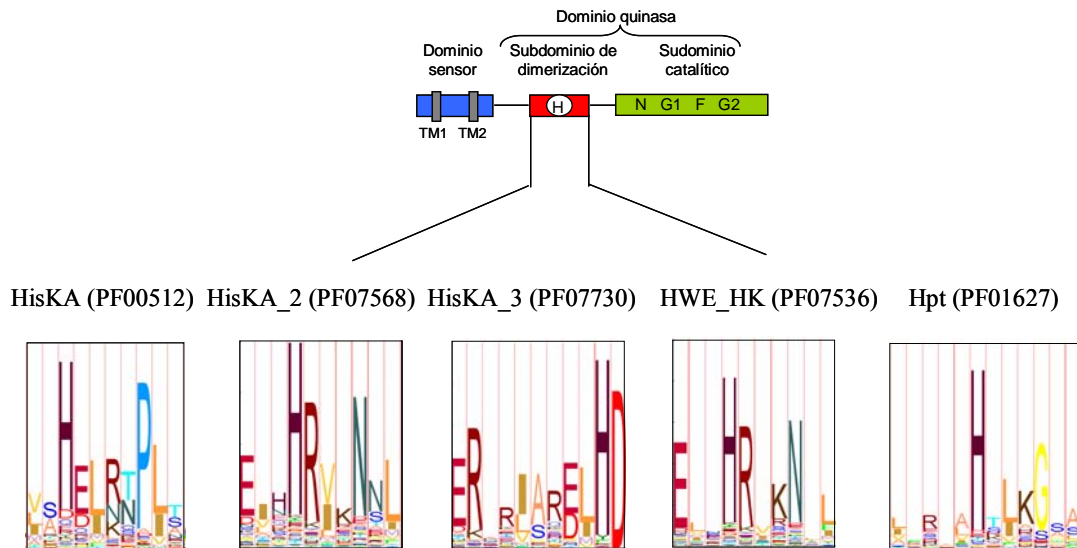
#### A.IV.1.1. Dominio sensor

El dominio sensor N-terminal de las histidina quinasas es el elemento que, bien de manera directa o indirecta, detecta los estímulos medioambientales. Las histidina quinasas presentan una gran variedad de dominios sensores intracelulares, extracelulares y/o transmembrana con una homología de secuencia primaria muy baja. Esto apoya la idea de que los dominios sensores han sido diseñados para detectar interacciones ligando/estímulo específicas (Stock *et al.*, 2000) En las histidina quinasas que presentan dominios sensores extracelulares, éstos están conectados con el dominio quinasa citoplasmático a través de una o más hélices transmembrana que, en algunos casos, están seguidas por un dominio de unión citoplasmático. Este dominio de unión (o dominio HAMP, del inglés *histidine kinases*, *adenylyl cyclases*, *methyl-accepting proteins* y *phosphatases*, proteínas en las que está presente dicho dominio) parece jugar un papel crítico en la transducción de la señal, y se ha sugerido que estos dominios HAMP poseen papeles en la regulación de la fosforilación de la histidina quinasa ya que transmiten al dominio quinasa, los cambios conformacionales ocurridos en el dominio sensor al detectar la señal (Aravind y Ponting, 1999).

#### A.IV.1.2. Dominio quinasa

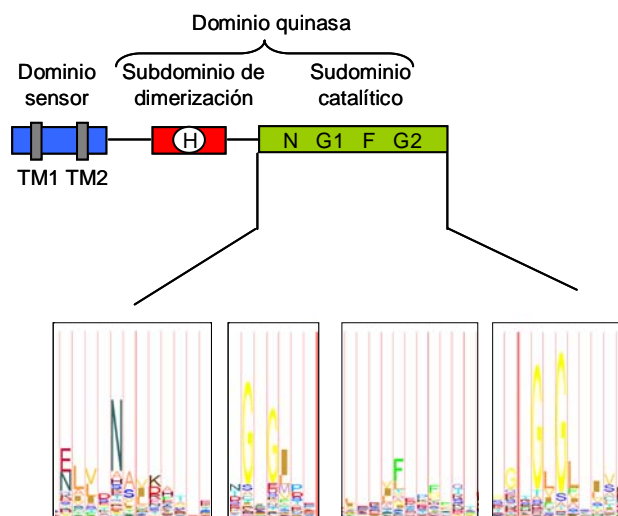
El dominio quinasa está constituido por dos subdominios: el de fosforilación/dimerización, y el subdominio catalítico.

El subdominio de fosforilación/dimerización contiene un motivo conocido como caja H con una secuencia altamente conservada donde se encuentra el residuo de histidina fosforilable, que en la mayoría de las histidina quinasas se localiza a unos 110 aminoácidos en posición N-terminal respecto al subdominio catalítico conservado (Hess *et al.*, 1988; Ninfa y Bennet, 1991; Roberts *et al.*, 1993). Este subdominio puede ser de cinco maneras diferentes dentro de las histidina quinasas: HisKA (PF00512), HisKA\_2 (PF07568), HisKA\_3 (PF07730), HWE\_HK (PF07536) y Hpt (PF01627), todos ellos caracterizados por la presencia de la caja H. En la Fig. 9 se muestra el HMM Logos para cada una de las cajas H en los distintos subdominios de fosforilación/dimerización de las histidina quinasas.



**Figura 9.** HMM Logos para cada una de las cajas H en los distintos subdominios de fosforilación/dimerización de las histidina quinasa.

El subdominio catalítico, por su parte, está constituido por cuatro motivos altamente conservados denominados cajas N, G1, F y G2 que están implicados en la unión al ATP y en la fosfotransferencia hasta el residuo aceptor de histidina. Este subdominio se conoce como HATPasa\_C (PF02518) (Fig. 10) (Parkinson y Kofoid, 1992; Stock *et al.*, 1995). Estas cajas N, G1, F y G2 han sido analizadas en numerosas histidina quinasa y los resultados obtenidos conducen a la clasificación de estas proteínas en 11 subfamilias. Este estudio indica que, en algunas cepas bacterianas, la mayoría de las histidina quinasa pertenecen a una misma subfamilia, lo que sugiere un proceso de transferencia genética lateral. En otras bacterias, tales como *Bacillus subtilis*, las 31 histidina quinasa que presenta se encuentran distribuidas prácticamente por igual entre ocho de los subgrupos (Grebe y Stock, 1999; Wolanin *et al.*, 2002; Khorchid e Ikura, 2006).



**Figura 10.** HMM Logos de las cajas N, G1, F y G2 altamente conservadas en el subdominio catalítico de las histidina quinasa.

El dominio quinasa se autofosforila en *trans* de forma que una subunidad fosforila a la subunidad opuesta en el complejo homodimérico (Wolanin *et al.*, 2002; Khorchid e Ikura, 2006).

### A.IV.1.3. Clases de histidina quinastas

En función de la organización de los subdominios funcionales anteriormente descritos se distinguen dos tipos de histidina quinastas (Bilwes *et al.*, 1999), cuyas diferencias posiblemente reflejan sus distintas localizaciones, funciones y mecanismos reguladores.

#### A.IV.1.3.1. Histidina quinastas de clase I

Esta clase constituye el tipo más abundante de histidina quinastas y se caracterizan porque el subdominio de fosforilación/dimerización, que contiene la caja H, se encuentra conectado directamente con el subdominio catalítico (Dutta *et al.*, 1999; Foussard *et al.*, 2001). De esta clase I de histidina quinastas derivan las denominadas histidina quinastas híbridas, en las cuales los dominios que contienen los residuos de histidina y aspártico fosforilables se encuentran en una misma proteína. Se estima que casi el 20% de todas las histidina quinastas son codificadas como proteínas híbridas. (Chang y Stewart, 1998). Estas proteínas híbridas presentan reguladores de respuesta o dominios HPt adicionales.

#### A.IV.1.3.2. Histidina quinastas de clase II

Las histidina quinastas que pertenecen a esta clase presentan los subdominios conectados mediante polipéptidos de longitud variable. Difieren de las de clase I en que presentan cinco subdominios denominados P1, P2, P3, P4 y P5 y que van desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. El subdominio P1 es el subdominio de fosforilación de tipo HPt que se localiza en el extremo N-terminal de la proteína y en él se encuentra la caja H (Dutta *et al.*, 1999; Foussard *et al.*, 2001). Este subdominio P1 constituye un dominio distinto y separado de los subdominios de dimerización P3 y catalítico P4 (Swanson *et al.*, 1993). El subdominio P2, por su parte, está dedicado al reconocimiento y unión de los reguladores de respuesta afines, y está seguido del dominio transmisor que sólo contiene las cajas N, G1, F y G2. La región C-terminal de estas histidina quinastas está implicada en la regulación de la actividad autoquinasa (Borruet *et al.*, 1993; Morrison y Parkinson, 1997).

## A.IV.2. Reguladores de respuesta

Una vez que la señal ha sido recibida por la histidina quinasa sensora del sistema regulador de dos componentes, esta histidina quinasa transmite dicha señal a su regulador de respuesta afín por un evento de fosforilación. En muchos sistemas procarióticos, los reguladores de respuesta se encuentran normalmente al final de las rutas de fosfotransferencia donde funcionan como interruptores activados mediante fosforilación para ejercer una respuesta adaptativa. Los reguladores de respuesta catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el residuo fosforilado de histidina de la histidina quinasa a un aspártico en su propio dominio regulador. Estas proteínas, por lo general, presentan una estructura constituida por dos o más dominios, con un dominio N-terminal regulador conservado y uno o varios dominios C-terminal efectores

variables. La mayoría de reguladores de respuesta son factores transcripcionales con dominios efectores de unión al ADN. Estos dominios de unión al ADN pueden ser subdivididos en tres subfamilias principales representadas por OmpR, NarL y NtrC (Stock *et al.*, 2000; West y Stock, 2001; Tropel y van der Meer, 2004).

#### A.IV.2.1. Dominio regulador

La característica que define a los reguladores de respuesta es la presencia de un dominio  $\alpha/\beta$  estructuralmente conservado conocido como dominio regulador (Gao *et al.*, 2007). Los dominios reguladores de los reguladores de respuesta interactúan con la histidina quinasa y catalizan la transferencia de un grupo fosfato a uno de sus propios residuos de aspártico. Además, catalizan su autodesfosforilación de manera que se limita el tiempo de vida del estado activado, y por otro lado, regulan las actividades de sus dominios efectores asociados de una manera dependiente de fosfato. Los dominios reguladores, a menudo llamados dominios receptores, también pueden encontrarse dentro de histidina quinasas híbridas o como proteínas aisladas dentro de las rutas de fosfotransferencia. En este contexto, los dominios receptores no están físicamente conectados a los dominios efectores y no juegan un papel directo en la regulación de la función del dominio efector (West y Stock, 2001).

Aunque los dominios reguladores son referidos a veces como dominios receptores no significa que los dominios conservados de los reguladores de respuesta sean compañeros pasivos en la fosfotransferencia desde la histidina quinasa. Más bien, los reguladores de respuesta catalizan activamente la fosfotransferencia ya que se ha observado que pequeñas moléculas tales como el acetil fosfato, carbamil fosfato, imidazol fosfato y fosforamidoato pueden servir como fosfodadores a los reguladores de respuesta en reacciones *in vitro*, demostrando que el regulador de respuesta puede catalizar la transferencia del grupo fosfato independientemente de una histidina quinasa (Lukat *et al.*, 1992).

El dominio regulador consiste en 5 láminas  $\beta$  rodeadas de 5 hélices anfipáticas. En este dominio se encuentran unos residuos altamente conservados que llevan a cabo papeles importantes en la propagación de la señal y en la catálisis de la fosfotransferencia y autodesfosforilación. El sitio activo de este dominio contiene un cluster de residuos ácidos conservados que incluye el ácido aspártico, sitio de fosforilación, en el extremo C-terminal de la lámina  $\beta_3$ . Este residuo está completamente conservado en todos los reguladores de respuesta homólogos. En el recodo  $\beta_1-\alpha_1$  hay dos residuos adicionales que posicionan un ión metálico divalente, generalmente  $Mg^{2+}$  que es requerido tanto para la fosfotransferencia como para la hidrólisis del fosfato. El resto de residuos altamente conservados en los dominios reguladores están implicados en la propagación de los cambios conformacionales que acompañan la fosforilación del regulador de respuesta (Gao *et al.*, 2007).

#### A.IV.2.2. Dominio efector

Una vez que los reguladores de respuesta han percibido la señal, efectúan una respuesta a través de sus dominios efectores.

Los dominios efectores son muy diversos en cuanto a estructura y función, y presentan mecanismos diferentes para controlar sus actividades, es por ello que hacer



una descripción modelo de un dominio efector no es posible. La mayoría de los dominios efectores tienen capacidad para unirse al ADN y funcionan como factores de transcripción cuya función es activar y/o reprimir la transcripción de genes específicos. Sin embargo, las secuencias específicas que son reconocidas, la organización de los sitios de unión y el mecanismo específico de regulación transcripcional difiere para cada regulador de respuesta, incluso dentro de una misma subfamilia. Un análisis detallado de manera individual de diversos reguladores de respuesta ha revelado una gran complejidad en el funcionamiento de estos factores de transcripción. Esto queda ilustrado por miembros representativos de las tres subfamilias principales de dominios efectores basadas en la homología de sus dominios de unión al ADN. Éstas son la subfamilia OmpR/PhoB, la NarL/FixJ, y la subfamilia de los factores de transcripción NtrC/DctD, acoplados a actividad ATPasa (Stock *et al.*, 2000). Aunque todas las subfamilias contienen secuencias hélice-giro-hélice, características de las proteínas que se unen al ADN, los dominios efectores pertenecientes a las distintas subfamilias se diferencian en su plegamiento.

### A.IV.2.2.1. Subfamilia OmpR/PhoB

OmpR es un miembro muy caracterizado de esta subfamilia de reguladores de respuesta que funciona tanto de activador como de represor para regular la expresión de manera diferencial de los genes *ompC* y *ompF* que codifican para porinas de la membrana externa. Los miembros de esta subfamilia, en la que también se incluye PhoB, presentan una enorme similitud estructural, sin embargo difieren en sus modos de acción. Por ejemplo, la activación transcripcional por OmpR implica la interacción con la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa, mientras que PhoB interacciona con  $\sigma^{70}$  (Ames *et al.*, 1999).

### A.IV.2.2.2. Subfamilia NarL/FixJ

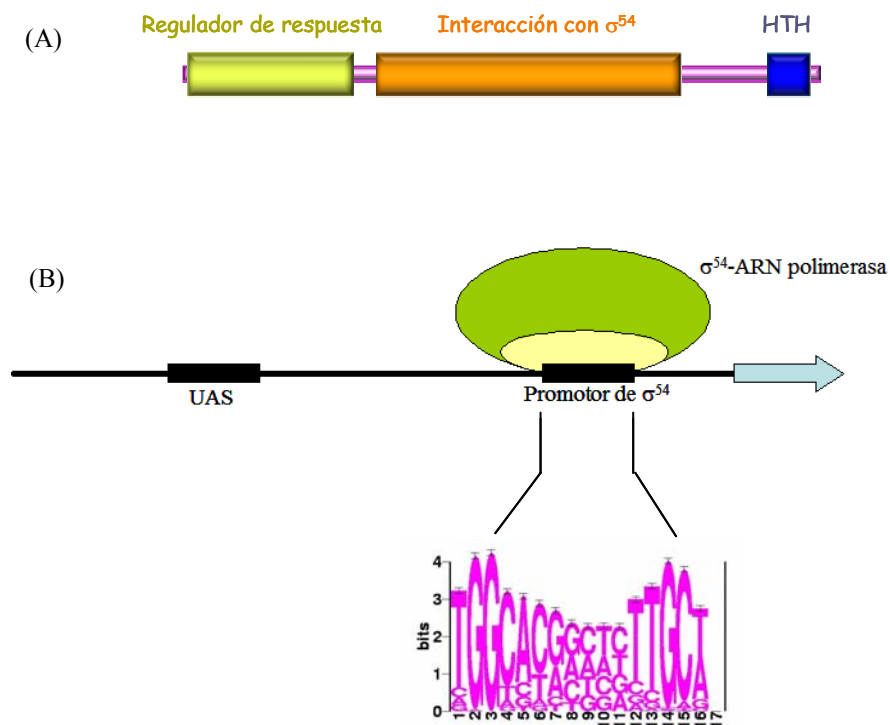
Otra subfamilia de reguladores de respuesta está representada por NarL, un factor de transcripción que tanto activa como reprime genes implicados en el metabolismo del nitrato y el nitrito. Los operones regulados por NarL también son regulados por el factor de transcripción Fnr y contienen sitios de unión a Fnr así como múltiples sitios de unión diversamente organizados del “heptámero NarL”. Se ha definido la estructura de NarL y se ha visto que sus dominios efectores están constituidos por cuatro hélices. Además, contiene un motivo hélice-giro-hélice que ha permitido postular interacciones específicas en el heptámero NarL (Baikalov *et al.*, 1996; Darwin *et al.*, 1997).

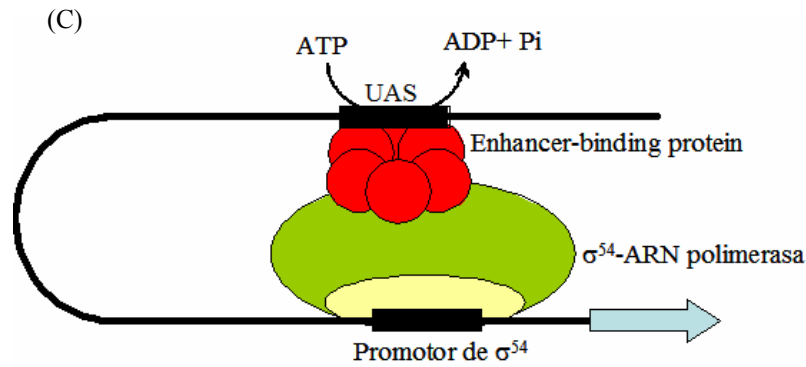
### A.IV.2.2.3. Subfamilia NtrC/DctD

La subfamilia de reguladores de respuesta más compleja estructural y, quizás funcionalmente, es la representada por la proteína reguladora del nitrógeno NtrC, un *enhancer* transcripcional que activa a la ARN polimerasa unida a  $\sigma^{54}$  (Stock *et al.*, 2000). Muchas bacterias utilizan  $\sigma^{54}$  para la transcripción de genes cuyos productos tienen diversos papeles fisiológicos, y en eso difiere de otros factores  $\sigma$  alternativos, como la fijación biológica de nitrógeno y la asimilación del mismo, el transporte de aminoácidos y enzimas degradativas, la formación del nódulo en la raíz durante la simbiosis con plantas, o la movilidad flagelar (Kustu *et al.*, 1989).  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa y al promotor de ADN diana forma lo que se llama complejo cerrado y a

diferencia de otros factores  $\sigma$ , estos complejos son transcripcionalmente inactivos debido a que el ADN permanece en forma de doble cadena (Fig. 11B). Para iniciar la transcripción con la formación del complejo abierto, es decir, el ADN localmente desnaturalizado, es necesario que  $\sigma^{54}$  interactúe con una proteína activadora (conocida también como *enhancer-binding protein*, EBP) para mediar este proceso. Estas proteínas se unen a unas secuencias localizadas a un mínimo de 80 pb del promotor conocidas como *upstream activating sequences* (UAS) o *enhancers*, e interactúan directamente con  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa para iniciar la transcripción. La interacción entre la proteína activadora unida a la UAS y  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa ocurre a través de un evento de curvatura del ADN que a menudo es facilitado por proteínas que doblan el ADN como el *integration host factor* (IHF) (Fig. 11C) (Rappas *et al.*, 2007; Wigneshweraraj *et al.*, 2008). La proteína NtrC es una de estas proteínas activadoras, un regulador de respuesta dependiente de  $\sigma^{54}$  que consta de un dominio N-terminal regulador fosforilable, un dominio central de interacción con  $\sigma^{54}$  y con capacidad para hidrolizar el ATP, y un dominio C-terminal que contiene determinantes para la oligomerización y es indispensable para la unión al ADN ya que contiene el motivo hélice-giro-hélice (HTH) (Fig. 11 A).

Bajo condiciones de limitación de nitrógeno la histidina quinasa NtrB se autofosforila y dona su residuo de fosfato a NtrC, el cual activa a la proteína para promover su oligomerización, unión al ADN y la interacción con  $\sigma^{54}$  en la ARN polimerasa. Además, la fosforilación de NtrC estimula la hidrólisis de ATP por el dominio central, proporcionando la energía necesaria para remodelar el complejo cerrado, permitir la formación del complejo abierto del ADN en los promotores diana e iniciar la transcripción de los genes necesarios para la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno en este caso (Chen y Reitzer, 1995; Mettke *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Joslin y Hendrixson, 2008).





**Figura 11.** (A) Arquitectura de dominios de los reguladores de respuesta de la subfamilia NtrC/DctD. (B) El complejo  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa unido al promotor no puede iniciar la transcripción (complejo cerrado), es necesaria (C) la interacción de  $\sigma^{54}$  con una *enhancer-binding protein* para formar el complejo abierto e iniciar la transcripción en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP.

Los 3 miembros mejor caracterizados de esta subfamilia comparten una alta homología de secuencia (40% de identidad) y son la proteína NtrC1 de *Aquifex aeolicus*, DctD de *Sinorhizobium meliloti* y NtrC de *Salmonella enterica* (Gao *et al.*, 2007).

#### A.IV.2.3. Activación por fosforilación de los reguladores de respuesta

La gran diversidad de dominios efectores plantea la cuestión de cómo un dominio regulador conservado puede funcionar para regular diferentes actividades de los dominios efectores. Tras años de investigación parece que se están aclarando algunas dudas. Los dominios reguladores de los reguladores de respuesta parecen existir entre dos estados conformacionales: uno inactivo y otro activo. La fosforilación del dominio regulador o la unión a las dianas cambia el equilibrio hacia la forma activa. Parece claro que cuando el dominio regulador se encuentra desfosforilado inhibe la actividad del dominio efector, y que la fosforilación actúa suprimiendo este efecto inhibitorio (Stock *et al.*, 2000).

El modelo de equilibrio entre los dos estados está apoyado por datos bioquímicos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, *in vitro*, la cantidad de reguladores de respuesta fosforilados se ve aumentada por la unión a las dianas, como se ha observado para el factor transcripcional OmpR en presencia de elementos específicos de reconocimiento del ADN (Ames *et al.*, 1999), y la proteína de quimiotaxis CheY en presencia de péptidos de la proteína flagelar FliM o su fosfatasa CheZ (Schuster *et al.*, 2001). La base molecular de estos efectos puede ser explicada por analogía con recientes estudios de otras enzimas en los que se observó que la catálisis ocurría sólo en una subpoblación de moléculas con una conformación compatible con la unión del sustrato. Similarmente, se esperaría que la fosforilación del dominio regulador ocurriera sólo en la subpoblación que existe en una conformación activa y que la tasa de fosforilación se correspondería directamente con la distribución del equilibrio entre los dos estados (Eisenmesser *et al.*, 2005).

Hay diferentes mecanismos para la activación de los reguladores de respuesta. En algunos casos, la activación implica la pérdida de la inhibición, como se observa en los reguladores de respuesta que pueden ser activados por la eliminación del dominio regulador N-terminal. En otros casos, el dominio regulador fosforilado desempeña un

papel activo. La fosforilación puede promover la dimerización, la oligomerización o la interacción con otras proteínas o el ADN. Algunas proteínas usan una combinación de estos mecanismos. Sin embargo, hay algunos casos en los que la fosforilación no necesariamente se corresponde con la activación. En la osmorregulación de levaduras, la proteína SSK1 fosforilada se considera el estado inactivo (Stock *et al.*, 2000).

Por tanto, la idea actual es que los dominios reguladores de los reguladores de respuesta funcionan como módulos interruptores encendido-apagado genéricos, y que los dominios pueden existir en dos estados estructurales cuyo equilibrio está modulado por la fosforilación. Esto proporciona un mecanismo muy simple y adaptable para la regulación de la actividad de los reguladores de respuesta (West y Stock, 2001).

### **A.IV.3. Regulación de los sistemas de dos componentes**

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

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

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



## **B. OBJETIVOS**



## B. OBJETIVOS

El hábitat natural de *M. xanthus* es el suelo rico en materia orgánica y material vegetal en descomposición. En estos nichos, esta bacteria se encuentra con frecuencia con altos niveles de compuestos aromáticos resultantes de la degradación de lignina y con altas concentraciones de metales procedentes de la polución industrial. Uno de estos metales es el cobre, el cual se acumula especialmente en suelos agrícolas debido a que se utiliza en la agricultura para controlar algunas enfermedades de plantas. Por otro lado, este metal es un cofactor esencial que se requiere para la actividad de una gran variedad de enzimas, sin embargo, a determinadas concentraciones es tóxico debido sobre todo a la formación de especies reactivas del oxígeno, es por ello que la homeostasis del cobre debe estar muy bien regulada.

La importancia del mantenimiento de la homeostasis del cobre se refuerza por el descubrimiento de varias familias de proteínas cuya función es controlar los niveles intracelulares de este metal (Rensing y Grass, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003). La respuesta al cobre en *M. xanthus* parece ser más compleja que en otras bacterias. Se ha demostrado que el cobre induce la acumulación de carotenoides en cultivos crecidos en oscuridad de *M. xanthus*, activando la transcripción de los genes estructurales para la síntesis de carotenoides (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005). Este trabajo también ha mostrado que el cobre induce otros mecanismos celulares desconocidos que confieren tolerancia a este metal durante el crecimiento vegetativo. Todavía no se sabe qué otros mecanismos son responsables para esta respuesta adaptativa regulada por cobre.

Con este motivo, en nuestro laboratorio hemos iniciado una línea de investigación encaminada a elucidar la respuesta global al cobre en *M. xanthus*. Este estudio de los mecanismos de resistencia y homeostasis de este metal en *M. xanthus*, contribuirá no sólo al conocimiento del ciclo de vida de esta bacteria en condiciones naturales, si no que ampliará el conocimiento de la respuesta al cobre de las comunidades bacterianas en general.

Por todo ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos encaminados a identificar genes implicados en la respuesta al cobre en *M. xanthus* y profundizar en el conocimiento de dicha respuesta en esta bacteria:

1. Estudio de la resistencia de *M. xanthus* al cobre y otros metales durante su ciclo de vida.
2. Identificación de genes implicados en la respuesta global al cobre en *M. xanthus*, centrándonos en las oxidasas multicobre.
3. Estudio del papel fisiológico de una oxidasa multicobre.
4. Caracterización de los reguladores de la oxidasa multicobre elegida.





## **C. MATERIAL Y MÉTODOS**



## C. MATERIAL Y MÉTODOS

### C.I. MATERIAL

#### C.I.1. Microorganismos

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

En el desarrollo de las distintas técnicas empleadas se utilizó la siguiente cepa de *E. coli*:

**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]*

Esta cepa ha sido empleada para realizar transformaciones y electroporaciones en *E. coli*, debido a que es deficiente en la recombinación, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos y la convierte en un hospedador adecuado para la clonación.

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

La cepa de *M. xanthus* utilizada fue la siguiente:

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

*pilQ1*

Esta cepa fue empleada como mixobacteria silvestre, al ser capaz de completar el ciclo de desarrollo con normalidad, a pesar de presentar una mutación *pilQ1* sobre los pili de tipo IV, que afecta ligeramente a la movilidad social. Esta modificación impide la agregación de la bacteria durante su cultivo en medio líquido, lo que facilita su manipulación. Todas las cepas de *M. xanthus* construidas durante este estudio derivan de ella.

### C.I.2. Medios de cultivo

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

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

Este medio está compuesto por:

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

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

La composición de este medio es la siguiente:

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

#### **C.I.2.1.1. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de *E. coli*.**

##### C.I.2.1.1.1. Antibióticos

- Kanamicina (25 µg/ml) (Sigma)

Se empleó para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico.

##### C.I.2.1.1.2. Otros compuestos

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

Este compuesto es utilizado por la enzima β-galactosidasa originando un producto azulado. Basándose en esta propiedad, fue usado para efectuar selección blanco/azul de las colonias originadas en procedimientos de transformación, en las etapas iniciales de clonación de fragmentos, por α-complementación. Esta técnica, permite diferenciar aquellas bacterias que no han incorporado el inserto a clonar (azules) de las que si lo han hecho (blancas).

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

##### C.I.2.2.1. *Crecimiento vegetativo*

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

Este medio está compuesto por:

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

C.I.2.2.2. Ciclo de desarrollo

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

La composición de este medio es la siguiente:

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

**C.I.2.2.3. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de *M. xanthus*.**

C.I.2.2.3.1. Antibióticos

- Kanamicina (80 µg/ml) (Sigma)

Se utilizó como marcador selectivo para el aislamiento de mixobacterias que tenían integrado en su cromosoma plásmidos que conferían resistencia a este antibiótico y que fueron introducidos en la bacteria *M. xanthus* mediante electroporación. La selección de bacterias resistentes a kanamicina indicando que portan una determinada construcción se debe a que la bacteria DZF1, utilizada como silvestre, es sensible a este antibiótico.

C.I.2.2.3.2. Otros compuestos

- Galactosa (10 mg/ml) (Fluka)

Se adicionó a los medios de cultivo utilizados en la obtención de mutantes de delección en fase, puesto que estas bacterias carentes del gen *diana* pierden igualmente mediante recombinación el gen *galK* que codifica para la enzima galactoquinasa, responsable de la susceptibilidad a la galactosa. De esta forma, la presencia de este azúcar en el medio inhibe el crecimiento del intermediario merodiploide por transformación de la galactosa en un análogo no metabolizable, a la vez que permite el crecimiento diferencial de las bacterias portadoras de la delección, carentes de *galK*.

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

Este compuesto es degradado por la enzima β-galactosidasa dando un producto de color azul. Basándonos en esto, el X-gal se adicionó a los medios de cultivo para determinar de manera cualitativa la actividad β-galactosidasa de las bacterias que contenían fusiones *lacZ*.

## Material y métodos

### ▪ Cobre (II) Sulfato 5-hidrato (Panreac)

Se adicionó tanto al medio CTT (líquido y sólido) como al medio CF, a diferentes concentraciones para realizar los estudios de medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa, así como los estudios de caracterización de los mutantes de delección tanto en el crecimiento vegetativo como en el ciclo de desarrollo.

## C.I.3. Tampones y soluciones

### Tampones generales: lavado y resuspensión

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

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

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

### Electroforesis de ADN

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

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

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

### Southern blot

Solución de despurinización: 0.25 N HCl

Solución de desnaturalización: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

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

Solución de neutralización (hibridación de colonias): 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M  
NaCl

SSC 20X: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico (pH 7.0)

### Hibridación con sondas marcadas con digoxigenina

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

### Detección con fosfatasa alcalina

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

Solución equilibrado I: 2X SSC, 0.1% SDS

Solución equilibrado II: 0.1X SSC, 0.1% SDS

Solución de lavado: 3% Tween 20 en tampón maleico

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

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

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

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

Tampón Z: 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 M KCl, 0.001 M  $\text{MgSO}_4$ , 0.05 M  $\beta$ -mercaptoetanol pH 7.0

### Determinación de actividad cuproso oxidasa

Tampón acetato de sodio: 100 mM acetato sódico (pH 5)

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

### C.I.4.1. Vectores

- **pKY481** (Cho y Zusman, 1999)

Vector de 8325 pb empleado para la construcción de fusiones traduccionales entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen diana cuyo perfil de expresión se desea conocer. Contiene un marcador de kanamicina que nos permite seleccionar los presuntos positivos. Tras la integración del vector en el cromosoma, la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se sitúa bajo el promotor que regula la expresión del gen diana fusionado.

- **pBJ113** (Julien *et al.*, 2000)

Vector de 5000 pb derivado de pUC118, utilizado para la obtención de mutantes de delección en fase. Este vector dispone de dos marcadores de selección procedentes del sistema KG para el aislamiento de cepas portadoras de la delección, el gen *galK* (galactoquinasa), que confiere sensibilidad a la galactosa y un gen de resistencia a kanamicina. Para llevar a cabo este proceso, en este plásmido se clonaron en fase dos fragmentos de ADN que delimitan al gen diana e incluyen los codones iniciales y finales del propio gen. A partir de este plásmido portador de la delección, fue posible eliminar fragmentos específicos de los genes diana conservando la pauta de lectura, evitando así el efecto polar de estas mutaciones.

### C.I.4.2. Oligonucleótidos

En esta sección se detallan los cebadores empleados en este trabajo de investigación. En cada caso, junto a la denominación de cada cebador se indica su secuencia en orientación 5'→3' y subrayados se señalan los nucleótidos que constituyen la diana reconocida por los enzimas de restricción empleados en la clonación de los productos de PCR. Todos los oligonucleótidos fueron proporcionados por la casa comercial Sigma-Genosys.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados para determinar la topología de la proteína CuoA.

| Nombre   | Secuencia (5'→3')            |
|----------|------------------------------|
| lcsAXhoF | GCCTCGAGCCGAGGTCACGCGCCTCGGG |
| lcsABamR | CGGGATCCATCCGAGTCGCACCCGCTC  |



**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la demostración del cluster *curA*.

| Nombre | Secuencia (5' → 3')   |
|--------|-----------------------|
| LRTC   | AAGAACTGGCCATGCACGTG  |
| RRTC   | AGCAGGGCGATGAGGTAATC  |
| CRTC   | TTGACCGTCCCTCCTGTAC   |
| FRTC   | TGGTCCTTCCCTGTGCCCTT  |
| ORTF   | TGGGACTCCTTGTGCACTC   |
| ORTR   | TGATGTGGTCCATCGCGCAG  |
| LRTF   | TACCCTGAAGACACCCCGTC  |
| LRTR   | TCAATCTGGCCACTCGCGTC  |
| HRTF   | AACTTCGAGGAGCACGCGAG  |
| HRTR   | GAGACGACTTCCTCCACCAG  |
| RRTF   | TGTCCGTTCAAGGTGAAGCTC |
| CRTF   | ACCTCAACATGTTACGCTG   |

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

| Nombre         | Secuencia (5' → 3')            | Aplicación   |
|----------------|--------------------------------|--|
| lcsABamA       | TTGGGATCCATGAAGCCTCTTCACGAATG  | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CuoA (MXAN3420)                  |
| lcsAKpn        | CAGGGTACCGGCCATGAACGGCACTTAC   |  |
| CusSlacZKpnF   | CGGGTACCCTGGACTTACCGTTCCCG     | Fusión <i>lacZ</i> del sistema CorSR (MXAN3419-MXAN3418)           |
| CusSlacZBamR   | TTGGATCCACGACATCCCCTGGCGAACG   |  |
| tpsXhoF        | CCCTCGAGCCCCCTGCACTGGGCCAAC    | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína S (MXAN5430)                     |
| tpsBamR        | TGGGATCCATTGCAGTGCTCCTCCGTTG   |  |
| FruALacZXhoF   | GACCTCGAGCACCGTCCAGTACAGCCACTG | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína FruA (MXAN3117)                  |
| FruALacZBamR   | GTTGGATCCATGCGAAGGCCCCAGCCGT   |  |
| MrpCLacZKpnF   | CGAGGTACCCTACCAACGCCTCAAGGTCAT | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína MrpC (MXAN5125)                  |
| MrpCLacZBamR   | AAAGGATCCATGGCATAACTCCTGGGAAGG |  |
| ATPasa3415Kpn  | GAGGGTACCGCGCTGGCCACGAAAATGAT  | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CopA (MXAN3415)                  |
| ATPasa3415BamI | CCTGGGGATCCACGAACATG           |  |
| ATPasa3422Kpn  | CGAGGTACCTGATGTGGTCCATCGCGCAG  | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CopB (MXAN3422)                  |
| ATPasa3422BamI | ACGGGATCCATGGGGCTTCCTCCTGCC    |  |
| ATPasa979Kpn   | CCGGGTACCAGGCAGTACGCCAGCTTCC   | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CopC (MXAN0979)                  |
| ATPasa979BamI  | TGTGGATCCATGGCGCTTCGAGGCTCCT   |  |
| cus985Kpn      | CTGGTACCTGACGACAAGCGCGCTGGC    | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Cus1 (MXAN0983, MXAN0984, MXAN0985) |
| cus985BamI     | GAGGATCCACGGCGATGACCTCGCGAA    |  |
| cus988Kpn      | CGGGTACCACGACGTCGCCATGAGCACC   | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Cus2 (MXAN0988, MXAN0989, MXAN0990) |
| cus988BamI     | GGGGATCCATGACTTCTGCTCCAGATG    |  |
| cus6176Kpn     | TCGGTACCAAAGAATCTGAACAAACGC    | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Cus3 (MXAN6176, MXAN6177, MXAN6178) |
| cus6176BamI    | ACGGATCCACGACATCTCCTTGATGAT    |  |
| czc3447Kpn     | GGGGTACCTTGTTCCTGCTCTACTGTC    | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Czc1 (MXAN3447, MXAN3448, MXAN3449) |
| czc3447BamI    | GGGGATCCTGCCGCGCACCTAGGGA      |  |
| czc3671Kpn     | GGGGTACCTGATACGGAACCCTCAC      | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Czc2 (MXAN3672, MXAN3671)           |
| czc3671BamI    | AGGGATCCATCTACTTCACGCCCTTCT    |  |
| czc7436Kpn     | CGGGTACCATGCCGTTGAAGGCGTG      | Fusión <i>lacZ</i> del sistema Czc3 (MXAN7438, MXAN7437, MXAN7436) |
| czc7436BamI    | TCGGATCCATGCCCCAGCCCCTGGGCA    |  |
| lcsBKpn        | CGCGGTACCCCGTGGCCGAAGCCGAGAAC  | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CuoB (MXAN3425)                  |
| lcsBBamA       | CTGGGATCCATGGTGGTGTGTCTCTCA    |  |
| lcsCK          | CTGGTACCTTCGGGCGCGTGGACGTGG    | Fusión <i>lacZ</i> de la proteína CuoC (MXAN3432)                  |
| lcsCNB2        | TGGGATCCATGCTCCGCGGTCAGCG      |  |

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

| Nombre         | Secuencia (5'→ 3')              | Aplicación   |
|----------------|---------------------------------|--|
| lcsBam2        | CAGGGATCCCGATGCATGAAGCCTCTTCACG | Amplificación de un fragmento 5' respecto a CuoA (MXAN3420)  |
| lacEco         | GTGGAATTCATGAACGGCACTTCACGGCTC  |  |
| lacPst         | CGGCTGCAGGGCCTCCAGCAGTGAAACCG   | Amplificación de un fragmento 3' respecto a CuoA (MXAN3420)  |
| lacBam2        | TGGGGATCCATGCGGAGGGTTCCAG       |  |
| HKLcsABamF     | CCCGGATCCAACGCTGGTGGTGTCTGGAG   | Amplificación de un fragmento 5' respecto a CorS (MXAN3419)  |
| HKLcsAPstR2    | GACTGCAGGGGCCTCGTGGATCTCCGCC    |  |
| RRLcsAPstF     | TCCCTGCAGTCTCAAGCGCTTTGGCCTG    | Amplificación de un fragmento 3' respecto a CorR (MXAN3418)  |
| RRLcsAHinR     | TTGAAGCTTTTCGTTGTCCACGTACATGAG  |  |
| carBKpnI       | CCTGGTACCCACGCTCCAGCAAACCTTGG   | Amplificación de un fragmento 5' respecto al operón <i>carB</i>  |
| carBBamHI1     | GTGGGATCCATGCTTCTTTCTCCGAAGA    |  |
| carBBamHI2     | TGTGGATCCACCCGGGGGCCGAATGATAC   | Amplificación de un fragmento 3' respecto al operón <i>carB</i>  |
| carBHindIII    | GGCAAGCTTTCGCCGCGTGAATCACGACG   |  |
| HKMut1KpnF     | CTGGTACCGCTGGTGGTGTCTGGAGAGG    | Amplificación de un fragmento 5' para la construcción de los mutantes $\Delta corS1$ , $\Delta corS4$ y $\Delta corS5$ |
| HKMut1BamR     | AGGGATCCGTGGATCTCCGCCATGCCCT    |  |
| HKMut1BamF2    | AGCGGATCCAGCACGCCAGCTTCCAGTG    | Amplificación de un fragmento 3' para la construcción de los mutantes $\Delta corS1$ , $\Delta corS3$ y $\Delta corS6$ |
| HKMut1HinR     | GGGAAGCTTCCTGCGACACCGCCAACCCC   |  |
| HKMut2KpnF     | CGGGTACCGCAACCCGCGGAGACCTTTC    | Amplificación de un fragmento 5' para la construcción de los mutantes $\Delta corS2$ y $\Delta corS3$                  |
| HKMut2BamR     | GCGGATCCTGCGTAGAGGTCTCGCACCG    |  |
| HKMut2BamF2    | CGCGGATCCGGCAACTTCGAGGAGCACGC   | Amplificación de un fragmento 3' para la construcción de los mutantes $\Delta corS2$ y $\Delta corS4$                  |
| HKMut2HinR     | TGCAAGCTTGTGTTGGTGGTGAAGAAGGGC  |  |
| HKMut5BamF     | TACGGATCCAGGCGCACACCGTCATCCT    | Amplificación de un fragmento 3' para la construcción del mutante $\Delta corS5$                                       |
| HKMut5HinR     | GCTAAGCTTTCGCCCCGGGACCTGGAGG    |  |
| HKMut6KpnF     | GGTGGTACCGGCGATGTTCCCGCAGGACG   | Amplificación de un fragmento 5' para la construcción del mutante $\Delta corS6$                                       |
| HKMut6BamR     | GTTGGATCCGGCGCGCTCGTAGTGCAGG    |  |
| MutUAS3421KpnF | CGCGGTACCCGCCTCGAAGTAGATGGGGG   | Amplificación de un fragmento 5' respecto a UAS1   |
| MutUAS3421BamR | ACGGGATCCGGTGGAACGTGGAGCAGCGT   |  |
| MutUAS3421BamF | ACGGGATCCGCGAAACCCATCCGGGTACT   | Amplificación de un fragmento 3' respecto a UAS1   |
| MutUAS3421HinR | AGTAAGCTTAGCATTGCGAGGAGGGCAAC   |  |
| MutUAS3419KpnF | CCGGGTACCGGGTGC GACTGCGGATGGTC  | Amplificación de un fragmento 5' respecto a UAS2   |
| MutUAS3419BamR | TGGGGATCCTGTAATGGGCCGGGGGCTCG   |  |
| MutUAS3419BamF | TGGGGATCCCCGGCCCTTTTCTCGCAACG   | Amplificación de un fragmento 3' respecto a UAS2   |
| MutUAS3419HinR | CGGAAGCTTGCGATGCGAGTCATGAGGTC   |  |
| Mut3417KpnF    | CTGGGTACCTAGAGACCAAGGCCGGTCTC   | Amplificación de un fragmento 5' respecto a MXAN3417   |
| Mut3417BamR    | ATGGGATCCATTTTCGACGGTCTTTTCGG   |  |
| Mut3417BamF    | CCGGGATCCCTGACCCATCTCGAGGTACG   | Amplificación de un fragmento 3' respecto a MXAN3417   |
| Mut3417HinR    | CGGAAGCTTGCCGCCTCCAGTCGTGAATG   |  |
| Mut3414KpnF    | TCCGGTACCAGACGCACGGCTTCAAGTC    | Amplificación de un fragmento 5' respecto a MXAN3414   |
| Mut3414BamR    | CGCGGATCCACGGGGTATTCTCCTCTTG    |  |
| Mut3414BamF    | CGAGGATCCGTAGCCGTCACATGTGAAAG   | Amplificación de un fragmento 3' respecto a MXAN3414   |
| Mut3414HinR    | TGCAAGCTTAATGGGTGGAGGCGGTGAAT   |  |

### C.I.4.3. Reactivos

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

## Material y métodos

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

**Amersham Pharmacia Biotech:** Membrana de nylon *Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>* para la transferencia de ADN (Southern blot).

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

**Bio-Rad:** *Bio-Rad Protein Assay*, para determinar la concentración de proteínas.

**Biosinth AG:** X-gal.

**Invitrogen:** *Superscript<sup>TM</sup> II RNaseH Reverse transcriptase*

**Millipore:** Filtros VSWP02500 para diálisis de muestras y filtros Millex-HA de 0.45 µm para la filtración de soluciones.

**Panreac:** Cobre (II) Sulfato 5-hidrato

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

**Roche Molecular Biochemicals:** Endonucleasas de restricción, seroalbúmina bovina, 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*.

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

**Serva:** Agarosa, acrilamida y Bis-acrilamida.

**Sigma (Molecular Biology Reagents):** TEMED, persulfato amónico, bolas de vidrio para la sonicación de muestras, así como la mayoría de los reactivos utilizados en la preparación de las distintas soluciones y tampones.

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

### C.I.4.4. Instrumentación

#### Para incubaciones de los cultivos

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

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

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

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

Para electroforesis

**Bio-Rad:** Fuente de alimentación *Power Pac 300*.

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

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

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

**Sigma:** Cubetas para electroforesis vertical.

Centrífugas

**Beckman:** Centrífuga refrigerada *Avanti<sup>TM</sup> 30*, rotores F0850 y F3602.

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

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

Para electroporación

**Bio-Rad:** Cubetas *Gene Pulser<sup>®</sup> Cuvette E. coli Pulser<sup>®</sup> Cuvette*, 2mm gap y de 1 mm y sistema de electroporación *Gene Pulser Xcell<sup>TM</sup> 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:** transiluminador con tratamiento de imágenes *Gel Doc XR System* y termociclador *MJ MINI Personal Thermal Cycler*.

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

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

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

**Misonix Inc.:** sonicador *Microson<sup>TM</sup> Ultrasonic Homogenizer XL2007*.

**Olympus:** cámara fotográfica digital *Camedia C-5060*

**Perkin Elmer:** espectrofotómetro de absorción atómica *5100ZL*

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

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

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

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

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

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

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

**Wild Heerbrugg:** lupa *M8*.

**Zeiss:** microscopio electrónico de transmisión *TEM902* y microscopio electrónico de barrido *DSM950*.

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

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

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

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

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

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

**Molbiol-tools:** para la búsqueda de posibles promotores reconocidos por  $\sigma^{54}$ .  
(<http://molbiol-tools.ca/promscan/>)

**NPS@ (Network Protein Sequence Analysis):** Desarrollo de alineamientos frente a otras proteínas (Clustalw).  
([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align\\_clustalw.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl))

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

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

**RSAT:** para la búsqueda de posibles operones.  
(<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>)

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

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

## C.II. MÉTODOS

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

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

En el caso de los cultivos líquidos se utilizó medio LB en el que se inoculó una única colonia aislada en medio sólido para asegurar el crecimiento de una población homogénea. Los tubos se incubaron a 37°C y a 150-200 rpm de agitación. En ocasiones, junto al LB también se utilizó el medio SOC para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia a los antibióticos conferidos por los plásmidos introducidos mediante electroporación o transformación. En el caso en el que los cultivos fueron sólidos se utilizó medio LB al que se le adicionó un 1.5% de Bacto-Agar. Y cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con kanamicina, así como con X-gal.

##### *Conservación*

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

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

##### Crecimiento vegetativo

El cultivo de *M. xanthus* se realizó a 30°C en CTT líquido en agitación a 300 rpm. Para el cultivo de las bacterias portadoras de fusiones *lacZ* de *E. coli* dicho medio se suplementó con kanamicina a una concentración final de 40 µg/ml. En la realización de las curvas de crecimiento para el estudio del fenotipo durante el crecimiento vegetativo se adicionaron concentraciones crecientes de sulfato de cobre.

El cultivo de *M. xanthus* también se realizó en medio CTT sólido al que se le adicionó Bacto-Agar al 1.5% para el crecimiento vegetativo de las bacterias así como para obtener extractos celulares para las medidas de actividad β-galactosidasa a partir de medio sólido. Cuando fue necesario, se suplementó con diferentes concentraciones de sulfato de cobre.

##### Ciclo de desarrollo

Para que el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* tuviera lugar se utilizó el medio de cultivo CF. Este medio presenta una pequeña cantidad de nutrientes que permite varias etapas de división celular antes de que se desencadene el ciclo de desarrollo.

Este medio, siempre sólido, se utilizó para cultivar las células que luego se recogerían en extractos para realizar medidas de actividad β-galactosidasa, y también para realizar los estudios del fenotipo de las bacterias durante el ciclo de desarrollo. Para ello, la bacteria se inoculó concentrada a una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 15 en gotas de 10-20 µl de volumen sobre la superficie de este medio y las placas se

## Material y métodos

incubaron a 30°C en una estufa. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con diferentes concentraciones de sulfato de cobre.

### Conservación

Para conservar las células de *M. xanthus* se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivo líquido a las que se les adicionó un 25% (p/v) de glicerol, y se mantuvieron a -80°C.

## C.II.2. Preparación de muestras para microscopía

### C.II.2.1. Microscopía óptica

Para estudiar el fenotipo de las bacterias se prepararon las muestras de la siguiente manera: la cepa a estudiar se creció en medio CTT líquido a 30°C y 300 rpm hasta que la DO<sub>600</sub> fue de 1 aproximadamente. En ese momento se recogieron las células por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 10.000xg. Seguidamente se resuspendieron en tampón TM (ver apartado C.I.3.) para que la DO<sub>600</sub> fuera de 15. De esa muestra se depositó una gota de 10 µl en el centro de una placa de Petri de 5.5 cm de diámetro que contenía 8 ml de medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre y sin cobre. Las placas se incubaron a 30°C y se fotografiaron utilizando la cámara digital Olympus (*Camedia C-5060*) acoplada a la lupa M8 de Wild Heerbrugg, a 18x de aumentos.

### C.II.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Al igual que en el caso de la microscopía óptica, las bacterias a observar se concentraron a una DO<sub>600</sub> de 15. De esa muestra se tomaron 200 µl y se repartieron en 10 gotas por placa en placas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían 20 ml de medio CTT o CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre y sin cobre. Se incubaron a 30°C hasta las 72 h.

Las posteriores etapas de tratamiento se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las muestras se observaron, en el mismo centro, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El tratamiento empleado fue similar al que utilizaron Mueller y Dworkin (1991), aunque con ligeras modificaciones.

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

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

### **C.II.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para la observación de las muestras con el microscopio electrónico de barrido (SEM), dichas muestras se concentraron a una  $DO_{600}$  de 15 como se ha mencionado en el apartado C.II.2.1. De esa muestra concentrada se tomaron 200  $\mu$ l y se repartieron en 10 gotas por placa en placas que contenían 20 ml de medio CTT o CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre y sin cobre. Dichas placas se incubaron a 30°C hasta las 72 h.

Al igual que en el caso del TEM, las posteriores etapas de tratamiento se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las muestras se observaron, en el mismo centro, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron postfijadas con tetróxido de osmio en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior y se deshidrataron en gradientes crecientes de etanol. En la siguiente etapa, las muestras fueron secadas hasta un punto crítico y cubiertas con oro.

Las fotografías fueron tomadas utilizando el microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM950.

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

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

#### *C.II.3.1.1. De E. coli*

El método empleado fue el del  $CaCl_2$ , que tiene la capacidad de hacer permeables las paredes celulares posibilitando que el ADN presente pueda atravesarlas con facilidad. Para la obtención de células competentes se partió de un cultivo en medio líquido LB de *E. coli* con una  $DO_{600}$  entre 0.5 y 1. Dicho cultivo se traspasó a un tubo estéril y fue enfriado en hielo durante 10 min. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación a 4°C y 4000 rpm durante 10 min. Tras desechar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en un volumen de 10 mM  $MgSO_4$  previamente enfriado y se mantuvieron en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, las células fueron recogidas en las mismas condiciones anteriores y resuspendidas en 0.5 volúmenes de 50 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) previamente enfriado, e incubadas en hielo durante 15 min. Posteriormente, las células se volvieron a recoger en las mismas condiciones anteriores y se resuspendieron en 0.05 volúmenes de 50 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20% glicerol. Finalmente, las células competentes obtenidas se repartieron en alícuotas de 100  $\mu$ l que se conservaron a -80°C hasta su utilización.



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

#### C.II.3.2.1. De *E. coli*

Se partió de un cultivo en medio líquido LB de *E. coli* con una  $DO_{600}$  entre 0.5 y 1. Las células de dicho cultivo fueron recogidas mediante centrifugación a 4000xg durante 15 min a 4°C y lavadas en 1 volumen de agua destilada estéril a 4°C. A continuación, las células se recogieron en las mismas condiciones anteriores y se lavaron dos veces con 0.5 volúmenes de agua destilada estéril a 4°C y una vez más con 0.02 volúmenes de agua destilada fría. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 0.002-0.003 volúmenes de glicerol estéril en frío al 10% (p/v) y repartidas en alícuotas de 40  $\mu$ l que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

#### C.II.3.2.2. De *M. xanthus*

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

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

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

##### C.II.4.1.1. Transformación por el método del choque térmico

Este método (Hanahan, 1983) se utilizó para transformar *E. coli* con plásmidos que presentan un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibiótico. Para ello, se mezclaron 45  $\mu$ l de células competentes de *E. coli* tratadas con  $CaCl_2$ , con 1-10 ng de plásmido y se mantuvieron en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico manteniéndolas durante 2 min en un baño a 42°C. Después, se recuperaron en 0.4 ml de SOC o LB sin antibiótico durante 1 h a 200 rpm de agitación, para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia al antibiótico conferido por el plásmido. Finalmente, las células fueron sembradas en medio LB sólido o líquido suplementado con el antibiótico para el cual el plásmido confiere resistencia.

##### C.II.4.1.2. Electroporación

Para llevar a cabo esta técnica, se mezclaron 40  $\mu$ l de células electrocompetentes de *E. coli* con 1  $\mu$ g de ADN plasmídico dializado durante 30 min en un filtro Millipore VSWP02500 de 0.025  $\mu$ m de tamaño de poro. La mezcla obtenida se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de ancho, previamente enfriada en hielo. Las condiciones de electroporación fueron 2.5 kV; 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ Fd, con una longitud de pulso de 5-6 ms. Tras el choque eléctrico, las células fueron recuperadas rápidamente en

1 ml de SOC o LB sin antibiótico e incubadas durante 1 h a 37°C y 200 rpm de agitación para recuperar su actividad metabólica. Finalmente, las células transformadas fueron sembradas en LB sólido suplementado con kanamicina.

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

##### **C.II.4.2.1. Electroporación**

Para la introducción de plásmidos en *M. xanthus* se siguió el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell (1995). A las células electrocompetentes de *M. xanthus* se les adicionó 1 µg del ADN que se quería electroporar, previamente dializado durante 30 min en un filtro *Millipore* VSWP02500. Dicha mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 1 mm de ancho. Las células fueron electroporadas bajo las siguientes condiciones de pulso eléctrico: 0.65 kV; 400 Ω; 12.25 kV/cm; 25 µFd, con una longitud de pulso de 8.6-9.5 ms. Rápidamente, las células fueron recuperadas en 1 ml de CTT líquido sin antibiótico. A continuación, fueron transferidas a un tubo de vidrio estéril que contenía 1.5 ml de CTT sin antibiótico, de manera que los 2.5 ml resultantes se incubaron de 6 a 8 h a 30°C y 300 rpm de agitación para permitir la expresión del marcador que se iba a seleccionar. Finalmente, alícuotas de distintos volúmenes fueron mezcladas con 4.5 ml de agar CTT blando (0.8% Bacto-Agar) y sembradas en CTT sólido con kanamicina. Estas placas fueron incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias (5-7 días).

#### **C.II.5. Manipulación de ADN**

##### **C.II.5.1. Extracción de ADN**

###### **C.II.5.1.1. ADN cromosómico de *M. xanthus***

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

###### **C.II.5.1.2. ADN plasmídico de *E. coli***

Para el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*, se siguió el procedimiento propuesto por el kit de purificación de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche. En este proceso se recogieron las células crecidas en medio LB sólido o en 5 ml de LB líquido suplementados con el antibiótico adecuado, y se lisaron en un medio fuertemente alcalino para desnaturalizar el ADN genómico sin afectar al plásmido, neutralizando el medio al transcurrir 5 min. El material genético cromosómico precipitó y se eliminó al sedimentar por centrifugación, mientras que el ADN plasmídico permaneció en suspensión. Finalmente, el plásmido se purificó en un filtro con una

matriz capaz de retenerlo y se recuperó tras proceder a su elución en condiciones adecuadas.

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

#### **C.II.5.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Este método, descrito por Saiki *et al.* (1988), permite la producción de un elevado número de copias de una secuencia concreta, generadas por una ADN polimerasa termoestable a partir de un par de cebadores que flanquean la región de ADN molde a amplificar.

La reacción de síntesis, que presentaba un volumen final de 100  $\mu$ l, estaba compuesta de 15-30 ng de ADN molde cromosómico o plasmídico, 100 pmoles de cada cebador, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs (dNATP, dCTP, dGTP y dTTP), 10  $\mu$ l de tampón *Taq* polimerasa 10X, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10% de DMSO y 2.5 unidades de *Taq* polimerasa. La mezcla se completó con agua Milli Q<sup>®</sup> hasta un volumen de 100  $\mu$ l.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *MJ Mini* de Bio-Rad, y en general las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 10 min, 30 ciclos compuestos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, anillamiento a una temperatura adecuada en función de la T<sub>m</sub> de cada oligonucleótido durante 1 min y elongación a 72°C durante 2 min. Y finalmente la reacción concluyó con un ciclo de elongación a 72°C durante 15 min.

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

#### **C.II.5.2.2. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción**

La digestión del ADN con una única enzima de restricción se realizó mediante una reacción que incorpora 5-10 unidades de endonucleasa por cada microgramo de ADN que se quiere digerir, en el tampón adecuado para la enzima, suministrado por la casa comercial, al igual que en el caso de digestiones con dos enzimas que presentaban su actividad más eficiente en el mismo tampón. En cambio, cuando el ADN fue digerido con dos enzimas con tampones óptimos de reacción diferentes se utilizó el tampón que resultaba compatible para la actividad endonucleasa de ambas enzimas. Cuando esa compatibilidad no fue posible, se digirió de forma secuencial con cada enzima procediendo a precipitar el material genético entre ambas digestiones. Tanto las temperaturas como los tiempos de incubación empleados para las reacciones de digestión fueron los indicados por la casa comercial.

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

La reacción de ligación de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos es llevada a cabo por la enzima ADN ligasa procedente del bacteriófago T4, suministrada por Roche. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de ADN de cadena doble. Esos enlaces se pueden establecer entre extremos cohesivos o bien entre extremos romos. La reacción de ligación incorpora 20

ng de vector junto con 40 ng del fragmento a clonar, siguiendo una relación molar 1:2 para favorecer los choques intermoleculares entre ambos sustratos, en un volumen de 20 µl que contenía el tampón ligasa, suministrado por la casa comercial, y que contiene  $Mg^{2+}$  y ATP necesarios para la actividad de la enzima. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 5 min y posteriormente se enfrió en hielo durante 10 min. A continuación, se añadió 1 unidad de la enzima ADN ligasa a dicha mezcla y se incubó durante una noche a 16°C. Transcurrido ese tiempo, la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* competentes o electrocompetentes sembradas en un medio selectivo con el antibiótico correspondiente. Los transformantes positivos fueron seleccionados mediante aislamiento y análisis de restricción del plásmido purificado. En los casos en los que resultó necesario, se procedió a la transferencia de colonias de células transformadas a filtros de nylon y posterior hibridación con sondas específicas para la identificación de presuntos positivos.

#### C.II.5.2.4. Secuenciación automática de ADN

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

En cada reacción de secuenciación se utilizaron de 300 a 600 ng de ADN puro como molde y de 1.6 a 3.2 picomoles de oligonucleótido en un volumen final de 6 µl. La polimerasa empleada fue *AmpliTaq*<sup>®</sup> FS y los terminadores marcados con fluorescencia *BigDye*<sup>™</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.

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

La separación de fragmentos de ADN en función de su peso molecular se ha conseguido mediante la aplicación de una técnica electroforética basada en la migración diferencial de estas moléculas durante el desplazamiento a través de una matriz polimérica por la acción de un campo eléctrico.

##### C.II.5.3.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa ha sido utilizada para la separación de fragmentos de ADN con un tamaño comprendido entre 0.5 kb y 25 kb.

Para efectuar la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 0.7% en tampón 1XTAE (C.I.3.), desarrollando la electroforesis horizontal en el mismo tampón.

Cuando las electroforesis se realizaron con el objetivo de comprobar los fragmentos obtenidos como producto de digestiones con enzimas de restricción, marcaje de sondas, reacciones de PCR, extracciones de ADN plasmídico o extracciones de ADN genómico se realizaron a un voltaje de 100 V durante 25-30 minutos utilizando el

## Material y métodos

sistema ultracompacto de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup> de Cosmo Bio Co. Ltd. En cambio, cuando la electroforesis se efectuó para recuperar ADN de los geles de agarosa o para analizar el ADN cromosómico mediante Southern blot se empleó la cubeta de electroforesis *Gel-o-Submarine Electrophoresis Systems* de Jordan Scientific Co., junto con la fuente de alimentación *Electrophoresis Power Supply (EPS) 600* de Pharmacia, desarrollando la electroforesis durante la noche a 20 V. En todos los casos, el marcador de peso molecular utilizado fue el ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII (Molecular Weight Marker II* de Roche).

Una vez desarrollada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$  en 1XTAE) durante 10 min. Este compuesto se intercala entre las hebras de ADN y posibilita la observación de los diferentes fragmentos cuando el gel es expuesto a luz ultravioleta.

### C.II.5.3.2. Electroforesis de ADN en geles de acrilamida

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

| COMPONENTES                           | VOLÚMENES<br>(ml) |
|---------------------------------------|-------------------|
| Acrilamida 29:1                       | 8.30              |
| H <sub>2</sub> O Milli Q <sup>®</sup> | 36.28             |
| 0.5XTBE                               | 5.00              |
| 10% Persulfato amónico                | 0.40              |
| TEMED                                 | 0.02              |
| <b>Volumen final</b>                  | <b>50 ml</b>      |

Tras su polimerización, el gel fue transferido a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón 0.5XTBE (C.I.3.) y la electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100 V durante 30-60 min. Los fragmentos separados en la electroforesis se observaron con luz ultravioleta tras teñir el gel con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$  en 1XTAE). El marcador de peso molecular utilizado fue una mezcla de ADN del plásmido pUCBM21 digerido con *HpaII* y del ADN del plásmido pUCBM21 digerido con *DraI* y *HindII (Molecular Weight Marker VIII* de Roche).

