

Estudio sobre genes parálogos que codifican proteínas quinasa de tipo eucariota en *Myxococcus xanthus*

Elena García Bravo
TESIS DOCTORAL

Granada, 2015



UGR

Universidad
de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis doctorales

Autora: Elena García Bravo

ISBN: 978-84-8125-559-8

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42792>



Universidad de Granada
Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

Estudios sobre genes parálogos que codifican
proteínas quinasa de tipo eucariota en
Myxococcus xanthus

Memoria presentada por la Licenciada Elena García Bravo para optar al
Grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Elena García Bravo
Granada, 25 de junio de 2015



Universidad de Granada
Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

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, Juana Pérez Torres y Aurelio Moraleda Muñoz.

Fdo.: Jose Muñoz Dorado

Fdo.: Juana Pérez Torres

Fdo.: Aurelio Moraleda Muñoz

La doctoranda **Elena García Bravo** y los directores de la tesis, el Dr. **José Muñoz Dorado**, la Dra. **Juana Pérez Torres** y el Dr. **Aurelio Moraleda Muñoz**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 25 de junio de 2015

Directores de la tesis:

Fdo.: Jose Muñoz Dorado

Fdo.: Juana Pérez Torres

Fdo.: Aurelio Moraleda Muñoz

Doctoranda:

Fdo.: Elena García Bravo

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a la concesión de una beca-contrato de Formación de Profesorado Universitario (FPU) otorgada por la Universidad de Granada, así como de la concesión de una Estancia Breve en el Instituto Helmholtz de la Universidad de Saarland (Alemania) financiada por la Universidad de Granada, el proyecto BFU2012-40184-C02-02 y el proyecto Consolider-Ingenio 2010. La investigación llevada a cabo ha sido financiada por el proyecto BFU2012-40184-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad y el proyecto Consolider-Ingenio 2010 (CSD2009-00006) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Agradecimientos

Hace ya más de una década que inicié la licenciatura de Biología, y la cursé en los cinco años reglamentarios a tal velocidad que no pude ni frenar antes de verme envuelta en el *fregao* que supone hacer un Doctorado.

Mis inicios en la investigación comenzaron con mucha ilusión, pero terminar esta tesis ha sido para mí la tarea más difícil a la que me he enfrentado. Después de trabajar y aprender mucho, pero también de luchar contra el desánimo y la procrastinación, tenéis este libro en vuestras manos. Hoy puedo decir que estoy muy feliz por todo lo que he aprendido por el camino, sobre todo en el aspecto personal, y no son pocas las personas a las que tengo que agradecer el haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, debo agradecer la labor de supervisión llevada a cabo por mis directores, Jose, Juani y Aurelio. Sin su guía y su experiencia como científicos esta tesis no habría sido posible realizarla. Siempre le agradeceré a Juani su apoyo en los últimos meses, por no dejar de involucrarse y darme ese voto de confianza que me ha hecho llegar hasta el final.

Me siento especialmente agradecida con Aurelio, ya que además de mi supervisor ha sido un gran compañero de laboratorio. Gracias por tu infinita paciencia y amabilidad, y por soportar el caos que llevamos todos al laboratorio. Gracias por ayudarme tanto a mí y a todos en general.

Quiero dar las gracias también a todos mis compañeros y amigos de laboratorio, tanto los que están ahora como aquellos que un día lo estuvieron. Ha sido un enorme placer trabajar codo con codo. Gracias por compartir conmigo confidencias, risas, llantos y deliciosas comidas, dentro y fuera del laboratorio. Gracias a Nuria, Mariceles, Marina, Cisco, Carmen, María y demás *niños*. . . a todos!!!! No pretendo olvidarme de los compis de la segunda planta y del sótano, que aunque nos hayamos visto poco en los últimos años, nos juntamos siempre para lo importante.

También quiero dar las gracias al resto de miembros del departamento, por su cercanía y por haberme prestado su ayuda siempre que lo he necesitado. Gracias, también, a todos mis alumnos de grado, que tan comprensivos se mostraban conmigo, y a sus ganas de aprender.

Gracias, de nuevo, a Cisco y Carmen, por mantener su amistad conmigo y por llevarla más allá de las fronteras de este país. Mil gracias, Cisco, por compartir conmigo tu humor ácido, por ser mi cómplice, y por tu refinado gusto gastronómico y cinematográfico. Mil gracias, Carmen, por el apoyo que me has mostrado, por tener siempre historias surrealistas que contar, y por ser nuestra madrecita y salvarnos de nuestra propia inmadurez.

Gracias a mis compañeros del grupo del Profesor Rolf Müller: al propio Rolf por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, a Carsten por sus ideas y su buen rollo, a Jenni por su impagable ayuda, a Ram por su alegría incombustible, a Hilda por su cercanía, a Ronald por su amabilidad y paciencia, a todos en general por ser tan amables... y en especial a Philipp, que se ganó mi amistad desde el primer minuto, y al que nunca podré agradecerle lo suficiente todo lo que hizo por mí en Alemania.

Gracias al resto de amigos que han estado presentes en estos años. A los que me ayudaron a conseguir la beca predoctoral en el último momento después de una tarde de tapeo y casualidades; a los amigos de Linares y a los compañeros de carrera que veo años después y parece que no pasa el tiempo; a todos mis amigos astrofísicos y físicos en general, que me aceptaron como uno más de la manada a pesar de ser *la bióloga*, con los que tan memorables ratos he pasado y espero pasar, y de los que aprendo tanto. Mención especial merece Simon, que me ~~in~~animó a aprender L^AT_EX y me prestó amablemente su propia plantilla y su tiempo para ayudarme a escribir esta memoria.

Gracias, ¡cómo no!, al servicio de comedores de la UGR, a esos magníficos cocineros que preparan tan deliciosa comida casera día tras día, y que la sirven con tanta alegría a pesar de todo. Os amamos.

Gracias a mis compis de *Baila Swing Fin* y *Graná Swing*, cada tema bailado con vosotros ha sido una rayita más de carga en mi batería. No podría haber sobrevivido a la tesis sin vuestro *bounce*.

Y gracias, en general, a familia y amigos que han estado a mi lado durante estos años, aunque no nos hayamos visto. A los que me aprecian, y a los que disculparon mis meteduras de pata y supieron valorar mi esfuerzo.

Si me preguntan cuál es el mayor descubrimiento que he hecho durante esta tesis doctoral, tendré que decir que eres tú, Rubén. Gracias por cuidarme, por ayudarme a valorar lo que hago y a quedarme con lo que merece la pena. Me quedo con lo mejor, me quedo contigo.

Por último, quiero dar mil gracias a mis padres por confiar siempre en mis capacidades, y por ayudarme en todo lo posible y más. Gracias a mi madre, por enseñarme a hacer las cosas que me gustan y a no complicarme la vida; gracias a mi padre, por transmitirme su fascinación por la ciencia desde que era pequeña, por llevarme al campo a pesar de las avispas, y por grabar todos los capítulos de ‘Cosmos’, ‘La Vida Privada de las Plantas’ y ‘El Mundo de Beakman’ en VHS. Sin vuestro apoyo no habría creído nunca que yo pudiese llegar hasta aquí. Gracias.

A mis padres.

“Voy a estrenar corbata hoy. Por fin haré algo de verdad. ¡Qué feliz soy!”

- Septiembre - Los Enemigos

“A pesar de todo me levantaré de nuevo: cogeré mi lápiz, el cual he abandonado en mi gran desánimo, y continuaré con mis dibujos.”

- Vincent van Gogh (1853 – 1890)

Índice general

I	Introducción	1
1.	Introducción	3
1.1.	Biología de <i>Myxococcus xanthus</i>	3
1.1.1.	Ciclo de vida	3
1.1.2.	Variación de fase	6
1.1.3.	Movilidad	8
1.1.4.	Transmisión de señales durante el desarrollo	10
1.2.	Quinasas de tipo eucariota en bacterias	14
1.2.1.	Transducción de señales en bacterias	14
1.2.2.	Dominio catalítico Ser/Thr quinasa	15
1.2.3.	Regulación de la actividad Ser/Thr quinasa	21
1.2.4.	Funciones de las Ser/Thr quinasas en bacterias	23
1.2.5.	Ser/Thr pseudoquinasas	24
1.3.	Ser/Thr quinasas en <i>Myxococcus xanthus</i>	27
II	Objetivos	33
III	Material y métodos	37
2.	Materiales	39
2.1.	Microorganismos	39
2.2.	Medios de cultivo	40
2.2.1.	Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	40
2.2.2.	Medios de cultivo para <i>M. xanthus</i>	41
2.2.3.	Componentes adicionados a los medios de cultivo	41
2.3.	Vectores	42
2.4.	Cebadores	42
2.5.	Soluciones	45
2.6.	Kits y reactivos comerciales	47
2.7.	Bases de datos y servidores	48

3. Métodos	51
3.1. Cultivo de microorganismos	51
3.2. Conservación de microorganismos	51
3.3. Técnicas rutinarias de manipulación de ADN	52
3.3.1. Extracción de ADN genómico	52
3.3.2. Extracción de ADN plasmídico	52
3.3.3. Amplificación de ADN por PCR	52
3.3.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción	53
3.3.5. Ligación de fragmentos de ADN	53
3.3.6. Secuenciación de ADN	54
3.3.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	54
3.3.8. Transferencia de ADN a células	55
3.4. Southern blot	56
3.4.1. Desnaturalización del ADN	57
3.4.2. Transferencia y fijación del ADN a una membrana	57
3.4.3. Marcaje de la sonda	57
3.4.4. Hibridación con una sonda marcada	58
3.4.5. Revelado y detección	58
3.5. Doble híbrido bacteriano	58
3.5.1. Construcción de los vectores	59
3.5.2. Ensayo de la interacción del DHB	60
3.6. Análisis de la expresión génica en <i>M. xanthus</i>	61
3.6.1. Construcción de fusiones <i>lacZ</i>	61
3.6.2. Análisis cualitativo de la expresión génica	62
3.6.3. Análisis cuantitativo de la expresión génica	63
3.7. Mutantes de delección en fase	64
3.7.1. Construcción de mutantes de delección en fase	64
3.7.2. Caracterización fenotípica de cepas mutantes	65
3.8. Medida del hierro intracelular en <i>M. xanthus</i>	68

IV	Resultados y discusión	69
4.	Análisis bioinformático	71
4.1.	Genes parálogos de Ser/Thr quinasas	71
4.2.	Entorno génico	71
4.3.	Secuencias de ADN	74
4.4.	Secuencias proteicas	75
4.4.1.	Dominios catalíticos	77
4.4.2.	Localización subcelular	81
4.5.	Modelado 3D con I-TASSER	82
4.6.	Ortólogos en otras especies	85
5.	Perfil de expresión de las parejas quinasa-pseudoquinasa	91
6.	Mutantes individuales de las quinasas	93
6.1.	Construcción de plásmidos portadores de las deleciones	93
6.2.	Obtención de las cepas mutantes	95
6.3.	Análisis de las variantes <i>yellow</i> y <i>tan</i> de <i>M. xanthus</i>	97
6.3.1.	Ciclo vegetativo	98
6.3.2.	Ciclo de desarrollo	100
6.4.	Fenotipo de los mutantes individuales para las quinasas	102
6.4.1.	Ciclo vegetativo	102
6.4.2.	Ciclo de desarrollo	105
6.5.	Conclusiones	112
7.	Mutantes múltiples de las parejas de quinasas	115
7.1.	Plásmidos portadores de las deleciones dobles	115
7.2.	Construcción de las cepas mutantes dobles y cuádruple	116
7.3.	Fenotipo de los mutantes dobles y cuádruple	118
7.3.1.	Ciclo vegetativo	118
7.3.2.	Ciclo de desarrollo	121
8.	Mutante de delección óctuple	125
8.1.	Plásmidos portadores de las deleciones dobles	125
8.2.	Construcción del mutante óctuple	126
8.3.	Fenotipo del mutante óctuple	128
8.3.1.	Ciclo vegetativo	128
8.3.2.	Ciclo de desarrollo	128
8.4.	Análisis de dos mutantes antagónicos	133

9. Vectores de expresión dependiente de cobre	137
10. Señales del desarrollo en los mutantes de delección	143
10.1. Construcción de cepas silvestres portadoras de fusiones <i>lacZ</i> en los marcadores del desarrollo	143
10.2. Transmisión de las señales A y C en las cepas silvestres	145
10.3. Transmisión de las señales A y C en los mutantes de las quinasas . . .	147
11. Análisis de interacciones proteína-proteína mediante DHB	151
11.1. Predicción de la interacción con STRING	151
11.2. Interacción proteína-proteína mediante DHB	153
11.2.1. Sistema de doble híbrido bacteriano BACTH	153
11.2.2. Construcción de los plásmidos	153
11.2.3. Ensayo de las interacciones proteína-proteína	153
V Conclusiones	161
VI Bibliografía	167
VII Apéndice	179
Secuencias de las quinasas	181
Secuencias de las pseudoquinasas	191
Cepas de <i>M. xanthus</i> obtenidas en esta tesis	197
Plásmidos construidos en esta tesis	199

Índice de figuras

1.1. Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	4
1.2. Variación de fases en <i>M. xanthus</i>	7
1.3. Movilidad social y aventurera en <i>M. xanthus</i>	9
1.4. Producción y recepción de la señal A	12
1.5. Producción y recepción de la señal C	13
1.6. Motivos conservados de una Ser/Thr quinasa típica	16
1.7. Estructura tridimensional del dominio quinasa	19
1.8. Espinas del dominio quinasa	20
1.9. Modelo de regulación de la Ser/Thr quinasa PknB	22
1.10. Pseudoquinasas en bacterias	26
1.11. Ser/Thr quinastas codificadas en los genomas de bacterias	28
1.12. Árbol filogenético de los dominios quinasa en mixobacterias	30
1.13. Microsintenia alrededor de los genes <i>pkn3</i> y <i>relA</i>	31
3.1. Funcionamiento del sistema de doble híbrido bacteriano	59
3.2. Construcción de una fusión <i>lacZ</i>	62
3.3. Construcción de mutantes de delección	67
4.1. Parálogos emparejados y situación en el árbol filogenético	72
4.2. Entorno génico	73
4.3. Identidad entre secuencias aminoacídicas	75
4.4. Alineamientos de las proteínas	76
4.5. Dominio quinasa de las proteínas situadas aguas arriba	79
4.6. Dominio quinasa de las proteínas situadas aguas abajo	80
4.7. Topología y localización subcelular	82
4.8. Modelado 3D de las quinastas MXAN_1233 y MXAN_1234	84
4.9. Árbol del dominio Ser/Thr quinasa, mostrando ortólogos de las quinastas en otras mixobacterias	86

4.10. Árbol del dominio Ser/Thr quinasa, mostrando ortólogos de las pseudoquinasas en otras mixobacterias	87
4.11. Ortólogos en especies del suborden <i>Cystobacterineae</i>	88
5.1. Expresión génica de las quinastas	92
6.1. Plásmidos portadores de deleciones en fase individuales para quinastas y pseudoquinasas	94
6.2. Southern blots de comprobación de los mutantes individuales de las quinastas y pseudoquinasas	96
6.3. Pigmentación de las cepas mutantes individuales	97
6.4. Porcentaje de células <i>yellow</i> y <i>tan</i> en una población silvestre de <i>M. xanthus</i> DK1622	98
6.5. Fenotipo vegetativo de las cepas DK1622 y DK1622 <i>tan</i>	99
6.6. Ciclo de desarrollo de las cepas DK1622 y DK1622 <i>tan</i>	101
6.7. Porcentaje de células <i>yellow</i> y <i>tan</i> en los mutantes individuales	103
6.8. Crecimiento vegetativo de los mutantes de las quinastas	104
6.9. Crecimiento vegetativo de los mutantes de las pseudoquinasas	104
6.10. Movilidad A en los mutantes de las quinastas	106
6.11. Movilidad A de los mutantes de las pseudoquinasas	106
6.12. Movilidad S en los mutantes de las quinastas	107
6.13. Movilidad S de los mutantes de las pseudoquinasas	107
6.14. Fructificación en los mutantes de las quinastas	109
6.15. Fructificación en los mutantes de las pseudoquinasas	110
6.16. Esporulación en los mutantes individuales	111
6.17. Germinación en los mutantes individuales	111
7.1. Plásmidos portadores de las deleciones dobles	116
7.2. Southern blot de comprobación de la cepas mutantes múltiples	117
7.3. Porcentaje de células <i>yellow</i> y <i>tan</i> en los mutantes múltiples	119
7.4. Crecimiento vegetativo de los mutantes múltiples	119
7.5. Movilidad A y S en los mutantes múltiples	120
7.6. Fructificación en los mutantes múltiples	121
7.7. Esporulación y germinación en los mutantes múltiples	122
8.1. Plásmidos diseñados para la obtención del mutante óctuple	126
8.2. Southern-blots para la obtención del mutante óctuple	127
8.3. Proporción	129

8.4. Crecimiento vegetativo del mutante óctuple	129
8.5. Movilidad A y S en el mutante óctuple	130
8.6. Ciclo de desarrollo en el mutante óctuple	130
8.7. Hierro intracelular durante el desarrollo	132
8.8. Esporulación y germinación del mutante óctuple	132
8.9. Ciclo de desarrollo en el mutante séxtuple	134
8.10. Sección C-terminal de la pseudoquinasa MXAN_2177	136
9.1. Vectores de expresión dependiente de cobre	138
9.2. Crecimiento vegetativo en presencia de cobre	139
9.3. Movilidad A y S en presencia de cobre	140
9.4. Desarrollo en presencia de cobre	141
10.1. Construcción de fusiones <i>lacZ</i> con genes dependientes de señales del desarrollo	144
10.2. PCR de comprobación de las fusiones <i>lacZ</i> en las cepas silvestres	145
10.3. Expresión de los genes marcadores del desarrollo en DK1622 y DK1622 <i>tan</i>	146
10.4. PCR de comprobación de las fusiones <i>lacZ</i> en las cepas mutantes	148
10.5. Expresión cuantitativa de los genes marcadores del desarrollo en las cepas mutantes	149
11.1. Predicción de interacciones proteína-proteína con STRING	152
11.2. Esquema del sistema de doble híbrido bacteriano	154
11.3. Plásmidos construidos para el ensayo del DHB	155
11.4. Interacción cualitativa proteína-proteína	156
11.5. Interacción cuantitativa proteína-proteína	157
11.6. Esquema de la localización subcelular e interacciones proteicas entre MXAN_1233 y MXAN_1234	159

Índice de tablas

1.1. Motivos conservados de una Ser/Thr quinasa.	18
2.1. Cepas bacterianas utilizadas	39
2.2. Componentes del medio LB	40
2.3. Componentes del medio Agar-MacConkey	40
2.4. Componentes del medio CTT	41
2.5. Componentes del medio CF	41
2.6. Vectores	42
2.7. Cebadores para PCR	44
2.8. Cebadores para secuenciación	45
2.9. Soluciones	47
3.1. Mezcla de PCR	53
3.2. Condiciones estándar para la reacción de PCR.	53
4.1. Porcentaje G+C de las Ser/Thr quinasa	74
4.2. Dominios quinasa encontrados en Pfam	78
4.3. Dominios transmembrana	81
6.1. Resumen cualitativo del cambio fenotípico	113
11.1. Combinaciones de plásmidos ensayadas	156
2. Cepas obtenidas durante esta tesis	198
3. Plásmidos construidos durante esta tesis.	200

Summary

Study on paralogous genes encoding eukaryote-like protein kinases in *Myxococcus xanthus*.

INTRODUCTION The soil δ -proteobacterium *Myxococcus xanthus* is a model for prokaryotic development due to its unique social life cycle. In the presence of nutrients, cells feed cooperatively in coordinated groups, following the vegetative cycle. Upon starvation, thousands of bacteria coordinate their movement and migrate to certain points, where they build macroscopic structures called fruiting bodies, inside of which the elongated rods differentiate into coccoid resistant myxospores.

M. xanthus contains a kinome that includes 99 Ser/Thr protein kinases (STPKs), an unusual number compared to most of the prokaryotes. However, only several STPKs have been characterized in this bacterium. We are deciphering the role in development of four pairs of genes that encode STPKs, which are MXAN_1233 and MXAN_1234, MXAN_2176 and MXAN_2177, MXAN_3182 and MXAN_3183, and MXAN_4841 and MXAN_4842. They show the peculiarities of being related phylogenetically, exhibiting microsynteny and being conserved among other myxobacteria species.

OBJECTIVES Our main purpose for this thesis was to elucidate the role of these duplicated pairs of Ser/Thr kinases in the life cycle of *M. xanthus*. To achieve that goal, we proposed several objectives:

- To characterize these STPKs, on the basis of their DNA and aminoacid sequences.
- To study the gene expression of the STPKs during the vegetative life cycle and development.
- To construct in-frame deletion mutants of these STPKs and analyze their phenotype.
- To study the signal transduction pathway(s) in which(es) these STPKs participate.

RESULTS Bioinformatic analysis revealed that these pairs of genes of *M. xanthus* coding STPKs are present in most sequenced species belonging to the suborder *Cystobacterineae*, *i.e.*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Stigmatella aurantiaca*, *Corallococcus coralloides*, *Myxococcus fulvus*, and *Hyalangiium minutum*. Moreover, the number of copies of these pairs of genes increases with the size of the genome. The pairs of genes conserve microsynteny, appearing always one next to another. They are generally preceded by a gene that codes a protein with a domain of unknown function (DUF:2381, PF09544.5), which is only found in myxobacteria.

The STPKs located upstream in each pair, that is, MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182, and MXAN_4842, conserve all the invariant residues in the eleven domains described in the protein kinase family required for catalytic activity. In contrast, the second STPKs of the pair, *i.e.*, MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183, and MXAN_4841, located downstream, have a cytoplasmic localization and belong to the so-called *non-D kinases* because they lack the aspartate residue of the HRD motif situated in the subdomain VIb, which is essential for activity. It is therefore plausible to catalogue them as pseudokinases, according to [Zeqiraj y van Aalten \(2010\)](#).

By fusing the genes MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182, and MXAN_4842 to the gene *lacZ* of *Escherichia coli* we analyzed gene expression of the STPKs during vegetative growth and developmental cycle. We did not detect any expression, so we concluded that the kinases maintain very low or none expression in the conditions tested.

The construction of single, double, and multiple in-frame deletion mutants of these STPKs indicated that they are involved in phase variation. Most of the mutants showed a tendency to develop a tan phenotype. Tan mutants showed defective motility growing in nutritive medium with agar, and a faster growth capacity while growing in nutritive liquid medium. Moreover, tan mutants were affected in development, showing a delay in fruiting body formation. Surprisingly, once the development cycle was completed, the tan mutants showed increased capacity for myxospore formation and germination.

Since no gene expression for the STPKs was detected, we designed and constructed a set of integrative expression vectors for *M. xanthus* whose expression can be regulated by adding copper to the culture media. These vectors were designed to overexpress, among other genes, the genes coding STPKs. Afterward, we analyzed vegetative growth and development of the wild type strain DK1622 in the presence of copper. Unfortunately, copper showed to slightly affect development and sporulation of the strain DK1622. Simultaneously, it was discovered that metals (Fe) could interfere with the process of phase variation ([Dziewanowska et al., 2014](#)). Later on, we detected that tan strains tend to accumulate selectively more iron than yellow variants during development.

Seeing that phase variation and several development features are affected in the deletion mutants of the STPKs, and copper could interfere with the phenotype caused by the mutations, we decided not to continue with overexpression. Nevertheless, these results were published in the journal *Applied and Environmental Microbiology* [Gómez-Santos et al. \(2012\)](#). The vectors had great acceptance by the scientific

community and have been used by several research groups in the research field of myxobacteria (Harms *et al.*, 2013; Iniesta, 2014; Iniesta *et al.*, 2012; Nan *et al.*, 2013; Treuner-Lange *et al.*, 2013).

Since the deletion mutants are affected both in phase variation and development, we considered interesting to elucidate in which moment of development the kinases and pseudokinases are functioning. For that reason, we determined A-signal and C-signal transmission during development by fusing A-signal and C-signal dependent genes to *lacZ* of *E. coli*. The wild type tan variant of *M. xanthus* showed higher levels of C-signal transmission compared to the wild type yellow variant, and that STPKs contribute to regulation of C-signal transmission since several deletion mutants of the STPKs, including an octuple mutant of the four pairs, showed delayed but a higher level of transmission of that signal.

Finally, in order to elucidate the signal transduction pathway in which these STPKs participate, we tested *in vivo* protein-protein interactions, using a bacterial two-hybrid system (Battesti y Bouveret, 2012). Pseudokinase MXAN_1234 showed interaction forming homooligomers that interact *head-to-tail*. However, kinase-pseudokinase MXAN_1233-MXAN_1234 showed no protein-protein interaction and no homodimers of MXAN_1233-MXAN_1233 were detected under the conditions assayed.

Further studies involving transcriptomics, proteomics, and phosphoproteomics techniques will be helpful in improving our understanding of the physiological process and signal transduction pathway of *M. xanthus* in which these eight STPKs participate.

MAIN CONCLUSION Multiple copies of phylogenetically related paired genes coding STPKs are conserved and maintain microsynteny in *M. xanthus* as well as in other myxobacteria in the suborder *Cystobacterineae*. The gene situated upstream encodes a functional kinase that conserves all the catalytic residues, while the gene downstream codes a kinase which can be catalogued as a pseudokinase since it lacks the catalytic aspartic acid residue in the HRD motif. These STPKs are, either directly or indirectly, involved in the process of phase variation of *M. xanthus*, and regulate other characteristics of the developmental life cycle, *i. e.* fruiting body formation, sporulation, germination, and signals transmission.

Parte I

Introducción

Capítulo 1

Introducción

1.1. Biología de *Myxococcus xanthus*

Las mixobacterias son un conjunto de bacterias englobadas en el orden *Myxococcales*, dentro de las δ -proteobacterias. Son bacilos Gram negativos, alargados (de 3-12 μm de largo por 0,7-1,2 μm de diámetro), y sin flagelos. Habitan sobre todo en la superficie de suelos ricos en materia orgánica, aunque se han podido aislar a partir de superficies rocosas, agua dulce y agua marina (Velicer y Hillesland, 2008; Li *et al.*, 2012). Producen metabolitos secundarios interesantes para la industria biotecnológica, como antibióticos y anticancerígenos (Diez *et al.*, 2012).

La principal peculiaridad de estas bacterias reside en su comportamiento multicelular. Durante todo su ciclo ocurren procesos de movilidad, comunicación y coordinación celular. Durante el crecimiento vegetativo, se alimentan por depredación cooperativa; en ausencia de nutrientes las mixobacterias emprenden el ciclo de desarrollo, que culmina con la formación de cuerpos fructíferos llenos de mixosporas (Kaiser, 2003).

Myxococcus xanthus es la especie de mixobacteria más estudiada y es considerada como uno de los modelos de comportamiento multicelular y desarrollo en procariotas.

1.1.1. Ciclo de vida

Ciclo vegetativo

En presencia de nutrientes, *M. xanthus* lleva a cabo la fase vegetativa del ciclo, durante la cual los bacilos se deslizan juntos sobre la superficie del sustrato formando colonias móviles denominadas **enjambres** (Figura 1.1, ilustración 1).

En esta fase del ciclo las células **se alimentan de forma cooperativa** a partir de materia orgánica o incluso depredando otros (micro)organismos tanto procariotas como eucariotas (Figura 1.1, 2). Producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar proteínas, ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos, peptidoglucano y polisacáridos (incluyendo celulosa). La formación de enjambres permite reducir el coste que supone la liberación al medio de estas enzimas, ya que también son utilizadas por las células vecinas. Durante esta fase se produce un movimiento ondulatorio coordinado denominado *rippling* (Velicer y Vos, 2009). Al tiempo que se alimentan, los bacilos se multiplican por **fisión binaria** (Figura 1.1, 3) haciendo crecer el enjambre.

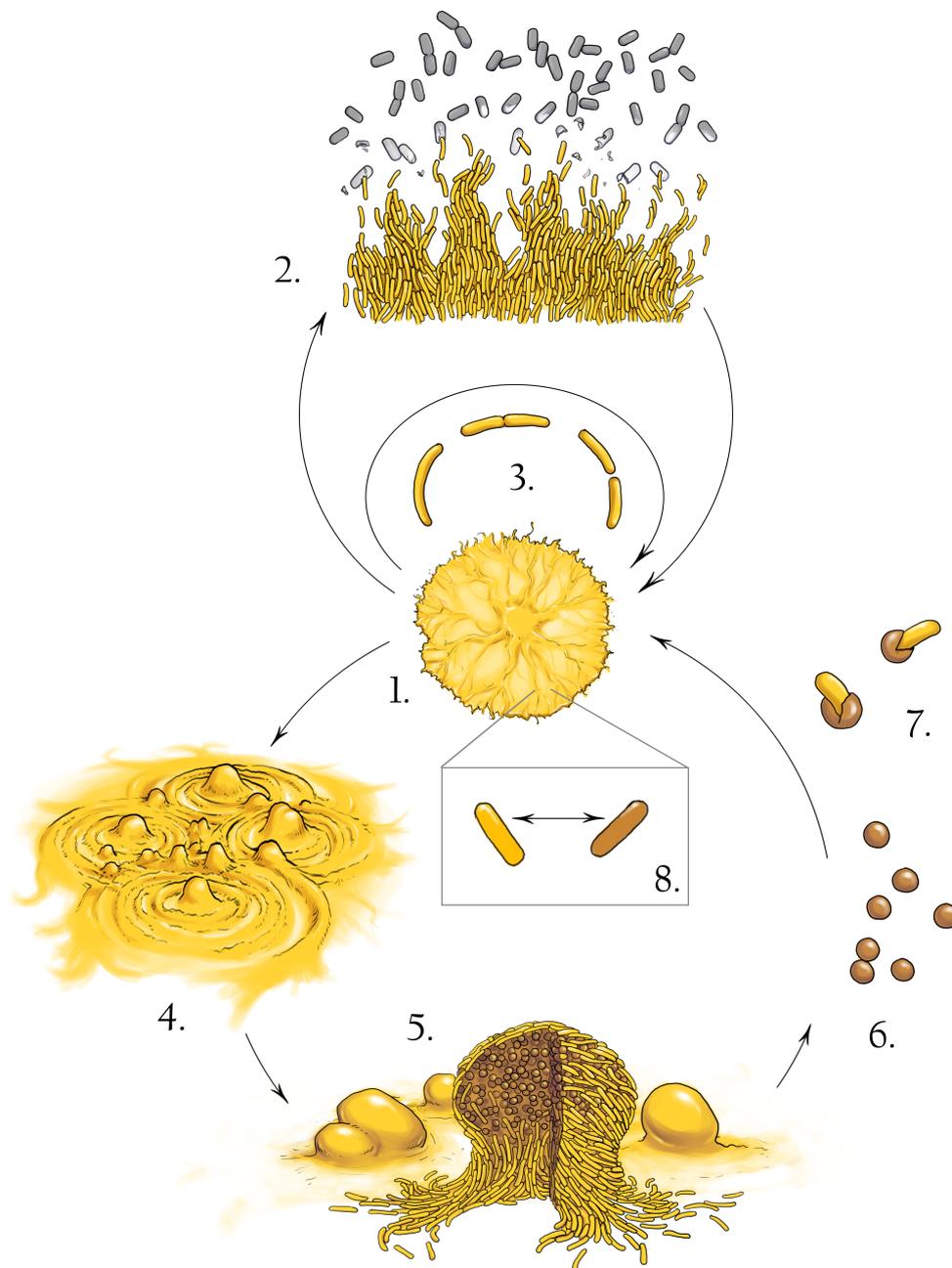


Figura 1.1: Ciclo de vida de *M. xanthus*. Ciclo vegetativo: 1. Enjambre. 2. Alimentación cooperativa por microdepredación. 3. Reproducción por fisión binaria. Ciclo de desarrollo: 4. *Rippling* y agregación. 5. Formación de cuerpos fructíferos llenos de esporas. 6. Mixosporas maduras. 7. Germinación. 8. Variación de fase.

Ciclo de desarrollo

Cuando existe escasez de nutrientes en el medio (agotamiento de la fuente de carbono, nitrógeno o fósforo), se induce el ciclo de desarrollo. Además de este desencadenante, la inducción del ciclo de desarrollo requiere dos condiciones: una **densidad celular elevada**, ya que es necesario que se produzca un intercambio de señales entre células, y un **sustrato sólido** que permita el desplazamiento de las células.

Cuando se cumplen las tres condiciones mencionadas las mixobacterias dejan de desplazarse hacia fuera del enjambre y se desencadena un movimiento rítmico de las células hacia dentro del enjambre, de manera que, transcurridas unas 4-6 horas, las células se irán acumulando en puntos determinados, formándose así los llamados **centros de agregación** (Figura 1.1, 4). Mientras, fuera de estos montículos se produce el fenómeno del *rippling* que arrastrará más células a dichos centros de agregación.

Estos centros crecerán de tamaño hasta formar, tras 24 horas, unas estructuras macroscópicas denominadas **cuerpos fructíferos**, que contiene cada uno alrededor de 10^5 células (Figura 1.1, 5). La morfología de los cuerpos fructíferos depende de la especie: mientras en *M. xanthus* son montículos, otras especies desarrollan cuerpos pedunculados, incluso ramificados, y que pueden contener numerosos esporangios. Tradicionalmente, la morfología de los cuerpos fructíferos ha sido un criterio de clasificación taxonómica hasta la era de la secuenciación, en la que se hicieron filogenias en base al ARN ribosómico 16S y se demostró que las mixobacterias son un grupo monofilético (Shimkets y Woese, 1992; Spröer *et al.*, 1999).

Tras 24 a 72 horas desde el comienzo del desarrollo, los bacilos dentro de los cuerpos fructíferos se diferencian a **mixosporas** (Figura 1.1, 5 y 6), que son células de resistencia metabólicamente durmientes, resistentes al calor, la desecación y a la luz UV, que alcanzarán su madurez tras 72 horas desde el comienzo del desarrollo. Las mixosporas representan solamente un 10-20 % de la población original que inició el desarrollo. Un 30 % de los bacilos vegetativos se diferenciarán a un morfotipo denominado bacilos periféricos, que se encuentran en estado de latencia y no se multiplican salvo que se restablezcan los nutrientes. La función de estos bacilos aún es desconocida, pero las hipótesis principales son que posibilitan el aprovechamiento de pequeñas cantidades de nutrientes que pueden reaparecer en el medio (O'Connor y Zusman, 1991) y que protegen a los cuerpos fructíferos de posibles depredadores y de la colonización por parte de otros microorganismos (Shimkets, 1999).

Finalmente, el resto de células sufre una muerte programada (Wireman y Dworin, 1977; Lee *et al.*, 2012). Cuando se restablecen las condiciones nutricionales, las mixosporas **germinan** generando células vegetativas que reanudan el ciclo vegetativo (Figura 1.1, 7).

Todo el proceso requiere unas 72 horas para completarse, durante las cuales se produce una minuciosa regulación de la expresión génica y del movimiento celular (Müller *et al.*, 2010), transmitiéndose gran cantidad de señales extracelulares (Kaiser, 2003; Kononova *et al.*, 2010; ?).

1.1.2. Variación de fase

Durante el crecimiento vegetativo, *M. xanthus* sufre un proceso de variación de fase (Figura 1.1, 8).

La **variación o cambio de fase** es un fenómeno de plasticidad fenotípica reversible, descrito tanto en bacterias como en eucariotas, cuyo objetivo final es una mejor adaptación al medio. El cambio de fase se ha estudiado principalmente en patógenos, que obtienen beneficio al variar sus antígenos de superficie, evadiendo el sistema inmune del hospedador (Van Der Woude y Bäumlér, 2004).

El cambio de fase se produce mediante varios mecanismos, la mayoría de los cuales implican cambios en la secuencia de ADN, que se traducen en cambios en la expresión génica y por consiguiente en los componentes celulares, que determinarán un fenotipo diferente. Los mecanismos de cambio en la secuencia ADN son variados y pueden consistir en errores de alineamiento en secuencias repetitivas durante la replicación del cromosoma, recombinación homóloga, inversión de secuencias, o inserción y escisión de elementos transponibles (Van Der Woude y Bäumlér, 2004).

Lo que distingue a este proceso de la regulación génica clásica es la **heredabilidad** de una generación a otra mediante mecanismos epigenéticos (Van Der Woude y Bäumlér, 2004). Los mecanismos epigenéticos descritos consisten en metilación del ADN. El estado de metilación de una secuencia afecta a la unión de proteínas reguladoras y por tanto a la transcripción génica (Van Der Woude y Bäumlér, 2004; Bayliss y Palmer, 2012). Este proceso, aunque heredable, es **reversible**. Así pues, la mayoría de las células hijas heredan la fase parental, pero una minoría cambia su patrón de expresión y exhibe una fase o fenotipo diferente. El ambiente, además, es un factor que puede afectar a la tasa de variación de fase y a las proporciones que presenta cada fase en la población (Van Der Woude y Bäumlér, 2004; Van Der Woude, 2006).