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

El aislamiento de fragmentos de ADN puros de más de 0.5 kb a partir de una mezcla de fragmentos obtenida como producto de digestiones con enzimas de restricción o de PCRs inespecíficas, se llevó a cabo utilizando la técnica de electroelución. Para ello, la muestra fue cargada en un gel preparativo de agarosa que se corrió a voltaje constante durante toda la noche. La separación de los diferentes fragmentos presentes fue verificada mediante la breve tinción del gel con bromuro de etidio y su posterior observación a la luz ultravioleta. A continuación, se cortó la porción de gel que contenía el fragmento de ADN de interés y se introdujo en una membrana de diálisis (previamente tratada y conservada en frío en etanol al 50%)

lavada con agua Milli Q<sup>®</sup>, cerrada en uno de sus extremos con una pinza de diálisis y llenada con tampón 0.5XTBE (C.I.3.). Tras introducir el fragmento de gel, se eliminó el exceso de tampón de la membrana, evitando que quedasen retenidas burbujas de aire, y se colocó otra pinza de diálisis en el extremo opuesto de la membrana de diálisis.

La membrana se introdujo en un tanque de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup> llenado con tampón 0.5XTBE y se electroeluyó en oscuridad durante 1 h a un voltaje constante de 100 V. A continuación, se extrajo todo el volumen de tampón de la membrana de diálisis y se pasó a un tubo eppendorf. El volumen se repartió en dos tubos cuando fue superior a 400 µl. Posteriormente, la muestra fue purificada con el kit *High Pure*<sup>™</sup> *PCR Product Purification Kit* de Roche y su concentración fue comprobada en un gel de agarosa.

## C.II.6. Manipulación de ARN

### C.II.6.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN de *M. xanthus* se utilizó el Kit *High Pure RNA Isolation Kit* de Roche. Puesto que este kit está diseñado para el tratamiento de  $1 \times 10^9$  células bacterianas, la toma de muestras se adaptó para obtener un número de células en torno al indicado. Una vez obtenida la muestra, ésta fue tratada siguiendo las indicaciones del kit consistentes en una lisis en un medio fuertemente desnaturante en presencia de sales de guanidinio y Tritón X-100. Finalmente, el ARN celular se purificó mediante un filtro que contenía una matriz capaz de unir el ARN de forma selectiva, y se eluyó en un volumen de 50 µl con agua libre de ARNasas.

Para asegurarnos de que el ARN obtenido no contenía restos de ADN cromosómico bacteriano se utilizó el kit *DNA-free*<sup>™</sup> de Ambion. Para ello se adicionaron 0.1 volúmenes del tampón 10X *DNase I*, 2 unidades de *DNase I* y se incubó a 37°C durante 20-30 min. A continuación, se adicionaron 0.1 volúmenes de *DNase Inactivation Reagent* y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 10000xg durante 1 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

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

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

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

## Material y métodos

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó el kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* de Invitrogen, donde se mezclaron 5 µg de ARN purificado, con 2 pmol del cebador reverso y 0.5 mM de cada uno de los dNTPs hasta un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 min y se enfrió otros 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se añadió el tampón de la enzima 1X y 10 mM de DTT, y se volvió a calentar a 42°C durante 2 min. Finalmente, se incorporaron 200 unidades de la enzima *SuperScript II RNasa H Reverse Transcriptase* y se incubó la reacción a 42°C durante 50 min. Una vez obtenido el ADNc, la enzima se inactivó por calentamiento de la muestra a 70°C durante 15 min. Posteriormente, la amplificación por PCR se llevó a cabo empleando los cebadores adecuados a partir de 2 µl de ADNc molde, procedente de la reacción de reversotranscripción, siguiendo el protocolo descrito en la sección C.II.5.2.1.

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

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

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

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

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

Previamente al marcaje, la concentración de la sonda se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

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

## 1) Transferencia de ADN a membranas de nylon

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

### 1.1) Transferencia de ADN a partir de colonias bacterianas (hibridación de colonias).

Esta técnica se aplicó para analizar un gran número de colonias de *E. coli* resultante de una reacción de transformación o electroporación de una mezcla ligada cuando se trataba de clonar algún fragmento. Para ello, las colonias fueron picadas sobre una membrana cuadrículada de nylon situada en una placa Petri que contenía medio LB con el antibiótico adecuado. En paralelo, y manteniendo el mismo orden, las colonias también fueron picadas sobre otra placa Petri con el mismo medio utilizada como placa madre. Tras incubar las placas a 37°C durante una noche, las placas madre fueron guardadas a 4°C, mientras que los filtros fueron tratados.

En la primera etapa, los filtros fueron colocados, con las células hacia arriba, sobre papel Whatman 3MM humedecido en solución de desnaturalización de ADN (C.I.3.) para llevar a cabo la lisis celular así como la separación de las cadenas de ADN. Esta incubación, prolongada durante 3 min, se realizó a temperatura ambiente. Tras repetir el procedimiento una segunda vez, los filtros fueron transferidos sobre papel Whatman 3MM humedecido en solución de neutralización para hibridación de colonias (C.I.3.) e incubados durante 5 min a temperatura ambiente. Este paso de desnaturalización también fue repetido una segunda vez antes de enjuagar el filtro en 2XSSC (C.I.3.). A continuación, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente para, seguidamente, fijar el ADN a la membrana incubándola a 80°C durante 2 h. Posteriormente, la membrana fue sometida a prehibridación e hibridación.

### 1.2) Transferencia de ADN a partir de un gel de agarosa: Southern blot

El Southern blot se realizó siguiendo la técnica descrita por Southern (1975) basada en la transferencia de ADN desnaturalizado desde un gel de agarosa a una membrana de nylon. Para ello, el ADN cromosómico que se quería analizar fue digerido con la endonucleasa de restricción adecuada y cargado en un gel preparativo de agarosa al 0.7% que se corrió a voltaje constante durante toda la noche. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio. Una vez teñido, se fotografió junto a una regla para identificar posteriormente el tamaño de las bandas aparecidas. A continuación, el gel fue sometido a una serie de tratamientos en los que los fragmentos de material genético a transferir fueron desnaturalizados en el propio gel para que, al alcanzar la membrana, se encontraran accesibles a la sonda en forma monocatenaria. Dichos tratamientos fueron realizados a temperatura ambiente y en agitación.

En primer lugar el gel se sumergió 3 min en 200 ml de solución de depurización (C.I.3.), fragmentando el ADN. Seguidamente, el gel fue enjuagado dos veces en agua destilada antes de pasar a ser incubado en 200 ml de solución de desnaturalización (C.I.3.) durante 15 min, dando lugar a una ruptura alcalina de la doble hélice, originando dos cadenas de ADN monocatenarias. Tras eliminar esta



solución, el gel fue mantenido nuevamente durante 15 min en otros 200 ml de solución de desnaturalización. Posteriormente, el gel fue enjuagado una vez en agua destilada para después ser incubado en 200 ml de solución de neutralización (C.I.3.) durante 30 min para recuperar el pH de forma rápida impidiendo la renaturalización del ADN. Finalmente, el gel fue enjuagado una vez en agua destilada e incubado en 2XSSC (C.I.3.) antes de iniciar la transferencia a la membrana.

La transferencia del ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nylon se realizó por capilaridad. Para efectuar la transferencia, se preparó una bandeja que contenía 20XSSC (C.I.3.). Sobre ella se colocó una placa de cristal en la que descansaban tres piezas de papel de Whatman 3MM, previamente humedecidas con 20XSSC, de tal modo que ambos extremos del papel estuviesen sumergidos en el tampón contenido en el recipiente. A continuación, se colocó el gel y sobre éste se situó una membrana de nylon de un tamaño ligeramente superior, que previamente había sido sumergida en agua Milli Q<sup>®</sup> y, seguidamente, en 2XSSC. A continuación, sobre la membrana de nylon se depositaron, una a una, tres piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la misma, humedecidas en 2XSSC. Finalmente, se depositaron servilletas de papel secas que fueron sustituidas periódicamente. Para asegurar la transferencia, sobre las servilletas de papel se colocó un peso de unos 500 g. La transferencia se prolongó durante una noche y, a continuación, se recuperó la membrana y sobre ella se señaló el contorno del gel. Posteriormente, la membrana fue lavada en agitación durante 10 min en 200 ml de 2XSSC y dejada secar a temperatura ambiente. Cuando se secó, se fijó el ADN a la membrana mediante la incubación de la misma a 80°C durante 2 h.

Por último, la membrana fue sometida a los tratamientos de prehibridación e hibridación con una sonda marcada que hibridó con su cadena de ADN complementaria.

## **2) Prehibridación de membranas portadoras de ADN fijado**

Tras la fijación del ADN, las membranas fueron humedecidas en 2XSSC (C.I.3.). Posteriormente, fueron incubadas en solución de prehibridación *Dig Easy Hyb* de Roche a 42°C durante al menos 2 h en un horno de hibridación. Para esta etapa de prehibridación se utilizaron 200 µl de solución de prehibridación por cada cm<sup>2</sup> de membrana. Este tratamiento es necesario para bloquear todos los sitios de unión inespecíficos de la sonda a la membrana.

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

La hibridación se realizó en el mismo horno que la prehibridación incubándose las membranas a 42°C durante una noche. La solución de hibridación fue la misma que la de prehibridación a diferencia de que en esta ocasión se utilizaron 40 µl de solución por cm<sup>2</sup> de membrana y se le adicionaron de 5 a 25 ng de sonda marcada por cada ml de solución. La sonda fue hervida durante 10 min para lograr su desnaturalización y generar ADN de cadena sencilla capaz de reconocer el material genético inmovilizado a la membrana de forma específica. A continuación, dicha sonda fue pasada rápidamente a hielo antes de ser incorporada a la solución de hibridación. Tras la incubación, las membranas fueron lavadas a temperatura ambiente dos veces durante 5 min con la solución de equilibrado I (C.I.3.) y dos veces con la solución de equilibrado II (C.I.3.) durante 15 min para eliminar el exceso de sonda no unida específicamente.

#### 4) Detección con fosfatasa alcalina

Este procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo del *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche para realizar la detección inmunológica de los fragmentos de ADN donde se había unido la sonda marcada con DIG\_dUTP. El anticuerpo que reconoce a la digoxigenina se encuentra conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, cuya actividad genera un producto coloreado que permite visualizar las bandas que quedaron marcadas por la sonda.

En primer lugar, la membrana fue sumergida de 1 a 5 min en 100 ml de tampón de lavado (C.I.3.), en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, fue incubada durante 30 min en 100 ml de 1X solución de bloqueo (C.I.3.) en las mismas condiciones anteriores. En la siguiente etapa, dicha membrana se incubó durante 30 min con agitación vigorosa en 50 ml de 1X solución de bloqueo a la que se habían añadido 5  $\mu$ l (dilución 1:10000) de anticuerpo *anti-DIG-AP* (anticuerpo policlonal ovino antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina). Transcurrida esta incubación, la membrana fue lavada dos veces durante 15 min en 100 ml de tampón de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la sonda marcada y posteriormente fue equilibrada de 2-5 min en 20 ml de tampón de detección (C.I.3.). Por último, fue incubada, en oscuridad, en una bolsa de plástico sellada que contenía la solución de desarrollo del color.

Como consecuencia de la reacción enzimática, se formó un compuesto violeta unido a la sonda ligada a la secuencia de ADN complementaria. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua Milli Q<sup>®</sup>.

### C.II.8. Estudio del perfil de expresión de genes de *M. xanthus*

La construcción de cepas portadoras de fusiones entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen de interés de *M. xanthus*, permitió establecer el momento así como el nivel de expresión del gen analizado a lo largo del ciclo de vida de esta bacteria. Una vez construida la fusión, se realizó un análisis cualitativo para determinar las condiciones de expresión, y posteriormente se procedió a la cuantificación del nivel de expresión.

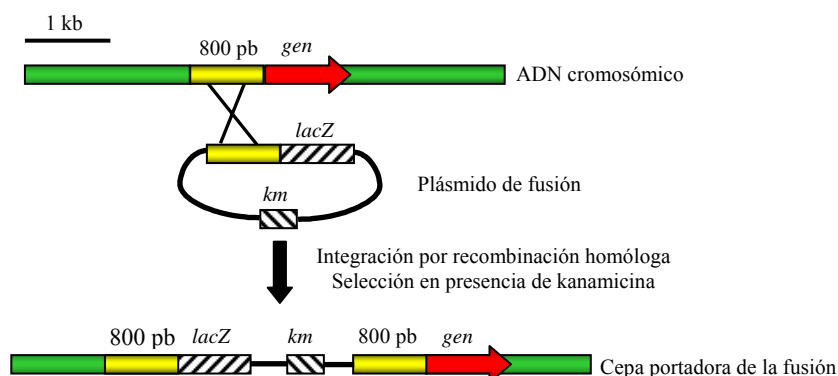
#### C.II.8.1. Construcción de una fusión entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen de interés de *M. xanthus*

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

Para la construcción de estas fusiones se utilizó el vector pKY481. Este vector posee el gen *lacZ* de *E. coli* y un marcador de resistencia a kanamicina que permite seleccionar los presuntos positivos. Para ello, se clonó un fragmento de unas 800 pb localizado delante del gen cuya expresión se deseaba analizar. En primer lugar, se amplificó dicho fragmento por PCR empleando oligonucleótidos específicos con los sitios de restricción deseados, y como molde, ADN cromosómico de *M. xanthus*. A

## Material y métodos

continuación, dicho producto de PCR se digirió con las enzimas adecuadas, al igual que el vector pKY481, y se clonó en fase con el gen *lacZ* de *E. coli* (Fig. 12) Según el caso, la fusión con el gen *lacZ* del vector se realizó en el codón de inicio del gen de *M. xanthus* o bien sobre los primeros codones del mismo.



**Figura 12.** Construcción de una fusión entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen de *M. xanthus*.

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

### C.II.8.2. Determinación cualitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en *M. xanthus*

Esta determinación se llevó a cabo mediante el crecimiento de las distintas cepas en placas con el medio de cultivo adecuado suplementado con X-gal, ya que la enzima  $\beta$ -galactosidasa es capaz de utilizar este compuesto como sustrato dando lugar a un producto de color azul. La aparición, por tanto, de un precipitado azulado en la zona donde se encontraban las células, indicó el momento de expresión de los genes analizados. Y la intensidad de dicho color azul permitió establecer una relación directa con el nivel de expresión de esos genes. Cuando fue necesario, los medios de cultivos fueron suplementados además con diferentes sales de metales.

### C.II.8.3. Determinación cuantitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en *M. xanthus*

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

#### C.II.8.3.1. Preparación de extractos crudos de *M. xanthus*

Las bacterias cuya actividad  $\beta$ -galactosidasa se quería cuantificar fueron cultivadas en medio CTT líquido suplementado con kanamicina a 30°C y 300 rpm de agitación hasta que los cultivos alcanzaron una  $DO_{600}$  de 1. En ese momento las células

fueron recogidas por centrifugación a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente y lavadas con tampón TM para eliminar el medio de cultivo. Entonces, las células se concentraron a una  $DO_{600}$  de 15 en tampón TM (C.I.3.) y se sembraron en placas de medio sólido adecuado (CTT o CF suplementados con diferentes concentraciones de sulfato de cobre) a razón de 200  $\mu$ l de cultivo por placa. Las placas se incubaron a 30°C y las células fueron recogidas a distintos tiempos y mantenidas a -20°C hasta su procesamiento que consistió en romper las células mediante sonicación. Para ello las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de tampón TM y sometidas a tratamiento con ultrasonidos durante 5 min en pulsos de 30 seg con el sonicador *Microson Ultrasonic Homogenizer XL2007* de Misonix Inc. Durante la sonicación, las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas provocado por el calentamiento generado durante dicho proceso. En el caso en el que las muestras contuvieran mixósporas se sonicaron con bolas de vidrio (Sigma) equilibradas previamente en tampón TM para facilitar la rotura de estas formas de resistencia. Tras la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y conservado a -20°C hasta el momento de efectuar la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

#### C.II.8.3.2. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa

En primer lugar, se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de Bio-Rad. Para ello se adicionaron los volúmenes adecuados de cada extracto celular a un volumen final de 1 ml de reactivo de Bio-Rad diluido cinco veces en agua Milli Q<sup>®</sup>. El color generado por cada muestra se midió a 595 nm tras 15-30 min de incubación, utilizando la aplicación *Cary Win UV Concentration* del espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer* de Varian, empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) para interpolar los valores de concentración de proteínas de las muestras.

Tras la medida de la concentración de proteínas se determinó la actividad desarrollando una reacción enzimática producida a partir de una mezcla de reacción compuesta por 30 a 50  $\mu$ g del extracto a ensayar en 450  $\mu$ l de tampón Z (C.I.3.) con ONPG (1 mg/ml), completando con tampón TM (C.I.3.) hasta un volumen final de 500  $\mu$ l. En esta reacción enzimática, el sustrato ONPG se rompe por la actividad  $\beta$ -galactosidasa generando un producto con tonalidad amarilla, el *o*-nitrofenol (ONP). Puesto que los extractos de *M. xanthus* presentan una tonalidad amarilla, similar al ONP, se preparó un lote de muestras paralelo en los que el tampón Z con ONPG fue reemplazado por tampón Z únicamente. En ambos casos, las mezclas resultantes se incubaron a 37°C hasta que la tonalidad amarilla generada adquirió una intensidad adecuada (una  $DO_{420}$  entre 0.6-0.9 o hasta un período máximo de 3 h de incubación) momento en el que se detuvo la reacción adicionando 0.5 ml de 1 M  $Na_2CO_3$ . A continuación, se realizó la lectura espectrofotométrica de las muestras a 420 nm empleando la aplicación *Cary Win UV Advanced Reads* del espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer* de Varian. La lectura se realizó frente a blancos sometidos al mismo tratamiento en los que el extracto a analizar fue sustituido por 50  $\mu$ l tampón TM.

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

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

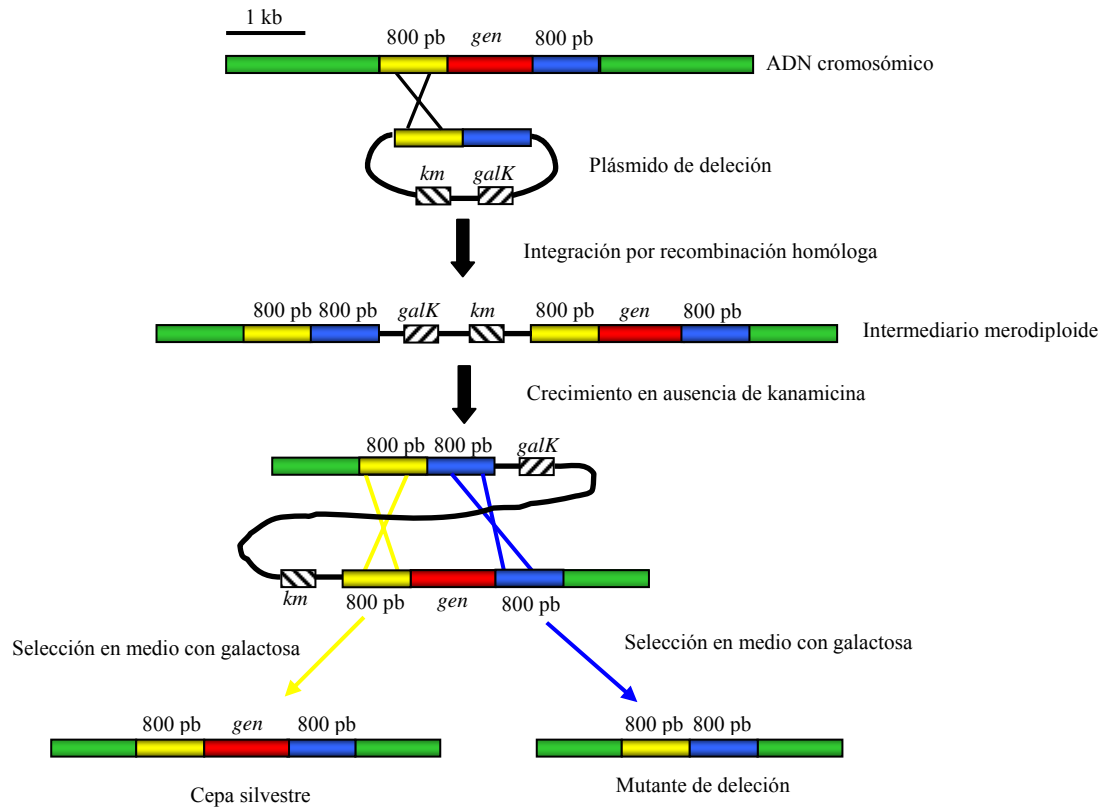
donde 213 deriva del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm, obtenida en los ensayos de actividad β-galactosidasa, en nanomoles de *o*-nitrofenol producidos,  $A_{420}$  es la diferencia de absorbancia entre las muestras incubadas con ONPG y esas mismas muestras incubadas sin dicho compuesto, *ml* es el volumen de extracto utilizado en la determinación de la actividad, *mg/ml* es la concentración de proteínas de la muestra, y *min* representa los minutos durante los cuales la muestra fue incubada a 37°C antes de detener la reacción.

## C.II.9. Construcción y caracterización de mutantes de delección en fase de *M. xanthus*

### C.II.9.1. Construcción de mutantes de delección en fase

El primer paso para la obtención de cepas mutantes de delección de *M. xanthus* fue la construcción de un plásmido portador de dicha delección. Para ello, se clonaron dos fragmentos de ADN cromosómico de *M. xanthus* de al menos 800 pb, situados uno inmediatamente aguas arriba del fragmento que se quiere deleccionar, y otro inmediatamente aguas abajo de dicho fragmento, manteniendo la pauta de lectura y conectados por un sitio de restricción (Fig. 13). Estos fragmentos se amplificaron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que portaban las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción adecuadas, y se clonaron en el vector pBJ113 digerido con las mismas enzimas. Este vector, además de contener un marcador seleccionable de resistencia a kanamicina, incluye el gen de la galactoquinasa (*galK*) que provoca sensibilidad a la galactosa.

A continuación, se electroporó el plásmido portador de la delección, previamente dializado, en la cepa silvestre de *M. xanthus*. Las células electroporadas se cultivaron en medio CTT sólido con kanamicina, de modo que sólo podían crecer aquellas que hubieran incorporado el plásmido. Tras 5-7 días de incubación a 30°C algunas colonias aparecidas, intermediarios merodiploides, fueron analizadas mediante Southern blot. Una vez seleccionado el intermediario correcto, se sembró secuencialmente en medio CTT sólido y líquido sin kanamicina, durante un día en cada caso para permitir la pérdida del plásmido por recombinación homóloga. A partir del cultivo líquido, se realizaron diluciones en medio CTT líquido hasta la dilución  $10^{-4}$ . Se tomaron 100 µl de estas diluciones y se depositaron en 4.5 ml de CTT blando (0.8% de Bacto-agar). A continuación se plaquearon en CTT sólido con galactosa. Tras 5-7 días de incubación a 30°C, las colonias resultantes de las diluciones se picaron en medio CTT sólido con galactosa, y paralelamente en CTT sólido con kanamicina, para seleccionar aquellas que eran capaces de crecer en presencia de galactosa pero no en presencia del antibiótico. Estas colonias fueron analizadas mediante Southern blot para diferenciar los mutantes de delección de aquellas que habían revertido a silvestre.



**Figura 13.** Obtención de una cepa de *M. xanthus* portadora de una delección. La recombinación se puede dar en el primer fragmento de 800 pb (en amarillo) o en el segundo (en azul) dando lugar a la incorporación del plásmido en el cromosoma. En esta figura sólo se representa una de las dos posibilidades.

## C.II.9.2. Caracterización de mutantes de delección en fase

### C.II.9.2.1. Fenotipo durante el crecimiento vegetativo

El análisis del crecimiento vegetativo para las cepas mutantes de *M. xanthus* obtenidas en este trabajo, se realizó mediante el desarrollo de una curva de crecimiento para cada una de las cepas mutantes, con la finalidad de comparar el crecimiento experimentado a lo largo del tiempo por estas cepas mutantes de *M. xanthus* respecto a la cepa silvestre DZF1. El análisis se hizo en unos casos creciendo las bacterias previamente en ausencia de sulfato de cobre y en otros, creciendo previamente las bacterias en presencia de dicho metal.

En unos casos, las bacterias fueron preincubadas a 30°C y 300 rpm de agitación en tubos que contenían 5 ml de CTT líquido. Al día siguiente, se determinó la  $DO_{600}$  de los cultivos, y a continuación las muestras fueron diluidas en tubos de 5 ml de CTT líquido, suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre, hasta una  $DO_{600}$  de 0.05. Los tubos se incubaron a 30°C y 300 rpm y periódicamente se tomaron medidas de los cultivos para determinar su  $DO_{600}$  en el espectrofotómetro *Spectronic 20D+*.

En otros casos, las bacterias fueron preincubadas igualmente a 30°C y 300 rpm de agitación en tubos que contenían 5 ml de CTT líquido suplementado con 600  $\mu$ M de sulfato de cobre. De la misma manera que en el caso anterior, al día siguiente, se

## Material y métodos

determinó la  $DO_{600}$  de los cultivos, y a continuación las muestras fueron diluidas en tubos de 5 ml de CTT líquido, suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre, hasta una  $DO_{600}$  de 0.05. Igualmente, los tubos se incubaron a 30°C y 300 rpm y periódicamente se tomaron medidas de los cultivos para determinar su  $DO_{600}$  en el mismo espectrofotómetro.

En las ocasiones en las que se quería observar la síntesis de carotenoides en presencia de sulfato de cobre por parte de las cepas mutantes durante el crecimiento vegetativo, se procedió a cultivar dichas cepas en medio CTT sólido suplementado con Bacto-Agar al 1.5%. En todos los casos se utilizó como control la bacteria silvestre. Para ello, las bacterias fueron crecidas en medio CTT líquido hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 1, momento en el cual, los cultivos se centrifugaron a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las células recogidas se lavaron en tampón TM (C.I.3.) y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. Seguidamente, se resuspendieron en tampón TM para que la  $DO_{600}$  final fuera de 15. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu$ l de cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas Petri de 5.5 cm de diámetro con medio CTT suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre o bien en placas de gradiente con medio CTT, igualmente suplementadas con sulfato de cobre. Las placas de gradiente fueron preparadas en placas cuadradas de 10 cm x 10 cm de la siguiente manera: el cobre fue añadido a 30 ml de CTT en sobrefusión a 50°C y fue vertido sobre la placa cuadrada colocada de manera inclinada. Tras la solidificación de esta capa, la placa fue colocada horizontalmente y se le adicionó una nueva capa de CTT (30 ml) que no contenía metal alguno. En estas placas de gradiente, las gotas de 10  $\mu$ l de cultivo fueron colocadas a una distancia unas de otras de 1.1 cm a lo largo del gradiente. Tanto en el caso de las placas de 5.5 cm como en el de las placas de gradiente, una vez que se secaron las gotas, dichas placas fueron incubadas a 30°C y escaneadas periódicamente en el escáner *HP Scanjet 8300*.

### C.II.9.2.2. 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 bacterias en medios de cultivo pobres en nutrientes, capaces de inducir el desarrollo multicelular en *M. xanthus* y tomando como control a la bacteria silvestre DZF1.

Igualmente que para el caso del crecimiento vegetativo, el análisis se hizo creciendo previamente las bacterias en CTT líquido en ausencia de sulfato de cobre o en presencia de una concentración de 600  $\mu$ M de dicho metal. En ambos casos se concentraron los cultivos a una  $DO_{600}$  de 15. A continuación se tomaron 10  $\mu$ l de cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas de 5.5 cm de diámetro que contenían 8 ml de medio CF suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Las muestras fueron incubadas a 30°C y se siguió a la lupa de forma periódica el transcurso del ciclo de desarrollo de cada cepa hasta las 96 h de incubación, tomando imágenes a lo largo del tiempo.

### C.II.9.2.3. Recuento de esporas

El estudio de la esporulación en las cepas mutantes de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo se ha centrado en el recuento del número de mixósporas producidas por

estas cepas en un medio inductor del desarrollo, para así establecer una comparación con las generadas por el silvestre en las mismas condiciones.

Para ello, las cepas de mixobacteria cuyas esporas se deseaban contar fueron cultivadas en medio CTT líquido, concentradas a una  $DO_{600}$  de 15 y diseminado en placas que contenían el medio inductor del desarrollo (CF) a razón de 200  $\mu$ l por placa, distribuidos en 10 gotas de 20  $\mu$ l cada una. El medio estaba suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Las placas fueron incubadas a 30°C y transcurridas 24, 48, 72 y 96 h, se recogieron las muestras raspando la superficie del medio. Las muestras se conservaron a -20°C hasta proceder al recuento.

Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a su sonicación para eliminar los bacilos vegetativos presentes en las mismas y dispersar las esporas que se encontraran agrupadas. Para ello, las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de tampón TM y sonicadas durante 1.5 min en pulsos de 30 seg utilizando un sonicador *Microson<sup>TM</sup> Ultrasonic Homogenizer XL2007* de Misonix Inc. Antes de proceder a su recuento, las muestras fueron diluidas 10 veces en tampón TM. El recuento se realizó en una cámara de *Petroff-Hausser* de Hausser Scientific Partnership y los resultados del recuento se expresaron en número de esporas/placa.

#### C.II.9.2.4. Germinación de esporas

Para determinar el porcentaje de esporas viables se siguió el procedimiento descrito por Wu *et al.* (1998). Se utilizaron los mismos extractos empleados para el recuento de esporas a las 72 h de incubación. Las muestras sonicadas se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron en un baño a 50°C durante 2 h. A continuación, fueron sonicadas durante 30 seg con el fin de dispersar las esporas que se encontrasen agrupadas.

Posteriormente, las muestras fueron diluidas en tampón TPM (C.I.3.) y 50  $\mu$ l de muestra diluida fueron adicionados a 5 ml de medio CTT blando (0.8% de Bacto-agar) mantenido en sobrefusión en un baño a 50°C. Las diluciones a hacer dependían del número de esporas contadas y del porcentaje de germinación esperado. Tras homogeneizar la muestra, el medio semisólido se distribuyó uniformemente sobre una placa de 20 ml de CTT. Las placas fueron incubadas a 30°C y, finalmente, el número de esporas viables fue determinado en función del número de colonias aparecidas tras 7 días de incubación. La eficiencia de la esporulación, por su parte, fue calculada dividiendo el número de esporas viables entre el número de esporas contadas en la muestra de partida.

#### C.II.9.2.5. Estudio de la tolerancia a diferentes metales

Para determinar la tolerancia a diferentes metales se emplearon medios de cultivo, tanto para el crecimiento vegetativo como para el ciclo de desarrollo, suplementados con diferentes concentraciones de metales. En todos los casos se utilizó como control la bacteria silvestre. Los metales empleados así como las concentraciones (en mM) fueron los siguientes: cobre, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.25, 0.5, 1 o 2; níquel, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6; zinc, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1; cobalto, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5; cadmio, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.5 y 0.6; plata, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 y 0.5; ión ferroso, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; e ión férrico, 0.1, 0.5, 1, 2 y 3.



## Material y métodos

El estudio se realizó creciendo previamente las bacterias en CTT líquido a 30°C y 300 rpm en ausencia de sulfato de cobre y concentrándolas a una DO<sub>600</sub> de 15. A continuación se tomaron 10 µl de cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas de 5.5 cm de diámetro que contenían 8 ml de medio CTT o CF suplementados con diferentes concentraciones de metales. Las muestras fueron incubadas a 30°C y se siguió a la lupa de forma periódica el crecimiento vegetativo o el transcurso del ciclo de desarrollo hasta las 96 h de incubación. En este momento, para comprobar la viabilidad de las células se tomó una muestra de cada cepa de cada una de las placas con los distintos metales y se sembró en placas de medio CTT sin metal alguno. Estas placas se incubaron durante 7 días a 30°C hasta la aparición de las colonias.

### C.II.9.2.6. Determinación del cobre intracelular

Para la determinación del cobre acumulado intracelularmente se siguió el procedimiento descrito por Outten *et al.* (2001). Para ello, se inoculó un tubo de 5 ml de CTT líquido con la bacteria a analizar y se incubó toda la noche a 30°C y 300 rpm. A la mañana siguiente, se midió la DO<sub>600</sub> del cultivo y se inoculó un matraz de CTT líquido con el volumen previamente determinado, de manera que la DO<sub>600</sub> de partida del nuevo cultivo fuera de 0.04. Dicho matraz se incubó durante 24 h a 30°C y 300 rpm.

Transcurridas las 24 h de incubación, se midió la DO<sub>600</sub> del cultivo y se concentraron las muestras añadiendo el volumen de tampón TM (C.I.3.) adecuando para que la DO<sub>600</sub> del cultivo fuera de 15. A continuación, se plaquearon 200 µl del cultivo (10 gotas de 20 µl) en medio sólido (con y/o sin sulfato de cobre). Tras secar las gotas, las placas se incubaron a 30°C durante 72 h.

Pasado el período de incubación adecuado, se recogieron las células raspando sobre la superficie del medio y se transfirieron a un tubo estéril de polipropileno de 15 ml previamente tarado en la balanza de precisión. A continuación, se lavó el pellet obtenido tres veces con medio CTT sin MgSO<sub>4</sub> pero adicionado con 1 mM EDTA y se secó dicho pellet durante toda la noche a 80°C.

A la mañana siguiente, se comprobó si la muestra se había desecado completamente y, en caso afirmativo, se pesó nuevamente el tubo en la balanza de precisión para determinar el peso seco de células. Posteriormente, se disolvió el pellet en 5 ml de ácido nítrico 65% Suprapur<sup>®</sup> de Merck incubando los tubos a 80°C durante 30 min.

Las posteriores etapas del procedimiento se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. El contenido de metal de las muestras fue medido usando la técnica del horno de grafito. El instrumento empleado fue un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 5100ZL. Para realizar las medidas se realizó una curva patrón con tres medidas estándar (50, 100 y 200 ppb) y un blanco.

### C.II.9.2.7. Determinación de actividades de la oxidasa multicobre CuoA

Para la determinación de diferentes actividades de la oxidasa multicobre CuoA se emplearon extractos celulares crudos. Dichos extractos celulares de *M. xanthus* se

obtuvieron mediante sonicación como se describe en el apartado C.II.8.3.1. Las células se recogieron a las 24 h de incubación en ausencia o presencia de 300 o 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre. Para los ensayos con compuestos aromáticos como sustratos se emplearon los siguientes compuestos: 3,3-dimetoxibenzidina; 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído; y 2,6-dimetoxifenol (DMP).

La actividad cuproso oxidasa fue medida en términos de razón de oxígeno consumido usando un oxígrafo (Hansatech) a 37°C como fue descrito por Singh *et al.* (2004). Las razones de oxígeno iniciales fueron calculadas de curvas de consumo de oxígeno frente al tiempo. El sustrato, Cu(I) fue añadido como un complejo  $[\text{Cu(I)(MeCN)}_4]\text{PF}_6$ , el cual libera Cu(I) en solución. Las soluciones stock de Cu(I) fueron preparadas en el momento de realizar las medidas y diluidas anaeróbicamente. Las reacciones fueron iniciadas añadiendo el sustrato ( $[\text{Cu(I)(MeCN)}_4]\text{PF}_6$  a 0.5 mM) a una mezcla saturada de aire que contiene el extracto celular, tampón acetato de sodio 100 mM pH 5 (C.I.3.) y acetonitrilo al 5%. Como control, se hicieron ensayos en los que no se utilizaban extractos celulares, o bien, no se utilizaba el sustrato. La actividad específica se expresó como nmol de Cu(I) oxidado por minuto por mg de proteína, y las actividades son medias de seis ensayos con extractos celulares crudos preparados de células procedentes de dos cultivos independientes. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Tecnología Química e Biológica (ITQB) de la Universidade Nova de Lisboa en Oeiras (Portugal).



## **D. RESULTADOS**



## D. RESULTADOS

### D.I. RESISTENCIA DE *M. xanthus* AL COBRE Y OTROS METALES DURANTE SU CICLO DE VIDA

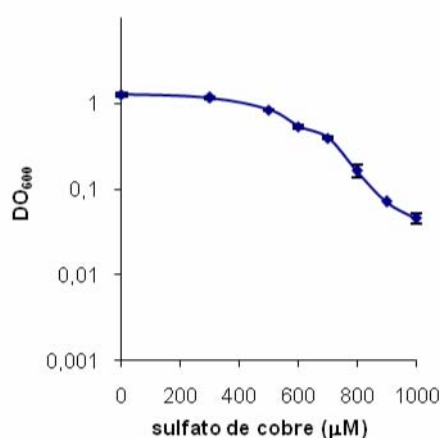
Como se ha comentado en la Introducción, el hábitat natural de la bacteria *M. xanthus* es el suelo rico en materia orgánica y material vegetal en descomposición. En estos nichos es frecuente que esta bacteria se encuentre con altas concentraciones de metales procedentes de la polución industrial. Uno de estos metales es el cobre, y el primer objetivo de este trabajo de investigación fue el estudio de la resistencia de *M. xanthus* al cobre y otros metales durante su ciclo de vida.

#### D.I.1. Tolerancia de *M. xanthus* al cobre

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la tolerancia de *M. xanthus* al cobre durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. En este trabajo se utilizó la bacteria silvestre DZF1 y dicho estudio se realizó en dos condiciones diferentes: una en la que las células fueron crecidas en ausencia de cobre externo (cultivos no inducidos), y otra en la que las células fueron preincubadas en presencia de cobre (cultivos inducidos), ya que se ha demostrado que los mecanismos de resistencia a este metal son inducibles (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005).

##### D.I.1.1. Cultivos no inducidos

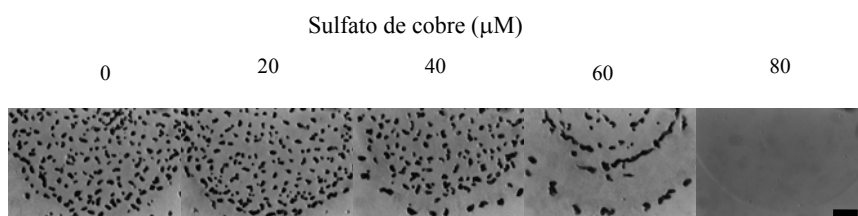
Para los ensayos en el crecimiento vegetativo, *M. xanthus* se incubó en CTT en ausencia de cobre externo. Las células se diluyeron en medio CTT fresco suplementado con diferentes concentraciones de cobre y se incubaron durante 24 h a 30°C. Como se puede observar en la Fig. 14, las células de *M. xanthus* crecieron hasta una concentración de 400  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre a una tasa similar a la observada en ausencia de metal. Sin embargo, a concentraciones más altas la tasa de crecimiento fue más baja y no se observó crecimiento por encima de una concentración de sulfato de cobre de 1000  $\mu\text{M}$ . La diferencia de crecimiento fue el resultado de un aumento en el tiempo de generación pero no en la duración de la fase lag (no mostrado).



**Figura 14.** Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* a las 24 h de incubación a 30°C. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

## Resultados

Para estudiar la sensibilidad al cobre de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo, las células crecidas en ausencia de este metal se cultivaron en medio CF, un medio inductor del desarrollo, que contenía diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Como se puede observar en la Fig. 15, las células sólo fueron capaces de formar cuerpos fructificantes hasta una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Por encima de esta concentración dichas células no fueron capaces de sobrevivir. Estos resultados muestran que las células de *M. xanthus* son aproximadamente 17 veces más sensibles al cobre durante el ciclo de desarrollo que durante el crecimiento vegetativo.



**Figura 15.** Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C hasta las 72 h. La barra representa 1 mm.

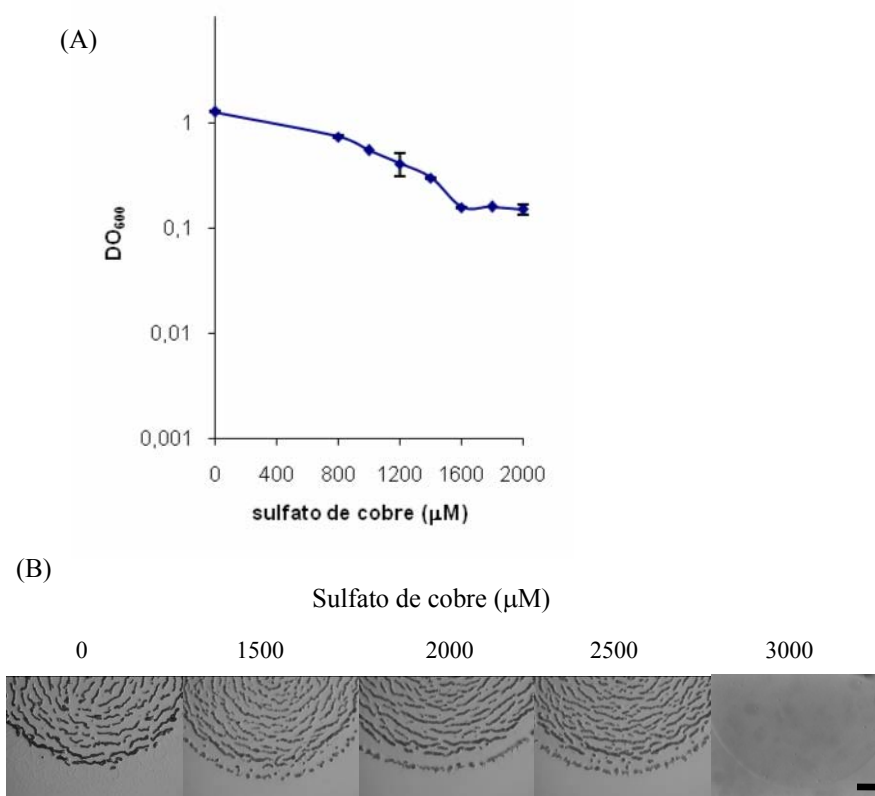
Con el fin de comprobar el efecto del cobre en el proceso de esporulación llevamos a cabo un recuento de mixósporas producidas por *M. xanthus* en medio CF en ausencia de metal y en presencia de una concentración de sulfato de cobre de 60  $\mu\text{M}$ . Se pudo observar que la producción de mixósporas fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de cobre, pasando de un número de  $1.92 \times 10^8$  mixósporas por placa en ausencia de cobre, a  $6.65 \times 10^7$  en presencia de una concentración de 60  $\mu\text{M}$  de dicho metal.

Una vez comprobada la eficiencia de esporulación de *M. xanthus* en ausencia y presencia de cobre, se trató de estudiar la viabilidad relativa de esas mixósporas. Para ello, las muestras utilizadas para hacer los recuentos fueron expuestas a condiciones de disponibilidad de nutrientes para favorecer su germinación. Se observó que la adición de cobre también redujo el porcentaje de esporas que fueron capaces de germinar. Así, en ausencia de cobre, la eficiencia de germinación fue del 11% mientras que en presencia de una concentración de 60  $\mu\text{M}$  de dicho metal la eficiencia fue del 0.3%.

### D.I.1.2. Cultivos inducidos con cobre

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que los mecanismos de resistencia al cobre son inducibles (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005), por ello decidimos estudiar la tolerancia al cobre de *M. xanthus* cuando las células eran preincubadas en presencia de una concentración de sulfato de cobre lo suficientemente alta como para inducir los mecanismos implicados en la resistencia a este metal. En este caso, se procedió de la misma manera que en los experimentos realizados en ausencia de cobre externo pero creciendo previamente las células en medio CTT que contenía una concentración de cobre de 600  $\mu\text{M}$ . Durante el crecimiento vegetativo se observó que las células inducidas fueron capaces de crecer hasta una concentración de 2000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, pero los tiempos de generación se alargaron considerablemente conforme las concentraciones de metal aumentaron (Fig. 16A). Sin embargo, durante el

ciclo de desarrollo, las células inducidas fueron capaces de formar cuerpos fructificantes hasta una concentración de 2500  $\mu\text{M}$  (Fig. 16B).



**Figura 16.** (A) Tolerancia al cobre de las células de *M. xanthus* preincubadas con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre e incubadas durante 24 h a 30°C con concentraciones más altas de dicho metal. Las barras de error indican las desviaciones estándar. (B) Cuerpos fructificantes de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, concentrados a una DO<sub>600</sub> de 15 e incubados a 30°C hasta las 72 h. La barra representa 1 mm.

Esta elevada tolerancia al cobre observada en las células inducidas con este metal durante el ciclo de desarrollo contrasta con la observada durante el crecimiento vegetativo. Este hecho podría atribuirse a que estos experimentos fueron realizados de manera diferente. En el caso del crecimiento vegetativo, las células fueron diluidas hasta una DO<sub>600</sub> de 0.05 e incubadas en medio líquido en agitación, mientras que para estudiar el ciclo de desarrollo, las células fueron concentradas a una DO<sub>600</sub> de 15 antes de ser plaqueadas en el medio CF. Se sabe 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. Por tanto, decidimos probar la sensibilidad al cobre de cultivos inducidos y no inducidos con este metal en placas de CTT después de concentrar las células a una DO<sub>600</sub> de 15. En este caso observamos que los cultivos mostraron la misma sensibilidad al cobre en placas de CTT que la observada en el medio líquido (no mostrado).

Estos resultados muestran claramente que el hecho de preincubar las células con cobre amplifica la respuesta de *M. xanthus* a este metal sólo 2.5 veces durante el



## Resultados

crecimiento vegetativo, mientras que durante el ciclo de desarrollo amplifica dicha respuesta hasta 41.7 veces.

### D.I.2. Tolerancia de *M. xanthus* a otros metales

Una vez comprobada la tolerancia al cobre de *M. xanthus*, se trató de estudiar la tolerancia de esta bacteria a otros metales como níquel, zinc, cobalto, cadmio, plata, ión férrico e ión ferroso. Dicho estudio se realizó tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo. Se pudo observar, que el cociente de tolerancia (tolerancia de crecimiento de las células vegetativas respecto a la tolerancia de las células en el ciclo de desarrollo) para el cobre fue mucho mayor que para los otros metales probados (Tabla 7). Para algunos metales como el zinc o el ión ferroso no había diferencias de tolerancia entre ambas fases del ciclo de vida. Sin embargo, en el caso del cobalto, las células durante el desarrollo fueron más resistentes a este metal. Para medir la sensibilidad de las células a  $\text{Cu}^+$  fue necesaria la adición de una concentración de ascorbato de 1mM a un medio que contenía  $\text{Cu}^{2+}$  para reducir dicho metal a  $\text{Cu}^+$ , y se observó que sólo aumentaba la sensibilidad al cobre de las células durante el ciclo de desarrollo (Tabla 7). En este caso las concentraciones de metal indicadas en la Tabla 7 corresponden a aquellas de  $\text{Cu}^{2+}$  añadidas al medio.

**Tabla 7.** Tolerancia de diferentes metales de *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. La razón de tolerancia se ha calculado como el cociente entre la máxima concentración de metal donde se observó viabilidad en el crecimiento vegetativo y la máxima concentración de metal donde se observó viabilidad durante el ciclo de desarrollo.

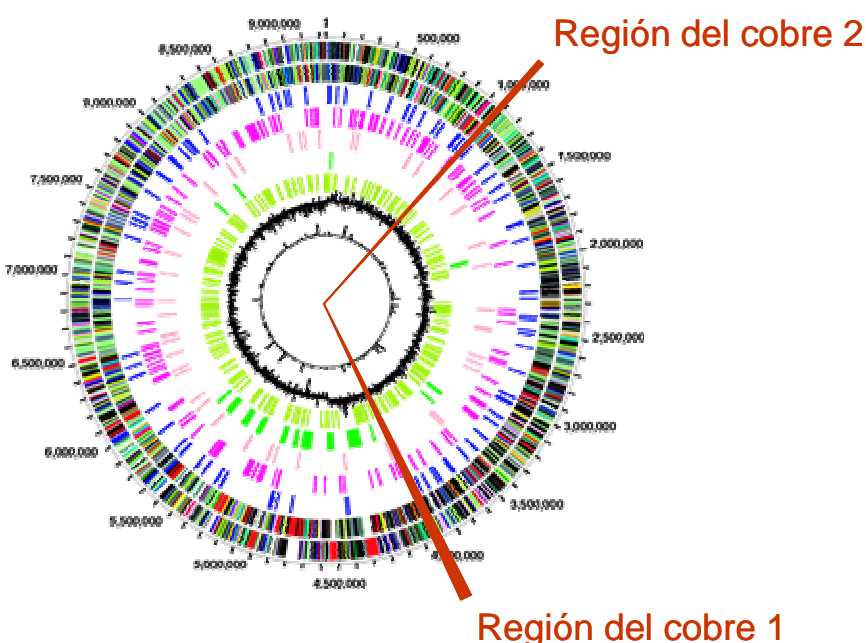
|                  | Máxima concentración de metal (mM)<br>que permite la viabilidad en el medio |      | Cociente de tolerancia<br>(CTT/CF) |
|------------------|---|------|------------------------------------|
|                  | CTT   | CF   |                                    |
| $\text{Cu}^{2+}$ | 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 parece sugerir que *M. xanthus* debe ajustar de forma muy precisa las concentraciones de este metal en su interior celular a lo largo del ciclo de vida.

Estos resultados nos condujeron a abordar el estudio de la respuesta global al cobre en *M. xanthus* desde diversos puntos de vista, que abarcan desde los análisis *in silico* hasta estudios a nivel transcripcional y funcional de los diferentes elementos encontrados en el genoma.

## D.II. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA AL COBRE EN *M. xanthus*

La secuenciación del genoma de *M. xanthus* ha sido llevada a cabo por Monsanto y TIGR (Goldman *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia del genoma ha revelado la existencia de una abundancia de genes cuyos productos presentan similitudes con la secuencia de proteínas que están implicadas en la homeostasis del cobre en otros organismos. Algunos de estos genes están localizados en una región de unas 26.5 kb que codifica para veinte proteínas, muchas de las cuales presentan dominios conservados implicados en la homeostasis del cobre. A dicha región la hemos denominado “región del cobre 1” (Fig. 17). Otros genes se encuentran localizados en una segunda región a la que hemos denominado “región del cobre 2” (Fig. 17).

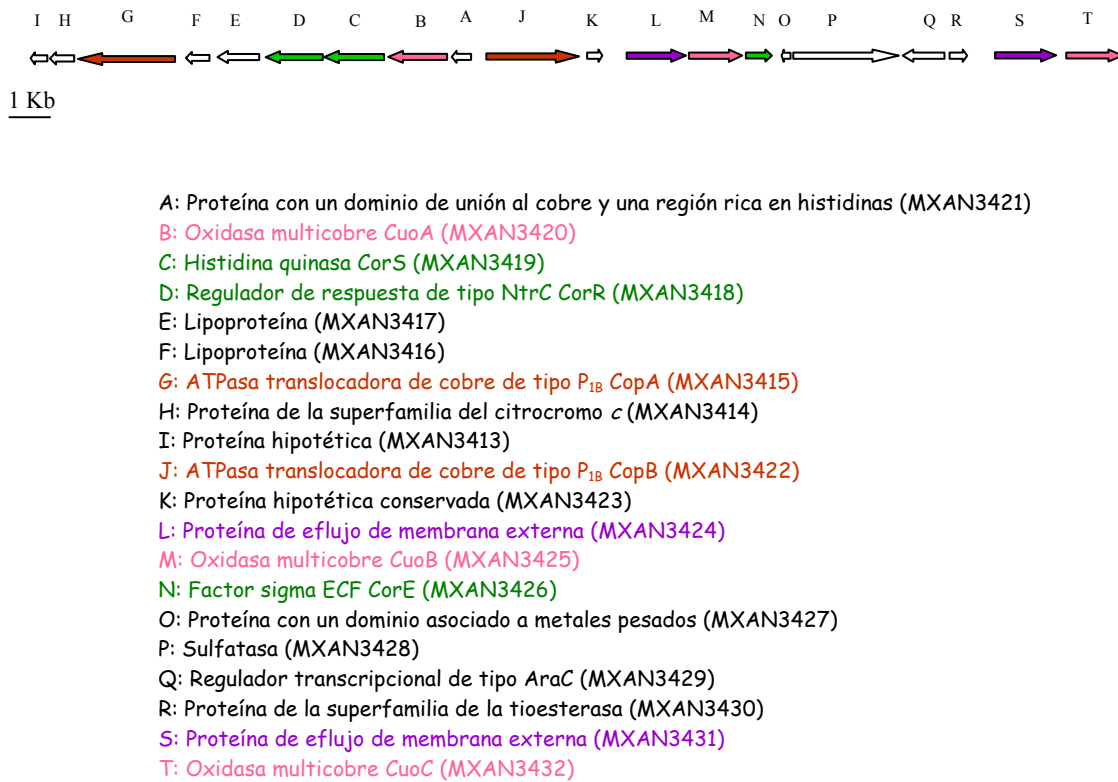


**Figura 17.** Localización en el genoma de *M. xanthus* de las regiones del cobre 1 y 2.

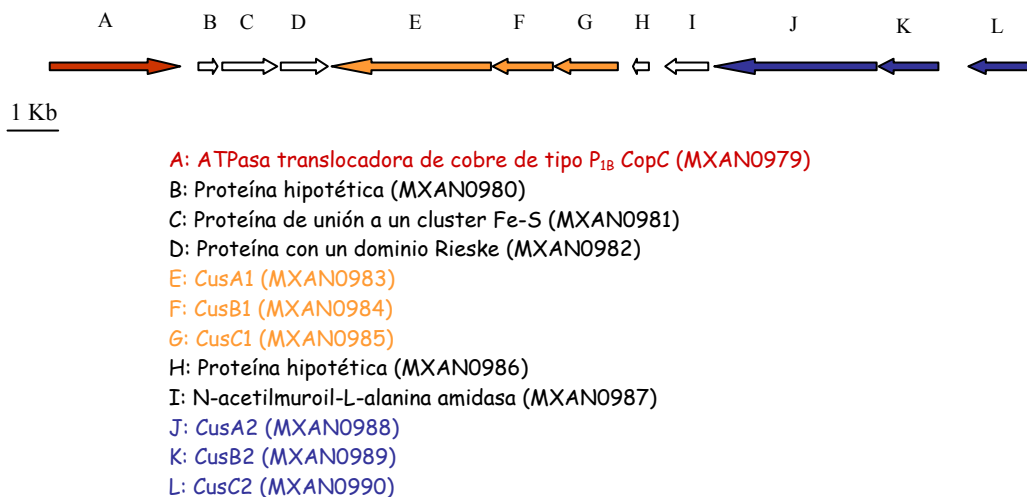
La región del cobre 1 incluye, entre otras proteínas, dos ATPasas de tipo  $P_{1B}$ , a las que hemos denominado CopA y CopB, codificadas por los genes *copA* (MXAN3415) y *copB* (MXAN3422), respectivamente, y tres oxididas multicobre denominadas CuoA, CuoB y CuoC, codificadas por los genes *cuoA* (MXAN3420), *cuoB* (MXAN3425) y *cuoC* (MXAN3432), respectivamente (Fig. 18).

La región del cobre 2, por su parte, incluye, entre otras proteínas, una ATPasa de tipo  $P_{1B}$ , a la que hemos denominado CopC, codificada por el gen *copC* (MXAN0979), y dos sistemas Cus, a los que hemos denominado Cus1 y Cus2, formados por tres genes cada uno: *cusA1* (MXAN0983), *cusB1* (MXAN0984) y *cusC1* (MXAN0985) para el sistema Cus1, y *cusA2* (MXAN988), *cusB2* (MXAN989) y *cusC2* (MXAN0990) para el sistema Cus2 (Fig. 19).

## Resultados

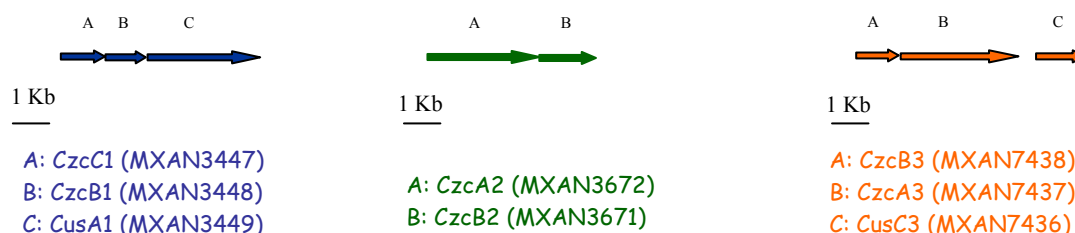


**Figura 18.** Organización genómica estructural de la región del cobre 1 de *M. xanthus*.



**Figura 19.** Organización genómica estructural de la región del cobre 2 de *M. xanthus*.

El análisis del genoma de *M. xanthus* también reveló la existencia de un tercer sistema Cus al que hemos denominado Cus3, igualmente formado por tres genes: *cusA3* (MXAN6177), *cusB3* (MXAN6178) y *cusC3* (MXAN6176); y la existencia de tres sistemas Czc (Fig. 20) que están implicados en la resistencia a Co(II), Zn(II) y Cd(II) (Legatzki *et al.*, 2003).



**Figura 20.** Organización genómica de los tres sistemas Czc de *M. xanthus*.

El hallazgo de tantos genes implicados en la respuesta al cobre en *M. xanthus* es indicativo de que los mecanismos de homeostasis del cobre en esta bacteria podrían ser diferentes durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo.

El presente trabajo de investigación se ha centrado en el estudio de la oxidasa multicobre CuoA (de cuproso oxidasa), localizada en la “región del cobre 1”, y la búsqueda de proteínas reguladoras. Como se comentó en la Introducción, la familia de proteínas de las oxidosas multicobre está caracterizada por la presencia de tres centros de unión al cobre con características espectroscópicas diferentes. Los principales miembros de esta familia de proteínas son las lacasas fúngicas, la ascorbato oxidasa de plantas y la ceruloplasmina de mamíferos (Solomon *et al.*, 1996). Sin embargo, también se han descrito oxidosas multicobre en bacterias. En los procariontes, la función de estas proteínas es muy variada y algunas de ellas están implicadas en la tolerancia al cobre. El estudio de esta oxidasa multicobre en *M. xanthus* nos permitirá conocer su papel fisiológico en la homeostasis del cobre a lo largo del ciclo de vida de esta bacteria.

### **D.III. CARACTERIZACIÓN DE LA OXIDASA MULTICOBRE CuoA (MXAN3420)**

Tras la identificación inicial de que el gen *cuoA* codificaba para una oxidasa multicobre se procedió a realizar un análisis detallado de la proteína CuoA para determinar su posible implicación en la respuesta global al cobre de *M. xanthus* tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo.

#### **D.III.1. Análisis de la secuencia del gen *cuoA* y de la proteína que codifica**

En la Fig. 21 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen *cuoA* (MXAN3420) de *M. xanthus*, así como la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen.

Se ha definido como codón de iniciación para el gen *cuoA* el primer ATG encontrado aguas abajo de un codón de terminación localizado en la misma pauta de lectura. Este codón de iniciación muestra un posible sitio de unión al ribosoma (AGAGG) a 5 pb aguas arriba. En la misma pauta de lectura que el codón de iniciación se encuentra el codón de terminación de la secuencia, TAA.

Resultados

```

ccggggccacgcccaccacgggggcttggtcccccctcctcgccccgcagcttccatccattcgt
gaAGAGGcttc ATG CAT CGC AAT CGC TGG TTC ATC GCG GCA GCT CTC GTT GCC
M H R N R W F I A A A L V A
CTC CTC GCA ATG CTC GCG GCA CTC GGC CTC GGC CAG GAG GAT GAT GCC GCC
L L A M L A A L G L G Q E D D A A A
ATG GCG ACG CTC CGG CAG CCG CGC GTG GCA CCG CCC TAC CCT GAA GAC ACC
M A T L R Q P R V A P P Y P E D T
CCG TCC ACG GGC CGC GTG CGC GAG TTC GAG CTC GTC GCG GCC CCG ACA GCC
P S T G R V R E F E L V A A P T A
CTC CCG CTC CTG GAT GGC CGG AGT CTG GAG GTC TGG GCC TAC AAC GGC CAG
L P L L D G R S L E V W A Y N G Q
GTA CCC GGC CCC ACC CTT CGC GCC ACC CAT GGC GAC ACG GTC CGC GTG CGA
V P G P T L R A T H G D T V R V R
TTC ACC AAC AAG CTG CCG CAG CCG ACG ACC ATT CAC TGG CAC GGC ATC CGT
F T N K L P Q P T T I H W H G I R
CTT CCG AAC GGA ATG GAC GGC GTG CCC GGG GTG ACC CAG CCT CCC ATC CCA
L P N G M D G V P G V T Q P P I P
CCT GGG GGA ACC TTC CTC TAT GAG TTC AAA GTG AAG GAC GCA GGA ACC TAC
P G G T F L Y E F K V K D A G T Y
TGG TTT CAC CCG CAC CTG CGC GGG AGC GAG CAA GTC GAG CGA GGG CTG TTC
W F H P H L R G S E Q V E R G L F
GGC GTG CTC ATC GTG GAG GAC CAG AAG CCC GGT CCT TTC TCA CGC GAG CTC
G V L I V E D Q K P G P F S R E L
GTC TGG GTG CTC GAC GAC TGG CGA CTC GAC GCG AGT GGC CAG ATT GAC GGC
V W V L D D W R L D A S G Q I D G
CGA TTC AAC ACG CGC CAC GAC CTC GCG CAC GAC GGC CGC TGG GGG CAG GTC
R F N T R H D L A H D G R W G Q V
TCC ACG GTG AAC GGG GCT GTC CAG CCA GAA GTC CCG CTG CAG CCC GGC GAG
S T V N G A V Q P E V P L Q P G E
CGG GTG CGA CTG CGG ATG GTC AAC GTT GCA AAC GGG CGC GTG TTC GCG CCT
R V R L R M V N V A N G R V F A P
TCC TTC GAA GGG CTG GGC GCA TCT GTC ATC GCG ATC GAC GGG CTG GCC ACG
S F E G L G A S V I A I D G L A T
GAC CGG CCG CAG CCG GCC TCC CGC TTG GAG CTC GCT CCA GGG AAC CGC GTC
D R P Q P A S R L E L A P G N R V
GAC CTG GAC TTC ACC GTT CCC GAG GCG CTG AGC AAC CAG CGC ATG GAG GTG
D L D F T V P E A L S N Q R M E V
ATG GAC CAC TTC ACC CGC AGG CCG TTC CCT CTC GCA ACG CTG GTG GTG TCT
M D H F T R R P F P L A T L V V S
GGA GAG GTC GTG CGG CCA CCC GAA GTG GCA GCA GTT GCC CCG CCC CCG AGT
G E V V R P P E V A A V A P P P S
CCT GAC CTC TCT CCA GCG CGT GCA CTG CAA CCC GCG GAG ACC TTT CGG CTG
P D L S P A R A L Q P A E T F R L
AAT GCG AGG CGA GGA GGC CCC TTC GGC ATC GAG TGG ACC ATC AAT GAC GAG
N A R R G G P F G I E W T I N D E
GCG TTC CAC CAC GAG GGG GAG CAT GCC TCC GCG CAC CAC AAG GTC TAC CGG
A F H H E G E H A S A H H K V Y R
CTC CCT GCC CAC CAA TGG GCC ACG CTG CGT TTC GTC AAC GAG TCC TCC CGC
L P A H Q W A T L R F V N E S S R
CTG CAC CCC ATG CAC GTG CAT GGC CAG TTC TTC CGG GTG GTG GCA CGC AAT
L H P M H V H G Q F F R V V A R N
GGT GCA TCG GTG GAC GAG GGA CAC TGG CGC GAC ACC GTG CTG ATT CGT CCA
G A S V D E G H W R D T V L I R P
AGA GAG ACG GTG GAT GTG GCG ATG TTC CCG CAG GAC GTG GGG GCC TGG ATG
R E T V D V A M F P Q D V G A W M
CTC CAC TGC CAC ATC CAA GAG CAC GCC GAG GCT GGG ATG ATG ACG CTC GTG
L H C H I Q E H A E A G M M T L V
GAC GTC CAT GCG GAG GGT TCC CAG TAA gcgagccgcgccattccgacagcgccgcggtt
D V H A E G S Q Stop

```

Figura 21. Secuencia nucleotídica del gen *cuoA* (MXAN3420) de *M. xanthus*. En azul se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la oxidasa multicobre CuoA donde se destaca en morado el péptido señal. En verde se muestra el codón de iniciación, en rojo el codón de terminación, y en amarillo un posible sitio de unión al ribosoma.

El gen *cuoA* está constituido por 1446 pb y codifica para una proteína de 481 aminoácidos con un peso molecular estimado de 54.05 kDa y un pI de 6.21. Este gen presenta un uso de codones típico de los genes de *M. xanthus* y otros microorganismos con un alto contenido en G+C (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993) dado que el 80% de los tripletes presentan G o C en la tercera posición.

La proteína codificada por el gen *cuoA* muestra un péptido señal en el extremo N-terminal (Fig. 21), lo que indica que debe ser secretada al espacio periplásmico por el sistema Sec (Berks *et al.*, 2005).

La comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína CuoA, así como las secuencias de las otras dos oxidasas multicobre de *M. xanthus*, CuoB y CuoC, con otras proteínas depositadas en las bases de datos confirmó su homología con las oxidasas multicobre y permitió diferenciar los cuatro motivos HXH donde se encuentran las ocho histidinas que coordinan los átomos de cobre característicos de estas proteínas. En la Fig. 22A se muestran los cuatro dominios de unión al cobre I, II, III y IV representados en rojo, verde, azul y amarillo respectivamente. Los residuos de histidina y cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre están numerados de acuerdo con el tipo de cobre. Los residuos invariantes en todas las proteínas se muestran con el fondo rojo, verde, azul o amarillo para los motivos I, II, III o IV respectivamente, mientras que los residuos conservados en un mínimo de seis proteínas están sombreados en gris.

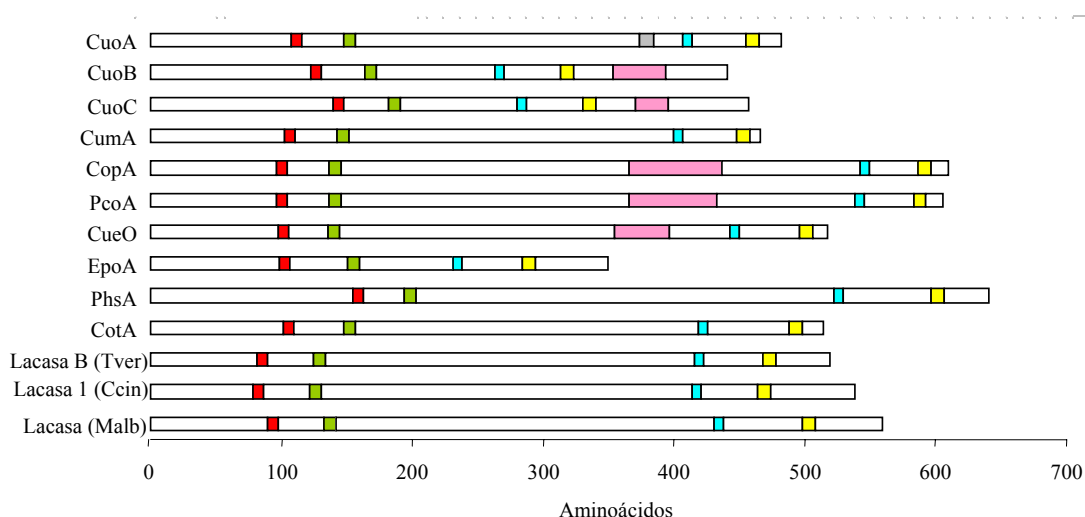
El análisis de la secuencia de CuoA revela que es bastante diferente a CuoB y CuoC, las cuales son muy similares entre sí. De hecho, la distancia entre los motivos II y III es más corta en CuoB y CuoC que en CuoA (Fig. 22B). Se ha visto que CuoA sólo muestra un 24.45 y un 22.91% de identidad con CuoB y CuoC respectivamente, mientras que este parámetro alcanza un valor del 56.18% cuando CuoB y CuoC son comparadas. Otra diferencia que se ha observado entre las tres oxidasas multicobre es que solamente CuoA presenta una región rica en histidinas entre los dominios II y III (Fig. 22B), una peculiaridad que no se ha observado en otras oxidasas multicobre. Sin embargo, CuoB y CuoC, presentan un motivo rico en metioninas en su región C-terminal.

(A)

| Organismo                     | Proteína/Número de acceso | I        | II         | III      | IV          |
|-------------------------------|---------------------------|----------|------------|----------|-------------|
| <i>M. xanthus</i>             | CuoA/ABF91184             | TTIHWHG  | GTYWFHPHL  | HPMHVHG  | WMLHCHI QEH |
| <i>M. xanthus</i>             | CuoB/ABF86571             | TTVHWGGL | GTYYMYHPHY | HPIHLHG  | WAMHCHMTTH  |
| <i>M. xanthus</i>             | CuoC/ABF89931             | TTIHWGGL | STNMYHSHH  | HPIHLHG  | WALHCHMTTH  |
| <i>Pseudomonas putida</i>     | CumA/AAL04024             | TTIHWHGI | GSYWYHPHV  | HPIHLHG  | WMFHCHVTDH  |
| <i>P. syringae</i>            | CopA/P12374               | TSIHWHGI | GTYYWYHSHS | HPIHLHG  | WAYHCHLLYH  |
| <i>Escherichia coli</i>       | PcoA/Q47452               | TSIHWHGI | GTYYWYHSHS | HPIHLHG  | WAYHCHLLYH  |
| <i>E. coli</i>                | CueO/P36649               | TTLHWHGL | ATCWFHPHQ  | HPFHIHG  | YMAHCHLLEH  |
| <i>Streptomyces griseus</i>   | EpoA/BAB64332             | ASLHVHGV | GYWHYHDHV  | HTFHIHG  | WMYHCHVQSH  |
| <i>S. antibioticus</i>        | PhsA/Q53692               | SVTHLHGA | TQWWYHDHA  | HPMHIHL  | FMYHCHLLEH  |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | CotA/P07788               | TVVHLHGG | AILWYHDHA  | HPIHLHL  | YVWHCHI LEH |
| <i>Trametes versicolor</i>    | Lacasa B/AAL07440         | TSIHWHGL | GTFWYHSHF  | HPFHLLHG | WFLHCHIDFH  |
| <i>Coprinus cinereus</i>      | Lacasa 1/AF118267         | TSIHWHGF | GTFWYHSHL  | HPFHLLHG | WFFHCHIEFH  |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> | Lacasa/CAE00180           | TSIHWHGI | GTSWYHSHF  | HPMHLHG  | WLFHCHIAWH  |
|                               |                           | 2 3      | 3 3        | 1 2 3    | 3 1 3 1     |

## Resultados

(B)



**Figura 22.** Organización de los dominios de las oxidodasas multicobre de *M. xanthus*. (A) Alineamientos de los cuatro dominios de unión al cobre de CuoA, CuoB y CuoC de *M. xanthus* con los de otras oxidodasas multicobre bacterianas y fúngicas. (B) Representación esquemática de los motivos en las oxidodasas multicobre fúngicas, bacterianas y de *M. xanthus*. Los cuatro dominios de unión al cobre están representados en el mismo color que en la parte A. El rectángulo gris en CuoA representa un motivo rico en histidinas, mientras que motivos ricos en metioninas en varias oxidodasas multicobre están representados por rectángulos rosa.

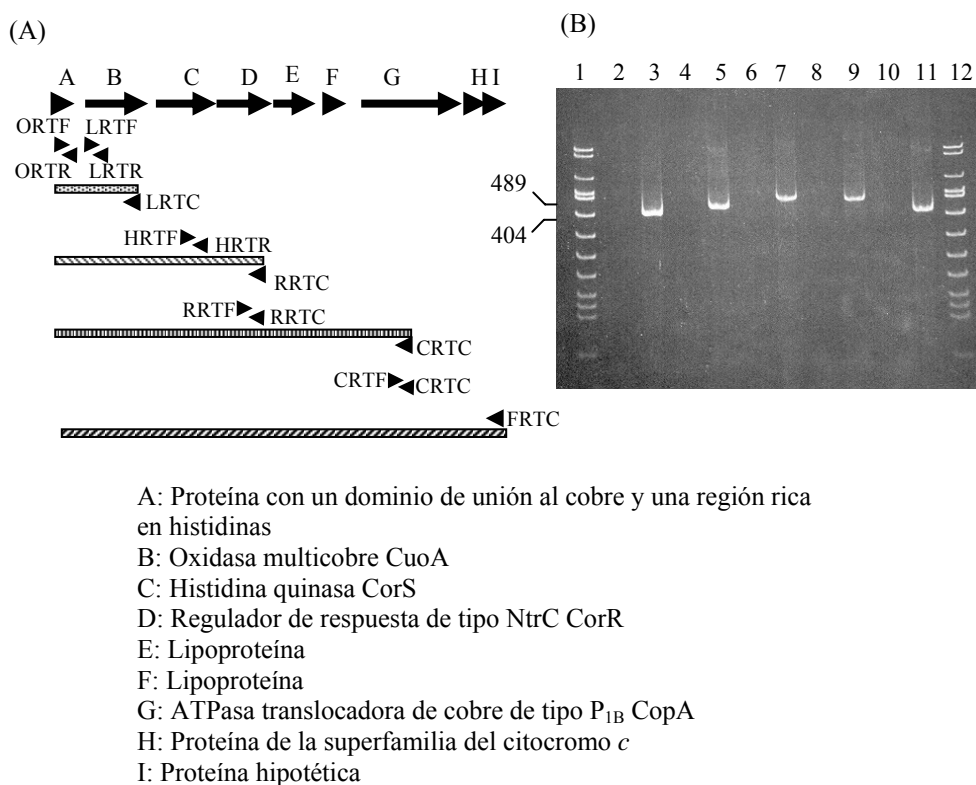
### D.III.2. Análisis de la región genómica situada en torno al gen *cuoA*

El estudio de los genes situados alrededor del gen *cuoA* en el genoma de *M. xanthus* reveló la presencia de nueve genes orientados en la misma dirección que el gen *cuoA* formando un bloque genético que ocupa 10.8 kb en el cromosoma. Uno de estos genes está localizado por encima del gen *cuoA* mientras que los otros siete aparecen inmediatamente por debajo. La disposición y proximidad de estos genes sugiere la posible presencia de un operón integrado por un total de nueve genes.

Para comprobar si estos nueve genes (nombrados desde A hasta I en la Fig. 23) están formando parte de un mismo operón se utilizó la técnica de RT-PCR y para ello se usó el procedimiento descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.6.2.).

Se usó ARN total procedente de células durante el crecimiento vegetativo crecidas en presencia de 0.3 mM de cobre como molde para los experimentos de RT-PCR. Los oligonucleótidos LRTC, RRTC, CRTC y FRTC (Tabla 4 del Material y Métodos), los cuales anillan a los genes B, D, G e I, respectivamente, se usaron para sintetizar cuatro ADNcs diferentes. Se realizaron cinco PCRs utilizando estos ADNcs como moldes usando los siguientes pares de oligonucleótidos: ORTF-ORTR, LRTF-LRTR, HRFTF-HRTR, RRTF-RRTC y CRTF-CRTC (Tabla 4) (Fig. 23A).

Como se muestra en la Fig. 23B, todas las reacciones amplificaron un fragmento con el tamaño esperado (líneas 3, 5, 7, 9 y 11). En las reacciones en las cuales se utilizó como molde el ARN directamente, no apareció ningún producto de PCR (líneas 2, 4, 6, 8 y 10), lo que indica que no había contaminación con ADN genómico. Este resultado confirma que los nueve genes están coexpresados, formando parte del mismo operón.



**Figura 23.** (A) Estrategia seguida para estudiar la coexpresión de los distintos genes del cluster *curA*. (B) Experimento de RT-PCR.

El análisis detallado de la secuencia de este bloque genético indica la presencia de una región promotora situada justo delante del primer gen de dicho bloque, el gen A (Fig. 23A). Este segmento, de 368 pb, presenta una secuencia donde es posible reconocer la existencia de un promotor característico para  $\sigma^{54}$  (Tabla 8), donde aparecen las secuencias GG y GC localizadas en las posiciones -24 y -12 bien conservadas. Sin embargo, un análisis más profundo de las regiones intergénicas reveló la presencia de posibles promotores internos para  $\sigma^{54}$ . Así, en las regiones intergénicas situadas entre los genes A y B, entre los genes B y C, y entre los genes F y G (Fig. 23A) se localizaron también promotores característicos para  $\sigma^{54}$  (Tabla 8), con las secuencias GG y GC localizadas en las posiciones -24 y -12. La presencia de estos promotores internos parece indicar que aunque los nueve genes se coexpresan en un mismo ARNm es probable que la transcripción también se pueda iniciar en otra parte dentro de la región. A este bloque genético lo hemos denominado cluster *curA*.

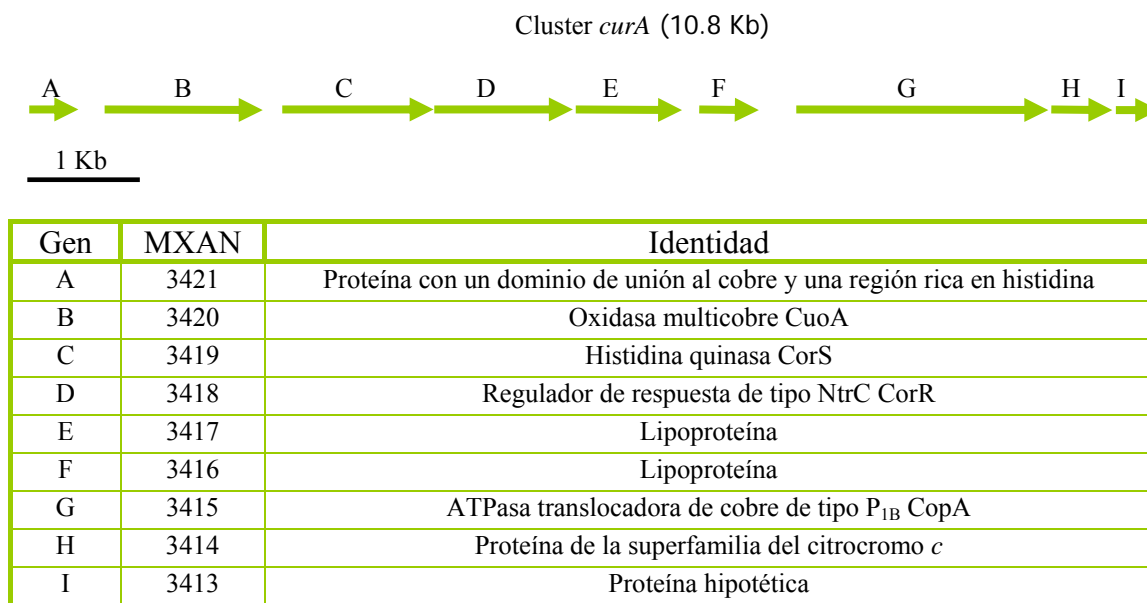
**Tabla 8.** Posibles promotores de  $\sigma^{54}$  identificados en el cluster *curA*.

| Localización  | Promotor de $\sigma^{54}$ |
|---|---------------------------|
| Delante del gen A (Proteína con un dominio de unión al cobre y una región rica en histidinas) | cGGCACGcgTgTGCT           |
| Delante del gen B (Oxidasa multicobre <i>CuoA</i> )   | TGGtcCctcCTcGCc           |
| Delante del gen C (Histidina quinasa <i>CorS</i> )  | TGGCctGcCTgTTGCT          |
| Delante del gen G (ATPasa translocadora de cobre de tipo $P_{1B}$ <i>CopA</i> )               | TGGCctcGgggTTGCT          |



## Resultados

Los genes integrados dentro del cluster *curA* han sido estudiados en detalle (Fig. 24). Sus funciones teóricas han sido deducidas por búsquedas de similitudes con otras proteínas depositadas en las bases de datos utilizando BLAST y otras bases de datos como ScanProsite, MotifScan e InterProScan del servidor ExpASY. La localización hipotética de las proteínas se ha llevado a cabo utilizando los siguientes servidores: signalP, PSORT, DAS y TMHMM. A continuación se describen las principales características de los productos codificados por los genes de dicho cluster.



**Figura 24.** Organización genómica de los genes localizados en el cluster *curA*. En la tabla se muestra el localizador de los genes en el genoma de *M. xanthus* así como la identidad de las proteínas que codifica cada uno de ellos.

Así, MXAN3421 (gen A) codifica una proteína de 152 aminoácidos de localización periplásmica con un dominio de unión al cobre (PF00127) y una región rica en histidinas en el extremo N-terminal.

MXAN3420 (gen B) codifica para la oxidasa multicobre CuoA como ya se ha comentado anteriormente.

MXAN3419 (gen C) genera una proteína de 475 residuos. Esta proteína pertenece a la familia de las histidina quinasa ya que posee tres dominios típicos de esta familia de proteínas: un dominio HAMP (PF00672) entre los residuos 183 y 252; un dominio histidina quinasa A fosfoaceptor (PF00512) entre los residuos 265 y 329, donde se encuentra el residuo de histidina que se fosforila; y un dominio HATPasa\_C (PF02518), entre los residuos 368 y 473. Además, posee un péptido señal desde los residuos 1 a 30. Esta proteína se encuentra anclada a la membrana citoplasmática ya que posee un dominio transmembrana entre los residuos 178 a 210. De ella se tratará más adelante.

Por su parte el MXAN3418 (gen D) da lugar a una proteína de 466 residuos. Esta proteína pertenece a la familia de reguladores de respuesta de tipo NtrC. Esta familia de proteínas se caracteriza porque son dependientes del factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa y consisten en un dominio N-terminal regulador de respuesta fosforilable

(PF00072) entre los residuos 7 a 116 para MXAN3418, un dominio central de interacción con  $\sigma^{54}$  (PF00158) entre los residuos 144 y 365, y un dominio C-terminal HTH de tipo Fis (PF02954) indispensable para la unión al ADN, ya que contiene el motivo hélice-giro-hélice, entre los residuos 415 y 455. La proteína MXAN3418 es una proteína de localización citoplasmática.

Las proteínas MXAN3419 y MXAN3418 forman un sistema regulador de dos componentes que hemos denominado sistema CorSR, y además hay solapamiento GTGA entre los dos genes que codifican para ambas proteínas.

MXAN3417 (gen E) codifica una proteína de 345 residuos y MXAN3416 (gen F) cifra una proteína de 197 aminoácidos que contiene dos dominios DUF305 (PF03713) entre los residuos 49 a 101 y 137 a 189, respectivamente. Ambas proteínas pertenecen a la familia de las lipoproteínas y se analizaron con el servidor LipoP 1.0. Se trata de proteínas ancladas a la membrana sintetizadas con un péptido señal precursor, el cual es cortado por una peptidasa señal específica de lipoproteínas (peptidasa señal II). Esta enzima reconoce una secuencia conservada y corta aguas arriba de un residuo de cisteína en el extremo N-terminal de manera que la proteína queda anclada a la membrana a través de un ácido graso unido a esa cisteína (Gennity e Inouye, 1991). Esa cisteína está localizada en el residuo 22 para MXAN3417 y en el residuo 21 para MXAN3416. Para que estas proteínas puedan ser procesadas se deben cumplir los siguientes requisitos: 1) la secuencia debe comenzar con una metionina; 2) el residuo de cisteína por el cual la proteína se queda anclada en la membrana debe estar entre las posiciones 15 y 35; y 3) debe haber como mínimo una lisina o una arginina en las primeras siete posiciones de la secuencia. Estas reglas se cumplen para MXAN3417 y MXAN3416. Si además aparece un aspártico en la posición 2 de la proteína madura, la proteína se encontrará anclada a la membrana interna (Seydel *et al.*, 1999). Para MXAN3417 y MXAN3416, el aminoácido que aparece en posición 2 no es un aspártico, por tanto ambas proteínas parecen estar ancladas a la membrana externa.

MXAN3415 (gen G) genera una proteína de 821 aminoácidos perteneciente a la familia de ATPasas translocadoras de cobre de tipo P, y dentro de esta familia pertenece al subgrupo de ATPasas tipo P<sub>1B</sub>. Esta proteína presenta tres dominios: un dominio YHS (PF04945) entre los residuos 26 y 71, un dominio E1-E2 ATPasa (PF00122) entre los residuos 277 y 500; y un dominio hidrolasa (PF00702) entre los residuos 504 y 730. Estas proteínas se caracterizan por transportar un amplio rango de metales pesados a través de las membranas biológicas y tienen características estructurales tales como una organización topológica con seis u ocho segmentos transmembrana con secuencias signatura de unión a metales en dichos segmentos como la secuencia CPC en el sexto segmento transmembrana. Estos sitios de unión a metales en los segmentos transmembrana son responsables del reconocimiento de los metales y su movimiento a través de la membrana. Además estas proteínas también presentan dominios citoplasmáticos de unión a metales (MBDs) en los extremos N y C-terminal. El dominio de unión a metales del extremo N-terminal se caracteriza por presentar la secuencia altamente conservada de unión a metales CXXC. Atendiendo a los criterios de Argüello *et al.* (2007), la proteína codificada por el gen MXAN3415, con ocho dominios transmembrana, es una ATPasa de tipo P<sub>1B-1</sub> que transporta Cu(I).

MXAN3414 (gen H) da lugar a una proteína de localización periplásmica con 200 residuos perteneciente a la superfamilia de proteínas del citocromo *c* que presenta la

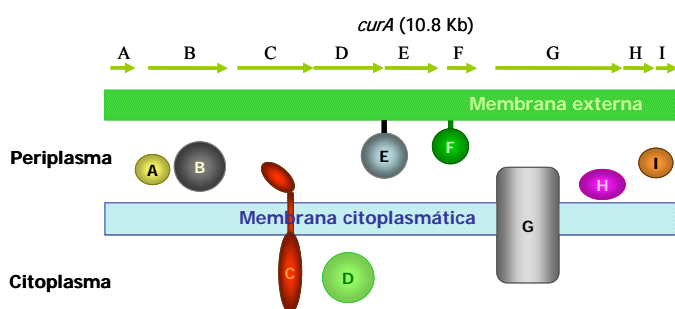
## Resultados

secuencia consenso para el motivo centro citocromo *c*, CXXCH, entre los residuos 89 y 93.

Por último, MXAN3413 (gen I) codifica una proteína hipotética periplásmica de 141 residuos que no presenta dominios funcionales representativos y tan sólo muestra muy baja homología con proteínas chaperoninas.

La estructura genómica del cluster *curA* no se ha encontrado en ninguno de los genomas descritos hasta el momento.

La Fig. 25 muestra un esquema de la localización teórica en la célula de los distintos componentes del cluster *curA*.



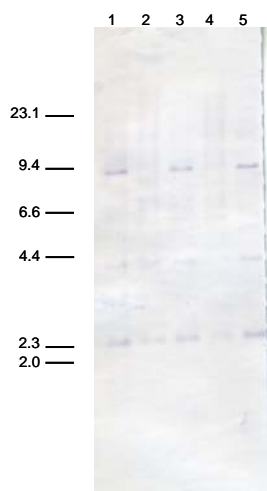
**Figura 25.** Esquema de la localización de los componentes del cluster *curA*.

### D.III.3. Determinación del perfil de expresión del gen *cuoA*

Para estudiar el perfil de expresión del gen *cuoA* se construyó una cepa de *M. xanthus* que contenía una fusión del gen *lacZ* de *E. coli* con el promotor de *cuoA* utilizando el vector pKY481 (Cho y Zusman, 1999). Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 823 pb abarcando la región del promotor de *cuoA*. Para amplificar ese fragmento se utilizaron los oligonucleótidos *lcsABamA* y *lcsAKpn* (Tabla 5 del Material y Métodos). El producto amplificado se clonó en el vector pKY481 utilizando las dianas *Bam*HI y *Kpn*I.

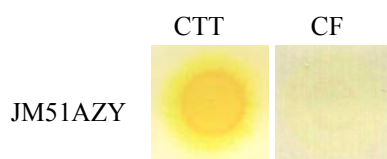
El plásmido resultante se denominó pKY481-CuoA, se dializó y se introdujo en la bacteria silvestre de *M. xanthus* por electroporación, integrándose en el cromosoma en un único evento de recombinación homóloga, y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de Southern blot (Fig. 26).

En la Fig. 26 se puede observar el Southern blot realizado para comprobar la obtención de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* de *M. xanthus*. Las calles 2 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control; y las calles 1, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. La digestión se realizó con *Xho*I y como sonda se utilizó el producto de PCR amplificado por el par de oligonucleótidos utilizados para construir la fusión (Tabla 5). Esta sonda hibrida con dos fragmentos, uno de 4.1 kb y otro de 2.4 kb, en el caso del silvestre. Y en el caso de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* la sonda hibrida con tres fragmentos: uno de 9.1 kb, otro de 4.1 kb y uno de 2.4 kb. Se seleccionó la colonia positiva de la calle 5 y se designó como JM51AZY.



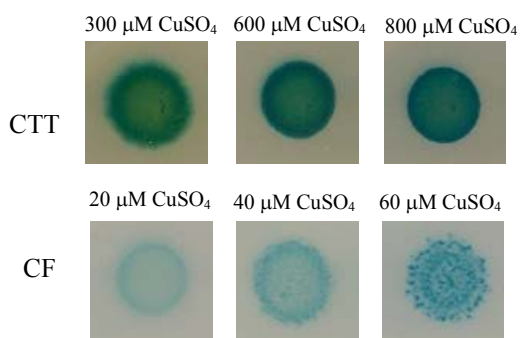
**Figura 26.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* de *M. xanthus*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

El análisis de la expresión del gen *cuoA* se realizó en un primer momento de manera cualitativa siguiendo el procedimiento descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.8.2.), en ausencia de cobre añadido, y se llevó a cabo tanto durante el crecimiento vegetativo, en medio CTT, como durante el ciclo de desarrollo, en medio CF, suplementados con el sustrato X-gal. Se observó que en ambos casos, el gen *cuoA* se expresaba a niveles indetectables (Fig. 27).



**Figura 27.** Expresión del gen *cuoA* en ausencia de cobre añadido al medio a las 48 h de incubación.

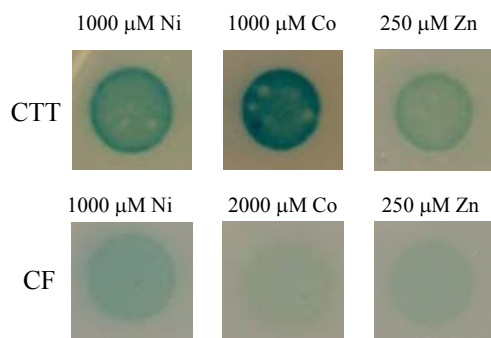
Sin embargo, en un medio de cultivo suplementado con cobre, los niveles de expresión del gen *cuoA* aumentaban tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 28).



**Figura 28.** Expresión del gen *cuoA* en presencia de cobre añadido al medio a las 48 h de incubación.

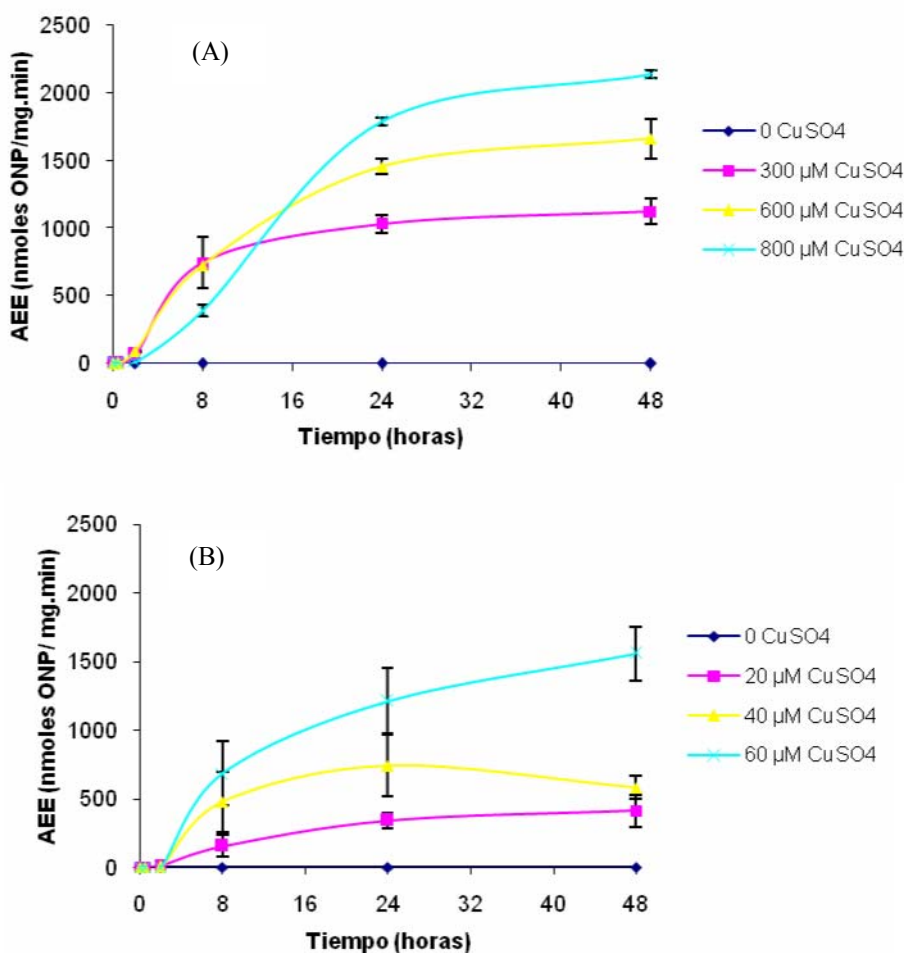
Por otro lado se comprobó que el gen *cuoA* también es inducible por metales divalentes como el níquel, cobalto y zinc, en las dos etapas del ciclo de vida (Fig. 29), aunque responde principalmente a cobre.

## Resultados



**Figura 29.** Expresión del gen *cuoA* en presencia de otros metales divalentes a las 48 h de incubación.

Con el fin de determinar si la expresión del gen *cuoA* era dependiente de cobre se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa añadiendo al medio diferentes concentraciones de este metal. La actividad se determinó siguiendo el protocolo descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.8.3.), y fue medida tanto en CTT como en CF (Fig. 30A y B).



**Figura 30.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica dependiente de cobre de la cepa JM51AZY durante el crecimiento vegetativo (A) y durante el ciclo de desarrollo (B).

El análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión con el promotor del gen *cuoA* mostró una alta dependencia de cobre externo. En el caso del crecimiento vegetativo (Fig. 30A), el promotor de *cuoA* era inducido conforme las concentraciones de iones Cu(II) iban aumentando, alcanzando niveles

máximos a concentraciones de cobre subinhibitorias (800  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ). En resumen, el promotor de *cuoA* responde a un amplio rango de concentraciones de cobre, mostrando una dependencia lineal de cobre externo. La expresión aumenta con el tiempo hasta alcanzar una meseta entre las 24 y 48 h de incubación con cobre. En el caso del ciclo de desarrollo (Fig. 30B), para poder analizar la expresión del promotor del gen *cuoA* fue necesario utilizar concentraciones de cobre 10 veces más bajas que para el crecimiento vegetativo con el fin de evitar la muerte de las células. El perfil y los niveles de expresión observados para *cuoA* en este caso fueron muy similares a los mostrados durante el crecimiento vegetativo a pesar de utilizar una concentración de cobre 10 veces menor. Esto indica que durante el ciclo de desarrollo, la cantidad de cobre requerida para alcanzar los máximos niveles de expresión es 10 veces más baja. Al igual que durante el crecimiento vegetativo se observó una dependencia lineal de cobre externo.

#### D.III.4. Estudio de la topología de la proteína CuoA

Mediante análisis bioinformáticos observamos que la secuencia de la proteína CuoA contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, lo que indica que debe ser secretada al espacio periplásmico mediante el sistema de secreción Sec (Berks *et al.*, 2005). Con el fin de comprobar que la proteína CuoA se secreta por dicho sistema y que es una proteína periplásmica, construimos dos fusiones traduccionales entre el gen *cuoA* de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*. Una de ellas se construyó en el codón que definimos como codón de iniciación y se llamó JM51AZY, que fue la cepa empleada para analizar el perfil de expresión del gen *cuoA* (ver apartado D.III.3.), y la otra fusión fue construida en otro codón después del péptido señal. Esta cepa se llamó JM51ADWZY (Fig. 31).



**Figura 31.** Esquema de la construcción de las fusiones *lacZ* con el gen *cuoA* para el estudio de la topología de la proteína CuoA. PS indica el péptido señal.

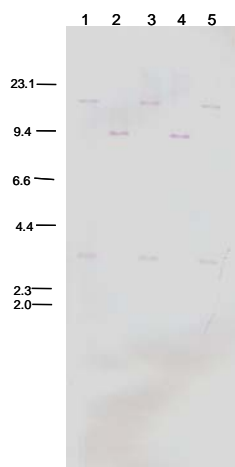
La determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa para las cepas portadoras de ambas fusiones permite establecer la topología de la proteína CuoA, ya que la enzima  $\beta$ -galactosidasa sólo es activa cuando se encuentra localizada en el citoplasma celular, pero no en el periplasma (Göt y Boos, 1998). De esta manera, al expresarse ambas fusiones, la enzima  $\beta$ -galactosidasa generada presentará una localización celular diferente en cada caso. Así, en el caso de la fusión realizada en el codón de inicio, la enzima  $\beta$ -galactosidasa se localizaría en el citoplasma, de manera que dicha proteína sería activa, mientras que en la segunda fusión la enzima  $\beta$ -galactosidasa sería translocada al periplasma por el sistema Sec tras el reconocimiento del péptido señal y por tanto sería inactiva, indicando que la localización de la proteína CuoA sería periplásmica.

Para la construcción de la fusión JM51ADWZY se utilizó nuevamente el vector pKY481. La fusión se realizó en un codón ATG situado después del péptido señal. Para

## Resultados

ello se amplificó por PCR un fragmento de 816 pb utilizando el par de oligonucleótidos lcsAXhoF-lcsABamR (Tabla 3 del Material y Métodos). El producto amplificado se clonó en el vector pKY481 utilizando las dianas *XhoI* y *BamHI*.

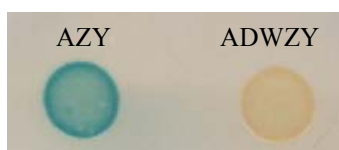
El plásmido resultante se denominó pKY481-FICuoA y se introdujo en la bacteria silvestre de *M. xanthus* por electroporación, integrándose en el cromosoma en un único evento de recombinación homóloga, y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de Southern blot (Fig. 32).



**Figura 32.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con un región intermedia del gen *cuoA*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En la Fig. 32 se puede observar el Southern blot para comprobar la fusión JM51ADWZY. Las calles 2 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, y las calles 1, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. La digestión se realizó con el enzima *BamHI* y como sonda se utilizó el producto de PCR amplificado por el par de oligonucleótidos empleados para construir la fusión (Tabla 3). El tamaño de los fragmentos esperados era de 9.4 kb en el caso del silvestre, y 3.3 kb y 15.2 kb en el caso de las cepas portadoras de la fusión *lacZ*. Se seleccionó la colonia calle 5 y se designó con el nombre mencionado anteriormente: JM51ADWZY.

Una vez obtenida esta nueva fusión se realizó un análisis cualitativo de la expresión de las dos fusiones con el gen *cuoA*, JM51AZY y JM51ADWZY, en un medio CTT suplementado con una concentración de sulfato de cobre de 600  $\mu\text{M}$  (puesto que el gen *cuoA* no se expresa en ausencia de dicho metal) y el sustrato X-gal. Como se puede observar en la Fig. 33, la fusión realizada en el codón de inicio (AZY) fue activa, mientras que la fusión realizada en un codón aguas abajo del péptido señal (ADWZY) resultó inactiva, indicando que la proteína CuoA se secreta por el sistema Sec al espacio periplásmico. Por tanto, su localización es periplásmica.



**Figura 33.** Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones realizadas para el estudio de la topología de la proteína CuoA. Estas bacterias fueron incubadas 24 h a 30°C en CTT suplementado con una concentración de sulfato de cobre de 600  $\mu\text{M}$  y el sustrato X-gal a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

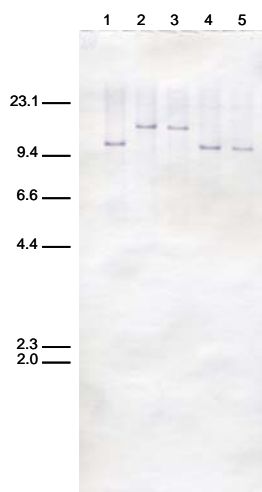
### D.III.5. Estudio de la implicación de la oxidasa multicobre CuoA en la tolerancia al cobre de *M. xanthus*

#### D.III.5.1. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen *cuoA*

Con el fin de determinar la función biológica de CuoA se construyó un mutante de delección en fase para este gen utilizando el vector pBJ113 (Julien *et al.*, 2000) y las directrices generales indicadas en el Material y Métodos (apartado C.II.9.1.).

La obtención de este mutante de delección en fase implicó la eliminación del 98% del gen *cuoA*. Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 823 pb aguas arriba del gen *cuoA* utilizando el par de oligonucleótidos lcsABam2 y lacEco (Tabla 6 del Material y Métodos), y un fragmento de 850 pb aguas abajo del mismo gen utilizando el par de oligonucleótidos lacPst y lacBam2. Los productos amplificados fueron clonados en el vector pBJ113 de manera secuencial utilizando las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para el fragmento aguas arriba, y *BamHI* y *PstI* para el fragmento aguas abajo. Ambos fragmentos quedaban unidos por la diana *BamHI* para permitir que la mutación ocurriera en fase.

El plásmido resultante (pAM $\Delta$ *cuoA*) se dializó y se introdujo en la bacteria silvestre mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot para tratar de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección y los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot para diferenciar aquellos que habían revertido al genotipo silvestre de los que portaban la delección deseada (Fig. 34).



**Figura 34.** Southern blot para comprobar la obtención del mutante de delección del gen *cuoA*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En la Fig. 34 podemos observar el Southern blot realizado para comprobar la obtención del mutante de delección del gen *cuoA* de *M. xanthus*. Las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, y las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. La digestión se realizó con *KpnI* y como sonda se utilizó el producto de PCR amplificado por el par de oligonucleótidos lacPstI-lacBam2 (Tabla 6 del Material y Métodos) que amplificaba el fragmento situado aguas abajo del gen



## Resultados

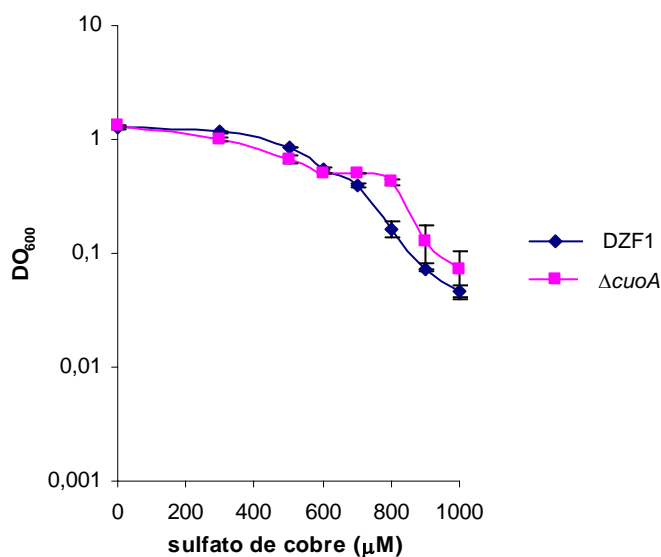
*cuoA*. Los fragmentos esperados fueron de 10.7 kb para el silvestre y 13.9 kb para el mutante de delección. El hecho de que en el caso del mutante apareciera una banda más grande que para el silvestre era debido a que la delección había eliminado un sitio de restricción para el enzima *KpnI*. De las tres muestras analizadas, dos (calles 2 y 3) eran positivas, mientras que la muestra situada en la calle 5 revirtió a silvestre. Se seleccionó la cepa mutante de la calle 2 y se denominó JM51AIF ( $\Delta cuoA$ ).

### D.III.5.2. Estudio de la tolerancia al cobre del mutante de delección $\Delta cuoA$

Una vez construido el mutante de delección para el gen *cuoA* se analizó la implicación de este gen en la tolerancia al cobre estudiando diversos parámetros que pudieran verse afectados por la ausencia de dicho gen.

#### D.III.5.2.1. Crecimiento vegetativo

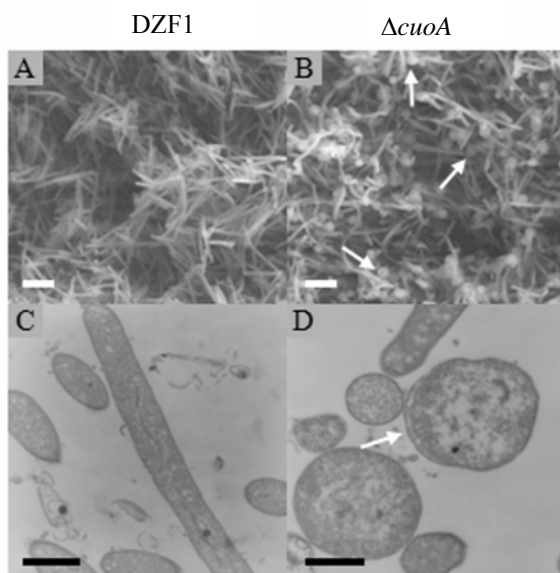
Para analizar la influencia de la delección del gen *cuoA* en la tolerancia al cobre durante el crecimiento vegetativo, dicha cepa así como la bacteria silvestre utilizada como control fueron cultivadas en medio CTT líquido con diferentes concentraciones de cobre siguiendo el procedimiento descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.9.2.1.).



**Figura 35.** Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo del mutante  $\Delta cuoA$  a las 24 h de incubación a 30°C. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

Como se puede observar en la Fig. 35, la tolerancia al cobre del mutante  $\Delta cuoA$  fue muy similar a la de la cepa silvestre. Hasta 700  $\mu\text{M}$  tanto la cepa mutante como la silvestre tuvieron un comportamiento en el crecimiento muy similar. La mayor diferencia se observó a partir 800  $\mu\text{M}$  donde, sorprendentemente, el tiempo de generación para el silvestre aumentó considerablemente con respecto al mutante. A partir de esta concentración, ambas bacterias eran muy sensibles y no crecían por encima de 1000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre.

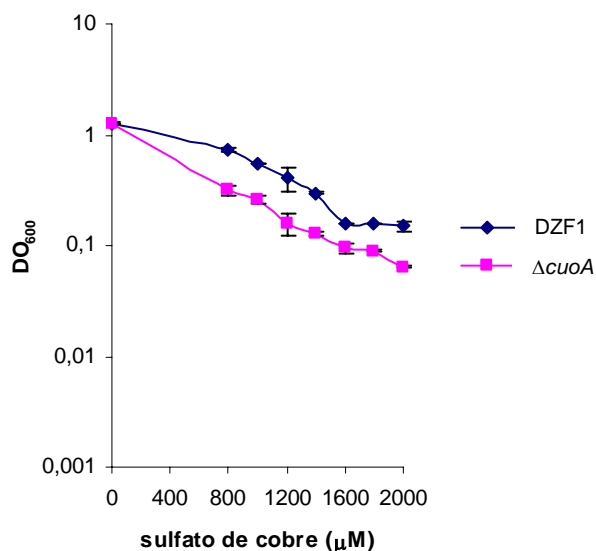
Aunque el mutante  $\Delta cuoA$  y la bacteria silvestre mostraban una tasa de crecimiento muy similar con 700  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, análisis de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido revelaron que las células del mutante presentaban formas alteradas, ya que muchas de ellas (aproximadamente un tercio) eran esféricas en lugar de mostrar la forma habitual de bacilo de *M. xanthus* (Fig. 36). El número de formas esféricas se ve incrementado en el mutante al aumentar la concentración de cobre. Algunas de estas formas esféricas se pudieron observar en el silvestre pero sólo con concentraciones de cobre de 900  $\mu\text{M}$ .



**Figura 36.** Morfología y ultraestructura de las células vegetativas del silvestre (A y C) o de  $\Delta cuoA$  (B y D) crecidas en medio CTT que contiene 700  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre. Las micrografías fueron tomadas con SEM (A y B) y TEM (C y D) después de 72 h de incubación. Las barras representan 3  $\mu\text{M}$  en A y B, y 5  $\mu\text{M}$  en C y D. Las flechas en la imagen B señalan formas esféricas, mientras que en la imagen D señalan un punto donde la distancia entre las membranas externa e interna es inusual.

Una posible explicación para el hecho paradójico de que las células del mutante muestren una morfología alterada y sin embargo toleren las mismas concentraciones de cobre que el silvestre, es que la falta de la proteína CuoA impediría una correcta destoxicación de cobre del espacio periplásmico, de manera que el metal se acumularía en dicho espacio provocando la rotura del peptidoglucano de la pared celular que alteraría la forma de la célula. Simultáneamente, esta falta de destoxicación induciría otros mecanismos implicados en la resistencia al cobre, suficientes para mantener, e incluso incrementar, la viabilidad de las células, pero no destoxicar el espacio periplásmico. De este modo, las células del mutante sobrevivirían en presencia de altas concentraciones de cobre, como las células del silvestre, pero no como largos bacilos, si no como formas esféricas. Si esto es cierto, las células del mutante que han crecido en presencia de cobre para inducir todos los mecanismos implicados en la resistencia deberían ser más sensibles al metal que las células del silvestre. Para comprobar esta hipótesis, las células del mutante y las del silvestre fueron crecidas en medio CTT líquido con una concentración de 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre (con el fin de inducir todos los mecanismos de resistencia al cobre) durante 24 h a 30°C. En ese momento, estas células preincubadas con cobre fueron diluidas en medio CTT nuevo que contenía concentraciones de cobre más altas. Como se puede observar en la Fig. 37, las células del mutante  $\Delta cuoA$  fueron ligeramente más sensibles a cobre que las células del silvestre bajo estas condiciones, lo cual es consecuente con nuestra hipótesis inicial.

## Resultados

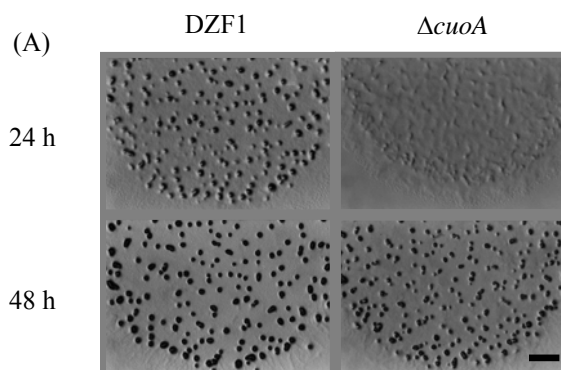


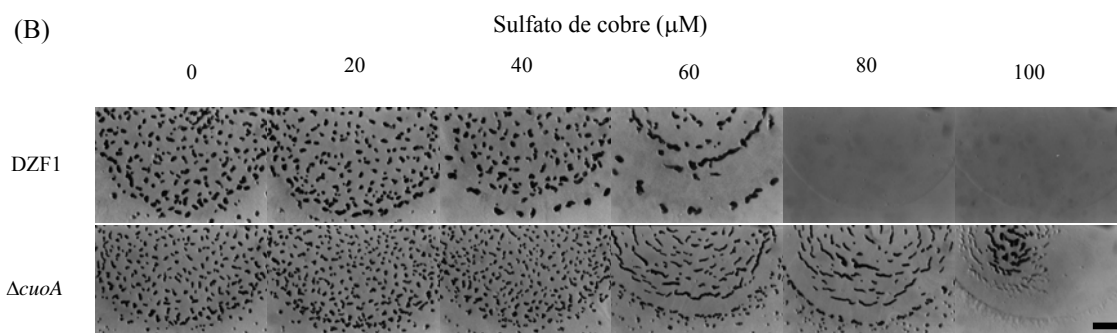
**Figura 37.** Tolerancia al cobre de las células del mutante  $\Delta cuoA$  preincubadas con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre e incubadas durante 24 h a 30°C con concentraciones más altas de dicho metal. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

### D.III.5.2.2. Ciclo de desarrollo

Para estudiar el papel de la oxidasa multicobre *CuoA* durante el ciclo de desarrollo, el mutante de delección y la cepa silvestre se cultivaron en medio CF.

En ausencia de cobre añadido al medio (Fig. 38A), la cepa mutante presentó un retraso en el ciclo de desarrollo a las 24 h de incubación con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, a partir de las 48 h ambas bacterias alcanzaron el mismo nivel de desarrollo. En presencia de cobre (Fig. 38B), observamos que ambas cepas fueron 10 veces más sensibles al metal que durante el crecimiento vegetativo. El mutante presentó una mayor tolerancia a cobre que el silvestre, formando cuerpos fructificantes hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, mientras que el silvestre sólo resistió hasta una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Este hecho indica que en ausencia de *CuoA*, la adición de cobre hace que se induzcan otros sistemas encaminados a conferir resistencia a este metal.



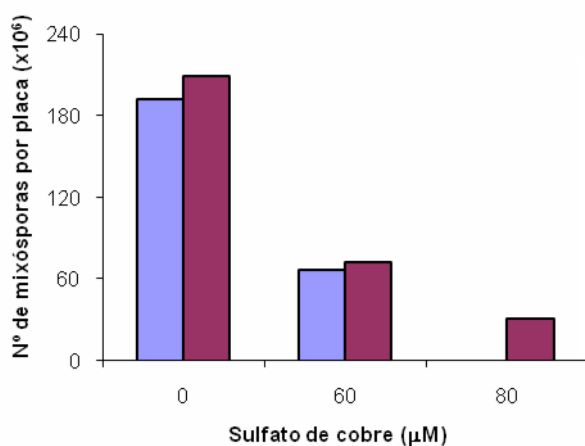


**Figura 38.** (A) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante  $\Delta\text{cuoA}$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a  $30^\circ\text{C}$  durante los períodos de tiempo indicados. (B) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante  $\Delta\text{cuoA}$  en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a  $30^\circ\text{C}$  hasta las 72 h. La barra representa 1 mm.

#### D.III.5.2.2.1. Esporulación

El análisis de la eficiencia de esporulación desarrollada por el mutante  $\Delta\text{cuoA}$  respecto a la cepa silvestre permite valorar el efecto de la delección del gen *cuoA* en el proceso de esporulación. El método empleado para ello ha sido el recuento de mixósporas producidas por ambas bacterias en medio CF durante el ciclo de desarrollo en dos condiciones diferentes: en ausencia de cobre, y en presencia de diferentes concentraciones de dicho metal.

En ausencia de cobre añadido al medio, el número de mixósporas del mutante  $\Delta\text{cuoA}$  fue muy similar al de la cepa silvestre. Lo mismo ocurrió en presencia de cobre en el medio. Sin embargo, en este último caso, el número de mixósporas, tanto para el silvestre como para el mutante, fue descendiendo en la misma proporción en la que aumentaba la concentración de metal (Fig. 39). Esto parece indicar que es el propio cobre el que hace que disminuya la formación de esporas pero no la ausencia de *CuoA*. Asimismo, el mutante no solamente formaba agregados a concentraciones de cobre que no puede tolerar el silvestre, sino que además mantenía su capacidad para formar mixósporas (Fig. 39).

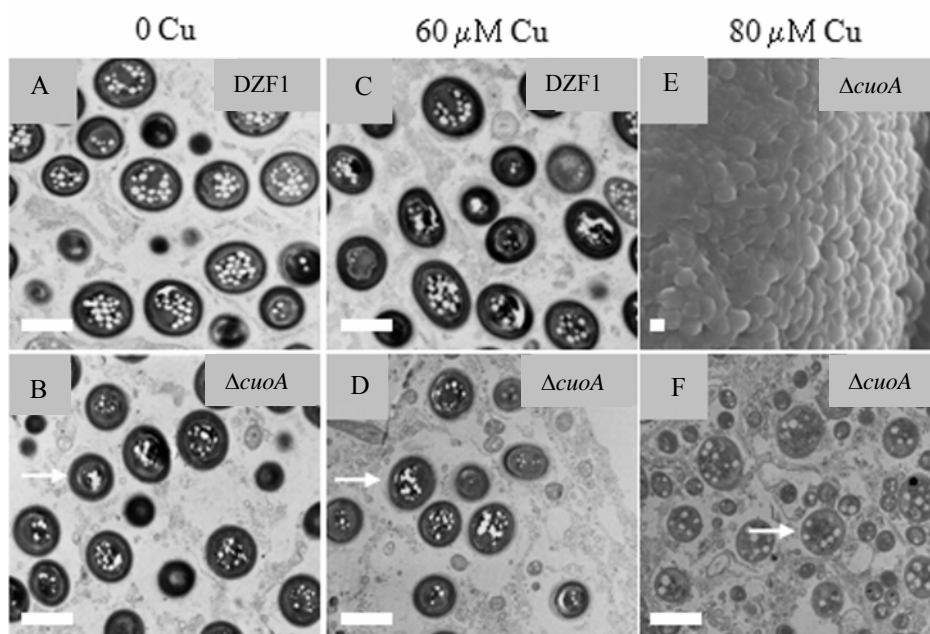


**Figura 39.** Cuantificación de esporas para las cepas silvestre (en azul) y  $\Delta\text{cuoA}$  (en rosa) a las 72 h de incubación. En la concentración de  $80 \mu\text{M}$  sólo se muestra el recuento para el mutante puesto que el silvestre no forma cuerpos fructificantes, y por tanto esporas, a esta concentración de sulfato de cobre.

Para tratar de apreciar diferencias en la morfología de las esporas producidas tanto por la bacteria silvestre como por la mutante, se llevó a cabo la preparación de muestras para su observación a los microscopios electrónicos de transmisión (TEM) y

## Resultados

barrido (SEM) (Fig. 40). Estos estudios revelaron que en el caso de  $\Delta cuoA$ , la cubierta de la espora se hacía gradualmente menos densa a los electrones conforme aumentaba la concentración de cobre, desapareciendo completamente con 80  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre (comparar paneles B, D y F en la Fig. 40). Estas células obtenidas con 80  $\mu\text{M}$  de cobre fueron muy diferentes a las formas esféricas observadas durante el crecimiento vegetativo para este mutante. En primer lugar, estas células sólo fueron observadas en los agregados y no en la población de bacilos periféricos de alrededor de los cuerpos fructificantes. En segundo lugar, estas células presentaban el mismo tipo de cuerpos de inclusión observados en las mixósporas normales (Fig. 40). Y por último, algunas de estas células fueron capaces de germinar. Esto parece indicar que la proteína CuoA está implicada en la correcta formación de las cubiertas de la espora en presencia de cobre.



**Figura 40.** Efecto del cobre en la cubierta de la espora. Los cuerpos fructificantes de la bacteria silvestre y  $\Delta cuoA$  fueron recogidos de las placas de CF que contenían las concentraciones de sulfato de cobre indicadas y fueron tratadas como se describe en el Material y Métodos (apartado C.II.2.). Todas las fotos fueron tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM) a excepción de la foto E que fue tomada con microscopio electrónico de barrido (SEM). Las barras indican 1  $\mu\text{m}$ . Las flechas en los paneles B, D y F señalan la cubierta externa de las mixósporas.

### D.III.5.2.2.2. Germinación

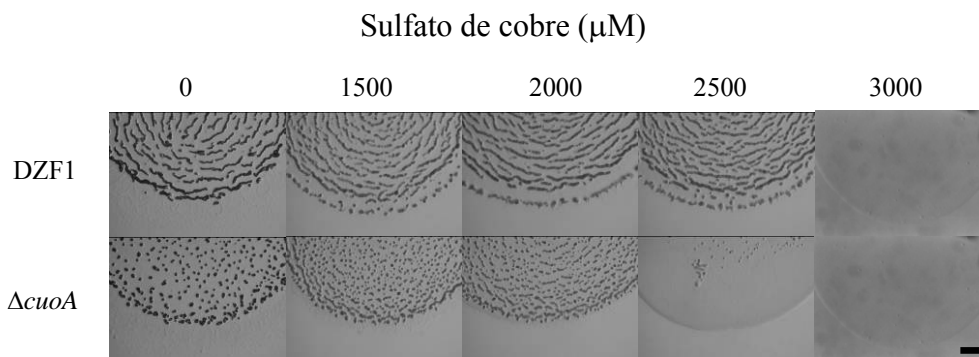
Una vez comprobado que entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta cuoA$  no había diferencias en cuanto a la producción de mixósporas, se trató de estudiar la viabilidad relativa de esas esporas producidas por ambas bacterias tanto en ausencia como en presencia de cobre.

En el caso de las esporas producidas en ausencia de cobre, su capacidad para germinar fue muy similar para las bacterias silvestre y mutante, con una eficiencia de germinación del 11% para ambas bacterias. Mientras que las esporas producidas en presencia de cobre presentaron una capacidad de germinación reducida con respecto a las producidas en ausencia de este metal. Sin embargo, las del mutante presentaron una mayor capacidad de germinación con respecto a las del silvestre. Esto es consecuente

con el hecho de que las células del mutante son más resistentes al cobre que las del silvestre. Así, sólo el 0.3% de las esporas del silvestre obtenidas en una concentración de cobre de 60  $\mu\text{M}$  fueron capaces de germinar con respecto al 4.4% de las esporas obtenidas para el mutante  $\Delta\text{cuoA}$  para esa misma concentración de cobre. Además, para el mutante se observó que no sólo producía esporas a la concentración de 80  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, si no que además estas esporas fueron capaces de germinar con una eficiencia de germinación del 0.13%.

#### D.III.5.2.2.3. Ciclo de desarrollo en células inducidas con cobre

De la misma manera que durante el crecimiento vegetativo estudiamos el fenotipo de la bacteria mutante  $\Delta\text{cuoA}$  cuando previamente la cultivábamos en un medio con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre para inducir todos los mecanismos de resistencia al cobre, decidimos estudiar que ocurría durante el ciclo de desarrollo en estas condiciones. Para ello se crecieron las células, tanto el mutante como la bacteria silvestre utilizada como control, en medio CTT líquido con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre. A continuación, las células fueron concentradas a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 en medio CF con diferentes concentraciones de cobre, superiores a las utilizadas en el experimento con las células sin inducir. En estos experimentos observamos que al igual que ocurría durante el crecimiento vegetativo, la bacteria mutante fue más sensible a cobre, formando cuerpos fructificantes solamente hasta 2000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, a diferencia del silvestre, que fue capaz de formarlos a una concentración de 2500  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre (Fig. 41). En estas concentraciones más altas de cobre las células mutantes no fueron capaces de sobrevivir.

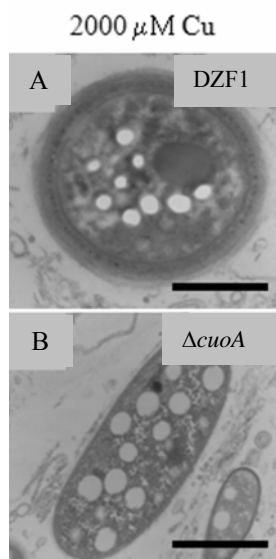


**Figura 41.** Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y  $\Delta\text{cuoA}$  de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C hasta las 72 h. La barra representa 1 mm.