El papel de este proceso en no patógenos es menos comprendido. Se ha demostrado que en bacterias comensales o del suelo, como *Bacillus subtilis*, el cambio de fase interviene en la capacidad de formación de biopelículas (Van Der Woude, 2006). *M. xanthus* es una bacteria no patógena, del suelo, que puede estar sujeta a grandes cambios ambientales así como a depredadores, con lo cual se expone la hipótesis de que la variación de fase es crítica para su supervivencia ante factores externos (Dahl *et al.*, 2011).

El proceso de variación de fase provoca en *M. xanthus* la aparición de **dos tipos celulares** con fenotipos diferentes: **una fase amarilla o yellow, y una fase parda o tan**, que se manifiestan macroscópicamente como dos tipos de colonias diferentes (Furusawa *et al.*, 2011). Las células en fase *yellow* son competentes en movilidad y presentan aspecto rugoso, mate y bordes con flecos. Se agregan fácilmente formando una biopelícula y sintetizan el pigmento DKxanteno que les confiere un color amarillo intenso (Meiser *et al.*, 2006, 2008; Furusawa *et al.*, 2011). Por el contrario, las células en fase *tan* carecen del pigmento amarillo DKxanteno, por lo que la apariencia de las colonias es de un color marrón pálido, con bordes redondeados, y aspecto mucoso y brillante. Las células *tan* son deficientes en movilidad, no se agregan tan fácilmente y crecen hasta una mayor densidad celular cuando se cultivan en medio líquido.

En una población promedio de *M. xanthus*, las células en fase *yellow* son mayoritarias, presentándose en un 75-99%, mientras que las células *tan* representan un

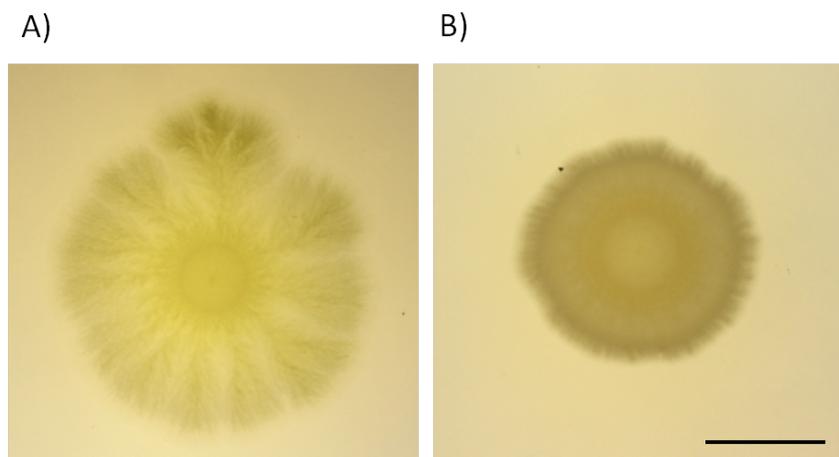


Figura 1.2: Variación de fases en *M. xanthus*. A) Enjambre de *M. xanthus* en fase *yellow*. B) Enjambre de *M. xanthus* en fase *tan*. Barra de escala = 1 cm.

1-25 % (Laue y Gill, 1995). Por tanto, en las poblaciones de las cepas silvestres de *M. xanthus*, como la cepa DK1622, las colonias amarillas son las predominantes. En el caso de las colonias *tan*, las proporciones se invierten, existiendo mayoritariamente células *tan* y sólo 1-25 % células *yellow*. La tasa de cambio de una fase a otra en *M. xanthus* se ha descrito como 10^{-2} ó 10^{-3} por célula y por generación (Laue y Gill, 1994), aunque se conoce por estudios en otras bacterias que las condiciones de cultivo pueden afectar a la tasa de cambio (Van Der Woude y Bäumlér, 2004). Los mecanismos que permiten el cambio de fase en *M. xanthus* aún se desconocen.

Durante el ciclo de desarrollo, las distintas fases de *M. xanthus* también presentan diferencias. Las poblaciones *tan* no forman cuerpos fructíferos o lo hacen de forma deficiente. En caso de formarse mixosporas, éstas presentan menor viabilidad (Laue y Gill, 1995; Furusawa *et al.*, 2011).

Datos obtenidos del transcriptoma de variantes *yellow* y *tan*, analizados por *microarrays* y RT-PCR, han demostrado que existen diferencias en expresión de genes entre estos dos tipos celulares (Furusawa *et al.*, 2011; Dziejowska *et al.*, 2014). Por ejemplo, se demostró experimentalmente que en las células de fase *yellow* existe una mayor expresión de los genes de la síntesis del DKxanteno, además de otros polímeros como el antibiótico mixovirescina. En cambio, entre los genes cuya expresión es mayor en la fase *tan*, se encuentran sideróforos y proteínas transportadoras de hierro, y proteínas quinasas de tipo eucariota, que son de especial interés para esta tesis doctoral.

Aún no se conoce con certeza la función de cada subpoblación. Por un lado, se especula que las células en fase *yellow*, con su capacidad de movilidad, proporcionan alimento y sintetizan metabolitos secundarios que protegen a la población de factores ambientales y depredación, señalizan el ciclo, y contribuyen a la morfogénesis de los cuerpos fructíferos y a la esporulación. Por otro lado, la subpoblación de células *tan* es más abundante tras la germinación, con lo cual las células *tan* parecen ser las destinadas a diferenciarse en mixosporas (Laue y Gill, 1995; Dahl *et al.*, 2011;

Furusawa *et al.*, 2011). Además, las células *tan* contribuirían a la supervivencia del enjambre gracias a su resistencia a la lisis celular y a su capacidad de adquisición de hierro del medio cuando éste es deficiente (Furusawa *et al.*, 2011; Dziewanowska *et al.*, 2014).

1.1.3. Movilidad

Muchas bacterias se mueven o desplazan, y para ello han desarrollado diversas estrategias. Mientras en medio líquido o muy húmedo predominan los flagelos, sobre superficies poco humedecidas predominan otros mecanismos como el deslizamiento (*gliding*) o la movilidad a tirones (*twitching*) (Bardy *et al.*, 2003; Nan *et al.*, 2014). Las células de *M. xanthus* carecen de flagelos y no nadan en medio líquido, pero se mueven sobre superficies sólidas, desplazándose a lo largo de su eje longitudinal. La movilidad es necesaria para formar enjambres en busca de una fuente de nutrientes y realizar los movimientos ondulatorios o de *rippling*, así como para agregarse durante el ciclo de desarrollo (Mauriello *et al.*, 2010). El desplazamiento suele ser rítmico, y las células invierten la polaridad y se desplazan en sentido opuesto cada 10 minutos aproximadamente (Kaiser, 2003).

El desplazamiento de *M. xanthus* está controlado por dos mecanismos de movilidad independientes: **la movilidad S o social, y la movilidad A o aventurera**. Ambas actúan de forma sinérgica para llevar a la célula en una misma dirección.

Movilidad social

La movilidad social es responsable del **desplazamiento en grupo** de las células, y es muy dependiente del contacto célula-célula (Kaiser, 2003). Este tipo de movilidad es proporcionada por ***pili* tipo IV**, que en número de 5 a 10, están situados en el extremo delantero de la célula, se adhieren al sustrato o a células vecinas y se retraen para tirar de la célula y desplazarla (Figura 1.3, A). También es necesaria la producción de matriz extracelular para la correcta retracción de los *pili* (Li *et al.*, 2003; Mauriello *et al.*, 2010). Este mecanismo es equivalente a la movilidad a tirones o *twitching* descrita en otras bacterias (Bardy *et al.*, 2003).

Mutantes de *M. xanthus* defectivos en movilidad aventurera (A- S+) ponen de manifiesto la movilidad social. En estos mutantes las colonias presentan bordes definidos, con prolongaciones o penachos formados por grupos de células, y nunca se observan bacterias aisladas en los bordes (Kaiser, 2003). En los enjambres silvestres también se observan estos penachos (Figura 1.3, C). La movilidad social también se puede estudiar en cepas silvestres de *M. xanthus* cuando se cultivan en placas de agar blando (al 0,5%) (Shi y Zusman, 1993). Puesto que en sustratos tan blandos y húmedos el mecanismo de movilidad aventurera no funciona, el único desplazamiento visible en dichos sustratos se debe al mecanismo de movilidad social.

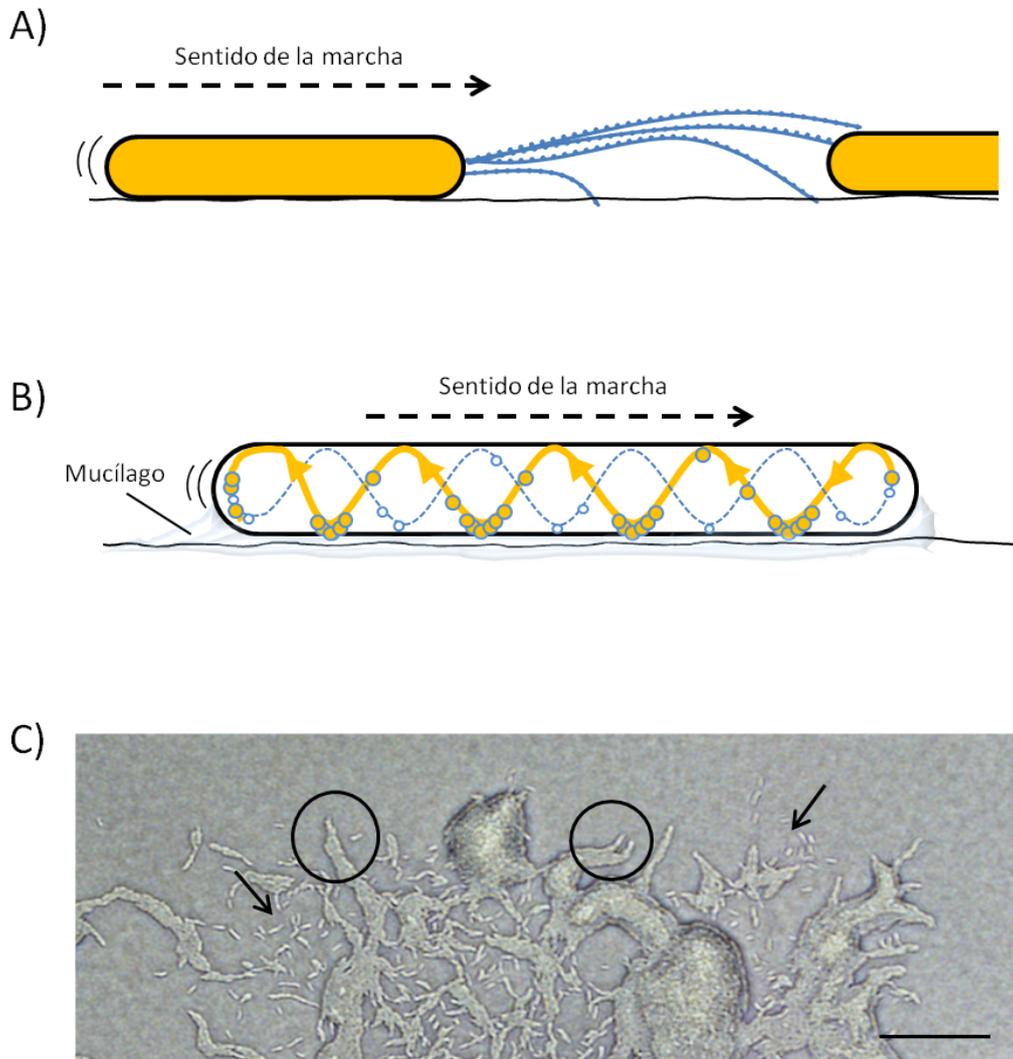


Figura 1.3: Movilidad social y aventurera en *M. xanthus*. A) Mecanismo de movilidad social por *pili* tipo IV. Los *pili* se adhieren a la superficie del sustrato o de otras células y se retraen para hacer avanzar a la célula. B) Mecanismo de movilidad aventurera. Los motores (puntos) viajan por la hélice de citoesqueleto. En el sentido contrario a la marcha (hélice amarilla), se adhieren al mucílago secretado sobre el sustrato y hacen girar la hélice, haciendo avanzar a la célula como un tornillo. Los motores regresan por la hélice en sentido contrario (hélice azul), sin ofrecer rozamiento sobre el sustrato. Adaptado de [Nan et al. \(2014\)](#). C) Fotomicrografía del borde de un enjambre de *M. xanthus* silvestre creciendo en agar al 1,5%. Se pueden observar células aventureras (flechas) y grupos de células con movilidad social (círculos). La barra representa 25 μm .

Movilidad aventurera

La movilidad A o aventurera es la encargada del **desplazamiento individual** de las células. En aquellas cepas mutantes de *M. xanthus* que sólo presentan movilidad aventurera (A+ S-) se observan fácilmente células aisladas que se desplazan hacia fuera de los bordes de la colonia (Figura 1.3, C)) (Shi y Zusman, 1993).

En este mecanismo, el movimiento celular es suave y mantenido sobre la superficie. Se clasifica como movilidad por **deslizamiento**, aunque son muy heterogéneos los mecanismos que se engloban dentro de este tipo de movilidad (Bardy *et al.*, 2003; Nan *et al.*, 2014).

Este movimiento aventurero se lleva a cabo gracias a la existencia de unos motores proteicos que transitan por una hélice de citoesqueleto dispuesta a lo largo de la bacteria, y que se anclan a un mucílago de naturaleza polisacáridica producido por la propia bacteria (Figura 1.3, B)). Los motores se fijan al mucílago y mediante fuerza protón motriz rotan la hélice, haciendo avanzar a la bacteria. Los motores adheridos al mucílago permanecen inmóviles respecto al sustrato, y es la bacteria la que rota sobre esos motores, avanzando como un tornillo. El polisacárido se adhiere más al sustrato que a la superficie bacteriana, por eso la bacteria se desliza sobre el mucílago adherido al sustrato, al igual que un caracol. El mucílago es necesario para que exista movilidad aventurera, y al resto de células les es más fácil seguir este rastro de mucílago que crear uno nuevo (Nan *et al.*, 2014).

Los motores que llegan al extremo caudal regresan al extremo frontal por la misma hélice, que es cerrada y recorre la célula también en el otro sentido. En un sentido de la hélice, los motores se acumulan en los puntos ventrales que están en contacto con el sustrato, se frenan por el mucílago y promueven el desplazamiento celular; en el otro sentido los motores vuelven al extremo frontal para ser repuestos. Estos motores que se desplazan en sentido contrario no contrarrestan el movimiento porque hay menos cantidad de motores volviendo que yendo, y la fuerza resultante hace que la célula avance. El cambio de dirección se produce por la diferente cantidad de motores que recorre cada hélice (Nan *et al.*, 2014).

Este mecanismo sólo funciona cuando la bacteria se desliza sobre una superficie sólida, como el agar a una concentración a partir de 1,5 % (Shi y Zusman, 1993). Por tanto, la movilidad aventurera se puede medir cultivando la mixobacteria en placas de agar duro, y midiendo el diámetro de las colonias. Este mecanismo es el que permite a las bacterias avanzar rápidamente más allá del borde de la colonia, por ello el diámetro de la colonia está determinado por las bacterias aventureras.

1.1.4. Transmisión de señales durante el desarrollo

Al iniciarse el ciclo de desarrollo se desencadena una serie de señales intercelulares necesarias para regular la coordinación de las células durante todo el proceso. Se han identificado genéticamente 5 señales intercelulares, que han sido denominadas A, B, C, D y E (Kaiser, 2004; Kononova *et al.*, 2010). Todas ellas son esenciales para culminar con éxito el ciclo de desarrollo, ya que los mutantes deficientes en alguna de estas señales no pueden llevar a cabo un desarrollo correcto. De todas las señales, solamente las señales A y C han sido caracterizadas químicamente. Asimismo, ha

sido caracterizada su transmisión a lo largo del desarrollo gracias a fusiones con genes marcadores (Kroos *et al.*, 1986). Aún permanecen sin identificar las moléculas que producirían el resto de señales intercelulares.

Cuando existe agotamiento de nutrientes en el medio, previamente a la producción de estas señales se desencadena, como en muchas bacterias, la **respuesta estricta**. El agotamiento de nutrientes se detecta por la ausencia de aminoácidos en el medio, ya que éstos son la principal fuente de carbono y nitrógeno. Como respuesta a estas condiciones se detiene la síntesis de proteínas para crecimiento, a la vez que comienza la síntesis de guanosín tetra/pentafosfato, (p)ppGpp. Se detiene el crecimiento y comienza la síntesis de aminoácidos y proteólisis controlada para autoabastecimiento. La acumulación de este nucleótido es necesaria y suficiente para la entrada en el ciclo de desarrollo. Su acumulación también inducirá la producción de señal A.

Señal A

El sistema de señal A funciona como un **sistema sensor de quorum** que indica a las mixobacterias la densidad celular existente, y además evalúa la cantidad de nutrientes disponibles. Esta información ayudará a las mixobacterias a elegir entre dos alternativas. Una de ellas es la entrada en el ciclo de desarrollo, si la población celular y los nutrientes son suficientes. La otra opción consiste en mantener una mínima tasa de crecimiento vegetativo, y se escoge cuando los nutrientes ni siquiera son suficientes para poder iniciar el ciclo de desarrollo (Kaiser, 2004, 2003; Konovalova *et al.*, 2010).

La señal A consiste en un conjunto de **proteasas extracelulares**, así como los **péptidos y aminoácidos** liberados por éstas. Las proteasas secretadas digieren proteínas de la superficie de la propias células liberando péptidos y aminoácidos al medio extracelular. Si la densidad celular es suficiente y se alcanza un umbral determinado de señal A, se desencadena la expresión de ciertos genes que son dependientes de la señal A. Dichos genes comienzan a expresarse a partir de las 2 horas desde la privación de nutrientes (Konovalova *et al.*, 2010, 2012).

El operón responsable de producir la señal A es el operón *asg*, formado por 5 genes. La escasez de nutrientes es captada por la proteína sensora AsgA, codificada por *asgA*, el primero de los genes del operón *asg*, que codifica una histidina quinasa receptora. Se produce una cascada de fosforilación hasta AsgB (gen *asgB*), un factor transcripcional que al fosforilarse se une al ADN y activa la expresión de genes encargados de producir la señal A, principalmente proteasas extracelulares. Además de los genes mencionados, existen otros: *asgC* es un factor sigma, *asgD* es otra histidina quinasa, y *asgE* es una amidohidrolasa. Se piensa que todas participan en la misma ruta de transducción de señales (Figura 1.4) (Konovalova *et al.*, 2012).

A pesar de que los genes necesarios para producir la señal A se han identificado, ni las proteasas ni los receptores han sido identificados aún. Se cree que la señal A es recibida por un sistema de dos componentes denominado SasS/SasR, cuya histidina quinasa SasS detecta los aminoácidos y péptidos liberados, y cuyo regulador de respuesta SasR activa los genes dependientes de la señal A (Figura 1.4) (Kaiser, 2004; Konovalova *et al.*, 2012).

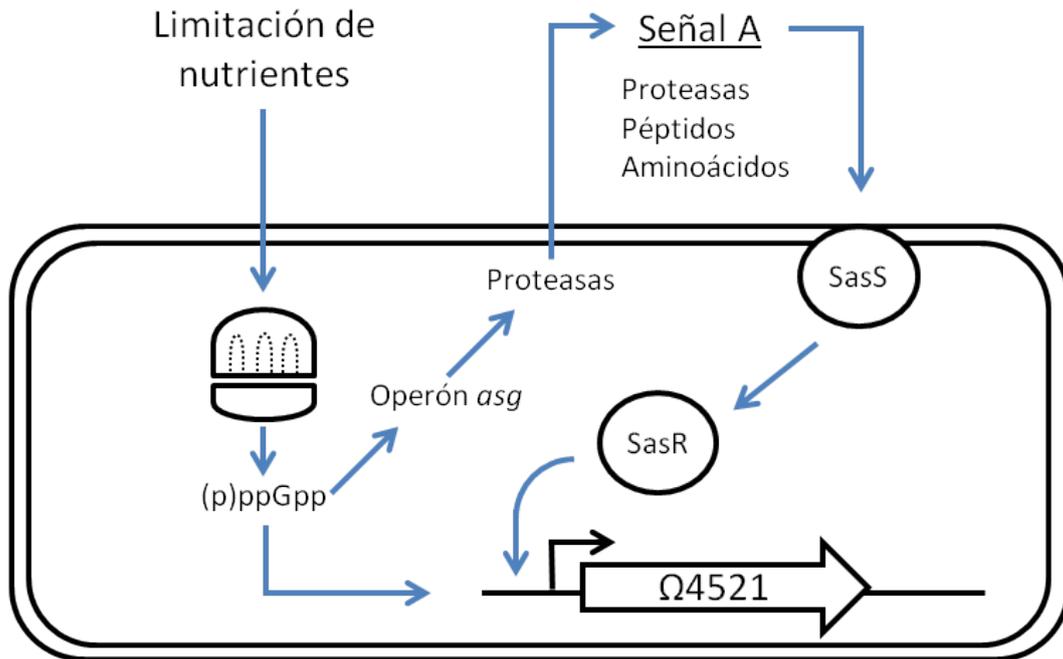


Figura 1.4: Producción y recepción de la señal A. Adaptado de Kaiser (2004).

El gen $\Omega4521$ es un gen cuya expresión depende de la señal A, así como de niveles elevados de (p)ppGpp intracelular (Figura 1.4) (Keseler y Kaiser, 1995). Este gen ha sido muy utilizado para estudiar la transmisión de la señal A en muchas cepas de *M. xanthus*. Según la hipótesis actual, el sistema de dos componentes SasS/SasR activaría la expresión del gen $\Omega4521$. A pesar de inducirse durante el desarrollo, no es esencial para la esporulación (Kaiser, 2004).

Señal C

La señal C desencadena tres procesos del desarrollo y además controla que se produzcan en el orden correcto: primero el proceso del *rippling*, más tarde la **agregación** y finalmente la **esporulación**. La transmisión de esta señal es absolutamente necesaria para completar el desarrollo.

El operón *csg* es el responsable de producir la señal C. El gen *csgA* codifica una proteína CsgA de 25 kDa (p25), que se secreta y queda anclada en la membrana externa (Figura 1.5). Una vez allí es cortada por la proteasa extracelular PopC, dando como resultado una proteína de menor tamaño (17 kDa). **Esta proteína, p17, expuesta en la membrana externa, es la señal C.** Es una señal no difusible, y por ello su transmisión requiere contacto directo entre células y un alineamiento celular adecuado. El contacto cabeza-cola entre células es el que permite la transmisión de la señal C (Kaiser, 2003; Konovalova *et al.*, 2010).

Cada proceso desencadenado por la señal C se origina con un umbral diferente en la concentración de la misma. La señal es producida durante el crecimiento vegetativo, pero en cantidades casi imperceptibles por las células. El número

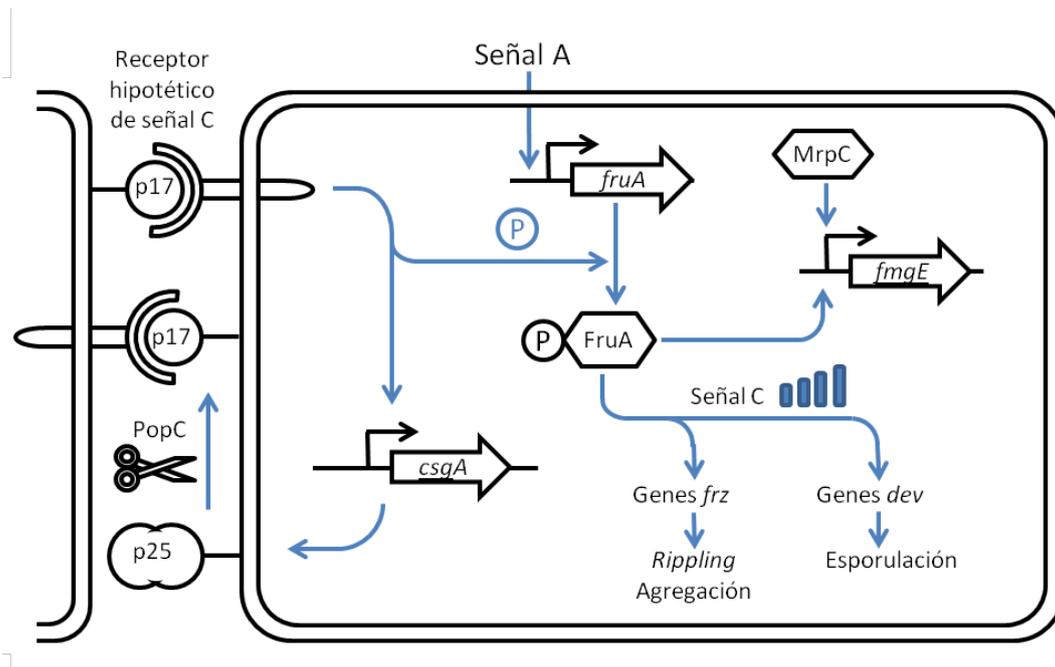


Figura 1.5: Producción y recepción de la señal C. Adaptado de Kaiser (2004).

de moléculas de señal C va creciendo en superficie celular a lo largo del desarrollo, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Su producción comienza a incrementar tras 3 horas desde la privación de nutrientes, y entre 8 y 18 horas después ya existen varios cientos de moléculas por célula. Con umbrales bajos de concentración se desencadena el *rippling*, a un umbral intermedio se forman los agregados. Los niveles de señal C alcanzan un máximo durante la esporulación; este pico solo se alcanza dentro del cuerpo fructífero. Los bacilos periféricos intercambian menores niveles de señal C y por ello no se agregan ni esporulan (Kaiser, 2003). Los genes que dependen de la transmisión de señal C comienzan a expresarse tras 6 horas del comienzo del desarrollo (Konovalova *et al.*, 2010, 2012).

La señal C es percibida por un receptor aún desconocido. Según la hipótesis actual, este receptor estaría presente en la membrana de la célula receptora y al interactuar con la señal C produciría una cascada de fosforilación que se transmitiría hasta el regulador de respuesta FruA (Figura 1.5). En respuesta a la señal C, FruA es fosforilado y activa dos rutas. Una de ellas, activada por niveles bajos-medios de señal C, desencadena la agregación, modificando la expresión de los genes *frz*. Estos genes codifican un sistema quimiosensor que regula la frecuencia de reversión del desplazamiento, favoreciendo que las células viajen en círculos y se acumulen en los centros de agregación. La otra ruta activada a niveles altos de señal C, desencadena la esporulación, de la que es responsable el operón *dev*. FruA actúa junto con el regulador transcripcional MrpC2 para activar otros genes dependientes de la señal C, como los genes *fmg*. Entre ellos, el gen *fmgE* (MXAN_3464) es interesante para estudiar la transmisión de la señal C en cepas de *M. xanthus* (Kroos *et al.*, 1986; Kaiser, 2004; Inouye y Nariya, 2008; Campbell *et al.*, 2015).

Las señales A y C se transmiten de forma sucesiva durante el desarrollo. Recientemente se ha demostrado que la señal C, que en principio se consideraban dependiente

de la señal A, se activa por una ruta independiente. (Konovalova *et al.*, 2012).

1.2. Quinasas de tipo eucariota en bacterias

1.2.1. Transducción de señales en bacterias

El fosfato juega un papel importante en biología formando parte de moléculas esenciales para la vida como el adenosín trifosfato (ATP) o los ácidos nucleicos como en ADN y el ARN (Hunter, 2012). Asimismo, posee un papel fundamental en señalización. Una de las modificaciones postraduccionales más comunes que ocurren en una proteína tras su síntesis es la adición de un grupo fosforilo a uno o varios de sus aminoácidos mediante enlace covalente. Este proceso es conocido como **fosforilación**.

En todos los seres vivos, existen **mecanismos de transducción de señales** que permiten transmitir información a la célula en respuesta a un estímulo específico, que puede ser intracelular o extracelular, para generar una respuesta adecuada a dicho estímulo. Estos mecanismos aseguran la adaptación a los cambios en el medio y la supervivencia de la célula u organismo.

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas en transducción de señales. Un grupo fosfato de una proteína puede interactuar con otros aminoácidos de la misma proteína o de otras proteínas formando puentes de hidrógeno o salinos (ion-ion), lo cual provoca cambios en las propiedades físico-químicas de dicha proteína y puede modificar su actividad enzimática, inducir una interacción con otra proteína, cambiar su localización subcelular, etc. (Kobir *et al.*, 2011).

La adición de un grupo fosforilo puede ocurrir en 9 de los 20 aminoácidos que componen las proteínas (Ser, Thr, Tyr, Arg, Lys, His, Cys, Asp y Glu). La fosforilación en histidina (His) y ácido aspártico (Asp) es predominante en sistemas de señalización bacterianos, mientras que la fosforilación en serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) es la más abundante en eucariotas (Pereira *et al.*, 2011). No obstante, ambos sistemas de fosforilación se pueden encontrar tanto en procariotas como en eucariotas (Stock *et al.*, 2000).

Los **mecanismos de transducción de señales descritos en bacterias** son de cuatro tipos: sistemas de un componente, sistemas de dos componentes, factores σ de tipo ECF (*extracitoplasmic function*) y Ser/Thr/Tyr quinasas y fosfatasa (Whitworth y Cock, 2008; Muñoz-Dorado *et al.*, 2012, 2014). De los cuatro, sólo dos de ellos conllevan procesos de fosforilación: los sistemas de dos componentes y las Ser/Thr/Tyr quinasas.

Los **sistemas de dos componentes** representan el sistema sensorial típico de procariotas. En un sistema de dos componentes prototípico, el primero de los componentes es una **histidina quinasa (HK) sensora** que se autofosforila en un residuo de His al recibir un estímulo ambiental. A continuación, el grupo fosforilo es traspasado al segundo componente, el **regulador de respuesta (RR)**, que lo incorpora en un residuo de Asp. El regulador de respuesta fosforilado se une al ADN. La respuesta consiste generalmente en la expresión de genes que elaboran una respuesta al

estímulo inicial. En la mayoría de los casos, cuando la HK no está recibiendo ningún estímulo, ella misma actúa como fosfatasa para su RR asociado (Capra y Laub, 2012).

Por otro lado, la señalización basada en fosforilación de Ser, Thr y Tyr, aunque es predominante en eucariotas, también existe en numerosas bacterias. Los tres aminoácidos contienen un grupo hidroxilo que funciona como aceptor del grupo fosforilo. Esta reacción de fosforilación es llevada a cabo por la **superfamilia de las Ser/Thr/Tyr quinasas**. Históricamente estas quinasas se creían exclusivas de eucariotas, por eso son también conocidas como ELKs (*eukaryote-like kinases*). La primera ELK eucariota bacteriana fue encontrada en *M. xanthus* por Muñoz-Dorado *et al.* (1991). Desde entonces, la secuenciación de genomas ha revelado la ubicuidad de las Ser/Thr/Tyr quinasas en bacterias. A fecha de 2008 se habían encontrado en 2/3 de los genomas procariotas secuenciados (Pérez *et al.*, 2008). Son especialmente abundantes en especies patógenas y/o con procesos de desarrollo en su ciclo de vida.

Las ELKs de bacterias, eucariotas y arqueas provienen de un ancestro común existente antes de la separación de las tres divisiones. Las quinasas de eucariotas superiores (EPKs, *eukaryote-protein kinases*) evolucionaron posteriormente a partir de dichas ELKs, tras la separación entre bacterias y arqueas/eucariotas (Kennelly, 2014). La superfamilia de las ELKs se subdivide en dos grupos, las Ser/Thr quinasas, y la familia de quinasas BY, que catalizan fosforilaciones en Tyr. Éstas últimas no presentan gran homología con las EPKs y no serán objeto de estudio en este trabajo. Así pues, de aquí en adelante nos centraremos exclusivamente en el estudio de las Ser/Thr quinasas de tipo eucariota, que fosforilan residuos de Ser y Thr, y que presentan una estructura homóloga a las EPKs.

1.2.2. Dominio catalítico Ser/Thr quinasa

La superfamilia de las Ser/Thr quinasas comparte un dominio común conservado desde bacterias a eucariotas superiores, llamado **dominio catalítico o dominio quinasa**, que es el responsable de la actividad enzimática (Taylor *et al.*, 2013b). Pese a no presentar una elevada homología a nivel de secuencia a lo largo de los dominios *Bacteria*, *Eukarya*, *Arquea*, poseen un plegamiento muy similar y un mecanismo catalítico equivalente. El dominio quinasa está definido por la existencia de **12 subdominios**, denominados con números romanos del I al XI, en los que aparecen **12 residuos o motivos** casi invariables que están implicados de forma directa o indirecta en la catálisis (ver figura 1.6) (Hanks y Hunter, 1995; Pereira *et al.*, 2011).

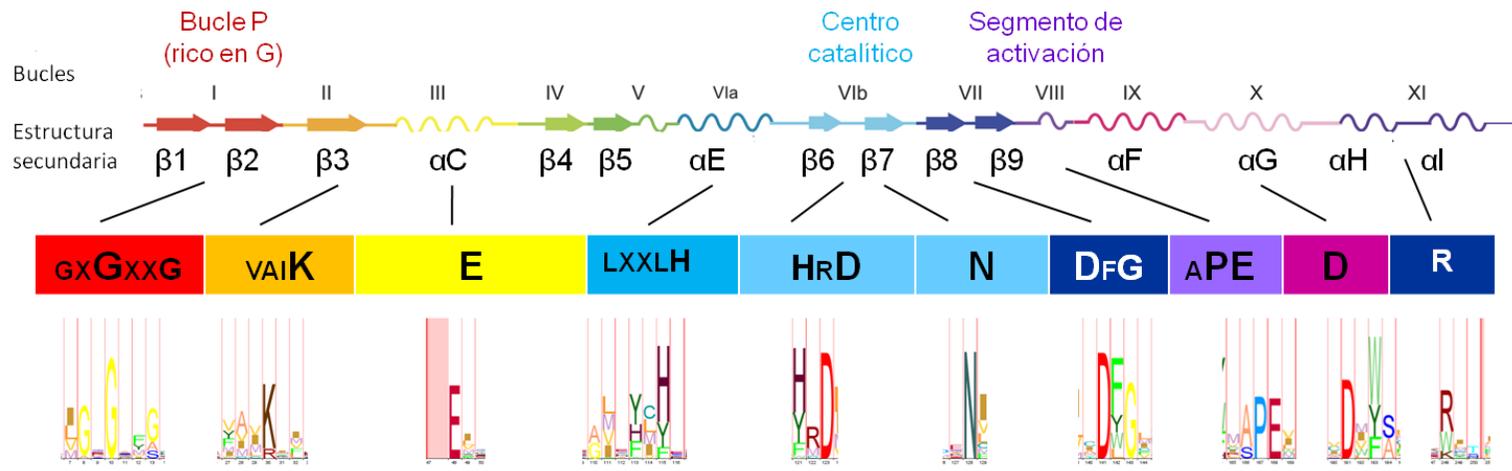


Figura 1.6: Motivos conservados de una Ser/Thr quinasa típica.

Entre los *motivos y residuos conservados*, cabe *profundizar* en los que se describen a continuación. Estos aparecen resumidos en la tabla 1.1.