En este caso en el que el ciclo de desarrollo es llevado a cabo por células que habían sido crecidas previamente con una concentración de sulfato de cobre de 600  $\mu\text{M}$ , la ultraestructura de las esporas de la bacteria mutante fue totalmente diferente a la de la bacteria silvestre. En micrografías de microscopio electrónico de transmisión (TEM) pudimos observar que la cubierta de las esporas que se encontraban en el interior de los agregados llegaba a desaparecer en el caso del mutante (Fig. 42B). Además, la morfología de las células mutantes también estaba afectada y más del 90% no era capaz de diferenciarse permaneciendo como cortos bacilos. A diferencia del mutante, muchas

## Resultados

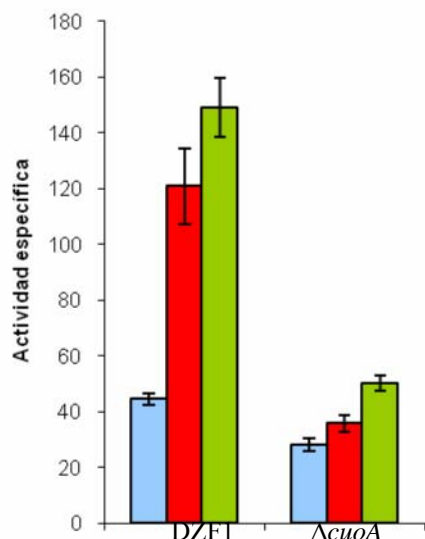
de las esporas de la bacteria silvestre mostraban una envuelta celular inalterada (Fig. 42A).



**Figura 42.** Morfología de las esporas de las bacterias silvestre y  $\Delta cuoA$  formadas por células crecidas previamente con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre y concentradas a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 en medio CF que contiene 2000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre. Los cuerpos fructificantes fueron recogidos de las placas de CF y tratados como se describe en el Material y Métodos (apartado C.II.2.). Las fotos fueron tomadas con microscopio electrónico de transmisión (TEM). Las barras representan 0.5  $\mu\text{m}$ .

### D.III.5.3. Actividad cuproso oxidasa en los extractos celulares de *M. xanthus*

Se ha demostrado que las oxidasas multicobre tienen capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos aromáticos (fenólicos y no fenólicos) y también iones metálicos tales como el ión cuproso. Para investigar cómo la oxidasa multicobre *CuoA* de *M. xanthus* lleva a cabo esta función, se buscaron varias actividades enzimáticas en extractos celulares obtenidos de la bacteria silvestre DZF1 a partir de células que habían sido crecidas tanto en ausencia como en presencia de cobre. Se probó el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y el DMP (2,6-dimetoxifenol). No se detectó actividad oxidativa de ninguno de los compuestos aromáticos probados cuando se usaron extractos celulares crudos obtenidos de células crecidas en ausencia de cobre y de células incubadas con este metal. En cambio, fuimos capaces de medir actividad cuproso oxidasa en extractos crudos de la cepa silvestre y la mutante  $\Delta cuoA$  obtenidos a partir de células recogidas después de haber estado creciendo 24 h en ausencia de cobre. Además, observamos cambios significativos en los extractos celulares obtenidos a partir de células que habían sido crecidas en presencia de concentraciones de cobre crecientes (Fig. 43). Las células del silvestre crecidas en presencia de 300 o 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre mostraron un incremento de 2.7 o 3.4 veces respectivamente en la actividad enzimática comparado con las células crecidas en ausencia de cobre. Además, se observó que la actividad cuproso oxidasa de los extractos celulares procedentes de las células del mutante  $\Delta cuoA$  a todas las concentraciones de cobre probadas estaba claramente reducida (Fig. 43). Estos resultados indican que *CuoA* está implicada en la detoxificación del citoplasma a través de la oxidación de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(II)}$ .



**Figura 43.** Actividad cuproso oxidasa en extractos celulares crudos de células de DZF1 y  $\Delta cuoA$  recogidas después de 24 h de crecimiento en ausencia de cobre (barras azules) o en presencia de 300  $\mu M$  (barras rojas) o 600  $\mu M$  (barras verdes) de sulfato de cobre.

#### D.III.5.4. Estudio de la tolerancia a otros metales del mutante de delección $\Delta cuoA$

Una vez comprobada la tolerancia al cobre del mutante  $\Delta cuoA$  se decidió estudiar la tolerancia de este mutante a otros metales como níquel, zinc, cobalto, cadmio, plata, ión férrico e ión ferroso. Nuevamente se utilizó la bacteria silvestre como control y el estudio se realizó tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo.

En la Tabla 9 se muestra el cociente de tolerancia (tolerancia de crecimiento de las células vegetativas respecto a la tolerancia de las células en el ciclo de desarrollo) de diferentes metales para la bacteria  $\Delta cuoA$ . Como se puede observar, al igual que ocurría con la bacteria silvestre (Tabla 7), el cociente de tolerancia para el cobre es mucho más alta que para el resto de los metales probados, siendo mayor para el silvestre puesto que las células del mutante durante el ciclo de desarrollo son más resistentes a dicho metal.

**Tabla 9.** Tolerancia de diferentes metales de la bacteria  $\Delta cuoA$  durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. La razón de tolerancia se ha calculado como el cociente entre la máxima concentración de metal donde se observó viabilidad en el crecimiento vegetativo y la máxima concentración de metal donde se observó viabilidad durante el ciclo de desarrollo.

| Metal            | Máxima concentración de metal (mM)<br>que permite la viabilidad en el medio |      | Razón de tolerancia<br>(CTT/CF) |
|------------------|---|------|---------------------------------|
|                  | CTT   | CF   |                                 |
| Cu <sup>2+</sup> | 1.0   | 0.1  | 10.0                            |
| Ni <sup>2+</sup> | 6.0   | 4.0  | 1.5                             |
| Zn <sup>2+</sup> | 0.5   | 0.5  | 1.0                             |
| Co <sup>2+</sup> | 1.0   | 3.0  | 0.33                            |
| Cd <sup>2+</sup> | 0.3   | 0.1  | 3.0                             |
| Ag <sup>+</sup>  | 0.2   | 0.25 | 0.8                             |
| Fe <sup>2+</sup> | 6.0   | 7.0  | 0.85                            |
| Fe <sup>3+</sup> | 2.0   | 1.0  | 2.0                             |

Estos resultados son similares a los de la cepa silvestre. En general no cambia el cociente de tolerancia para la mayoría de los metales, excepto que al igual que ocurría con el cobre, el mutante es más resistente a la plata.



## D.IV. ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS REGULADORES DE LA OXIDASA MULTICOBRE CuoA

### D.IV.1. Búsqueda de elementos reguladores de la oxidasa multicobre CuoA

En *E. coli* y otras bacterias entéricas, algunos de los promotores de genes inducibles por cobre están precedidos por secuencias palindrómicas denominadas “copper box” reconocidas por los reguladores transcripcionales CueR o CusR de *E. coli* (Outten *et al.*, 2000b; Rensing y Grass, 2003). Un análisis exhaustivo de las secuencias aguas arriba del gen *cuoA* y el gen anterior demostró que estas secuencias no estaban presentes. Esto sugiere que el gen *cuoA* está regulado por factores de transcripción que detectan cobre de forma diferente a CueR y CusR de *E. coli*.

Debido a que en la mayoría de los casos los genes suelen estar regulados por otros genes que se localizan en sus proximidades (Leonhartsberger *et al.*, 2001), se estudió si el gen *cuoA* estaba regulado por un sistema regulador de dos componentes codificado por los genes MXAN3419 y MXAN3418 y al que denominamos CorSR. Este sistema de dos componentes se localiza en el cluster *curA* (Fig. 24). Para ello se construyó un mutante de delección en fase en el que se eliminó casi la totalidad de dicho sistema y al que se llamó  $\Delta corSR$ . Una vez construido dicho mutante, se utilizó como fondo genético para introducir la fusión *lacZ* del gen *cuoA* y estudiar el perfil de expresión de dicho gen en el mutante  $\Delta corSR$ .

#### D.IV.1.1. Análisis de la secuencia de los genes *corSR* y de las proteínas que codifican

El sistema regulador de dos componentes CorSR está formado por una histidina quinasa a la que hemos denominado CorS (MXAN3419) y un regulador de respuesta al que hemos denominado CorR (MXAN3418).

En las Fig. 44 y 45 se muestran las secuencias de nucleótidos de los genes *corS* y *corR* de *M. xanthus*, así como la secuencia deducida de aminoácidos de las proteínas codificadas por dichos genes. Como codón de iniciación se consideró en los dos casos un codón alternativo de tipo GTG, destacado en verde. Este triplete de iniciación, bastante común en los genes de *M. xanthus*, se encuentra en la misma pauta de lectura que el codón de terminación de la secuencia, TGA para el gen *corS* y TAA para el gen *corR*, destacados en rojo, e inicia una pauta de lectura con el uso de codones característico de *M. xanthus*.

Por tanto, el gen *corS* está constituido por 1428 pb y codifica para una proteína de 475 aminoácidos con un peso molecular estimado de 51.6 kDa. El gen *corR*, por su parte, está constituido por 1401 pb y codifica para una proteína de 466 aminoácidos con un peso molecular estimado de 51.4 kDa. Ambos genes presentan G o C en la tercera posición del codón en el 86% de los tripletes para *corS* y en el 85% para *corR*, lo que supone un uso de codones típico de microorganismos con un alto contenido en G+C (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993).

```

acttgcagcgcgcaccacattggcctgcctgttgctaaatccctaccttgcgttgcggAGGGGAgtgc
GTG TCC GGA ACC GCT CGC AGG CTC TTA TAC GCC TTC TCG CTC CTC GTC CTG
V S G T A R R L L Y A F S L L V L
ACC TTC GGC GCG GCA GCC TAT GCC GCG CTC GAG GGC ATG GCG GAG ATC CAC
T F G A A Y A A L E G M A E I H
GAG GCC CTG CAC AGC GTG CGG CGG CAG GAA ACG GCC GTG CGC ACC ACG CTG
E A L H S V R R Q E T A V R T T L
TCG CTC GCG ACC TCG GTG CGA GAC CTC TAC GCA CAC CAG GCG CAC ACC GTC
S L A T S V R D L Y A H Q A H T V
ATC CTC GGC AAC GCC AGC CAC CTG CCG CTC TAT GAC AGC GCC TAT CAC CGT
I L G N A S H L P L Y D S A Y H R
GCC ATG GAG CGG CTC GAA GCG GTA CAA GCC CAG GCC ACC ACC TCC GAG GAA
A M E R L E A V Q A Q A T T S E E
CGC GCC CAG GTG GAG ACC ATG CGC CGC ACC ACG ACG GAG CTG GAC CGG CTT
R A Q V E T M R R T T T E L D R L
TTC CGC GAG GCG CTC GTG CCA GCC GTG CTG CGC GAG GAC CAC GCC ACC ACG CGG
F R E A L V P A V L R E D H A T A
GCC CGT GAA CAC GCC AGG GCC CTG GAA CTG GTC GAC GTC ATC CAG GAG AGC
A R E H A R A L E L V D V I Q E S
GCG GAC ACC CTG GCC TCG CAC TAC GAG CGC GCC ATT GGC AAC TTC GAG GAG
A D T L A S H Y E R A I G N F E E
CAC GCG AGC ACG GTC CAG CAC GCC AGC TTC CAG TGG ACG GTC GCC ATC CTG
H A S T V Q H A S F Q W T V A I L
GCC GCC GCC GCC CTG CTC GCG GCG GGC GTA GGC CTC TAC ATC GGC CGC TCG
A A A A L L A A G V G L Y I G R S
GTG GCC CGC CCG GTT TCA CTG CTG GAG GCC GGC GCG GCC CGT ATC GCC GCG
V A R P V S L L E A G A A R I A A
GGC GAC CTC ATG ACT CGC ATC GCG CTG GAC CGC CCG GAT GAG TTC GGA AGG
G D L M T R I A L D R P D E F G R
CTG GCG CAG CAG TTC AAC CGG ATG ACC GCC GCG CTA CGC GAG CAC CAG GAG
L A Q Q F N R M T A A L R E H Q E
CGC CTG GTT CAA AGC GAG CGG CTG GCG GGC ATC GGC CGC CTC GCG GCG GGC
R L V Q S E R L A G I G R L A A G
GTG GCG CAT GAA ATC AAC AAT CCC CTA GGG GTC ATC CTC GGC TAC GTG CGC
V A H E I N N P L G V I L G Y V R
CTG CTT CAG CGC AAG GCG GAG GGT GCG CTC GCG GAC GAC CTG CGC ATC ATC
L L Q R K A E G A L A D D L R I I
GAA GAG GAG ACG CTG CGC TGC GTG GAT ATC GTG GAG GGC ATG CTC GAC CTG
E E E T L R C R D I V E G M L D L
TCG CGG CCC CTC CAG GTC CCG GGC GAG ACG CTG GAG CTG CGA GAG CTG GTG
S R P L Q V P G E T L E L R E L V
GAG GAA GTC GTC TCC CGG CAG CGG GAG TCC GCC CAG CAC TCC GCG GCA TCC
E E V V S R Q R E S A Q H S A A S
CTG ACG GTG GAA GGC GAA GCC CAG GTG GCA GGG CAT CCG CAG CGG CTG CGG
L T V E G E A Q V A G H P Q R L R
CAG GTG GTC ACG AAC CTG GTC AAG AAC GCC ATG GAG GCC GCA GGT CCC TCT
Q V V T N L V K N A M E A A G P S
GGA CAG GTG ACA GTG GCC ATC CAG GCC CAC GAA GGC GAG GTG GCG CTT TCA
G Q V T V A I Q A H E G E V A L S
TTC CGC GAC AGC GGG CCC GGC CTC TCT CCC GAG GCA CAG AAG CGG ATG TTC
F R D S G P G L S P E A Q K R M F
GAG CCC TTC TTC ACC ACC AAA CCC CAT GGC ACC GGG CTG GGG TTG GCG GTG
E P F F T T K P H G T G L G L A V
TCG CAG GCC ATC GCC CAG GCC CAT GGT GGG CGC ATC CAG CCG CGC AAC CTG
S Q A I A Q A H G G R I Q P R N L
CCT GGA CGT GGT GCG GAA TTC ACC CTG CAT CTC CCC CGG AGT ACG CCG TGA
P G R G A E F T L H L P R S T P Stop
cggacagaccgagtggttctcgttgcgacgacaaggagaaacatgcccacctcatcaccgcgattctc

```

**Figura 44.** Secuencia nucleotídica del gen *corS* (MXAN3419) de *M. xanthus*. En naranja se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la histidina quinasa CorS. En verde se muestra el codón de iniciación, en rojo el codón de terminación y en amarillo un posible sitio de unión al ribosoma.

Resultados

```

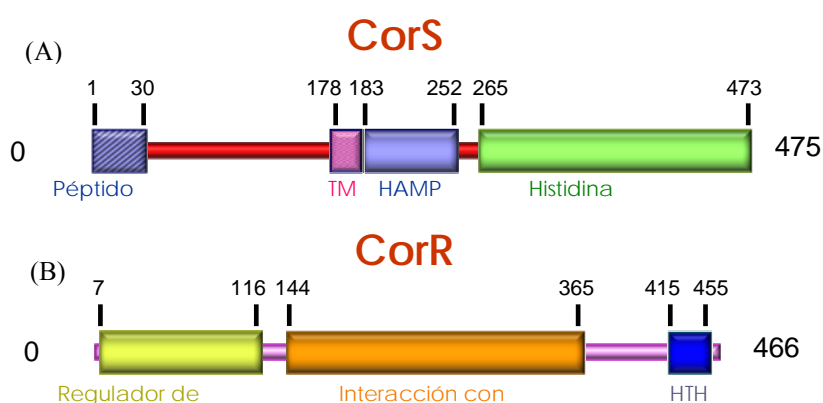
catccagccgcgcaacctgcctggacgtgggtgcggaattcaccctgcatctccccgggagtagcgcg
GTG ACG GAC AGA CCG AGT GTT CTC GTT GTC GAC GAC AAG GAG AAC ATG CGC
V T D R P S V L V V D D K E N M R
CAC CTC ATC ACC CGC ATT CTC GGT GAC GCT TAT CAG GTG AGG ACG GCT GAA
H L I T R I L G D A Y Q V R T A E
GAC GGA GGC CGT GCG CTC TCC CTC ATC CAG ACG CAG CCG TTC GAC GTG GTG
D G G R A L S L I Q T Q P F D V V
GTG ACG GAC ATC CGA ATG CCA GGA GCG GAC GGC TTC GAG GTG CTC AAG GCC
V T D I R M P G A D G F E V L K A
GTC AAG CAG CAC GCG CCC ACC ACC GAG GTC ATC CTG ATG ACG GCG TAC GCC
V K Q H A P T T E V I L M T A Y A
TCC GTC CCC AAG GCG GTA GAG GCC ATC AAG GAG GGG GCC TAC GAC TAC CTG
S V P K A V E A I K E G A Y D Y L
CCC AAG CCC TTC GAC CCG GAC GAG GCG TCC CTG GTG GTA GCC CGC GCC GTC
P K P F D P D E A S L V V A R A V
GAG CGC AAG CGG CTC AAG GAG CAG GCC GCC TCA CTG CGG CGC GAG CTG GAG
E R K R L K E Q A A S L R R E L E
GGC ATC TAC AGC TTC CAG AAC ATC ATT GGC AGG AGC GCG CCC ATG CGT GCG
G I Y S F Q N I I G R S A P M R A
CTC TAC GGC CTG CTG GAG CGC GCC TCC CAG TTG GAC ATC ACG GTG CTC ATC
L Y G L L E R A S Q L D I T V L I
ACC GGG GAG ACG GGG ACG GGC AAG GAG TTG GTG GCG CGG GCC ATC CAC CAC
T G E T G T G K E L V A R A I H H
GAC GGC CCA CGC AAG GAC CCG CCC TTC ATT GCG GTC AAC TGC GGC GCG CTG
D G P R K D R P F I A V N C G A L
CCC TCC GAA CTC ATC GAG AGC GAG CTG TTC GGT CAC GCC CGG GGC GCC TTC
P S E L I E S E L F G H A R G A F
ACT GGC GCG GTA GAG ACC AAG GCC GGT CTC TTC GAG GCA GCC TCC GGG GGA
T G A V E T K A G L F E A A S G G
ACC ATC TTC CTG GAC GAG ATT GGA GAG TTG CCC CTG TCC GTT CAG GTG AAG
T I F L D E I G E L P L S V Q V K
CTC AAC CGC ACG CTC CAG GAC AAG GAA GTG CGC CGT GTC GGA GAC GCG GTT
L N R T L Q D K E V R R V G D A V
GCG CGC TGC ATC GAC GCA CGC GTC ATC ACC GCC ACC CAC CGC GAC CTC AAG
A R C I D A R V I T A T H R D L K
GCC GAA GTG ACT GCG GGC CGC TTC CGC GAA GAC CTC TAC TAC CGG CTC AAT
A E V T A G R F R E D L Y Y R L N
GTC TTC CCG GTG CAT CTG CCG TCC CTG CGG GAG CGG CGC GAG GAC ATC CCC
V F P V H L P S L R E R R E D I P
CTG CTG GCC ATG CAC TTC GTA CAG AAG GCG GCG AAG ACC TAC CGG CAG CCG
L L A M H F V Q K A A K T Y R Q P
GTG GAT GGC CTG GAG CCG GAC GCG TTG CGT GCG CTC ACC GGG TAC ACC TGG
V D G L E P D A L R A L T G Y T W
CCG GGC AAC GTG CGC CAA CTA GAG AAT GCC ATC GAA CGC GCG GTG GCC ATC
P G N V R Q L E N A I E R A V A I
ACC ACT GGC TCC CGA GTG GGC CCT GAC GCA CTC CCC CCT GAA GTC ACG GGC
T T G S R V G P D A L P P E V T G
GGA CAA CAG GGA GCA CTG CCC GTA GAC CAT CTG GTG AAG ATG CCC TTC CGG
G Q Q G A L P V D H L V K M P F R
GAG GCG GTG GAC CTG GCG CGG GAC CGT GCA TCG CGC GAT TAC CTC ATC GCC
E A V D L A R D R A S R D Y L I A
CTG CTG CGG GAA TTC GGG GGC AAT GTG ACG CGG GCT GCT GAA CGC GCG GGC
L L R E F G G N V T R A A E R A G
ATG GAG CGC GAG AGC CTC CAC CGG CTC CTC AAG CGC TTT GGC CTG CGT TCC
M E R E S L H R L L K R F G L R S
GAT GAC TTC AAG GAG TCA CCC TAA gcaacacatgcaatcaagctgcattcacaaccgga
D D F K E S P Stop

```

**Figura 45.** Secuencia nucleotídica del gen *corR* (MXAN3418) de *M. xanthus*. En morado se muestra la secuencia aminoacídica deducida del regulador de respuesta CorR destacando en azul la secuencia GAFGTA, altamente conservada en la familia de reguladores de tipo NtrC. En verde se muestra el codón de iniciación y en rojo el codón de terminación.

Como ya hemos indicado, la histidina quinasa CorS es una proteína de 475 residuos que contiene los dominios característicos de esta familia de proteínas: un dominio sensor N-terminal entre los residuos 30 y 178 de localización periplásmica conectado con el dominio quinasa a través de una hélice transmembrana entre los residuos 178 y 210. En la proteína CorS de *M. xanthus* esa hélice transmembrana está seguida de un dominio de unión citoplasmático conocido como dominio HAMP (PF00672) entre los residuos 183 a 252. Este dominio es típico de histidina quinasa y parece jugar un papel crítico en la transducción de la señal ya que transmite al dominio quinasa los cambios conformacionales ocurridos en el dominio sensor al detectar la señal (Aravind y Ponting, 1999). El dominio quinasa está subdividido en un subdominio histidina quinasa A (fosfoaceptor) (PF00512) entre los residuos 265 y 329 donde se encuentra el residuo de histidina que se fosforila y un subdominio HATPasa\_C (PF02518), entre los residuos 368 y 473 (Fig. 46A). La proteína CorS se encuentra anclada a la membrana citoplasmática a través de un dominio transmembrana.

El regulador de respuesta CorR es una proteína de 466 aminoácidos que pertenece a la familia de reguladores de respuesta de tipo NtrC. Esta familia de reguladores de respuesta, como ya hemos indicado, se caracteriza porque son dependientes del factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa y constan de un dominio N-terminal regulador de respuesta (PF00072) entre los residuos 7 y 116 que contiene el residuo de aspártico fosforilable, un dominio central de interacción con  $\sigma^{54}$  e hidrólisis de ATP (PF00158) entre los residuos 144 y 365. En este dominio se encuentra el motivo GAFTGA (Fig. 45), altamente conservado en esta familia de proteínas, entre los residuos 219 y 224, que es crítico para la activación transcripcional, ya que esta región constituye una superficie que une  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa, y por último un dominio C-terminal HTH de tipo Fis (PF02954) indispensable para la unión al ADN ya que contiene el motivo hélice-giro-hélice y además contiene determinantes para la oligomerización, entre los residuos 415 y 455 (Fig. 46B). Esta proteína es de localización citoplasmática.



**Figura 46.** Organización modular de la histidina quinasa CorS (A) y el regulador de respuesta CorR (B) de *M. xanthus*.

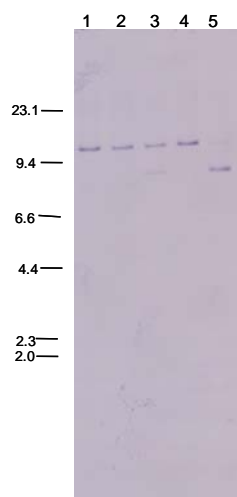
#### D.IV.1.2. Construcción de un mutante de delección en fase para los genes *corSR*

Con el fin de determinar si el sistema regulador de dos componentes CorSR está implicado en la regulación del gen *cuoA*, se construyó un mutante de delección en fase para dicho sistema utilizando el vector pBJ113 (Julien *et al.*, 2000).

## Resultados

La obtención del mutante de delección en fase implicó la eliminación del 94% del sistema CorSR. Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 818 pb aguas arriba del gen *corS* utilizando el par de oligonucleótidos HKlcsABamF y HKlcsAPstR2 (Tabla 6 del Material y Métodos), y un fragmento de 822 pb aguas abajo del gen *corR* utilizando el par de oligonucleótidos RRlcsAPstF y RRlcsAHinR (Tabla 6). Los productos amplificados fueron clonados de manera secuencial utilizando las enzimas *Bam*HI y *Pst*I para el fragmento aguas arriba, y *Pst*I y *Hind*III para el fragmento aguas abajo. Ambos fragmentos quedaban unidos por la diana *Pst*I para permitir que la delección ocurriera en fase.

El plásmido resultante (pAM $\Delta$ *corSR*) se dializó y se introdujo en la bacteria silvestre mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot para tratar de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección. Los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot para diferenciar aquellos que portaban la delección deseada de los que habían revertido al genotipo silvestre (Fig. 47).



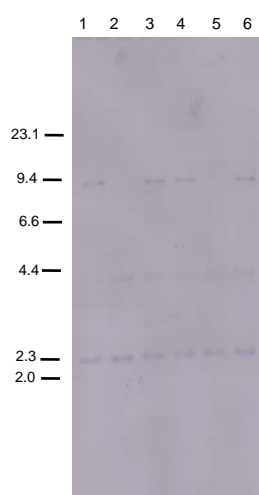
**Figura 47.** Southern blot para comprobar la obtención del mutante de delección de los genes *corSR*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En la Fig. 47 podemos observar el Southern blot realizado para comprobar la obtención del mutante de delección de los genes *corSR* de *M. xanthus*. Las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, y las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión de las muestras a analizar. La digestión se realizó con el enzima *Kpn*I y como sonda se utilizó el producto de PCR amplificado por el par de oligonucleótidos HKlcsABamF-HKlcsAPstR2 (Tabla 6 del Material y Métodos) que amplificaba un fragmento situado aguas arriba del gen *corS*. Los fragmentos esperados fueron 10.7 kb para el silvestre y 8.0 kb para el mutante de delección. De las tres muestras analizadas, sólo una (calle 5) era positiva, mientras que la muestra situada en la calle 2 revirtió a silvestre, y la muestra situada en la calle 3 presentó una mezcla de mutante y silvestre. Se seleccionó la cepa mutante de la calle 5 y se denominó JM51DIF ( $\Delta$ *corSR*).

### D.IV.1.3. Determinación del perfil de expresión del gen *cuoA* en el mutante $\Delta corSR$

Una vez construido el mutante de delección para los genes *corSR* se utilizó como fondo genético para la introducción de la fusión *lacZ* del gen *cuoA* y el estudio del perfil de expresión de dicho gen en el mutante  $\Delta corSR$ .

Para ello el plásmido que contiene la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, pKY481-CuoA (ver apartado D.III.3.), se dializó y se introdujo en la bacteria mutante  $\Delta corSR$  mediante electroporación, integrándose en el cromosoma en único evento de recombinación homóloga, y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias obtenidas fueron analizadas mediante la técnica de Southern blot (Fig. 48).

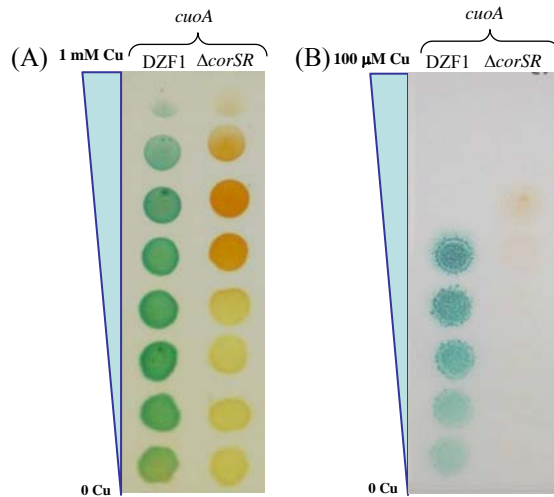


**Figura 48.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$ . Las calles 2 y 5 muestran la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, y las calles 1, 3, 4 y 6 corresponden a las muestras a analizar. La digestión se realizó con *XhoI* y los tamaños esperados fueron: 4.1 kb y 2.3 kb para el control, y 9.0 kb, 4.1 kb y 2.3 kb para las cepas portadoras de la fusión. Como sonda se utilizó el fragmento empleado para construir la fusión. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Las cuatro colonias analizadas eran positivas. Se seleccionó la muestra de la calle 1 y se denominó JM51DAZY, cepa portadora de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$ .

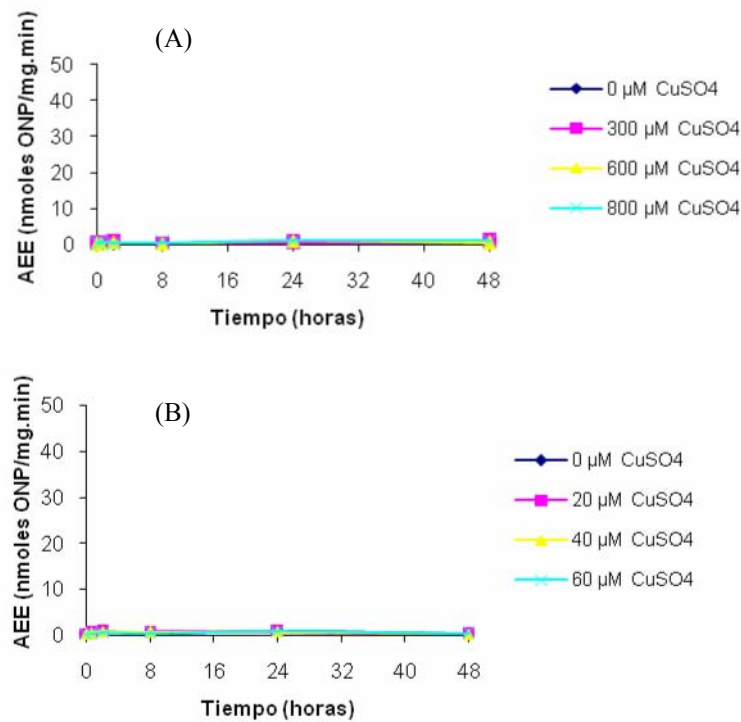
El análisis de la expresión del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$  se realizó en un primer momento de manera cualitativa siguiendo el procedimiento descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.8.2.), y se llevó a cabo tanto durante el crecimiento vegetativo, como durante el ciclo de desarrollo, en medios suplementados con el sustrato X-gal y con sulfato de cobre. Como control se utilizó la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en la bacteria silvestre. Se observó que en ambos casos, crecimiento vegetativo y ciclo de desarrollo, no había expresión del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$  (Fig. 49A y B).

## Resultados



**Figura 49.** Análisis cualitativo del perfil de expresión del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$  (A) Crecimiento vegetativo (B) Ciclo de desarrollo.

Para confirmar que el gen *cuoA* no se expresaba en el mutante  $\Delta corSR$  se cuantificó actividad  $\beta$ -galactosidasa añadiendo al medio diferentes concentraciones de sulfato de cobre. La actividad se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.8.3.), y fue medida tanto en CTT como en CF (Fig. 50A y B).



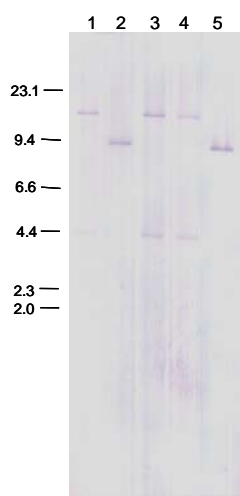
**Figura 50.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa JM51DAZY durante el crecimiento vegetativo (A) y durante el ciclo de desarrollo (B).

El análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión con el promotor del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corSR$  mostró una ausencia de expresión de dicho gen, lo que indica que la expresión del gen *cuoA* está regulada completamente por el sistema regulador de dos componentes CorSR.

## D.IV.2. Determinación del perfil de expresión del sistema *corSR*

Para estudiar el perfil de expresión del sistema regulador de dos componentes *corSR* y ver su posible dependencia de cobre, se construyó una cepa de *M. xanthus* que contenía una fusión del gen *lacZ* de *E. coli* con el promotor del gen *corS* utilizando el vector pKY481. Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 795 pb abarcando la región del promotor del gen *corS*. Para amplificar este fragmento se emplearon los oligonucleótidos cusSlacZKpnF y cusSlacZBamR (Tabla 5 del Material y Métodos). El producto amplificado se clonó en el vector pKY481 utilizando las dianas *KpnI* y *BamHI*.

El plásmido resultante se denominó pKY481-CorSR, se dializó y se introdujo en la bacteria silvestre mediante electroporación. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina que se analizaron mediante la técnica de Southern blot (Fig. 51).



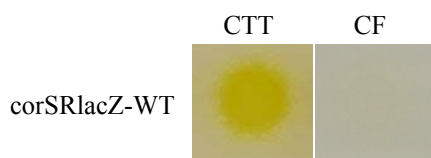
**Figura 51.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *corS* de *M. xanthus*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En la Fig. 51 se puede observar el Southern blot realizado para comprobar la obtención de la fusión *lacZ* con el gen *corS* de *M. xanthus*. Las calles 2 y 5 muestran la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, mientras que las calles 1, 3 y 4 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. La digestión se realizó con el enzima *BamHI* y como sonda se empleó el producto de PCR utilizado para construir la fusión (Tabla 5 del Material y Métodos). Los fragmentos esperados fueron: un fragmento de 9.4 kb para el silvestre; y dos fragmentos, uno de 14.3 kb y otro de 4.3 kb para las cepas portadoras de la fusión *lacZ*. Las tres muestras analizadas eran positivas. Se seleccionó la muestra de la calle 4 y se denominó corSR*lacZ*-WT.

El análisis de la expresión del sistema *corSR* se realizó en un primer momento de manera cualitativa siguiendo el protocolo descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.8.2.). Por un lado el análisis se hizo en ausencia de cobre añadido al medio y se llevó a cabo en ambas fases del ciclo de vida, en medios suplementados con el sustrato X-gal. En ambos casos se observó que el sistema *corSR* se expresaba a niveles indetectables en ausencia de cobre (Fig. 52).

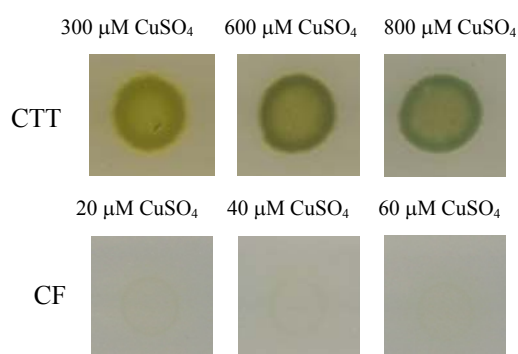


## Resultados



**Figura 52.** Expresión del sistema *corSR* en ausencia de cobre añadido a las 72 h de incubación.

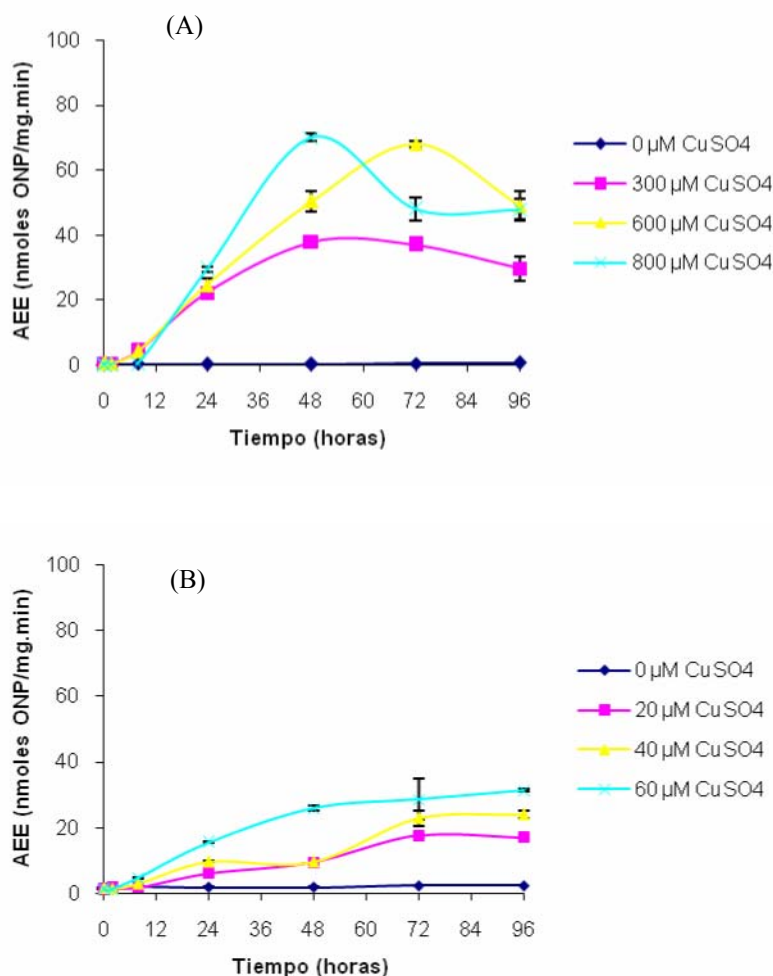
Por otro lado, en un medio suplementado con sulfato de cobre, los niveles de expresión del sistema *corSR* aumentaban tanto durante el crecimiento vegetativo (CTT) como durante el ciclo de desarrollo (CF), aunque estos niveles de expresión observados fueron más bajos que los del gen *cuoA*, en cuya regulación está implicado el sistema CorSR (Fig. 53).



**Figura 53.** Expresión del sistema *corSR* en presencia de cobre añadido a las 72 h de incubación.

A fin de comprobar la dependencia de cobre en la expresión del sistema *corSR*, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa añadiendo al medio diferentes concentraciones de sulfato de cobre. La cuantificación se llevó a cabo tanto en CTT como en CF (Fig. 54A y B).

La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión *lacZ* con el promotor del sistema *corSR* corrobora lo observado durante el estudio cualitativo: dependencia de cobre externo. En ambas fases del ciclo de vida (Fig. 54A y B), se observa que el promotor del sistema *corSR* es inducido conforme aumentan las concentraciones de Cu(II) hasta alcanzar un nivel máximo a concentraciones subinhibitorias. Como ocurría en el caso de la expresión del promotor del gen *cuoA*, fue necesario utilizar concentraciones de cobre 10 veces más bajas durante el ciclo de desarrollo a fin de permitir la viabilidad de las células. Sin embargo, los niveles de expresión observados para el sistema *corSR* fueron mucho más bajos que los observados para el gen *cuoA* a las mismas concentraciones de cobre. Así, durante el crecimiento vegetativo se observa que el nivel máximo de expresión alcanzado por el sistema *corSR* fue unas 28 veces más bajo que el observado para el gen *cuoA* a la misma concentración de cobre (800  $\mu$ M) y mismo tiempo de incubación (48 h). Durante el ciclo de desarrollo sin embargo, los niveles máximos de expresión del promotor de *corSR* fueron unas 50 veces más bajos que los observados para el gen *cuoA*. Estos resultados confirman que aunque los genes *cuoA* y *corSR* se coexpresan en el mismo ARNm mediante la técnica de RT-PCR, deben estar sometidos a una regulación diferencial, y que *corSR* probablemente posea otro promotor interno, puesto que los niveles de expresión así como el tiempo de máxima expresión varían en ambos casos.



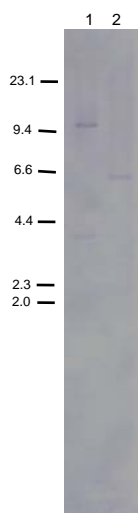
**Figura 54.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica dependiente de cobre de la cepa *corSRLacZ-WT* durante el crecimiento vegetativo (A) y el ciclo de desarrollo (B).

Por otro lado, se pudo comprobar que el sistema regulador de dos componentes *corSR* era inducible por otros metales divalentes como el níquel, cobalto o zinc, y no por metales monovalentes. Aunque, al igual que ocurría con el gen *cuoA*, responde principalmente a cobre.

### D.IV.3. Autorregulación del sistema de dos componentes CorSR

Una vez que comprobamos que el sistema CorSR regula completamente la expresión del gen *cuoA*, decidimos determinar si también regula su propia expresión. Para ello el plásmido portador de la fusión *lacZ* con los genes *corSR*, pKY481-CorSR (ver apartado D.IV.2.) se introdujo en la bacteria mutante  $\Delta corSR$  mediante electroporación. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina que se analizaron mediante la técnica de Southern blot (Fig. 55).

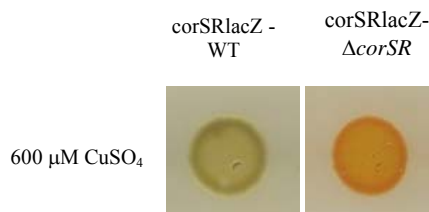
## Resultados



**Figura 55.** Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con los genes *corSR* en el mutante  $\Delta corSR$ . En la calle 1 se muestra la digestión del cromosoma de la cepa portadora de la fusión. En la calle 2 se muestra la digestión del cromosoma del mutante  $\Delta corSR$  utilizado como control. La digestión utilizada fue *Bam*HI y los tamaños esperados fueron: 11.6 kb y 4.3 kb para la cepa portadora de la fusión, y 6.8 kb para el mutante  $\Delta corSR$ . Como sonda se utilizó el fragmento empleado para construir la fusión. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Una vez comprobado que la colonia analizada era positiva se seleccionó y se denominó *corSRlacZ- $\Delta corSR$* .

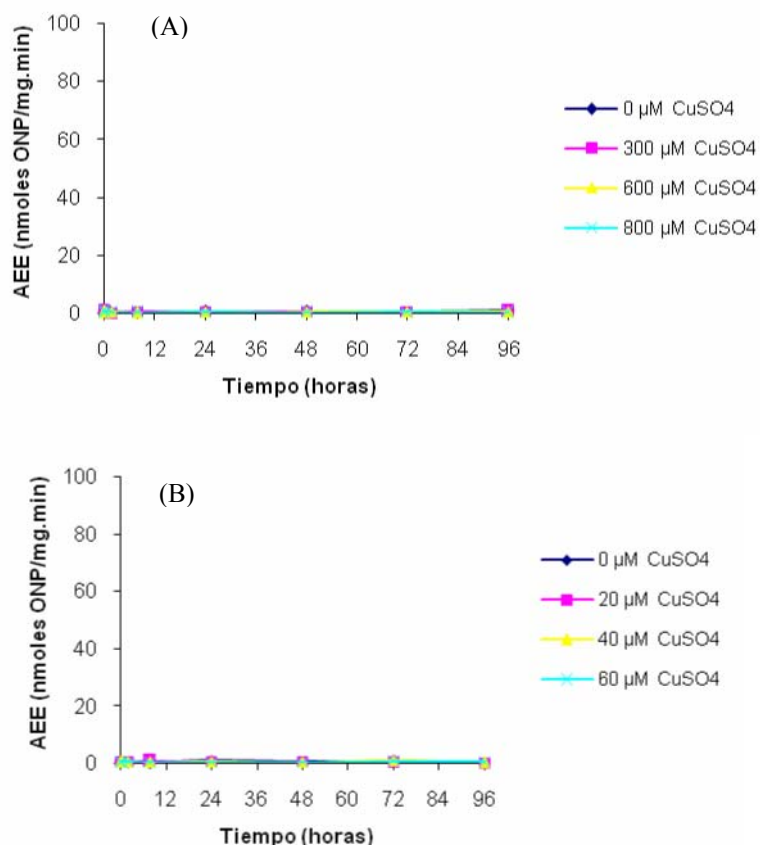
El análisis de la expresión de los genes *corSR* en el mutante  $\Delta corSR$  se realizó en un primer momento de manera cualitativa y se llevó a cabo tanto durante el crecimiento vegetativo, como durante el ciclo de desarrollo, en medios suplementados con sulfato de cobre y el sustrato X-gal. Como control se utilizó la fusión *lacZ* con los genes *corSR* en la bacteria silvestre. Se observó que en ninguna de las dos fases del ciclo de vida había expresión de los genes *corSR* en el mutante de dicho sistema indicando que regula su propia expresión (Fig. 56).



**Figura 56.** Análisis cualitativo de la fusión *lacZ* con los genes *corSR* en la bacteria silvestre de *M. xanthus* y en el mutante  $\Delta corSR$ . Se muestra sólo la expresión durante el crecimiento vegetativo a una concentración de 600  $\mu$ M de sulfato de cobre y a las 48 h de incubación a 30°C.

A fin de confirmar que el sistema *corSR* regula su expresión se cuantificó actividad  $\beta$ -galactosidasa añadiendo al medio diferentes concentraciones de sulfato de cobre. La actividad se determinó tanto en CTT como en CF (Fig. 57A y B).

El análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión con los genes *corSR* en el mutante  $\Delta corSR$  confirmó lo observado en el análisis cualitativo: el sistema *CorSR* controla su propia expresión de manera completa, ya que ni durante el crecimiento vegetativo ni el ciclo de desarrollo se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 57A y B).



**Figura 57.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa *corSRLacZ-delta-corSR* durante el crecimiento vegetativo (A) y durante el ciclo de desarrollo (B).

#### D.IV.4. Estudio de la implicación del sistema CorSR en el ciclo de vida de *M. xanthus*

Ya que CorSR regula la expresión de la oxidasa multicobre CuoA y la suya propia, se estudió su papel en la resistencia al cobre de *M. xanthus*. Para ello, se empleó el mutante de delección  $\Delta corSR$  (ver apartado D.IV.1.2.) y se estudiaron diversos parámetros que pudieran verse afectados por la ausencia de dicho sistema.

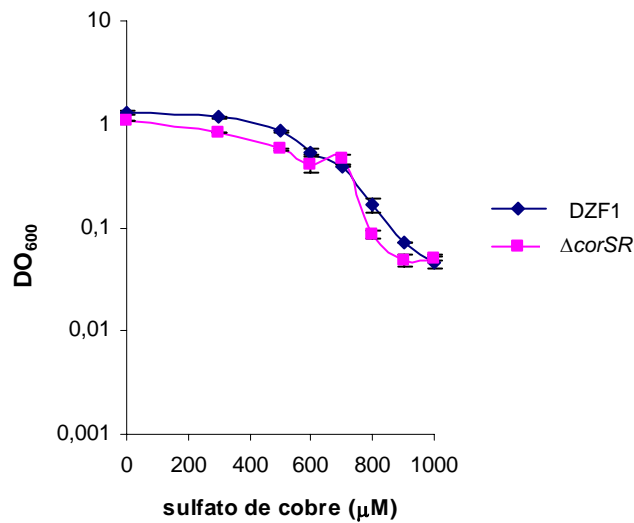
##### D.IV.4.1. Crecimiento vegetativo

Con el fin de analizar la influencia de la delección el sistema *corSR* durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*, la cepa  $\Delta corSR$  así como la cepa silvestre fueron cultivadas en medio CTT líquido con concentraciones crecientes de sulfato de cobre e incubadas en agitación a 30°C durante 24 h.

Como se puede observar en la Fig. 58, la tolerancia al cobre del mutante  $\Delta corSR$  fue muy similar a la de la cepa silvestre. Hasta 700 µM de sulfato de cobre tanto la cepa mutante como la silvestre presentaban un comportamiento muy similar. Sin embargo a una concentración de 800 µM el tiempo de generación del mutante aumentó con respecto al del silvestre, indicando que el mutante es ligeramente más sensible que la bacteria DZF1 a estas concentraciones de metal. Como ocurría con el mutante  $\Delta cuoA$ , a

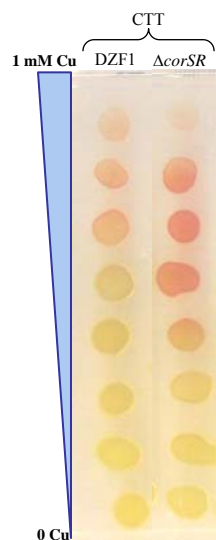
## Resultados

partir de esta concentración ambas bacterias eran muy sensibles y no crecían por encima de 1000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre.



**Figura 58.** Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo de la bacteria mutante  $\Delta\text{corSR}$ . Las barras de error indican las desviaciones estándar.

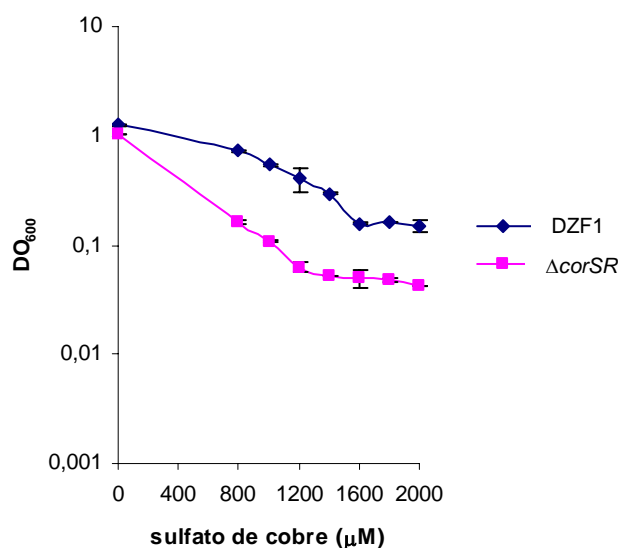
Durante el crecimiento vegetativo, los cultivos de la bacteria silvestre de *M. xanthus* crecidos en oscuridad son amarillos. Sin embargo, la adición de sulfato de cobre hace que los cultivos de la bacteria silvestre de *M. xanthus* se vuelvan rojos como consecuencia de la inducción de los carotenoides por este metal (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005). En el caso del mutante  $\Delta\text{corSR}$  se observó que durante el crecimiento vegetativo no sólo fue ligeramente más sensible a cobre que la cepa silvestre, sino que además los carotenoides aparecieron a una concentración de cobre más baja que en el silvestre (Fig. 59).



**Figura 59.** Inducción de la síntesis de carotenoides en el mutante  $\Delta\text{corSR}$  como consecuencia de la adición de sulfato de cobre.

#### D.IV.4.1.1. Análisis del fenotipo durante el crecimiento vegetativo de células inducidas con 600 $\mu\text{M}$ de sulfato de cobre

Al igual que hicimos con el mutante  $\Delta\text{cuoA}$ , decidimos estudiar el fenotipo del mutante  $\Delta\text{corSR}$  durante el crecimiento vegetativo cuando todos los mecanismos de resistencia al cobre estaban inducidos. Para ello las células del mutante así como las del silvestre fueron crecidas en medio CTT líquido con una concentración de 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre durante 24 h. En ese momento, estas células que se habían preincubado con cobre y por tanto tenían todos los mecanismos de resistencia a dicho metal inducidos, se diluyeron en medio CTT nuevo que contenía concentraciones de sulfato de cobre superiores a las empleadas para el estudio con las células sin inducir. Como se puede observar en la Fig. 60, las células del mutante  $\Delta\text{corSR}$  fueron mucho más sensibles a cobre que las células del silvestre y que las del mutante  $\Delta\text{cuoA}$  bajo estas condiciones, lo que indica que el sistema regulador de dos componentes CorSR debe regular, además de  $\text{CuoA}$ , otros mecanismos de resistencia que se inducen en presencia de cobre durante el crecimiento vegetativo, y al estar ausente dicho sistema, estos mecanismos no se inducirían y por tanto, las células del mutante serían más sensibles cuando son preincubadas con cobre.



**Figura 60.** Tolerancia al cobre de las células del mutante  $\Delta\text{corSR}$  inducidas con 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre e incubadas durante 24 h a 30°C con concentraciones más altas de dicho metal. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

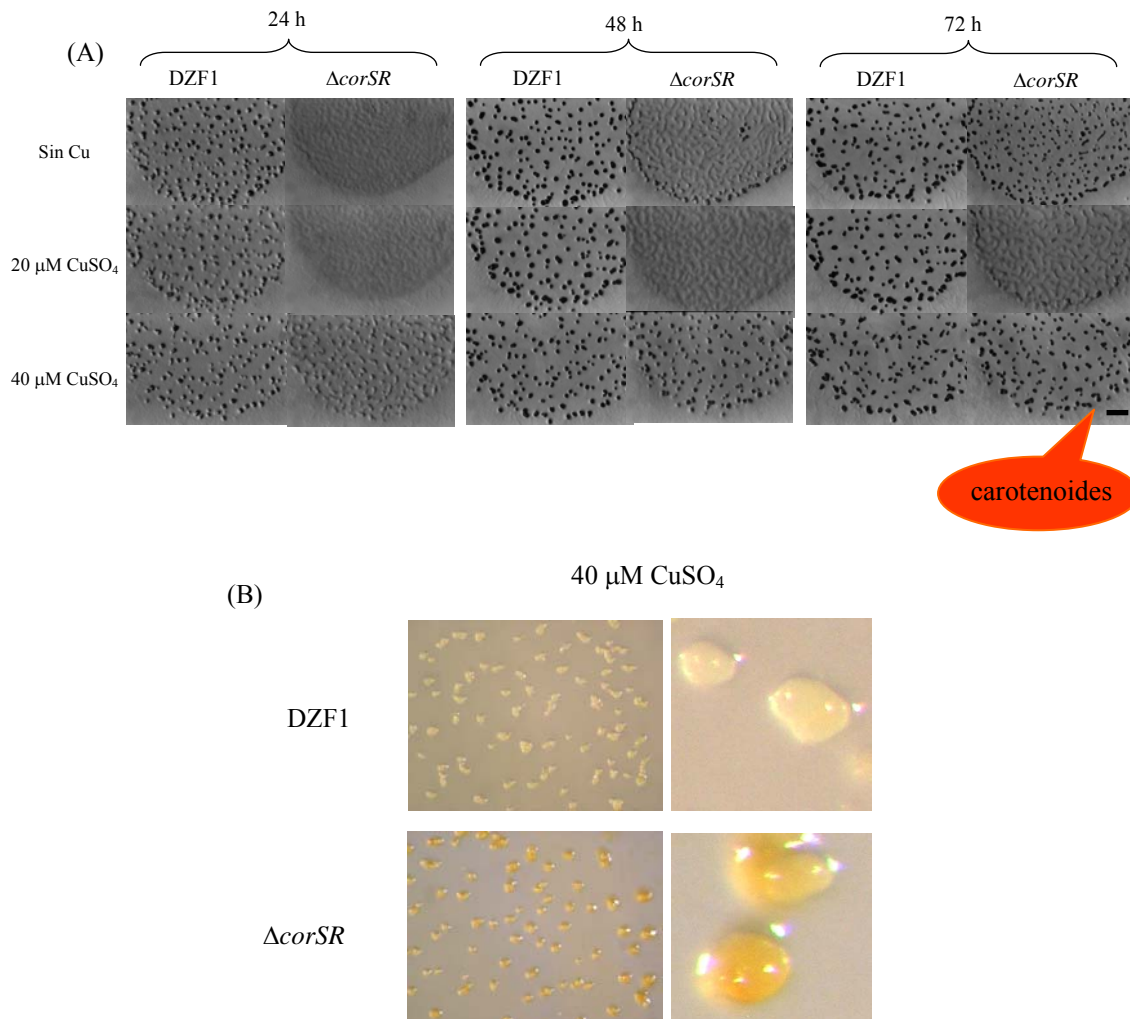
#### D.IV.4.2. Ciclo de desarrollo

Para estudiar el papel del sistema regulador de dos componentes CorSR durante el ciclo de desarrollo, el mutante de delección y la cepa silvestre de *M. xanthus* se cultivaron en un medio sin nutrientes.

En ausencia de cobre añadido al medio, la cepa mutante presentó un retraso en el ciclo de desarrollo hasta las 72 h de incubación con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, los cuerpos fructificantes estaban bien formados a partir de ese tiempo (Fig. 61A). En medio con cobre y a diferencia del mutante  $\Delta\text{cuoA}$ , que presentaba una mayor tolerancia a cobre que el silvestre, el mutante  $\Delta\text{corSR}$  fue ligeramente más sensible,

## Resultados

como ya ocurría durante el crecimiento vegetativo. Al igual que se observó en ausencia de cobre, en presencia de dicho metal había un retraso en la formación de los cuerpos fructificantes en el caso del mutante, sin embargo esos cuerpos estaban mejor formados a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre (Fig. 61A) donde observamos claramente la inducción de la síntesis de carotenoides (Fig. 61B) lo que parece sugerir que dichos pigmentos podrían proteger a las células del daño oxidativo ocasionado por el cobre y explicaría la mejor formación de los cuerpos fructificantes en estas condiciones. Hay que resaltar que estos cuerpos fructificantes de color rojo no se han observado nunca en la cepa silvestre, ya que las concentraciones de cobre tan bajas usadas durante el desarrollo no son suficientes para disparar la carotenogénesis.



**Figura 61.** (A) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y mutante  $\Delta corSR$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante los períodos de tiempo indicados. La barra indica 1 mm. (B) Cuerpos fructificantes de las cepas silvestre y  $\Delta corSR$  en medio CF con 40  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante 96 h. En el caso del mutante se puede observar el color rojo como consecuencia de la síntesis de carotenoides. Las imágenes de la derecha en (B) muestran los cuerpos fructificantes de DZF1 y  $\Delta corSR$  a los máximos aumentos.

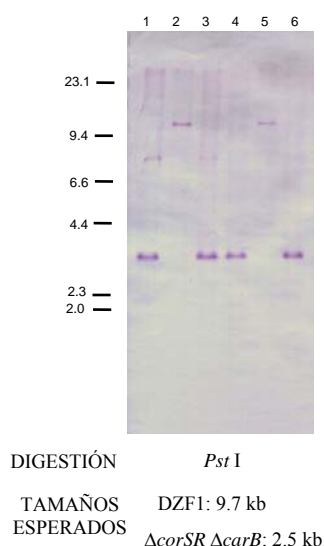
### D.IV.4.3. Análisis de la implicación de los carotenoides en el fenotipo del mutante $\Delta corSR$

Con el fin de comprobar si los carotenoides eran los responsables de la mejor formación de los cuerpos fructificantes en el mutante  $\Delta corSR$  en presencia de sulfato de cobre, se construyó un mutante de delección del operón *carB* utilizando como fondo genético el mutante para el sistema de dos componentes CorSR. Como se explicó en la Introducción, el operón *carB* constituye uno de los dos *loci* donde se localizan los genes estructurales para la síntesis de carotenoides en *M. xanthus*.

#### D.IV.4.3.1. Obtención de un mutante de delección doble $\Delta corSR \Delta carB$

La construcción del mutante de delección en fase del operón *carB* implicó la eliminación del 99% de dicho operón. Para ello se amplificó mediante PCR un fragmento de 746 pb localizado aguas arriba del primer gen de *carB* utilizando el par de oligonucleótidos carBKpnI-carBBamHI1 (Tabla 6 del Material y Métodos) y un fragmento de 797 pb aguas abajo del último gen de dicho operón empleando la pareja de oligonucleótidos carBBamHI2-carBHindIII (Tabla 6). Los productos amplificados fueron clonados de manera secuencial en el vector pBJ113 y ambos fragmentos quedaban unidos por la diana *Bam*HI para permitir que la delección ocurriera en fase y evitar efectos polares.

El plásmido resultante (pBJ113-carB) se dializó y se introdujo en la bacteria  $\Delta corSR$  mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante la técnica de Southern blot para la identificación de intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección y las colonias recombinantes fueron analizadas mediante Southern blot para diferenciar aquellas que portaban la delección deseada de las que habían revertido al genotipo silvestre (Fig. 62).



**Figura 62.** Southern blot para comprobar la obtención del mutante doble  $\Delta corSR \Delta carB$ . Las calles 2 y 5 muestran la digestión del cromosoma DZF1 utilizado como control, y las calles 1, 3, 4 y 6 muestran la digestión de los cromosomas de las colonias a analizar. Como sonda se empleó el fragmento aguas arriba del operón *carB*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Como se puede comprobar en la Fig. 62, todas las muestras analizadas eran positivas, sin embargo en las muestras de las calles 1 y 3 aparece una banda adicional a la esperada por lo que se descartaron. Se seleccionó la muestra de la calle 6 y se denominó JMcarBDIF ( $\Delta corSR \Delta carB$ ).



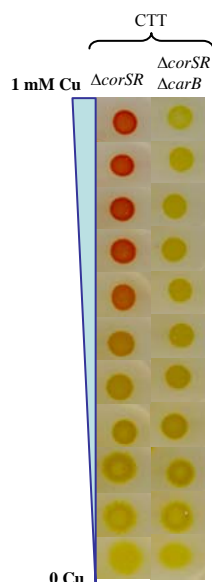
## Resultados

### D.III.4.3.2. Estudio del fenotipo del mutante doble $\Delta corSR \Delta carB$

Una vez obtenido el mutante de delección doble para el sistema de dos componentes CorSR y el operón *carB*, se analizó la implicación de los carotenoides en el fenotipo del mutante  $\Delta corSR$  tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo.

#### 1) Crecimiento vegetativo

El análisis del fenotipo del mutante doble  $\Delta corSR \Delta carB$  durante el crecimiento vegetativo no mostró diferencias en cuanto a tolerancia al cobre con respecto al mutante sencillo  $\Delta corSR$ , a pesar de que el mutante doble permanecía amarillo como consecuencia de la ausencia de carotenoides (Fig. 63). Este resultado parece indicar que los carotenoides no son responsables de una mayor tolerancia al cobre, al menos en las condiciones probadas aquí.

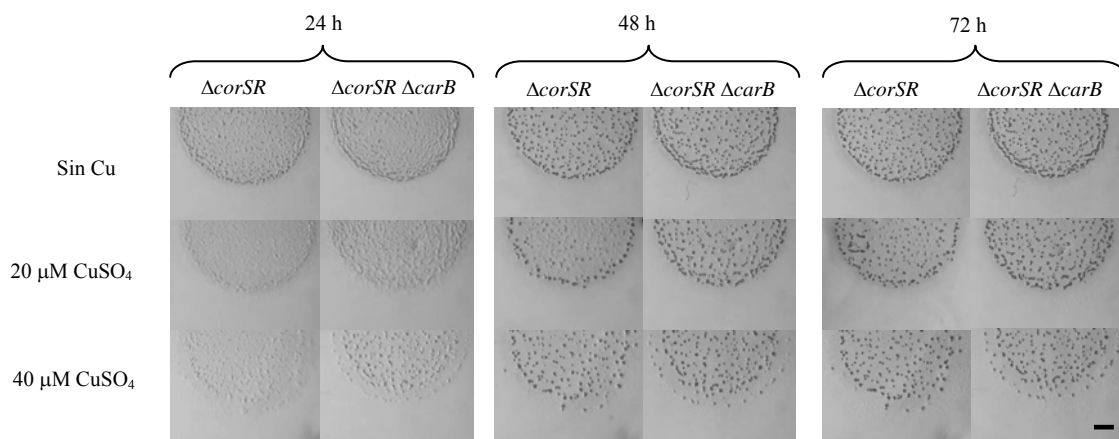


**Figura 63.** Fenotipo del mutante doble  $\Delta corSR \Delta carB$  durante el crecimiento vegetativo.

#### 2) Ciclo de desarrollo

Para comprobar si los carotenoides eran los responsables de la mejor formación de los cuerpos fructificantes en el mutante  $\Delta corSR$  con 40  $\mu M$  de sulfato de cobre, se estudió el fenotipo del mutante doble  $\Delta corSR \Delta carB$  durante el ciclo de desarrollo. Como control se utilizó el mutante  $\Delta corSR$  y el estudio se realizó tanto en ausencia como en presencia de cobre.

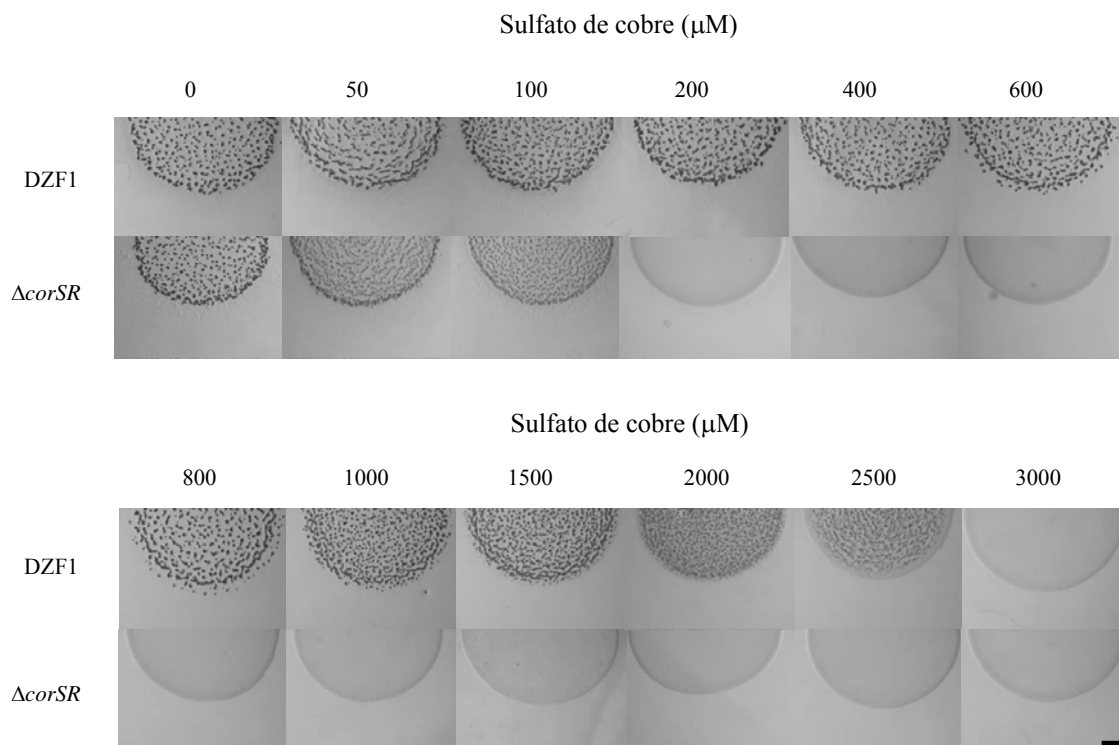
En ausencia de cobre se observó que no había diferencias entre la bacteria mutante  $\Delta corSR$  y el mutante doble  $\Delta corSR \Delta carB$  (Fig. 64). Sin embargo, en presencia de cobre se observó que la formación de los cuerpos fructificantes estaba más adelantada en el mutante doble en la concentración de 40  $\mu M$  de cobre, en contra de lo que cabría esperar, ya que esta cepa carecía de carotenoides (Fig. 64). Estos resultados parecen indicar que los carotenoides no son los principales responsables de la mejor formación de los cuerpos fructificantes en el mutante  $\Delta corSR$  con 40  $\mu M$  de sulfato de cobre.



**Figura 64.** Cuerpos fructificantes de las cepas  $\Delta corSR$  y  $\Delta corSR \Delta carB$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a  $30^{\circ}C$  durante los períodos de tiempo indicados. La barra indica 1 mm.

#### D.IV.4.4. Ciclo de desarrollo en células inducidas con $600 \mu M$ de sulfato de cobre

Ya que durante el crecimiento vegetativo estudiamos el fenotipo de la bacteria mutante  $\Delta corSR$  cuando previamente la cultivábamos en un medio con  $600 \mu M$  de sulfato de cobre para inducir los mecanismos de resistencia a este metal, decidimos observar qué ocurría en estas condiciones durante el ciclo de desarrollo.



**Figura 65.** Fenotipo de las cepas silvestre y  $\Delta corSR$  de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos crecidos previamente en presencia de  $600 \mu M$  de sulfato de cobre, concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a  $30^{\circ}C$  hasta las 72 h. La barra representa 1 mm.

## Resultados

Para ello se crecieron las células tanto del silvestre como del mutante  $\Delta corSR$  en medio CTT líquido con 600  $\mu M$  de sulfato de cobre y se concentraron a una  $DO_{600}$  de 15 en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Se pudo observar que en ausencia de metal ambas bacterias, silvestre y mutante, presentaron un comportamiento muy similar (Fig. 65). Sin embargo, en presencia de cobre, aunque previamente inducidas las bacterias fueron más resistentes al metal que cuando fueron incubadas en ausencia del mismo, las diferencias entre silvestre y mutante eran notables. Mientras que el silvestre fue capaz de formar cuerpos fructificantes hasta una concentración de 2500  $\mu M$  de sulfato de cobre, la bacteria mutante  $\Delta corSR$  dejaba de formar cuerpos a partir de una concentración de 100-200  $\mu M$  de sulfato de cobre (Fig. 65), sin embargo las bacterias estaban vivas hasta una concentración de 2000  $\mu M$ .

### D.IV.4.4.1. Construcción de fusiones *lacZ* con los marcadores del desarrollo *fruA*, *mrpC* y *tps*

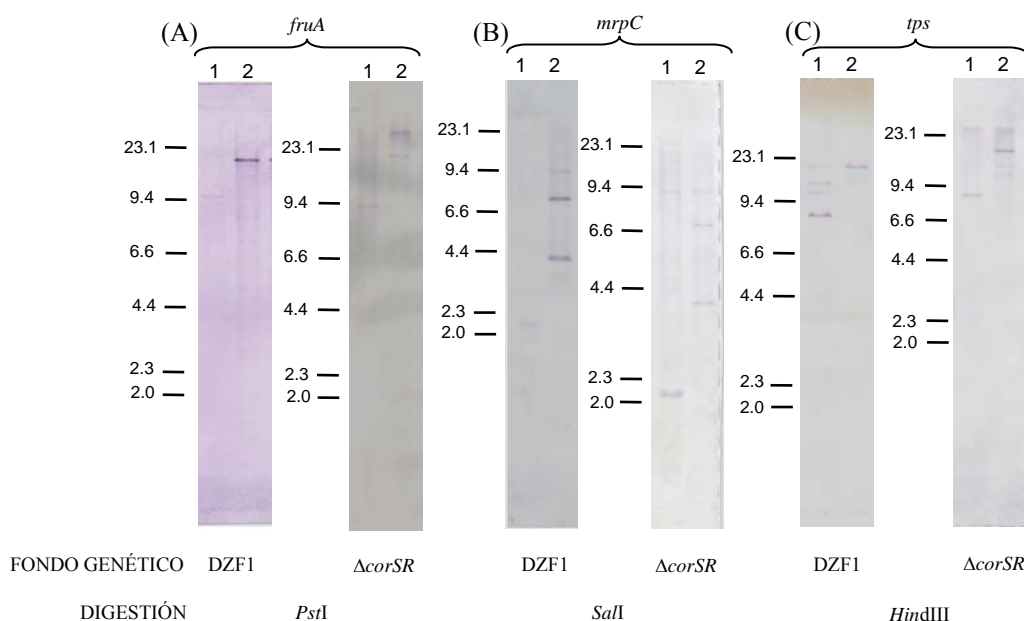
Con el fin de averiguar que ocurría durante el ciclo de desarrollo para que el mutante  $\Delta corSR$  dejara de formar cuerpos fructificantes pero se mantuviera vivo, decidimos estudiar la expresión de tres genes marcadores del desarrollo: *fruA*, *mrpC* y *tps*. Durante el transcurso del desarrollo tiene lugar la activación programada de un conjunto de genes inducidos de forma específica en respuesta al intercambio de señales celulares. El patrón de expresión característico de cada evento que conforma el ciclo de desarrollo depende del nivel de expresión de cada uno de estos genes implicados en la regulación de este proceso. En consecuencia, se ha analizado en el mutante  $\Delta corSR$  la expresión de estos tres genes dependientes del ciclo de desarrollo, cuya expresión incrementa de forma drástica durante esta etapa para conseguir que la mixobacteria complete el ciclo de desarrollo.

La proteína FruA es un regulador de respuesta de tipo FixJ clave para el control del ciclo de desarrollo, al mediar la respuesta a los niveles crecientes de señal C, necesarios para que progrese el desarrollo. Este regulador controla la movilidad, promoviendo inicialmente la agregación y fructificación, para finalmente, tras activarse totalmente por fosforilación, estimular la diferenciación durante el proceso de esporulación (Ueki e Inouye, 2003). En relación con esta proteína se encuentra MrpC, un activador transcripcional de *fruA* durante el desarrollo y esencial para la formación de cuerpos fructificantes en *M. xanthus* (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b, Nariya e Inouye, 2005). Y por último, la proteína S, que es el componente principal de la cubierta de la spora y está codificada por el gen *tps* cuya expresión depende a su vez de la presencia de FruA (Inouye *et al.*, 1979b; Ueki e Inouye, 2006). En la sección A.I.6 de la Introducción se ofrece una revisión más detallada de estos marcadores del desarrollo.

Este estudio se llevó a cabo con la obtención de tres fusiones traduccionales de cada uno de estos tres genes con el gen *lacZ*. Dichas construcciones fueron introducidas en la bacteria silvestre de *M. xanthus* y en la mutante  $\Delta corSR$ , obteniendo cepas portadoras de las distintas fusiones *lacZ*, en las cuales la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por cada una de ellas refleja el nivel de expresión de cada marcador. De esta forma ha sido posible comparar la expresión de cada uno de estos marcadores en el mutante con relación al silvestre para así tratar de explicar el fenotipo mostrado por la bacteria mutante durante el ciclo de desarrollo cuando todos los mecanismos de resistencia al cobre estaban inducidos.

Para la construcción de las fusiones *lacZ* con los genes *fruA*, *mrpC* y *tps* se amplificaron mediante PCR fragmentos de 800 pb que a su vez contenían la región que codifica los primeros codones de cada uno de estos genes. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos FruAlacZXhoF-FruAlacZBamR para *fruA*, MrpClacZKpnF-MrpClacZBamR para *mrpC* y tpsXhoF-tpsBamR para *tps* (Tabla 5 del Material y Métodos). Los productos obtenidos se clonaron en el vector pKY481 empleando las enzimas adecuadas.

Los plásmidos obtenidos se introdujeron en la bacteria silvestre y en  $\Delta corSR$  mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina que se analizaron mediante la técnica de Southern blot (Fig. 66).



**Figura 66.** Southern blot de las fusiones *lacZ* de los genes *fruA* (A), *mrpC* (B) y *tps* (C), introducidas en el silvestre DZF1 y en el mutante  $\Delta corSR$ . Los cromosomas del silvestre, utilizado como control (calle 1), y de cada fusión (calle 2) se digirieron con el enzima adecuado en cada caso y se hibridaron con el fragmento amplificado por los oligonucleótidos utilizados para hacer la fusión. Los fragmentos esperados fueron 9.4 kb para el silvestre y 18.5 kb para la cepa portadora de la fusión en el caso de *fruA*; 2.1 kb para el silvestre y 4.1 y 7.0 kb para la cepa portadora de la fusión en el caso de *mrpC*; y 8.4 kb para el silvestre y 17.5 kb para la cepa portadora de la fusión en el caso de *tps*. A la izquierda se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Se seleccionaron las muestras positivas y se denominaron FruAlacZ-WT FruAlacZ- $\Delta corSR$  para *fruA*, MrpClacZ-WT y MrpClacZ- $\Delta corSR$  para *mrpC*; y tpslacZ-WT y tpslacZ- $\Delta corSR$  para *tps*.

#### D.IV.4.4.2. Análisis de la expresión de los marcadores *fruA*, *mrpC* y *tps* en el silvestre y en el mutante $\Delta corSR$

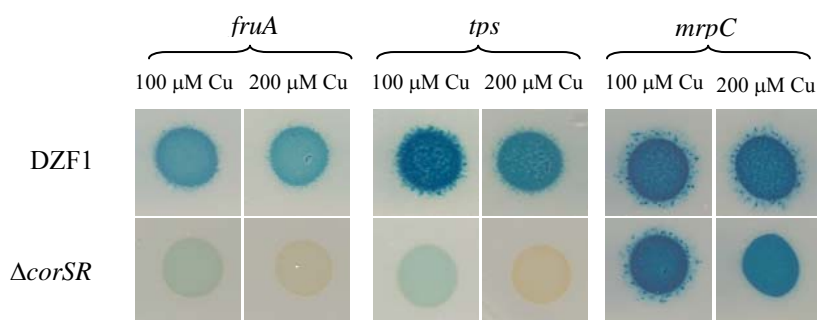
Una vez obtenidas las fusiones se realizó un análisis cualitativo de la expresión de dichos marcadores en la bacteria silvestre y en la mutante  $\Delta corSR$  en un medio CF suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre y el sustrato X-gal. El estudio se realizó con las bacterias previamente incubadas con una concentración de sulfato de cobre de 600  $\mu$ M puesto que nuestro objetivo fue determinar la expresión de

## Resultados

los tres marcadores del desarrollo cuando los mecanismos de resistencia al cobre estaban previamente inducidos ya que en el mutante  $\Delta corSR$  no se producía la formación de cuerpos fructificantes en estas condiciones, sin embargo las bacterias estaban vivas. Para ello las bacterias fueron cultivadas en presencia de cobre antes de ser plaqueadas en medio sin nutrientes.

Para las fusiones con los genes *fruA* y *tps* se observó que en el caso del mutante  $\Delta corSR$  la expresión fue menor a medida que aumentaba la concentración de metal y a partir de 200  $\mu\text{M}$  ya no hubo expresión. Esto coincide con el hecho de que a partir de esta concentración las bacterias del mutante estaban vivas pero no formaban cuerpos fructificantes. En el caso de la fusión con el gen *mrpC* se observó expresión hasta la máxima concentración ensayada (hasta 1000  $\mu\text{M}$ ) tanto en el silvestre como en el mutante. Sin embargo, a partir de la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, el nivel de expresión para el mutante  $\Delta corSR$  fue menor que el de la cepa silvestre.

Estos resultados nos indican que como estos genes son específicos del desarrollo, esta falta de expresión coincide con el hecho de que la bacteria deje de formar cuerpos fructificantes, indicando que el ciclo de desarrollo se bloquea aunque las bacterias no mueran.



**Figura 67.** Expresión de las fusiones *lacZ* de los genes *fruA*, *tps* y *mrpC* en las bacterias DZF1 y  $\Delta corSR$  de *M. xanthus* a partir de cultivos previamente crecidos en presencia de 600  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a 30°C hasta las 72 h.

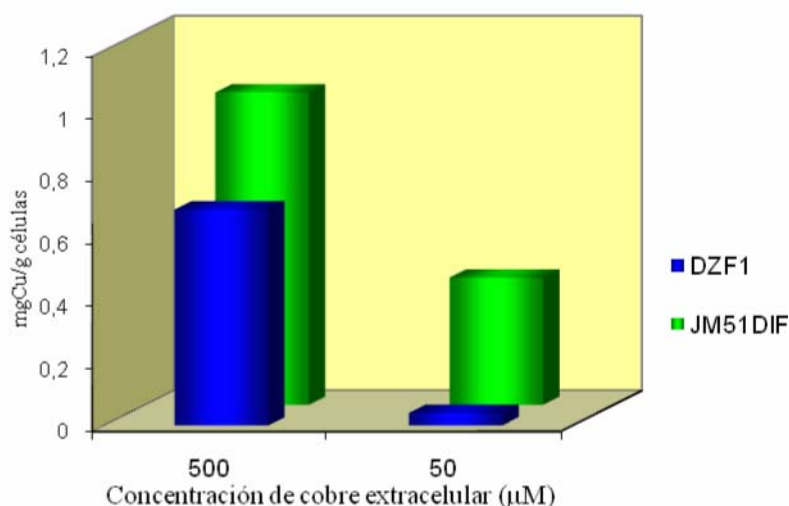
En la Fig. 67 se muestra la expresión de las fusiones de los tres marcadores genéticos en las cepas silvestre y mutante. Se muestran solamente las concentraciones 100 y 200  $\mu\text{M}$ , ya que esta última es la concentración a partir de la cual dejan de formarse los cuerpos fructificantes en el caso del mutante  $\Delta corSR$ . Se observa cómo a partir de esta concentración los genes *fruA* y *tps* dejan de expresarse mientras que el gen *mrpC* se expresa aunque a menor nivel.

### D.IV.4.5. Determinación de la acumulación de cobre intracelular en el mutante $\Delta corSR$

Con el fin de confirmar la posible explicación de que la ausencia del sistema regulador de dos componentes CorSR haga que se acumule cobre en el interior de la célula provocando la síntesis de carotenoides a menor concentración de metal, decidimos determinar la acumulación de cobre intracelular en dicho mutante. Para llevar a cabo dicha determinación, se siguió el protocolo descrito en el Material y Métodos (apartado C.II.9.2.6.), y como control se utilizó la bacteria silvestre. Las medidas se realizaron tanto durante el crecimiento vegetativo, en medio CTT, como en el ciclo de desarrollo, en medio CF, suplementados con las concentraciones de sulfato de cobre de

500 y 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Como control, se realizaron las mismas medidas en ausencia de cobre añadido al medio.

La siguiente gráfica (Fig. 68) muestra los resultados obtenidos tras la realización de las medidas solamente en presencia de cobre añadido, puesto que las cantidades de cobre detectadas en ausencia de metal tanto para la cepa silvestre como para la mutante, eran imperceptibles. Podemos observar que los niveles de cobre intracelular acumulado son más altos en el mutante que en la cepa silvestre. Así, durante el crecimiento vegetativo a esta concentración de sulfato de cobre, la cantidad de dicho metal acumulado para el silvestre era de 0.7 mg Cu/g células, mientras que para el mutante era de 1 mg Cu/g células. Por su parte, durante el ciclo de desarrollo la cantidad de cobre intracelular acumulado para el silvestre era de 0.04 mg Cu/g células y para el mutante era de 0.4 mg Cu/g células. Estos resultados confirman que la falta del sistema regulador de dos componentes CorSR impide que puedan actuar otros mecanismos implicados en la detoxificación de cobre y éste se acumule en el interior celular y posiblemente esta acumulación provoque la síntesis de carotenoides. Obsérvese que la acumulación en el mutante, en relación con la cepa silvestre, era 10 veces mayor durante el ciclo de desarrollo que en el crecimiento vegetativo.



**Figura 68.** Determinación del cobre intracelular para las bacterias silvestre DZF1 y el mutante  $\Delta\text{corSR}$  (JM51DIF) durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. Las medidas fueron realizadas a las 72 h de incubación con el metal.

#### D.IV.5. Otros genes regulados por el sistema regulador de dos componentes CorSR

Una vez que se comprobó que el sistema regulador de dos componentes CorSR regulaba su propia expresión y la expresión del gen *cuoA* de una manera completa en ambos casos, y que estaba implicado en conferir a *M. xanthus* tolerancia al cobre, decidimos estudiar si dicho sistema regulaba otros genes implicados en el metabolismo del cobre en esta bacteria. Para ello se construyeron cepas de *M. xanthus* que contenían fusiones *lacZ* con cada uno de los genes a estudiar en cada caso utilizando el mutante  $\Delta\text{corSR}$  como fondo genético.

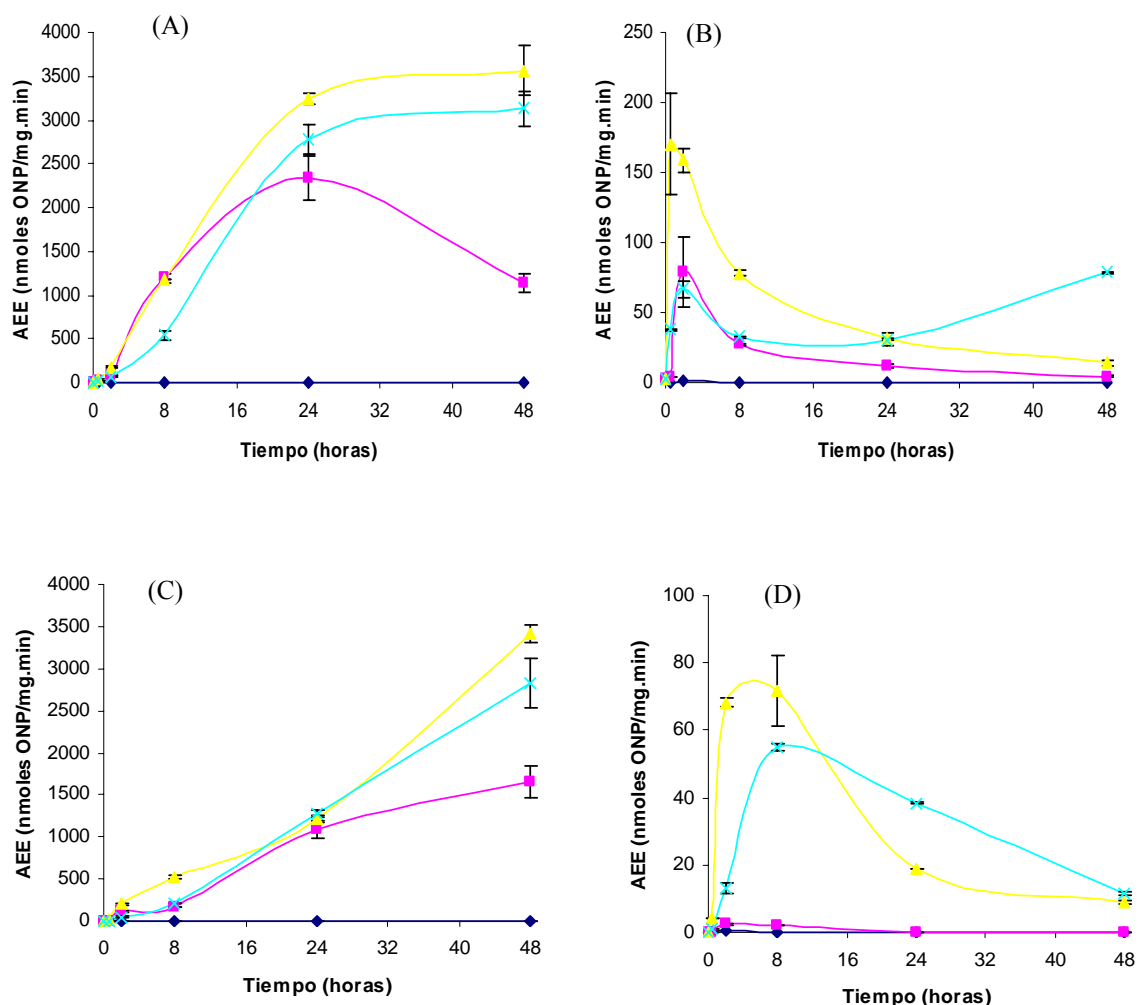
#### D.IV.5.1. Estudio de la regulación del gen *copA* (MXAN3415)

El análisis comenzó con otro gen localizado en el cluster *cura*, MXAN3415, que codifica para una ATPasa translocadora de cobre de tipo P<sub>1B</sub> a la que hemos denominado CopA (Fig. 24).

Para llevar a cabo el estudio, se construyó una cepa de *M. xanthus* que contenía una fusión traduccional del gen *lacZ* de *E.coli* con el gen *copA* utilizando el mutante  $\Delta corSR$  como fondo genético. Para ello se amplificó por PCR un fragmento de 800 pb que abarcaba la región del promotor del gen *copA* utilizando el par de oligonucleótidos ATPasa3415Kpn-ATPasa3415Bam (Tabla 5 del Material y Métodos). Dicho fragmento se clonó en el vector pKY481 y el plásmido resultante, pKY481-CopA, se introdujo en la cepa  $\Delta corSR$  por electroporación. Las colonias positivas se comprobaron mediante Southern blot (no mostrado). La actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por esta nueva cepa nos permitirá comprobar si el gen *copA* está regulado por el sistema regulador de dos componentes CorSR.

Un primer análisis cualitativo en los medios CTT y CF suplementados con cobre y con el sustrato X-gal mostró que el gen *copA* no perdía totalmente la expresión en el mutante  $\Delta corSR$  (no mostrado), aunque no se expresaba al mismo nivel que en la cepa DZF1 utilizada como control (esta cepa fue construida por los doctores Antonio Luis Extremera León y Aurelio Moraleda Muñoz). Esto parece indicar que el sistema CorSR regula la expresión del gen *copA* pero no lo hace de manera completa. Con el objeto de confirmar lo observado cualitativamente se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto en medio CTT como en CF suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre, puesto que se observó que el gen *copA*, al igual que *cuoA* y *corSR*, no se expresa en ausencia de cobre (Fig. 69A, B, C y D).

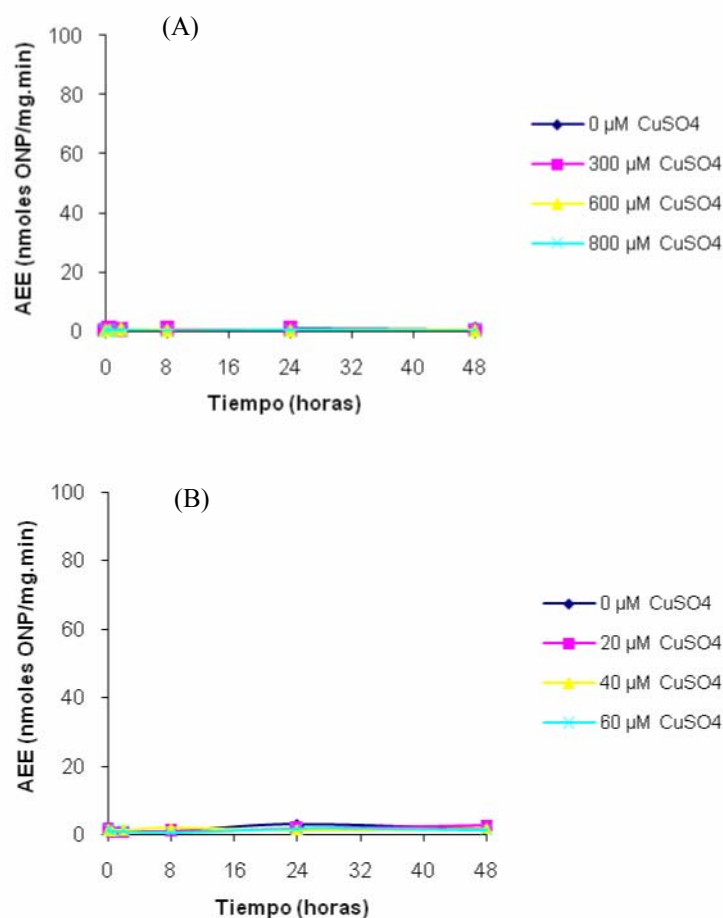
La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa para el gen *copA* en el mutante  $\Delta corSR$  mostró que no había una pérdida total de expresión, indicando que el sistema CorSR regula la expresión del gen *copA* de manera parcial. Pero además dicha cuantificación nos permitió observar que el perfil de expresión del gen *copA* en el mutante  $\Delta corSR$  se correspondía con el perfil de expresión de los genes regulados por el factor sigma de tipo ECF CorE (MXAN3426) de *M. xanthus*. El regulador CorE ha sido estudiado en profundidad por Gómez Santos, 2009. Con el fin de determinar si el gen *copA* estaba regulado por ambos reguladores (CorSR y CorE) decidimos construir una cepa de *M. xanthus* que contenía una fusión traduccional del gen *lacZ* de *E.coli* con el gen *copA* utilizando un mutante doble para los dos reguladores ( $\Delta corSR \Delta corE$ ), construido por Gómez Santos, como fondo genético. Tras comprobar mediante la técnica de Southern blot que las colonias eran positivas (no mostrado), se llevó a cabo un primer análisis cualitativo durante el crecimiento vegetativo y ciclo desarrollo en los medios CTT y CF, respectivamente, suplementados con sulfato de cobre y el sustrato X-gal. En este estudio se comprobó que no había expresión del gen *copA* en el mutante doble para los dos reguladores lo que parecía indicar que dicho gen estaba regulado por ambas proteínas (no mostrado). No obstante debíamos confirmar, mediante cuantificación de la expresión, que efectivamente la pérdida de expresión era total. Para ello se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *lacZ* con el gen *copA* en el mutante doble para ambos reguladores (Fig. 70A y B).



**Figura 69.** Determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa para el gen *copA* durante el crecimiento vegetativo (A) y (B) y durante el ciclo de desarrollo (C) y (D). Las figuras (A) y (C) muestran la actividad del gen *copA* en la cepa DZF1 mientras que las figuras (B) y (D) muestran la actividad de dicho gen en la cepa  $\Delta corSR$ . La línea azul oscuro corresponde a la medida en ausencia de cobre, la línea rosa corresponde a la concentración de 300  $\mu$ M de sulfato de cobre en el caso del crecimiento vegetativo y 20  $\mu$ M para el ciclo de desarrollo, la línea amarilla corresponde a la concentración de 600  $\mu$ M para el crecimiento vegetativo y 40  $\mu$ M para el desarrollo, y la línea azul claro corresponde a la concentración de 800  $\mu$ M para el vegetativo y 60  $\mu$ M para el desarrollo. Obsérvese la diferencia de escala en las figuras (A) y (B), y (C) y (D) respectivamente.

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *copA* en el mutante doble para los reguladores CorSR y CorE corroboró lo observado en el análisis cualitativo: el gen *copA* no se expresaba en el mutante doble para ambas proteínas (Fig. 70 A y B). Esto indica que este gen presenta una regulación doble por ambos reguladores.





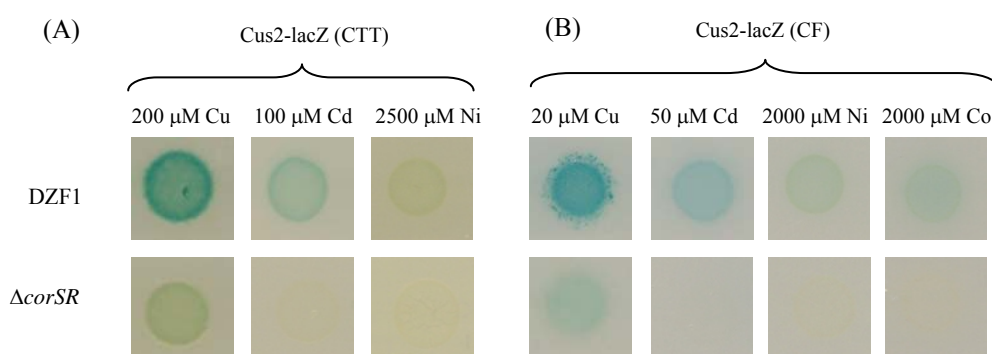
**Figura 70.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *copA* en el mutante doble para los reguladores CorSR y CorE de *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo (A) y el ciclo de desarrollo (B).

#### D.IV.5.2. Estudio de la regulación de los genes *cuoB*, *cuoC*, *copB*, *copC* y los tres sistemas Cus y Czc de *M. xanthus* por el sistema CorSR

Por otro lado, se estudió la regulación por parte del sistema CorSR de otros genes implicados en la respuesta global al cobre en *M. xanthus* (ver apartado D.II.). Por una parte se probó si regulaba alguno de los otros dos genes que codifican para oxidasas multicobre, *cuoB* (MXAN3425) y *cuoC* (MXAN3432), por otra parte se probó si regulaba alguno de los otros dos genes que codifican para ATPasas de tipo P<sub>1B</sub> en *M. xanthus*, *copB* (MXAN3422) y *copC* (MXAN0979), y por último se probó si alguno de los sistemas Cus (Cus1 (MXAN0983, MXAN0984, MXAN0985), Cus2 (MXAN0988, MXAN0989, MXA0990) o Cus3 (MXAN6176, MXAN6177, MXAN6178)), o alguno de los sistemas Czc (Czc1 (MXAN3447, MXAN3448, MXAN3449), Czc2 (MXAN3672, MXAN3671) o Czc3 (MXAN7438, MXAN7437, MXAN7436)) estaba regulado por el sistema de dos componentes CorSR.

Para el estudio se procedió igual en todos los casos: para cada gen se construyó una cepa de *M. xanthus* que contenía una fusión traduccional del gen *lacZ* de *E. coli* con dicho gen utilizando el mutante  $\Delta corSR$  como fondo genético. Tras comprobar mediante Southern blot (no mostrado) que las colonias eran positivas se llevó a cabo un

análisis cualitativo en los medios CTT y CF (para ver si había diferencias entre el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo) suplementados con cobre y otros metales, puesto que alguno de los genes estudiados no responde a cobre, y con el sustrato X-gal. Como control se utilizó una cepa que contenía la fusión *lacZ* con el gen de estudio en cada caso en la cepa silvestre (estas cepas fueron construidas por los doctores Antonio Luis Extremera León y Aurelio Moraleda Muñoz). Se pudo comprobar que ninguno de los genes analizados es regulado por el sistema CorSR puesto que la cepa que contenía la fusión en el mutante  $\Delta corSR$  presentaba los mismos niveles de expresión que la cepa que contenía la fusión en el silvestre. Sólo en el caso del sistema Cus2 se observó regulación por parte del sistema CorSR, siendo parcial en el caso de la respuesta a cobre, mientras que en el caso de la respuesta a los metales divalentes ensayados ( $Cd^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  durante el crecimiento vegetativo y  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$  durante el ciclo de desarrollo) fue total (Fig. 71A y B).



**Figura 71.** Expresión del sistema Cus2 en la cepa silvestre DZF1 y el mutante  $\Delta corSR$  durante el crecimiento vegetativo (A) y durante el ciclo de desarrollo (B) con los metales en los que se observó regulación por parte del sistema CorSR a las 72 h de incubación, a excepción de la imagen de cobre durante el crecimiento vegetativo que fue tomada a las 24 h de incubación porque fue el tiempo donde se observaron mayores diferencias en la expresión del sistema Cus2 entre las cepas silvestre y mutante.

La Tabla 10 muestra todos los genes en los que se ha estudiado si había regulación por parte del sistema regulador de dos componentes CorSR.

**Tabla 10.** Genes para los que presenta regulación el sistema regulador de dos componentes CorSR. En el caso del sistema Cus2 se ha indicado solamente la regulación en el caso de la respuesta a cobre.

| Gen          | Regulación por parte de CorSR |
|--------------|-------------------------------|
| <i>cuoA</i>  | Total                         |
| <i>cuoB</i>  | No                            |
| <i>cuoC</i>  | No                            |
| <i>corSR</i> | Total                         |
| <i>copA</i>  | Parcial                       |
| <i>copB</i>  | No                            |
| <i>copC</i>  | No                            |
| Sistema Cus1 | No                            |
| Sistema Cus2 | Parcial                       |
| Sistema Cus3 | No                            |
| Sistema Czc1 | No                            |
| Sistema Czc2 | No                            |
| Sistema Czc3 | No                            |

## D.IV.6. Análisis del dominio sensor de la histidina quinasa CorS

Los estudios de la topología de la histidina quinasa CorS indican que dicha proteína se encuentra anclada a la membrana citoplasmática a través de un dominio transmembrana, de manera que el dominio sensor queda expuesto hacia el periplasma.

### D.IV.6.1. Estudio de la secuencia del dominio sensor de la histidina quinasa CorS

Como se explicó en la Introducción, el dominio sensor de las histidina quinasa, localizado en el extremo N-terminal, es el elemento que, bien de manera directa o indirecta, detecta los estímulos medioambientales. Es por ello que estas proteínas presentan una gran variedad de dominios sensores con una homología de secuencia primaria muy baja. Nuestro objetivo en este punto, fue determinar la manera en que la parte sensora de la proteína CorS detectaba el cobre. El análisis de la secuencia de dicho dominio mostró que no había ningún motivo de los conocidos en unir cobre. Sí había varias histidinas (Fig. 72), de las que se sabe que unen metales y se pensó que la interacción podría ser directamente con el cobre, o bien con otra proteína que uniera metales.

Con el fin de determinar si esos residuos de histidina estaban implicados en la detección del cobre en la histidina quinasa CorS se construyeron diferentes mutantes de delección del dominio sensor para acotar la zona que detecta dicho metal. Dichos mutantes se utilizaron como fondo genético para introducir la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, un gen para el cual el sistema regulador de dos componentes CorSR presenta una regulación completa. La actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por estas nuevas cepas que portan la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* reflejará la implicación de la parte delecionada en la detección del cobre. Así, si dicha parte delecionada interviene en la detección del metal, al estar eliminada no podrá percibir el estímulo, de manera que la histidina quinasa no se autofosforilará en el residuo de histidina y en consecuencia no podrá transferir dicho grupo fosfato al residuo de aspártico del regulador de respuesta CorR que no podrá activar la transcripción del gen *cuoA*, y por tanto éste no se expresará.

#### D.IV.6.1.1. Construcción de mutantes de delección en fase en el dominio sensor de la histidina quinasa CorS (mutantes 1 y 2)

En un primer momento se realizaron dos mutantes de delección, uno al que denominamos  $\Delta corS1$  y en el que se deleccionaba el dominio sensor casi por completo, con el fin de comprobar que dicho dominio funcionaba como tal, y otro al que denominamos  $\Delta corS2$  en el que se deleccionaba la parte central de este dominio en el que se eliminaban la gran mayoría de residuos de histidina que podrían estar implicados en la detección de cobre (Fig. 72)

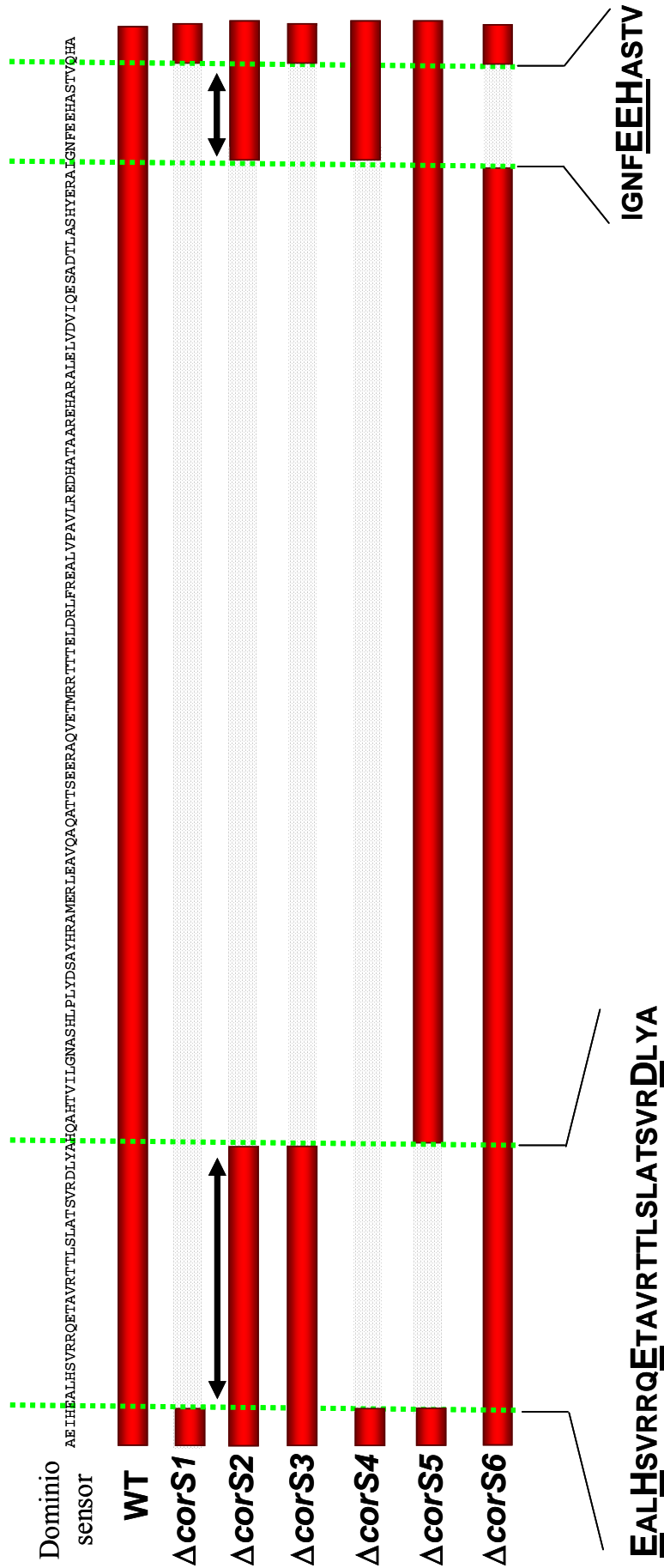
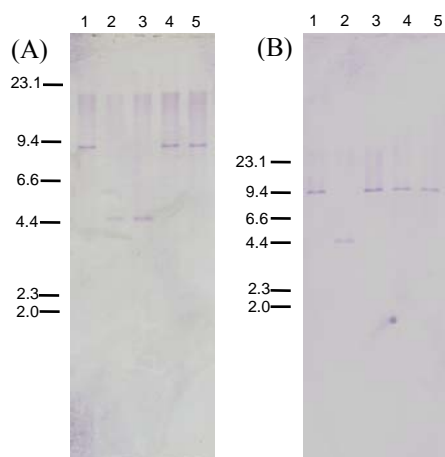


Figura 72. Distintos mutantes de delección, contruidos para el estudio del dominio sensor de la histidina quinasa CorS. En la parte superior se indica la secuencia en aminoácidos del dominio sensor. Las flechas indican las regiones delecionadas en el mutante 1 que no han sido delecionadas en el mutante 2 y parecen estar implicadas en la detección del cobre. Además se muestra la secuencia de estas regiones indicando los posibles aminoácidos que detectan el metal (subrayados).

## Resultados

Para construir estos mutantes de delección se amplificó por PCR un fragmento de 800 pb aguas arriba de la región a deleccionar en cada uno de los mutantes utilizando el par de oligonucleótidos HKMut1KpnF-HKMut1BamR para el mutante 1 (Tabla 6 del Material y Métodos) y el par HKMut2KpnF-HKMut2BamR para el mutante 2; y un fragmento de 800 pb aguas abajo de la región a deleccionar en cada mutante utilizando los oligonucleótidos HKMut1BamF2-HKMut1HinR para el mutante 1 (Tabla 6) y HKMut2BamF2-HKMut2HinR para el mutante 2. Los productos amplificados fueron clonados de manera secuencial en el vector pBJ113 utilizando las dianas *KpnI* y *BamHI* para los fragmentos aguas arriba, y *BamHI* y *HindIII* para los fragmentos aguas abajo. El fragmento aguas arriba quedaba unido al fragmento aguas abajo por la diana *BamHI* para permitir que la mutación ocurriera en fase.

Los plásmidos obtenidos, pBJ113-Mut1 $\Delta$ *corS* y pBJ113-Mut2 $\Delta$ *corS*, se dializaron y fueron incorporados a la bacteria silvestre mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante la técnica de Southern blot para tratar de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección y los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot para diferenciar aquellos que habían revertido al genotipo silvestre de los que portaban la delección deseada (Fig. 73).



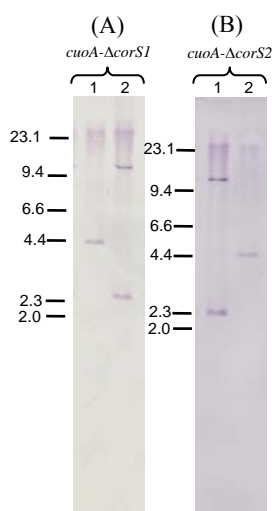
**Figura 73.** Southern blot para comprobar la obtención de los mutantes 1 (A) y 2 (B) del dominio sensor de la histidina quinasa *CorS*. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En la Fig. 73 (A) y (B) se observan los Southern blot realizados para comprobar la obtención del mutante 1 y la obtención del mutante 2, respectivamente, del dominio sensor de la histidina quinasa *CorS*. En ambos Southern, las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria silvestre utilizada como control, y las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. La digestión de los cromosomas se realizó con el enzima *BamHI* y como sonda se utilizó el producto de PCR amplificado por los oligonucleótidos HKMut1KpnF-HKMut1BamR (Tabla 6 del Material y Métodos) para el mutante 1 y HKMut2KpnF-HKMut2BamR para el mutante 2. Los fragmentos esperados fueron 9.4 kb para el silvestre y 4.4 kb para el mutante de delección. En el caso del mutante 1 dos muestras eran positivas (calles 2 y 3) mientras que la muestra de la calle 5 revirtió a silvestre. Se seleccionó la muestra de la calle 3 y se denominó  $\Delta$ *corS1*. En el caso del mutante 2 sólo la muestra de la calle 2 era positiva. Se seleccionó dicha muestra y se denominó  $\Delta$ *corS2*.

#### D.IV.6.1.2. Determinación del perfil de expresión del gen *cuoA* en los mutantes $\Delta corS1$ y $\Delta corS2$

Una vez obtenidos los mutantes de delección para ambos fragmentos del dominio sensor de la histidina quinasa CorS, se utilizaron como fondo genético para introducir la fusión del gen *lacZ* de *E. coli* con el gen *cuoA*, a fin de comprobar si estas partes delecionadas detectaban el cobre.

Para ello el plásmido que contiene la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, pKY481-CuoA (ver apartado D.III.3.), se introdujo en las bacterias mutantes  $\Delta corS1$  y  $\Delta corS2$  mediante electroporación. Las colonias positivas se analizaron mediante la técnica de Southern blot (Fig. 74).

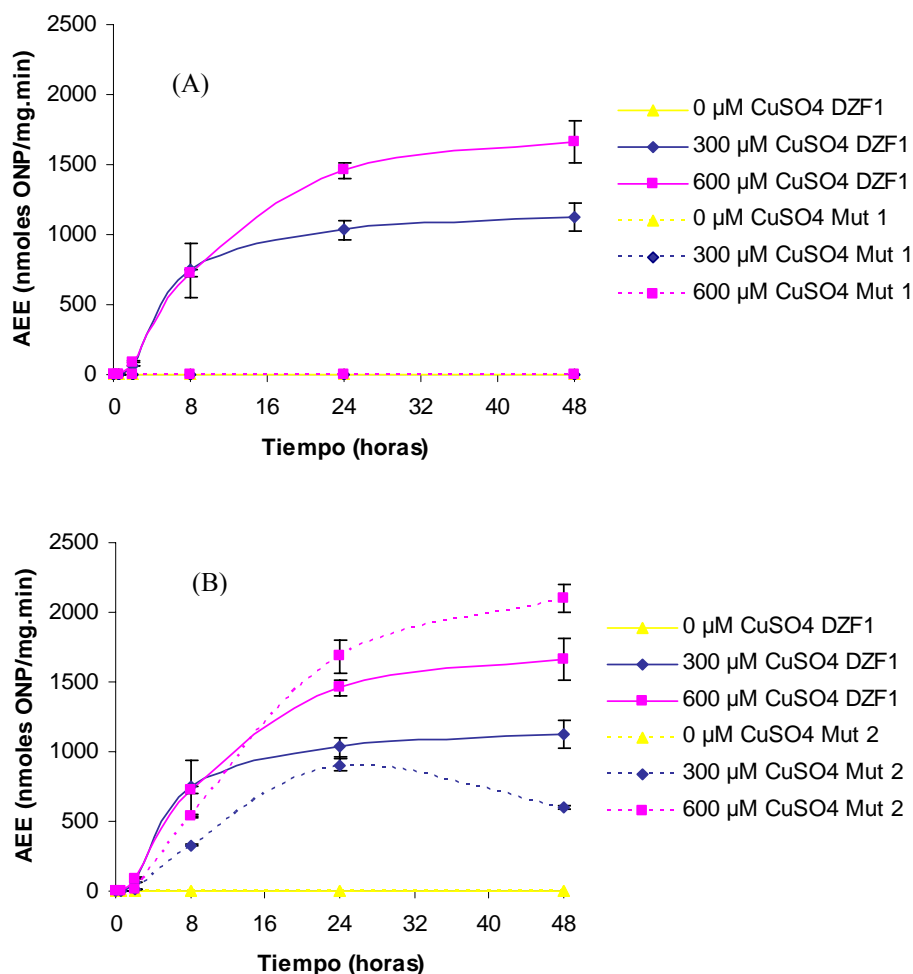


**Figura 74.** Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en los mutantes  $\Delta corS1$  y  $\Delta corS2$ . En (A) la calle 1 muestra la digestión del cromosoma de la cepa  $\Delta corS1$  utilizada como control. En la calle 2 se muestra la digestión del cromosoma de la cepa portadora de la fusión. En (B) la calle 1 muestra la digestión del cromosoma de la cepa portadora de la fusión, y la calle 2 muestra la digestión del cromosoma de la cepa  $\Delta corS2$  utilizada como control. La digestión utilizada fue *Bam*HI y los tamaños esperados fueron: 10.9 kb y 2.6 kb para las cepas portadoras de la fusión, y 4.4 kb para los mutantes  $\Delta corS1$  y  $\Delta corS2$ . Como sonda se utilizó el fragmento empleado para construir la fusión. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Una vez comprobado que las colonias analizadas eran positivas se seleccionaron y se denominaron *cuoA*lacZ- $\Delta corS1$  y *cuoA*lacZ- $\Delta corS2$ .

A continuación, se realizó un estudio cualitativo de la expresión del gen *cuoA* en ambos mutantes en un medio CTT sin cobre y el sustrato X-gal en un caso, y suplementado con sulfato de cobre y el sustrato X-gal en otro caso. Como control se utilizó la cepa JM51AZY que contenía la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en el silvestre. Se comprobó que en el caso del mutante  $\Delta corS1$ , donde el dominio sensor de la histidina quinasa CorS se había delecionado casi por completo, el gen *cuoA* dejaba de expresarse en presencia de cobre, y al igual que ocurría en el silvestre tampoco se expresaba en ausencia de dicho metal (no mostrado). Mientras que en el caso del mutante  $\Delta corS2$ , donde se había delecionado la parte central del dominio sensor, el gen *cuoA* se expresaba a niveles similares que los del silvestre en presencia de cobre, sin embargo, en el caso del medio sin cobre no se expresaba, al igual que ocurría en el silvestre (no mostrado). Con el fin de corroborar lo observado cualitativamente, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en un medio CTT en ausencia de cobre y suplementado con diferentes concentraciones de dicho metal (Fig. 75A y B).

## Resultados



**Figura 75.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corS1$  (Mut 1) (A) y el mutante  $\Delta corS2$  (Mut 2) (B) durante el crecimiento vegetativo.

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en ambos mutantes para el dominio sensor de la histidina quinasa CorS mostró que en el caso del mutante  $\Delta corS1$  no había expresión de dicho gen, como ya se había observado cualitativamente. Este resultado era de esperar puesto que la delección comprendía el dominio sensor casi por completo. En el caso del mutante  $\Delta corS2$ , el gen *cuoA* se expresaba a niveles similares que en el silvestre, indicando para nuestra sorpresa, que esta parte delecionada del dominio sensor no interviene en la detección del cobre.

Este experimento indica que la región que detecta el cobre en la histidina quinasa CorS de *M. xanthus* se encuentra en la región delecionada en  $\Delta corS1$  pero no en  $\Delta corS2$ . Para profundizar en las regiones implicadas en la detección del metal construimos nuevos mutantes de delección en fase.

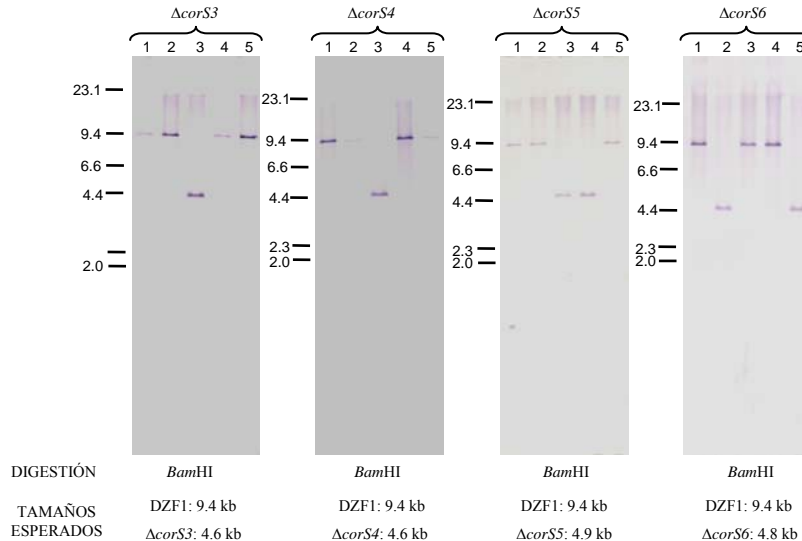
### D.IV.6.1.3. Construcción de nuevos mutantes de delección en fase del dominio sensor de la histidina quinasa CorS (mutantes 3, 4, 5 y 6)

Una vez comprobado lo que ocurría cuando se delecionaba casi por completo el dominio sensor de la histidina quinasa CorS ( $\Delta corS1$ ) y cuando se delecionaba la parte central de dicho dominio ( $\Delta corS2$ ), construimos nuevos mutantes en los que fuimos

eliminando regiones que se habían delecionado en  $\Delta corS1$  pero no en  $\Delta corS2$ . En la Fig. 72 se muestran las nuevas deleciones realizadas en el dominio sensor de la histidina quinasa CorS.

Al igual que se hizo con los mutantes  $\Delta corS1$  y  $\Delta corS2$ , para construir los mutantes  $\Delta corS3$ ,  $\Delta corS4$ ,  $\Delta corS5$  y  $\Delta corS6$  se amplificaron por PCR fragmentos de 800 pb aguas arriba de la región a delecionar en cada uno de los mutantes empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 6 en el Material y Métodos, y otros fragmentos de 800 pb aguas abajo de la región a delecionar en cada mutante utilizando los oligonucleótidos que se muestran en dicha Tabla. Los productos amplificados fueron clonados de manera secuencial en el vector pBJ113 utilizando las dianas *KpnI* y *BamHI* para los fragmentos aguas arriba, y *BamHI* y *HindIII* para los fragmentos aguas abajo. El fragmento aguas arriba quedaba unido al fragmento aguas abajo por la diana *BamHI* para permitir que la mutación ocurriera en fase y se mantuviera completa la secuencia de CorS, excepto los fragmentos delecionados.

Los plásmidos obtenidos, pBJ113-Mut3 $\Delta corS$ , pBJ113-Mut4 $\Delta corS$ , pBJ113-Mut5 $\Delta corS$  y pBJ113-Mut6 $\Delta corS$  se dializaron y fueron incorporados a la bacteria silvestre mediante electroporación y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot con el fin de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de deleción y las colonias recombinantes fueron analizadas mediante Southern blot para diferenciar aquellas que portaban la deleción deseada de las que habían revertido al genotipo silvestre (Fig. 76).



**Figura 76.** Southern blot para comprobar la obtención de los mutantes 3, 4, 5, y 6 del dominio sensor de la histidina quinasa CorS. Como sonda se utilizó en todos los casos el fragmento aguas arriba de la región delecionada a excepción del mutante  $\Delta corS5$  donde se empleó el fragmento aguas abajo. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

La Fig. 76 muestra los Southern blot realizados para comprobar la obtención de los mutantes 3, 4, 5 y 6, respectivamente, del dominio sensor de la histidina quinasa CorS. En el caso de los Southern para  $\Delta corS3$  y  $\Delta corS6$ , las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria DZF1 utilizada como control, mientras que las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a



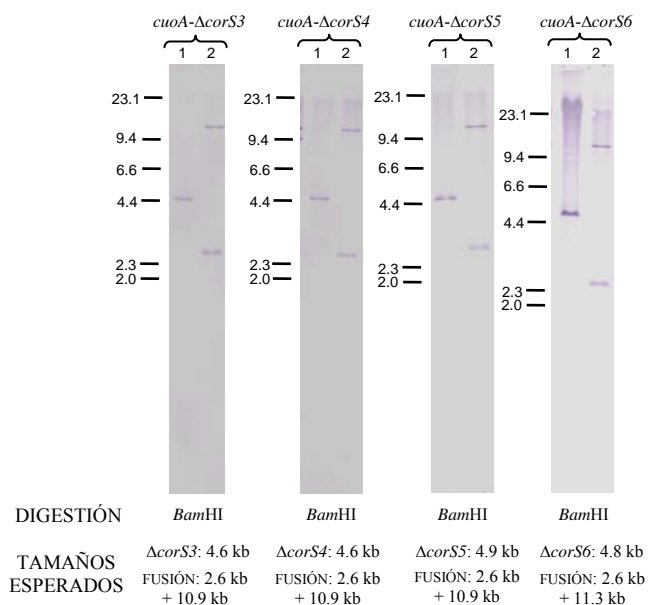
## Resultados

analizar. En el caso de los Southern para  $\Delta corS4$  y  $\Delta corS5$ , las calles 2 y 5 corresponden a la digestión del cromosoma de la bacteria DZF1, mientras que las calles, 1, 3 y 4 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar. En el caso de los mutantes  $\Delta corS3$  y  $\Delta corS4$  sólo una de las muestras analizadas era positiva ya que el resto revirtió a genotipo silvestre, así que se seleccionó dicha muestra en ambos casos. En el caso de los mutantes  $\Delta corS5$  y  $\Delta corS6$  dos de las muestras analizadas eran positivas. Para el mutante 5 se seleccionó la muestra de la calle 3 mientras que para el mutante 6 se seleccionó la muestra de la calle 5.

### D.IV.6.1.4. Determinación del perfil de expresión del gen *cuoA* en los mutantes $\Delta corS3$ , $\Delta corS4$ , $\Delta corS5$ y $\Delta corS6$

Una vez obtenidos estos nuevos mutantes de delección para el dominio sensor de la histidina quinasa CorS, se emplearon como fondo genético para introducir la fusión del gen *lacZ* de *E. coli* con el gen *cuoA*, a fin de comprobar si estas partes delecionadas detectaban el cobre.

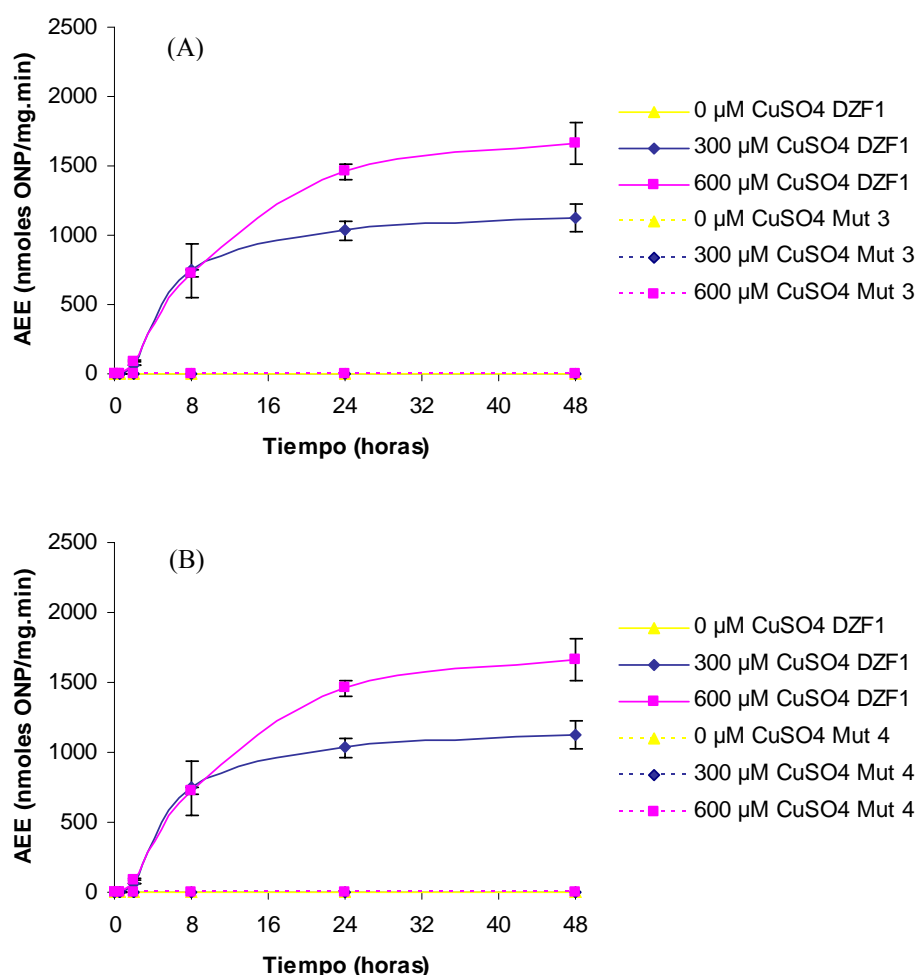
Para ello el plásmido que contiene la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, pKY481-CuoA (ver apartado D.III.3.) se introdujo en las bacterias mutantes  $\Delta corS3$ ,  $\Delta corS4$ ,  $\Delta corS5$  y  $\Delta corS6$  mediante electroporación y las colonias positivas se analizaron mediante Southern blot (Fig. 77).