- En el subdominio I (figura 1.6) se encuentra el **bucle P**, situado entre las hojas β -1 y β -2. Esta porción es rica en glicinas y participa en la correcta orientación del fosfato γ del ATP. Además, interviene en el intercambio de ADP por una nueva molécula de ATP.
- En el subdominio II existe un residuo de **lisina** esencial para la actividad catalítica. Interacciona con los fosfatos α y β de la molécula de ATP y la orienta de forma adecuada. Su papel en la catálisis es tan relevante que las quinasas carentes de este residuo son consideradas **pseudoquinasas** (ver sección 1.2.5) (Eyers y Murphy, 2013).
- En la hélice α -C del subdominio III existe un residuo de **glutamato** que forma un puente salino con el residuo de lisina del subdominio II. Juntos, contribuyen a orientar la molécula de ATP. También puede perderse la actividad catalítica si se pierde este residuo (Meharena *et al.*, 2013).
- En el subdominio VIb, situado entre las hojas β -6 y β -7 se encuentra el **centro catalítico** (Taylor *et al.*, 2013b). Presenta el triplete conservado Y/HRD, responsable de la actividad catalítica. El residuo de ácido aspártico de este motivo se conoce como **base catalítica**, pues es el que promueve la transferencia del grupo fosforilo γ del ATP al residuo de serina o treonina del sustrato. En algunas quinasas no existe el residuo de arginina anterior al aspártico catalítico. Las quinasas que la contienen se conocen como **quinasas RD**, e indica que se activan por autofosforilación, mientras que las quinasas carentes de dicha arginina, denominadas **quinasas no RD**, no se autoactivan. Las quinasas que carecen de la base catalítica se denominan no D y son también consideradas pseudoquinasas (Eyers y Murphy, 2013). En el centro catalítico también hay un residuo de asparagina muy conservado, fundamental para la unión de Mg^{2+} o Mn^{2+} .
- El motivo **DFG** situado entre las hojas β -8 y β -9, es también un elemento conservado. El residuo de aspártico, junto con la asparagina del centro catalítico, une dos átomos de Mg^{2+} o Mn^{2+} , que a su vez contribuyen a orientar los fosfatos β y γ del ATP. El residuo de fenilalanina del motivo DFG se apila contra el residuo de tirosina o histidina del triplete Y/HRD.
- Entre las hojas β 9 y la hélice α F, desde el motivo DFG al motivo S/APE, se expande el **segmento de activación**. Este segmento comprende tres elementos: el bucle de activación, el bucle de unión a Mg^{2+} y el bucle P+1.
- El **bucle de activación**, situado entre la hoja β -9 y el subdominio VIII, es una porción muy flexible y dinámica de la proteína de secuencia altamente variable. Es un elemento clave para la regulación de su actividad enzimática. Esta porción tiene acceso a la hendidura catalítica que se forma cuando la proteína se encuentra plegada en su estructura terciaria. Suele contener residuos de serina y treonina y en las quinasas tipo RD es fosforilado por la propia quinasas para activar o desactivar su propia actividad enzimática (Taylor *et al.*,

Nombre	Motivo conservado	Localización	Función
Bucle P	GxGxxG	Lóbulo N, subdominio I	Orientación del fosfato γ del ATP
Lys	VAIK	Lóbulo N, subdominio II,	Orientación de los fosfatos α y β del ATP e interacción con Glu del subdominio III
Glu	E	Lóbulo N, subdominio III, hoja β 3	Orientación de los fosfatos α y β del ATP e interacción con Lys del subdominio I
Centro catalítico	HRDxKxxN	Lóbulo C, subdominio VIb	Transferencia del grupo fosforilo γ del ATP al sustrato
DFG	KxxDFG	Lóbulo C, subdominio VII	Unión de Mg^{2+} o Mn^{2+} , orientación de los fosfatos β y γ del ATP
Bucle de activación	Muy variable	Lóbulo C, subdominio VIII	Transición entre quinasa activa/inactiva o interacción con otras proteínas
Bucle P+1	S/APE	Lóbulo C, subdominio VIII	Estabiliza la conformación del dominio catalítico

Tabla 1.1: Resumen de los motivos y residuos conservados que definen una Ser/Thr quinasa de tipo eucariota.

2013b) (ver sección 1.2.3). En muchas quinasas, el segmento de activación es una región de interacción con otras proteínas moduladoras de la actividad (Pereira *et al.*, 2011).

- El **bucle P+1** contiene el **motivo S/APE**, situado al inicio de una pequeña hélice alfa, que es clave para estabilizar la conformación tridimensional del dominio catalítico. El bucle P+1 interviene en la interacción quinasa-sustrato, y parece ser que determina la especificidad de la quinasa, es decir, si el residuo que fosforila es serina o treonina (Pereira *et al.*, 2011).

La función de cada motivo conservado se manifiesta una vez la quinasa está plegada en su forma tridimensional. Las Ser/Thr quinasas adquieren una estructura **bilobular**. El **lóbulo amino-terminal (N)** abarca los subdominios I-IV y está formado en su mayor parte por láminas beta antiparalelas (ver figuras 1.6 y 1.7). Está implicado principalmente en la unión y orientación de la molécula de ATP, donante del grupo fosforilo. Por otro lado, el **lóbulo carboxilo-terminal (C)** abarca los subdominios VI-XI. Consiste sobretodo de hélices alfa que lo hacen globular y de mayor tamaño. Es el encargado de unir el sustrato y el principal responsable de la fosfotransferencia. Entre los dos lóbulos se forma un bolsillo donde se produce la catálisis, denominado **hendidura catalítica**. Ambos lóbulos participan en la unión de dos átomos de magnesio que ayudan a orientar correctamente la molécula de ATP. Una región flexible llamada **región bisagra** es la que conecta ambos lóbulos (figura 1.7). Entre los dos lóbulos se forma una hendidura donde se alberga el **centro catalítico**, y es donde se van a encontrar una molécula de ATP y el sustrato, y se va

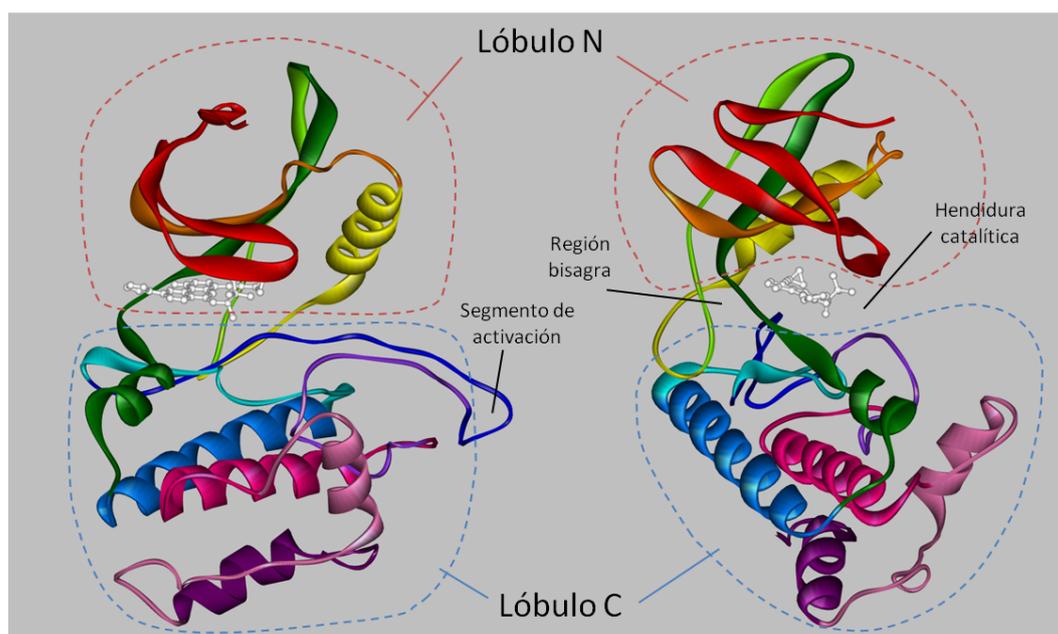


Figura 1.7: Estructura tridimensional del dominio quinasa. Izquierda: vista frontal. Derecha: vista lateral. Los subdominios aparecen coloreados con los mismos colores que en la figura 1.6. Se ha tomado como modelo el dominio quinasa de PknB de *Mycobacterium tuberculosis*, No. acceso en GenBank: CCE35557.1. En la hendidura catalítica aparece representada un análogo del ATP, en color blanco. Modelo generado con I-TASSER (Roy *et al.*, 2010).

a producir la fosfotransferencia (Pereira *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2013b; Meharena *et al.*, 2013).

Tras los recientes análisis computacionales de la estructura tridimensional del dominio quinasa, ha sido propuesto un modelo de organización espacial del núcleo catalítico que ofrece una nueva definición de la Ser/Thr quinasa con actividad catalítica. Este modelo describe un **núcleo catalítico hidrofóbico**, compuesto por dos espinas hidrofóbicas ancladas a una tercera espina que consiste en una hélice α (Taylor *et al.*, 2013b; Meharena *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013a).

La **espinas hidrofóbica o espina H** corresponde a la hélice α -F del subdominio IX (figura 1.8). Ancladas a esta hélice se encuentran la espina catalítica o espina C y la espina reguladora o espina R. Estas espinas están formadas por residuos que aparecen separados en la secuencia aminoacídica, pero que se ubican juntos al plegarse la proteína. La capacidad catalítica de una quinasa depende del correcto ensamblaje de las espinas R y C. Cuando cualquiera de estas espinas está rota por carecer de alguno de los residuos hidrófobos adecuados, la quinasa adquiere una conformación que es inactiva.

La **espinas R** está formada por cuatro residuos hidrofóbicos. Dos pertenecen al lóbulo N, y son el residuo de Tyr/His del motivo Y/HRD y el residuo de Phe del motivo DFG. Los otros dos aminoácidos corresponden al lóbulo C, uno correspondiente a la hélice α -C y otro a la hoja β -4 (figura 1.8). Éstos son variables de una quinasa

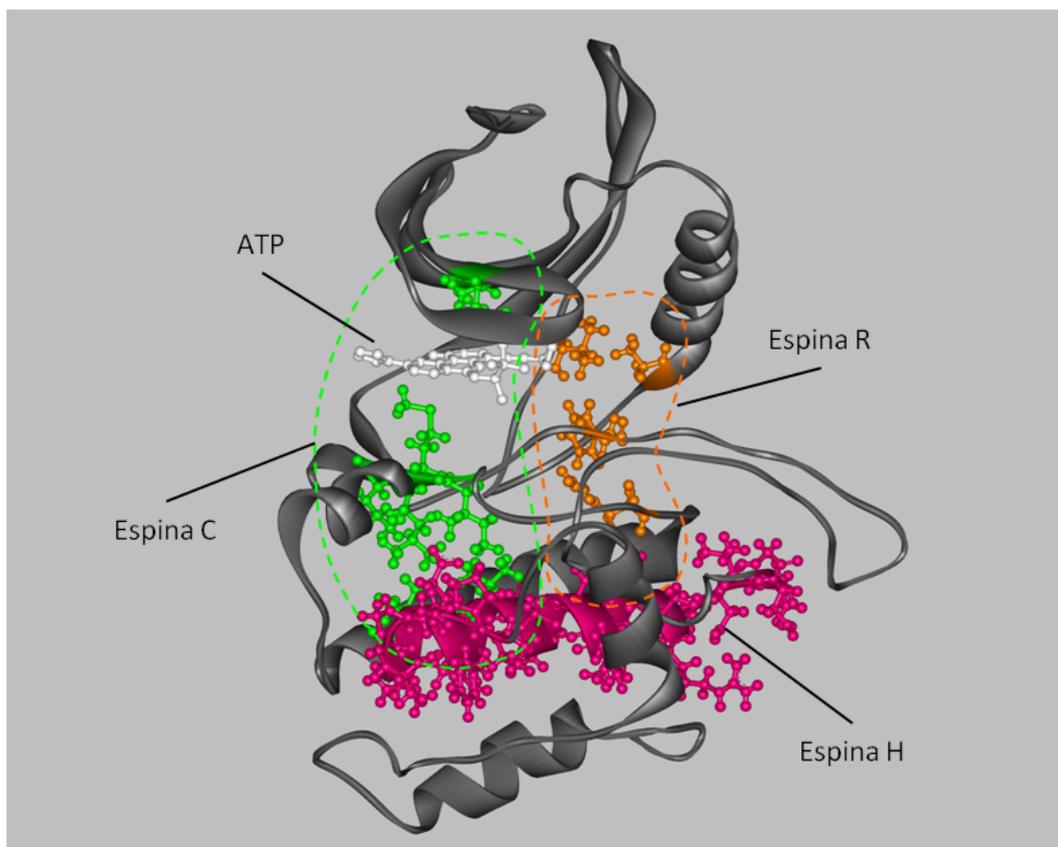


Figura 1.8: Espinas R y C del dominio quinasa. Vista frontal de la quinasa PKA de ratón (*Mus musculus*), No. acceso en GenBank: AAH54834.1. Modelo generado con I-TASSER (Roy *et al.*, 2010).

a otra (en la quinasa PKA de ratón son Leu106, Leu95, Phe185 y Tyr164 (Taylor *et al.*, 2013b)). La espina R es el sello distintivo de una quinasa activa. Cuando la espina R está quebrada o mal ensamblada, la quinasa es inactiva. Así sucede, por ejemplo, en la conformación "DFG-out" (ver sección 1.2.3) donde la espina R se rompe (Taylor *et al.*, 2013b). Muchas veces, el ensamblaje de la espina R forma parte del mecanismo regulador de la quinasa, y a menudo se ensambla correctamente y se estabiliza por fosforilación del bucle de activación.

La **espina C** también está compuesta por 8 aminoácidos hidrofóbicos no consecutivos, procedentes de ambos lóbulos (en PKA de ratón son Val57, Ala70, Leu172, Leu173, Ile174, Met128, Leu227, Met231 (Taylor *et al.*, 2013b)) (figura 1.8). En este caso, un quinto elemento completa la arquitectura de la espina: el anillo de adenina de la molécula de ATP forma parte de la espina C, y conecta los residuos de los lóbulos C y N. Por tanto, la espina C sólo se ensambla adecuadamente tras la unión de una molécula de ATP al centro catalítico, y es entonces cuando la quinasa adquiere la conformación activa necesaria para realizar la catálisis.

1.2.3. Regulación de la actividad Ser/Thr quinasa

Las Ser/Thr quinasas catalizan procesos de fosforilación, pero más que como eficientes catalizadoras, funcionan como **interruptores moleculares** que "encienden" y "apagan" rutas de transducción de señales.

Al igual que un interruptor que puede encenderse y apagarse, el dominio quinasa posee una **conformación activa y otra inactiva**. Sin embargo dentro de estas dos conformaciones aparece una serie de estados conformacionales diferentes. La conformación activa abarca todo el rango de estados posible entre dos posiciones: abierta y cerrada. Durante este estado, se facilita el acercamiento de tres elementos: el fosfato γ del ATP, la base catalítica (Asp) en el motivo catalítico HRD, y el residuo fosfoaceptor, posibilitándose así la fosfotransferencia (Pereira *et al.*, 2011). Por otro lado, las conformaciones inactivas se clasifican en dos tipos, "*DFG-in*" y "*DFG-out*", según la posición (cercana o lejana) del residuo de fenilalanina respecto al motivo DFG (Meharena *et al.*, 2013).

El paso de una conformación activa a inactiva ha de ser rigurosamente regulado. La mayoría de las veces, la **activación** de la quinasa sucede por **fosforilación en el bucle de activación**, bien por autofosforilación, o bien por transfosforilación por parte de otra quinasa (Pereira *et al.*, 2011). En bacterias encontramos un ejemplo en el mecanismo de activación de la quinasa PknB de *M. tuberculosis*. Esta Ser/Thr quinasa forma dímeros tras unir un ligando por su extremo carboxilo extracelular. Se cree que esta dimerización provoca la autofosforilación intermolecular del bucle de activación, en el que uno de los monómeros funciona como quinasa y otro como sustrato (Lombana *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas evidencias apuntan también a una posible autoactivación intramolecular, en forma monomérica (Damle y Mohanty, 2014). Aunque el mecanismo de activación no es completamente conocido, actualmente hay descrito un modelo de regulación, que ha sido representado en la figura 1.9.

Las quinasas que reconocen sus propios segmentos de activación y se autofosforilan para activarse siempre tienen una arginina y un aspartato en su centro catalítico,

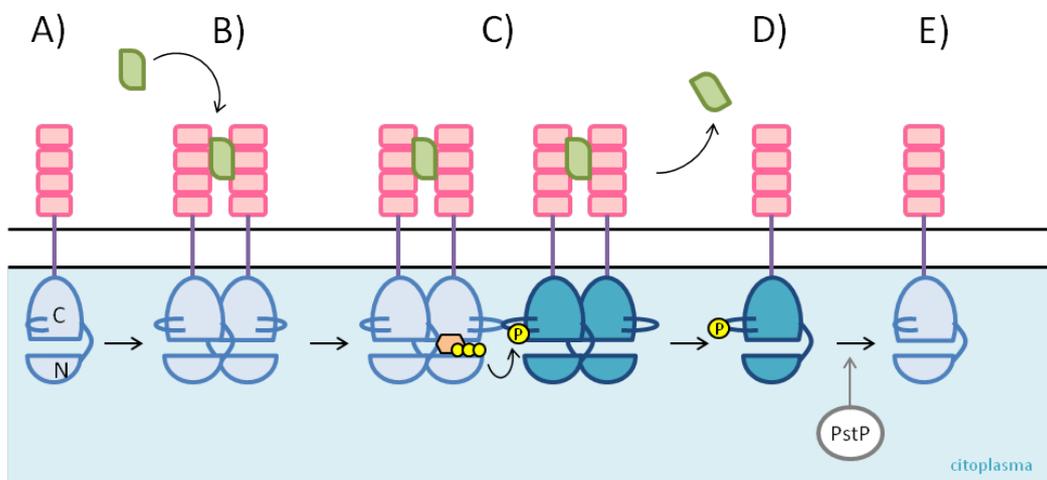


Figura 1.9: Modelo de la Ser/Thr quinasa regulación de PknB. A) La quinasa PknB inactiva (quinasa celeste) presenta en forma monomérica y sin fosforilar. B) PknB forma dímeros tras unir monómeros de peptidoglucano (verde) a través de sus dominios PASTA extracelulares (rosa). Esta dimerización provoca un cambio conformacional en el dominio quinasa, que adopta una conformación activa. C) Esta conformación activa desencadena una transfosforilación en el bucle de activación de otro dímero, que provoca la activación de la quinasa para la fosforilación de otros sustratos (quinasa azul oscuro). D) Al disociarse los dímeros, los monómeros permanecen activos y amplifican la señal. E) La Ser/Thr fosfatasa PstP desfosforila los monómeros de PknB, devolviéndolos a su conformación inactiva. Adaptado de Lombana *et al.* (2010).

tras la histidina catalítica, por eso reciben el nombre de **quinasas RD**. En ellas, la conformación espacial del segmento de activación está típicamente regulada por fosforilación. El bucle de activación es una región sin estructura α o β definida, flexible, dinámica y regulable, muy sensible a las fosforilaciones (Johnson *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2013b). La adición de un fosfato provoca una conformación estable del propio bucle que permite el acceso de un sustrato al centro catalítico para ser fosforilado. A esta estabilización contribuye la Arg de las quinasas RD. Una vez activas, las quinasas fosforilan su sustrato utilizando otra molécula de ATP. Hay quinasas que aún siendo clasificadas como RD tienen que ser activadas por otras quinasas mediante transfosforilación, o ser fosforiladas en otros lugares diferentes al segmento de activación (Johnson *et al.*, 1996).

Existe otro tipo de quinasas, denominadas **quinasas no-RD**. Carecen de arginina previa a la base catalítica, y en ningún caso se autofosforilan ni son fosforiladas por otras en el segmento de activación, sino que se activan por otros mecanismos (Johnson *et al.*, 1996). A través de procesos como la dimerización u otra interacción proteína-proteína, unión a efectores alostéricos, percepción de segundos mensajeros o ligandos por parte de dominios reguladores o sensores, etc., se producen cambios conformacionales en la quinasa. Estos cambios en sí mismos provocan una reordenación del bucle de activación, que lleva a la quinasa a su conformación activa para fosforilar el sustrato.

Para "apagar los interruptores", las quinasas han de ser defosforiladas. La reacción catalizada por las Ser/Thr quinasas une un grupo fosforilo al aminoácido fosfoceptor mediante enlace fosfoéster, que es mucho más estable que el enlace fosforamidato creado por las histidina quinasas. Es por eso que el grupo fosforilo ha de ser retirado siempre por una **Ser/Thr fosfatasa**. Las quinasas junto con las fosfatasas funcionan de forma antagónica para encender y apagar rutas de transducción de señales. Otra diferencia respecto a los sistemas de dos componentes, es que la correlación entre número de quinasas y fosfatasas en un genoma no es tan exacta como la existente entre HKs y RRs (Kennelly, 2014), y el número de fosfatasas suele ser menor que el de quinasas.

Además de la regulación de las rutas de señalización mediante coordinación entre quinasas y fosfatasas, existe regulación cruzada entre Ser/Thr quinasas y otros sistemas. Existen casos de factores sigma ECF y sistemas de dos componentes que se coordinan con quinasas en una misma ruta (Stock *et al.*, 2000; Inouye y Nariya, 2008; Burnside y Rajagopal, 2012). Estas rutas cruzadas incrementan la complejidad de los mecanismos reguladores, haciendo que las respuestas a estímulos sean más diversificadas y precisas.

1.2.4. Funciones de las Ser/Thr quinasas en bacterias

El dominio quinasa es la unidad funcional conservada en la superfamilia de las Ser/Thr proteínas quinasa, pero en cada Ser/Thr quinasa está asociado a diferentes dominios adicionales. Éstos son altamente variables, y ello se traducirá en una gran variedad de funciones y mecanismos de control. Generalmente estos dominios van a tener función de reconocimiento de ligandos o interacción proteína-proteína (Pereira *et al.*, 2011).

Las Ser/Thr quinasas de eucariotas están muy estudiadas, debido a que en humanos muchas de ellas están asociadas a enfermedades (Meharena *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013b). En humanos, el 1-2 % de los genes codificantes de proteínas son Ser/Thr proteínas quinasa (518 EPKs) (Taylor *et al.*, 2013b; Graves *et al.*, 2013). Regulan numerosos procesos biológicos, y entre sus principales funciones incluyen regulación de la transcripción y la traducción, crecimiento y proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, apoptosis, reordenamiento del citoesqueleto y metabolismo (Duong-Ly y Peterson, 2013).

En bacterias, las funciones son similares a eucariotas, interviniendo en la regulación de muchos procesos biológicos. Se han encontrado Ser/Thr quinasas bacterianas que controlan procesos como **movilidad, agregación, diferenciación, germinación de esporas, división celular, metabolismo secundario, adaptación al estrés, resistencia a antibióticos y virulencia** (Inouye y Nariya, 2008; Shah *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011; Burnside y Rajagopal, 2012; Ruggiero *et al.*, 2012; Page y Krause, 2013).

Un buen ejemplo de regulación de **procesos de desarrollo**, es el caso del ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. Existe una cascada de fosforilación en la que intervienen dos Ser/Thr quinasas, Pkn8 y Pkn14, que fosforilan el factor transcripcional MrpC, impidiendo su procesamiento durante el ciclo vegetativo evitándose así una entrada prematura en el ciclo de desarrollo (Inouye y Nariya, 2008). Otro ejemplo lo encontramos en el proceso de germinación de las esporas de *Bacillus subtilis*. La germinación puede ser inducida, en parte, mediante la Ser/Thr quinasa sensora PrkC (Shah *et al.*, 2008). Esta quinasa posee dominios PASTA (*pencillin-binding-protein and Ser/Thr kinase-associated*) extracelulares que unen monómeros de peptidoglucano. Cuando estos monómeros liberados por células cercanas en crecimiento son percibidos por PrkC se induce la germinación de la spora.

Tanto en procariotas como eucariotas, las Ser/Thr quinasas presentan un papel importante en la regulación de la transcripción. En algunas bacterias se ha encontrado fosforilación de proteínas ribosómicas por parte de Ser/Thr quinasas. Según Pereira *et al.* (2011), este dato plantea la hipótesis de que las quinasas contribuirían a dirigir la síntesis de proteínas para alternar entre el ciclo vegetativo y de desarrollo.

Sin embargo, la gran mayoría de Ser/Thr quinasas no se encuentran caracterizadas, y se desconoce qué desencadena su fosforilación y qué procesos regulan.

1.2.5. Ser/Thr pseudoquinasas

En humanos, las quinasas disfuncionales están asociadas a muchas enfermedades, incluyendo diabetes, enfermedades cardiovasculares y cánceres. Por ello, se han convertido en importantes dianas moleculares para la búsqueda de nuevos fármacos (Meharena *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013b).

El genoma humano codifica 518 Ser/Thr proteínas quinasa, y se ha encontrado que el 10 % de éstas carece de algún residuo esencial para la catálisis, a pesar de que conservan el plegamiento general de una quinasa. Tradicionalmente, estas quinasas se han clasificado como **pseudoquinasas**, puesto que se tomaron por proteínas inertes,

desprovistas de su actividad catalítica (Eyers y Murphy, 2013; Dar, 2013; Taylor *et al.*, 2013b).

Realmente, sólo unas pocas de estas pseudoquinasas están enzimáticamente inactivas, y existen numerosos ejemplos de pseudoquinasas catalíticas. La primera estructura de una pseudoquinasa humana, WNK1, fue resuelta por Min *et al.* (2004), y se descubrió que, a pesar de carecer de la lisina conservada del subdominio II, otro aminoácido básico ocupaba ese lugar y la quinasa poseía actividad catalítica. En el caso de CASK, ésta quinasa carece de dos residuos cuyo papel es unir uno de los átomos de Mg, y aún así fosforila su sustrato (Mukherjee *et al.*, 2008).

Por otra parte, es cierto que existen quinasas completamente carentes de actividad catalítica, como VRK3, en la que el sitio de unión al anillo de adenina del ATP está ocupado por dos residuos hidrofóbicos (Scheeff *et al.*, 2009). La función de estas pseudoquinasas no catalíticas pueden no radicar en la fosforilación de un sustrato para llevar a cabo su función biológica, sino en un amplio abanico de otras propiedades. Tendrían que ser consideradas quinasas con actividad inusual. En el caso de VRK3, su papel en la ruta de transducción de señales consiste en ejercer una función de andamiaje, reclutando otras proteínas. Además, hay quinasas catalíticamente inertes que pueden ser fosforiladas por quinasas activas (Gee *et al.*, 2012).

Por ejemplo, la simple unión de ATP, sin efectuar una catálisis, puede hacer pasar a la quinasa de una conformación inactiva a una activa, al igual que ocurre en las proteínas G pequeñas (Eyers y Murphy, 2013). Esta propiedad incluso se puede trasladar a las quinasas catalíticamente activas. Por ejemplo, la proteína B-Raf humana es una quinasa catalítica, que forma dímeros que provocan una transfosforilación en su bucle de activación, para activar a continuación la quinasa ERK. Un mutante de B-Raf incapaz de unir ATP, por tanto podría considerarse una pseudoquinasa, es aún capaz de formar dímeros para accionar ERK y continuar la ruta de transducción de señales (Eyers y Murphy, 2013). B-Raf posee una doble función de andamiaje (*scaffold*) y catalítica (Shaw *et al.*, 2014).

Por tanto, el concepto de pseudoquinasa alberga un conjunto de genes muy heterogéneo, y cada uno de los casos ha de ser estudiado de forma particular para averiguar la capacidad de catálisis y la función que cumple en una ruta de transducción de señales. Ante esta situación, Zeqiraj y van Aalten (2010) propone un **marco de clasificación para pseudoquinasas**:

- **Pseudoquinasas.** Propiamente dichas, que poseen mutaciones en los residuos catalíticos y para las que no se ha detectado actividad catalítica experimentalmente.
- **Pseudoquinasas predichas.** Quinasas carentes de algún residuo catalítico pero para las que no existe ninguna evidencia experimental acerca de su actividad catalítica o falta de ella.
- **Quinasas con baja actividad.** Pseudoquinasas predichas para las que se ha detectado actividad quinasa pero muy baja, comparado con sus parálogas activas.

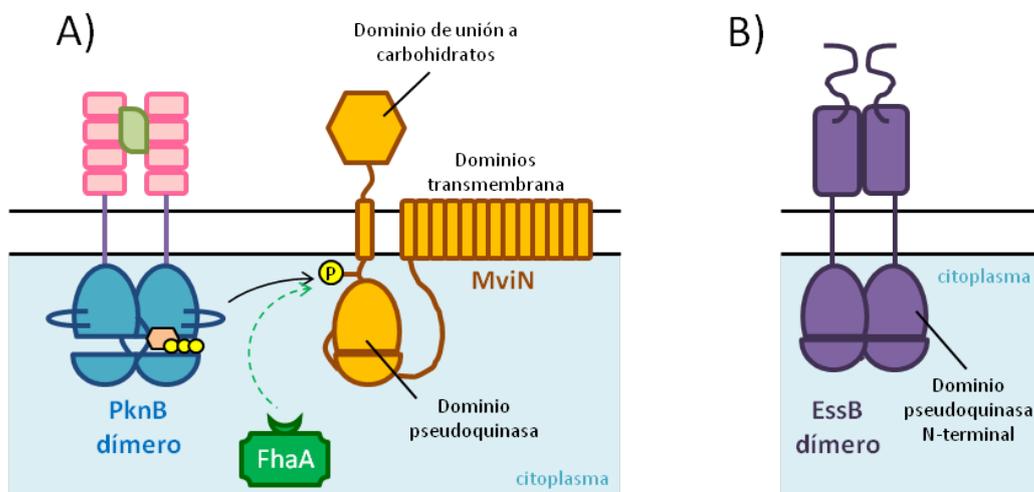


Figura 1.10: Pseudoquinasas en bacterias. A) Mecanismo de regulación de MviN de *M. tuberculosis* (naranja). El dominio pseudoquinasa de MviN es fosforilado por PknB y el residuo fosforilado es reconocido por FhaA. Adaptado de [Gee et al. \(2012\)](#). B) Estructura de EssB de *Staphylococcus aureus*, que contiene un dominio pseudoquinasa citoplasmático. Adaptado de [Martin et al. \(2013\)](#).

- **Pseudoquinasas activas.** Pseudoquinasas predichas para las que se ha detectado actividad catalítica normal pese a albergar mutaciones en los residuos conservados.

La primera **pseudoquinasa bacteriana**, MviN de *Mycobacterium tuberculosis*, fue reportada por [Gee et al. \(2012\)](#). MviN es una proteína integral de membrana que forma parte de la ruta que controla la síntesis de pared celular en bacterias. A diferencia de sus ortólogos en otras bacterias, MviN de *M. tuberculosis* presenta en su extremo carboxilo un dominio Ser/Thr quinasa intracelular, y un dominio extracelular de unión a carbohidratos. La estructura tridimensional del dominio catalítico muestra que el sitio de unión a ATP está ocupado por residuos alifáticos y aromáticos, y en lugar de los motivos HRD y DFG típicos de una quinasa activa aparecen los tripletes LSI y YPA respectivamente. Los experimentos *in vitro* han demostrado que no existe capacidad de fosfotransferencia ni de unión a ATP.

Este dominio quinasa no es catalítico, pero preserva una función reguladora esencial en la síntesis de peptidoglucano. El dominio pseudoquinasa de MviN es fosforilado en un residuo de Thr por parte de la quinasa PknB. Solamente cuando es fosforilado, el residuo de treonina recluta a la proteína FhaA a través de su dominio FHA (del inglés, *forkhead-associated domain*) que reconoce específicamente residuos de fosfotreonina. Este complejo proteico se concentra en los polos y en el *septum* de la célula, lugares de síntesis del peptidoglucano.

En *Staphylococcus aureus* se ha descrito una proteína clasificada dentro de los sistemas de secreción tipo VII (T7SS) denominada EssB. Esta proteína posee un extremo amino bilobular cuya estructura secundaria y terciaria se asemeja a una

Ser/Thr quinasa (Martin *et al.*, 2013). Su ortólogo más próximo es la Aurora-A quinasa humana (Nikonova *et al.*, 2013). La secuencia del lóbulo N-terminal de EssB carece de los residuos implicados en la unión de ATP y en la catálisis. Muestra una porción análoga al segmento de activación de las quinasas, y mediante análisis cristalográficos se ha descubierto que la posición de este segmento es similar a las de las quinasas catalíticamente inactivas. Estos datos muestran que este dominio probablemente no tenga actividad quinasa. Por otro lado, esta proteína conserva homología con una porción de la secuencia de la Aurora-A quinasa, que en esta última está implicada en la interacción entre dominios quinasa. Se ha demostrado, además, que EssB forma dímeros. Esto implica que el papel de EssB se basaría principalmente en establecer interacciones proteína-proteína dentro del complejo proteico del sistema T7SS.

1.3. Ser/Thr quinasas en *Myxococcus xanthus*

Las bacterias cuyos hábitats son nichos ecológicos estables y poseen ciclos de vida simples, como las de vida parásita obligada, codifican genomas de pequeño tamaño y con sistemas de señalización relativamente sencillos. Por el contrario, los microorganismos que viven en ambientes variables, como el suelo o el medio acuático, poseen los genomas más grandes entre los procariotas, y codifican sistemas de señalización más abundantes, variados y sofisticados. También las bacterias con procesos de desarrollo o comportamiento multicelular tienen grandes genomas y numerosos sistemas de señalización (Galperin, 2005; Pérez *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2013).

Las cianobacterias, las actinobacterias y las mixobacterias son grupos de bacterias que cumplen estas dos cualidades, puesto que viven en ambientes inestables y en parte, la adaptación a estas condiciones supone la entrada en el ciclo de desarrollo. Basándonos en lo anterior, no es sorprendente que en mixobacterias se encuentren los genomas más grandes descritos entre los procariotas (Han *et al.*, 2013). Los genomas pueden expandirse por eventos de duplicación de material genético y conservación de las copias parálogas, o bien por transferencia horizontal de material genético de una cepa a otra. Estos dos mecanismos de adquisición de nuevos genes aportan la materia prima sobre la que se construyen y evolucionan nuevas rutas moleculares, entre ellas, rutas de transducción de señales (Capra y Laub, 2012). Las mixobacterias codifican numerosos genes parálogos (Goldman *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008), entre los que cobran gran importancia los implicados en sistemas de señalización.

El número total de genes de TCSs por genoma, típicamente crece como el cuadrado del número de genes total. Es decir, los TCSs presentan una expansión lineal respecto al aumento del tamaño del genoma (Capra y Laub, 2012; Whitworth y Cock, 2008). En mixobacterias, el número de genes codificantes para TCSs aumenta también linealmente con el tamaño del genoma; sin embargo, el número de Ser/Thr quinasas aumenta **exponencialmente** respecto al tamaño del genoma (figura 1.11) (Pérez *et al.*, 2008).

La cepa tipo de *M. xanthus* DK1622 codifica 99 Ser/Thr proteínas quinasa en su genoma (Goldman *et al.*, 2006). Actualmente, además del genoma de *M. xanthus*, hay secuenciados y anotados 12 genomas de mixobacterias, entre las que se encuentran

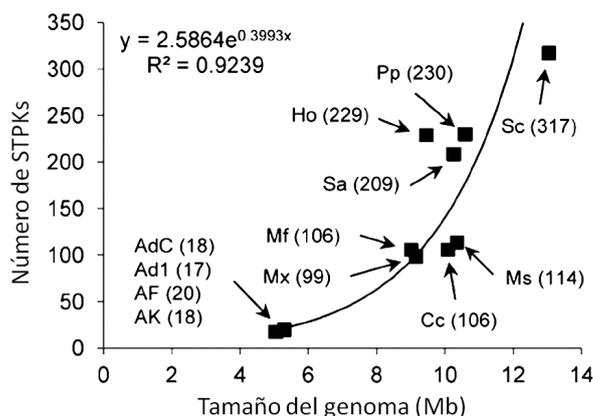


Figura 1.11: Número de Ser/Thr quinasas codificadas en los genomas de mixobacterias. Cada punto representa una especie. AdC: *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C; Ad1: *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1; AF: *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5; AK: *Anaeromyxobacter* sp. K; Mf: *Myxococcus fulvus* HW-1; Mx: *M. xanthus* DK1622; Ho: *Haliangium ochraceum* DSM 14365; Cc: *Corallocooccus coralloides* DSM 2259; Sa: *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1; Ms: *Myxococcus stipitatus* DSM 14675; Pp: *Plesiocystis pacifica* SIR-1; y Sc: *Sorangium cellulosum* So ce56. Los números entre paréntesis indican el número de quinasas codificadas por cada especie. Adaptado de Muñoz-Dorado *et al.* (2014).

varias especies de *Anaeromyxobacter*, las mixobacterias de menor tamaño de genoma, que poseen 17-20 ELKs por genoma, y *Sorangium cellulosum* So ce56, la bacteria con mayor tamaño de genoma que se conoce hasta en momento, con 317 ELKs (Figura 1.11) (Pérez *et al.*, 2008; Muñoz-Dorado *et al.*, 2014). Recientemente se ha descrito una cepa de *S. cellulosum*, So0157-2, una mixobacteria que puede crecer en rangos de pH neutro hasta alcalino. En esta cepa, las quinasas representan la mayor familia de parálogos codificada en su genoma (Han *et al.*, 2013).

¿Por qué han sido preferiblemente las ELKs, y no los TCSs clásicos, los sistemas que se han duplicado y diversificado en organismos con grandes genomas como las mixobacterias? Presumiblemente, la arquitectura modular de las quinasas, junto con la posibilidad de formar cascadas de fosforilación, los hace mecanismos de transducción de señales regulables a muchos niveles, y muy adecuadas para coordinar los procesos tan complejos que ocurren del ciclo de vida de las mixobacterias. Cuanto mayor sean la abundancia y la variabilidad de estas proteínas, más precisa podrá ser la regulación del ciclo de vida (Pérez *et al.*, 2008).