**Figura 77.** Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en los mutantes  $\Delta corS3$ ,  $\Delta corS4$ ,  $\Delta corS5$  y  $\Delta corS6$ . En la calle 1 se muestra la digestión del cromosoma de la cepa mutante empleada como fondo genético en cada caso utilizada como control. En la calle 2 se muestra la digestión del cromosoma de la cepa portadora de la fusión en cada caso. Como sonda se utilizó el fragmento empleado para construir la fusión. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Tras la comprobación, mediante Southern blot, de que todas las colonias analizadas eran positivas, se procedió a realizar un estudio cualitativo de la expresión del gen *cuoA* en cada uno de los nuevos mutantes del dominio sensor de la proteína CorS. Para ello se empleó un medio CTT sin más suplementado con el sustrato X-gal, y un medio CTT con diferentes concentraciones de sulfato de cobre y suplementado también con el sustrato X-gal. Al igual que se hizo en el estudio de la expresión del gen *cuoA* en los mutantes 1 y 2 de la región sensora de CorS, como control se utilizó la cepa JM51AZY que contenía la fusión *lacZ* con dicho gen en el silvestre. Se pudo comprobar, en el caso del mutante  $\Delta corS3$ , donde se había delecionado la parte central del dominio sensor y la parte próxima al dominio transmembrana (Fig. 72), que el gen

*cuoA* dejaba de expresarse (no mostrado). Lo mismo ocurría en el mutante  $\Delta corS4$  (no mostrado), donde se había deletado, además de la parte central del dominio sensor, la región próxima al péptido señal (Fig. 72). Sin embargo, en el mutante  $\Delta corS5$ , donde se había deletado solamente la parte próxima al péptido señal (Fig. 72), el gen *cuoA* se expresaba a niveles casi indetectables en presencia de cobre, mientras que en ausencia del metal presentaba una ligera expresión basal (no mostrado). En el caso del mutante  $\Delta corS6$ , donde se había deletado solamente la parte próxima al dominio transmembrana (Fig. 72), se observó que el gen *cuoA* se expresaba a niveles algo más bajos en presencia de cobre que en la cepa silvestre, sin embargo, en ausencia del metal presentaba una expresión basal mucho mayor que la observada en el mutante  $\Delta corS5$  (no mostrado). Con el objeto de ratificar lo observado en el análisis cualitativo, se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en cada uno de los mutantes en un medio CTT en ausencia de cobre y suplementado con diferentes concentraciones de dicho metal.

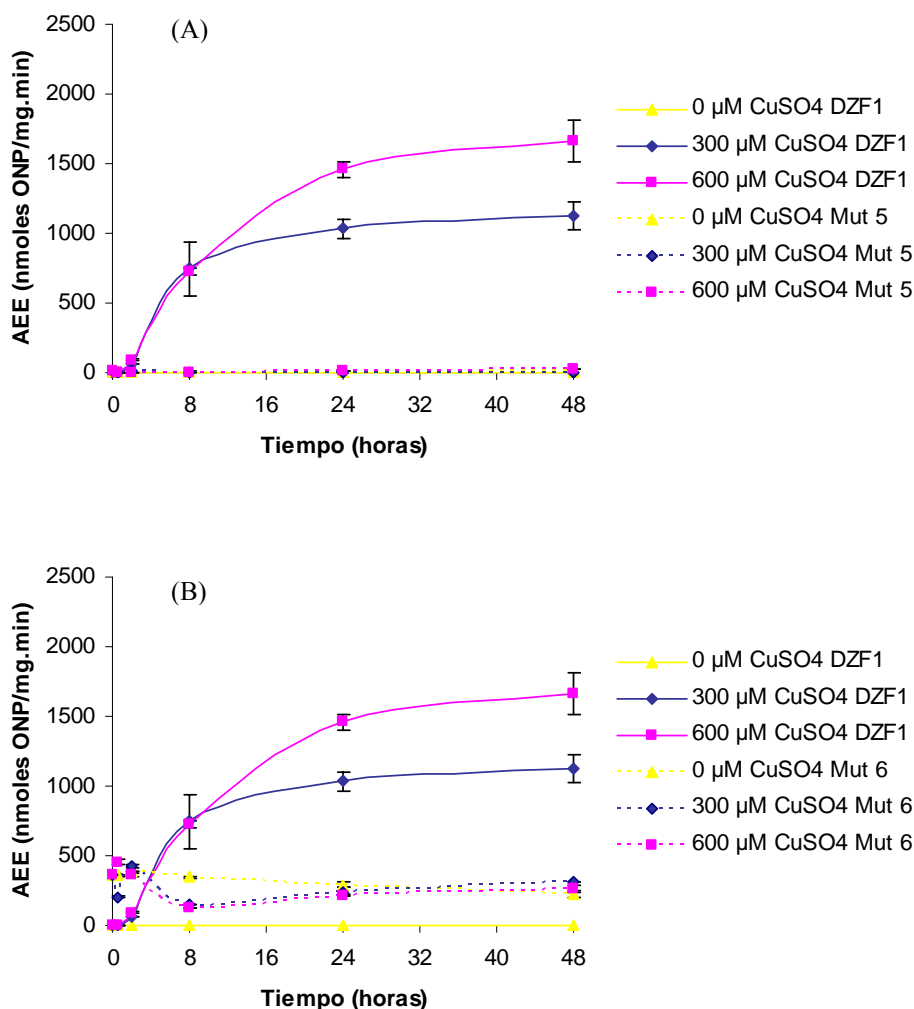


**Figura 78.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta corS3$  (Mut 3) (A) y el mutante  $\Delta corS4$  (Mut 4) (B) durante el crecimiento vegetativo.

La determinación cuantitativa de actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en los mutantes  $\Delta corS3$  y  $\Delta corS4$  (Fig. 78A y B) confirmó lo observado durante el estudio cualitativo: el gen *cuoA* no se expresaba cuando se deletaban, además de la parte central del dominio sensor de *CorS*, la parte próxima al dominio transmembrana

## Resultados

(mutante 3) o la región próxima al péptido señal (mutante 4). Esto reafirma lo observado con los mutantes 1 y 2, las regiones próximas al péptido señal y al dominio transmembrana parecen estar implicadas en la detección de cobre.



**Figura 79.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta\text{corS5}$  (Mut 5) (A) y el mutante  $\Delta\text{corS6}$  (Mut 6) (B) durante el crecimiento vegetativo.

En el caso de los mutantes  $\Delta\text{corS5}$  y  $\Delta\text{corS6}$ , la determinación cuantitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* corroboró lo observado en el estudio cualitativo: en el caso del mutante 5, se observó una ligera expresión basal en ausencia de cobre, y en presencia de dicho metal los niveles observados fueron muy bajos (Fig. 79A), aproximadamente 100 veces menores que los observados en la cepa silvestre. Esto indica que la parte del dominio sensor próxima al péptido señal, región delecionada en el mutante 5 (Fig. 72), está implicada en la detección de cobre, puesto que su eliminación hace que no se exprese el gen *cuoA*, ya que la histidina quinasa CorS no puede activarse porque no puede detectar la presencia de cobre. En el caso del mutante 6, donde se delecionó la parte próxima al dominio transmembrana (Fig. 72), se observó que a diferencia de los otros mutantes del dominio sensor, la eliminación de esta región hace que el gen *cuoA* se exprese a niveles basales bastante elevados, entre 300 y 400 unidades aproximadamente. Es importante destacar que el gen *cuoA*, no se expresa en ausencia de metales. En presencia de cobre, los niveles de expresión, así como el perfil,

son diferentes con respecto a la cepa silvestre (Fig. 79B). Lo más significativo de este mutante, es que se expresa sin cobre.

Estos experimentos realizados con el dominio sensor de la histidina quinasa CorS parecen sugerir que las regiones delecionadas en los mutantes 5 y 6 (Fig. 72) están implicadas en la detección de cobre. Sin embargo, un análisis de la secuencia de estas regiones delecionadas parece indicar que no hay sitios típicos de reconocimiento de cobre.

#### **D.IV.7. Estudio de la interacción de la lipoproteína MXAN3417 con la histidina quinasa CorS**

Como se ha indicado anteriormente, los estudios realizados con los mutantes del dominio sensor de la histidina quinasa CorS parecen sugerir que no hay sitios típicos de reconocimiento de cobre, por tanto, nos planteamos que dicho dominio sensor podría reconocer el metal a través de la interacción con otras proteínas.

Agua abajo del sistema regulador de dos componentes CorSR se localiza un gen que codifica para una proteína que tiene cierta homología con las lipoproteínas (MXAN3417). Esta proteína se caracteriza porque presenta repeticiones NHL que se han encontrado en una amplia variedad de enzimas, algunas de ellas implicadas en la homeostasis del cobre. Se ha descrito que en algunas actinobacterias está muy conservada esta organización genómica: un sistema regulador de dos componentes e inmediatamente aguas abajo un gen que codifica para una lipoproteína. En este grupo de bacterias se postula que la lipoproteína media la transducción de señales a través del sistema regulador de dos componentes por interacción con el dominio sensor de la histidina quinasa, formando un “sistema de tres componentes” (Hoskisson y Hutchings, 2006). Por esta razón, nos planteamos si la lipoproteína situada inmediatamente aguas abajo del sistema CorSR estaría implicada en la detección del cobre y transmitiría la señal a la histidina quinasa CorS a través de la interacción con su dominio sensor, quien a su vez transmitiría la señal al regulador de respuesta CorR que activaría la transcripción de los genes diana. Para ello decidimos construir un mutante de delección en fase para el gen que codifica la lipoproteína MXAN3417 y emplearlo como fondo genético para introducir la fusión del gen *lacZ* de *E. coli* con el gen *cuoA* de *M. xanthus*. Se utilizó el gen *cuoA* porque el sistema regulador CorSR regula su expresión completamente, de modo que una pérdida de expresión del gen *cuoA* en el mutante para la lipoproteína MXAN3417 en presencia de cobre indicaría que, al no estar presente la lipoproteína, no detectaría el metal, no podría transmitir la señal al sistema regulador CorSR y no habría respuesta, es decir, no habría expresión del gen *cuoA*, lo que nos demostraría que el sistema regulador de dos componentes CorSR y la lipoproteína MXAN3417 formarían un “sistema de tres componentes”.

##### **D.IV.7.1. Análisis de la secuencia del gen MXAN3417 y de la proteína que codifica**

En la Fig. 80 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen MXAN3417 de *M. xanthus*, así como la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína que codifica dicho gen.

## Resultados

```

tcgattcacaaccggacactgcctctgtagatgccgtcgcacatgattccgcccAAAGGAccgtcgaa
ATG GAA CGC ATG AAG CCG ACA CTG TGG ATG ATG CCC TTC CTG ACT GCG CTG
M E R M K P T L W M M P F L T A L
GCG ATG AGT GGC TGC GCC GAC AAG GAC CCG AAC TCG TTC CCC GTC CTC GAA
A M S G C A D K D P N S F P V L E
AAG GAC GCC GTG TTC GTC GTG AAT GGT GGC AGC AAC TCC CTC AGC GTC ATT
K D A V F V V N G G S N S L S V I
GAC GTG GAG CGG CAG GAG GTC ACC AGC ACC CTT CGA TTG AAG GAC ATG ACC
D V E R Q E V T S T L R L K D M T
TAT CCC CAC CAC ATC AGC CTC AGC CCG GAC CGG AGC CTG CTC GTG GTG GCG
Y P H H I S L S P D R S L L V V A
GTC CCC GGC ATG GAC CTG AGC GGC GGG CAC GGC GGC GGG CAC GGC GGT CAC
V P G M D L S G G H G G H G G H
AGC ATG CCT GGC AAG CTC CTC CTG CTG GAC GCG AAG ACG GGT AAG ACG CGG
S M P G K L L L L D A K T G K T R
GCT ACG CGG CAG TTC GAC GTG ATG ACC CAC AAC GGC GCC TTC TCG CCG GAC
A T R Q F D V M T H N G A F S P D
GGC ACC GAG GTG TGG ACG GCC CTG ATG GCA AAG CCG GGC GCG GTG GTC GTG
G T E V W T A L M A K P G A V V V
CTC GAC AGC CAG ACG CTC GAG CCC AAG CAA ACA ATC GAC GTG GGC GAC ATG
L D S Q T L E P K Q T I D V G D M
CCC GCG GAG GTG ACG TTC TCC CAG GAC GGG CGC TAC GCC TTC GTC GCC AAT
P A E V T F S Q D G R Y A F V A N
GGC GAC TCC AAC AAC GTC TCC GTC ATC AAC GCG GCC ACC AAG GCG GTG GTG
G D S N N V S V I N A A T K A V V
AAG ACG GTG ACC GTC GGG GCC AAC CCG GTC GGC GCC TGG CCA GGA AAC GAC
K T V T V G A N P V G A W P G N D
GGC CTC ATG TAC GTG GAC AAC GAG GAC GGC AAG AGC CTC ACC GGC ATT GAT
G L M Y V D N E D G K S L T G I D
GCC AGC ACC CTC GAT GTG GCG CGC ACC TAT CCG CTG GGC TTC ACG CCG GCC
A S T L D V A R T Y P L G F T P A
ATG GCC GCC ACC GCC CCC AAT GGG GAC CTC TGG GTG ACG GAC ACC GAC AAC
M A A T A P N G D L W V T D T D N
GGC AAG GTC ATC TTC TTC GCC GCA GGT ACG ACG ACA CGT CAG GGG GAA CTG
G K V I F F A A G T T T R Q G E L
GCC ACT GGC GCC GGA GCC CAT GGC ATC GCG TTC TCC GCT GAT GGC GCC ACC
A T G A G A H G I A F S A D G A T
TCA TTC ATC ACC AAC CAG ACC GCG GGG ACG CTC AGC ATC GTC GAC GTC GCC
S F I T N Q T A G T L S I V D V A
TCG CGC ACC GTT CGG AAG ACG CTC ACC GTG GGC ACT CAG CCC AAC GGA CTT
S R T V R K T L T V G T Q P N G L
GTC TTC CGC AAG AAC TGA cccatctcgaggtacgaggtgattggcgtggctccccctgt
V F R K N Stop

```

**Figura 80.** Secuencia nucleotídica del gen MXAN3417 de *M. xanthus*. En rosa se muestra la secuencia deducida de la lipoproteína que codifica destacando en naranja el péptido señal que reconoce y corta la enzima peptidasa señal II, y en azul el residuo de cisteína por el cual dicha proteína queda anclada a la membrana. En verde se muestra el codón de iniciación, en rojo el codón de terminación y en amarillo un posible sitio de unión al ribosoma.

Como codón de iniciación se ha definido un ATG, destacado en verde en la Fig. 80, situado en la misma pauta de lectura que el codón de terminación de la secuencia, TGA, destacado en rojo en la Fig. 80, e inicia una pauta de lectura con el uso de codones típico de *M. xanthus* con un posible sitio de unión al ribosoma (AAAGGA) a 8 pb aguas arriba.

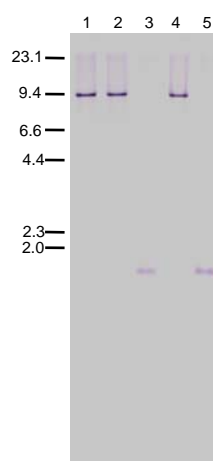
El gen MXAN3417 está constituido por 1038 pb y codifica para una proteína de 345 aminoácidos con un peso molecular estimado de 36.1 kDa. Este gen presenta G o C en la tercera posición en el 89% de los tripletes, lo que supone un uso de codones típico de *M. xanthus* y otros microorganismos con un alto contenido en G+C.

La proteína codificada por el gen MXAN3417 muestra un péptido señal en el extremo N-terminal (destacado en naranja en la Fig. 80) cortado por la enzima peptidasa señal II específica de lipoproteínas. Esta enzima reconoce una secuencia específica y corta aguas arriba de un residuo de cisteína (destacado en azul en la Fig. 80) de manera que la proteína queda anclada a la membrana a través de un ácido graso unido a esa cisteína.

#### D.IV.7.2. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen MXAN3417

La obtención del mutante de delección en fase del gen MXAN3417 implicó la eliminación de la totalidad del gen, manteniendo solamente el codón de iniciación y el codón de terminación de la proteína conectados por el sitio de restricción *Bam*HI, conservando de esta manera la pauta de lectura y evitando el efecto polar que pudiera tener la delección del gen. Para ello se utilizó el par de oligonucleótidos Mut3417KpnF-Mut3417BamR (Tabla 6 del Material y Métodos) para la amplificación de un fragmento de 817 pb situado por delante del gen MXAN3417, y el par Mut3417BamF-Mut3417HinR (Tabla 6) para amplificar un fragmento de 804 pb situado por detrás de dicho gen. Ambos productos fueron clonados de forma secuencial en el vector pBJ113.

El plásmido resultante (pBJ113-Mut3417) se dializó y se introdujo en la bacteria silvestre. Las colonias obtenidas, resistentes a kanamicina como consecuencia de la incorporación del plásmido, se analizaron mediante Southern blot para identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección y los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot para diferenciar aquellos que habían revertido al genotipo silvestre de los que portaban la delección deseada (Fig. 81).



**Figura 81.** Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN3417. Las calles 2 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizada como control, y las calles 1, 3 y 5 corresponden a la digestión del cromosoma de las colonias recombinantes. La digestión empleada fue *Bam*HI y como sonda se utilizó la región cromosómica situada por detrás del gen MXAN3417. El tamaño de los fragmentos esperados fue 9.4 kb para el silvestre y 1.2 kb para el mutante. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

De las tres colonias analizadas, dos portaban la delección deseada mientras que la muestra situada en la calle 1 revirtió a genotipo silvestre. Se seleccionó la colonia de calle 5 y se denominó  $\Delta 3417$ .

#### D.IV.7.3. Análisis de la expresión del gen *cuoA* en el mutante $\Delta 3417$

Una vez construido el mutante de delección en fase para el gen MXAN3417 se empleó como fondo genético para la construcción de una cepa que contenía la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* y el estudio de la expresión de dicho gen en el mutante  $\Delta 3417$ .

## Resultados

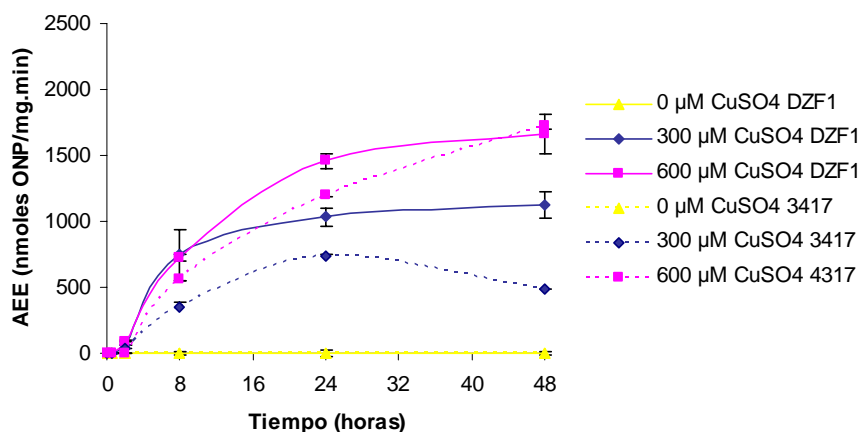
Para ello el plásmido que contiene la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, pKY481-CuoA (ver apartado D.III.3.), se introdujo en la bacteria mutante  $\Delta 3417$  y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina (Fig. 82).



**Figura 82.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* de *M. xanthus* en el mutante  $\Delta 3417$ . Las calles 1 y 3 corresponden a la digestión de los cromosomas de las muestras a analizar mientras que la calle 2 corresponde a la digestión del cromosoma del mutante  $\Delta 3417$  utilizado como control. La digestión empleada fue *Bam*HI y los tamaños esperados fueron 7.2 kb para el mutante  $\Delta 3417$ , y 2.6 kb y 13.7 kb para las cepas portadoras de la fusión. Como sonda se utilizó el fragmento empleado para construir la fusión. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Las dos muestras analizadas eran correctas. Se seleccionó la muestra situada en la calle 3 y se denominó *cuoA*lacZ- $\Delta 3417$ .

El análisis de la expresión del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta 3417$  se realizó en primer lugar de manera cualitativa, en un medio CTT suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre, puesto que el gen *cuoA* no se expresa en ausencia de este metal, y con el sustrato X-gal (no mostrado). Como control se utilizó la cepa JM51AZY, que contiene la fusión *lacZ* con el gen *cuoA* en la bacteria silvestre. En este estudio se comprobó que el gen *cuoA* en el mutante  $\Delta 3417$  se expresaba a niveles similares que en la cepa silvestre, lo que parece indicar que la lipoproteína codificada por el gen MXAN3417 no formaría un “sistema de tres componentes” con el sistema CorSR como ocurre en las actinobacterias (Hoskisson y Hutchings, 2006). No obstante, aunque cualitativamente no se observaron diferencias en la expresión del gen *cuoA* en las bacterias silvestre y mutante con las concentraciones de sulfato de cobre probadas (300 y 600  $\mu$ M) y hasta las 48 h de incubación, se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de dicho gen en el mutante para la lipoproteína MXAN3417 con el fin de determinar si había alguna diferencia en el perfil de expresión con respecto a la bacteria silvestre.



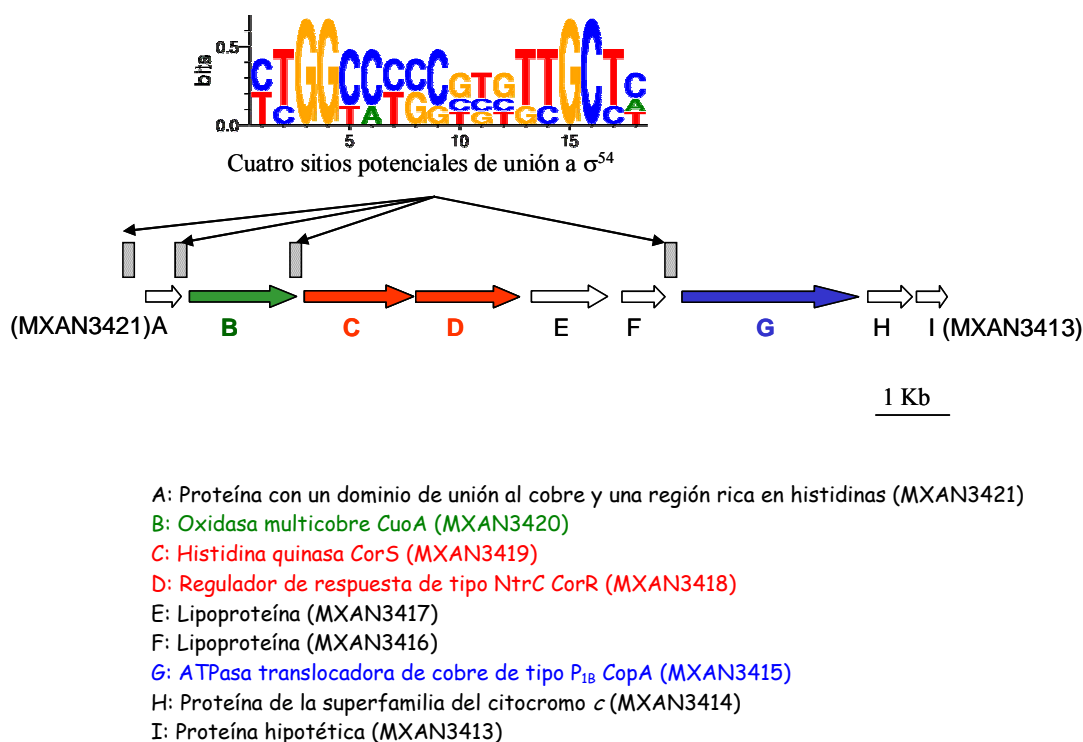
**Figura 83.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta 3417$  durante el crecimiento vegetativo.

La medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó solamente durante el crecimiento vegetativo en medio CTT suplementado con las concentraciones de sulfato de cobre de 300 y 600  $\mu$ M. Como control se utilizó un medio CTT sin metal. Tras la determinación, se pudo comprobar que el perfil de expresión era muy similar al de la cepa silvestre, es decir, el promotor del gen *cuoA* es inducido conforme aumentan los niveles de Cu(II). En cuanto a los niveles de expresión, son bastante similares a los de la cepa silvestre aunque algo más bajos, probablemente como consecuencia del error experimental cometido al realizar las medidas, lo que confirma lo observado en el experimento cualitativo donde no se observaron diferencias de coloración azul en ambas bacterias a este tiempo de incubación y a esta concentración de sulfato de cobre, indicando que la lipoproteína MXAN3417 no forma parte de un “sistema de tres componentes” con el sistema CorSR (Fig. 83).

#### D.IV.8. Análisis del regulador de respuesta CorR del sistema CorSR

El regulador de respuesta CorR pertenece a la familia de reguladores de respuesta de tipo NtrC. Como se explicó con detalle en la Introducción, esta familia de proteínas se caracteriza porque son dependientes del factor  $\sigma^{54}$ . Para el inicio de la transcripción es necesario que estas proteínas, también llamadas EBPs, se unan a unas secuencias localizadas a un mínimo de 80 pb del promotor conocidas como UAS e interaccionen directamente con  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa. En este proceso, estas proteínas acoplan la hidrólisis de ATP para remodelar el complejo cerrado del ADN y permitir el inicio de la transcripción.

##### D.IV.8.1. Localización de posibles sitios de unión de $\sigma^{54}$ en el cluster *curA*



**Figura 84.** Localización de cuatro sitios potenciales de unión a  $\sigma^{54}$  en el cluster *curA* y LOGO de la secuencia consenso de dichos sitios.



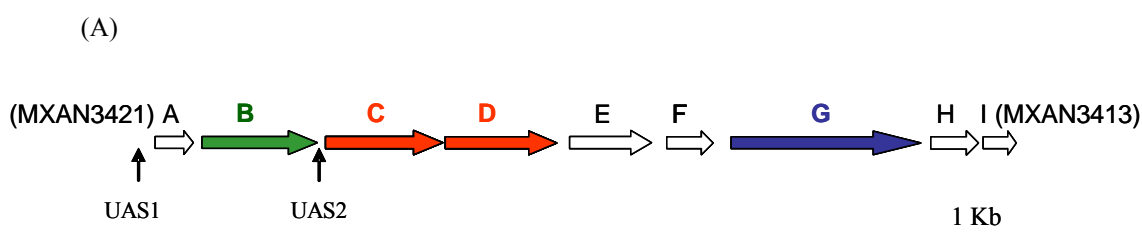
## Resultados

Como se comentó en el apartado D.III.2., el análisis detallado de la secuencia del cluster *curA* mostró la presencia de cuatro posibles sitios de unión al factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa (ver Tabla 8). La Fig. 84 muestra la localización de esos sitios potenciales así como el LOGO de la secuencia consenso. La secuencia de los sitios localizados en las regiones promotoras de los genes A (MXAN3421) y C (MXAN3419) está totalmente conservada, mientras que la secuencia de los sitios localizados delante del gen B (MXAN3420) y G (MXAN3415) no se encuentra tan conservada.

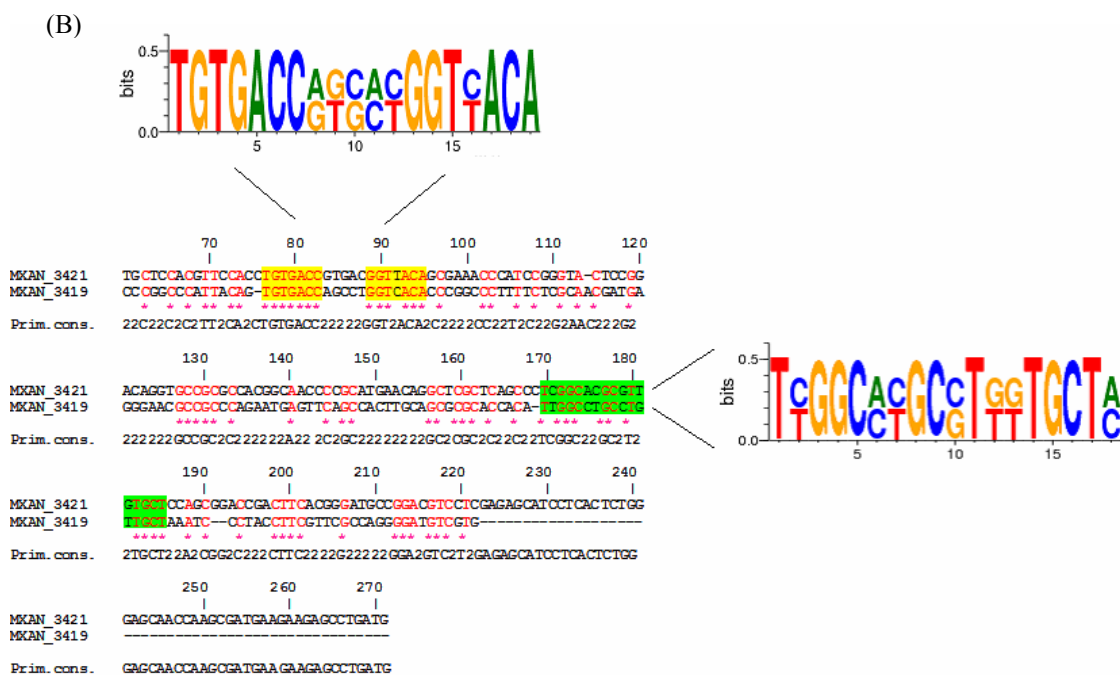
### D.IV.8.2. Localización de dos posibles UAS en los promotores de los genes del cluster *curA* regulados por el sistema CorSR

Como se ha explicado anteriormente, para que los reguladores de respuesta de tipo NtrC como CorR de *M. xanthus*, puedan activar la transcripción es necesario que se unan a unas secuencias conocidas como UAS. Estas secuencias, caracterizadas por ser repetidas e invertidas, suelen estar localizadas a una distancia mínima de 80 pb del promotor. Con el fin de localizar la región del promotor de los distintos genes del cluster *curA* regulados por el sistema CorSR donde se une CorR para iniciar la transcripción, buscamos regiones repetidas e invertidas que pudieran ser una posible UAS basándonos en la secuencia consenso 5' TGTN<sub>4</sub>TN<sub>5</sub>ACA 3' para la UAS de los promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  de genes implicados en la fijación de nitrógeno (Buck *et al.*, 1986). El análisis de las regiones promotoras de los genes del cluster *curA*, mostró dos posibles UAS localizadas por delante de los genes A (MXAN3421) y C (MXAN3419) del cluster *curA*. A la posible UAS localizada por encima del gen A la hemos denominado UAS1, mientras que a la posible UAS localizada por encima del gen C la hemos denominado UAS2 (Fig. 85A y B).

Las posibles UAS localizadas por encima de los genes A y C son secuencias palindrómicas de 19 pb con la secuencia consenso 5' TGTGACCN<sub>5</sub>GGTNACA 3'. En el caso de la UAS2 el palíndromo es perfecto a excepción de la base central, mientras que en la UAS1 la secuencia palindrómica no es tan perfecta, ya que la cuarta base empezando por la izquierda y dicha base empezando por la derecha no son complementarias (Fig. 85B). La UAS1 está localizada a 72 pb del promotor de  $\sigma^{54}$ , mientras que la UAS2 está localizada a 74 pb de dicho promotor.



- A: Proteína con un dominio de unión al cobre y una región rica en histidinas (MXAN3421)
- B: Oxidasa multicobre *CuoA* (MXAN3420)
- C: Histidina quinasa *CorS* (MXAN3419)
- D: Regulador de respuesta de tipo NtrC *CorR* (MXAN3418)
- E: Lipoproteína (MXAN3417)
- F: Lipoproteína (MXAN3416)
- G: ATPasa translocadora de cobre de tipo P<sub>1B</sub> *CopA* (MXAN3415)
- H: Proteína de la superfamilia del citocromo *c* (MXAN3414)
- I: Proteína hipotética (MXAN3413)



**Figura 85.** (A) Localización de las posibles UAS en el cluster *curA*. (B) Alineamiento de las regiones situadas por encima de los genes A (MXAN3421) y C (MXAN3419). En amarillo se muestran las posibles UAS así como el LOGO de la secuencia consenso. En verde se muestra el promotor de  $\sigma^{54}$  así como el LOGO de la secuencia consenso.

Una vez localizadas las dos posibles UAS por encima de los genes A y C, decidimos deletar estas UAS con el fin de determinar si el regulador de respuesta CorR se une a dichas regiones para iniciar la transcripción de los genes que regula el sistema CorSR. Una vez obtenidos estos mutantes de delección fueron empleados como fondo genético para la introducción de las fusiones del gen *lacZ* de *E. coli* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA*, los tres genes del cluster *curA* para los que el sistema CorSR presenta regulación. La actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por cada una de estas nuevas cepas refleja el nivel de expresión de cada uno de los genes en cada uno de los mutantes para cada UAS, de manera que nos permitirá saber si la UAS deletada en cada caso representa el sitio de unión para el regulador de respuesta CorR que permita iniciar la transcripción del gen en cuestión.

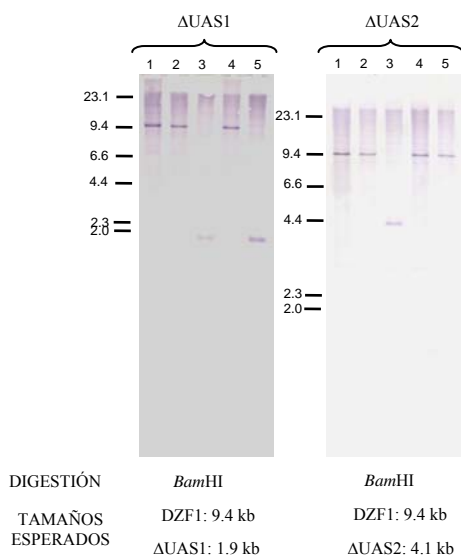
#### D.IV.8.2.1. Construcción de mutantes de delección para las posibles UAS

La obtención de los mutantes de delección de las posibles UAS implicó la eliminación de la región 5' TGTGACC<sub>N</sub>GGTNACA 3', sustituyendo dicha región por el sitio de restricción *Bam*HI. En el caso de la región UAS1, situada por encima del gen A (MXAN3421), se utilizó la pareja de oligonucleótidos MutUAS3421KpnF-MutUAS3421BamR (Tabla 6 del Material y Métodos) para la amplificación de un fragmento de 807 pb localizado por delante de la UAS1, y el par MutUAS3421BamF-MutUAS3421HinR (Tabla 6) para amplificar un fragmento de 804 pb situado por detrás de dicha UAS. Para la región UAS2, situada entre los genes B (MXAN3420) y C (MXAN3419), se empleó el par de oligonucleótidos MutUAS3419KpnF-MutUAS3419BamR (Tabla 6) para amplificar un fragmento de 806 pb localizado por delante de la UAS2, y la pareja MutUAS3419BamF-MutUAS3419HinR (Tabla 6) para la amplificación de un fragmento igualmente de 806 pb situado por detrás de dicha

## Resultados

UAS. En cada caso, el producto aguas arriba y el producto aguas abajo, fueron clonados de manera secuencial en el vector pBJ113.

Los plásmidos resultantes, pBJ113- $\Delta$ UAS1 y pBJ113- $\Delta$ UAS2, se introdujeron en la bacteria silvestre. Las colonias obtenidas, resistentes a kanamicina se analizaron mediante Southern blot para identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto en cada caso, estos se emplearon para obtener los mutantes de delección y las colonias recombinantes fueron analizadas mediante Southern blot para diferenciar aquellas que portaban la delección deseada de las que habían revertido al genotipo silvestre (Fig. 86).



**Figura 86.** Southern blot para la identificación de los mutantes para las posibles UAS. Las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la cepa DZF1 utilizada como control y las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión de los cromosomas de las colonias recombinantes. Como sonda se utilizó el fragmento localizado por delante de la UAS en cada caso. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

En el caso de UAS1, dos de las tres colonias analizadas portaban la delección deseada mientras que la tercera, revirtió a silvestre. Se seleccionó la muestra de la calle 5 y se denominó  $\Delta$ UAS1. En el caso de UAS2, sólo una de las tres colonias analizadas (calle 3) portaba la delección esperada mientras que las otras dos revirtieron a silvestre. Se seleccionó dicha colonia positiva y se denominó  $\Delta$ UAS2.

Una vez obtenidos los mutantes para las dos posibles UAS se emplearon como fondo genético para introducir las fusiones *lacZ* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA*.

### D.IV.8.2.2. Obtención de cepas portadoras de fusiones *lacZ* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en los mutantes para las posibles UAS

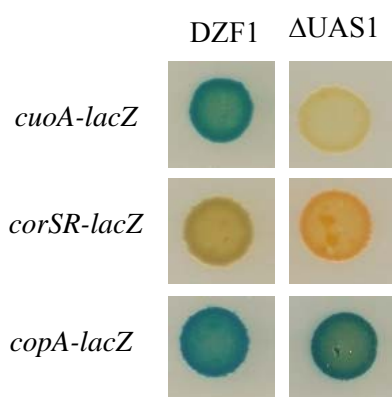
Para la obtención de cepas portadoras de fusiones *lacZ* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA*, los plásmidos que contenían las fusiones *lacZ* con dichos genes, pKY481-CuoA (ver apartado D.III.3.), pKY481-CorSR (D.IV.2.) y pKY481-CopA (D.IV.5.1.), respectivamente, fueron introducidos en las bacterias mutantes  $\Delta$ UAS1 y  $\Delta$ UAS2 mediante electroporación. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina que se analizaron mediante Southern blot (no mostrado).

Las colonias positivas se seleccionaron y se emplearon para hacer los análisis de expresión de los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en los mutantes para las UAS1 y UAS2.

### D.IV.8.2.3. Análisis de la expresión de los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en el mutante $\Delta$ UAS1

En primer lugar se analizó la expresión de los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en el mutante para la UAS1.

El análisis de la expresión se realizó por un lado de manera cualitativa, en placas que contenían medio CTT suplementado con el sustrato X-gal y diferentes concentraciones de sulfato de cobre, ya que ninguno de los genes estudiados se expresa en ausencia de dicho metal. En todos los casos, se utilizaron como control las cepas que contenían las fusiones *lacZ* de los genes analizados en la bacteria silvestre (Fig. 87)



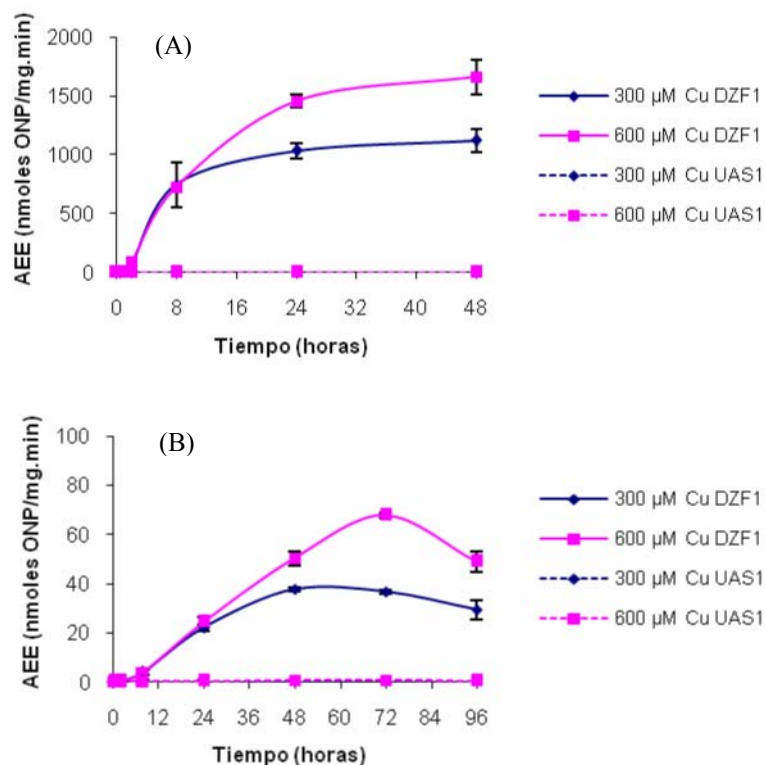
**Figura 87.** Análisis cualitativo de las fusiones *lacZ* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en la bacteria silvestre DZF1 y en el mutante  $\Delta$ UAS1 durante el crecimiento vegetativo con una concentración de 600  $\mu$ M de sulfato de cobre a las 48 h de incubación a 30°C.

En el caso de los genes *cuoA* y *corSR*, se observó una pérdida total de expresión. Esto indicaría que el regulador de respuesta CorR se uniría a esta región para interactuar con  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de estos genes, confirmando que esta región deletionada actuaría como UAS. Sin embargo, en el caso del gen *copA*, no había una pérdida total de expresión como la observada en los otros dos genes puesto que se observaba coloración azul, aunque a niveles más bajos que los observados en la cepa silvestre. Esto indicaría que CorR no controlaría totalmente la expresión de *copA* al unirse a esta UAS.

Con la intención de corroborar lo observado en el estudio cualitativo se llevó a cabo una determinación cuantitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los tres genes en el mutante para la UAS1. Dicha determinación se realizó durante el crecimiento vegetativo en un medio CTT suplementado con las concentraciones de cobre de 300 y 600  $\mu$ M puesto que como se comentó anteriormente, ninguno de los tres genes estudiados se expresa en ausencia de dicho metal.

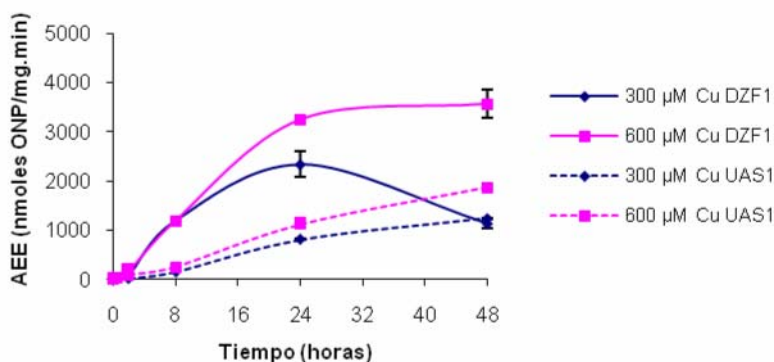
La determinación cuantitativa de la expresión de los genes *cuoA* y *corSR* confirmó lo observado en el estudio cualitativo: no había expresión de ninguno de los dos genes cuando se deletionaba la región denominada UAS1 ya que los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa detectados estaban próximos a cero (Fig. 88A y B), indicando que el regulador de respuesta CorR se uniría a esta región para iniciar la transcripción de dichos genes.

## Resultados



**Figura 88.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *cuoA* (A) y los genes *corSR* (B) en el mutante  $\Delta$ UAS1 durante el crecimiento vegetativo.

En cuanto al gen *copA*, la determinación cuantitativa de su expresión, mostró niveles más bajos que los detectados para dicho gen en la cepa silvestre en las dos concentraciones de cobre ensayadas (Fig. 89). Así, a la concentración de 300  $\mu$ M se detectaron unos niveles de aproximadamente 2300 unidades a las 24 h de incubación en la cepa silvestre pasando a un nivel de aproximadamente 1000 unidades en el mismo tiempo de incubación en la cepa mutante. Como se observa, hay una reducción aproximadamente a la mitad de los niveles de expresión. En el caso de la concentración de 600  $\mu$ M al mismo tiempo de incubación, 24 h, se observó un paso de 3200 unidades en la cepa silvestre a 1100 unidades en la cepa mutante. En este caso, la reducción de la expresión era a la tercera parte de la observada para la cepa silvestre. Esta reducción en los niveles de expresión del gen *copA* en el mutante para la UAS1 indicaría que CorR no controlaría la expresión de este gen de manera completa al unirse a dicha UAS.

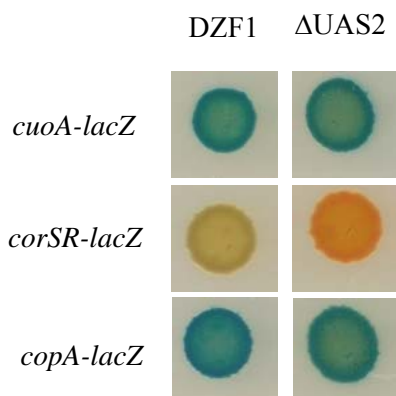


**Figura 89.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *copA* en el mutante  $\Delta$ UAS1 durante el crecimiento vegetativo.

#### D.IV.8.2.4. Análisis de la expresión de los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en el mutante $\Delta$ UAS2

Tras analizar la expresión de los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en el mutante para la UAS1, se analizó la expresión de dichos genes en el mutante para la UAS2.

Al igual que en el caso anterior, en un primer momento se realizó un análisis de la expresión de manera cualitativa, en placas de CTT con el sustrato X-gal y diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Nuevamente, se utilizaron como control las cepas que contenían las fusiones *lacZ* de los genes analizados en la bacteria silvestre (Fig. 90)



**Figura 90.** Análisis cualitativo de las fusiones *lacZ* con los genes *cuoA*, *corSR* y *copA* en la bacteria silvestre DZF1 y en el mutante  $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo con una concentración de 600  $\mu$ M de sulfato de cobre a las 48 h de incubación a 30°C.

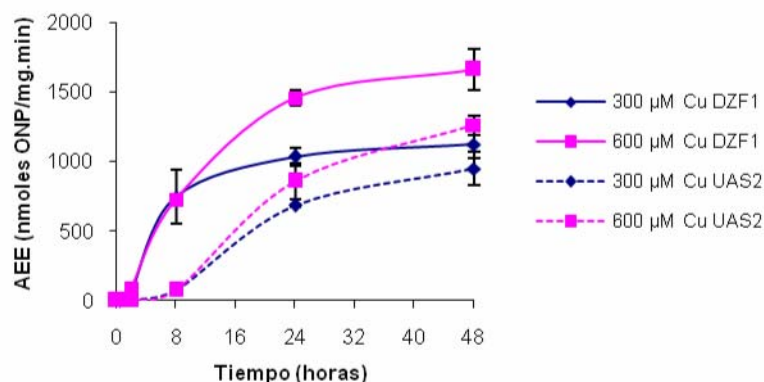
En este caso, se observó que solamente los genes *corSR* perdían la expresión puesto que no se observó coloración azul a lo largo del tiempo en el que fueron incubadas las bacterias. Esto indicaría, que como ocurría con la región UAS1, CorR se uniría a esta región para interaccionar con  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de estos genes, confirmando que esta región delecionada actuaría como UAS. Sin embargo, en el caso del gen *cuoA*, no había una pérdida de expresión ya que se observó coloración azul, aunque dicho gen se expresaba a niveles más bajos que los observados en la bacteria silvestre. Algo similar ocurre en el caso del gen *copA*, ya que se observa coloración azul pero a niveles más bajos que los observados para la bacteria silvestre. La expresión cualitativa del gen *copA* en el mutante  $\Delta$ UAS2 era muy similar a la observada en el mutante  $\Delta$ UAS1 para dicho gen.

A fin de confirmar los resultados obtenidos en el estudio cualitativo se llevó a cabo la determinación cuantitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los tres genes estudiados en el mutante  $\Delta$ UAS2. Como en el caso del mutante  $\Delta$ UAS1, las medidas se realizaron durante el crecimiento vegetativo en un medio CTT suplementado con las concentraciones de sulfato de cobre de 300 y 600  $\mu$ M.

En el caso del gen *cuoA*, la determinación cuantitativa mostró que los niveles de expresión observados en el mutante  $\Delta$ UAS2 eran más bajos que los de la cepa silvestre, sobre todo en los primeros tiempos de incubación. Así, a las 8 h de incubación los niveles de expresión para el gen *cuoA* a las dos concentraciones de cobre probadas eran de aproximadamente 700 unidades en la cepa silvestre, mientras que en el caso del mutante  $\Delta$ UAS2 los niveles de expresión para el gen *cuoA* para estas dos concentraciones de cobre eran de aproximadamente 70 unidades, es decir, 10 veces menos. Sin embargo, a partir de las 24 h las diferencias observadas en los niveles de

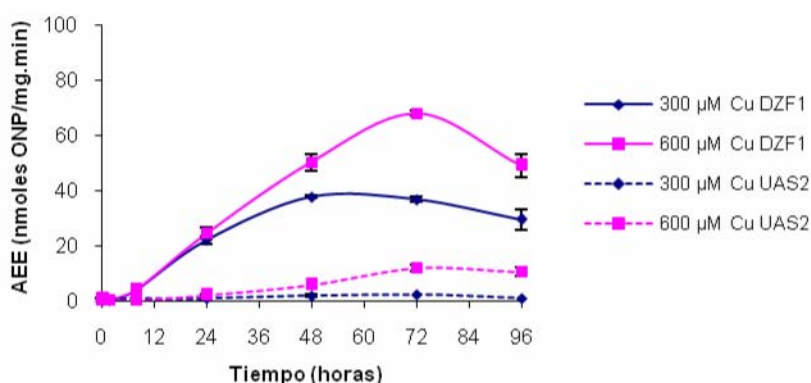
## Resultados

expresión en ambas concentraciones de sulfato de cobre en las cepas silvestre y mutante no eran tan grandes (Fig. 91). Esto parece indicar que la inducción del gen *cuoA* en ausencia de UAS2 es más lenta.



**Figura 91.** Determinación de la actividad β-galactosidasa del gen *cuoA* en el mutante  $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo.

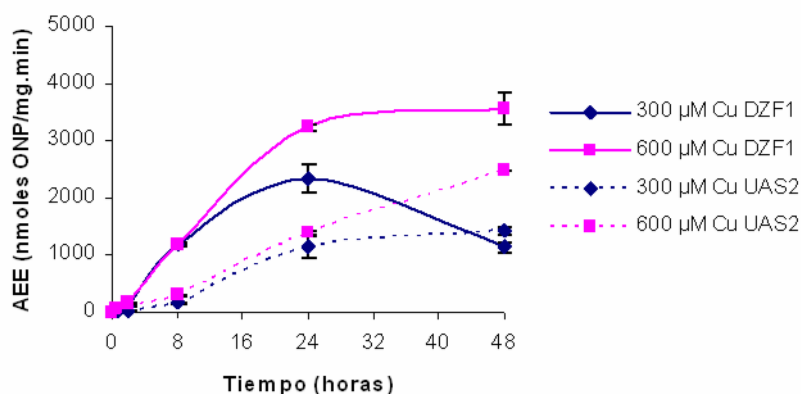
La determinación cuantitativa de la expresión de los genes *corSR* en el mutante  $\Delta$ UAS2 mostró que no había una pérdida total de la expresión como se observó en el estudio cualitativo, puesto que no se detectó coloración azul, y en el caso del mutante  $\Delta$ UAS1 donde los niveles de actividad β-galactosidasa detectados estaban próximos a cero. Sin embargo, los niveles de expresión observados con respecto al silvestre eran mucho más bajos, pasando de un máximo de 70 unidades a las 72 h con 600 μM de sulfato de cobre en la cepa silvestre a un máximo de 12 unidades, es decir, casi 7 veces menos de actividad al mismo tiempo de incubación y a la misma concentración de sulfato de cobre. La disminución en la expresión de los genes *corSR* cuando se deletorea UAS2 parece indicar que al igual que en el caso anterior la expresión de los genes *corSR* es tardía, es decir, la inducción es más lenta. (Fig. 92).



**Figura 92.** Determinación de la actividad β-galactosidasa de los genes *corSR* en el mutante  $\Delta$ UAS2 durante el crecimiento vegetativo.

En cuanto al gen *copA*, la determinación cuantitativa de su expresión, mostró algo muy similar a lo observado en el mutante  $\Delta$ UAS1: los niveles de expresión son más bajos que los detectados para dicho gen en la cepa silvestre en las dos concentraciones de cobre ensayadas (Fig. 93). Así, a la concentración de 300 μM se

detectaron unos niveles de alrededor de 1100 unidades en la cepa mutante, aproximadamente la mitad de lo observado en la cepa silvestre, donde se observaron niveles de unas 2300 unidades. En el caso de la concentración de 600  $\mu\text{M}$  se detectaron niveles de unas 1300 unidades en la cepa mutante a diferencia de las aproximadamente 3200 observadas en la cepa silvestre para dicha concentración. En este caso la reducción es de un tercio con respecto a la cepa silvestre como ya se observó para dicha concentración y el mismo tiempo de incubación en el mutante UAS1. Esto parece indicar que al igual que ocurría con los genes *cuoA* y *corSR*, la inducción del gen *copA* en ausencia de UAS2 es tardía.



**Figura 93.** Determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *copA* en el mutante  $\Delta\text{UAS2}$  durante el crecimiento vegetativo.

En resumen, podemos decir que la delección de la región UAS1 hace que se pierda la expresión de los genes *cuoA* y *corSR*, lo que parece indicar que el regulador de respuesta CorR se uniría a esta región para iniciar la transcripción de dichos genes. Sin embargo, la expresión del gen *copA* desde la UAS1 es más tardía, lo que parece indicar que su expresión no es controlada totalmente desde esta región. La delección de la región UAS2, por su parte, hace que la expresión de los genes regulados por el sistema regulador de dos componentes CorSR sea más tardía, lo que hace pensar que el control de la expresión de estos genes desde esta UAS no es total.

## D.V. ESTUDIO DE OTROS GENES QUE APARECEN EN EL CLUSTER *curA*

Una vez que completamos el estudio del gen *cuoA* y su regulación por el sistema de dos componentes CorSR, decidimos investigar la implicación en la respuesta global al cobre de otros genes localizados en el cluster *curA* que nos parecieron de mayor interés.

### D.V.1. Análisis de la implicación de la lipoproteína MXAN3417 en la tolerancia al cobre de *M. xanthus*

Como se ha explicado en el apartado D.IV.7., la lipoproteína codificada por el gen MXAN3417 está localizada aguas abajo del sistema regulador de dos componentes CorSR pero parece no estar implicada en la detección del cobre y su posterior interacción con la histidina quinasa CorS para permitir la expresión del gen *cuoA*. No obstante, dicho gen puede tener alguna implicación en la tolerancia al cobre de *M.*

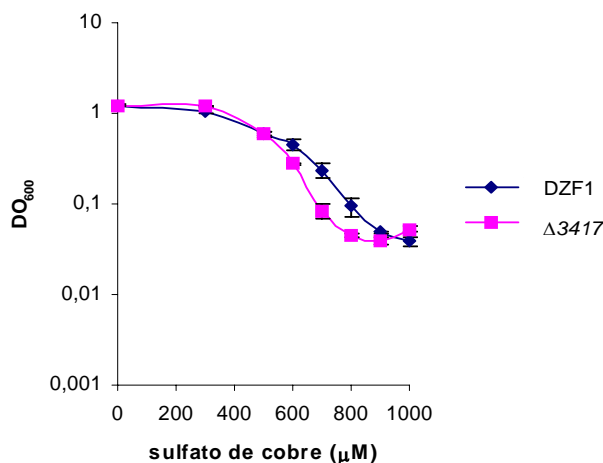


## Resultados

*xanthus*. Para ello decidimos estudiar el fenotipo del mutante de delección en fase de este gen durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. La obtención del mutante de delección se ha descrito en el apartado D.IV.7.2.

### D.V.1.1. Crecimiento vegetativo

Con el fin de analizar la influencia de la delección del gen MXAN3417 durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*, la cepa  $\Delta 3417$  así como la cepa silvestre, fueron cultivadas en medio CTT líquido con concentraciones crecientes de sulfato de cobre e incubadas en agitación a 30 °C durante 24 h (Fig. 94).



**Figura 94.** Efecto del cobre durante el crecimiento vegetativo del mutante  $\Delta 3417$ . Las barras de error indican las desviaciones estándar.

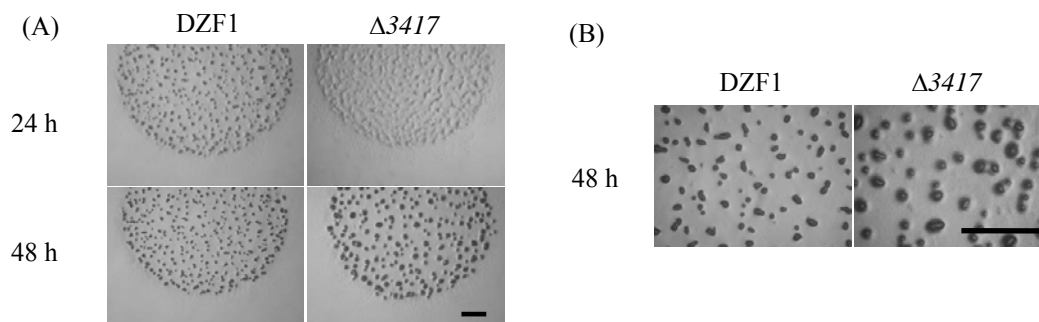
Como se puede observar en la Fig. 94, la tolerancia al cobre del mutante  $\Delta 3417$  fue ligeramente menor que la de la cepa silvestre. Hasta una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, tanto la cepa silvestre como la mutante presentaban un comportamiento muy similar, pero a partir de 600  $\mu\text{M}$  el tiempo de generación del mutante aumentó con respecto al del silvestre, indicando que la bacteria mutante es más sensible que la bacteria silvestre a estas concentraciones de metal. A partir de la concentración de 800  $\mu\text{M}$ , ambas bacterias eran muy sensibles y no crecían por encima de 1000  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre. Esto indica que la lipoproteína codificada por el gen MXAN3417 está implicada de alguna manera en la respuesta al cobre de *M. xanthus*, puesto que su ausencia aumenta la sensibilidad de la bacteria a dicho metal durante el crecimiento vegetativo.

### D.V.1.2. Ciclo de desarrollo

Para estudiar la posible implicación de la lipoproteína MXAN3417 en el ciclo de desarrollo, el mutante de delección y la bacteria silvestre se cultivaron en medio CF en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de cobre.

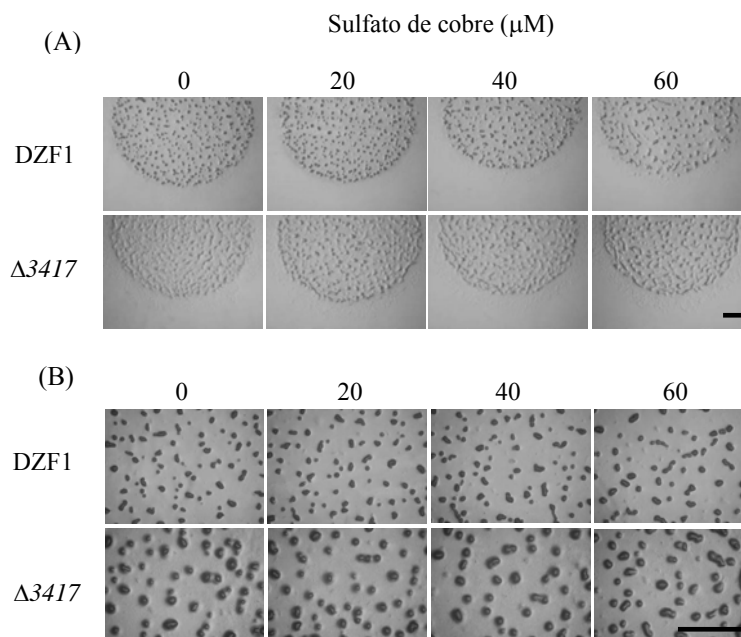
En ausencia de cobre añadido al medio, la cepa mutante presentó un retraso en el ciclo de desarrollo a las 24 h de incubación con respecto a la cepa silvestre. Pero a partir de las 48 h de incubación, ambas bacterias alcanzaron un nivel de desarrollo similar (Fig. 95A). Sin embargo, el aspecto de los cuerpos fructificantes en la cepa mutante es

diferente con respecto a los de la bacteria silvestre ya que son más grandes y redondeados (Fig. 95B).



**Figura 95.** (A) Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre DZF1 y del mutante  $\Delta 3417$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante los períodos de tiempo indicados. Las fotos han sido tomadas a 18 aumentos. (B) Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre DZF1 y del mutante  $\Delta 3417$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante 48 h. En este caso las fotos han sido tomadas a 50 aumentos. Tanto en (A) como en (B) la barra representa 1 mm.

En cuanto a la tolerancia al cobre, la bacteria mutante presentó la misma sensibilidad que la bacteria silvestre formando cuerpos hasta las mismas concentraciones de cobre. Al igual que ocurría en ausencia de metal, el mutante presentó un retraso en la formación de los cuerpos fructificantes a las 24 h de incubación, aunque ese retraso fue menor que en ausencia de cobre. A partir de las 48 h, ambas bacterias presentaron el mismo nivel de desarrollo, pero tal como pasaba en ausencia de cobre, el aspecto de los cuerpos fructificantes de la bacteria mutante  $\Delta 3417$  es diferente con respecto a los cuerpos de la bacteria silvestre, ya que son más redondeados y grandes (Fig. 96A y B).



**Figura 96.** Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre DZF1 y del mutante  $\Delta 3417$  de *M. xanthus* en medio CF con diferentes concentraciones de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $DO_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante (A) 24 h y (B) 48 h. Las fotos han sido tomadas a 18 aumentos en (A) mientras que en (B) han sido tomadas a 50 aumentos. Las barras representan 1mm.

## D.V.2. Estudio de la implicación del gen MXAN3414 en la tolerancia al cobre de *M. xanthus*

De los tres mutantes descritos hasta el momento:  $\Delta cuoA$ ,  $\Delta corSR$  y  $\Delta 3417$ , nos llamó la atención el fenotipo del mutante  $\Delta corSR$  puesto que los carotenoides aparecen a una concentración de sulfato de cobre más baja que para la cepa silvestre. Ya que dicho sistema parece controlar el cluster *curA*, tratamos de buscar en dicha región un gen que pudiera ser responsable de ese color rojo en el mutante para el sistema de dos componentes CorSR. Nos centramos en el gen MXAN3414 que codifica una proteína perteneciente a la superfamilia de proteínas del citocromo *c*, los cuales están implicados en reacciones redox que podrían contribuir a esa síntesis de carotenoides en el mutante  $\Delta corSR$ .

### D.V.2.1. Análisis de la secuencia del gen MXAN3414 y de la proteína que codifica

En la Fig. 97 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen MXAN3414 de *M. xanthus*, así como la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen.

```

atgccctgcggtgaagcggtggacctctgaccgccacctcgccggattcaagagGAGAAatcccc
GTG ACC TTG CGC CGT ACC GTG GTG GGT GGA CTG GCT GTA CTG GGC GCC CTG
V T L R R T V V G G L A V L G A L
ACG CTC ATC CTG GGC GTG AGC GGC GGG GTG TAT GGG CTG ACG GTG GCG CGC
T L I L G V S G G V Y G L T V A R
CGC GGC TTC TCG GCC CGG GAG GCC CCC TCG GCG CTC GAA GCG AAG GTG GCG
R G F S A R E A P S A L E A K V A
CGT GCG GCA CGG AGC TTC AGC ATG CCC GCG GGG GCC CGG GAG CTG AAG AAT
R A A R S F S M P A G A R E L K N
CCG CTC GCG CCC CTC TCA CCG CAG GCC CTC GCC GAG GCG CGA GCC CAT TGG
P L A P L S P Q A L A E A R A H W
GCT GAC CAC TGC GCC ATC TGC CAC GCG GCG GAT GGC AGC GGG CAG ACG CCC
A D H C A I C H A A D G S G Q T P
ATC GGC CAG GGG CTC TAC CCG CGC GCC CCC AAC ATG CGC GCC ACC CCG ACC
I G Q G L Y P R A P N M R A T P T
CAG GAC CTG AGC GAT GGC GAG CTG TAC TGG ATC ATC CAG AAC GGC ATC CGC
Q D L S D G E L Y W I I Q N G I R
CTG ACC GGC ATG CCC GCC TGG GGA CAA CTC CAC GAG GGG GCG GGC AAC AAC
L T G M P A W G Q L H E G A G N N
GAT AGC TGG GCC CTC GTC GAA CTC ATC CGC AGG CTG CCG CGT CTC GGC GAG
D S W A L V E L I R R L P R L G E
GAA GAG CTC GAT GAA ATC AAA GCC GCC CTG CCC CAA TCC CGG CAT GAG CTT
E E L D E I K A A L P Q S R H E L
GAA GAG CAG CGC ATC GAG GAC GCG TTC CTC GAA GGA CAG TAG ccgtcacatgt
E E Q R I E D A F L E G Q Stop
aaaggagcgcaatgccatgagccccaaccgcttcgtccccgcctcagagcctcgccgtggtgacc

```

**Figura 97.** Secuencia nucleotídica del gen MXAN3414 de *M. xanthus*. En azul se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la proteína que codifica destacando en rosa los aminoácidos que constituyen el motivo centro citocromo *c*. En verde se muestra el codón de iniciación, en rojo el codón de terminación y en amarillo un posible sitio de unión al ribosoma.

Se ha definido como codón de iniciación para el gen MXAN3414 un codón GTG, destacado en verde en la Fig. 97, situado en la misma pauta de lectura que el codón de terminación de la secuencia, TAG, destacado en rojo en la Fig. 97. Dicho triplete de iniciación comienza una pauta de lectura con el uso de codones característica

de *M. xanthus* y muestra un posible sitio de unión al ribosoma (GAGAA) a 6 pb aguas arriba.

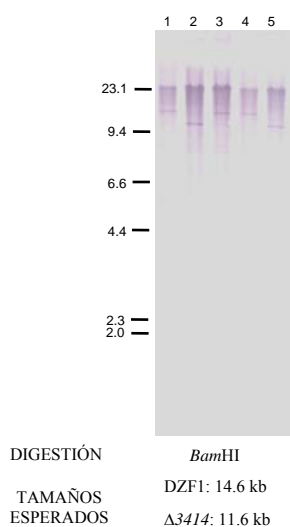
El gen MXAN3414 está constituido por 603 pb y codifica para una proteína de 200 aminoácidos con un peso molecular estimado de 21.45 kDa. Este gen presenta un uso de codones típico de microorganismos con un alto contenido en G+C dado que el 90% de los tripletes presentan G o C en la tercera posición.

La proteína codificada muestra la secuencia CAICH, destacada en rosa en la Fig. 97, motivo centro citocromo *c* (consenso CXXCH) indicando que dicha proteína pertenece a la superfamilia de proteínas del citocromo *c*.

#### D.V.2.2. Obtención de un mutante de delección en fase para el gen MXAN3414

Con el fin de estudiar la función del gen MXAN3414 de *M. xanthus*, se construyó un mutante de delección en fase para este gen utilizando el vector pBJ113. La obtención de este mutante de delección implicó la eliminación de la totalidad del gen, manteniendo solamente el codón de iniciación y el codón de terminación de la proteína conectados por el sitio de restricción *Bam*HI manteniendo la pauta de lectura. Para ello se amplificó un fragmento de 802 pb aguas arriba del gen MXAN3414 utilizando el par de oligonucleótidos Mut3414KpnF-Mut3414BamR (Tabla 6 del Material y Métodos), y un fragmento de 814 pb aguas abajo del mismo gen empleando la pareja de oligonucleótidos Mut3414BamF-Mut3414HinR (Tabla 6). Ambos productos amplificados fueron clonados de manera secuencial en el vector pBJ113.

El plásmido resultante, pBJ113-Mut3414 se introdujo en la bacteria silvestre y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina que se analizaron mediante Southern blot para identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se empleó para obtener el mutante de delección y los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot para diferenciar aquellos que habían revertido al genotipo silvestre de los que portaban la delección deseada (Fig. 98).



**Figura 98.** Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN3414. Las calles 1 y 4 corresponden a la digestión del cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizada como control, y las calles 2, 3 y 5 corresponden a la digestión del cromosoma de las colonias recombinantes. Como sonda se empleó la región cromosómica situada detrás del gen MXAN3414. A la izquierda de la figura se muestran los tamaños moleculares en kilobases.

Como se observa en la Fig. 98, una de las tres muestras analizadas, la situada en la calle 3 revirtió a silvestre, mientras que las otras dos muestras, situadas en las calles 2

## Resultados

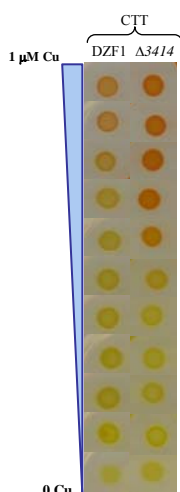
y 5 portaban la deleción deseada. Se seleccionó la muestra de la calle 5 y se denominó  $\Delta 3414$ .

### D.V.2.3. Análisis de la tolerancia al cobre del mutante de deleción $\Delta 3414$

Una vez obtenido el mutante de deleción para el gen MXAN3414 se analizó la implicación de este gen en la tolerancia al cobre de *M. xanthus* y en la biosíntesis de carotenoides, estudiando su fenotipo durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo.

#### D.V.2.3.1. Crecimiento vegetativo

El análisis del fenotipo del mutante  $\Delta 3414$  durante el crecimiento vegetativo, no mostró diferencias en cuanto a tolerancia al cobre con respecto a la cepa silvestre empleada como control, pero sí en cuanto a la síntesis de carotenoides. Como ya ocurrió en el mutante  $\Delta corSR$ , en el mutante  $\Delta 3414$  los carotenoides aparecieron a una concentración de cobre más baja que en el silvestre (Fig. 99). Esto parece indicar que parte del fenotipo observado en el mutante  $\Delta corSR$ , se deba a la deleción de este gen.



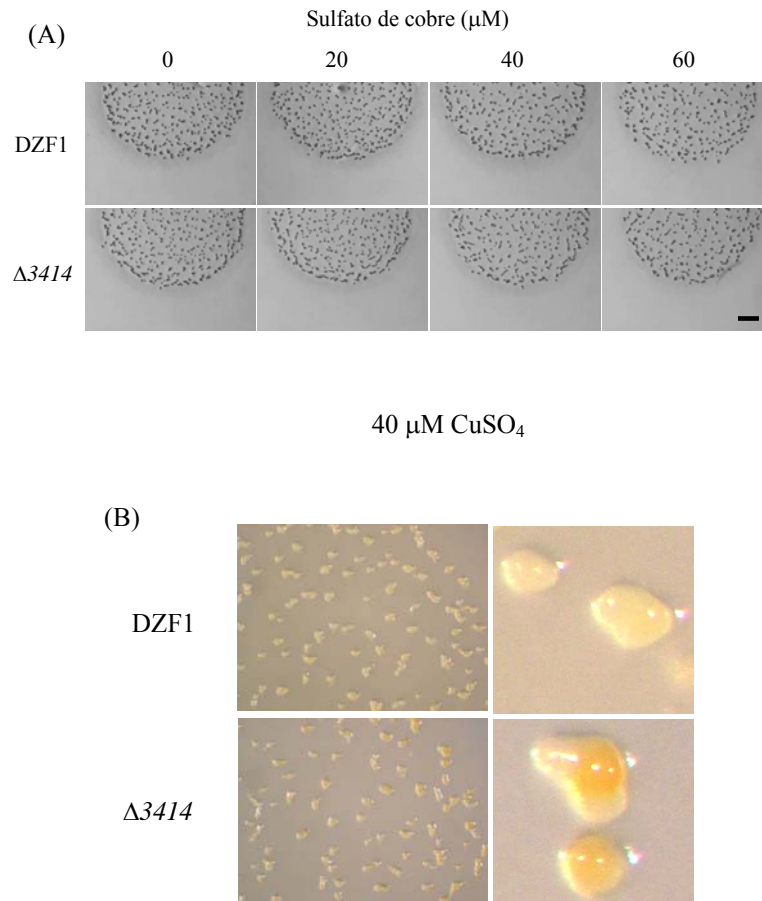
**Figura 99.** Inducción de la síntesis de carotenoides en el mutante  $\Delta 3414$  como consecuencia de la adición de sulfato de cobre.

#### D.V.2.3.2. Ciclo de desarrollo

Para estudiar la posible implicación del gen MXAN3414 en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, el mutante de deleción y la bacteria silvestre se cultivaron en medio CF en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de cobre, como ya se ha hecho con los diferentes mutantes analizados a lo largo de este trabajo de investigación.

En ausencia de cobre añadido al medio, no se observaron diferencias con respecto a la cepa silvestre, puesto que a las 24 h de incubación, ambas bacterias presentaban ya el mismo nivel de desarrollo (no mostrado). Lo mismo ocurría en presencia de cobre, a las 24 h de incubación ambas bacterias presentaban el mismo nivel de desarrollo a las concentraciones de sulfato de cobre probadas, y el mutante formaba cuerpos hasta la máxima concentración a la que la cepa silvestre los formaba, es decir, 60  $\mu\text{M}$  (Fig. 100A). Sin embargo, y a diferencia del silvestre, en el mutante  $\Delta 3414$  podía observarse la síntesis de carotenoides durante el ciclo de desarrollo a partir de las

72 h de incubación y de la concentración de sulfato de cobre de 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 100B), como ya se observó en el caso del mutante  $\Delta\text{corSR}$  (Fig. 61). Ya que este fenotipo no se había observado ni para la oxidasa multicobre CuoA ni para la lipoproteína MXAN3417, este resultado parece indicar que ese fenotipo pueda deberse más al cambio de oxidación del cobre que a la acumulación de dicho metal.



**Figura 100.** (A) Cuerpos fructificantes de las cepas DZF1 y mutante  $\Delta 3414$  de *M. xanthus* en medio CF en ausencia y presencia de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C hasta las 72 h de incubación, momento en el que fueron tomadas las fotografías. La barra indica 1 mm. (B). Cuerpos fructificantes de las cepas DZF1 y  $\Delta 3414$  en medio CF con 40  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre a partir de cultivos concentrados a una  $\text{DO}_{600}$  de 15 e incubados a 30°C durante 96 h. En el caso del mutante se puede observar el color rojo como consecuencia de la síntesis de carotenoides. Las imágenes de la derecha en (B) muestran los cuerpos fructificantes de DZF1 y  $\Delta 3414$  a los máximos aumentos.



## **E. DISCUSIÓN**





## E. DISCUSIÓN

Como se ha comentado en la Introducción, *M. xanthus* es una bacteria del suelo que tiene que hacer frente a cambios en las condiciones medioambientales de su entorno, de tal modo, que en presencia de nutrientes, las bacterias crecen formando comunidades depredadoras denominadas enjambres que se alimentan de modo cooperativo. Pero cuando los nutrientes se agotan, inician un ciclo de desarrollo en el cual experimentan cambios fisiológicos y morfológicos que culminan con la formación de cuerpos fructificantes, en cuyo interior se diferencian en formas de resistencia conocidas como mixósporas. Cuando las condiciones nutricionales vuelven a ser favorables, las mixósporas germinan e inician un nuevo ciclo vegetativo. En el suelo, este complejo ciclo de vida tiene que llevarse a cabo en presencia de sustancias nocivas de naturaleza muy diversa, entre las que cabe destacar metales como el cobre. El cobre es un elemento traza esencial y actúa como cofactor de numerosas enzimas, algunas de las cuales están implicadas en el metabolismo energético o en procesos de detoxificación (Gaetke y Chow, 2003; Solioz y Stoyanov, 2003). Pero en concentraciones elevadas, este metal es extremadamente tóxico debido a que es responsable de la aparición de ROS, de ahí la importancia del mantenimiento de la homeostasis de dicho metal (Rensing y Grass, 2003).

Las bacterias tienen varios mecanismos para hacer frente a concentraciones variables de metales, lo que les permite crecer en ecosistemas contaminados con niveles tóxicos de dichos metales (Teitzel *et al.*, 2006). Los mecanismos más elementales para mantener la homeostasis en las bacterias son, por un lado, controlar la entrada de esos metales en la célula cuando son limitantes para el crecimiento, y para ello las células expresan una enorme variedad de transportadores para metales (Moore *et al.*, 2005); y por otro lado eliminar el exceso de los mismos. Las estrategias empleadas para eliminar el exceso de metales son muy diversas e incluyen diferentes sistemas reguladores que modulan la expresión de distintos factores implicados en la salida y secuestro de los metales, así como la oxidación del ión metálico en el espacio periplásmico (Espariz *et al.*, 2007).

Nuestro grupo de investigación está investigando desde hace unos años la respuesta global al cobre en *M. xanthus*. Esta bacteria responde de una manera muy peculiar a este metal, lo que la ha convertido en un excelente modelo para el estudio de la respuesta al cobre en procariotas. Las características más destacables de esta respuesta se resumen a continuación:

- En primer lugar, el cobre induce a nivel transcripcional los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides. Esta es la primera bacteria en la que se ha descrito que este proceso fisiológico se induce en respuesta a un factor externo distinto de la luz azul (Moraleta-Muñoz *et al.* 2005).
- En segundo lugar, las células durante el crecimiento vegetativo son 17 veces más resistentes al cobre que las células durante el desarrollo (Sánchez-Sutil *et al.* 2007). Así, mientras que la bacteria silvestre es capaz de crecer a concentraciones de hasta 1000  $\mu\text{M}$  de cobre, las células durante el desarrollo no soportan más de 60  $\mu\text{M}$ . Esta respuesta tan diferente en los dos estadios del ciclo de vida sólo se ha observado para el cobre, ya que según se indica en la Tabla 7, para el resto de los metales (con excepción de la plata) el coeficiente de tolerancia es próximo a 1, esto quiere decir

que las células son igual de sensibles en ambas fases del ciclo de vida para la mayoría de los metales. Sin embargo, el estado fisiológico de las células de *M. xanthus* es especialmente significativo en la respuesta al cobre. Este hecho se puede deber a que las células durante esta fase del ciclo de vida experimentan muchos cambios en la envuelta celular con el fin de reorganizarse y convertirse en mixósporas. Estas alteraciones harían que durante el desarrollo las células fueran extremadamente sensibles al estrés por cobre. Además estas células son fisiológicamente diferentes. Durante la inanición, los niveles energéticos de las células son más bajos que durante el crecimiento vegetativo. En *E. coli* se ha descrito que las células que están creciendo en condiciones anaeróbicas son más sensibles al cobre que aquellas que están creciendo en presencia de oxígeno. Esto es interesante, porque los efectos tóxicos del cobre son a menudo atribuidos a su capacidad para catalizar la formación de ROS desde O<sub>2</sub>. Dado que el cobre es más tóxico bajo condiciones de oxígeno limitado, el metal alteraría los procesos fisiológicos de una manera diferente a como ocurre en presencia de oxígeno. Estos autores han demostrado que el crecimiento en ausencia de oxígeno produce un cambio en el estado de oxidación del cobre, que pasaría preferentemente de Cu(II) a Cu(I). Los dos sistemas implicados en la tolerancia al cobre (sistemas *cue* y *cus*) son regulados de manera también diferente durante condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Outten *et al.*, 2001). Estos datos en *E. coli* y los obtenidos a lo largo de este trabajo de investigación indican que el estado fisiológico de las células es un factor importante en la tolerancia al cobre.

- En tercer lugar, hemos comprobado que cuando se inducen los mecanismos de respuesta a este metal mediante la incubación de las células en medio con cobre, las células presentan una resistencia muy similar en las dos fases del ciclo de vida. Así, durante el crecimiento vegetativo llegan a crecer hasta en 2000  $\mu\text{M}$ , mientras que durante el desarrollo se vuelven incluso más resistentes, llegando a soportar concentraciones de 2500  $\mu\text{M}$ . Estos datos indican que la bacteria debe de tener un arsenal de proteínas que contribuyen a que las células puedan asumir un ciclo de vida completo en presencia de concentraciones variables de cobre.
- Por último, un detallado análisis *in silico* del genoma de *M. xanthus* ha revelado la presencia de numerosos genes cuyos productos presentan similitud con proteínas implicadas en el manejo y transporte de cobre y otros metales en otros organismos. Muchos de estos genes son redundantes y esto es indicativo de que la homeostasis del cobre en esta bacteria, que se ha de enfrentar a numerosos cambios fisiológicos a lo largo de su complejo ciclo de vida, también va a ser más compleja que en el resto de los microorganismos. Como ya se ha indicado con anterioridad, hemos identificado varios genes estructurales que incluyen: tres MCOs, tres ATPasas translocadoras de cobre de tipo P<sub>1B</sub>, seis bombas de tipo CBA: tres sistemas *Cus* y tres sistemas *Czc*. Además, hemos identificado varios elementos reguladores que intervienen en la respuesta al cobre y que incluyen dos sistemas reguladores de dos componentes y un regulador de tipo ECF. En nuestro laboratorio se está llevando a cabo el estudio de cada uno de estos elementos estructurales. Para ello se han construido fusiones de cada uno los genes con el gen *lacZ* de *E. coli*. Hemos construido mutantes sencillos, dobles e incluso triples y hemos analizado el fenotipo de todos ellos. Los estudios con las tres ATPasas, los tres sistemas *Cus* y los tres *Czc*, están siendo realizados por Aurelio Moraleda-Muñoz y Antonio Luis Extremera León (resultados no publicados). Los estudios con las MCOs *CuoB* y

CuoC, se han llevado a cabo por Nuria Gómez Santos, y han sido presentados en una Tesis Doctoral que se ha llevado a cabo paralelamente a esta. El estudio de la MCO CuoA y de su regulación son los principales objetivos de la presente Tesis Doctoral.

### **E.I. La oxidasa multicobre CuoA es inducida por cobre de forma tardía y es necesaria para el mantenimiento de la resistencia al cobre**

El análisis de la secuencia de la proteína CuoA ha mostrado que presenta los cuatro dominios del cobre típicos de estas proteínas (Martins *et al.*, 2002). Además, presenta un sitio rico en histidinas, entre el segundo y el tercer dominio, que no está presente en ninguna de las oxidasas multicobre descritas hasta ahora (Fig. 22). En la mayoría de las MCOs implicadas en la resistencia al cobre, incluidas la CuoB y CuoC de *M. xanthus* (Sánchez-Sutil *et al.* 2007), aparece una región rica en metioninas. Esta región en CueO de *E. coli*, parece funcionar como un regulador que une cobre para activar la enzima o como un mediador en la interacción proteína-proteína (Roberts *et al.*, 2003).

Otra característica que diferencia a CuoA del resto de las MCOs es su sistema de secreción, ya que según hemos demostrado experimentalmente ésta MCO es secretada al periplasma por el sistema de secreción Sec. Por el contrario, CueO y otras MCOs son secretadas al periplasma por el sistema Tat (Rensing y Grass, 2003, Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Este sistema se caracteriza por transportar proteínas completamente plegadas con sus cofactores ya unidos antes de la translocación al periplasma (Berks *et al.*, 2005). Por tanto, la carga de cobre de estas proteínas dentro del citoplasma con el posterior transporte al periplasma contribuiría a la destoxicación citoplasmática de cobre. Sin embargo, en la proteína CuoA, la ausencia de esa región rica en metioninas y el hecho de que sea secretada por el sistema Sec, hace pensar que esta proteína incorpora el cobre como cofactor una vez que se encuentra en el periplasma, de manera que no contribuiría a la eliminación de cobre del citoplasma durante la translocación al espacio periplásmico (Rensing y Grass, 2003).

Los estudios con la fusión del gen *cuoA* con el gen *lacZ* de *E. coli* han demostrado que es inducible por cationes divalentes tales como níquel, cobalto y zinc, pero responde principalmente al cobre. La mayoría de los mecanismos implicados en respuesta al cobre en procariontes responden también a la plata, ya que este metal es químicamente muy similar al Cu(I). Así, la plata mimetiza al Cu(I) e induce los sistemas *cue* y *cus* de *E. coli* (Outten *et al.*, 2001). Estos resultados indican, como luego hemos demostrado, que el regulador de *cuoA* va a responder a Cu(II). Respecto al perfil de expresión, *cuoA* presenta una dependencia lineal de cobre, de manera que los niveles de expresión aumentan conforme se incrementa la concentración de Cu(II) hasta alcanzar un máximo a concentraciones subinhibitorias. Esto parece indicar que la proteína CuoA está implicada en el mantenimiento de la respuesta al cobre una vez que ésta se ha producido. En estudios paralelos, hemos demostrado que otra MCO, concretamente la CuoB, responde de forma temprana al cobre para luego disminuir sus niveles hasta su práctica desaparición. Sabemos que CuoB está implicada en la respuesta primaria (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007 y Gómez-Santos, 2009). Por tanto, *M. xanthus* parece disponer de dos sistemas, uno al que hemos denominado de respuesta temprana o respuesta primaria, en el que estaría implicada la proteína CuoB, y otro de respuesta tardía o de mantenimiento, en el que estaría implicada la proteína CuoA.

Respecto al perfil de expresión observado para el gen *cuoA* durante el ciclo de desarrollo es similar al observado durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, para alcanzar niveles de expresión similares a los del crecimiento vegetativo, la concentración de cobre requerida es aproximadamente 10 veces más baja. Esta sensibilidad diferente al cobre de los promotores durante el vegetativo y el desarrollo se ha observado también para *CuoB* (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007) y otros genes implicados en la resistencia al cobre (Moraleda-Muñoz *et al.* datos no publicados), aunque no para la inducción de la carotenogénesis.

Los estudios fenotípicos con un mutante en fase del gen *cuoA* nos permitieron comprobar, que al contrario de lo que cabía esperar, el mutante es ligeramente más resistente al cobre que la cepa silvestre. Sin embargo, estudios de microscopía óptica y electrónica de transmisión y barrido del mutante  $\Delta cuoA$  durante el crecimiento vegetativo, revelaron que la ausencia de la proteína *CuoA* provocaba graves alteraciones en las células. A partir de una concentración de 700  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre en el medio de cultivo, las células no aparecen como largos bacilos, sino como formas redondeadas. Estas formas esféricas, presentan intactas las membranas interna y externa, por tanto, este cambio de morfología se debe probablemente a una alteración del peptidoglucano, por acumulación de cobre en el espacio periplásmico. Este efecto del cobre, que no se ha descrito en ninguna otra bacteria, puede deberse a las peculiaridades de este polímero de la pared celular en *M. xanthus*. Dicho polímero está formado por una serie de parches conectados por puentes muy sensibles a proteasas y detergentes como el SDS (Dworkin, 1993). Estos puentes, según se deduce de nuestros resultados, deben ser muy sensibles también al estrés oxidativo originado por el cobre. Se sabe que la oxidasa multicobre *CueO* de *E. coli* tiene como mecanismo de acción la destoxificación del espacio periplásmico protegiendo a las enzimas periplásmicas debido a la oxidación de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(II)}$  que es menos tóxico (Singh *et al.*, 2004). La oxidación de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(II)}$  evitaría reacciones como la de Fenton o Haber-Weiss que causan daño en el periplasma (Outten *et al.*, 2000a; Rensing y Grass, 2003). Los ensayos de actividad oxidasa con extractos celulares revelaron que probablemente la proteína *CuoA* ejerza también su función de destoxificación del espacio periplásmico a través de su actividad cuproso oxidasa (Fig. 43). En el mutante  $\Delta cuoA$  se acumularía  $\text{Cu(I)}$  en el espacio periplásmico, provocando la alteración del peptidoglucano y otras estructuras de la pared celular, dando lugar a la pérdida de la forma bacilar típica de *M. xanthus*. A su vez, se acumularía  $\text{Cu(I)}$  en el espacio citoplasmático, ya que el cobre en su estado reducido atraviesa más fácilmente la doble capa lipídica y por tanto se acumularía  $\text{Cu(I)}$  en el citoplasma. Este  $\text{Cu(I)}$  induciría algunos de los mecanismos implicados en la respuesta al cobre, tales como algunos de los sistemas *cus*, que sabemos responden a  $\text{Cu(I)}$  (Moraleda-Muñoz *et al.* datos no publicados). Alternativamente, otro posible mecanismo de destoxificación del espacio periplásmico por parte de *CuoA*, podría ser la oxidación de compuestos aromáticos tipo catecol, dando lugar a polímeros capaces de secuestrar el cobre libre (Rensing y Grass, 2003; Grass *et al.*, 2004). Este mecanismo, aunque no lo podemos descartar, es muy improbable en el caso de *M. xanthus*, ya que no hemos observado diferencias en la oxidación de compuestos fenólicos entre el silvestre y el mutante.

En concordancia con este resultado, durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, las células del mutante  $\Delta cuoA$  también son más resistentes al cobre que las células de la cepa silvestre. No obstante, cuando se analizaron las esporas por microscopía electrónica se observó una pérdida de las cubiertas de las mismas en el mutante  $\Delta cuoA$  a medida que aumentaba la concentración de cobre. Así, las esporas del mutante  $\Delta cuoA$

obtenidas con 80  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre no presentaban cubierta. Este hecho refuerza la hipótesis de que CuoA es la responsable de la destoxicación periplásmica de cobre. La cubierta de la espora tiene que ser secretada desde el citoplasma a la superficie exterior, y durante este transporte, los materiales que forman parte de la cubierta tienen que atravesar el periplasma. En este compartimento celular, dichos materiales están expuestos a las reacciones nocivas provocadas por el cobre en el mutante  $\Delta\text{cuoA}$ , de modo que se impide el correcto ensamblaje de dichos materiales, y por tanto se originan mixósporas sin cubierta.

Dado que el mutante  $\Delta\text{cuoA}$  es más resistente al cobre tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el desarrollo cuando se adicionaba este metal a células que no habían estado en contacto con él, pensamos que si se inducían todos los mecanismos de repuesta al cobre mediante la incubación previa con el metal, podríamos obtener células más sensibles. Efectivamente, en los experimentos con células preinducidas pudimos comprobar que el mutante es más sensible al cobre en las dos fases del ciclo de vida, lo que nos permitió concluir que CuoA está implicada en el mantenimiento de la resistencia al cobre.

Como hemos indicado anteriormente, *M. xanthus* posee además de CuoA otras dos MCOs, denominadas CuoB y CuoC. Estas últimas han sido caracterizadas por Gómez Santos, 2009. Los genes que codifican para las tres MCOs, que están situadas en la región 1 del cobre (Fig. 18), son inducibles por cobre. Sin embargo, estudios de los perfiles de expresión y del fenotipo de los mutantes, nos han permitido concluir que CuoB está implicada en la respuesta primaria al cobre, mientras que la proteína CuoC, al igual que la proteína CuoA, es necesaria para el mantenimiento de la respuesta, pero CuoC es también necesaria para un adecuado desarrollo de *M. xanthus*, ya que el mutante produce menos esporas y además éstas presentan una capacidad de germinación muy inferior a las de la bacteria silvestre ya que se induce por el agotamiento de nutrientes (Sánchez-Sutil *et al.* 2007). Se puede deducir, por tanto, que estos genes, ejercen la misma función pero en condiciones cambiantes de cobre y de nutrientes, por lo que se pueden catalogar como ecoparálogos, según el término empleado por Sánchez-Pérez *et al.* (2008).

## **E.II. La oxidasa multicobre CuoA es regulada por el sistema de dos componentes CorSR**

El análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen *cuoA* reveló la presencia de nueve genes orientados en la misma dirección que dicho gen: una proteína con un dominio de unión al cobre y una región rica en histidinas, la propia oxidasa multicobre CuoA, la histidina quinasa CorS, el regulador de respuesta CorR, dos lipoproteínas, la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> CopA, una proteína de la superfamilia del citocromo *c* y una proteína hipotética. En este bloque genético uno de los genes está localizado por encima del gen *cuoA*, mientras que los otros siete están inmediatamente por debajo. Mediante estudios de RT-PCR hemos demostrado que estos nueve genes se coexpresan en un mismo ARNm, sin embargo un análisis detallado de la secuencia de este bloque genético reveló la presencia de un promotor característico para  $\sigma^{54}$  justo delante del primer gen de este bloque genético y una serie de promotores internos para  $\sigma^{54}$  delante de los genes segundo (que codifica para la oxidasa multicobre CuoA), tercero (que codifica para la histidina quinasa CorS) y séptimo (que codifica para la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> CopA) de dicho bloque. Esto parece indicar que aunque los nueve

genes que forman parte de este mismo bloque genético se coexpresan en el mismo ARNm, están también sometidos a mecanismos de regulación distintos debido a la presencia de esos promotores internos. Es por ello que decidimos designar a este bloque genético como cluster *curA*, el cual constituiría un supra operón.

La estructura genómica de los genes localizados en el cluster *curA* no se ha encontrado en ninguno de los genomas descritos hasta el momento. Sin embargo, un análisis detallado de la secuencia de las distintas proteínas y la organización estructural de dichos genes recuerda en algunas características a los elementos implicados en la homeostasis del cobre en *E. coli* y en otras al sistema *copABCDRS* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Outten *et al.*, 2000a; Rensing y Grass, 2003). Es interesante destacar que la localización de todos los genes del cluster *curA*, con excepción del regulador de respuesta CorR, es periplásmica, lo que parece indicar una función de detoxificación de este compartimento celular para los componentes de este cluster.

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación era encontrar elementos reguladores de la expresión de la oxidasa multicobre CuoA. En un análisis previo de la región promotora del gen *cuoA* tratamos de buscar secuencias palindrómicas denominadas “copper box” reconocidas por los reguladores transcripcionales CueR o CusR en los promotores de los genes inducibles por cobre en las bacterias entéricas (Outten *et al.*, 2000b; Rensing y Grass, 2003), pero no las encontramos por lo que pensamos que en la regulación del gen *cuoA* estaban implicados otros factores de transcripción diferentes que detectan cobre. El análisis de la región genómica próxima al gen *cuoA* había mostrado la presencia de un sistema regulador de dos componentes localizado inmediatamente aguas abajo de dicho gen. Ya que en muchos casos, los genes suelen estar regulados por otros genes que se localizan en sus proximidades (Leonhartsberger *et al.*, 2001), se planteó la posibilidad de que el sistema regulador de dos componentes localizado aguas abajo de *cuoA*, al que denominamos CorSR, regulara la expresión de dicho gen. Para ello se estudió la expresión del gen *cuoA* en un mutante para el sistema CorSR en presencia de sulfato de cobre y se pudo comprobar que los niveles de expresión de dicho gen estaban próximos a cero tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo. De estos resultados, podemos concluir que la expresión del gen *cuoA* en respuesta a cobre está determinada por el sistema regulador de dos componentes CorSR.

El sistema regulador de dos componentes CorSR está formado por una histidina quinasa, CorS, y un regulador de respuesta de tipo NtrC, CorR. Como se explicó con detalle en la Introducción, una característica de los reguladores de respuesta de tipo NtrC es que activan la transcripción de los genes que regulan por interacción con  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa. En primer lugar, buscamos las secuencias consenso descritas para los promotores de  $\sigma^{54}$  en otras bacterias (Studholme y Dixon, 2003). Por otro lado, en un estudio en *M. xanthus* con varios genes que son controlados por reguladores dependientes de  $\sigma^{54}$ , se describió que en esta mixobacteria los promotores conservan las secuencias GG y GC típicas de estos promotores localizadas en las posiciones -24 y -12 desde el sitio de inicio de la transcripción (Ueki e Inouye, 2002). Basándonos en estos datos y como se ha comentado, se encontraron cuatro posibles secuencias delante de algunos genes del cluster *curA* (Fig. 84). Esto indica que la regulación de *cuoA* por el sistema regulador de dos componentes CorSR es estrictamente dependiente de  $\sigma^{54}$  y que la regulación del cluster *curA* por este sistema regulador va a depender de varios promotores, como comentaremos más adelante.

### E.III. El sistema regulador de dos componentes CorSR controla su propia expresión e interviene en la respuesta al cobre de *M. xanthus*

Los genes que codifican para el sistema regulador de dos componentes CorSR son inducibles por cationes divalentes pero responden principalmente a cobre, al igual que ocurría en el caso del gen *cuoA*, indicando que presentan la misma especificidad de metales. Sin embargo, los niveles de expresión así como el tiempo de expresión observados para los genes *corSR* tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo son diferentes a los observados para el gen *cuoA*. De modo que los niveles máximos de expresión durante el crecimiento vegetativo fueron unas 28 veces más bajos que los detectados en el caso del gen *cuoA*, mientras que en el caso del ciclo de desarrollo los niveles máximos detectados fueron unas 50 veces más bajos en las mismas condiciones. Además, la expresión de los genes *corSR* no comienza a detectarse hasta las 24 horas de incubación con cobre. Esta respuesta tan lenta al metal, parece indicar que el sistema regulador de dos componentes CorSR, en concordancia con los datos obtenidos para la proteína CuoA, está implicado en la respuesta tardía al cobre.

Mediante estudios de RT-PCR habíamos demostrado que los genes *cuoA* y *corSR* se coexpresaban en el mismo ARNm; sin embargo, la presencia de promotores internos delante de cada uno de estos genes hacía pensar también estuvieran sometidos a otros mecanismos de regulación diferentes aunque se coexpresaran. El análisis de los perfiles de expresión de los genes *cuoA* y *corSR* en presencia de cobre confirmó esta teoría, ya que hemos demostrado que los niveles y el tiempo de expresión de ambos genes son muy distintos, aunque en ambos casos hay una dependencia lineal de cobre. Si dichos genes estuvieran bajo el control de los mismos mecanismos se esperaría un nivel de expresión similar, sin embargo esto no ocurre así, lo que parece confirmar que la expresión de los genes *cuoA* y *corSR* ocurre desde promotores diferentes.

El estudio de la autorregulación de CorSR mostró que dicho sistema controla su propia expresión de una manera completa puesto que los niveles detectados en la expresión de dichos genes en un mutante  $\Delta corSR$  eran próximos a cero. El análisis de su región promotora había mostrado además la presencia de un promotor típico para  $\sigma^{54}$  lo que hace pensar que al igual que ocurría con el gen *cuoA*, la expresión de los genes *corSR* es estrictamente dependiente del factor  $\sigma^{54}$  de la ARN polimerasa.

El estudio fenotípico del mutante  $\Delta corSR$  demostró que es ligeramente más sensible a cobre que la cepa silvestre. Además, la síntesis de carotenoides, inducida por la presencia de sulfato de cobre en el medio (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005), ocurría a una concentración de dicho metal más baja que para la cepa silvestre. Durante el ciclo de desarrollo se observó que en ausencia de cobre en el medio, la cepa  $\Delta corSR$  presentaba un retraso en la formación de los cuerpos fructificantes hasta las 72 h. En presencia de cobre en el medio también se observó un retraso en la formación de los cuerpos fructificantes, sin embargo, esos cuerpos estaban mejor formados a una concentración de 40  $\mu$ M de sulfato de cobre donde observamos claramente la inducción de la síntesis de carotenoides. El hecho de que tanto durante el crecimiento vegetativo como en el ciclo de desarrollo se observe una respuesta de este tipo tan fuerte en el caso del mutante  $\Delta corSR$  hace pensar que la falta del sistema regulador de dos componentes produce cambios en el estado redox del cobre y/o altera su localización subcelular induciendo de forma más eficiente la síntesis de carotenoides. Como se verá más



adelante, este fenotipo se debe a la regulación del gen MXAN3414, que se encuentra en el cluster *curA*.

Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005, demostraron que un mutante en el que no se producía la síntesis de carotenoides era tan resistente al cobre como la cepa silvestre. Esto parece indicar que la síntesis de carotenoides por si sola no contribuye a la tolerancia completa al cobre, al menos en las condiciones que hemos probado. Además el hecho de que cuando se preincubaban las células de *M. xanthus* con sulfato de cobre, éstas son más resistentes a dicho metal debido a que se activan otros mecanismos independientes de los carotenoides y que confieren resistencia a concentraciones más altas de cobre, hace pensar que la inducción de carotenoides podría ser uno de los varios mecanismos celulares para la resistencia al cobre y la regulación de dichos mecanismos podría estar interconectada.

Cuando las células del mutante  $\Delta corSR$  se preincubaron con cobre durante el crecimiento vegetativo resultaron ser bastante más sensibles al metal que la cepa silvestre. Este hecho parece indicar que el sistema CorSR, está implicado en el mantenimiento de la respuesta al cobre, lo cual no es sorprendente si tenemos en cuenta que regula al gen *cuoA*. El estudio del fenotipo durante el desarrollo cuando las células están inducidas indicó que el sistema CorSR está implicado en la formación de cuerpos fructificantes en presencia de altas concentraciones de cobre. Las células preinducidas del mutante eran más resistentes al metal que en el experimento sin preincubar; sin embargo, mientras la bacteria silvestre formaba cuerpos hasta una concentración de 2500  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, el mutante sólo formaba cuerpos hasta 100  $\mu\text{M}$ , aunque las bacterias estaban vivas hasta una concentración de 2000  $\mu\text{M}$ . Esto indica que la ausencia del sistema CorSR hace que se bloquee el ciclo de desarrollo en presencia de cobre sin afectar a la viabilidad de las células.

Para verificar este efecto a nivel molecular, se construyeron diferentes fusiones *lacZ* con varios genes marcadores del desarrollo: *fruA*, *mrpC* y *tps*, cuya expresión se induce de forma específica durante el ciclo de desarrollo (Inouye *et al.*, 1979b; Ogawa *et al.*, 1996; Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b). El análisis de la expresión de estas fusiones *lacZ* en el silvestre y en el mutante  $\Delta corSR$  durante el desarrollo cuando los mecanismos de resistencia al cobre están inducidos permite explicar el fenotipo exhibido por el mutante, puesto que a partir de la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, que es donde el mutante ya no formaba cuerpos, no se observó expresión de los genes *fruA* y *tps*, y la expresión del gen *mrpC* estaba disminuida, conduciendo a un bloqueo del ciclo de desarrollo.

El componente clave para la progresión del ciclo de desarrollo en *M. xanthus* es el regulador de respuesta FruA. Esta proteína controla la transducción de señales ante los niveles crecientes de señal C recibidos por la célula, incrementando a su vez su nivel de expresión durante el desarrollo (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehaug *et al.*, 1998). Durante esta etapa, esta proteína dirige inicialmente a las células hacia la agregación para la formación de cuerpos fructificantes, para posteriormente, a medida que avanza el desarrollo, promover la diferenciación de las células contenidas dentro de los cuerpos en mixósporas de resistencia (Bonner y Shimkets, 2001). Por tanto, el hecho de que a partir de la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre, donde dejan de formarse los cuerpos fructificantes en el mutante  $\Delta corSR$ , no se detecte proteína FruA indica que, al no estar presente esta proteína, el ciclo de desarrollo no pueda progresar.

La actividad del regulador FruA estimula la expresión de la proteína S, el componente principal de la cubierta de la mixóspora, codificada por el gen *tps* (Inouye *et al.*, 1979b). Una vez completada la agregación, FruA dispara la expresión de los genes *dev*, necesarios para la diferenciación de mixósporas en los cuerpos fructificantes, ante la presencia de niveles crecientes de señal C. Sin embargo, otros genes dependientes del desarrollo, como ocurre con *tps*, requieren de la acción de FruA pero no se encuentran regulados por la señal C (Ueki e Inouye, 2006). El hecho de que FruA no se exprese a partir de la concentración de 200  $\mu$ M de sulfato de cobre, impide a su vez la expresión de genes activados por esta proteína, como el gen *tps*, de ahí que tampoco se detecten niveles de este último gen a partir de dicha concentración de sulfato de cobre.

La expresión del regulador FruA se induce durante el desarrollo por acción del activador MrpC (Nariya e Inouye, 2005; Nariya e Inouye, 2006). En este estudio se ha comprobado que a partir de la concentración de 200  $\mu$ M de sulfato de cobre, los niveles de MrpC disminuyen, de manera que puede que no sean suficientes para activar a FruA y permitir que el ciclo de desarrollo se lleve a cabo con normalidad.

La ausencia de expresión de los marcadores del desarrollo *fruA* y *tps*, y la disminución de la expresión del marcador *mrpC* en el mutante  $\Delta$ *corSR* cuando los mecanismos de resistencia al cobre están inducidos a partir de la concentración de sulfato de cobre en el medio de 200  $\mu$ M, corrobora que la falta del sistema regulador de dos componentes CorSR en esta situación hace que el ciclo de desarrollo no progrese pero no se afecte la viabilidad de las células, de modo que aunque éstas están vivas no son capaces de llevar a cabo el ciclo de desarrollo puesto que éste se encuentra bloqueado, a pesar de encontrarse en un medio pobre en nutrientes. No obstante, aún queda por determinar cual o cuales son las proteínas afectadas directamente por el cobre, y que impiden que se induzcan los genes esenciales para el desarrollo.

#### **E.IV. El sistema de dos componentes CorSR regula parcialmente la expresión de la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> CopA**

El análisis del fenotipo del mutante  $\Delta$ *corSR* cuando las células se preincubaban con cobre durante el crecimiento vegetativo mostró que era más sensible al metal que la cepa silvestre, lo que parece sugerir que dicho sistema debe intervenir en la regulación de otros mecanismos implicados en la resistencia al cobre, además de en la regulación de la oxidasa multicobre CuoA. Por tanto, debe de haber otros mecanismos implicados en la resistencia al cobre regulados por el sistema CorSR. Los resultados descritos hasta el momento indican que el sistema regulador de dos componentes CorSR regula la expresión del gen *cuoA* y la suya propia, por lo que tratamos de encontrar otros posibles genes implicados en el metabolismo del cobre en cuya regulación interviniera el sistema regulador de dos componentes CorSR.

El estudio de otros posibles genes regulados por el sistema regulador de dos componentes CorSR comenzó con la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub> CopA localizada en el cluster *curA*. Para ello se construyó una fusión *lacZ* con el gen *copA* y se estudió su expresión en el mutante  $\Delta$ *corSR*. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del gen *copA* en el mutante para el sistema CorSR no se perdía completamente, lo que indicaba que dicho sistema no era el único regulador que intervenía en su expresión. Pero además, el análisis del perfil de expresión de *copA* en el mutante  $\Delta$ *corSR*, era similar al

de los genes regulados por el factor sigma de tipo ECF CorE (MXAN3426) de *M. xanthus*, cuyo estudio se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio (Gómez-Santos, 2009). Esto hacía pensar que el gen *copA* presentaba una regulación doble por ambos reguladores, por lo que se decidió estudiar la expresión de este gen en un mutante doble para los dos reguladores ( $\Delta corSR \Delta corE$ ). Se pudo comprobar que la expresión del gen *copA* en el mutante doble era abolida completamente, indicando que dicho gen presenta una regulación doble por ambas proteínas reguladoras. El hecho de que haya una regulación múltiple no es un resultado tan extraño puesto que previamente se han descrito algunos casos de este tipo de regulación para algunas de las proteínas implicadas en la respuesta al cobre. En la regulación de la ATPasa CopA de *E. coli*, el componente central de la homeostasis del cobre en dicha bacteria, interviene el regulador de respuesta a metales CueR, pero también se ha visto que la expresión de esta ATPasa está influenciada por el regulador de respuesta a estrés en la envuelta celular, CpxR (Outten *et al.*, 2000b) o por el sensor de oxígeno FNR bajo condiciones microaeróbicas (Partridge *et al.*, 2007).

El análisis de la región promotora del gen *copA* mostró un promotor característico para  $\sigma^{54}$ , sin embargo, el hecho de que este gen sea regulado además de por el sistema CorSR, por el factor de tipo ECF CorE, indica que la expresión de este gen no es estrictamente dependiente de  $\sigma^{54}$  como ocurría con el gen *cuoA* y los genes *corSR*, todos ellos localizados en el cluster *curA*.

Con el fin de dilucidar qué otros genes podría formar parte del regulón de CorSR, se introdujeron en el mutante  $\Delta corSR$ , las fusiones *lacZ* de otros genes implicados en la respuesta al cobre como *cuoB*, *cuoC*, *copB*, *copC* y los tres sistemas Cus y Czc de *M. xanthus*. Estas construcciones, como ya se ha comentado, forman parte del estudio de la respuesta global al cobre que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio. Ninguno de los genes ensayados está bajo el control del sistema CorSR. Sólo pudimos observar regulación parcial del sistema Cus2. Esto parece indicar que la respuesta global al cobre en *M. xanthus* es probablemente un proceso muy complejo en el que deben intervenir numerosas proteínas diferentes a las tradicionales ya comentadas.

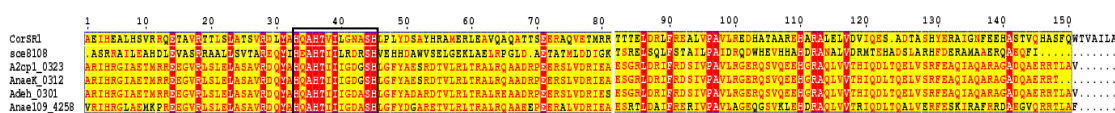
### **E.V. Caracterización del dominio sensor de la histidina quinasa CorS**

El análisis de la arquitectura de dominios de la histidina quinasa CorS mostró que es una histidina quinasa típica de clase I (Dutta *et al.*, 1999; Foussard *et al.*, 2001) que contiene los dominios característicos de esta familia de proteínas: un dominio sensor N-terminal conectado con el dominio quinasa a través de una hélice transmembrana seguida de un dominio HAMP; un dominio HisKA, donde se encuentra el residuo de histidina que se fosforila y un subdominio HATPasa\_C implicado en la unión al ATP y en la fosfotransferencia hasta el residuo aceptor de histidina. La topología de CorS, cuando se analiza con diferentes servidores tales como el DAS, TMHMM, TMPred o TopPred, presenta un péptido señal entre los aminoácidos 8 y 30. La secuencia presenta un dominio transmembrana claro entre los aminoácidos 178 y 210. Esto indica que el dominio sensor de la histidina quinasa está orientado hacia el periplasma. Esta orientación explica en parte el hecho de que detecte Cu(II) y no sea sensible al Cu(I). La forma oxidada es la que preferentemente se encuentra en el espacio periplásmico, mientras que la reducida penetra en el espacio citoplasmático. Por tanto el dominio sensor detectará Cu(II) presente en el espacio periplásmico.

El dominio sensor de las histidina quinasa es el elemento que detecta los estímulos medioambientales, es por ello que estas proteínas presentan una gran variedad de secuencias con una homología muy baja, lo que apoya la idea de que los dominios sensores han sido diseñados para detectar estímulos específicos (Stock *et al.*, 2000). A pesar de que se han descrito varios sistemas de dos componentes implicados en la regulación de proteínas que confieren resistencia al cobre, como por ejemplo los sistemas CusRS y PcoRS de *E.coli* o CopRS de *P. syringae* (Brown *et al.*, 1995; Rensing y Grass, 2003) no se ha estudiado en ninguno de ellos cómo detecta el cobre el dominio sensor. Además, estos dominios no se asemejan entre sí.

Se sabe que las proteínas que unen metales lo hacen a través de los átomos de azufre de las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína y metionina, nitrógeno de la histidina y oxígeno de aspártico y glutámico (Pennella y Giedroc, 2005). El cobre suele unirse a los aminoácidos cisteína, metionina o histidina. Principalmente, el Cu(I) suele unirse a los átomos de azufre, mientras que el Cu(II) suele unirse a los átomos de nitrógeno (Xue *et al.*, 2008) El análisis de la secuencia de aminoácidos del dominio sensor de la histidina quinasa CorS mostró que no presentaba ninguna cisteína como ocurre en los reguladores de tipo MerR, donde están implicadas en la unión de metales (Brown *et al.*, 2003), y sólo dos residuos de metionina. Por el contrario, presentaba un alto número de residuos de histidina. Esto está en concordancia con el hecho de que el sistema CorSR responde principalmente a Cu(II), el cual se suele unir a los átomos de nitrógeno de los residuos de histidina.

El análisis de la secuencia de dicho dominio de la proteína CorS no reveló homología con otros dominios sensores de otras histidina quinasa implicadas en la detección de metales depositadas en las bases de datos. Sin embargo, sí que presentaba alta identidad (por encima del 38%) con varios dominios sensores de histidinas quinasa (Fig. 101) de otras mixobacterias secuenciadas, algunas de ellas, como es el caso de sce8108 de *S. cellulosum*, se encuentra en una región donde se localizan genes que podrían estar implicados en la respuesta al cobre, incluidas dos MCOs.



**Figura 101.** Alineamiento del dominio sensor de la histidina quinasa CorS de *M. xanthus* con los dominios sensores de otras histidina quinasa presentes en *S. cellulosum* y especies del género *Anaeromyxobacter*. En blanco sobre fondo rojo se muestran los aminoácidos conservados en las cinco secuencias comparadas, y el recuadro muestra la posible región con residuos de histidina implicada en la detección del cobre. sce8108 (*Sorangium cellulosum* So ce56), A2cp1\_0323 (*Anaeromyxobacter dehalogenans* 2C-1); AnaeK\_0312 (*Anaeromyxobacter* sp. K); Adeb\_0301 (*Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C) y Anae109-4258 (*Anaeromyxobacter* sp. Fw 109-5).

Para estudiar este dominio sensor decidimos utilizar una estrategia en la que se fueron construyendo diferentes mutantes de delección en fase en los que se introdujo la fusión *cuoA-lacZ*. Con esta táctica fuimos capaces de determinar si cada mutante sentía o no la presencia de cobre. En primer lugar delecionamos prácticamente todo el dominio sensor (mutante  $\Delta corS1$ ), y como esperábamos, la proteína dejaba de sentir el cobre. A continuación construimos otro mutante en el que delecionamos un trozo más pequeño ( $\Delta corS2$ ). Los resultados obtenidos con este mutante nos sorprendieron especialmente, ya que la proteína mutante fue capaz de sentir el cobre externo. Además, como se observa en la Fig. 101 la región rica en histidinas (HXAHTXIXXXXSH) que *a priori*

podría estar implicada en la detección del cobre, y que está altamente conservada en todas las mixobacterias, no parece ser necesaria. Los resultados con el mutante  $\Delta corS2$  sin embargo, nos ayudaron a acotar las regiones implicadas. Este experimento nos permitió determinar que los aminoácidos encargados de sentir el cobre están situados en las regiones adyacentes al péptido señal y al dominio transmembrana. Así, pudimos concluir que son necesarias las dos regiones resaltadas en la Fig. 72. La mutación independiente de cada una de ellas causó una alteración en la detección del cobre, ya que eran proteínas funcionales aún en ausencia de cobre añadido. Esto parece indicar que ambos subdominios son importantes para que el sensor detecte el cobre y transmita la señal al dominio quinasa. Un análisis más profundo de las dos regiones del dominio sensor de CorS implicadas en la detección del cobre, mostró la presencia de residuos de histidina, pero también la presencia de residuos de aspártico y glutámico, implicados en la detección de metales en los reguladores transcripcionales de tipo ArsR (Pennella *et al.*, 2003; Pennella y Giedroc, 2005; Giedroc y Arunkumar, 2007), indicando que probablemente estos tres tipos de residuos sean los responsables de la detección del cobre en la histidina quinasa CorS. La región más cercana al amino terminal presenta cierta homología con la familia Ctr copper transporter (PF04145). A esta familia pertenecen proteínas implicadas en el transporte de cobre (Puig *et al.*, 2002). La región más cercana al carboxilo terminal es muy pequeña, por lo que es muy difícil establecer alguna homología con otras proteínas implicadas en el transporte o manejo del cobre. Incluso es probable que sea necesaria para la dimerización de la histidina quinasa, y por tanto, la transmisión de la señal, más que para la detección del metal.

Sin embargo, a pesar de que los aminoácidos comentados podrían estar implicados en la detección directa del metal, no se pueden descartar otras interpretaciones. Por ejemplo, se podría pensar que el sensor no detecta cobre, sino los daños originados por este metal, como ocurre con en el regulador CpxR de *E. coli* (Outten *et al.*, 2000b). Esta posibilidad creemos que está excluida, ya que, como hemos indicado, los genes que son regulados por este sistema de dos componentes, tales como *cuoA* son inducibles por otros metales divalentes como el Ni, Zn o Co que no producen los daños del tipo oxidativo que produce el cobre.

Una segunda explicación podría ser que el dominio sensor no sienta cobre directamente, sino que interaccione con otra proteína que medie en esta transducción de señales mediante interacción proteína-proteína. Con objeto de comprobar esta última posibilidad se analizaron los diferentes genes que forman del cluster *curA*. Se observó que inmediatamente aguas abajo de dicho sistema se encuentra un gen que codifica para una lipoproteína (MXAN3417), a tan solo 86 pb aguas abajo del regulador de respuesta *corR*. En las actinobacterias se ha observado que un subgrupo de histidina quinasa, junto con su regulador de respuesta, están unidas genéticamente a genes para lipoproteínas que en algunos casos funcionan como una proteína accesoria de la histidina quinasa con la que se cotraducen (Hoskisson y Hutchings, 2006). En *Mycobacterium tuberculosis*, este “sistema de tres componentes” está formado por el sistema regulador de dos componentes MtrAB y la lipoproteína LpqB (Lipoprotein LpqB beta-propeller domain). Se ha propuesto que estas lipoproteínas median la transducción de señales a través del sistema regulador de dos componentes por interacción con el dominio sensor de la histidina quinasa, formando un “sistema de tres componentes” (Hoskisson y Hutchings, 2006). El hecho de que esta organización genética tan conservada en las actinobacterias, estuviera presente en el cluster *curA* de *M. xanthus*, y de que además la lipoproteína MXAN3417 presentara un dominio

WD40/YVTN repeat-like-containing domain, implicado en interacciones proteína-proteína, añadido al hecho de que MXAN3417 cuando se analiza por la base de datos PFAM, tiene cierta homología con el clan *Beta\_propeller* (CL0186), a la que también pertenece la familia *Gmad1* (PF10647), cuyo representante principal es la lipoproteína de LpqB de *Mycobacterium*, se decidió estudiar si en *M. xanthus* dichos genes también formaban un “sistema de tres componentes”. La estrategia a seguir fue construir un mutante de delección del gen MXAN3417 y utilizarlo como fondo genético para la introducción de la fusión *lacZ* con el gen *cuoA*, el cual está regulado totalmente por el sistema CorSR. El análisis de la expresión del gen *cuoA* en dicho mutante mostró un perfil muy similar a la expresión en la cepa silvestre en presencia de cobre, indicando que la lipoproteína MXAN3417 no es la que detecta el cobre y transmite la señal a la histidina quinasa CorS, de manera que el sistema CorSR y la proteína MXAN3417 no forman un “sistema de tres componentes”.

### **E.VI. El regulador de respuesta CorR del sistema CorSR se une a dos diferentes UAS localizadas en el cluster *curA***

El análisis de la arquitectura de dominios del regulador de respuesta CorR reveló que esta proteína pertenece a la familia de reguladores de respuesta de tipo NtrC. Las proteínas de esta familia presentan tres dominios característicos: un dominio N-terminal regulador de respuesta donde se encuentra el residuo de aspártico fosforilable por la histidina quinasa afin, un dominio central de interacción con  $\sigma^{54}$  e hidrólisis de ATP, y un dominio C-terminal HTH indispensable para la unión al ADN (Stock *et al.*, 2000). Estos tres dominios están presentes en la proteína CorR de *M. xanthus*, indicando que pertenece a esta familia de proteínas.

Debido a esta arquitectura, esta familia de proteínas son dependientes del factor  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa. Como se explicó con detalle en la Introducción, es necesario que para iniciar la transcripción estas proteínas se unan a unas secuencias localizadas a un mínimo de 80 pb del promotor conocidas como UAS e interaccionen directamente con  $\sigma^{54}$  unido a la ARN polimerasa. En este proceso, estas proteínas acoplan la hidrólisis de ATP para remodelar el complejo cerrado del ADN y permitir el inicio de la transcripción de los genes diana (Rappas *et al.*, 2006; Wigneshweraraj *et al.*, 2008). El análisis *in silico* de la región promotora de los distintos genes del cluster *curA* regulados por el sistema CorSR mostró dos posibles UAS localizadas por encima de los genes MXAN3421 (UAS1) y MXAN3419 (UAS2) del cluster *curA* (Fig. 85A). Las posibles UAS son secuencias de 19 pb con la secuencia consenso 5' TGTN<sub>13</sub>ACA 3'. La UAS1 está localizada a 72 pb del promotor de  $\sigma^{54}$ , mientras que la UAS2 está localizada a 74 pb de dicho promotor.

Con el fin de confirmar si las dos posibles regiones localizadas *in silico* actuaban como posibles UAS, decidimos deleccionar dichas regiones y estudiar la expresión de los genes regulados por CorSR, *cuoA*, *corSR* y *copA*. Se pudo comprobar que cuando se deleccionaba la UAS1, los genes *cuoA* y *corSR* presentaban niveles de expresión próximos a cero. Sin embargo, el gen *copA*, no perdía su expresión aunque estaba reducida. En el caso en el que se deleccionó la UAS2 se observó que la expresión de genes *corSR* estaba prácticamente abolida. Sin embargo, la expresión de los genes *cuoA* y *copA* no se perdía completamente, aunque si se encontraba reducida.

La delección de la UAS1 abolía la expresión de los genes *cuoA* y *corSR* indicando que esa secuencia es necesaria para la expresión de dichos genes. De manera que queda confirmado que la expresión de los genes *cuoA* y *corSR* requiere la unión de CorR a la UAS1, la posterior curvatura del ADN y la interacción con  $\sigma^{54}$  para iniciar la transcripción. En el caso del gen *copA*, esta región no parece actuar como UAS puesto que la pérdida de la expresión no era completa. La delección de la UAS2 por su parte, mostró solamente una abolición de la expresión de los genes *corSR*, indicando que esta secuencia es necesaria sólo para la expresión de estos genes, y que su expresión requiere la unión de CorR a esta secuencia. Sin embargo, en el caso de los genes *copA* y *cuoA*, esta región delecionada no parece actuar como UAS puesto que no había una pérdida completa de la expresión. La región UAS2 está localizada aguas abajo del gen *cuoA*, y la distancia con su promotor es bastante grande (2169 pb) lo que explicaría que dicha región no actuara como UAS, al menos de una manera completa como ocurría con la UAS1. En el caso del gen *copA*, es probable que su expresión esté controlada desde una UAS localizada en su propia región promotora, aunque no se ha encontrado ninguna secuencia similar a UAS1 y UAS2 que pudiera funcionar como tal.

Cuando se busca la secuencia consenso de las dos UAS (TGTGACCN<sub>5</sub>GGTNACA) frente a todos los genomas depositados en la base de datos del Visual Footprints versión 3 (Regulon Prediction) ([http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp\\_regulon.php](http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_regulon.php)), mediante su programa SMILE (**S**imilar **I**ntergenic **L**ocation **A**nalyzer), sólo aparecen dos coincidencias, en ambos casos dos mixobacterias:

- a) la secuencia TGTGACCGAGCCGGTCACA a -116 del comienzo del gen *sce8108* de *S. cellulosum*, que codifica para una histidina quinasa con un dominio sensor muy similar a MXAN3419 (Fig. 101).
- b) la secuencia TGTGACCGGGGCGGTCACG, en la región promotora del gen *Adeh\_0301*, que codifica para una histidina quinasa también muy similar a MXAN3419 (Fig. 101), aunque en este caso no se conserva la secuencia consenso TGTN<sub>13</sub>ACA.

Parece por tanto que estos sistemas de dos componentes de estas tres mixobacterias, cuyos reguladores de respuestas son dependientes de  $\sigma^{54}$ , presentan una regulación muy parecida.

### **E.VII. El gen MXAN3414 está implicado en la tolerancia al cobre y en la biosíntesis de carotenoides**

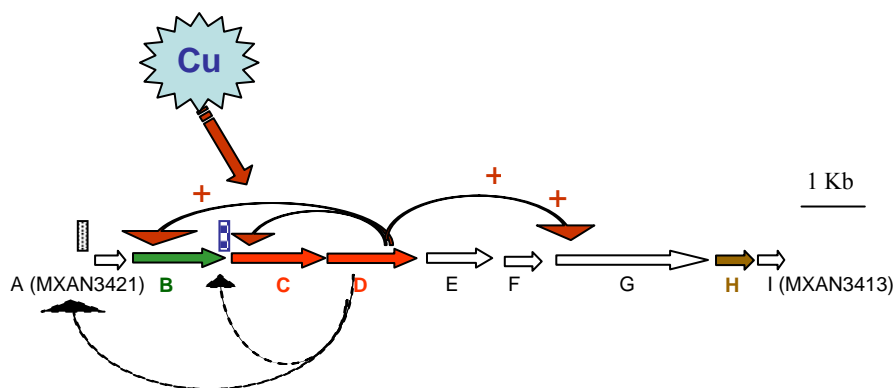
Cuando se observó por primera vez que el mutante  $\Delta corSR$  era capaz de inducir la biosíntesis de carotenoides a concentraciones más bajas de cobre y que además esta inducción ocurría a concentraciones de cobre tan bajas como para formar cuerpos fructificantes rojos, establecimos la hipótesis de que probablemente era porque se acumulaba cobre en el citoplasma como consecuencia de la falta de expresión de la ATPasa CopA. Sin embargo, el análisis del mutante de CopA no presenta este fenotipo (Moraleta *et al.*, 2009, resultados sin publicar). Una vez desechada esta hipótesis, nos fijamos en el gen MXAN3414, localizada solo a 35 pares de bases aguas abajo del gen *copA*, el cual codifica una proteína perteneciente a la superfamilia del citocromo *c* (MXAN3414). El hecho de que esta proteína pertenezca a la familia de los citocromos,

implicadas en procesos redox, hizo que la eligiéramos para su estudio, ya que el cobre está implicado en procesos que conllevan reacciones de oxido-reducción.