La existencia de rutas de transducción de señales mediadas por ELKs no sustituye la señalización mediante TCSs, sino que los diferentes sistemas se integran para formar nuevas rutas. Las mixobacterias poseen redes reguladoras en las que intervienen sistemas de dos componentes, factores sigma y quinasas de tipo eucariota. Como ejemplo de esta integración, se ha descrito en *M. xanthus* un mecanismo de señalización que integra TCSs y ELKs. Se trata de la regulación de MrpC (un regulador de respuesta huérfano que interviene en el ciclo de desarrollo) mediante un sistema de transducción de señales que incluye dos Ser/Thr quinasas y el propio regulador de respuesta MrpC (Inouye y Nariya, 2008) (ver sección 1.2.4).

La secuenciación del genoma de *M. xanthus* reveló las 99 Ser/Thr proteínas quinasa que codifica esta bacteria en su genoma (Goldman *et al.*, 2006). En un experimento realizado con *M. xanthus* en el que se inactivaron estos 99 genes por inserción de un plásmido, se demostró que al menos 20 de las 99 quinasas son esenciales para llevar a cabo el ciclo de desarrollo. Estos 20 mutantes mostraron deficiencias en la formación de los cuerpos fructíferos, en la esporulación y/o en la movilidad social (Ueki y Inouye, 2006; Pérez *et al.*, 2008).

En *M. xanthus*, las Ser/Thr quinasas parecen estar especialmente involucradas en regular la formación de los cuerpos fructíferos. Por ejemplo, las quinasas Pkn1, Pkn2 y Pkn5 retrasan o inhiben la formación de los cuerpos, ya que su inactivación acelera la velocidad de formación. Por el contrario, las proteínas quinasa Pkn6 y Pkn9 aceleran la fructificación, ya que al ser inactivadas ésta se retrasa (Castañeda García, 2008; Inouye y Nariya, 2008; Muñoz-Dorado *et al.*, 2014).

Las quinasas de *M. xanthus* presentan diferentes localizaciones subcelulares, según los análisis bioinformáticos elaborados hasta el momento. De las 99 Ser/Thr proteínas quinasa, 60 son proteínas transmembrana, 55 de ellas con el dominio regulador expuesto al periplasma, y sólo 5 con ambos dominios, catalítico y regulador, expuestos al citoplasma; 36 son solubles en el citoplasma, y 6 aparecen unidas a la membrana interna (Castañeda García, 2008).

La mayoría de las Ser/Thr quinasas de mixobacterias presentan una organización modular. El dominio quinasa suele aparecer en la porción N-terminal y su secuencia está altamente conservada. Por otro lado, existe una gran variedad de dominios acompañando al dominio quinasa, situados generalmente en la porción C-terminal de la quinasa. Se han descrito Ser/Thr proteínas quinasa con dominios reguladores de unión a segundos mensajeros como cAMP, cGMP, dominios de unión a fosfotreonina (FHA), y dominios TPR de interacción con proteínas. Pero la mayoría de ellos son de función desconocida y sólo se han encontrado en mixobacterias. La gran diversidad de dominios reguladores y la existencia de dominios únicos en este grupo de bacterias indica que las Ser/Thr quinasas participan en una amplia variedad de procesos, muchos de ellos exclusivos de mixobacterias, que al ser tan complejos necesitan numerosos y novedosos niveles regulación (Castañeda García, 2008; Inouye y Nariya, 2008; Pérez *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011).

Al alinear el dominio catalítico de las Ser/Thr proteínas quinasa de *M. xanthus* con una secuencia consenso para Ser/Thr proteínas quinasa, se ha comprobado que los motivos que definen a una quinasa de tipo eucariota están muy conservados en la mayoría. Sin embargo 18 de ellas presentan cambios o mutaciones en estos residuos importantes. Se han detectado quinasas con dominios atípicos, carentes de aminoácidos clave para la catálisis: por ejemplo, dominios carentes de la lisina del subdominio II, cuya función es unir el anillo de adenosina del ATP; carentes del ácido aspártico catalítico en el motivo HRD del subdominio VIb, responsable de la fosfotransferencia al residuo aceptor; o carentes del aspártico que une Mg^{2+} del subdominio VII. Se han nombrado a estas Ser/Thr proteínas quinasa como quinasas no-K, no-D1 y no-D2, respectivamente. Además, dentro de la clasificación de quinasas RD y no-RD, en *M. xanthus* se han encontrado 11 quinasas no-RD que no se autoactivan por fosforilación en el bucle de activación, por lo cual habrán de ser reguladas mediante otros mecanismos, posiblemente a nivel de otros dominios (Pérez *et al.*, 2008).

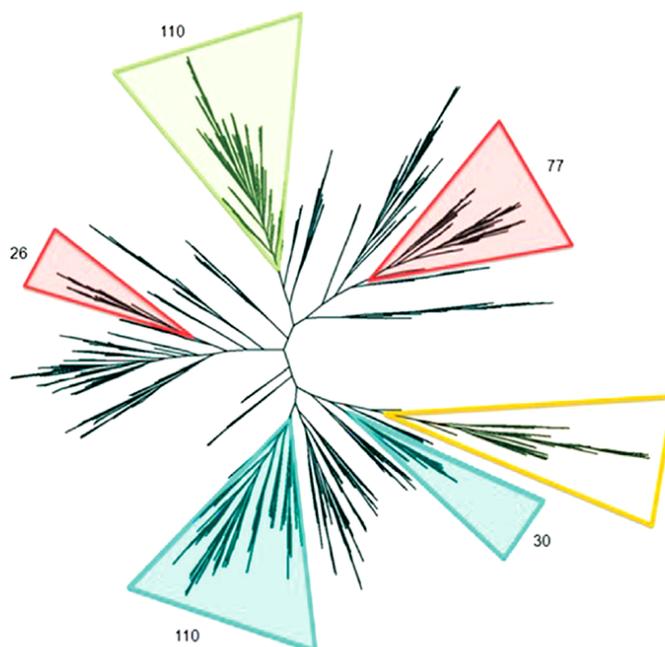


Figura 1.12: Árbol filogenético de los dominios quinasa en mixobacterias. Se ha elaborado en base principio de parsimonia. Los triángulos rojo, verde y azul marcan los *clusters* formados por dominios ELKs pertenecientes al suborden *Cystobacterineae* (*Stigmatella*, *Myxococcus*, y *Anaeromyxobacter*), *Nannocystineae* (*Plesyocystis pacifica*), y *Sorangineae* (*S. cellulosum*), respectivamente. En cada triángulo se indica el número de ELKs. El triángulo naranja indica una rama con genes parálogos y ortólogos de la quinasa MXAN_4053, que aparecen en los 3 subórdenes mencionados. Tomado de Pérez *et al.* (2008).

Los estudios filogenéticos indican que muchas duplicaciones génicas en mixobacterias se producen tras la especiación. En un árbol filogenético realizado con los dominios catalíticos de las ELKs de las mixobacterias, los dominios quinasa se agruparon por especies, en general (figura 1.12). Sin embargo, algunos dominios de *M. xanthus* se agruparon en el mismo cluster junto a dominios quinasa de *S. aurantiaca* y *A. dehalogenans*, dentro del suborden *Cystobacterineae* al que pertenecen. Esto quiere decir que estos dominios quinasa presentan mayor homología con los dominios de otras especies, que con otros dominios intraespecíficos, y por tanto se consideran genes ortólogos. Estas especies probablemente comparten vías de regulación en las que intervienen estas Ser/Thr quinásas ortólogas (Pérez *et al.*, 2008). Algunos de estos genes se han escogido para la realización de este trabajo.

En procariontes, el término **sintenia** describe la conservación del orden de los genes ortólogos en los genomas de otras especies (Bentley y Parkhill, 2004). La sintenia a gran escala es escasa en mixobacterias, sin embargo son comunes las zonas donde se conserva una microsintenia. En las mixobacterias analizadas, algunos de los *clusters* de genes que contienen Ser/Thr quinásas mantienen la microsintenia de unas especies a otras dentro del suborden *Cystobacterineae* (Pérez *et al.*, 2008). Un ejemplo de microsintenia conservada son los genes que rodean al gen *pkn3* de *M. xanthus*,

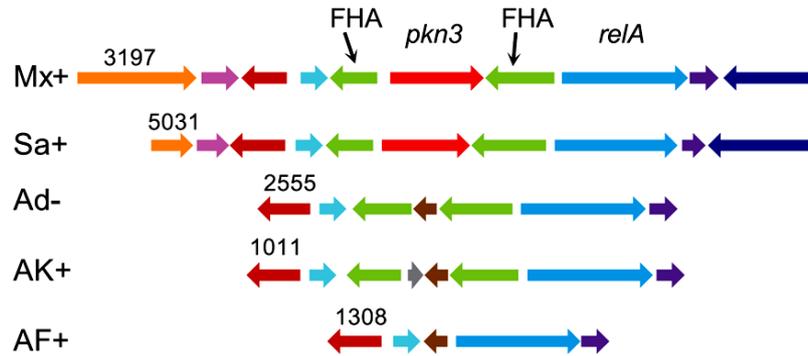


Figura 1.13: Microsinetia alrededor de los genes *pkn3* y *relA*. Los genes representados del mismo color codifican proteínas homólogas. Los números indican la posición del gen en el genoma de cada especie. Mx: *M. xanthus*; Sa: *S. aurantiaca*; Ad: *A. dehalogenans*; AK: *Anaeromyxobacter sp. K*; AF: *Anaeromyxobacter sp. Fw109-5*. Los símbolos + y - indican si los genes se transcriben en la hebra de ADN directa o la complementaria, respectivamente. Tomado de Pérez *et al.* (2008)

que codifica una Ser/Thr quinasa (figura 1.13). En *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, esta quinasa aparece integrada en un cluster junto al gen *relA*. Este cluster también conserva la microsinetia en las especies de *Anaeromyxobacter*, aunque en éstas no está presente la Ser/Thr quinasa. Estos análisis demuestran que existe concordancia entre filogenia, sintenia y taxonomía.

La integración de datos de secuenciación genómica y transcriptómica junto con datos procedentes de estudios experimentales suponen un paso adelante para dilucidar el papel de estas quinasas en la transducción de señales bacteriana. El objetivo global de esta tesis doctoral es descubrir el papel que cumplen algunas de estas ELKs en el ciclo de vida de *M. xanthus*, y describir las rutas de transducción de señales en las que intervienen. Con ello pretendemos contribuir a una mejor comprensión del ciclo de vida de la bacteria modelo *M. xanthus* en particular, y de los procesos de multicelularidad y desarrollo bacteriano en general.

Parte II

Objetivos

Objetivos

De acuerdo con lo expuesto en el capítulo de introducción (capítulo 1), como objetivo global para desarrollar esta tesis doctoral se propuso identificar el papel desempeñado por las parejas de Ser/Thr quinasas duplicadas, *i.e.*, los genes MXAN_1233, MXAN_1234, MXAN_2176, MXAN_2177, MXAN_3182, MXAN_3183, MXAN_4841 y MXAN_4842. Para ello, el objetivo global se subdividió en las siguientes propuestas:

- Caracterización bioinformática de las ocho Ser/Thr quinasas en base a sus secuencias de ADN y de aminoácidos. Este trabajo se desarrolla en el capítulo 4.
- Determinación del perfil de expresión génica de las Ser/Thr quinasas durante el ciclo de vida de *M. xanthus*. En este apartado se engloba el capítulo 5.
- Construcción de mutantes de delección en fase de *M. xanthus* carentes de las Ser/Thr quinasas, y caracterización fenotípica de los mismos. Este trabajo se desarrolla en los capítulos 6, 7, 8, 9 y 10.
- Determinación de la ruta de transducción de señales en la que estas Ser/Thr quinasas participan. En base a este apartado se elaboró el capítulo 11.

Parte III

Material y métodos

Capítulo 2

Materiales

2.1. Microorganismos

Cepa	Fenotipo	Aplicación en esta tesis	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Strr</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Transformación de plásmido puro y mezclas de ligación	Invitrogen
<i>E. coli</i> BTH101	<i>F</i> -, <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Doble híbrido bacteriano	Euromedex
<i>M. xanthus</i> DK1622	Silvestre	Cepa silvestre (WT)	(Kaiser, 1979)

Tabla 2.1: Cepas bacterianas utilizadas

El genoma de la cepa *M. xanthus* DK1622 ha sido secuenciado ([Goldman *et al.*, 2006](#)) y se encuentra disponible en numerosas bases de datos (ver sección 2.7).

2.2. Medios de cultivo

2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

Medio LB (Miller, 1972)

Utilizado para crecimiento regular de *E. coli*. Para preparar LB sólido, se adicionó agar al 1,5 %.

Componentes	Concentración
Triptona	1 %
Extracto de levadura	0,5 %
NaCl	1 %
NaOH	Hasta ajustar a pH 7,2

Tabla 2.2: Componentes del medio LB

Medio Agar-MacConkey (DIFCO ®)

Utilizado para los ensayos cualitativos del sistema de doble híbrido bacteriano (DHB) (secciones 3.5.2 y "resultados").

Componentes	Concentración (g/L)
Digerido pancreático de gelatina	17,0
Peptonas	3,0
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
NaCl	5,0
Agar	13,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
pH final	7,1 ± 0,2

Tabla 2.3: Componentes del medio Agar-MacConkey

2.2.2. Medios de cultivo para *M. xanthus*

Medio CTT

Medio de cultivo para crecimiento vegetativo. El medio CTT se complementó con agar al 1,5 % para medio sólido en placas de Petri.

Componentes	Concentración
Casitona	1 %
MgSO ₄	0,2 %
Tampón fosfato pH 7,6	1 mM
Tampón Tris-HCl pH 7,6	10 mM

Tabla 2.4: Componentes del medio CTT

Medio CF

Medio de cultivo inductor de ciclo de desarrollo.

Componentes	Concentración
Casitona	0,015 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	8 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 mM
Tampón Tris-HCl pH 7,6	10 mM
Piruvato sódico	0,1 %
Citrato sódico	0,2 %
Agar	1,5 %

Tabla 2.5: Componentes del medio CF

2.2.3. Componentes adicionados a los medios de cultivo

- **Kanamicina (Sigma)** Este antibiótico se añadió siempre a una concentración de 40 µg/mL, excepto al medio CTT sólido, que se añadió a 80 µg/mL.
- **Ampicilina (Sigma)** Este antibiótico se añadió al medio a una concentración de 100 µg/mL.
- **Galactosa (Sigma)** Este monosacárido se añadió al 1 % al medio CTT para seleccionar colonias portadoras de una delección (sección 3.7.1).

- **Maltosa (Sigma)** Este disacárido se añadió al 1 % al medio MacConkey para el ensayo de DHB (sección 3.5).
- **X-gal (Biosynth AG)** El 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido (X-gal) se adicionó a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los ensayos cualitativos de actividad β -galactosidasa.
- **FeCl₃ (Sigma)** Se añadió al medio CF sólido a una concentración de 0.5 mM para el ensayo de acumulación de Fe³⁺ intracelular en cepas de *M. xanthus*.
- **CuSO₄ (Sigma)** Se añadió al medio CF/CTT para ver sus efectos en el fenotipo de *M. xanthus*.
- **IPTG (Roche)** Se añadió al medio MacConkey como análogo no hidrolizable de la lactosa, para inducir la expresión génica en el ensayo de DHB.

2.3. Vectores

Vector	Aplicación	Descripción	Referencia
pBJ113	Mutantes de delección en fase	<i>galK</i> Kan ^r	(Julien <i>et al.</i> , 2000)
pKY481	Fusiones transcripcionales entre el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y un gen diana	<i>LacZY</i> Kan ^r	(Cho y Zusman, 1999)
pKNT25	Doble híbrido bacteriano	Kan ^r T25 de CyaA (fusión N-terminal)	Euromedex
pKT25	Doble híbrido bacteriano	Kan ^r T25 de CyaA (fusión C-terminal)	Euromedex
pUT18	Doble híbrido bacteriano	Amp ^r T18 de CyaA (fusión N-terminal)	Euromedex
pUT18C	Doble híbrido bacteriano	Amp ^r T18 de CyaA (fusión C-terminal)	Euromedex

Tabla 2.6: Vectores

2.4. Cebadores

En esta sección, se detallan los cebadores diseñados y utilizados durante este trabajo. Dichos cebadores fueron sintetizados por la casa comercial Sigma. Las dianas para enzimas de restricción aparecen destacadas en mayúscula.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
Mxan1233KpnLac	tcGGTACCcacgagagccgcaggttgct	pKY-1233 <i>lacZ</i>
Mxan1233BamLac	gaGGTACCtgcggcgccgcaagtggag	
Mxan2176KpnLac	gaGGTACCccatggcggaacaagcggaa	pKY-2176 <i>lacZ</i>
Mxan2176BamLac	tcGGATCCatggagttcccccggaagca	
MXAN3182Kpnlac	tgGGTACCagcccaaccttcagccgca	pKY-3182 <i>lacZ</i>
MXAN3182Bamlac	tcGGATCCatggagttcccccgagaca	
MXAN4842Kpnlac	gcGGTACCgctcgttctcgctggggag	pKY-4842 <i>lacZ</i>
MXAN4842Bamlac	tcGGATCCatggggttccccagaggcc	
MXAN1233Kpn	gaGGTACCtgcggcgccgcaagtggag	Brazo 3' en pBJ- Δ 1233
MXAN1233Bam1	atGGATCCcatggagccctcgagaagc	
MXAN1233Bam2	gcGGATCCtgagatcccgaaggacgt	Brazo 5' en pBJ- Δ 1233
MXAN1233Pst	ccCTGCAGcatctcaggcgcaaataga	
MXAN1234Kpn	tcGGTACCcacgagagccgcaggttgct	Brazo 3' en pBJ- Δ 1234
MXAN1234Bam1	acGGATCCcatccagccgagggaacgcc	
MXAN1234Bam2	cgGGATCCtgaccgcagacggggcggg	Brazo 5' en pBJ- Δ 1234
MXAN1234Pst	ccCTGCAGtacgacttcgctggtgaa	
MXAN2176Kpn	gaGGTACCccatggcggaacaagcggaa	Brazo 3' en pBJ- Δ 2176
MXAN2176Bam1	aaGGATCCcacgggtcatggggtcaaaa	
MXAN2176Bam2	gcGGATCCtgaccgcagggggacgtaa	Brazo 5' en pBJ- Δ 2176
MXAN2176Pst	ccCTGCAGAagcatctccggtgacgagt	
MXAN2177Kpn	ctGGTACCtaccgcaggggaaccacg	Brazo 3' en pBJ- Δ 2177
MXAN2177Bam1	aaGGATCCcacgggtcatggggtcaaaa	
MXAN2177Bam2	gcGGATCCtgaggggctccccaggggc	Brazo 5' en pBJ- Δ 2177
MXAN2177Pst	gcCTGCAGaccgacacctctccagggc	
MXAN3182Hind	tgAAGCTTtagcccaaccttcagccgca	Brazo 3' en pBJ- Δ 3182
MXAN3182Bam1	atGGATCCcatggagttcccccgagac	
MXAN3182Bam2	gtGGATCCtgagcgtcgcaaaagacgta	Brazo 5' en pBJ- Δ 3182
MXAN3182Eco	caGAATTCccggtgatgagtagaagtgg	
MXAN3183Hind	cgAAGCTTgacccctccacattccgcgc	Brazo 3' en pBJ- Δ 3183
MXAN3183Bam1	gcGGATCCcatgccgttgcccctcgtgt	
MXAN3183Bam2	cgGGATCCtgattgatgtgcttctgagcv	Brazo 5' en pBJ- Δ 3183
MXAN3183Eco	tcGAATTCaccgtcgccccgaagaaga	

... continúa en la página siguiente

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
MXAN4841Hind	cgAAGCTTcagaggagacagggcgctcct	Brazo 3' en pBJ- Δ 4841
MXAN4841Bam1	cgGGATCCtgaccgactggggcgcat	
MXAN4841Bam2	acGGATCCcatccatccagccgagggaaacgcc	Brazo 5' en pBJ- Δ 4841
MXAN4841Eco	ccGAATTCgctgctgacgggcccctgaga	
MXAN4842Hind	caAAGCTTAcatgaagaggtccgagcgc	Brazo 3' en pBJ- Δ 4842
MXAN4842Bam1	cgGGATCCatgagagccccgaaaggacg	
MXAN4842Bam2	atGGATCCcatggggtgccccagaggc	Brazo 5' en pBJ- Δ 4842
MXAN4842Eco	cgGAATTCgctcgttctcgcgtggggag	
LcsAKpnF	cggGGTACCgctgcttcaacggcattcat	Amplificación <i>PcuoA</i>
LcsABamR	ttgGGATCCatgaagcctcttcaagaatg	
DHB1233BamHI	cgaGGATCCcatgaacgtgatttcgatat	MXAN_1233 para DHB
DHB1233KpnI	ccgGGTACCcagggccagcggtaacgac	
DHB1234BamHI	cctGGATCCgatgcggcaggtagcttctt	MXAN_1234 para DHB
DHB1234KpnI	tctGGTACCcaggacgtcgtcacgtcatc	
4276LacZKpn	ggGGTACCttaggggattcactcatcgc	pKY- <i>spi-lacZ</i>
4276LacZBam	ggGGATCCatggggcctccgtggatgt	
3464LacZKpn	actGGATCCcgattgcgttcctgctccatg	pKY- <i>fmgE-lacZ</i>
3464LacZBam	cctGGTACCtgaatcctgggtggcggeg	
pKY FW	cagcgagtcagtgagcgagg	Comprobación <i>spi-lacZ</i>
CheckLacZ4276RV	cgggtcaacagcgacgac	
pKY FW	cagcgagtcagtgagcgagg	Comprobación <i>fmgE-lacZ</i>
CheckLac3464RV	cgtccttgactgcaaggcg	

Tabla 2.7: Cebadores para PCR

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
seqpKNT25FW	agttagctcactcattaggc	Insertos pKNT25 y pUT18 Fw
seqpKNT25RV	tttttccttcgccacggcc	Insertos pKNT25 Rv
seqpKT25FW	cgacatgttcgccattatgc	Insertos pKT25 Fw
seqpKT25RV	ctcttcgctattacgccagc	Insertos pKT25 Rv
seqpUT18RV	tcgtagcggaaactggcgacg	Insertos pUT18 Rv
seqpUT18CFW	tgggctgggagccgcgcccg	Insertos pUT18C Fw
seqpUT18CRV	atgccgggagcagacaagcc	Insertos pUT18C Rv
pKY FW	cagcgagtcagtgagcgagg	Insertos en pKY481 Fw
pKY RV	cgccagggttttccagtc	Insertos en pKY481 Rv

Tabla 2.8: Cebadores para secuenciación

2.5. Soluciones

Solución	Componentes	Utilización
Tampón PM2	70 mM Na ₂ HPO ₄ , 30 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM MgSO ₄ , 0,2 mM MnSO ₄ (pH 7,0)	Determinación de actividad β-galactosidasa (DHB)
Tampón Z	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,01 M KCl, 0,001 MgSO ₄ , 0,05 M β-mercaptoetanol	Determinación de actividad β-galactosidasa <i>M. xanthus</i>
TM	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM MgSO ₄	Lavado, re-suspensión y lisis.
TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)	Lavado, re-suspensión y lisis.

... continúa en la página siguiente

Solución	Componentes	Utilización
TAE	40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8,0)	Electroforesis ADN
Tampón de carga (5x)	0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol, 30 % glicerol	Electroforesis ADN
Solución de despurinación	0,25 N HCl	Southern blot
Solución de desnaturalización	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH	Southern blot
Solución de neutralización	Acetato sódico 3 M (pH 5,5)	Southern blot
SSC (20x)	3 M NaCl, citrato sódico 0,3 M (pH 7,0)	Southern blot
Tampón maleico	150 mM NaCl, 100 mM ácido maleico (pH 7,5)	Southern blot
Solución de hibridación	DIG Easy Hyb (Roche)	Southern blot
Solución de equilibrado I	2xSSC, 0,1 % SDS	Southern blot
Solución de equilibrado II	0,1xSSC, 0,1 % SDS	Southern blot

... continúa en la página siguiente

Solución	Componentes	Utilización
Solución de lavado	3 % (p/v) Tween 20 en tampón maleico	Southern blot
Solución de bloqueo	1 % (p/v) de reactivo de bloqueo (Roche) en tampón maleico	Southern blot
Solución de detección	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ (pH 9,5)	Southern blot
Solución de desarrollo color	de 200 μ L de NTB/BCIP (Roche) en de 10 mL de solución de detección	Southern blot

Tabla 2.9: Soluciones

2.6. Kits y reactivos comerciales

- **Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega).** Obtención de ADN genómico de *M. xanthus*.
- **Reactivo de Bradford (BioRad).** Determinación de la concentración de proteínas.
- **High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).** Obtención de ADN plasmídico (*miniprep*).
- **PrimeSTAR DNA Polymerase (Takara).** Polimerasa de alta precisión (mínima tasa de mutación) para amplificación de fragmentos de ADN por PCR.
- **Enzimas de restricción (Roche y Fermentas).** Digestión de ADN.
- **ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche).** Ligación de ADN.
- **GelRed[®].** Tinción de ADN tras electroforesis.
- **Molecular Weight Marker II (Roche).** Patrón de bandas (0,5-25kb) para electroforesis de ADN en agarosa, procedente del ADN del fago λ digerido con la enzima *HindIII*.
- **Papel filtro Whatman 3MM.** Southern blot.

- **Hybond-N⁺ (GE Healthcare)**. Membrana para transferencia Southern blot.
- **DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche)**. Kit para marcaje y detección de la sonda de ADN con digoxigenina para Southern blot.
- **Dig Easy Hyb (Roche)**. Reactivo de bloqueo para Southern blot.
- **ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido)**. Medida de la actividad β -galactosidasa.

2.7. Bases de datos y servidores

- **BLAST** Alineamientos para secuencias de ADN (BLASTn) y proteínas (BLASTp). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- **ClustalW2** Alineamientos múltiples para ADN y proteínas. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- **ESPrpt 3.0** (Robert y Gouet, 2014). Tratamiento gráfico de alineamientos múltiples. <http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>
- **I-TASSER** (Roy *et al.*, 2010). Modelaje 3D de proteínas y predicción de funciones. <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- **KEGG** (Kanehisa *et al.*, 2014). Genoma de *M. xanthus*. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mx
- **NCBI** Base de datos de información genómica y proteómica. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- **NPS@** (Combet *et al.*, 2000). Contiene diversas herramientas bioinformáticas, entre ellas programas de alineamientos múltiples para ADN y proteínas. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html
- **OCTOPUS** (Viklund y Elofsson, 2008). Predicción de dominios transmembrana. <http://octopus.cbr.su.se/index.php>
- **Phylogeny.fr** (Dereeper *et al.*, 2008). <http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>
- **Pfam 27.0** (Finn *et al.*, 2013). Base de datos de familias de proteínas. <http://pfam.xfam.org>
- **Pubmed** Base de datos bibliográfica y genomas completos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **STRING 9.1** (Franceschini *et al.*, 2013). Predicción de interacciones proteína-proteína. <http://string-db.org/>
- **SOSUI**. Predicción de regiones transmembrana. <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>

- **TMHMM**. Predicción de regiones transmembrana y localización subcelular de una proteína. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- **TopPred**. Predicción de regiones transmembrana. <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>
- **Xanthusbase** Base de datos sobre mixobacterias. <http://xanthus.openmods.org/>

Capítulo 3

Métodos

3.1. Cultivo de microorganismos

Cultivo de *E. coli* Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido se utilizó siempre medio LB. Los cultivos se inocularon partiendo de una única colonia, y se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación.

Para el cultivo en medio sólido, *E. coli* se sembró en estría o con espátula de Driglasky sobre placas de medio LB o MacConkey conteniendo 1.5 % de agar. Se incubaron rutinariamente a 37 °C durante la noche, excepto para los ensayos de doble híbrido bacteriano, que se incubaron a 30 °C durante varios días (3.5.2). En caso de ser necesario, se adicionaron al medio X-gal, maltosa, o los antibióticos correspondientes.

Cultivo de *M. xanthus* El crecimiento vegetativo de *M. xanthus* se realizó en medio de cultivo CTT. Los cultivos se incubaron a 30 °C con 300 rpm de agitación. Para su cultivo en medio sólido, las bacterias se sembraron en gotas, en estría o en sobrecapa sobre placas de CTT con agar al 1.5 % y fueron incubadas a 30 °C durante varios días. Se añadieron componentes adicionales (sección 2.2.3) al medio cuando correspondió.

Para la inducción del ciclo de desarrollo, *M. xanthus* se cultivó en medio CF, pobre en nutrientes. Para ello, los cultivos vegetativos líquidos se concentraron previamente a $DO_{600}=15$, y se inocularon en forma de gotas de 10-20 μL de volumen sobre las placas. La incubación se realizó a 30 °C durante varios días. En caso de ser necesario, se añadieron componentes adicionales al medio (sección 2.2.3).

3.2. Conservación de microorganismos

Conservación de *E. coli* Las estirpes de *E. coli* fueron conservadas a partir de cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0,5-1$) al que se añadió glicerol estéril a una concentración final del 24 %. Se conservaron alícuotas de 1 mL en crioviales a -80°C. Para recuperar las células se procedió a raspar la superficie de la alícuota congelada con un asa de siembra estéril y se sembró en estría sobre medio LB sólido, añadiendo el antibiótico apropiado en caso de ser necesario.

Conservación de *M. xanthus* Las estirpes de *M. xanthus*, tanto las silvestres como las manipuladas genéticamente, fueron conservadas a partir de cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0,8-1$), al que se añadió glicerol estéril a una concentración final del 24%. Se conservaron alícuotas de 1 mL en crioviales a -80°C . Para recuperar las células se procedió a descongelar una alícuota completa y se resembraron 200 μL en forma de gotas sobre una placa de CTT sólido, con el antibiótico apropiado cuando fue necesario.

3.3. Técnicas rutinarias de manipulación de ADN

3.3.1. Extracción de ADN genómico

La purificación de ADN genómico de *M. xanthus* fue necesaria para realizar PCRs y Southern blots. Se partió de una muestra de 1-3 mL cultivo líquido vegetativo crecido hasta $DO_{600}=1$. Para ello se utilizó un kit comercial de purificación de ADN genómico (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante para bacterias Gram negativas. Las células se rompen en solución de lisis. Las proteínas son precipitadas con sulfato amónico y el material genético se obtiene mediante precipitación en isopropanol y lavado con etanol al 70%. Finalmente el ADN obtenido se resuspende en tampón de elución del kit.

3.3.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico (*miniprep*) amplificado en células de *E. coli* se utilizó el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche según el protocolo del fabricante. Las células de *E. coli* se lisan en un medio fuertemente alcalino para precipitar ADN genómico y proteínas. El ADN plasmídico es purificado haciendo pasar la mezcla de lisis por un filtro proporcionado por el kit, y posteriormente eluido.

3.3.3. Amplificación de ADN por PCR

La amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite obtener un elevado número de copias de una secuencia concreta, generadas por una ADN polimerasa termoestable a partir de una pareja de cebadores que flanquean la región de ADN molde que se desea amplificar (Saiki *et al.*, 1988).

Muchos cebadores utilizados en esta tesis (2.4) han sido diseñados incluyendo sitios de restricción cohesivos, inexistentes en la secuencia original, para controlar la orientación de clonación del fragmento amplificado en el vector correspondiente.

Los componentes adicionados en la mezcla de reacción aparecen en la tabla 3.1, y las condiciones estándar que se usaron para la reacción se exponen en la tabla .

50 pmol de cada cebador.
 0,2 mM de cada dNTP.
 25 μ L de tampón de reacción 2x (Contiene $MgCl_2$).
 10 % DMSO.
 2,5 U de polimerasa PrimeSTAR (Takara).
 15-30 ng de ADN molde (plasmídico o genómico).
 Agua Milli-Q[®] hasta completar 50 μ L.

Tabla 3.1: Mezcla de PCR

Fase	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}C$)	Tiempo (min)
Desnaturalización	1	94	10
Amplificación	30		
Desnaturalización	1	94	1
Hibridación	1	50-68	1
Elongación	1	72	1-3
Elongación	1	72	12

Tabla 3.2: Condiciones estándar para la reacción de PCR

3.3.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción de tipo II cortan el ADN por secuencias palindrómicas específicas para cada enzima, y son de uso rutinario en los laboratorios de biología molecular. Los fragmentos digeridos con una misma enzima presentan extremos compatibles, lo que facilita la unión de ambas secuencias entre sí a través de estos extremos cohesivos. Las enzimas utilizadas en este trabajo pertenecen a las casas comerciales Roche y Fermentas, y se utilizaron según instrucciones del fabricante, realizando incubaciones de varios minutos a varias horas, generalmente a 37 $^{\circ}C$. La digestión de ADN con una única enzima de restricción se ha realizado mediante una reacción que incorpora 5-10 unidades de endonucleasa por cada microgramo de ADN, utilizando el tampón suministrado por la casa comercial correspondiente. La digestión con dos enzimas es posible, siempre que el tampón sea común y exista suficiente distancia entre las dianas.

3.3.5. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de fragmentos de ADN es catalizada por la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). Esta enzima une de forma covalente, mediante enlace fosfodiéster,

los extremos compatibles de dos segmentos de ADN. Este proceso ha sido utilizado para la clonación de fragmentos de ADN de forma orientada en un vector, siendo ambos digeridos con enzimas de restricción que generaron extremos compatibles.

Para la reacción de ligación se incorporaron 20 ng de vector junto con 40 ng de fragmento a clonar, siguiendo una relación molar 1:2. A esta mezcla se le añadió 1 unidad de ADN ligasa de T4, así como tampón de la ligasa que contiene Mg^{2+} y ATP. La reacción se realizó a 16 °C durante la noche en un volumen final de 20 μ L.

La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* para amplificar los vectores con inserto procedentes de la ligación, añadiendo al medio un antibiótico selectivo.

3.3.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR o clonados en un vector ha sido realizada por el Centro de Instrumentación Científica 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).

3.3.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN en función de su tamaño se consigue mediante electroforesis, que se basa en la migración diferencial de las moléculas de ADN de diferentes tamaños durante el desplazamiento a través de una matriz polimérica por la acción de un campo eléctrico. La agarosa se utiliza como matriz de separación para fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 0,5-25 kb. Se han utilizado geles a una concentración de agarosa de 0,7%, preparada en tampón TAE 1x (sección 2.5). Esta técnica de rutina se ha utilizado para comprobar la presencia de productos de PCR, digestiones con enzimas de restricción o tras la purificación de ADN plasmídico o genómico. Las condiciones estándar de corrida de los geles fueron 120 V (voltaje constante) durante unos 30 min, en cubetas de electroforesis horizontal (BioRad) con tampón de electroforesis TAE 1x.

La tinción de los geles de agarosa se ha realizado con una solución de 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, o GelRed[®], preparada en TAE 1x durante 10 min. Estos compuestos se intercalan en la doble hebra de ADN, permitiendo la visualización de las distintas bandas electroforéticas, por emisión de fluorescencia bajo la luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (Molecular Weight Marker II de Roche).

La electroforesis de ADN en gel de agarosa también se ha empleado para el aislamiento de fragmentos puros de ADN a partir de una mezcla. Para ello, tras la separación de los fragmentos en un gel de agarosa, se recortó la porción de gel que contenía la banda de interés y se purificó con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

3.3.8. Transferencia de ADN a células

Transferencia de ADN a *E. coli*

La transferencia de ADN a células de *E. coli* permite seleccionar y amplificar plásmidos procedentes de una mezcla de ligación así como de una *miniprep* pura. El vector concede a la bacteria la capacidad de crecer en un medio selectivo con antibiótico, de manera que solo crecerán en placa aquellas células que contengan el plásmido. La introducción de plásmidos en *E. coli* se puede realizar mediante dos procedimientos: transformación por choque térmico o electroporación.

Transformación por choque térmico La bacteria es sometida a un choque térmico que permite al ADN extracelular entrar al citoplasma. Previamente es necesario preparar las células para permeabilizar la membrana celular mediante un tratamiento con CaCl_2 , obteniendo así células competentes.

Para preparar células competentes se partió de un cultivo de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600}=0,5-1$). Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. El *pellet* se resuspendió en 1 volumen de 10 mM MgSO_4 y se incubó durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones y se incubaron en hielo, resuspendidas en 0,5 volúmenes de 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 8), durante otros 15 min. Por último, las células se recuperaron nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en 0,05 volúmenes de 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 8) y 20 % glicerol, y se repartieron en alícuotas de 100 μL que se conservaron a -80 °C hasta ser utilizadas.

Para realizar la transformación, se mezclaron 50 μL de células competentes de *E. coli* con 1-10 ng de plásmido o mezcla de ligación, y se incubó la mezcla durante 30 min en hielo. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico (42 °C durante 2 min) y seguidamente se añadieron 0,4 mL de LB líquido. Se realizó una incubación previa, de 60 min a 37 °C en agitación, donde las células expresaron la resistencia a antibióticos conferida por el plásmido. A continuación, las células se sembraron en medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37 °C durante la noche, hasta la aparición de colonias.

Electroporación Mediante este método, las células electrocompetentes de *E. coli* son sometidas a una breve descarga eléctrica de elevado voltaje, facilitando la entrada de ADN a través de poros generados en la membrana. Este método presenta mayor eficiencia de captación de ADN en comparación con la transformación por choque térmico.

Para preparar células electrocompetentes se partió de un cultivo de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600}=0,5-1$). Las células se lavaron 3 veces con agua Milli-Q[®] estéril helada para eliminar las sales. Tras cada proceso de lavado, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C y finalmente, se resuspendieron en 0,002 volúmenes de glicerol estéril al 10 % (p/v), permaneciendo conservadas a -80 °C en alícuotas de 100 μL .

Para la electroporación, se mezclaron 50 μL de células de *E. coli* electrocompetentes con 1 μg de ADN plasmídico previamente dializado. La mezcla obtenida se

transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de ancho (BioRad) y se aplicó un pulso eléctrico (2,5 kV, 129 Ω) durante 5-10 ms. Tras el choque eléctrico, se añadió 1 mL de LB líquido, se incubaron las células durante 1 h a 37 °C con 200 rpm de agitación para permitir la expresión de la resistencia a antibióticos. Se realizaron diluciones para obtener colonias separadas y se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado, para luego incubar a 37 °C durante una noche.

Transferencia de ADN a *M. xanthus*

La transferencia de ADN a *M. xanthus* se realizó mediante electroporación, según describieron [Kashefi y Hartzell \(1995\)](#). El proceso consiste en la aplicación de una breve descarga eléctrica a elevado voltaje sobre células electrocompetentes de *M. xanthus*. Este choque eléctrico genera poros momentáneos en las membranas por los que se produce la entrada del ADN en la bacteria.

Para preparar células electrocompetentes de *M. xanthus* se partió de 1,5 mL de cultivo líquido crecido a una $DO_{600}=1$, y se centrifugó 2 min a 10000 rpm y a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con agua Milli-Q[®] estéril, y tras descartar el volumen de agua las células se concentran en un volumen menor (40 μ L).

El ADN plasmídico fue dializado para retirar las sales, y se tomó 1 μ g para la electroporación. La electroporación se realizó mezclando ADN y células concentradas en una cubeta de electroporación de 1 mm de ancho (Bio-Rad) y se sometió a un pulso eléctrico (0,65 kV, 200 Ω y 25 μ F) con el electroporador GenePulser Xcell de Bio-Rad durante 5-10 ms. Justo después de aplicar la descarga eléctrica, se añadió 1 mL de CTT líquido a la cubeta, y se incubó la mezcla en un matraz con CTT líquido sin antibiótico durante 6-8 h, para permitir la expresión del gen de resistencia a antibiótico presente en el vector. Tras esta incubación, se sembraron las células en sobrecapa en CTT sólido con el antibiótico apropiado, y se incubaron las placas durante varios días hasta que aparecieron colonias visibles. Los plásmidos no pueden replicarse de forma autónoma en la mixobacteria, y se integran en el cromosoma de *M. xanthus* mediante recombinación homóloga.

3.4. Southern blot

La técnica de Southern blot o hibridación Southern ([Southern, 1975](#)) es empleada para estudiar la existencia de genes y su organización en el genoma, mediante el mapeo de sitios de restricción que existen en fragmentos de ADN genómico para los que se fabrica una sonda de ADN específica. Este método se ha utilizado en esta tesis durante la construcción de mutantes de delección, para comprobar la presencia o ausencia de determinados genes ([3.7.1](#)).

La técnica de Southern blot consta de una serie de pasos que se describen a continuación. En primer lugar se digirió el cromosoma a analizar siguiendo el protocolo descrito en la sección [3.3.4](#). Esta digestión, normalmente con un único enzima, genera fragmentos de ADN que permiten diferenciar entre cepas que han sido modificadas

genéticamente. Seguidamente, los fragmentos generados se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (3.3.7), dejando correr el gel durante la noche a bajo voltaje (20-30 V) para obtener una mejor resolución de las bandas. Al día siguiente se visualizó el gel y se anotaron las distancias recorridas por las bandas del marcador molecular. Posteriormente, se procedió a desnaturalizar el ADN y se transfirió del gel de agarosa a una membrana. Por otra parte, se amplificó mediante PCR el fragmento que se utilizaría como sonda de ADN. El ADN fijado en la membrana se hibridó con la sonda marcada, y se procedió al revelado para la detección de las bandas específicas. Cada uno de los pasos se detallará a continuación.

3.4.1. Desnaturalización del ADN

Es necesario separar la doble hebra del ADN para que más adelante sea posible su hibridación con la sonda. Para ello, el gel en el que se realizó la electroforesis se sumergió en solución de despurinación durante 3 min, para romper enlaces de hidrógeno entre bases púricas. A continuación el gel se lavó dos veces, durante 15 min cada una, con solución de desnaturalización para separar por completo la doble hebra de ADN. Finalmente, el pH básico de las soluciones previas fue neutralizado con solución de neutralización durante 30 min, para mantener la doble hélice separada. Trascurrido el proceso de desnaturalización, el gel se empapó con solución 2x SSC. La composición de las soluciones utilizadas se describe en la tabla 2.9.

3.4.2. Transferencia y fijación del ADN a una membrana

La transferencia y fijación de los fragmentos de ADN a un soporte sólido es necesaria para poder relacionar una banda durante el revelado con un fragmento de ADN concreto. Para ello, se colocó el gel sobre tres papeles de filtro Whatman 3MM humedecidos en 20x SSC, en contacto con un tampón compuesto por solución de transferencia 20x SSC contenida en una bandeja. Sobre el gel se situó en contacto directo una membrana Hybond-N⁺ (GE Healthcare), previamente humedecida en 2x SSC. Encima de la membrana, se situaron otros tres papeles de filtro Whatman 3MM empapados en 2x SSC y por último se depositó una pila de servilletas de papel secas comprimidas por un peso, que absorbieron la solución de transferencia, produciéndose la transferencia del ADN del gel a la membrana por capilaridad. El ADN queda retenido en la membrana ocupando la misma posición que presentaba en el gel. El proceso de transferencia se prolongó durante una noche. Al día siguiente se procedió al lavado de la membrana con 200 mL de 2x SSC durante 10 min en agitación y se fijó el ADN a la membrana mediante incubación a 80 °C durante 2 h.

3.4.3. Marcaje de la sonda

Para fabricar la sonda se partió de un fragmento amplificado por PCR cuya secuencia estaba contenida en los fragmentos de ADN genómico que se deseaban observar tras el revelado. Este fragmento de PCR fue previamente desnaturalizado por calor, para después ser empleado como molde por la polimerasa de Klenow. Esta polimerasa sintetiza una cadena complementaria a partir de hexanucleótidos marcados con DIG-11-dUTP, de manera que se incorpora un nucleótido marcado con digoxigenina cada 20-25 pb en el ADN sintetizado. El marcaje de fragmentos de ADN se realizó siguiendo el procedimiento descrito por el kit DIG DNA Labeling.

3.4.4. Hibridación con una sonda marcada

Una vez que el ADN de cadena sencilla estuvo fijado a la membrana, ésta se preparó para la hibridación. Previamente se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la sonda a la membrana, mediante una incubación de 4 h a 42 °C en solución de hibridación (tabla 2.9) con agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se descartó la solución de hibridación y se añadió solución de hibridación nueva conteniendo la sonda marcada, desnaturalizada por calor, a una concentración final de 5-25 ng/ mL. La hibridación se mantuvo durante la noche, incubado la membrana con la sonda a 42 °C con agitación suave. Durante el tratamiento de hibridación se produce la unión selectiva de las cadenas sencillas de la sonda a las cadenas sencillas complementarias de los fragmentos de ADN genómico fijados en la membrana.

Transcurrida la hibridación, la sonda no hibridada se eliminó lavando la membrana dos veces durante 5 min con solución de equilibrado I, y otras dos veces más con solución de equilibrado II durante 15 min cada una (tabla 2.9).

3.4.5. Revelado y detección

El revelado de las bandas se realizó mediante la detección con anticuerpos anti-digoxigenina portadores de fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP). Esta enzima genera un producto coloreado que permite visualizar las bandas a las que se adhirió la sonda.

El procedimiento de revelado se realizó siguiendo el protocolo indicado por el kit de marcaje de la sonda (sección 2.6). En este proceso, la membrana se lavó 5 min en tampón de lavado (tabla 2.9) y se incubó con 100 mL de solución de bloqueo (tabla 2.9) durante 30 min en agitación fuerte. A continuación, la membrana se incubó 30 min en nueva solución de bloqueo con el anticuerpo anti-DIG-AP (dilución 1:10000 del stock), en agitación. Tras esta incubación, se lavó el exceso de anticuerpo con tampón de lavado dos veces durante 15 min.

Entonces, la membrana se equilibró durante 5 min en 20 mL de tampón de detección (tabla 2.9) y se introdujo en una bolsa de plástico sellada que contenía solución de desarrollo de color (tabla 2.9), que contiene BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), sustrato para la fosfatasa alcalina, y NTB (azul de nitro-tetrazolio), que actúa como oxidante. El enzima hidroliza el BCIP y genera un compuesto que al oxidarse se torna de color morado. La membrana fue incubada en oscuridad hasta la aparición de bandas coloreadas de morado, y la reacción se detuvo lavando con agua destilada.

3.5. Doble híbrido bacteriano

Se utilizó un sistema de doble híbrido bacteriano (DHB) para detectar posibles interacciones entre proteínas en un sistema *in vivo*. El sistema BACTH (*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid*) diseñado por Karimova *et al.* (1998) se basa en las propiedades de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertusis*. Esta enzima consta de dos subunidades, denominadas T25 y T18, que necesitan estar en contacto físico para transformar el ATP en AMPc, y no son activas por separado (Figura 3.1, apartados

A y B). Al fusionar dos proteínas que interaccionan a cada una de las subunidades de la adenilato ciclasa, la actividad enzimática se reconstituye y se produce AMPc (Figura 3.1, apartado C). El AMPc producido se unirá a la proteína CAP (proteína activadora por catabolitos) y se activará la transcripción los operones *lac* y *mal*, que actuarán como genes reporteros. Así, utilizando una cepa de *E. coli* carente de actividad adenilato ciclasa (*cya-*) como hospedadora, podemos revelar interacciones proteicas fusionando nuestras proteínas problema a las subunidades T25 y T18 de la adenilato ciclasa.

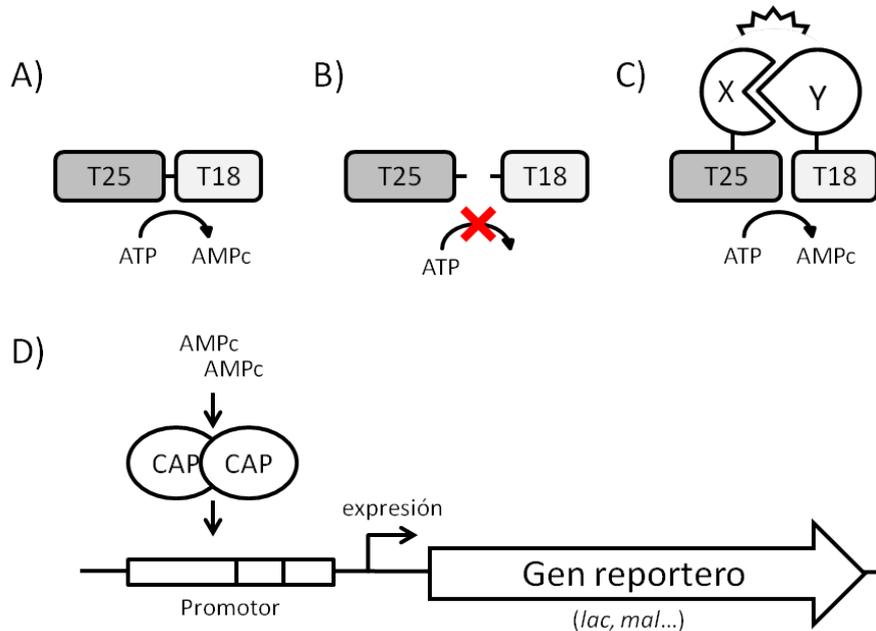


Figura 3.1: Funcionamiento del sistema de doble híbrido bacteriano (BACTH). A) La adenilato ciclasa requiere que las dos subunidades T25 y T18 se encuentren en contacto para funcionar y sintetizar AMPc. B) Cuando se encuentran separadas no se sintetiza AMPc. C) La actividad de la adenilato ciclasa puede reconstituirse cuando se fusionan las dos subunidades a dos proteínas que interaccionan entre sí, recuperándose la actividad enzimática y la síntesis de AMPc. D) La síntesis de AMPc provoca la unión de la proteína activadora del catabolismo (CAP) a la región promotora del operón *lac* de *E. coli*, y activará la expresión de los genes reporteros.

3.5.1. Construcción de los vectores

El kit del sistema BACTH incluye cuatro vectores de clonación, pKNT25, pKT25, pUT18 y pUT18C, que permiten realizar proteínas de fusión con las subunidades T25 y T18 de la adenilato ciclasa, tanto en el extremo amino como en el carboxilo. Este sistema permite analizar múltiples combinaciones de proteínas de fusión, puesto que algunas combinaciones podrían presentar problemas para la interacción.

pKT25 Este vector permite construir proteínas de fusión, fusionando una proteína problema al extremo carboxilo de la subunidad T25.

pKNT25 Permite fusionar una proteína problema al extremo amino de la subunidad T25.

pUT18 Este vector permite fusionar una proteína problema al extremo amino de la subunidad T18.

pUT18C Permite fusionar la proteína problema al extremo carboxilo de la subunidad T18.

El sistema incluye además un control positivo constituido por la pareja de vectores pKT25-Zip y pUT18C-Zip, que contienen un motivo de cremallera de leucina fusionado a las subunidades T25 y T18 respectivamente [Karimova *et al.* \(1998\)](#).

Los genes escogidos para el ensayo se amplificaron mediante PCR (3.3.3). Se diseñó una pareja de cebadores por gen (2.4), de tal manera que el mismo fragmento de PCR pudiese ser clonado en los 4 vectores manteniendo la misma pauta de lectura que la subunidad correspondiente de la adenilato ciclasa. Las enzimas de restricción utilizadas para flanquear los fragmentos de PCR fueron *Bam*HI aguas arriba y *Kpn*I aguas abajo.

3.5.2. Ensayo de la interacción del DHB

Las parejas de plásmidos experimentales y de plásmidos control se introdujeron en la cepa de *E. coli* BTH101 (tabla 2.1) mediante electroporación (sección 3.3.8). Como control positivo se utilizaron los vectores pKT25-Zip y pUT18C-Zip. Como control negativo se utilizaron pKT25 y pUT18C sin inserto. Las colonias *Kan*^r *Amp*^r aparecidas al día siguiente se utilizaron para el análisis de la interacción proteína-proteína, tanto cualitativo como cuantitativo.

Ensayo cualitativo del DHB El análisis cualitativo de la interacción proteína-proteína se realizó como indica el fabricante y mejorándolo según [Battesti y Bouveret \(2012\)](#). Las colonias experimentales *Kan*^r *Amp*^r, así como las colonias control, fueron sembradas simultáneamente en placas de LB sólido + X-gal + Kan. + Amp., y en placas de agar MacConkey + maltosa + Kan. + Amp. Se incubaron réplicas a 28 °C, 30 °C y 37 °C para observar la expresión de los genes marcadores en las interacciones positivas, tal como indica el fabricante. En medio LB + X-gal, se revela la expresión del operón *lac*, apareciendo las colonias positivas coloreadas de azul y las negativas incoloras; en el medio MacConkey se revela la expresión del operón *mal*, apareciendo las colonias positivas de color fucsia intenso y las negativas de color amarillento.

Ensayo cuantitativo del DHB Las interacciones proteína-proteína fueron cuantificadas mediante la medida de la actividad β -galactosidasa, según explica Battesti y Bouveret (2012). Para ello, las colonias cotransformadas con las parejas de vectores adecuadas fueron crecidas en medio LB líquido con Kan. y Amp. durante 6 h. Tras la incubación, los cultivos fueron diluidos 10 veces en tampón TM y se tomó nota de la DO_{600} . Las células fueron permeabilizadas añadiendo 30 μ L de tolueno y 30 μ L de SDS al 0.1% a 1,5 mL de cultivo. La mezcla se agitó brevemente con vórtex y se incubó con agitación vigorosa (300 rpm) a 37 °C durante 30 min.

Para la reacción enzimática, se añadieron 0,1 mL de células permeabilizadas en 0,9 mL de tampón PM2 (tabla 2.9), añadiendo β -mercaptoetanol fresco a concentración final 100 mM. Los tubos donde se llevó a cabo la reacción fueron preincubados a 28 °C durante 5 min. La reacción enzimática se inició añadiendo 0,25 mL de la solución sustrato, compuesta por 0,4% ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) en tampón PM2 sin β -mercaptoetanol, pre-equilibrada a 28 °C. La reacción se detuvo añadiendo 0,5 mL de 1 M Na_2CO_3 cuando se alcanzó una coloración amarilla equivalente a una $absorbancia_{420}=0,8-1,2$.

3.6. Análisis de la expresión génica en *M. xanthus*

3.6.1. Construcción de fusiones *lacZ*

La construcción de cepas de *M. xanthus* portadoras de fusiones entre un gen de la propia mixobacteria y el gen *lacZ* de *E. coli* permite establecer el perfil de expresión de dicho gen de *M. xanthus* a lo largo del ciclo de vida. Para la construcción de estas fusiones se utilizó el vector pKY481 (Cho y Zusman, 1999). Este vector posee el gen *lacZ* de *E. coli* que codifica la enzima β -galactosidasa, y un gen de resistencia a Kan. También posee un sitio de clonación múltiple que permite clonar la región promotora del gen que se pretende analizar, aguas arriba y en la misma pauta de lectura que el gen de la β -galactosidasa. De esta manera la expresión de la enzima β -galactosidasa quedará bajo el control del promotor del gen problema, lo que nos permite determinar el perfil de expresión de dicho gen mediante análisis, cualitativo o cuantitativo, de la actividad enzimática β -galactosidasa.

Para construir los plásmidos se partió de un fragmento de unas 800-900 pb localizado aguas arriba del gen, que contenía la región promotora y el codón de inicio (ver figura 3.2, A). Este fragmento fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *M. xanthus*, utilizando cebadores con sitios de restricción añadidos, diseñados específicamente para cada fusión (sección 2.4). El fragmento se introdujo en el sitio de clonación múltiple del vector, correctamente orientado y manteniendo la pauta de lectura con el gen *lacZ* aguas abajo.

El plásmido con el inserto fue electroporado en la cepa adecuada de *M. xanthus* según se explica en la sección 3.3.8. Una vez el plásmido entra en la célula, éste se integrará en el cromosoma mediante un proceso de recombinación homóloga que se produce entre el inserto y el fragmento equivalente del cromosoma (ver figura 3.2, B). Las células que hubieron incorporado el plásmido se seleccionaron mediante cultivo en CTT con kanamicina.

La correcta inserción del plásmido se comprobó mediante PCR, tomando como molde el cromosoma de la cepa portadora de la fusión, y utilizando una pareja de cebadores específicamente diseñados para la comprobación: uno de ellos híbrida en el cromosoma original de *M. xanthus* y otro en el vector (ver figura 3.2, C). De este modo, solamente cuando el vector se haya insertado en el lugar deseado se amplificará la región acotada por los cebadores y podremos detectar la presencia del producto de PCR.

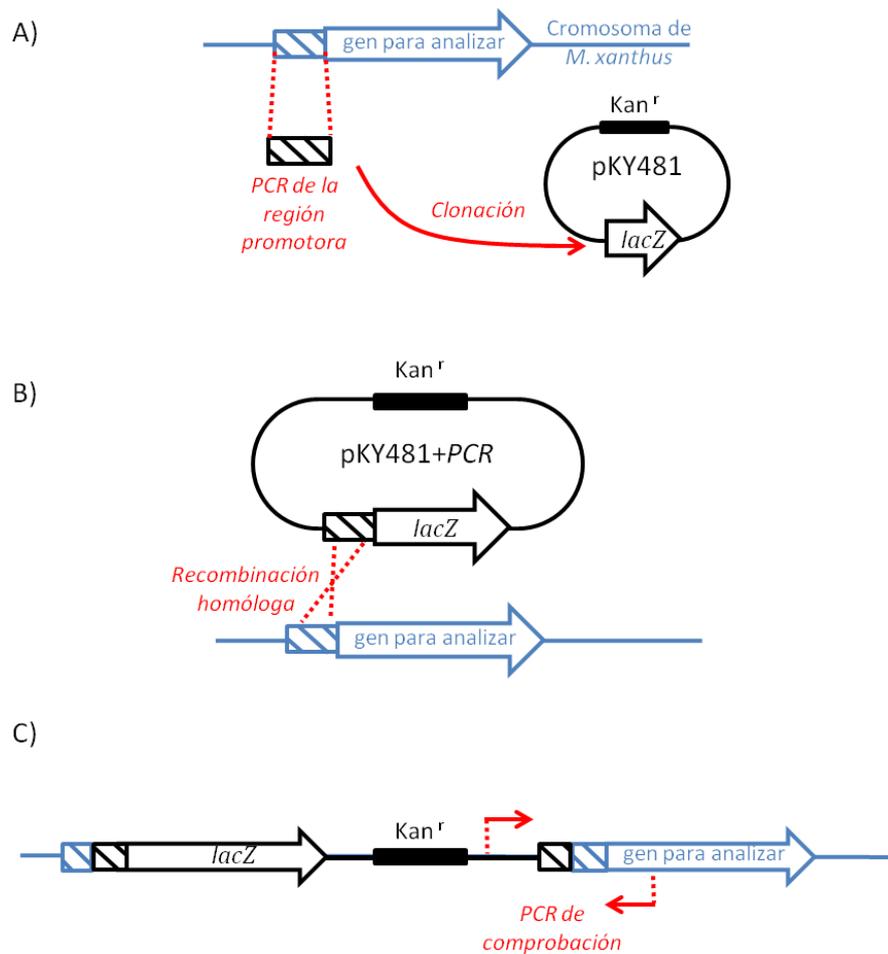


Figura 3.2: Construcción de una fusión *lacZ*. A) Amplificación por PCR y clonación en pKY481 de un fragmento de 800 pb que contiene la región promotora del gen cuyo perfil de expresión se quiere conocer. B) Integración del plásmido en el cromosoma de *M. xanthus* mediante recombinación homóloga. C) PCR para comprobar la correcta inserción del plásmido en el cromosoma. Los cebadores utilizados están representados por flechas rojas.

3.6.2. Análisis cualitativo de la expresión génica

La actividad β -galactosidasa en *M. xanthus* se estima de forma cualitativa inoculando las cepas en forma de gotas en placas de CTT o CF suplementado con X-gal.

La enzima β -galactosidasa emplea el X-gal como un sustrato generando un producto de color azul. En base a esto, las cepas cuya fusión *lacZ* se expresa adquieren un color azul, de forma que la aparición del color indica el momento de expresión, y la intensidad de color se relaciona de forma directa con el nivel de expresión génica.

3.6.3. Análisis cuantitativo de la expresión génica

Preparación de extractos celulares La cepa de *M. xanthus* portadora de la fusión se cultivó en medio líquido CTT+Kan. a 30 °C y 300 rpm durante una noche. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600}=0,8-1$, las células se recogieron por centrifugación a 10.000xg durante 10 min a temperatura ambiente y concentradas a $DO_{600}=15$ en tampón TM (ver Tabla 2.9). A continuación se sembraron sobre placas del medio sólido pertinente, inoculando 200 μ L de cultivo por placa, repartido en 10 gotas, y se incubaron a 30 °C hasta su recolección. Las células se recogieron a diferentes intervalos de tiempo con ayuda de una espátula, y se conservaron a -20 °C.

El contenido celular se liberó por sonicación. Las células se resuspendieron en tampón TM y se rompieron mediante pulsos de 30 s de 22,5 kHz a una amplitud de 30 % durante 5 min, manteniendo las células en hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y por tanto la desnaturalización de las proteínas. Cuando procedió, se añadieron perlas de vidrio durante la sonicación para romper las mixosporas. Tras sonicar se centrifugaron las muestras (10 min, 4 °C, 15000 rpm) para descartar los restos celulares y recuperar el sobrenadante para el ensayo de actividad enzimática.

Medida de la actividad β -galactosidasa La determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa en *M. xanthus* portadoras de fusiones *lacZ* se ha efectuado siguiendo el procedimiento descrito por Kroos *et al.* (1986).

Previamente al ensayo, se cuantificó la concentración de proteínas de la muestra mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina para interpolar los valores de concentración de las muestras experimentales. La concentración de los extractos se ajustó a 50 μ g/ μ L para realizar el ensayo de actividad enzimática.

La determinación de la actividad β -galactosidasa se efectuó mediante el desarrollo de una reacción enzimática producida a partir de una mezcla de reacción compuesta por 50 μ L del extracto celular en 450 μ L de tampón Z (ver Tabla 2.9) con 1 mg/mL ONPG. El ONPG es sustrato de la β -galactosidasa generando o-nitrofenol (ONP), de color amarillo. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante el tiempo necesario para que la tonalidad amarilla generada durante la reacción enzimática adquiriera una intensidad equivalente a una *absorbancia*₄₂₀=0,6-0,9. En ese momento, la reacción se detuvo añadiendo 0,5 mL de 1 M Na₂CO₃ y se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 420 nm. Las medidas se estandarizan con dos tipos de control negativo (blanco), uno de ellos constituido por 50 μ L extracto celular en tampón Z sin ONPG para cada muestra, y otro formado por 50 μ L tampón TM en tampón Z sin ONPG. La actividad específica se expresó como nmol de ONP producidos por min y por mg de proteína.

3.7. Mutantes de delección en fase

3.7.1. Construcción de mutantes de delección en fase

Las cepas mutantes de delección construidas en este trabajo contienen una delección completa del gen o los genes deseados. La pauta de lectura no se alteró, de modo que la expresión de los genes que pudieran ser cotranscritos junto con los genes delecionados no se viera afectada.

La construcción de los mutantes fue posible mediante el uso del vector pBJ113 (tabla 2.6). En este vector, se clonaron dos fragmentos de PCR de aproximadamente 800 pb cada uno, correspondientes a fragmentos situados por encima y por debajo del gen que se quiere delecionar (figura 3.3, apartado A). Para mantener la pauta de lectura tras la delección, se han conservado el codón de iniciación y el de terminación, quedando un sitio de restricción *Bam*HI entre estos. El plásmido se integrará en el cromosoma de *M. xanthus* durante un paso intermedio del proceso. Dicho plásmido contiene dos genes marcadores selectivos: un gen de resistencia a kanamicina y el gen *galK* que codifica para la enzima galactoquinasa. El gen de resistencia al antibiótico es utilizado para seleccionar las colonias de *M. xanthus* intermediarias que han integrado el plásmido en el cromosoma. Por su parte, el gen *galK* funciona en un paso posterior para seleccionar aquellas cepas que han eliminado el plásmido, puesto que las células portadoras de este gen no crecen adecuadamente en presencia de galactosa.

Una vez obtenida la construcción de los dos fragmentos de PCR y clonados en el vector, éste fue electroporado en la cepa adecuada de *M. xanthus*. Las células que incorporaron el plásmido se seleccionaron creciendo la bacteria en medio CTT sólido suplementado con kanamicina.

La integración del plásmido en el cromosoma sucede por recombinación homóloga, y puede ocurrir a través del primer producto de PCR clonado o del segundo. En ambos casos se produce la incorporación del plásmido completo y como consecuencia se obtiene una duplicación en el cromosoma de los fragmentos amplificados por PCR (figura 3.3, B). Tras varios días de incubación, las colonias capaces de crecer en el medio con kanamicina fueron analizadas mediante Southern blot, para comprobar que habían incorporado el plásmido en el lugar correcto.

El siguiente paso consistió en la escisión del plásmido, para lo que se cultivaron las células en medio CTT sin antibiótico durante 24-48 h. Al eliminar la presión selectiva del antibiótico se favorece la pérdida del plásmido, de nuevo por un proceso de recombinación homóloga (figura 3.3, apartado C). A continuación se realizaron diluciones seriadas en medio CTT sólido con galactosa. Las colonias capaces de metabolizar la galactosa y por tanto de crecer en un medio suplementado con este azúcar, pero no en presencia de kanamicina, serán las que habrán perdido el plásmido. Al igual que en el caso anterior, este proceso de recombinación se puede producir a través del primer o del segundo producto de PCR. Dependiendo del caso, obtendremos nuevamente cepas silvestres (figura 3.3, apartado E), o se obtendrá el mutante de delección en fase para el gen deseado (figura 3.3, apartado D). La distinción entre revertientes a silvestre y mutantes se realizó por Southern blot.

3.7.2. Caracterización fenotípica de cepas mutantes

Crecimiento vegetativo

La realización de curvas de crecimiento vegetativo de la cepa silvestre y de las diferentes cepas mutantes permitió caracterizar las consecuencias fenotípicas de las delecciones realizadas. Para ello, se inocularon las cepas procedentes de medio CTT sólido en medio CTT líquido. Tras una incubación de 24 h a 30 °C, las cepas alcanzaron una $DO_{600} \simeq 1$. Este cultivo se utilizó como preinóculo. A continuación, cada una de las cepas fue inoculada en un matraz con 50 mL de medio CTT líquido ajustando la densidad óptica inicial a $DO_{600}=0,05$, e incubada a 30 °C en agitación (300 rpm). Se midió la DO_{600} del cultivo de forma periódica hasta que transcurrieron 48 h.

Movilidad

La movilidad de las cepas de *M. xanthus* se determinó mediante la valoración a lo largo del tiempo del desplazamiento desarrollado por cada una de estas cepas sobre la superficie de CTT sólido. Para ello, un cultivo vegetativo de cada cepa crecido a una $DO_{600}=1$ fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para concentrar las células, que fueron resuspendidas en tampón TM a una $DO_{600}=15$. Se depositaron 10 μL de cada cultivo concentrado en el centro de una placa de medio CTT sólido y se incubaron las muestras a 30 °C. Se determinó de forma periódica el diámetro (mm) alcanzado por cada gota sobre la placa, a lo largo de una semana. Para estudiar la movilidad social y aventurera se emplearon concentraciones de agar diferentes. Se utilizó un medio más consistente con 1.5 % de agar para el análisis de la movilidad aventurera; para estudiar la movilidad social se empleó una concentración de 0.5 % de agar. Los mecanismos de movilidad en *M. xanthus* se detallan en la sección 1.1.3.

Ciclo de desarrollo

El análisis fenotípico de las cepas mutantes durante el ciclo de desarrollo se llevó a cabo tras sembrar las células en medio CF, pobre en nutrientes, capaz de inducir la fructificación. Para todas las cepas se partió de un cultivo en medio CTT líquido crecido a una $DO_{600}=1$. Los cultivos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El *pellet* obtenido se resuspendió en tampón TM para concentrar los cultivos hasta una $DO_{600}=15$. Se tomaron 10 μL de cada cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota en placas Petri con medio CF. Las muestras fueron incubadas a 30 °C y se llevó a cabo un seguimiento de la formación de los cuerpos fructíferos tomando fotografías con una lupa periódicamente hasta las 96 h.

Esporulación

El estudio de la esporulación de los mutantes se ha llevado a cabo mediante el recuento del número de mixosporas producidas durante el ciclo de desarrollo, estableciendo una comparación con las mixosporas generadas por la cepa silvestre en las mismas condiciones.

Las distintas cepas fueron cultivadas en CF, inoculándose un volumen de 200 μL distribuidos en 10 gotas de 20 μL . Las placas fueron incubadas a 30 °C y se recogieron muestras a las 96 h, cuando el ciclo de desarrollo ha culminado y las esporas son maduras. Las muestras fueron recogidas con una espátula, y se procedió a su sonicación para eliminar las células vegetativas que pudieran estar presentes y para dispersar las mixosporas que se encontrasen agregadas. Para ello, las muestras fueron resuspendidas previamente en 200 μL de tampón TM y sonicadas durante 1,5 min en pulsos de 30 s y 22,5 kHz. Antes de proceder a su recuento, las muestras sonicadas fueron diluidas 10 ó 100 veces en tampón TM. El recuento se efectuó en una cámara Petroff-Hausser. El resultado se expresó como número de mixosporas por placa.

Germinación

La viabilidad de las mixosporas producidas por las cepas de *M. xanthus* ha sido determinada mediante su eficiencia de germinación en un medio rico en nutrientes.

Para inducir la germinación, las muestras sonicadas utilizadas para el recuento de mixosporas se calentaron a 50 °C durante 2 h y se sometieron a un pulso de 30 s de sonicación para dispersar las esporas agrupadas. A continuación se realizaron diluciones decimales de las muestras en tampón TM, hasta la dilución 10^{-8} . De cada dilución se tomaron 50 μL y se añadieron a 4,5 mL de CTT blando fundido para sembrarlas en sobrecapa en placas de medio CTT sólido. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 7 días hasta que aparecieron colonias visibles. El número de esporas viables se corresponde con el número de colonias aparecidas. El porcentaje de esporas viables se calculó según las esporas inoculadas de partida, y la eficiencia de germinación de cada cepa se expresó como un porcentaje respecto a la eficiencia de germinación de la cepa silvestre.

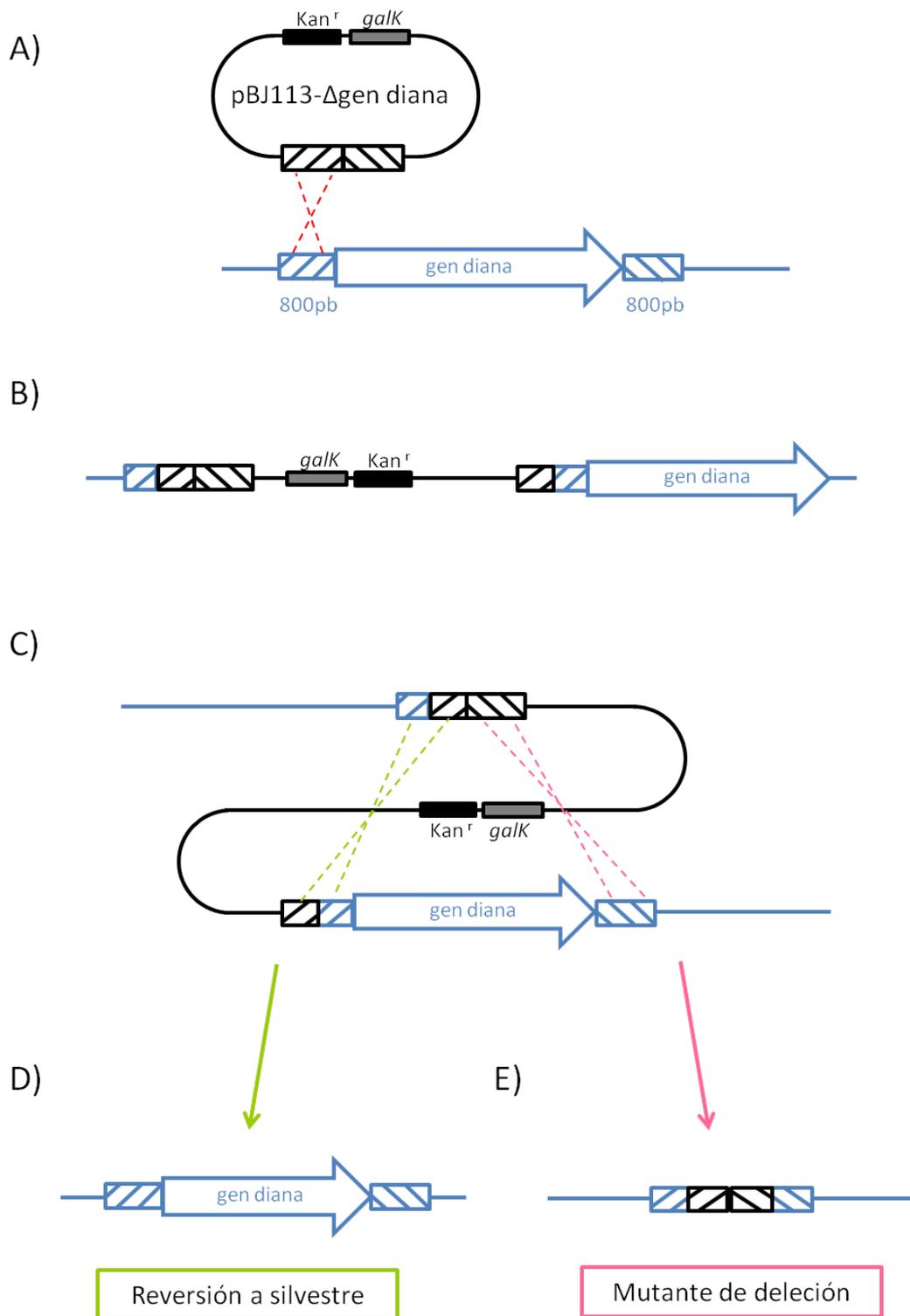


Figura 3.3: Construcción de un mutante de delección en fase. A) El plásmido portador de la delección pBJ113- Δ gen se integra en el cromosoma de *M. xanthus* mediante recombinación homóloga. En este caso se representa la recombinación en el brazo aguas arriba del gen. B) El plásmido permanece integrado en el cromosoma, las colonias que lo contienen son resistentes a kanamicina. C) Pérdida del plásmido por un segundo proceso de recombinación homóloga. D) Cuando la segunda recombinación sucede por el mismo fragmento que la primera, obtenemos de nuevo una cepa silvestre. E) Cuando la recombinación sucede por el otro fragmento, obtenemos una cepa mutante de delección en fase.