El mutante de delección de este citocromo mostró un fenotipo similar al mutante  $\Delta corSR$ . Por tanto, parece que el fenotipo observado en el mutante de los dos componentes, en relación con la carotenogénesis, se debe principalmente a la eliminación del gen MXAN3414. El hecho de que esta proteína presente alta homología con la superfamilia del citocromo *c* nos induce a especular sobre la posibilidad de que esté implicada en reacciones de oxido-reducción. Lo más sencillo sería pensar que en su ausencia se acumularía el cobre en otro estado reducido como Cu(I), en el espacio periplásmico y que esta acumulación induce la síntesis de carotenoides a concentraciones más bajas de cobre. Es importante recordar que en ni en la bacteria silvestre, ni en ninguno de los mutantes estudiados hasta ahora, se acumula suficiente cobre durante el desarrollo como para que se observen los cuerpos fructificantes de color rojo. Esto se debe a que las bacterias durante el desarrollo solo son capaces de resistir y formar cuerpos hasta 60  $\mu\text{M}$  de cobre y por tanto las células mueren antes de que se acumule suficiente cobre como para inducir los carotenoides. Otra posibilidad para explicar el fenotipo observado en este mutante, sería que la falta del gen MXAN3414 hiciera que las células no se encontraran en condiciones óptimas de crecimiento porque sea un gen necesario para que las células obtengan energía. La síntesis de carotenoides suele ocurrir en condiciones de crecimiento subóptimas (Moraleta-Muñoz, 2005), de manera que sería la falta de la proteína MXAN3414 en sí la responsable de ese fenotipo y no el estado redox del cobre.

### E.VIII. Función y regulación del cluster *curA*

Para terminar, y como resumen de todos los resultados presentados hasta el momento, se puede concluir que el cluster *curA*, formado por 9 genes, es regulado por el sistema regulador de dos componentes CorSR (Fig. 102).



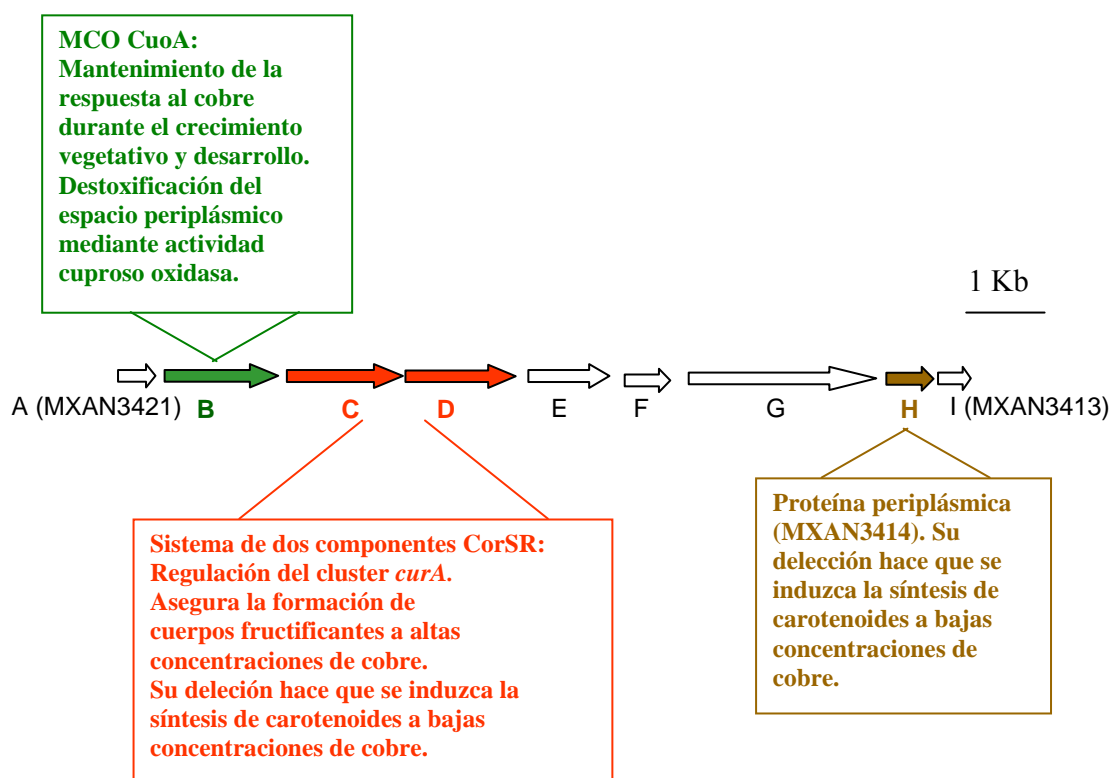
**Figura 102.** Regulación del cluster *curA* por el sistema regulador de dos componentes CorSR. Líneas punteadas: unión del regulador de respuesta a UAS1 (■) y UAS2 (■). Líneas continuas: regulación positiva por el cobre de CorSR sobre la MCO CuoA, la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub>, CopA y su propio gen (autorregulación).

La histidina quinasa responde al cobre a través de su dominio sensor localizado en el extremo N-terminal y activa a su regulador de respuesta CorR. Dicho regulador es dependiente del factor  $\sigma^{54}$  y por tanto reconoce promotores típicos de estos factores transcripcionales. Aunque todos los genes del cluster *curA* parecen cotranscribirse en el



mismo ARNm, hemos demostrado que existen promotores internos y que CorR reconoce dos UAS independientes, una de los cuales se localiza aguas arriba del gen MXAN3421 (UAS1) y la otra antes del gen que codifica para la histidina quinasa CorS (UAS2). Las búsquedas bioinformáticas y experimentales indican que CorSR ejerce su función mediante la regulación sólo del cluster *curA*.

Respecto a la función que desempeña el cluster *curA*, se puede concluir que en general está implicado en el mantenimiento de la resistencia al cobre y la destoxificación del metal del espacio periplásmico (Fig. 103). Esto se puede deducir tanto por los perfiles de expresión tardía de sus genes y por el fenotipo de alguno de los mutantes de los mismos. En esta tesis se ha profundizado en la función y el mecanismo de acción de la MCO CuoA y del sistema de dos componentes CorSR. La proteína CuoA está implicada en la destoxificación del espacio periplásmico a través de su actividad cuproso oxidasa. El sistema regulador CorSR regula los genes del cluster para mantener la resistencia al cobre y asegurar la formación de cuerpos fructificantes a altas concentraciones de cobre. Además, la mutación del sistema de dos componentes y por tanto de los genes del cluster *curA* afecta a la inducción de la biosíntesis de carotenoides por cobre. Las células durante el desarrollo en el mutante producen cuerpos fructificantes de color rojo con bajas concentraciones de este metal, que no se han observado ni en la bacteria silvestre, ni en ningún otro mutante. Hemos demostrado que esta alteración es debida a la falta de expresión del gen MXAN3414.



**Figura 103.** Resumen de las funciones del cluster *curA*.

## **F. CONCLUSIONES**



## F. CONCLUSIONES

1. El estudio de la resistencia de *M. xanthus* al cobre ha mostrado que dicha bacteria es 17 veces más sensible al metal durante el ciclo de desarrollo que durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, si las células son incubadas en presencia de cobre, los mecanismos implicados en la destoxificación de este metal se inducen y las células durante el desarrollo son tan resistentes al cobre como durante el crecimiento vegetativo.
2. El análisis del genoma de *M. xanthus* ha revelado la existencia de una gran abundancia de genes cuyos productos presentan similitudes con la secuencia de proteínas que están implicadas en la homeostasis del cobre en otros organismos. Muchos de estos genes son redundantes, indicando que la respuesta global al cobre en *M. xanthus* es más compleja que en otras bacterias. Entre estas proteínas se encuentran tres oxidasas multicobre, denominadas CuoA, CuoB y CuoC.
3. El gen que codifica para la proteína CuoA se cotranscribe con otros ocho genes en un mismo ARNm. Entre estos genes se encuentran los que codifican para el sistema regulador de dos componentes CorSR, la ATPasa de tipo P<sub>IB</sub> CopA, una lipoproteína y una proteína de la superfamilia del citocromo *c*.
4. La oxidasa multicobre CuoA es una proteína periplásmica secretada por el sistema Sec que interviene en la destoxificación de este compartimento celular y es necesaria para una tolerancia completa al cobre durante el ciclo de vida de *M. xanthus*.
5. La expresión del gen *cuoA* es dependiente de cobre y otros cationes divalentes como el zinc, cobalto y níquel. Su expresión es linealmente dependiente de la concentración de cobre y aumenta con el tiempo hasta alcanzar un meseta entre las 24 y 48 h de incubación con el metal. Su promotor es más sensible al metal durante el ciclo de desarrollo, requiriéndose una concentración diez veces menor para obtener los mismos niveles de expresión.
6. La expresión de la proteína CuoA está regulada por el sistema regulador de dos componentes CorSR dependiente de  $\sigma^{54}$ . Este sistema también regula su propia expresión y la de la ATPasa CopA.
7. El dominio sensor de la histidina quinasa CorS presenta dos regiones implicadas en la detección del cobre, una próxima al péptido señal y otra próxima al dominio transmembrana de dicha proteína, aunque se desconoce si estas secuencias unen cobre directamente o interaccionan con otra proteína para activarse.
8. Se han identificado dos regiones UAS necesarias para iniciar la transcripción de los genes regulados por el sistema de dos componentes CorSR.



## **G. BIBLIOGRAFÍA**



## G. BIBLIOGRAFÍA

**Alber, M.S., Kiskowski, M.A. y Jiang, Y. (2004)** Two-stage aggregate formation via streams in myxobacteria. *Phys. Rev. Lett.* **93**:068102.

**Alexandre, G. y Zhulin, I.B. (2000)** Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotech.* **18**:41-42.

**Ames, S.K., Frankema, N. y Kenney, L.J. (1999)** C-terminal DNA binding stimulates N-terminal phosphorylation of the outer membrane protein regulator OmpR from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11792-11797.

**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.

**Aouffen, M., Paquin, J., Furtos, A., Waldron, K.C., y Mateescu, M.A. (2004)** Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by piruvate. *Free Radic. Res.* **38**:19-26.

**Aravind, L. y Ponting, C.P. (1999)** The cytoplasmic helical linker domain of the receptor histidine kinase and methyl-accepting protein is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**:111-116.

**Argüello, J.M., Eren, E. y González-Guerrero, M. (2007)** The structure and function of heavy metal transport P<sub>1B</sub>-ATPases. *Biometals* **20**:233-248.

**Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. y Hernández, M. (2003)** Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1953-1958.

**Arias, M.E., Polvillo, O., Rodríguez, J., Hernández, M., Molina, J.M., González-Pérez, J.A. y González-Villa, F.J. (2005)** Effect of different *Streptomyces* strains on pine wood as seen by Py-GC/MS. Implications for mechanical pulping. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **74**:138-144.

**Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P. y Dickerson, R.E. (1996)** Structure of the *Escherichia coli* response regulador NarL. *Biochemistry* **35**:11053-11061.

**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.

**Behmlander, R.M. y Dworkin, M. (1994)** Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:6304-6311.

**Bekker, M., Teixeira de Mattos, M.J. y Hellingwerf, K.J. (2006)** The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci. Prog.* **89**:213-242.



- 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.
- Berleman, J.E., Scott, J., Chumley, T. y Kirby, J.R. (2008)** Predataxis behavior in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:17127-17132.
- 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.
- Berrocal, M., Ball, A.S., Huerta, S., Barrasa, J.M., Hernández, M., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E. (2000)** Biological upgrading of wheat straw through solid-state fermentation with *Streptomyces cyaneus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **54**:764-771.
- Berrocal, M.M., Rodríguez, J., Ball, A.S., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E. (1997)** Solubilisation and mineralisation of [<sup>14</sup>C]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotech.* **48**:379-384.
- Berrocal, M.M., Rodríguez, J., Hernández, M., Pérez, M.I., Roncero, M.B., Vidal, T., Ball, A.S. y Arias M.E. (2004)** The analysis of handsheets from wheat straw following solid substrate fermentation by *Streptomyces cyaneus* and soda cooking treatment. *Bioresource Technology.* **94**:27-31.
- Bibb, M.J., Findlay, P.R. y Johnson, M.W. (1984)** The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* **30**:157-166.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. y Simon, M.I. (1999)** Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**:131-141.
- Black, W.P. y Yang, Z. (2004)** *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J. Bacteriol.* **186**:1001-1008.
- Blackhart, B.D. y Zusman, D.R. (1985a)** Cloning and complementation analysis of the “frizzy” genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **198**:243-254.
- Blackhart, B.D. y Zusman, D.R. (1985b)** “Frizzy” genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8767-8770.
- Blattner, F.R., Plunkett 3<sup>rd</sup>, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. y Shao, Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Bonner, P.J., Black, W.P., Yang, Z. y Shimkets, L.J. (2006)** FibA and PilA act cooperatively during fruiting body formation of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **61**:1283-1293.

- Bonner, P.J. y Shimkets, L.J. (2001)** Piecing together a puzzling pathway: new insights into C-signaling. *Trends Microbiol.* **9**:462-464.
- Bonner, P.J., Xu, Q., Black, W.P., Li, Z., Yang, Z. y Shimkets, L.J. (2005)** The Dif chemosensory pathway is directly involved in phosphatidylethanolamine sensory transduction in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **57**:1499-1508.
- Botella, J.A., Murillo, F.J. y Ruiz-Vázquez, R.M. (1995)** A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* **223**:238-248.
- Bourret, R.B., Davagnino, J. y Simon, M.I. (1993)** The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. *J. Bacteriol.* **175**:2097-2101.
- Boysen, A., Ellehauge, E., Julien, B. y Søgaard-Andersen, L. (2002)** The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **184**:1540-1546.
- Brenner, M., Garza, A.G. y Singer, M. (2004)** *nsd*, a locus that affects the *Myxococcus xanthus* cellular response to nutrient concentration. *J. Bacteriol.* **186**:3461-3471.
- Bretscher, A.P. y Kaiser, D.T. (1978)** Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriol.* **133**:763-768.
- 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.
- Brouwers, G.-J., Vrind, J. P.M.de, Corstjens, P.L.A.M., Cornelis, P., Baysse, C. y Vrind-de Jong, E.W.De (1999)** *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1762-1768.
- Brown, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T. y Rouch, D.A. (1995)** Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* **17**:1153-1166.
- 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.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. y Dixon, R. (1986)** Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**:374-378.
- Buettner, G. (1993)** The packing order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**:535-543.

- Bui, N.K., Gray, J., Schwarz, H., Schumann, P., Blanot, D. y Vollmer, W. (2009)** The peptidoglycan sacculus of *Myxococcus xanthus* has unusual structural features and is degraded during glycerol-induced myxospore development. *J. Bacteriol.* **191**:494-505.
- Cerpa, W., Varela-Nallar, L., Reyes, A.E., Minniti, A.N. y Inestrosa, N.C. (2005)** Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? *Mol. Aspects Med.* **26**:405-420.
- Cervantes, M. y Murillo, F.J. (2002)** Role for vitamin B12 in light induction of genes expression in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **184**:2215-2224.
- Chang, C. y Stewart, R.C. (1998)** The two-component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* **117**:732-731.
- Chater, K.F. y Hopwood, D.A. (1989)** *Genetics of Bacterial Diversity*. London Academic. pp:129-150.
- Checa, S.K., Espariz, M., Audero, M.E.P., Botta, P.E., Spinelli, S.V., y Soncini, F.C. (2007)** Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol. Microbiol.* **63**:1307-1318.
- Chen, P. y Reitzer, L.J. (1995)** Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: stimulon by phosphorylation and the binding of ATP. *J. Bacteriol.* **177**:2490-2496.
- Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1989a)** *dsg*, a gene required for cell-cell interactions early in *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **171**:3719-3726.
- Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1989b)** *dsg*, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability. *J. Bacteriol.* **171**:3727-3731.
- Cheng, Y.L., Kalman, L.V. y Kaiser, D. (1994)** The *dsg* gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3. *J. Bacteriol.* **176**:1427-1433.
- Cho, K. y Zusman, D.R. (1999)** AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **34**:268-281.
- Claus, H. (2003)** Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**:145-150.
- Claus, H. (2004)** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**:93-96.
- Clausen, M., Jakovljevic, V., Sogaard-Andersen, L. y Maier, B. (2009)** High-force generation is a conserved property of type IV pilus systems. *J. Bacteriol.* **191**:4633-4638.
- Cobine, P.A., George, G.N., Jones, C.F., Wickramasinghe, W.A., Solioz, M., y Dameron, C.T. (2002)** Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the

repressor, Zn(II) CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry* **41**:5822-5829.

**Corstjens, P.L., Vrind, J.P.de, Westbroek, P. y Vrind-de Jong, E.W. de (1992)** Enzymatic iron oxidation by *Leptothirx discophora*: identification of an iron-oxidizing protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:450-454.

**Crawford, E.W. y Shimkets, L.J. (2000a)** The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. *Mol. Microbiol.* **37**:788-799.

**Crawford, E.W. y Shimkets, L.J. (2000b)** The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Dev.* **14**:483-492.

**Crichton, R.R., y Pierre, J.L. (2001)** Old iron, young copper: From Mars to Venus. *BioMetals* **14**:99-112.

**Culotta, V.C., Klomp, L.W.J., Strain, J., Casareno, R.L.B., Krems, B., y Gitlin, J. D. (1997)** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **272**:23469-23472.

**Cusick, J.K. y Gill, R.E. (2005)** The *bcsA* gene influences multiple aspects of development in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Microbiol.* **51**:336-343.

**Cusick, J.K., Hager, E. y Gill, R.E. (2002)** Characterization of *bcsA* mutations that bypass two distinct signaling requirements for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **184**:5141-5150.

**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.

**Dahl, J.L., Tengra, F.K., Dutton, D., Yan, J., Andacht, T.M., Coyne, L., Windell, V. y Garza, A.G. (2007)** Identification of major sporulation proteins of *Myxococcus xanthus* using a proteomic approach. *J. Bacteriol.* **189**:3187-3197.

**Darwin, A.J., Tyson, K.L., Busby, S.J., Stewart, V. (1997)** Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol. Microbiol.* **25**:583-95.

**Davis, J.M., Mayor, J. y Plamann, L. (1995)** A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:943-952.

**Dawid, W. (2000)** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:403-427.

**Dick, G.J., Torpey, J.W., Beveridge, T.J. y Tebo, B.M. (2008)** Direct identification of a bacterial manganese (II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1527-1534.

**Djoko, K.Y., Xiao, Z. y Wedd, A. (2008)** Copper resistance in *E. coli*: the multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{II}}\text{-PcoC}$ . *Chem. Biochem.* **9**: 1579-1582.

**Downard, J., Ramaswamy, S.V. y Kil, K.S. (1993)** Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **175**:7762-7770.

**Downard, J. y Toal, D. (1995)** Branched chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **16**:171-175.

**Downard, J. y Zusman, D.R. (1985)** Differential expression of protein S genes during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **161**:1146-1151.

**Dutta, R., Qin, L. e Inouye, M. (1999)** Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**:633-640.

**Dworkin, M. (1962)** Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**:250-257.

**Dworkin, M. (1963)** Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **86**:67-72.

**Dworkin, M. (1993)** Cell surfaces and appendages. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:63-83.

**Dworkin, M. (1996)** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:70-102.

**Dworkin, M. y Gibson, S.M. (1964)** A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Science* **146**:243-244.

**Eisenmesser, E.Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D.M., Wolf-Watz, M., Bosco, D.A., Skalick, J.J., Kay, L.E. y Kern, D. (2005)** Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* **438**:117-121.

**Elías, M. y Murillo, F.J. (1991)** Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *J. Gen. Microbiol.* **137**:381-388.

**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.

**Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. y Søgaard-Andersen, L. (1998)** The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **30**:807-817.

- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T., y Ueda, K. (2003)** Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **133**:671-677.
- Endo, K., Hosono, K., Beppu, T., y Ueda, K. (2002)** A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology* **148**:1767-1776.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., Carrondo, M.A. (2003)** Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**:19416-19425.
- Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E.P., Pontel, L.B. y Soncini, F.C. (2007)** Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* **153**:2989-2997.
- Fabret, C., Feher, V.A. y Hoch, A. (1999)** Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**:1975-1983.
- Fiegna, F. y Velicer, G.J. (2005)** Exploitative and hierarchical antagonism in a cooperative bacterium. *PLoS Biol.* **3**:e370.
- Finney, L.A. y O' Halloran, T.V. (2003)** Metals: impacts on health and the environment. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**:931-936.
- Fong, S.T., Camakaris, J., y Lee, B.T. (1995)** Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **15**:1127-1137.
- Fontes, M., Galbis-Martínez, L., y Murillo, F.J. (2003)** A novel regulatory gene for light-induced carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **47**:561-571.
- Fontes, M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1993)** Growth phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *EMBO J.* **12**:1265-1275.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J.D., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C. y Samama, J.P. (2001)** The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**:417-424.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D.H. (2003)** Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:3804-3812.
- Fraústo da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P. (1993)** The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life. Oxford University Press, Oxford.
- Gaballa, A., Cao, M. y Helmann, J.D. (2003)** Two MerR homologues that affect copper induction of the *Bacillus subtilis* copZA operon. *Microbiology* **149**:3413-3421.

**Gaballa, A. y Helmann, J.D. (2003)** *Bacillus subtilis* CPx-type ATPases: characterization of Cd, Zn, Co, and Cu efflux systems. *Biometals* **16**:497-505.

**Gaetke, L.M. y Chow, C.K. (2003)** Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**:147-163.

**Galbis-Martínez, M., Fontes, M. y Murillo, F.J. (2004)** The high-mobility group A-type protein CarD of the bacterium *Myxococcus xanthus* as a transcription factor for several distinct vegetative genes. *Genetics* **167**:1585-1595.

**Galperin, M.Y. (2005)** A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**:35.

**Gao, R., Mack, T.R. y Stock, A.M. (2007)** Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* **32**:225-234.

**Garza, A.G., Harris, B.Z., Pollack, J.S. y Singer, M. (2000)** The *asgE* locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **35**:812-824.

**Geng, Y., Yang, Z., Downard, J., Zusman, D.R. y Shi, W. (1998)** Methylation of FrzCD defines a discrete step in the developmental program of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **180**:5765-5768.

**Gennity, J.M. e Inouye, M. (1991)** The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *J. Biochem Chem.* **266**:16458-16464.

**Gerth, K., Bedorf, N., Hofle, G., Irschik, H. y Reichenbach, H. (1996)** Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **49**:560-563.

**Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Hofle, G. y Reichenbach, H. (1994)** The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* **47**:23-31.

**Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. y Trowitzsch, W. (1982)** The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J. Antibiot.* **35**:1454-1459.

**Gerth, K. y Müller, R. (2005)** Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.* **7**:874-880.

**Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. y Muller, R. (2003)** Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and

future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* **106**:233-253.

**Gevers, D., Vandepoele, K., Simillon, C. y Van de Peer, Y. (2004)** Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **12**:148-154.

**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., Effose, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L. y Bally, R. (1993)** Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**:205-210.

**Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. y Nies D.H. (1999)** Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. *J. Biol. Chem.* **274**:26065-26070.

**Goldman, B., Bhat, S. y Shimkets, L.J. (2007)** Genome evolution and the emergence of fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *PLoS ONE* **26**:e1329.

**Goldman, B.S., Nierman, W.C., Kaiser, D., Slater, S.C., Durkin, A.S., Eisen, J.A., Ronning, C.M., Barbazuk, W.B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H.S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S.A., Vaudin, M., Wiegand, R. y Kaplan, H.B. (2006)** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15200-15205.

**Gómez Santos, N. (2009)** Análisis de la respuesta al cobre mediada por CuoB y CuoC. Caracterización del factor sigma de tipo ECF CorE. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada.

**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 antisigma factor CarR. *Mol. Microbiol.* **19**:171-186.

**Göt, P. y Boos, W. (1998)** The transmembrane topology of the *sn*-glycerol 3-phosphatase permease of *Escherichia coli* analysed by *phoA* and *lacZ* protein fusions. *Mol. Microbiol.* **2**:655-663.

**Gottesman, S. y Maurizi, M.R. (2001)** Cell biology. Surviving starvation. *Science* **293**:614-615.



## Bibliografía

**Goudreau, P.N., y Stock, A.M. (1998)** Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:160-169.

**Gräf, W. y Pelka, G. (1979)** Aquatic myxobacteria as indicators in the evaluation of drinking water quality. *Zentralbl. Bakteriol.* **169**:225-239.

**Grass, G. y Rensing, C. (2000)** Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145-2147.

**Grass, G. y Rensing, C. (2001).** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**: 902-908.

**Grass, G., Thakali, K., Klebba, P.E., Thieme, D., Muller, A., Wildner, G.F., y Rensing, C. (2004)** Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:5826-5833.

**Grebe, T.W. y Stock, J.B. (1999)** The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* **41**:139-227.

**Gronewold, T.M. y Kaiser, D. (2001)** The *act* operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **40**:744-756.

**Gronewold, T.M. y Kaiser, D. (2007)** Mutations of the *act* promoter in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **189**:1836-1844.

**Guo, D., Bowden, M.G., Pershad, R. y Kaplan, H.B. (1996)** The *Myxococcus xanthus* *rfaABC* operon encodes an ATP-binding cassette transports homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. *J. Bacteriol.* **178**:1631-1639.

**Gupta, S.D., Lee, B.T., Camakaris, J., y Wu, H.C (1995)** Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 4207-4215.

**Hagen, D.C., Bretscher, A.P. y Kaiser, D. (1978)** Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **64**:284-296.

**Hager, E., Tse, H. y Gill, R.E. (2001)** Identification and characterization of *spdR* mutations that bypass the BsgA protease-dependent regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **39**:765-780.

**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.

**Hanahan, D. (1983)** Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

- Hanson, C.W. y Dworkin, M. (1974)** Intracellular and extracellular nucleotides and related compounds during the development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **118**:486-496.
- Harris, B.Z., Kaiser, D. y Singer, M. (1998)** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **12**:1022-1035.
- Hartzell, P. y Kaiser, D. (1991a)** Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7615-7624.
- Hartzell, P. y Kaiser, D. (1991b)** Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7625-7635.
- Hartzell, P., Shi, W. y Youderian, P. (2008)** Gliding motility of *Myxococcus xanthus*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:103-122.
- Hayashi, S. y Wu, H.C. (1990)** Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:451-471.
- Hemphil, H.E. y Zahler, S.A. (1968)** Nutritional induction and suppression of fruiting in *Myxococcus xanthus* FBa. *J. Bacteriol.* **95**:1018-1023.
- Henrichsen, J. (1972)** Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* **36**:478-503.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Pérez, M.I., Revilla, E., Villar, J.C., Ball, A.S., Viikari, L. y Arias M.E. (2005)** Biomechanical pulping of spruce wood chips with *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 and handsheet characterization. *Holzforschung.* **59**:173-177.
- Hernández-Coronado, M.J., Hernández, M., Centenera, F., Pérez-Leblic, M.I., Ball, A.S. y Arias M.E. (1997)** Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation. *Microbiology-UK.* **143**:1359-1367.
- Hess, J.F., Bourret, R.B. y Simon, M.I. (1988)** Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* **336**: 139-143.
- Higgs, P.I., Jagadeesan, S., Mann, P. y Zusman, D.R. (2008)** EspA, an orphan hybrid histidine protein kinase, regulates the timing of expression of key developmental proteins of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:4416-4426.
- Hillesland, K.L., Lenski, R.E. y Velicer, G.J. (2007)** Ecological variables affecting predatory success in *Myxococcus xanthus*. *Microb. Ecol.* **53**:571-578.
- Hoch, J.A. (2000)** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:165-170.

**Hoch, J.A. y Silhavy, T.J. (eds.) (1995)** *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington D.C.

**Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1977)** Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:2938-2942.

**Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1979a)** Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**:167-176.

**Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1979b)** Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**:177-191.

**Hoiczky, E. y Baumeister, W. (1998)** The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **8**:1161-1168.

**Hoiczky, E., Ring, M.W., McHugh, C.A., Schwär, G., Bode, E., Krug, D., Altemeyer, M.O., Lu, J.Z. y Bode H.B. (2009)** Lipid body formation plays a central role in cell fate determination during developmental differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **74**:497-517.

**Hoskisson, P.A. y Hutchings, M.I. (2006)** MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends Microbiol.* **14**:444-449.

**Huffman, D.L. y O' Halloran, T.V. (2001)** Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:677-701.

**Huitema, E. y Viollier, P.H. (2006)** A myxobacterial S-motility protein dances with poles. *Trends Microbiol.* **14**:247-248.

**Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. y Martin-Verstraete, I. (2001)** CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**:5426-5430.

**Huston, W.M., Naylor, J., Cianciotto, N.P., Jennings, M.P. y McEwan, A.G. (2008)** Functional analysis of the multi-copper oxidase from *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* **10**:497-503.

**Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B. y Silhavy, T.J. (1989)** Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* **3**:1725-1734.

**Igoshin, O.A., Goldbeter, A., Kaiser, D. y Oster, G. (2004)** A biochemical oscillator explains several aspects of *Myxococcus xanthus* behavior during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15760-15765.

**Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, J.W. y Yamanaka, S. (2003)** *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains

dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:189-195.

**Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. y Yamanaka, S. (1998)** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:317-322.

**Inouye, S., Hsu, M.Y., Eagle, S. e Inouye, M. (1989)** Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell* **56**:709-717.

**Inouye, M., Inouye, S. y Zusman, D.R. (1979a)** Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: pattern of protein synthesis. *Dev. Biol.* **68**:579-591.

**Inouye, M., Inouye, S. y Zusman, D.R. (1979b)** Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:209-213.

**Jain, V., Kumar, M. y Chatterji, D. (2006)** ppGpp: stringent response and survival. *J. Microbiol.* **44**:1-10.

**Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M. y Sogaard-Andersen, L. (2008)** PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:2411-2421.

**Jelsbak, L. y Sogaard-Andersen, L. (2002)** Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:2032-2037.

**Joslin, S.N. y Hendrixson, D.R. (2008)** Analysis of the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator suggests integration of diverse mechanisms to activate an NtrC-like protein. *J. Bacteriol.* **190**:2422-2433.

**Julien, B., Kaiser, D. y Garza, A. (2000)** Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9098-9103.

**Kaiser, D. (2004)** Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:75-98.

**Kaiser, D. y Kroos, L. (1993)** Intercellular signaling. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:257-283.

**Kaiser, D. y Welch, R. (2004)** Dynamics of fruiting body morphogenesis. *J. Bacteriol.* **186**:919-927.

**Kalman, L.V., Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1994)** The *Myxococcus xanthus* *dsg* gene product performs functions of translation initiation factor IF3 *in vivo*. *J. Bacteriol.* **176**:1434-1442.

**Kaplan, H.B. (2003)** Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:572-577.

**Kaplan, H.B. y Plamann, L. (1996)** A *Myxococcus xanthus* cell density-sensing system required for multicellular development. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**:89-95.

**Karlin, S., Brocchieri, L., Mrazek, J. y Kaiser, D. (2006)** Distinguishing features of delta-proteobacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:11352-11357.

**Kashefi, K. y Hartzell, P.L. (1995)** Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF* defect. *Mol. Microbiol.* **15**:483-494.

**Kaufman, R.I. y Nixon, B.T. (1996)** Use of PCR to isolate genes encoding  $\sigma^{54}$ -dependent activators from diverse bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:3967-3970.

**Kearns, D.B., Bonner, P.J., Smith, D.R. y Shimkets, L.J. (2002)** An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **184**:1678-1684.

**Kearns, D.B. y Shimkets, L.J. (1998)** Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11957-11962.

**Kearns, D.B. y Shimkets, L.J. (2001)** Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol.* **9**:126-129.

**Keseler, I.M. y Kaiser, D. (1995)** An early A-signal-dependent gene in *Myxococcus xanthus* has a sigma 54-like promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4638-4644.

**Khorchid, A. e Ikura, M. (2006)** Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**:307-312.

**Kim, D. y Forst, S. (2001)** Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**:1197-1212.

**Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990a)** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Cell* **61**:19-26.

**Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990b)** Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* **249**:926-928.

**Kim, S.K. y Kaiser, D. (1991)** C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* **173**:1722-1728.

**Kim, J. S., Kim, M. H., Joe, M. H., Song, S. S., Lee, I. S., y Choi, S. Y. (2002)** The *sctR* of *Salmonella enterica* serova Typhimurium encoding a homologue of MerR protein is involved in the copper-responsive regulation of *cuiD*. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 99-103.

**Kiskowski, M.A., Jiang, Y. y Alber, M.S. (2004)** Role of streams in myxobacteria aggregate formation. *Phys. Biol.* **1**:173-183.

**Komano, T., Inouye, S. e Inouye, M. (1980)** Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide and phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* **144**:1076-1081.

**Konstantinidis, K.T. y Tiedje, J.M. (2004)** Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3160-3165.

**Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M. y Brown, J.R. (2000)** Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17**:1956-1970.

**Kroos, L., Hartzell, P., Stephens, K. y Kaiser, D. (1988)** A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes Dev.* **2**:1677-1685.

**Kroos, L. y Kaiser, D. (1984)** Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5816-5820.

**Kroos, L. y Kaiser, D. (1987)** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev.* **1**:840-854.

**Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1986)** A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**:252-266.

**Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1990)** Defects in fruiting body development caused by Tn5 *lac* insertions in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **172**:484-487.

**Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G.J. y Müller, R. (2008)** Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3058-3068.

**Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N.M.S. y Søgaard-Andersen, L. (2001)** C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **40**:156-168.

**Kuspa, A., Kroos, L. y Kaiser, D. (1986)** Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**:267-276.

**Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992a)** Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3319-3326.

**Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992b)** A-Signaling and cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **174**:7360-7369.

**Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. (1989)** Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**:367-376.

- Lampky, J.R. (1971)** Distribution of *Sorangium cellulosum*. *Appl. Microbiol.* **22**:937-938.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. y Kaiser, D. (1983)** Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *J. Bacteriol.* **153**:1394-1404.
- 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, J., Owens, J.T., Hwang, I., Meares, C. y Kustu. S. (2000)** Phosphorylation-induced signal propagation in the response regulator NtrC. *J. Bacteriol.* **182**:5188-5195.
- Lee, K. y Shimkets, L.J. (1994)** Cloning and characterization of the *socA* locus which restores development to *Myxococcus xanthus* C-signaling mutants. *J. Bacteriol.* **176**:2200-2209.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C. y Nies, D.H. (2003)** Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J. Bacteriol.* **185**:4354-4361.
- Leonardy, S., Freymark, G., Hebener, S., Ellehauge, E. y 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.
- Leonhartsberger, S., Huber, A., Lottspeich, F. y Böck. A. (2001)** The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* **307**:93-105.
- Li, S.F., Lee, B.U. y Shimkets, L.J. (1992)** *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev.* **6**:401-410.
- Li, Y., Bustamante, V.H., Lux, R., Zusman, D.R. y Shi, W. (2005a)** Divergent regulatory pathways control A and S motility in *Myxococcus xanthus* through FrzE, a CheA-CheY fusion protein. *J. Bacteriol.* **187**:1716-1723.
- Li, Y., Lux, R., Pelling, A. E., Gimzewski, J.K. y Shi, W (2005b)** Analysis of type IV pilus and its associated motility in *Myxococcus xanthus* using an antibody reactive with native pilin and pili. *Microbiology* **151**:353-360.
- Li, Y. y Plamann, L. (1996)** Purification and *in vitro* phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. *J. Bacteriol.* **178**:289-292.
- Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D. y Shi, W. (2003)** Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5443-5448.

- Licking, E., Gorski, L. y Kaiser, D. (2000)** A common step for changing cell shape in fruiting body and starvation-independent sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **182**:3553-3558.
- Liu, T., Reyes-Caballero, H., Li, C., Scout, R.A. y Giedroc, D.P. (2007)** Multiple metal binding domains enhance the Zn(II) selectivity of the divalent metal ion transporter AztA. *Biochemistry* **46**:11057-11068.
- Llamas, M.A., Rodríguez-Herva, J.J., Hancock, R.E., Bitter, W., Tommassen, J. y Ramos, J.L. (2003)** Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **185**:4707-4716.
- Lobedanz, S. y Søgaard-Andersen, L. (2003)** Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **17**:2151-2161.
- López-Rubio, J.J., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S. y Murillo, F.J. (2002)** A repressor-antirepressor pair links two loci controlling light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* **277**:2762-2770.
- López-Rubio, J.J., Padmanabhan, S., Lázaro, J.M., Salas, M., Murillo, F.J. y Elías-Arnanz, M. (2004)** Operator design and mechanism for CarA repressor-mediated down-regulation of the photoinducible *carB* operon in *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* **277**:2762-2770.
- Lu, A., Cho, K., Black, W.P., Duan, X.Y., Lux, R., Yang, Z., Kaplan, H.B., Zusman, D.R. y Shi, W. (2005)** Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **55**:206-220.
- Lukat, G.S, McCleary, W.R., Stock, A.M. y Stock, J.B. (1992)** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:718-722.
- Lynch, M. y Conery, J.S. (2003)** The origins of genome complexity. *Science* **302**:1401-1404.
- Mahmud, T., Bode, H.B., Silakowski, B., Kroppenstedt, R.M., Xu, M., Nordhoff, S., Hofle, G. y Muller, R. (2002)** A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J. Biol. Chem.* **277**:32768-32774.
- Magnani, D., Barré, O., Gerber, S.D. y Solioz, M. (2008)** Characterization of the CopR regulon of *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* **190**:536-545.
- Magnani, D. y Solioz, M. (2005)** Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the *cop* operon of *Enterococcus hirae*. *Biomaterials*. **18**:407-412.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. y Nakata, A. (1989)** Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* **210**:551-559.



**Manoil, C. y Kaiser, D. (1980a)** Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* **141**:297-304.

**Manoil, C. y Kaiser, D. (1980b)** Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* **141**:305-315.

**Martínez-Argudo, I., Ruiz-Vázquez, 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.

**Martínez-Laborda, A., Balsalobre, J.M., Fontes, M. y Murillo, F.J. (1990)** Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **223**:107-114.

**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., Helmann, J.D. y Uden, G. (2006)** Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:910-938.

**Matsubara, M. y Mizuno, T. (2000)** The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **470**:118-124.

**Mattie, M.D. y Freedman, J. H. (2001)** Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-tocopherol) against copper and cadmium-induced toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 921-925.

**Mauriello, E.M.F., Nan, B. y Zusman, D.R. (2009)** AglZ regulates adventurous (A-) motility in *Myxococcus xanthus* through its interaction with the cytoplasmic receptor, FrzCD. *Mol. Microbiol.* **72**: 964-977.

**Mauriello, E.M. y Zusman, D.R. (2007)** Polarity of motility systems in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:624-629.

**Mayer, A.M. y Staples, R.C. (2002)** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565.

**McCleary, W.R., Esmon, B. y Zusman, D.R. (1991)** *Myxococcus xanthus* protein C is a major spore surface protein. *J. Bacteriol.* **173**:2141-2145.

**Meiser, P., Bode, H.B. y Müller, R. (2006)** The unique Dkxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:19128-19133.

- Mettke, I., Fiedler, U. y Weiss, V. (1995)** Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5056-5061.
- Mignot, T., Merlie, J.P. y Zusman, D.R. (2005)** Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science* **310**:855-857.
- Mignot, T., Merlie, J.P. Jr. y Zusman, D.R. (2007a)** Two localization motifs mediate polar residence of FrzS during cell movement and reversals of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **65**:363-372.
- Mignot, T., Shaevitz, J.W., Hartzell, P.L. y Zusman, D.R. (2007b)** 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.
- Mizuno, T. (1997)** Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducer in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**:161-168.
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén, F., Moya, R., Hernández, M. y Arias, M.E. (2009)** Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int. Microbiol.* **12**:13-21.
- Moore, C. M., Gaballa, A., Hui, M., Ye, R. W. y Helmann, J. D. (2005)** Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Mol. Microbiol.* **57**:27-40.
- 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.
- Moreno, A.J., Fontes, M. y Murillo, F.J. (2001)** *ihfA* gene of the bacterium *Myxococcus xanthus* and its role in activation of carotenoid genes by blue light. *J. Bacteriol.* **183**:557-569.
- Morrison, T.B. y Parkinson, J.S. (1997)** A fragment liberated from the *Escherichia coli* CheA kinase that blocks stimulatory, but no inhibitory, chemoreceptor signaling. *J. Bacteriol.* **179**:5543-5550.
- 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.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W. y O'Halloran, T.V. (2000)** Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**:5864-5871.

**Nakamura, K. y Go, N. (2005)** Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *CMLS Cell. Mol. Life. Sci.* Review article 1-17.

**Nariya, H. e Inouye, S. (2005)** Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **58**:367-379.

**Nariya, H. e Inouye, S. (2006)** A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **60**:1205-1217.

**Nariya, H. e Inouye, M. (2008)** MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**:55-66.

**Nicolás, F.J., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1994)** A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **8**:2375-2387.

**Nicolás, F.J., Cayuela, M.L., Martínez-Argudo, I.M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1996)** High mobility group I(Y)-like DNA binding domains on a bacterial transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6881-6885.

**Ninfa, A.J. y Bennett, R.L. (1991)** Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. *J. Biol. Chem.* **266**: 6888-6893.

**Nudleman, E., Wall, D. y Kaiser, D. (2005)** Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science* **309**:125-127.

**Nudleman, E., Wall, D. y Kaiser, D. (2006)** Polar assembly of the type IV pilus secretin in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **60**:16-29.

**O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1991)** Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:3342-3355.

**O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1997)** Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for  $\beta$ -lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Mol. Microbiol.* **24**:839-850.

**O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1999)** Induction of beta-lactamase influences the course of development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**:6319-6331.

**O'Halloran, T.V. y Culotta, V.C. (2000)** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* **275**:25057-25060.

**Ogawa, M., Fujitani, S., Mao, X., Inouye, S. y Komano, T. (1996)** FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **22**:757-767.

- Osman, D. y Cavet, J.S. (2008)** Copper homeostasis in bacteria. *Advances in Applied Microbiology* **65**:217-247.
- Ossola, J.O., Groppa, M.D. y Tomaro, M.L. (1997)** Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**:332-337.
- Otani, M., Inouye, M. e Inouye, S. (1995)** Germination of myxospores from the fruiting bodies of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**:4261-4265.
- Otani, M., Kozaku, S., Xu, C., Umezawa, C., Sano, K. e Inouye, S. (1998)** Protein W, a spore-specific protein in *Myxococcus xanthus*, formation of a large electron-dense particle in a spore. *Mol. Microbiol.* **30**:57-66.
- Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A. y O'Halloran, T.V. (2001)** The independent *cue y cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**:30670-30677.
- Outten, F.W., Outten, C.E. y O'Halloran, T.V. (2000a)** Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. En: *Bacterial Stress Responses*. Ed: Storz, G. y Hengge-Aronis, R. ASM, Press. Washington D.C., pp 145-157.
- Outten, F.W., Outten, C.E., Hale, J. y O'Halloran, T.V. (2000b)** Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR Homologue, CueR. *J. Biol. Chem.* **275**:31024-31029.
- Padmanabhan, S., Elias-Arnanz, M., Carpio, E., Aparicio, P. y Murillo, F.J. (2001)** Domain architecture of a high mobility group A-type bacterial transcriptional factor. *J. Biol. Chem.* **276**:41566-41575.
- Parkinson, J.S. (1995)** Genetics approaches for signaling pathways and proteins. En: Two-component signal transduction (Hoch, J.A y Silhavy, T.J., eds.), American Society for Microbiology Press, Washington D.C., pp: 9-24.
- Parkinson, J.S. y Kofoid, E.C. (1992)** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**:71-112.
- Partridge, J.D., Sanguinetti, G., Dibden, D., Roberts, R.E., Poole, R.K. y Green, J. (2007)** Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *J. Biol. Chem.* **282**:11230-11237.
- Pelling, A.E., Li, Y., Shi, W. y Gimzewski, J.K. (2005)** Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:6484-6489.
- Pennella, M.A. y Giedroc, D.P. (2005)** Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals* **18**:413-428.

**Pennella, M.A., Shokes, J.E., Cospers, N.J., Scott, R.A. y Giedroc, D.P. (2003)** Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:3713-3718.

**Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R. y Muñoz-Dorado, J. (2008)** Eukaryotic-like protein kinases in prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:15950-15955.

**Pérez, J. y Moraleda-Muñoz, A. (2009)** Fungal lignocellulosic enzymes: applications in biodegradation and bioconversion. En: *Mycofactories*. Ed: Bentham Science Publishers. En prensa.

**Pérez-Marín, M.C., López-Rubio, J.J., Murillo, F.J., Elías-Arnanz, M. y Padmanabhan, S. (2004)** The N-terminus of *M. xanthus* CarA repressor is an autonomously folding domain that mediates physical and functional interactions with both operator DNA and antirepressor protein. *J. Biol. Chem.* **279**:33093-33103.

**Perraud, A.L., Weiss, V. y Gross, R. (1999)** Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Genet.* **15**:15-19.

**Petersen, C., y Moller, L. B. (2000)** Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene* **261**: 289.

**Pham, V.D., Shebelut, C.W., Zumstein, E.J. y Singer, M. (2005)** BrgE is regulator of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **151**:1865-1874.

**Plamann, L., Davis, J.L., Cantwell, B. y Mayor, J. (1994)** Evidences that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:2013-2020.

**Plamann, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1992)** Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3311-3318.

**Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. y Mayor, J. (1995)** The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* **177**:2014-2020.

**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.

**Radford, D.S., Kihlken, M.A., Borrelly, G.P.M., Harwood, C.R., Brun, N.E., y Cavet, J.S. (2003)** CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**:105-112.

**Rappas, M., Bose, D. y Zhang, X. (2007)** Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking  $\sigma^{54}$ -dependent gene transcription. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**:110-116.

- Rasmussen, A.A., Porter, S.L., Armitage, J.P. y Sogaard-Andersen, L. (2005)** Coupling of multicellular morphogenesis and cellular differentiation by an unusual hybrid histidine protein kinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **56**:1358-1372.
- Rasmussen, A.A., Wegener-Feldbrugge, S., Porter, S.L., Armitage, J.P. y Sogaard-Andersen, L. (2006)** Four signalling domains in the hybrid histidine protein kinase RodK of *Myxococcus xanthus* are required for activity. *Mol. Microbiol.* **60**:525-534.
- Reichenbach, H. (1993)** Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy. En *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:13-62.
- Reichenbach, H. (1999)** The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1**:15-21.
- Reichenbach, H. (2005)** *Myxococcales*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª edición. pp:1059-1144.
- Reichenbach, H. y Dworkin, M. (1991)** The myxobacteria. En: *The Prokaryotes*. Springer, New York. pp:3415-3487.
- Reichenbach, H. y Dworkin, M. (1992)** The myxobacteria. En: *The Prokaryotes (2ª edición) A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer-Verlag, New York. pp:3416-3487.
- Reichenbach, H. y Höfle, G. (1993)** Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol. Adv.* **11**:219-277.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., y Rosen, B. (2000)** CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 652-656.
- Rensing, C. y Grass, G. (2003)** *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:197-213.
- Rhie, H.G. y Shimkets, L.J. (1989)** Developmental bypass suppression of *Myxococcus xanthus* *csaA* mutations. *J. Bacteriol.* **171**:3268-3276.
- Ridge, J.P., Lin, M., Larsen, E.I., Fegan, M., McEwan, A.G., y Sly, L.I. (2007)** A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environ. Microbiol.* **9**:944-953.
- Roberts, D.L., Bennett, D.W. y Forst, S.A. (1993)** Identification of the site of phosphorylation on the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 8728-8733.
- 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.

## Bibliografía

**Rodríguez, A.M. y Spormann, A.M. (1999)** Genetic and molecular analysis of *cglB*, a gene essential for single-cell gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**:4381-4390.

**Rodríguez-Soto, J.P. y Kaiser, D. (1997)** The *tgl* gene: social motility and stimulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **179**:4361-4371.

**Rogers, S.D., Bhawe, M.R., Mercer, J.F., Camakaris, J., y Lee, B.T. (1991)** Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:6742-6748.

**Rosenberg, E., Keller, K.H. y Dworkin, M. (1977)** Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriol.* **129**:770-777.

**Rosenbluh, A. y Rosenberg, E. (1989a)** Autocide AMI rescues development in *dsg* mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **171**:1513-1518.

**Rosenbluh, A. y Rosenberg, E. (1989b)** Sporulation of *Myxococcus xanthus* in liquid shake flask cultures. *J. Bacteriol.* **171**:4521-4524.

**Rouch, D., Camakaris, J. y Lee, B.T.O. (1989)** Copper transport in *Escherichia coli*. En: Metal Ion Homeostasis; Molecular Biology and Chemistry. Ed: Hamer, D. H., y Winge, D. R. Alan R. Liss, Nueva York., pp 469-477.

**Ruiz-Vázquez, R.M., Fontes, M. y Murillo, F.J. (1993)** Clustering and co-ordinated activation of carotenoid genes in *Myxococcus xanthus* by blue light. *Mol. Microbiol.* **10**:25-34.

**Sager, B. y Kaiser, D. (1993)** Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **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)** Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Record* **7**:220-229.

**Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001)** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sánchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernandez, E., García-Borrón, J.C., y Solano, F. (2001)** Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**: 104-116.

**Sánchez-Pérez, G., Mira, A., Nyiró, G., Pasic, L. y Rodríguez-Valera F. (2008)** Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends Genet.* **24**:154-158.

- Sánchez-Sutil, M.C., Gómez-Santos, N., Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J. (2007)** Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **189**:4887-4898.
- Sanford, R.A., Cole, J.R. y Tiedje, J.M. (2002)** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:893-900.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulsson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain terminators inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, D., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M.O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., Bode, H.B., Bolten, C.J., Choudhuri, J.V., Doss, S., Elnakady, Y.A., Frank, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Groeger, C., Gross, F., Jelsbak, Kalinowski, J., Kegler, C., Knauber, T., Konietzny, S., Kopp, M., Krause, L., Krug, D., Linke, B., Mahmud, T., Martínez-Arias, R., McHardy, A.C., Merai, M., Meyer, F., Mormann, S., Muñoz-Dorado, J., Pérez, J., Pradella, S., Rachid, S., Raddatz, G., Rosenau, F., Rückert, C., Sasse, F., Scharfe, M., Schuster, S.C., Suen, G., Treuner-Lange, A., Velicer, G.J., Vorhölter, F.J., Weissman, K.J., Welch, R.D., Wenzel, S.C., Whitworth, D.E., Wilhelm, S., Wittmann, C., Blöcker, H., Pühler, A. y Müller, R. (2007)** Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**:1281-1289.
- Schuster, M., Silversmith, R.E. y Bourret, R.B. (2001)** Conformational coupling in the chemotaxis response regulator CheY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:6003-6008.
- Scott, A.E., Simon, E., Park, S.K., Andrews, P. y Zusman, D.R. (2008)** Site-specific receptor methylation of FrzCD in *Myxococcus xanthus* is controlled by a tetra-trico peptide repeat (TPR) containing regulatory domain of the FrzF methyltransferase. *Mol. Microbiol.* **69**:724-735.
- Seydel, A., Gounon, P. y Pugsley, A.P. (1999)** Testing the “+2 rule” for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol. Microbiol.* **34**:810-821.
- Shi, W., Kohler, T. y Zusman, D.R. (1993)** Chemotaxis plays a role in the social behavior of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **9**:601-611.
- Shi, W., Kohler, T. y Zusman, D.R. (1994)** Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. En: *Molecular Microbiology Techniques*. Academic Press, San Diego. pp:258-269.
- Shi, 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.
- Shi, X., Wegener-Feldbrügge, S., Huntley, S., Hamann, N., Hedderich, R. y Søgaard-Andersen, L. (2008)** Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:613-624.



- Shimkets, L.J. (1993)** The myxobacterial genome. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:85-107.
- Shimkets, L.J. (1999)** Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:525-549.
- Shimkets, L.J. y Asher, S.J. (1988)** Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:63-71.
- Shimkets, L.J. y Dworkin, M. (1981)** Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **84**:51-60.
- Shimkets, L.J. y Dworkin, M. (1997)** Myxobacterial multicellularity. En: *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press, New York. pp:220-244.
- Shimkets, L.J. y Rafiee, H. (1990)** CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **172**:5299-5306.
- Shimkets, L.J., Reichenbach, H. y Dworkin, M. (2005)** The Myxobacteria. En: *The Prokaryotes*, 3<sup>a</sup> ed. Springer, New York. pp:31-115
- Singer, M. y Kaiser, D. (1995)** Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early development 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.
- Sitthisak, S., Howieson, K., Amezola, C. y Jayaswal, R.K. (2005)** Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5650-5653.
- Sliusarenko, O., Neu, J., Zusman, D.R. y Oster, G. (2006)** Accordion waves in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:1534-1539.
- Sliusarenko, O., Zusman, D.R. y Oster, G. (2007)** The motors powering A-motility in *Myxococcus xanthus* are distributed along the cell body. *J. Bacteriol.* **189**:7920-7921.
- Smaldone, G.T. y Helmann, J.D. (2007)** CsoR regulates the copper efflux operon *copZA* in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **153**:4123-4128.
- Søgaard-Andersen, L. (2004)** Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:587-593.
- Søgaard-Andersen, L. y Kaiser, D. (1996)** C-factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmatic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2675-2679.
- Solioz, M. y Stoyanov, J. V. (2003)** Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:183-195.

- Solomon, E.I., Augustine, A.J. y Yoon, J. (2008)** O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.* **30**:3921-3932.
- Solomon, E.I., 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.
- Sozinova, O., Jiang, Y., Kaiser, D. y Alber, M. (2005)** A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:11308-11312.
- Sozinova, O., Jiang, Y., Kaiser, D. y Alber, M. (2006)** A three-dimensional model of myxobacterial fruiting-body formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:17255-17259.
- Spormann, A.M. y Kaiser, D. (1995)** Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**:5846-5852.
- Spormann, A.M. y Kaiser, D. (1999)** Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequency and small displacements. *J. Bacteriol.* **181**:2593-2601.
- Stephens, K., Hartzell, P. y Kaiser, D. (1989)** Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products. *J. Bacteriol.* **171**:819-830.
- Stephens, K. y Kaiser, D. (1987)** Genetic of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: molecular cloning of the *mgl* locus. *Mol. Gen. Genet.* **207**:256-266.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989)** Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450-490.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. y Goudreau, P.N. (2000)** Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183-215.
- Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M. y Park, P. (1995)** Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanism of catalysis. En: *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington D.C. pp:25-51.
- Strom, M.S. y Lory, S.H. (1993)** Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol.* **47**:565-96.
- Sun, H. y Shi, W. (2001a)** Analyses of *mrp* genes during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **183**:6733-6739.
- Sun, H., y Shi, W. (2001b)** Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**:4786-4795.
- Studholme, D.J. y Dixon, R. (2003)** Domain architectures of  $\sigma^{54}$ -dependent transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **185**:1757-1767.

**Swanson, R.V., Bourret, R.B. y Simon, M.I. (1993)** Intramolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol. Microbiol.* **8**:435-441.

**Teintze, M., Thomas, R., Furuichi, T., Inouye, M. e Inouye, S. (1985)** Two homologous genes coding for spore-specific proteins are expressed at different times during development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**:121.

**Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M., y Parsek, M.R. (2006)** Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:7242-7256.

**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.

**Thomas, S.H., Wagner, R.D., Arakaki, A.K., Skolnick, J., Kirby, J.R., Shimkets, L.J., Sanford, R.A. y Löffler, F.E. (2008)** The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *PLoS ONE* **7**:e2103.

**Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A.G., Burke, N., Plamann, L. y Hartzell, P.L. (2002)** MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **46**:1399-1413.

**Thöny-Meyer, L. y Kaiser, D. (1993)** *devRS*, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **175**:7450-7462.

**Thurston, C.F. (1994)** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* **140**:19-26.

**Toal, D.R., Clifton, S.W., Roe, B.R. y Downard, J. (1995)** The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes de E1 $\alpha$  and E1 $\beta$  subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **16**:177-189.

**Torres, A.S., Petri, V., Rae, T.D., y O'Halloran, T.V. (2001)** Copper stabilizes a heterodimer of the yCCS metallochaperone and its target superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **276**:38410-38416.

**Tottey, S., Rondet, S.A.M., Borrelly, G.P.M., Robinson, P.J., Rich, P.R., y Robinson, N.J. (2002)** A copper metallochaperone for photosynthesis and respiration reveals metal-specific targets, interaction with an importer, and alternative sites for copper acquisition. *J. Biol. Chem.* **277**:5490-5497.

**Tropel, D. y van der Meer, J.R. (2004)** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:474-500.

- Tse, H. y Gill, R.E. (2002)** Bypass of A- and B-signaling requirements for *Myxococcus xanthus* development by mutations in *spdR*. *J. Bacteriol.* **184**:1455-1457.
- Turnlund, J.R. (1999)** Copper. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Ed: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Tzeng, L., Ellis, T.N. y Singer, M. (2006)** DNA replication during aggregation phase is essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **188**:2774-2779.
- Tzeng, L. y Singer, M. (2005)** DNA replication during sporulation in *Myxococcus xanthus* fruiting bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:14428-14433.
- Uauy, R., Olivares, M., Gonzalez, M. (1998)** Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:952S-959S.
- Ueki, T. e Inouye, S. (2002)** Transcriptional activation of a heat-shock gene, *lonD*, of *Myxococcus xanthus* by a two component histidine-aspartate phosphorelay system. *J. Biol. Chem.* **277**:6170-6177.
- Ueki, T. e Inouye, S. (2003)** Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8782-8787.
- Ueki, T. e Inouye, S. (2006)** A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**:21-9.
- Viswanathan, P., Singer, M. y Kroos, L. (2006)** Role of sigmaD in regulating genes and signals during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **188**:3246-3256.
- Voloudakis, A.E., Reignier, T.M. y Cooksey, D.A. (2005)** Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:782-789.
- Wall, D., Kolenbrander, P.E. y Kaiser, D. (1999)** The *Myxococcus xanthus pilQ* (*sglA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility, and development. *J. Bacteriol.* **181**:24-33.
- Ware, J.C. y Dworkin, M. (1973)** Fatty acids of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **115**:253-261.
- Watson, B.F. y Dworkin, M. (1968)** Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **96**:1465-1473.
- West, A.H. y Stock, A.M. (2001)** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**:369-376.
- White, D. (1993)** Myxospore and fruiting body morphogenesis. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:307-332.

**Whitworth, D.E. (2008)** Myxobacteria: Multicellularity and differentiation. ASM Press, Washington, D.C.

**Whitworth, D.E., y Hodgson, D.A. (2001)** Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: evidence that CarS act as an anti-repressor of CarA. *Mol. Microbiol.* **42**:809-819.

**Wiethaus, J., Wildner, G. y Masepohl, B. (2006)** The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**:67-74.

**Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K. y Buck, M. (2008)** *Modus operandi* of the bacterial RNA polymerase containing the  $\sigma^{54}$  promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.* **68**:538-546.

**Wireman, J.W. y Dworkin, M. (1975)** Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science* **189**:516-523.

**Wolanin, P.M., Thomason, P.A. y Stock, J.B. (2002)** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**:reviews3013.

**Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D. y Oster, G. (2002)** How myxobacteria glide. *Curr. Biol.* **12**:369-377.

**Wu, S.S. y Kaiser, D. (1995)** Genetic and functional evidence that type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:547-558.

**Wu, S.S., Wu, J., Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1998)** The *pilH* gene encodes an ABC transporter homologue required for type IV pilus biogenesis and social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **29**:1249-1261.

**Wu, S.S., Wu, J. y Kaiser, D. (1997)** The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol. Microbiol.* **23**:109-121.

**Xu, Q., Black, W.P., Cadieux, C.L. y Yang, Z. (2008)** Independence and interdependence of Dif and Frz chemosensory pathways in *Myxococcus xanthus* chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **69**:714-723.

**Xu, D., Yang, C. y Kaplan, H.B. (1998)** *Myxococcus xanthus sasN* encodes a regulator that prevents developmental gene expression during growth. *J. Bacteriol.* **180**:6215-6223.

**Xue, Y., Davis, A.V., Balakrishnan, G., Stasser, J.P., Staehlin, B.M., Focia, P., Spiro, T.G., Penner-Hahn, J.E. y O'Halloran, T.V. (2008)** Cu(I) recognition via cation-[pi] and methionine interactions in CusF. *Nat. Chem. Biol.* **4**:107-109.

**Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H.B. y Shi, W. (1998)** A new set of chemotaxis homologs is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **30**:1123-1130.

**Yang, C. y Kaplan, H.B. (1997)** *Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression. *J. Bacteriol.* **179**:7759-7767.

**Yang, Z., Ma, X., Tong, L., Kaplan, H.B., Shimkets, L.J. y Shi, W. (2000)** *Myxococcus xanthus dif* genes are required for biogenesis of cell surface fibrils essential for social gliding motility. *J. Bacteriol.* **182**:5793-5798.

**Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

**Youderian, P., Burke, N., White, D.J. y Hartzell, P.L. (2003)** Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol. Microbiol.* **49**:555-570.

**Youderian, P. y Hartzell, P.L. (2006)** Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics* **172**:1397-1410.

**Yu, R. y Kaiser, D. (2007)** Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol. Microbiol.* **63**:454-467.

**Zhang, H., Dong, H., Zhao, J., Hu, W. y Li, Y.Z. (2005a)** Characterization of developmental autolysis in myxobacterial fruiting body morphogenesis with profiling of amino acids using capillary electrophoresis method. *Amino Acids* **28**:319-325.

**Zhang, X.X. y Rainey P.B. (2007)** The role of a P1-type ATPase from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in copper homeostasis and plant colonization. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**:581-588.

**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. (2005b)** Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3331-3336.

**Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. e Inouye, M. (2000)** Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7808-7813.

## *Bibliografía*