3.8. Medida del hierro intracelular en *M. xanthus* mediante ICP-OES

La cantidad de hierro intracelular se midió en cepas de *M. xanthus* utilizando Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES). Esta técnica permite detectar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica presentes en una muestra a muy bajas concentraciones (elementos traza).

Inicialmente, las cepas fueron cultivadas en medio CTT sólido, con y sin hierro añadido. Las cepas, provenientes de un cultivo líquido en medio CTT con 24 h de incubación, se concentraron a una $DO_{600}=15$, y se inocularon en placas de CF sin hierro adicionado o suplementadas 0,5mM de $FeCl_3$, a razón de 10 gotas de 20 μ L por placa.

Tras incubar las placas durante 24 h a 30 °C, las células se recogieron en un tubo de centrifuga estéril, y se lavaron 3 veces con medio CTT modificado (sin $MgSO_4$ y añadiendo 1 mM EDTA). A continuación, se siguió el método descrito por [Outten et al. \(2001\)](#) para la preparación de las muestras. Los *pellets* se secaron incubándolos a 80 °C durante una noche. Una vez secados, se disolvieron en 5 mL de ácido nítrico para trazas de metal, calentándolos a 80 °C durante 30 min.

El contenido en metal (Fe) de las muestras se midió utilizando un espectrógrafo ICP-OES Thermo Jarrell Ash Enviro 36 con un rango de detección de 20 elementos. La muestra es pulverizada e inyectada a través de un plasma a muy alta temperatura. Este proceso provoca la atomización, ionización y excitación de los elementos de la muestra. El espectro de emisión de cada elemento y su intensidad son detectados por el aparato, e interpretados con la ayuda de una curva patrón, ofreciendo finalmente un listado de los elementos detectados y su concentración en la muestra.

Parte IV

Resultados y discusión

Capítulo 4

Análisis bioinformático

4.1. Genes parálogos de Ser/Thr quinasas

Uno de los primeros análisis que se hizo tras la secuenciación y anotación del genoma de *M. xanthus* (Goldman *et al.*, 2006) fue un estudio de genes parálogos, revelándose que uno de los grupos de parálogos más grande es el de las Ser/Thr quinasas de tipo eucariota. El análisis demostró la existencia de 99 genes que codificaban proteínas de este tipo.

En nuestro grupo de investigación se elaboró un árbol filogenético utilizando las secuencias de los dominios quinasa de todas las mixobacterias secuenciadas hasta el momento (2008), con el objetivo de estudiar el proceso de duplicación y divergencia que han sufrido los genes de las Ser/Thr quinasas en mixobacterias. El árbol reveló la existencia de dos grupos de genes muy similares, pertenecientes a *M. xanthus* (figura 4.1), que aparecen agrupados en dos ramas independientes: una de ellas contiene, entre otros, los genes MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842, y la segunda engloba genes entre los que se encuentran MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841. Observando la numeración, descubrimos que cada uno de los genes de una rama aparecía emparejado con otro de los genes de la otra rama, formando parejas de dos quinasas consecutivas en la secuencia del genoma. El hecho de que estas quinasas se encuentren siempre en parejas, así como que aparezcan 4 copias de dichas parejas dentro del genoma de *M. xanthus*, fueron los motivos que nos llevaron a elegir estas quinasas entre las 99 codificadas por esta mixobacteria.

4.2. Análisis del entorno génico

Para iniciar un estudio en profundidad de estas Ser/Thr quinasas, se comenzó estudiando su entorno génico.

Los ocho genes de Ser/Thr quinasas forman 4 parejas que se encuentran distribuidas por el genoma de *M. xanthus*. En la figura 4.2 se han representado las cuatro regiones génicas que rodean a las cuatro parejas de genes. Todas las parejas de quinasas se transcriben en la misma dirección, excepto la pareja MXAN_4842

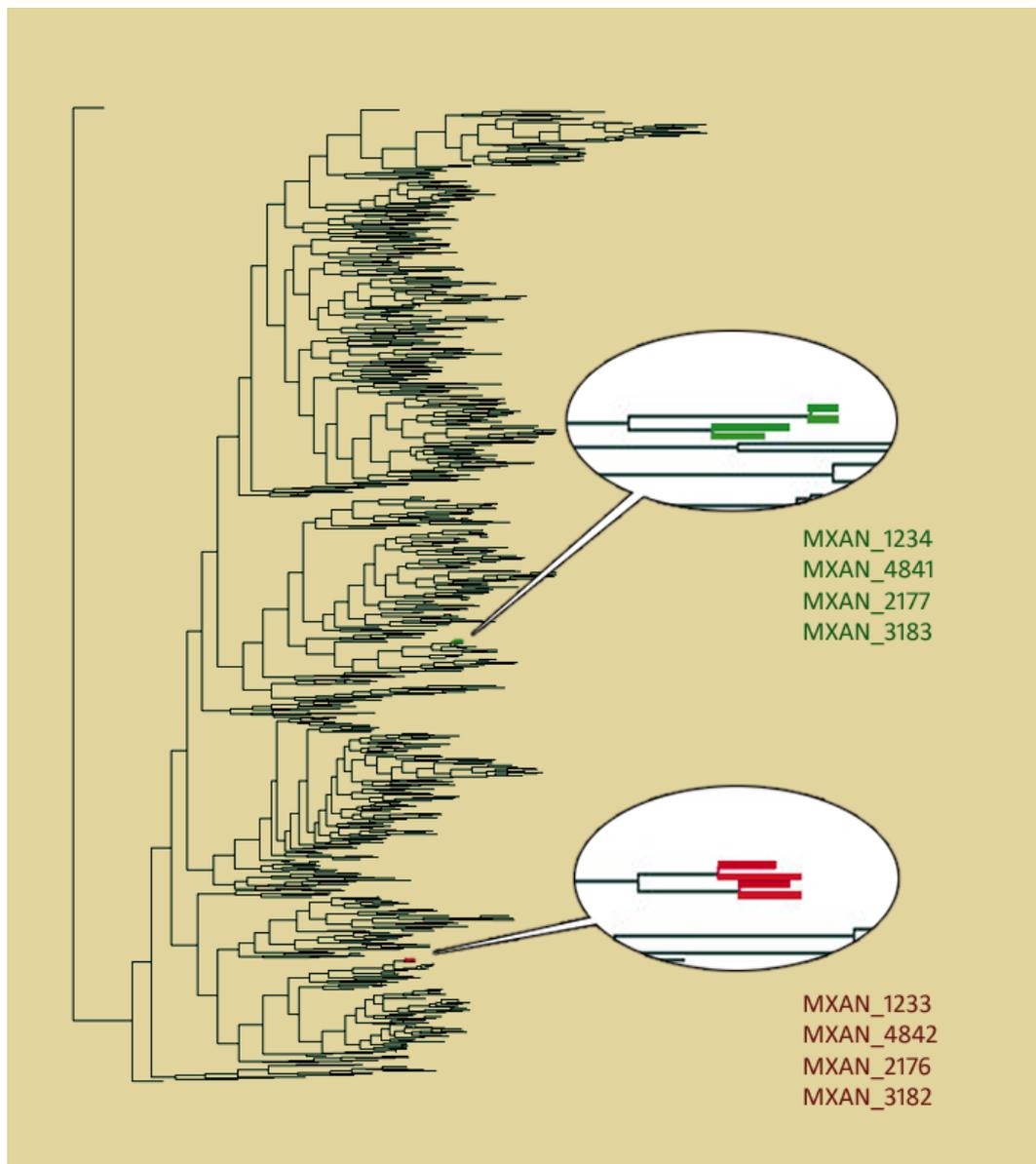


Figura 4.1: Árbol filogenético de los dominios Ser/Thr quinasa de mixobacterias, mostrando la situación de los genes parálogos emparejados. Los parálogos MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842 aparecen coloreados de rojo. Los parálogos MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841 aparecen coloreados de verde.

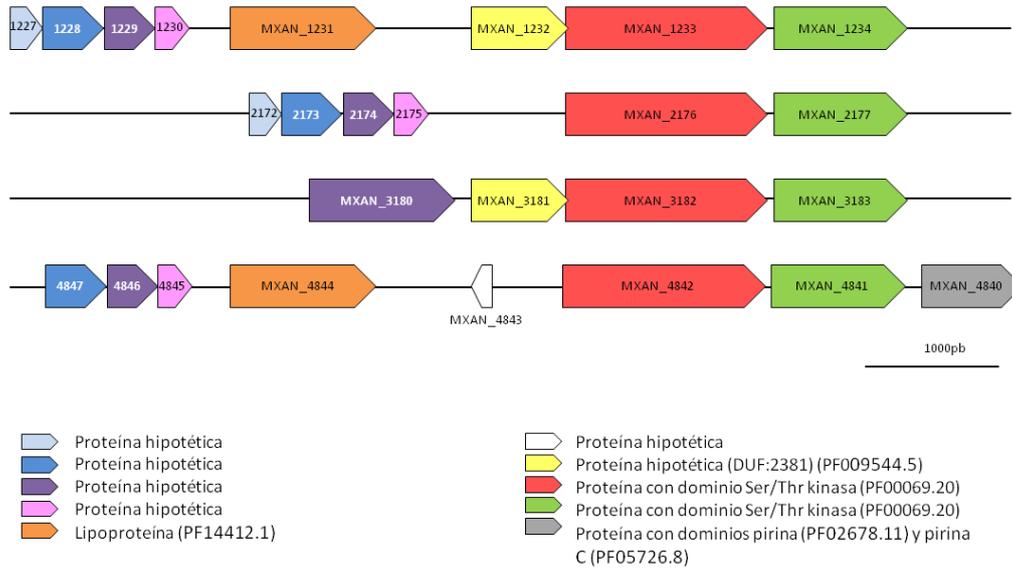


Figura 4.2: Entorno génico de las parejas de genes para Ser/Thr quinazas. Los números representan el código MXAN en el genoma de *M. xanthus*. Los genes y los espacios intergénicos están representados a escala. Los genes del mismo color representan genes parálogos. Las funciones de los genes han sido predichas según su similitud a otras secuencias, utilizando la base de datos KEGG.

y MXAN_4841, que aparece en la hebra complementaria. Los genes que acompañan a las quinazas se transcriben en el mismo sentido que éstas exceptuando el ORF MXAN_4843, que además no presenta ningún parálogo. Sin embargo, no se expresan todos los genes en la misma pauta de lectura.

Entre los genes codificados en estas regiones, aparecen numerosas proteínas hipotéticas, cuya secuencia no se ha podido relacionar con proteínas de función conocida. Otros genes se han clasificado según su secuencia como lipoproteínas y proteínas con dominios pirina de unión a Fe (II) (PF02678.11 y PF05726.8).

En estas regiones existe un alto grado de **microsintenia local**, pues la mayoría de los genes que rodean a las quinazas se encuentran conservados en varias parejas, y mantienen el mismo orden de aparición. No obstante, todas las agrupaciones presentan diferencias en la combinación de genes que aparecen. El único gen que aparece conservado en las cuatro parejas es una proteína hipotética representada en color morado en la figura 4.2. Este hecho sugiere que, probablemente, estas quinazas tuvieron como antecesor original una región de ADN que contenía una única pareja de Ser/Thr quinazas acompañadas de estos genes vecinos, que sufrió repetidas duplicaciones en el genoma. Para ser mantenidos, los genes duplicados han de aportar una ventaja selectiva, y frecuentemente se preservan en el genoma mediante un mecanismo de **subfuncionalización** (Innan y Kondrashov, 2010; Lynch y Force, 2000). Según este modelo, cada una de las copias generadas de una región génica sufre una menor presión selectiva que la copia antecesora única, pudiendo acumular mutaciones y pérdidas de genes completos. Cada región génica habría adquirido una

función especializada, y sería el motivo por el que se mantienen cuatro copias en el genoma. Por otro lado, el hecho de que existan copias de la proteína hipotética antes mencionada (MXAN_1229, MXAN_2174, MXAN_3180 y MXAN_4846) en todos los *clusters* supone un aspecto en común en la función que desempeñarán las cuatro parejas de quinasas.

Acompañando a dos de las parejas aparece un gen, situado aguas arriba de la primera quinasa, que codifica una proteína hipotética con un dominio conservado de función desconocida (DUF:2381, PF09544.5). Según la base de datos Pfam, este dominio solamente aparece en mixobacterias.

En ambos genes DUF:2381 su región codificante se solapa con la región codificante de la quinasa que aparece a continuación, así que probablemente sean cotranscritas. Asimismo, las quinasas aguas abajo siempre aparecen a menos de 100 pb de distancia de las quinasas aguas arriba, y también cabe la posibilidad de que sean transcritas junto a estas últimas.

4.3. Análisis de la secuencia de ADN de las Ser/Thr quinasas emparejadas

Las Ser/Thr quinasas fueron anotadas con herramientas bioinformáticas y verificadas de forma manual durante la anotación del genoma de *M. xanthus*. La secuencia de los genes situados aguas arriba en la pareja presenta un tamaño que oscila entre 1791-1794 pb; los genes situados aguas abajo son de menor tamaño, oscilando entre 1155-1218 pb. Las secuencias de ADN se pueden consultar en los apéndices A y B de este trabajo.

En general, el contenido en guanina y citosina (G+C) en la tercera base de cada codón en las secuencias codificantes de *M. xanthus* es elevado, de un 70 % aproximadamente (Komano *et al.*, 1987). En las quinasas que estamos estudiando, el porcentaje G+C se encuentra ligeramente por debajo de la media, con valores que oscilan entre 62,36-66,83 %. Los porcentajes para cada gen aparecen detallados en la tabla 4.1. El codón de iniciación es en todos los casos ATG, exceptuando el gen MXAN_2177 que comienza con el codón de inicio alternativo GTG.

Quinasas aguas arriba		Quinasas aguas abajo	
MXAN_1233	62,36 %	MXAN_1234	65,10 %
MXAN_2176	62,65 %	MXAN_2177	65,76 %
MXAN_3182	62,53 %	MXAN_3183	66,83 %
MXAN_4842	62,47 %	MXAN_4841	64,44 %

Tabla 4.1: Porcentaje G+C de las Ser/Thr quinasas emparejadas.

4.4. Análisis de la secuencia proteica de las Ser/Thr quinasas emparejadas

Los genes para estas quinasas codifican proteínas que constan de 596-597 aminoácidos en el caso de los genes situados aguas arriba y de 384-405 aminoácidos en el caso de los genes situados aguas abajo.

Los genes pertenecientes a la misma rama en el árbol filogenético, mantienen una secuencia de aminoácidos muy similar entre ellos. La similitud se puede apreciar visualmente en los alineamientos realizados (figura 4.4), así como en el porcentaje de aminoácidos idénticos calculado, que como mínimo es de un 80 % (figura 4.3).

En el alineamiento de las proteínas MXAN_1233 y sus homólogas, éstas presentan una secuencia idéntica o bioquímicamente equivalente en casi toda su longitud, salvo en residuos puntuales. Cabe destacar que existen dos zonas de menor similitud, que en la figura 4.4, apartado A, abarcan los residuos 306-334 y 360-388 (numeración relativa a MXAN_4842).

En el alineamiento de los de las proteínas MXAN_1234 y sus homólogas se observa también que las secuencias son idénticas o equivalentes, salvo en residuos puntuales (4.4, apartado B). También existen zonas con menor homología, pero esta vez se encuentran situadas en los extremos de la proteína: al inicio, en los residuos 1-8, y especialmente en la región final de la proteína, a partir del residuo 350 (numeración referida a MXAN_1234).

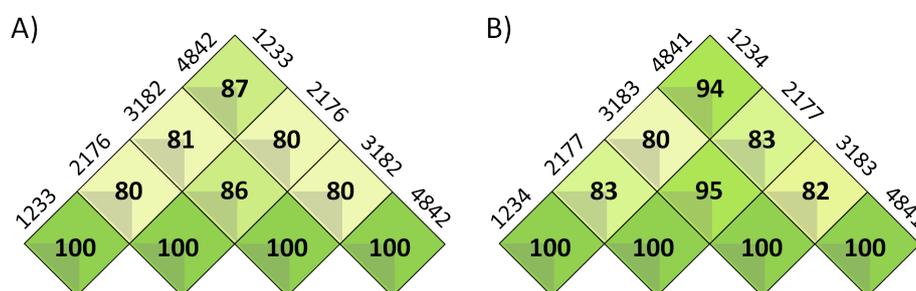


Figura 4.3: Porcentaje de identidad entre secuencias peptídicas de los genes parálogos. A) Secuencia aminoacídica de las quinasas MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842. B) Secuencia aminoacídica de las quinasas MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841. Datos tomados de alineamientos realizados en BLASTp.

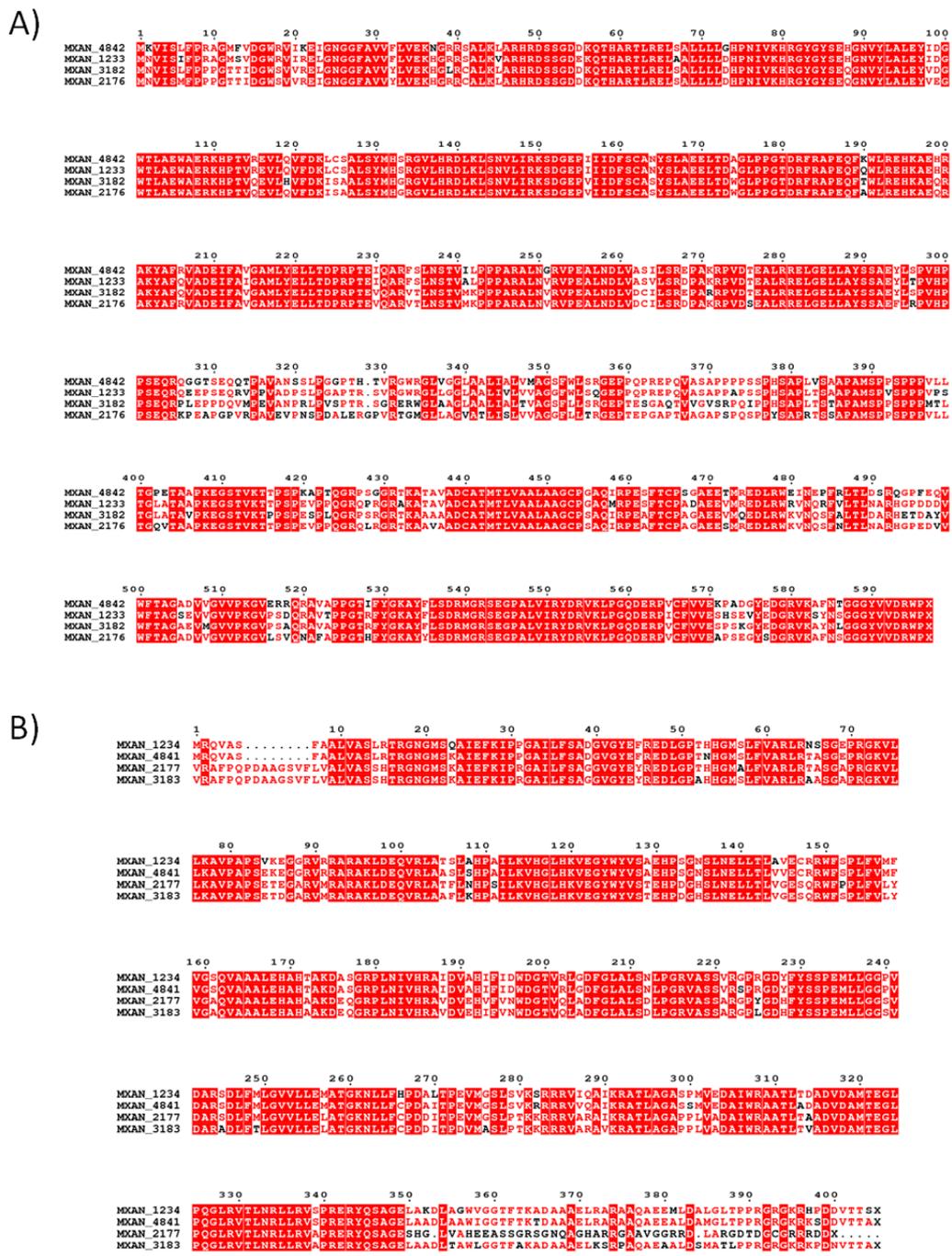


Figura 4.4: Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de (A) los genes parálogos MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842 y de (B) los genes parálogos MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841. Los residuos idénticos aparecen representados con letras blancas sobre fondo rojo. Los residuos pertenecientes al mismo grupo bioquímico aparecen como letras coloreadas de rojo. Los alineamientos han sido realizados en ClustalW2 y modificados en ESPrInt.

4.4.1. Estudio de los dominios catalíticos

En cada uno de los 8 genes, la secuencia de aminoácidos deducida contiene un **dominio Ser/Thr quinasa**. La identificación de los dominios se ha realizado a través de la base de datos Pfam, a partir de alineamientos con otras secuencias que contienen motivos similares. Se ha empleado un valor de corte estricto (E-value<1.0) para la identificación de dominios (Tabla 4.2). Este dominio está altamente conservado en todos los miembros de la familia Ser/Thr quinasa, y es el responsable de la actividad catalítica. Los dominios quinasa abarcan aproximadamente 263-266 residuos en el caso de las quinasas aguas arriba, y son más cortos en el caso de las quinasas aguas abajo, abarcando 290-297 residuos (Tabla 4.2). En las quinasas aguas arriba, el dominio catalítico se encuentra situado en el extremo amino de la proteína, mientras que en las quinasas situadas aguas abajo dicho dominio abarca casi la totalidad de la proteína, dejando unas regiones de 23-62 residuos a cada lado del dominio catalítico que no poseen ninguna estructura conservada.

A continuación se examinaron los **residuos y motivos conservados que definen un dominio quinasa**. Para ello, los dominios Ser/Thr quinasa se alinearon con los dominios catalíticos de las Ser/Thr quinasas PknB de la bacteria *M. tuberculosis* y PKA de ratón. Se escogieron estas quinasas como modelo por ser los ejemplos mejor caracterizados en procariotas y eucariotas respectivamente.

En primer lugar describiremos **el dominio quinasa codificado por los genes parálogos aguas arriba**, cuyos alineamientos con las Ser/Thr quinasas PknB y PKA se muestran en la figura 4.5. Observamos que los dominios están muy conservados a nivel de secuencia, pues se han introducido muy pocos *gaps* en el alineamiento. Utilizando como guía las estructuras secundarias de las quinasas PknB y PKA, se han identificado los 12 subdominios típicos de un dominio quinasa en las quinasas de *M. xanthus*.

Las secuencias presentan todos los residuos y motivos esenciales para la actividad catalítica de la proteína. El bucle P, rico en glicina, se encuentra conservado en todas, así como el residuo de lisina en el subdominio II, y el residuo de glutamato en la hélice del subdominio III.

El triplete HRD del subdominio VIb también está conservado, así que estas quinasas deben englobarse dentro de las **quinasas RD**, que en su mayoría se activan por autofosforilación en el bucle de activación. Observamos que en el bucle de activación, que abarca los residuos numerados del 159 al 183 en la figura 4.5 (numeración referente a PknB), encontramos residuos candidatos a ser fosforilados: dos residuos de treonina, y uno o dos residuos de serina, dependiendo de la proteína. Cabe destacar que el residuo de treonina situado en 171 es el único que está conservado en las cuatro quinasas de *M. xanthus*, así como en PknB y PKA. En ambas quinasas modelo, este residuo de treonina es el único residuo del bucle de activación que es fosforilado (Pereira *et al.*, 2011). Por consiguiente, esta treonina parece ser el residuo fosfoceptor más probable.

En el triplete DFS, una serina sustituye al clásico residuo de glicina. Sin embargo, se conservan los residuos de aspartato y fenilalanina, necesarios para unir Mg^{2+} y estabilizar el motivo catalítico HRD, respectivamente. A pesar de que la glicina del DFG está conservada en la inmensa mayoría de quinasas activas, no está demostrado

Parálogo	Gen	Residuos	Valor E	Esquema
Aguas arriba	MXAN_1233	17-280	1,2e -39	
	MXAN_2176	17-283	1,5e -39	
	MXAN_3182	17-283	3,1e -38	
	MXAN_4842	17-283	9,2e -38	
Aguas abajo	MXAN_1234	57-354	1,4e -22	
	MXAN_2177	68-358	2,0e -21	
	MXAN_3183	68-361	4,1e -23	
	MXAN_4841	57-353	4,2e -23	

Tabla 4.2: Dominios quinasa encontrados en la base de datos Pfam a partir de la secuencia de aminoácidos. Un valor $E > 1$ indica un resultado significativo.

que este residuo tenga un papel en la catálisis, con lo cual no hemos considerado esta variación una razón suficiente para englobar a estas quinasas dentro de la categoría de pseudoquinasas.

Al final del segmento de activación también aparece conservado en triplete APE en las cuatro proteínas. En conclusión, estas quinasas conservan todos los residuos clave y podemos clasificarlas, desde un punto de vista bioinformático, como **Ser/Thr quinasas activas**.

Los **dominios quinasa codificados por los genes aguas abajo** aparecen representados en la figura 4.6, alineados también con los dominios catalíticos de PknB y PKA. Observamos que el grado de conservación de los dominios quinasa no es tan elevado como en los genes anteriores y aparece mayor número de *gaps*. Aún así, es posible identificar los 12 subdominios típicos de un dominio quinasa, así como los motivos y residuos conservados.

El bucle P del subdominio I, el residuo de lisina en el subdominio II, y el residuo de glutamato en la hélice del subdominio III, se encuentran conservados. En las cuatro proteínas, el triplete catalítico del subdominio VIb muestra una **sustitución del residuo de aspártico por un residuo de alanina, presentando un motivo HRA**. Recordaremos que este residuo de aspártico constituye la base catalítica del enzima, y en la mayor parte de ellas es necesaria su intervención para el proceso de fosfotransferencia. Esta sustitución es motivo suficiente para considerar a estas proteínas **pseudoquinasas predichas**, según el marco de clasificación propuesto por Zeqiraj y van Aalten (2010).

Por otro lado, los tripletes DFG y APE aparecen perfectamente conservados, así como el segmento de activación. En este segmento aparecen numerosos residuos de serina, entre 4 y 5 dependiendo del gen, que podrían ser candidatos a ser fosforilados. En tal caso, la reacción habrá de ser catalizada por otra Ser/Thr quinasa con actividad catalítica que formará parte de la misma ruta de transducción de señales. Asimismo, existe la posibilidad de que estos residuos no se fosforilen, y esta quinasa sea regulada exclusivamente mediante mecanismos alostéricos.

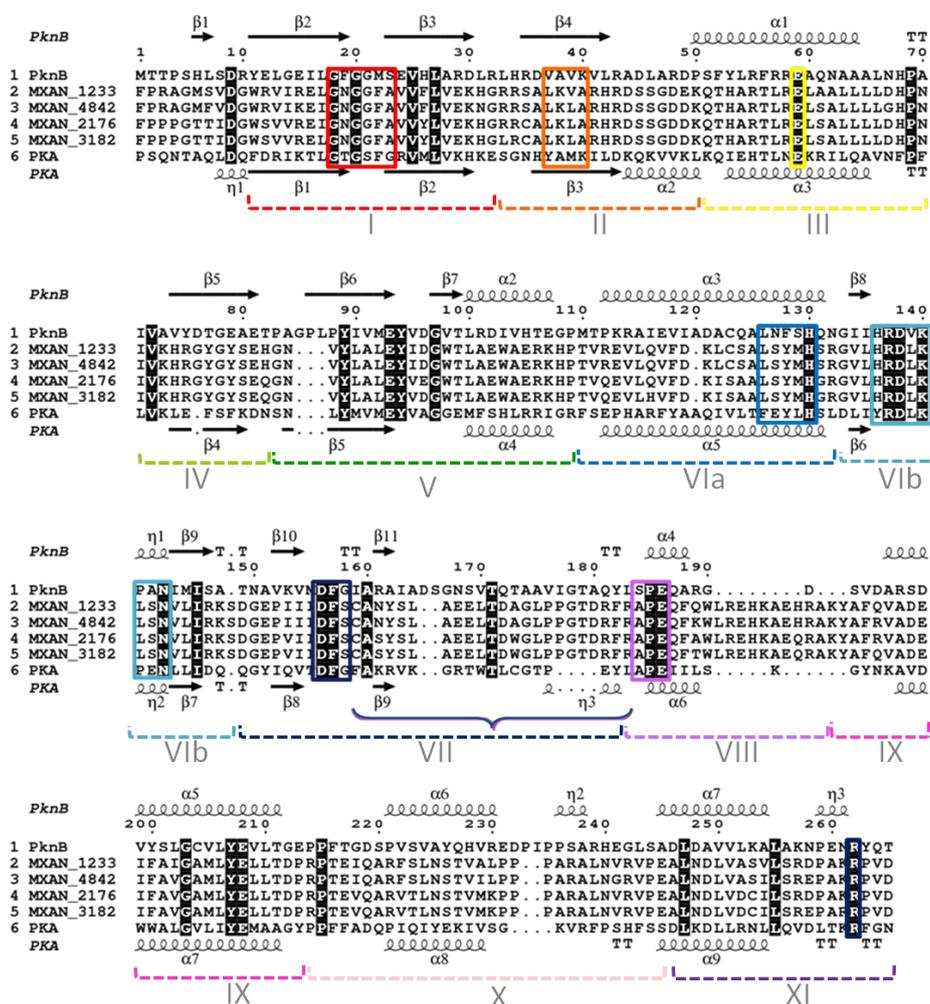


Figura 4.5: Alineamientos de la secuencia de aminoácidos del dominio quinasa de las proteínas MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842 (residuos 7-275 referentes a PknB), dominio quinasa de PknB de *M. tuberculosis* (PDB: 1O6Y, residuos 1-263 referentes a PknB), y dominio quinasa de PKA de *M. musculus* (PDB: 4NTS, residuos 33-284 referentes a PknB). Encima y debajo del alineamiento se muestran las estructuras secundarias de PknB y PKA, respectivamente. Los recuadros coloreados muestran los residuos y motivos más importantes que definen un dominio quinasa: bucle P (rojo), lisina del subdominio II (naranja), glutamato del subdominio III (amarillo), lisinas e histidina del subdominio VIIa (azul), triplete HRD del centro catalítico (azul celeste), triplete DFG del segmento de activación (azul marino), segmento de activación (llave azul marino), triplete S/APE (lila), y arginina correspondiente al subdominio XI (azul marino). Los alineamientos han sido realizados utilizando los servidores NPS@ y Esript.

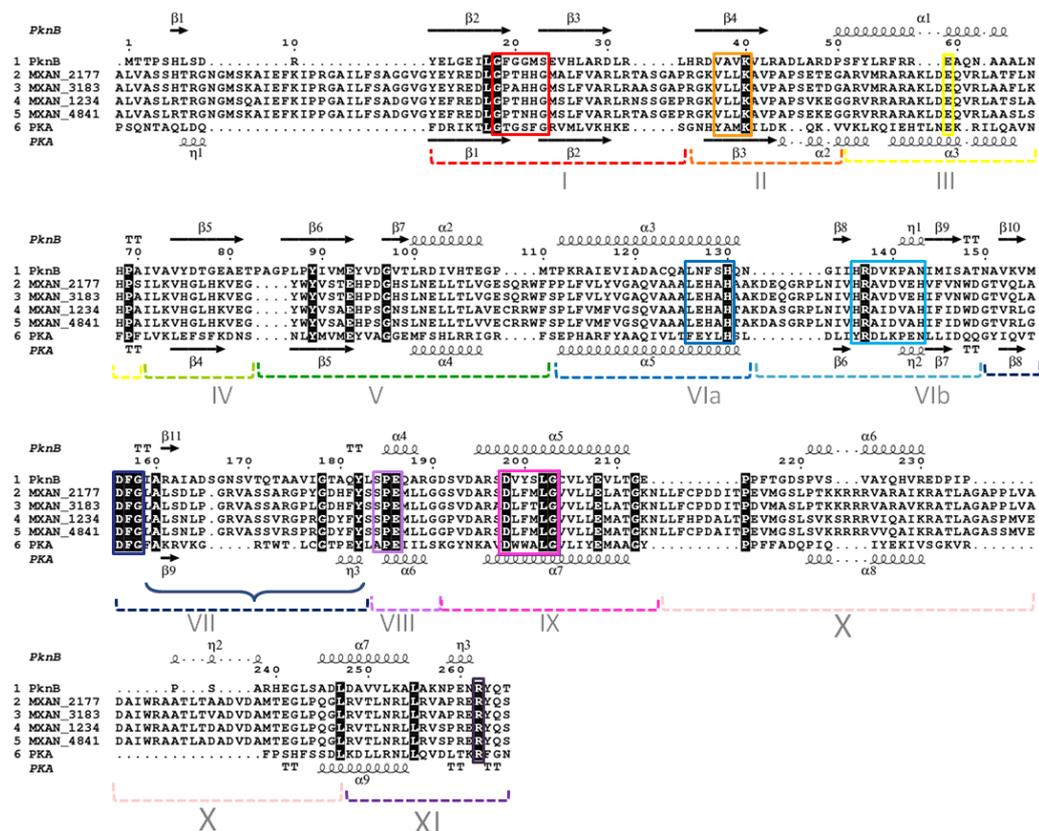


Figura 4.6: Alineamientos de la secuencia de aminoácidos del dominio quinasa de las proteínas MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841, dominio quinasa de PknB de *M. tuberculosis* (PDB: 1O6Y, residuos 1-263 referentes a PknB), y dominio quinasa de PKA de *M. musculus* (PDB: 4NTS, residuos 33-284 referentes a PknB). Encima y debajo del alineamiento se muestran las estructuras secundarias de PknB y PKA, respectivamente. Los elementos destacados y el código de color utilizados son los mismos a los indicados en la figura 4.5. Los alineamientos han sido realizados utilizando los servidores NPS@ y Esript.

4.4.2. Estudio de la localización subcelular de las Ser/Thr quinasas

Para predecir la localización subcelular de estas proteínas, se ha analizado la secuencia de aminoácidos en busca de segmentos transmembrana, y en consecuencia, determinar la topología de dichas proteínas. En las quinasas MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842, algunas de las bases de datos utilizadas predicen varios dominios transmembrana, mientras que otras las clasifican como proteínas solubles. La topología más frecuente proporcionada por las bases de datos es aquella en la que aparece un único segmento transmembrana (ver tabla 4.3). Dicho segmento se encuentra situado tras el dominio catalítico.

Según estas predicciones, estas quinasas son **proteínas transmembrana**, con su extremo amino, que contiene el dominio catalítico quinasa, situado en el citoplasma, y su extremo carboxilo situado en el espacio periplásmico.

La mayoría de las proteínas que se alojan en la membrana codifican una secuencia de 15-20 aminoácidos al inicio de la proteína, denominada *péptido señal*. Esta corta secuencia será reconocida un sistema de secreción que la transportará hasta la membrana interna (Madigan *et al.*, 2008). Por este motivo se buscaron péptidos señal en las quinasas utilizando diversas bases de datos (SignalP, ExPASy). Sin embargo, no se encontraron regiones que pudieran corresponder a dicha secuencia. Es posible que estas proteínas se secreten a la membrana por un mecanismo independiente de péptido señal, y que la señal de secreción esté contenida en la conformación terciaria de la proteína (Saier Jr, 2006).

Las cuatro quinasas contienen una porción de unos 250 residuos aproximadamente en el extremo carboxilo, que según las predicciones corresponde a la parte extracitoplasmática de la proteína. Esta parte no presenta homología con ningún dominio conocido. Al estar situado en el periplasma podría actuar como dominio sensor, y la proteína completa actuaría entonces como un **receptor de membrana**. Este es el funcionamiento de muchas ELKs transmembrana, que efectúan un papel transmisor de una señal extracitoplasmática hasta el interior del citoplasma, y la transmiten mediante fosforilación de un sustrato (Pereira *et al.*, 2011).

Gen	Residuos TM			
	SOSUI	TMHMM	OCTOPUS	TopPred
MXAN_1233	Soluble	332-356	333-353	330-341, 432-440
MXAN_2176	Soluble	333-355	211-226, 335-355	328-340, 433-441
MXAN_3182	338-360	336-353	334-353	331-339, 433-440
MXAN_4842	335-356, 383-405	332-354	334-354	330-340, 432-440

Tabla 4.3: Dominios transmembrana predichos por distintas bases de datos, a partir de la secuencia de aminoácidos. Se escogieron solamente los resultados significativos de cada base de datos.

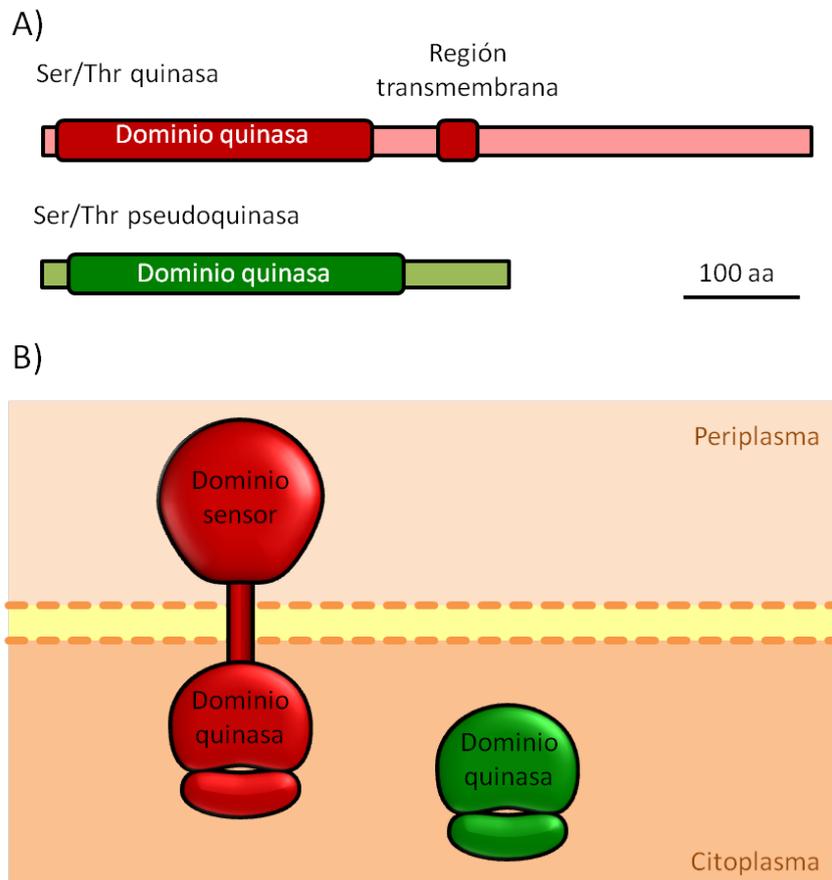


Figura 4.7: Esquema de la topología de las Ser/Thr quinasa (A) y de su localización subcelular hipotética (B).

En lo que respecta a las pseudoquinasa MXAN_1234, MXAN_2177 y MXAN_3183 y MXAN_4841, se ha realizado el mismo proceso de búsqueda de segmentos transmembrana. Sin embargo, ninguna base de datos (SOSUI, TMHMM, OCTOPUS y TopPred) muestra fragmentos transmembrana significativos y todas predicen que se trata de proteínas solubles localizadas en el citoplasma. La búsqueda de péptidos señal también mostró baja probabilidad de encontrar un péptido señal. Según estas predicciones, todas las pseudoquinasa son **proteínas solubles citoplasmáticas**.

Según todos los datos recabados acerca de la topología y la localización subcelular de las quinasa y pseudoquinasa, se ha elaborado un esquema, mostrado en la figura 4.7.

4.5. Modelado 3D con I-TASSER

Para obtener una visión preliminar del plegamiento de estas quinasa de *M. xanthus*, se ha realizado un modelado tridimensional de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos. Para ello, debido a la gran similitud en secuencia, se han

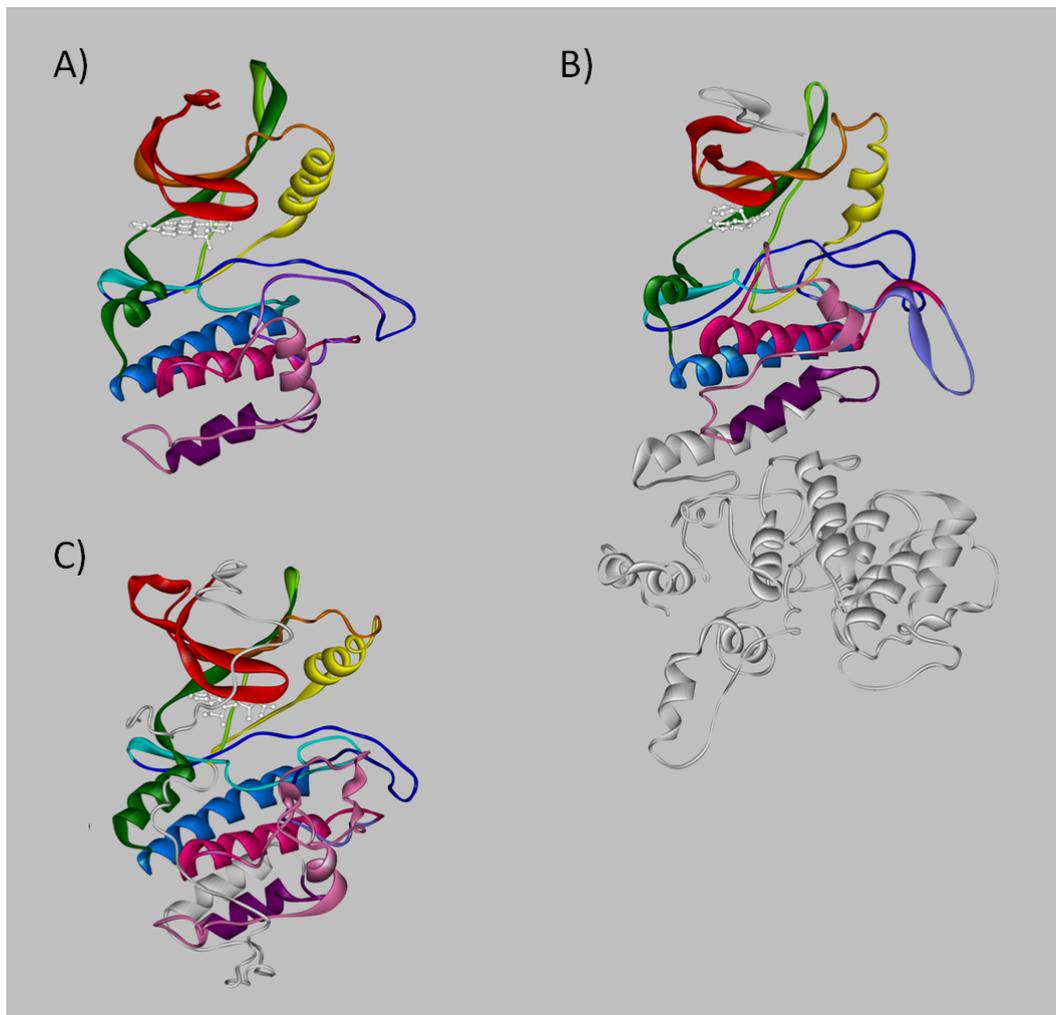
escogido dos representantes de cada *set* de parálogos. Dichos representantes fueron las proteínas MXAN_1233 y MXAN_1234.

Los modelos tridimensionales han sido generados utilizando el servidor I-TASSER (Roy *et al.*, 2010). Este algoritmo predice estructura y función de una proteína a partir de su secuencia peptídica. Realiza alineamientos múltiples entre partes de la secuencia problema y secuencias de otras proteínas cuya estructura es conocida, y las utiliza como plantilla para modelar la proteína por fragmentos. Esos fragmentos cuya estructura secundaria ha sido predicha son ensamblados para obtener la proteína completa, y se realizan repetitivos plegamientos de la proteína hasta obtener el modelo atómico tridimensional más probable. La función se predice encontrando homólogos estructurales en la base de datos de proteínas PDB.

Los modelos resultantes para las quinasas MXAN_1233 y MXAN_1234 se muestran en la figura 4.8, junto al modelo tridimensional del dominio catalítico de PknB. Ambas quinasas de *M. xanthus* adquieren la **estructura terciaria bilobular** típica de las Ser/Thr quinasas, con un lóbulo N-terminal compuesto principalmente por hojas beta y un lóbulo C-terminal con abundantes hélices alfa. En las dos proteínas, el segmento de activación aparece sin estructura secundaria, en forma de bucle, al igual que se observa en la quinasa PknB representada en la figura. El modelo estructural más similar encontrado para cada quinasa aparece en la tabla bajo la figura 4.8. El dominio extracitoplasmático de la quinasa MXAN_1233, que tendría una función sensora, presenta una estructura terciaria globular, con numerosas hélices alfa en los 5 modelos generados.

El algoritmo I-TASSER predice, además, los posibles **ligandos** que una proteína puede unir, según la similitud estructural global (proteína completa) y local (sitio de unión) con otras proteínas. En el caso de MXAN_1233, el servidor indica que esta quinasa une un análogo del ATP ((2S)-1-{{5-(3-metil-1H-indazol-5-il)piridin-3-il}oxi}-3-fenilpropan-2-amina) con una probabilidad de 0,79, y átomos de magnesio o manganeso con una probabilidad de 0,1-0,13. Para MXAN_1234, la predicción de ligandos es ADP con una probabilidad de 0,79, seguido de magnesio o manganeso con probabilidad máxima de 0,03.

I-TASSER también predice una posible **función** de estas quinasas por comparación estructural global y local. La certidumbre de esta predicción se mide mediante la puntuación GO (GO-score) que varía de 0 a 1, donde 1 significa la máxima similitud entre la proteína problema y la plantilla. Los resultados ofrecen funciones de unión no covalente a ATP tanto para la quinasa transmembrana MXAN_1233 (GO-score=0,88) como para la pseudoquinasa soluble MXAN_1234 (GO-score=0,83). Para MXAN_1234 también se predice funciones de fosforilación (GO-score=0,60).



Proteína	C-score	TM-Score	RMSD	Análogo estructural
MXAN_1233	-0,97	0,59±0,14	10,0±4,6 Å	<i>PknG de M. tuberculosis</i>
MXAN_1234	-2,08	0,47±0,15	11,8±4,5 Å	<i>PknB mutante de M. tuberculosis</i>

Figura 4.8: Modelado 3D bioinformático de las quinasas MXAN_1233 (B) y MXAN_1234 (C), junto al dominio catalítico de PknB de *M. tuberculosis* (A). En color blanco aparece un ligando que representa una molécula de ATP. En los tres casos, el dominio quinasa aparece coloreado según la figura 1.6. Las porciones de la proteína completa MXAN_1233 que no pertenecen al dominio quinasa aparecen coloreadas de gris. Tabla: el valor C-score varía en un rango de -5 a 2, donde valores más altos equivalen a mayor calidad en la predicción de la estructura. Los valores TM-Score y RMSD indican la similitud estructural con las plantillas utilizadas para modelar: un TM-Score > 0,5 indica un modelo con topología correcta, y RMSD < 0,17 indica una similitud casual. Se ha indicado en la tabla el análogo estructural más similar encontrado por el servidor.

4.6. Ortólogos en otras especies

La construcción de árboles filogenéticos pueden ayudarnos a entender la evolución de las duplicaciones de genes que codifican Ser/Thr quinasa en mixobacterias. En el árbol filogenético mencionado en el apartado 4.1, se incluyeron todos los dominios Ser/Thr quinasa de las mixobacterias cuyo genoma estaba disponible en ese momento. Actualmente, a fecha de realización de este trabajo, existen 17 genomas de mixobacterias secuenciados, aunque no todos están cerrados y completamente anotados. Por ello, se realizó una nueva búsqueda de genes homólogos a los dominios quinasa de MXAN_1233 y MXAN_1234 de *M. xanthus*, mediante BLASTp. Con las secuencias homólogas obtenidas, todas pertenecientes a mixobacterias, se realizaron nuevos árboles filogenéticos (figuras 4.9 y 4.10).

Los árboles muestran las ocho Ser/Thr quinasa de *M. xanthus* que estamos estudiando, agrupadas en dos ramas. Incluidos en estas ramas, aparecen dominios quinasa de *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Stigmatella aurantiaca*, *Coralloccoccus coralloides*, *Myxococcus fulvus* y *Hyalangium minutum*. Son genes ortólogos cuyo parecido con los genes de *M. xanthus* es mayor que el resto de genes parálogos de *M. xanthus* (figuras 4.9 y 4.10).

Todas las especies de mixobacterias que contienen estos ortólogos de *M. xanthus* pertenecen al suborden *Cystobacterineae*, dentro del orden *Myxococcales*. Dentro de este orden hay especies que no presentan ortólogos de estos genes, aunque sí de otras Ser/Thr quinasa, como sucede en *Myxococcus stipitatus* y otras especies del género *Anaeromyxobacter*. Fuera de este suborden no existen ortólogos tan emparentados filogenéticamente.

La mayoría de los ortólogos identificados se encuentran emparejados en el genoma de cada especie, apareciendo uno a continuación del otro al igual que ocurre en *M. xanthus*. Por tanto, la **microsintenia** de la pareja se mantiene a nivel de suborden. Dichas parejas de genes han sido representados en la figura 4.11.

Junto a estas parejas de quinasa, aparece frecuentemente un gen que codifica una proteína con dominio DUF2381, que como observamos anteriormente, aparece en dos de las parejas de *M. xanthus*. En el resto de especies también se conservan copias de este gen, que aparecen siempre aguas arriba de las parejas de quinasa. El dominio DUF2381 consta de 286 aminoácidos y a fecha de hoy no tiene función conocida. Se conocen en total 90 secuencias con este dominio, que solamente se encuentran en especies pertenecientes al orden *Myxococcales*, es decir, **estas proteínas son codificadas exclusivamente por mixobacterias**.

Además de los genes codificantes del dominio DUF2381 que son mostrados en la figura 4.11, aparecen más homólogos de estos genes en otras partes del genoma de *M. xanthus* y también de otras mixobacterias. En particular, *M. xanthus* codifica 7 proteínas de este tipo en total, incluyendo MXAN_1232 y MXAN_3181. Otro rasgo interesante de estos genes es que **siempre aparecen acompañando a genes que codifican Ser/Thr quinasa**, tanto en *M. xanthus* como en el resto de especies. Este dato es motivo para pensar que estas proteínas funcionan conjunta y exclusivamente con Ser/Thr quinasa.

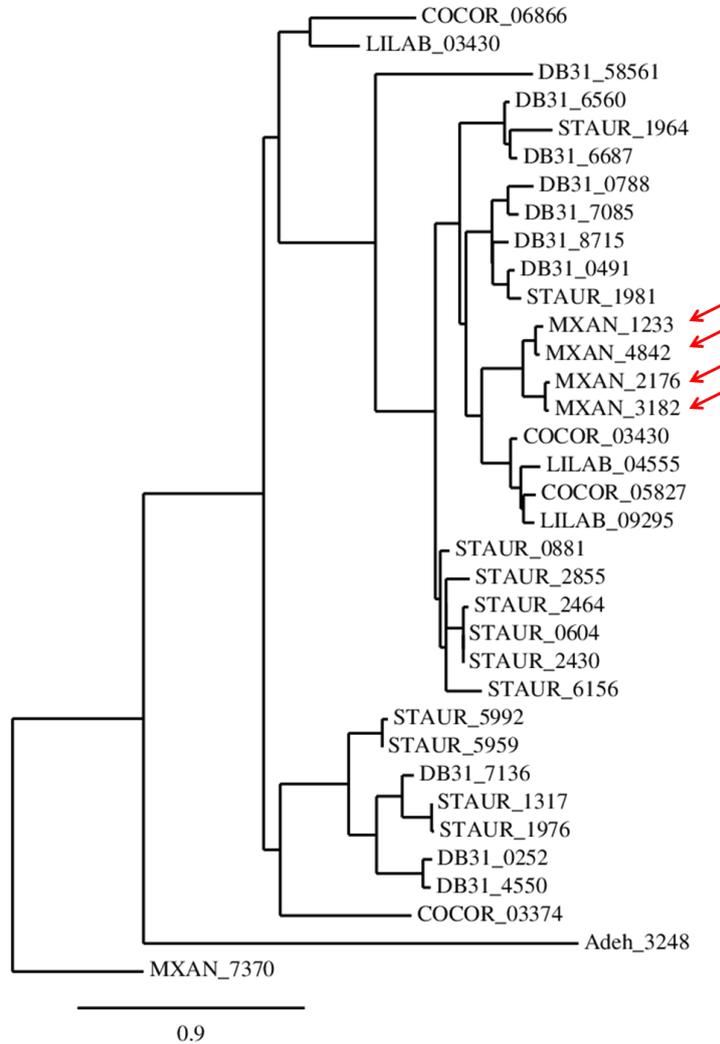


Figura 4.9: Árbol del dominio Ser/Thr quinasa, mostrando ortólogos de las quinasas de *M. xanthus* en otras mixobacterias. Los genes aparecen identificados según la especie y su posición en el genoma, Adeg: *Anaeromyxobacter dehalogenans*, COCOR: *Coralloccoccus coralloides*, DB31: *Hyalangium minutum*, LILAB: *Myxococcus fulvus*, y STAUR: *Stigmatella aurantiaca*. Como referencia, se ha incluido el dominio quinasa del gen MXAN_7370, el gen parálogo de *M. xanthus* más cercano a los genes MXAN_1233, MXAN_2176, MXAN_3182 y MXAN_4842, los cuales aparecen señalados con flechas rojas. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones en la secuencia de aminoácidos. El árbol ha sido elaborado en la plataforma Phylogeny.fr y utilizando la información disponible en las bases de datos KEGG y NCBI.

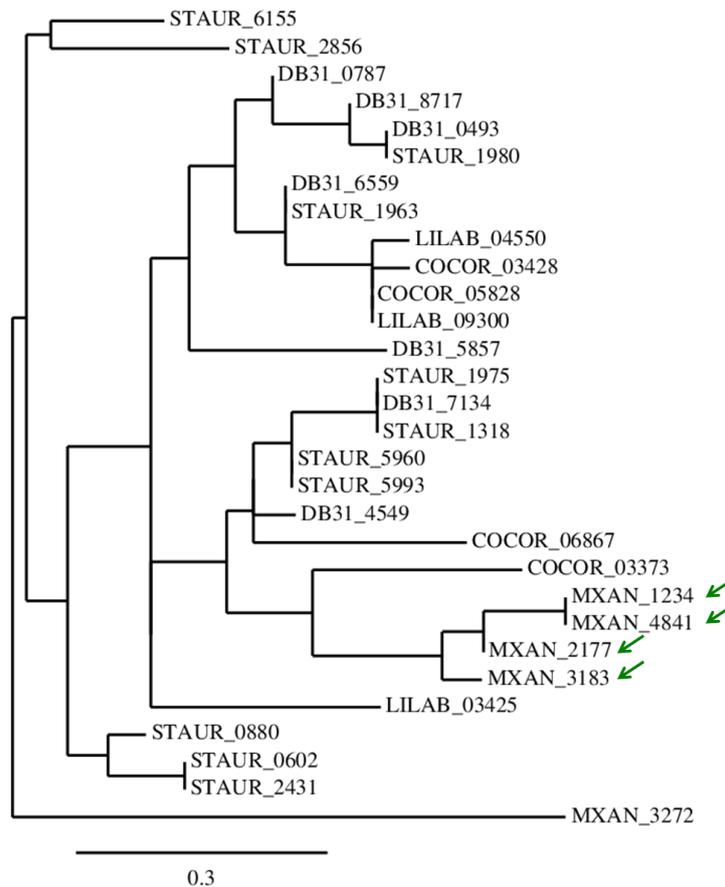


Figura 4.10: Árbol del dominio Ser/Thr quinasa, mostrando ortólogos de las pseudoquinasas de *M. xanthus* en otras mixobacterias. Los genes aparecen identificados según la especie y su posición en el genoma, Adeh: *Anaeromyxobacter dehalogenans*, COCOR: *Corallocccus coralloides*, DB31: *Hyalangium minutum*, LILAB: *Myxococcus fulvus*, y STAUR: *Stigmatella aurantiaca*. Como referencia, se ha incluido el dominio quinasa del gen MXAN_3272, el gen parálogo de *M. xanthus* más cercano a los genes MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841, los cuales aparecen señalados con flechas verdes. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones en la secuencia de aminoácidos. El árbol ha sido elaborado en la plataforma Phylogeny.fr y utilizando la información disponible en las bases de datos KEGG y NCBI.



Figura 4.11: Ortólogos en especies del suborden *Cystobacterineae*. Las flechas representan ORFs anotados en el genoma de cada especie. Las flechas del mismo color representan genes parálogos, exceptuando las de color blanco que representan genes sin ortólogos ni parálogos, en este contexto. La búsqueda de parálogos se ha realizado en las bases de datos KEGG y NCBI.

Por otra parte, existe gran diversidad de proteínas que acompañan a estas parejas de quinasas, y entre las más frecuentes encontramos transposasas (STAUR_2428 y STAUR_2432), y pequeñas proteínas de aproximadamente 100 aminoácidos con dominios HTH de unión al ADN. Sin embargo la microsintenia no se da en el mismo grado que ocurría en las cuatro parejas de parálogos de *M. xanthus*. Los genes vecinos no se mantienen conservados en las otras especies, y tampoco se mantiene un elevado grado de microsintenia entre las regiones génicas de una misma especie.

Es interesante destacar que las especies con mayor tamaño de genoma, cuyo quinoma es también mayor, poseen relativamente más copias de estas parejas de Ser/Thr quinasas [4.11](#).

Del análisis bioinformático se deduce que estas parejas de quinasas son genes de los que es necesario disponer numerosas copias cuando el tamaño del genoma es muy grande. Podrían estar regulando procesos cuya complejidad aumenta con el tamaño del genoma como el ciclo de desarrollo, puesto que el número de este tipo de quinasas es mayor en mixobacterias que forman cuerpos fructíferos más complejos, como ocurre con *Stigmatella*.

Por ello, como siguiente objetivo se propuso investigar qué función cumplen estas Ser/Thr quinasas en el ciclo de vida de *M. xanthus*.

Capítulo 5

Estudio del perfil de expresión de las parejas de quinasa-pseudoquinasa

Para iniciar el estudio del papel fisiológico de las parejas de genes quinasa-pseudoquinasa en el ciclo de vida de *M. xanthus* se procedió a estudiar su perfil de expresión genética. Para ello se fusionó el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* al promotor de las quinasas situadas aguas arriba. Este método está explicado detalladamente en el apartado 3.6.1.

Como primer paso se construyó un plásmido para cada quinasa partiendo del vector pKY481. En cada uno de los plásmidos se clonó un fragmento que abarcaba las 800 pb justo aguas arriba de los genes de las quinasas, incluyendo el codón de inicio. Los cebadores utilizados para amplificar cada fragmento aparecen en el apartado 2.4. A continuación de este fragmento de 800 pb, que contiene el promotor de los genes, quedaría colocado el gen de la β -galactosidasa en la misma fase de lectura que la quinasa. De esta forma se construyeron los plásmidos denominados pKY-1233*lacZ*, pKY-2176*lacZ*, pKY-3182*lacZ* y pKY-4842*lacZ*.

Los plásmidos fueron electroporados en la cepa silvestre de *M. xanthus* DK1622, y se integraron en el cromosoma por recombinación homóloga. Se obtuvieron así 4 cepas, 1233-*lacZ*, 2176-*lacZ*, 3182-*lacZ* y 4842-*lacZ*, en las que el gen *lacZ* se expresa bajo el control de cada uno de los promotores de las quinasas aguas arriba de cada pareja. De esta manera, la actividad de la enzima β -galactosidasa desarrollada en cada cepa se correlaciona de forma directa con el nivel de expresión de la quinasa estudiada.

La actividad β -galactosidasa de cada cepa se analizó de forma cualitativa, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el desarrollo, añadiendo X-gal al medio de cultivo. Este sustrato adquiere un tono azul cuando es metabolizado por la enzima β -galactosidasa. La intensidad en la coloración es proporcional al nivel de expresión de la enzima y, por tanto, al nivel de expresión de las quinasas.

El análisis cualitativo del perfil de expresión (figura 5.1) mostró que no existían niveles de expresión detectables ni durante el crecimiento vegetativo, ni durante el

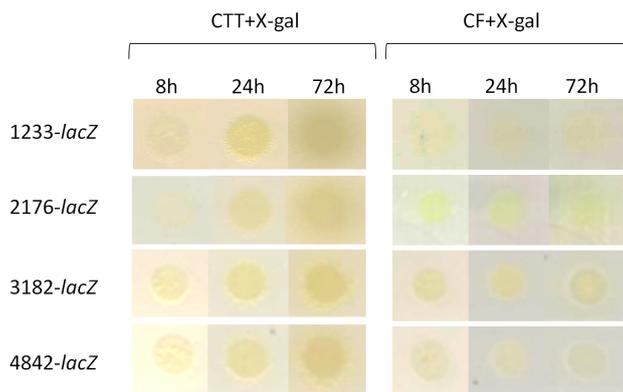


Figura 5.1: Expresión génica de las quinastas. Se observó de manera cualitativa la actividad β -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y el ciclo de desarrollo (medio CF) de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* bajo el control del promotor de las quinastas 1233-*lacZ*, 2176-*lacZ*, 3182-*lacZ* y 4842-*lacZ*. Se inocularon gotas de 10 μ L a una $DO_{600}=15$, obtenidas mediante la concentración de un cultivo vegetativo, en ambos medios de cultivo y se incubaron a 30 °C en oscuridad hasta transcurridas 72 h.

ciclo de desarrollo. De cada una de las cepas construidas se analizaron varias colonias (de 3 a 7) independientes, y todas las colonias presentaron el mismo comportamiento.

De los resultados obtenidos, podemos interpretar que estas quinastas no se expresan en *M. xanthus* en las condiciones analizadas de crecimiento y desarrollo, o bien sus niveles de expresión son tan bajos que son indetectables con esta técnica colorimétrica, lo cual no es extraño en este tipo de proteínas reguladoras (Muñoz-Dorado *et al.*, 2014; Furusawa *et al.*, 2011).

La ausencia de actividad β -galactosidasa observada en el estudio cualitativo nos llevó a descartar la realización de medidas cuantitativas. Basándonos en estos resultados negativos, se decidió descartar el estudio de la expresión de las pseudoquinastas.

Tras el resultado obtenido con el método de las fusiones con el gen *lacZ*, decidimos obtener mutantes de delección para las quinastas individuales, con el fin de observar el efecto de la delección en el fenotipo de *M. xanthus*.

Capítulo 6

Construcción de mutantes de delección en fase individuales para las quinazas y las pseudoquinazas

Para conocer el papel fisiológico de estas parejas de quinasa-pseudoquinasa en el ciclo de vida de *M. xanthus*, procedimos a construir cepas mutantes de delección de cada una de las quinazas y pseudoquinazas para analizar después el fenotipo provocado por las delecciones.

6.1. Construcción de los plásmidos portadores de las delecciones

El primer paso para la construcción de cada una de las cepas mutantes fue la construcción de los correspondientes plásmidos, cada uno de los cuales era portador de una delección. Para ello partimos del plásmido pBJ113 (Julien *et al.*, 2000), en el que se clonaron, contiguos, dos fragmentos de ADN de unas 800 pb, correspondientes a dos fragmentos que flanquean cada uno de los genes que queríamos deleccionar (figura 6.1). Las parejas de oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar por PCR cada uno de los fragmentos aparecen en la sección 2.4. En las construcciones resultantes se mantuvieron tan solo el codón de inicio y el codón de terminación de cada gen deleccionado, unidos por un sitio de restricción de 6 pares de bases, de forma que se mantuvo la pauta de lectura y se respetó la lectura de los genes que se encuentran aguas abajo (ver sección 3.7.1).

De esta manera, se obtuvieron 8 plásmidos, pBJ- $\Delta 1233$, pBJ- $\Delta 1234$, pBJ- $\Delta 2176$, pBJ- $\Delta 2177$, pBJ- $\Delta 3182$, pBJ- $\Delta 3183$, pBJ- $\Delta 4842$ y pBJ- $\Delta 4841$, que sirvieron para deleccionar las quinazas y pseudoquinazas en la cepa silvestre.

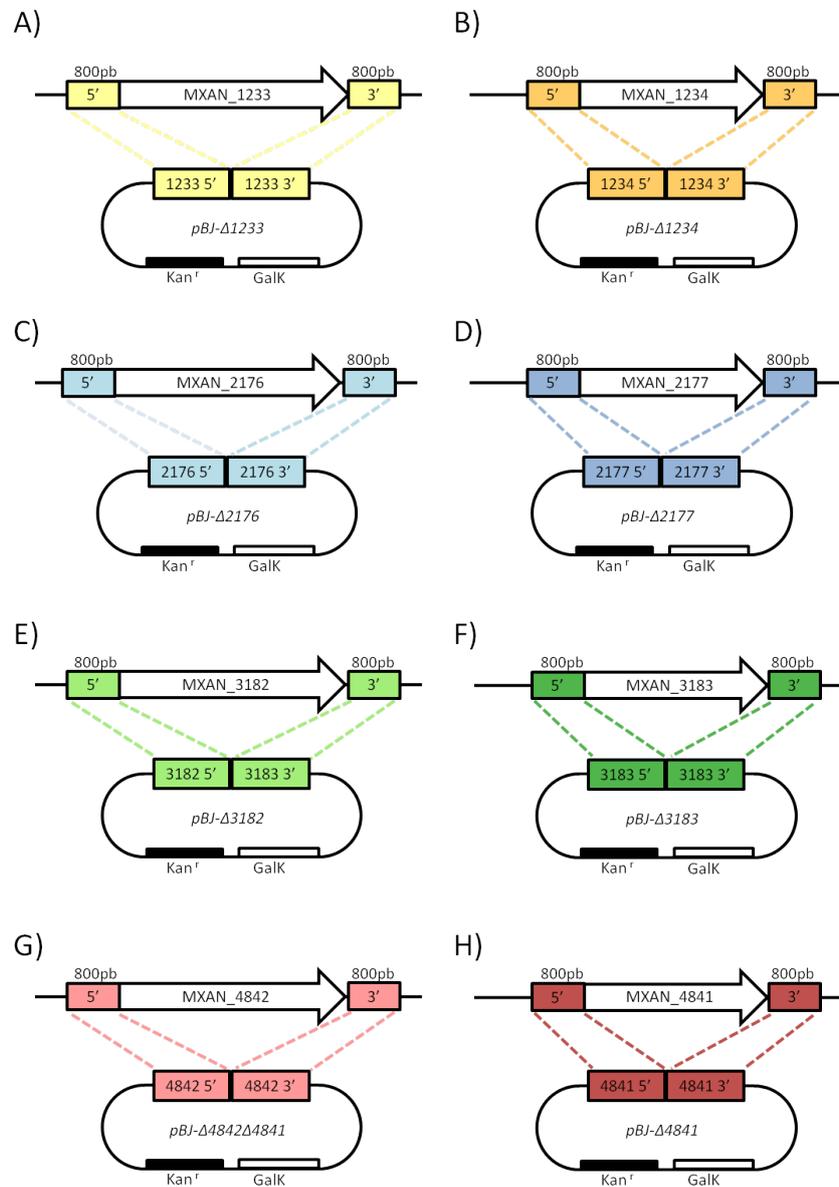


Figura 6.1: Vectores portadores de deleciones deleciones en fase individuales para quinasas y pseudoquinas: (A) pBJ-Δ1233, (B) pBJ-Δ1234, (C) pBJ-Δ2176, (D) pBJ-Δ2177, (E) pBJ-Δ3182, (F) pBJ-Δ3183, (G) pBJ-Δ4842 y (H) pBJ-Δ4841.

6.2. Obtención de las cepas mutantes

Una vez contruidos los ocho plásmidos que portaban, de forma individual, las quinazas y pseudoquinazas delecionadas en fase, se procedió a introducirlos mediante electroporación en la cepa silvestre de *M. xanthus*. Mediante dos procesos consecutivos de recombinación homóloga, se sustituyó la copia funcional del gen en el cromosoma de la bacteria. Este procedimiento se explica con más detalle en el apartado 3.7.1.

El proceso de doble recombinación homóloga puede resultar en la obtención tanto de colonias mutantes como de colonias nuevamente silvestres. Para diferenciar las silvestres de las mutantes, cada una de las colonias obtenidas fue analizada mediante Southern blot. En la figura 6.2 se muestran los Southern blots de comprobación de las cepas mutantes para las quinazas, en el apartado A). Dichas cepas fueron denominadas $\Delta 1233$, $\Delta 2176$, $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$. En esta misma figura se muestran, en el apartado B), los Southern blots de comprobación de las cepas mutantes para las pseudoquinazas, denominadas $\Delta 1234$, $\Delta 2177$, $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$.

Una vez obtenidos todos los mutantes, nos percatamos de que la pigmentación de la mayoría de las cepas mutantes difería a simple vista del aspecto de la cepa silvestre. Tal es el caso de los mutantes $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$, que, como se aprecia en la figura 6.3, presentaron una coloración parda distinta al característico color amarillo de la cepa silvestre DK1622. Dichas cepas mutantes mostraban además un aspecto mucoso cuando crecían en medio sólido. No obstante, las cepas mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ mantuvieron el aspecto amarillo y la textura originales de la cepa silvestre.

Las cepas mutantes con aspecto diferente a la cepa silvestre poseen características que se corresponden con la variante *tan* de *M. xanthus*. Esta variante de células aparece de forma natural en las colonias normales, pero en baja proporción, entre el 1-25 % de las células según Laue y Gill (1995) y el 5 % según Furusawa *et al.* (2011). Tradicionalmente, siempre se ha trabajado preferiblemente con las variantes *yellow* de *M. xanthus* antes que con variantes *tan*, para evitar los efectos del cambio de fase a la hora de evaluar un fenotipo (Hodgkin y Kaiser, 1979). Sin embargo en nuestro caso no fue posible seleccionar las variantes *yellow*, pues para seis de las ocho cepas mutantes ($\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$) solamente se obtuvieron colonias en fase *tan*. Por este motivo, para hacer una mejor evaluación del fenotipo de las cepas mutantes se decidió comparar dichas cepas con sus respectivos tipos de cepas silvestres: una de variante *yellow* y otra *tan*. Para ello, se decidió realizar un análisis fenotípico previo de las dos variantes silvestres *yellow* y *tan*.

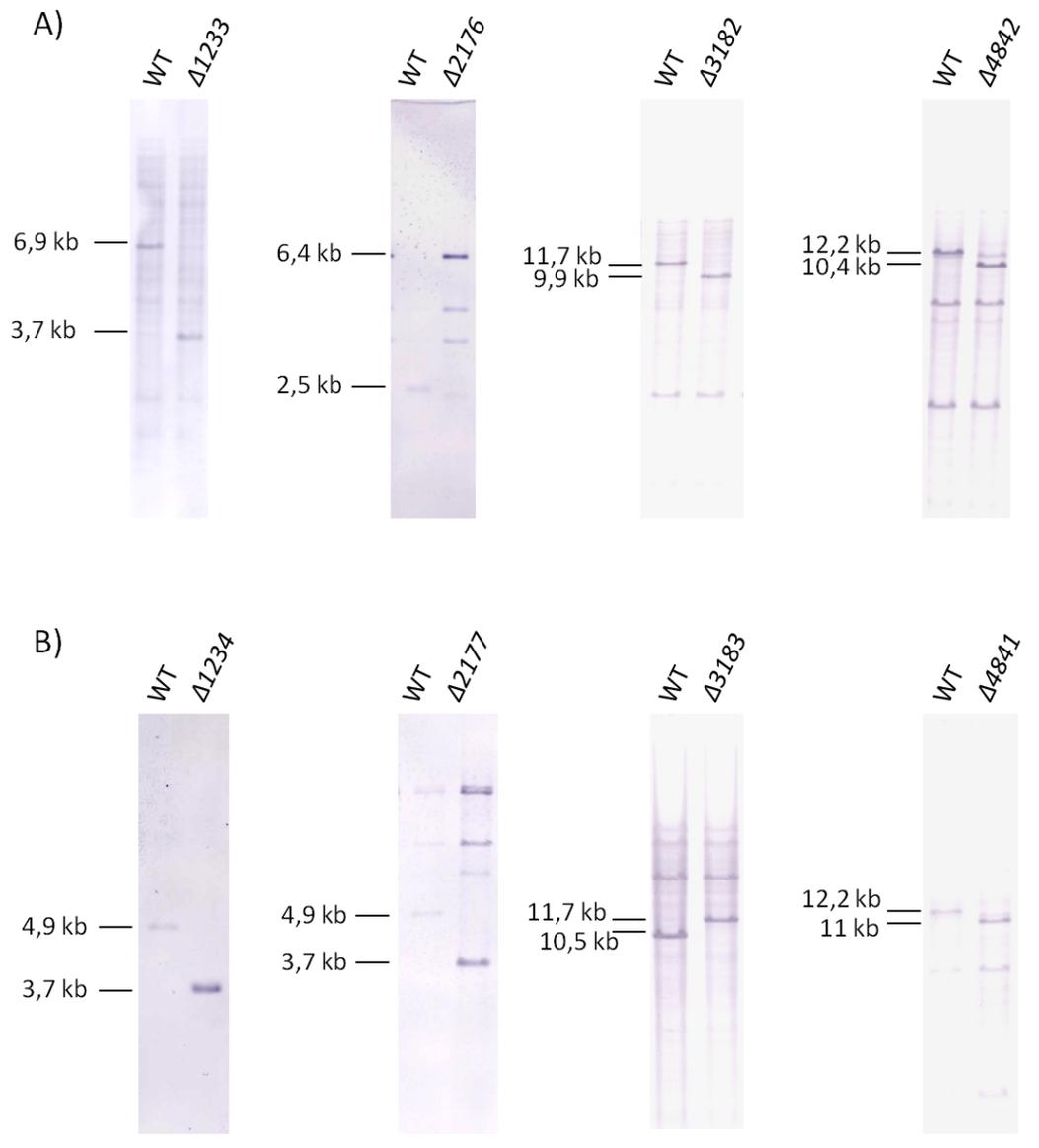


Figura 6.2: Southern blots de comprobación de los mutantes individuales de las quinasas y pseudoquinasas. A) Comprobación de las cepas mutantes $\Delta 1233$, $\Delta 2176$, $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$. Los cromosomas fueron digeridos con las enzimas *SalI*, *XhoI*, *PstI* y *XhoI* respectivamente. La sonda utilizada fue, en los cuatro casos, el fragmento de PCR situado aguas arriba de la quinasa. Los tamaños de los fragmentos esperados para cada mutante aparecen marcados en la imagen, junto al tamaño esperado para su control (WT). B) Southern blots de comprobación de las cepas mutantes para las pseudoquinasas $\Delta 1234$, $\Delta 2177$, $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$. Los cromosomas fueron digeridos de nuevo con las enzimas *SalI*, *XhoI*, *PstI* y *XhoI* respectivamente. La sonda utilizada fue, en estos cuatro casos, el fragmento de PCR situado aguas abajo de la pseudoquinasa. Los tamaños de los fragmentos esperados para cada mutante aparecen marcados en la imagen, junto al tamaño esperado para su control (WT).

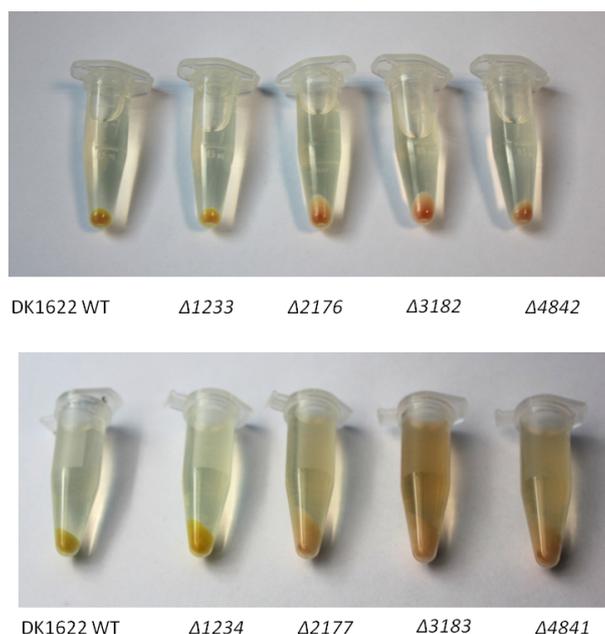


Figura 6.3: Pigmentación de las cepas mutantes de las quinasas y pseudoquinasas, en comparación con la cepa silvestre DK1622. Las cepas fueron cultivadas durante 24 h a 30 °C en agitación, y se centrifugaron 3-4,5 mL de cada cultivo a 10.000xg durante 2 min para obtener los *pellets*.

6.3. Análisis de las variantes *yellow* y *tan* de *M. xanthus*

En primer lugar, se procedió a aislar una colonia silvestre de *M. xanthus* en fase *tan*. Para ello se hicieron diluciones seriadas de un cultivo líquido de la cepa silvestre DK1622, y se sembraron las diluciones en medio nutritivo sólido (CTT-agar) para obtener colonias separadas que permitieran hacer un recuento. Transcurrida una semana de incubación a 30 °C aparecieron mayoritariamente colonias que presentaban fenotipo *yellow* y algunas colonias con fenotipo *tan* (figura 6.4). De éstas últimas se analizaron 3 para comprobar que mantenían las mismas características fenotípicas, especialmente durante el ciclo de desarrollo, y se conservó una de ellas. A esta cepa se le dio el nombre de DK1622 *tan*. A continuación, para evaluar la pureza de la cepa silvestre DK1622 *tan*, se contó también la proporción de células *yellow* y *tan* que contenía dicha cepa. Para ello se practicaron diluciones seriadas nuevamente.

En ocasiones, cierto porcentaje colonias provenientes tanto de DK1622 como de DK1622 *tan* presentaban un aspecto intermedio que no permitió clasificarlas; para este caso se creó una categoría denominada *no clasificadas*. Estas últimas colonias se contaron y se incluyeron como un margen de error en la clasificación.

Los recuentos de colonias realizados permitieron comparar el porcentaje de células que se hallaban en cada fase de forma natural en las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. Según el resultado, que aparece representado en la figura 6.4, una colonia natural de DK1622 posee alrededor de un 85±9% de células *yellow* y un 6±9% de células *tan*. Los datos obtenidos se solapan con los porcentajes descritos en

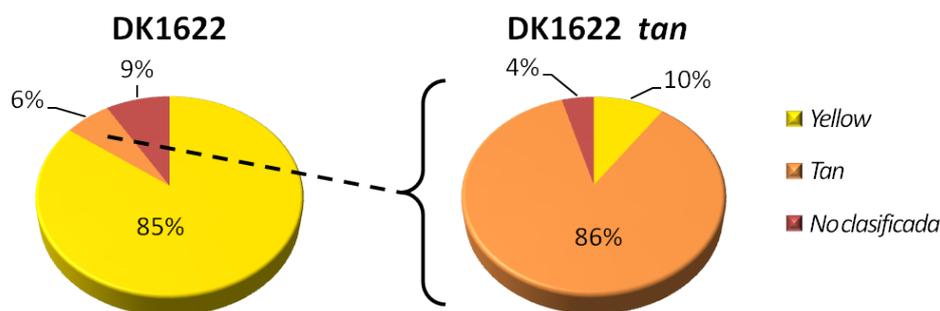


Figura 6.4: Porcentaje de células *yellow* y *tan* en una población silvestre de *M. xanthus* (DK1622 WT) y en una población procedente de una colonia inicialmente *tan* (DK1622 WT *tan*). Los datos proceden de un recuento de más de 300 colonias en ambos casos.

otros estudios de cambio de fase en *M. xanthus*, puesto que la proporción de células *tan* en DK1622 se encuentra incluida en el intervalo de 1-25 % señalado por Laue y Gill (1995), y es cercano al 5 % que describe Furusawa *et al.* (2011). Para la cepa silvestre DK1622 *tan*, que provino de una colonia inicialmente *tan*, se encontró que la proporción de células *tan* era mayoritaria (86 ± 4 %), mientras que las células *yellow* representaban el 10 ± 4 %. En la bibliografía se ha descrito que el porcentaje de células en fase *yellow* de una colonia *tan* representan el 1-25 % según Laue y Gill (1994), y el 2-5 % según Dahl *et al.* (2011). Nuestros datos se solapan con los citados por Laue y Gill (1994). Como ambas cepas silvestres presentaron gran mayoría de células de un solo tipo, se consideraron aptas para realizar una evaluación fenotípica de cada una de las variantes en diferentes fases del ciclo de vida.

6.3.1. Ciclo vegetativo

En primer lugar, se analizó el comportamiento de las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan* durante el crecimiento vegetativo.

Cada una de las cepas fue cultivada en medio CTT líquido en agitación a 300 rpm y a 30 °C, y se tomaron medidas periódicas de la densidad óptica del cultivo, hasta las 48 h. El resultado, representado en la figura 6.5, apartado A, muestra que la cepa DK1622 *tan* posee un crecimiento más rápido y alcanza la fase estacionaria unas 12 horas antes que la cepa DK1622. Además, durante la fase estacionaria, alcanza una densidad óptica ligeramente mayor. Es decir, la cepa *tan* es más eficiente creciendo en medio líquido, lo cual ya ha sido observado previamente (Furusawa *et al.*, 2011). La diferencia en el aspecto de ambas cepas durante el crecimiento en medio líquido se muestra en la figura 6.5, apartado B. A simple vista se observa que la cepa DK1622 *tan* posee una coloración marrón-rosada, en comparación con la cepa DK1622 de color amarillo.

A continuación se analizó la movilidad de las cepas DK1622 y DK1622 *tan* sobre agar. Como se explicó en el capítulo (1.1.3), *M. xanthus* presenta dos mecanismos de movilidad en medio sólido, la movilidad A o aventurera y la movilidad S o social.

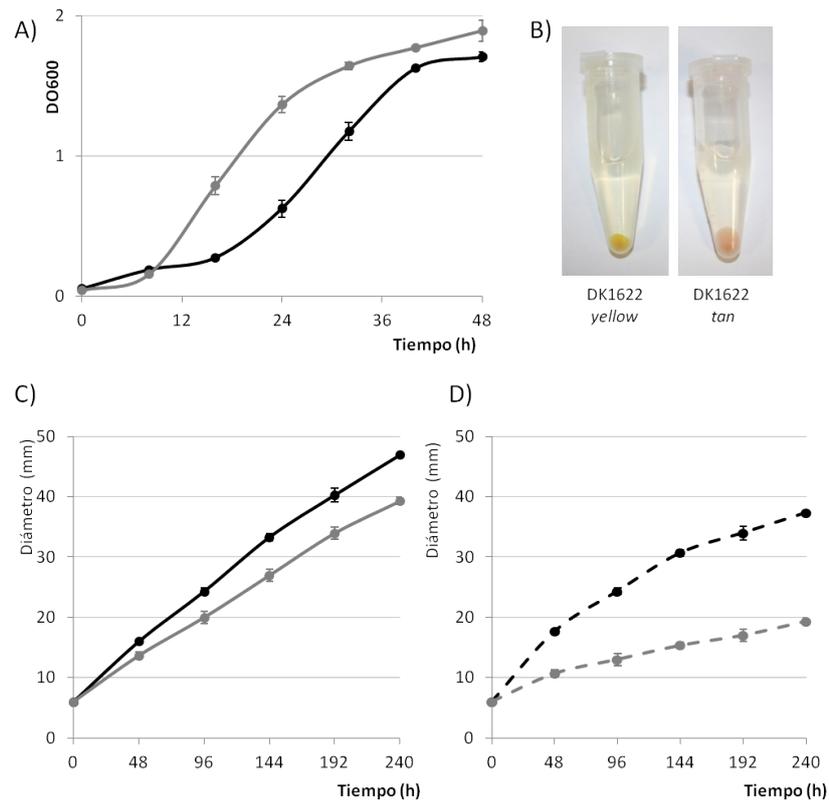


Figura 6.5: Fenotipo vegetativo de las cepas DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). A) Curva de crecimiento en medio líquido a lo largo de 48 h. DO₆₀₀ = densidad óptica del cultivo medida a 600nm. Las barras de error representan la desviación estándar. B) *Pellets* de células procedentes de cultivo líquido. Ambas cepas fueron cultivadas en medio CTT líquido durante 24 h a 30 °C en agitación, y se centrifugaron 3 mL de cada cultivo a 10.000xg durante 2 min. C) Movilidad aventurera en agar al 1.5 %. Las barras de error representan la desviación estándar. D) Movilidad social sobre agar blando al 0.5 %. Las barras de error representan la desviación estándar.

La movilidad aventurera se pone de manifiesto en medios sólidos con un porcentaje de agar alto (1,5 %), mientras que la movilidad social se observa en medios blandos con bajo porcentaje de agar (0,5 %). Para medir la movilidad se inocularon gotas procedentes de cultivos líquidos de las cepas DK1622 y DK1622 *tan* en el centro de una placa de Petri con medio nutritivo CTT y agar al 1,5 % y al 0,5 %. Estas placas se incubaron a 30 °C y se midió el diámetro de las gotas de forma periódica.

Las gráficas representadas en la figura 6.5 (apartados C y D), nos muestran que la cepa DK1622 posee mayor capacidad de movilidad, tanto social como aventurera, que la cepa DK1622 *tan*. De nuevo estos datos se corresponden con los encontrados en la bibliografía (Furusawa *et al.*, 2011).

6.3.2. Ciclo de desarrollo

A continuación, se analizó el comportamiento de las cepas DK1622 y DK1622 *tan* durante el ciclo de desarrollo. Para ello, las cepas se cultivaron en medio sólido pobre en nutrientes para inducir la fructificación y la esporulación (ver procedimiento en el apartado 3.7.2).

Las fotografías de los cuerpos fructíferos mostradas en la figura 6.6, apartado A, muestran que la formación de cuerpos es más lenta en la cepa DK1622 *tan*. Dicha cepa presentó un retraso de alrededor de 24 h, comenzando a formar cuerpos en la periferia y finalmente formándolos en toda la superficie de la gota. Una vez formados los cuerpos fructíferos en la cepa DK1622 *tan*, éstos fueron generalmente más voluminosos y abundantes (figura).

En cuanto a la capacidad de formación de esporas y la germinación, advertimos que existen diferencias entre las dos cepas silvestres. Observamos que la cepa silvestre *tan*, pese a mostrar retraso en el ciclo de desarrollo, terminó formando más esporas que la cepa silvestre *yellow* una vez transcurridas 96 horas de incubación (175 % respecto al 100 % del silvestre original). Observamos un patrón similar en el proceso de germinación, pues tras sembrar el mismo número de esporas, tratadas con calor y sonicación, de cada cepa en medio nutritivo de nuevo, la cantidad de esporas germinadas de la cepa *tan* fue casi el doble (198 %) que de la cepa silvestre original (100 %). Sorprendentemente, estos últimos datos suponen una discrepancia con los datos descritos hasta ahora en la bibliografía, pues clásicamente se ha considerado que las estirpes *tan* no poseen movilidad suficiente para formar cuerpos fructíferos, y son incapaces de formar esporas viables (Shimkets, 1999). Esto puede ser debido a que muchos de los datos se han tomado de cepas mutantes bloqueadas en la fase *tan*, esto es, que no pueden revertir a *yellow* (Laue y Gill, 1995). En nuestro caso hemos aislado una colonia *tan* silvestre que no ha visto alterada su capacidad de cambio de fase. Por tanto, nuestra cepa silvestre DK1622 *tan* contiene una pequeña proporción de células *yellow* generadas de forma natural que probablemente ayudan a culminar con éxito el ciclo de desarrollo. No obstante, Furusawa *et al.* (2011) señala que algunas cepas en fase *tan* pueden formar esporas viables e indistinguibles de las de una cepa silvestre cuando se encuentran a densidades celulares elevadas.

Así pues, consideramos que el aislado DK1622 *tan* es un control adicional válido para la evaluación del fenotipo de las cepas mutantes por dos motivos: porque proviene de la misma cepa silvestre DK1622 original que las cepas mutantes con las que va a ser comparada, y porque ha sido tratada y cultivada bajo las mismas condiciones que todas las demás cepas.

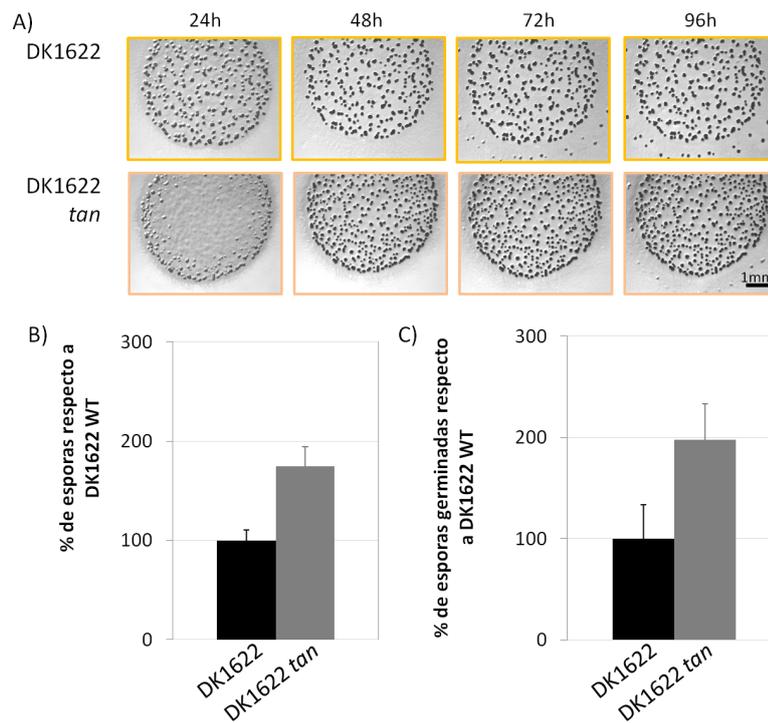


Figura 6.6: Ciclo de desarrollo de las cepas DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Formación de cuerpos fructíferos (A) y cuantificación de la capacidad relativa de esporulación (B) y germinación (C) de la cepa silvestre DK1622 *tan* respecto a la cepa silvestre DK1622. Las esporas fueron contadas tras 96 h de desarrollo. Esas mismas esporas fueron sometidas al proceso de germinación. Las barras de error representan la desviación estándar.

6.4. Análisis fenotípico de los mutantes de delección individuales

Tras caracterizar fenotípicamente cada una de las cepas silvestres que actuarían como control, se procedió a determinar el fenotipo de las cepas mutantes de delección, analizando los mismos procesos durante el ciclo de vida.

6.4.1. Ciclo vegetativo

Variación de fases

En primer lugar, se decidió examinar de forma cuantitativa la proporción de células *yellow* y *tan* existentes en los mutantes para las quinazinas y pseudoquinazinas. Se sembraron diluciones de cultivos líquidos de todas las cepas para obtener colonias separadas, tal y como se procedió en el caso de las cepas silvestres. A continuación se clasificaron en las categorías *yellow*, *tan* o *no clasificadas*.

El resultado del recuento, mostrado en la figura 6.7, concuerda con el aspecto fenotípico mostrado en la figura 6.3. Observamos que los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ están compuestos casi en su mayoría por células *yellow*. Por otro lado, en los mutantes $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$ muestran un elevado porcentaje de células *tan*, tal y como se apreciaba en el color de los cultivos líquidos.

No pensamos que este primer resultado fenotípico sea debido al azar, pues seis de los ocho mutantes construidos presentaron fase *tan*, cuando en la cepa silvestre este morfotipo es minoritario. En otras ocasiones, ya se ha descrito este fenotipo *tan* en cepas mutantes con deficiencias en el ciclo de desarrollo (Furusawa *et al.*, 2011). Además, durante la obtención de mutantes de delección en fase en otras líneas de investigación en nuestro laboratorio no se ha observado la aparición de variantes *tan*.

Crecimiento en medio líquido

Cada una de las cepas mutantes, así como las dos cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*, fueron cultivadas en condiciones de crecimiento vegetativo (CTT líquido en agitación a 300 rpm y a 30 °C, ver sección 3.7.2) durante 48 h. Durante este tiempo se midió periódicamente la densidad óptica de cada cultivo. En las figuras 6.8 y 6.9 aparecen representadas las curvas de crecimiento de los mutantes para las quinazinas y para las pseudoquinazinas, respectivamente.

Se observa que las cepas $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ presentan un crecimiento en líquido semejante al de la cepa silvestre DK1622 (figuras 6.8 A, y 6.9, A). Además, estas cepas mostraron un aspecto amarillo al igual que el silvestre DK1622. En las cepas mutantes $\Delta 2176$ (quinasa) y $\Delta 2177$ (pseudoquinasa), la curva de crecimiento es muy similar (figuras 6.8 B, y 6.9, B). En esta ocasión el crecimiento es más acelerado que el del control DK1622, pero no llega a solaparse con la cepa DK1622 *tan*. Finalmente, las cepas mutantes $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$ (quinazinas) y $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$ (pseudoquinazinas) presentan un crecimiento más rápido que el control DK1622, alcanzando la fase estacionaria rápidamente. En estos mutantes, el crecimiento es más similar al de la

6.4. Fenotipo de los mutantes individuales para las quininas

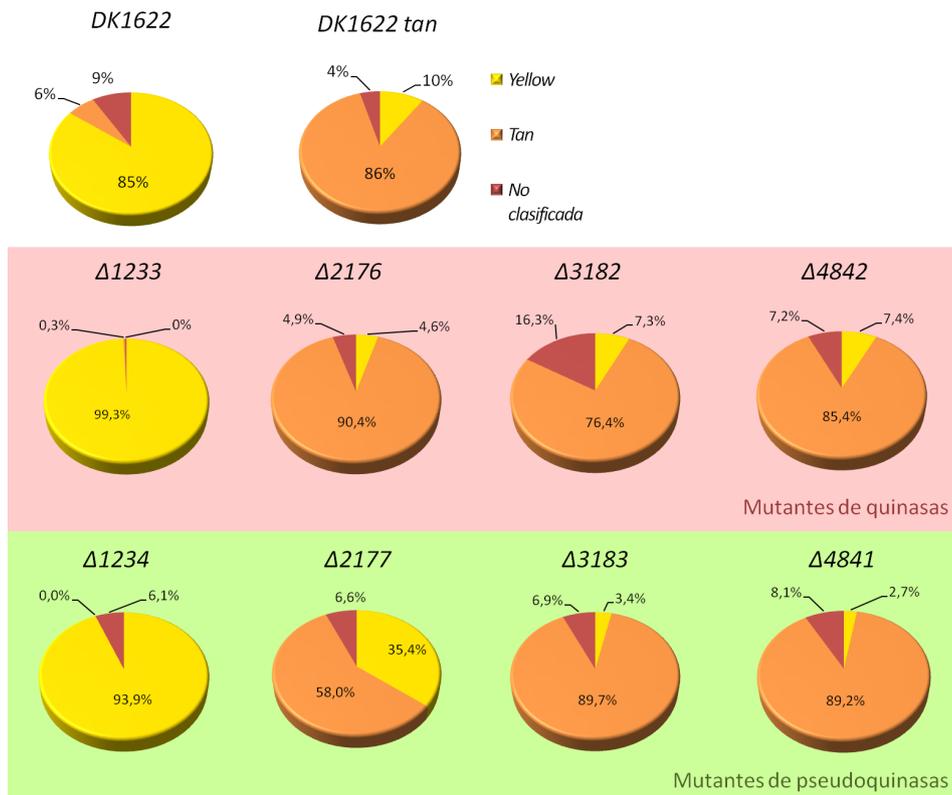


Figura 6.7: Porcentaje de células *yellow* y *tan* en las cepas mutantes de las quininas (recuadro rosa) y pseudoquininas (recuadro verde). Para una mejor comparación, se han incluido también los datos de las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. Los datos proceden de recuentos de más de 300 colonias en cada caso.

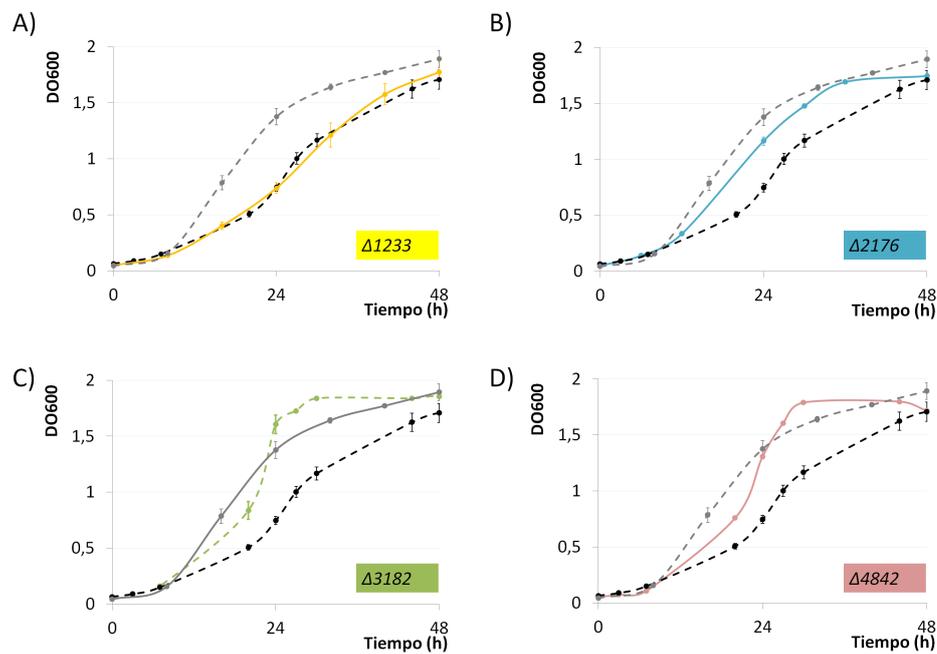


Figura 6.8: Crecimiento vegetativo en medio líquido de las cepas mutantes para las quinasas $\Delta 1233$ (A), $\Delta 2176$ (B), $\Delta 3182$ (C) y $\Delta 4842$ (D), en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

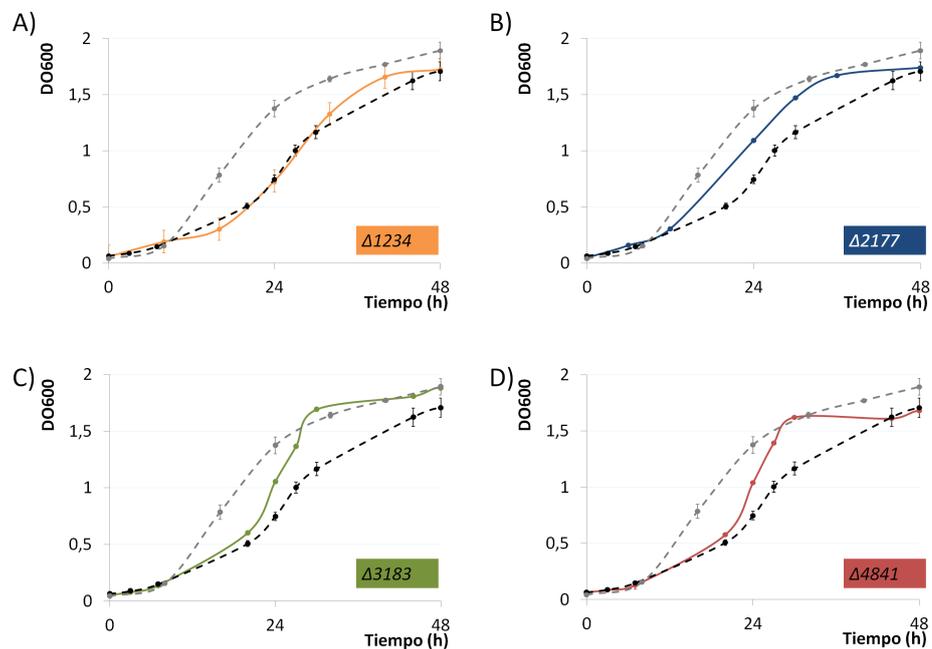


Figura 6.9: Crecimiento vegetativo en medio líquido de las cepas mutantes para las pseudoquinasas $\Delta 1234$ (A), $\Delta 2177$ (B), $\Delta 3183$ (C) y $\Delta 4841$ (D), en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

cepa control DK1622 *tan*. Estos patrones pueden explicarse por el hecho de que los mutantes $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3182$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$ se encuentran en fase *tan*.

En los experimentos realizados se observa un comportamiento fenotípico muy similar en los mutantes que pertenecen a la misma pareja de quinasa-pseudoquinasa. Así, las cepas $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ mutadas en la misma pareja presentan una curva similar y son ambas de aspecto amarillo, comportándose de forma similar a la cepa amarilla DK1622. Lo mismo se observa en el resto de parejas quinasa-pseudoquinasa ($\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, $\Delta 3182$ y $\Delta 3182$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$) que presentan curvas de crecimiento rápido y son de aspecto marrón, comportándose como la cepa control DK1622 *tan*.

Movilidad aventurera y social

La movilidad aventurera se midió en las cepas mutantes del mismo modo que en las cepas silvestres, utilizando agar duro (1,5 %) para medir la movilidad A, y agar blando (0,5 %) para la movilidad S.

Los resultados de la medida de la **movilidad aventurera** han sido representados en las figuras 6.10 (mutantes para las quinasa) y 6.11 (mutantes de las pseudoquinasa).

Los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ presentan una movilidad muy similar a la cepa silvestre. Los demás mutantes, $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3182$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$, presentan en mayor o menor grado una deficiencia en movilidad aventurera, llegando a solaparse con la capacidad de movilidad de la cepa DK1622 *tan*.

El estudio de la **movilidad social** nos muestra un patrón similar al anterior (figuras 6.12 y 6.13). Los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ no muestran grandes diferencias respecto a la movilidad S de la cepa control DK1622, aunque la cepa $\Delta 1234$ presenta una ligera deficiencia. Mientras tanto, en el resto de mutantes se observan defectos en movilidad muy evidentes, siendo muy semejantes al silvestre *tan*.

6.4.2. Ciclo de desarrollo

Para estudiar el efecto de estas deleciones durante el ciclo de desarrollo, las cepas mutantes se cultivaron en medio sólido pobre en nutrientes (CF) para inducir la fructificación y la esporulación (ver procedimiento en Material y Métodos, capítulo 3.7.2).

Fructificación

Las fotografías de los cuerpos fructíferos formados por los **mutantes para las quinasa** se muestran en la figura 6.14. En la cepa $\Delta 1233$ se observa un desarrollo simultáneo a la cepa silvestre DK1622, con formación de cuerpos fructíferos tras 24 h de incubación. En el caso de las otras tres cepas mutantes, el desarrollo se ve retrasado respecto a la cepa DK1622.

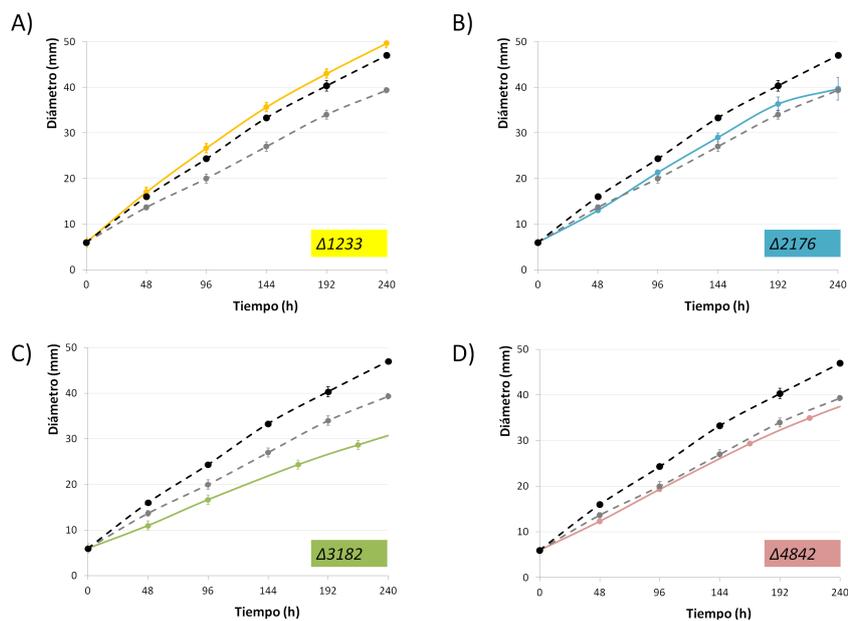


Figura 6.10: Estudio de la movilidad aventurera en los mutantes de las quinazinas, $\Delta 1233$, $\Delta 2176$, $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$ en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

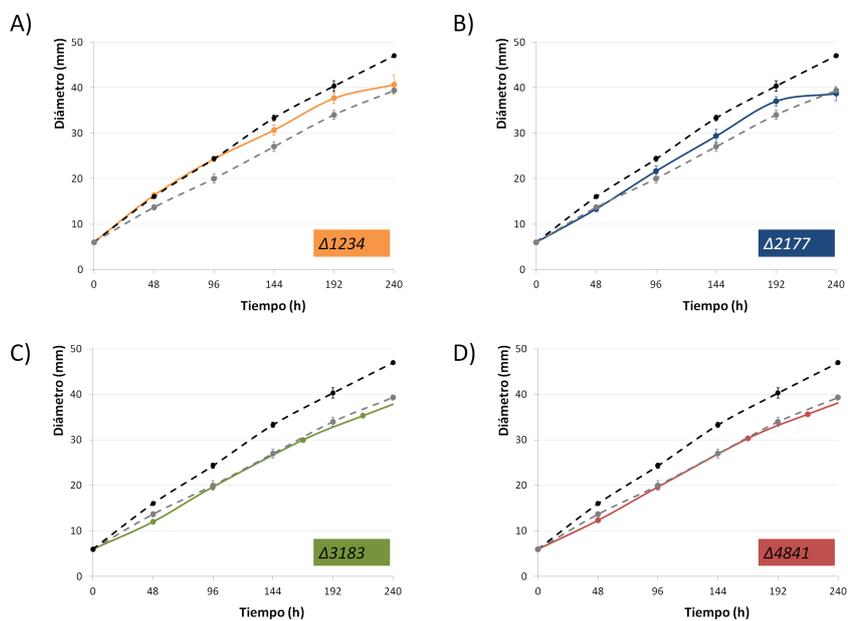


Figura 6.11: Estudio de la movilidad aventurera en los mutantes de las pseudoquinazinas, $\Delta 1234$, $\Delta 2177$, $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$, en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

6.4. Fenotipo de los mutantes individuales para las quinazinas

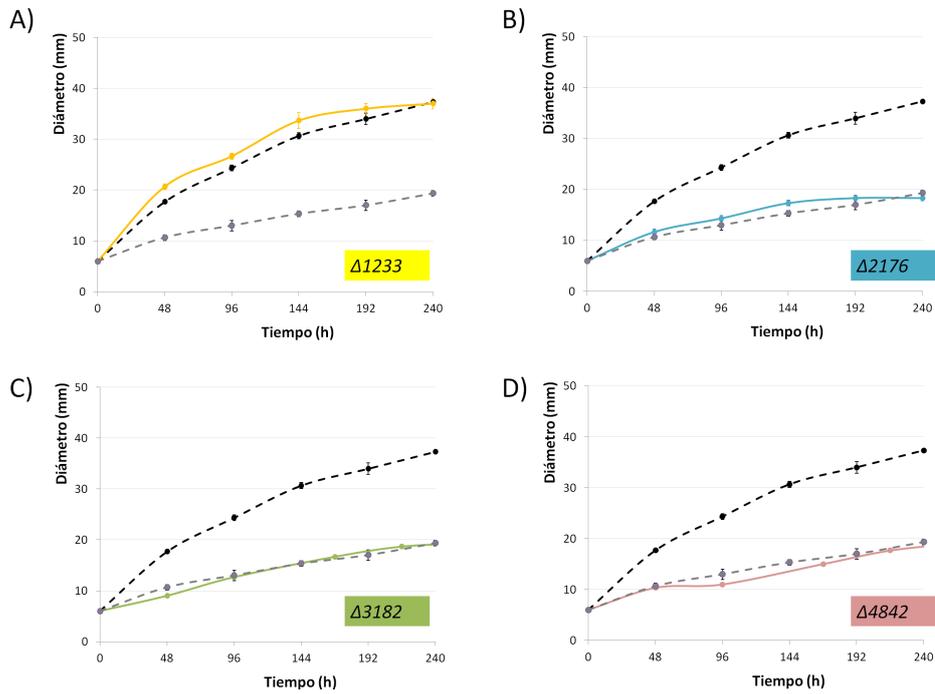


Figura 6.12: Estudio de la movilidad social en las cepas mutantes para las quinazinas, $\Delta 1233$, $\Delta 2176$, $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$, en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

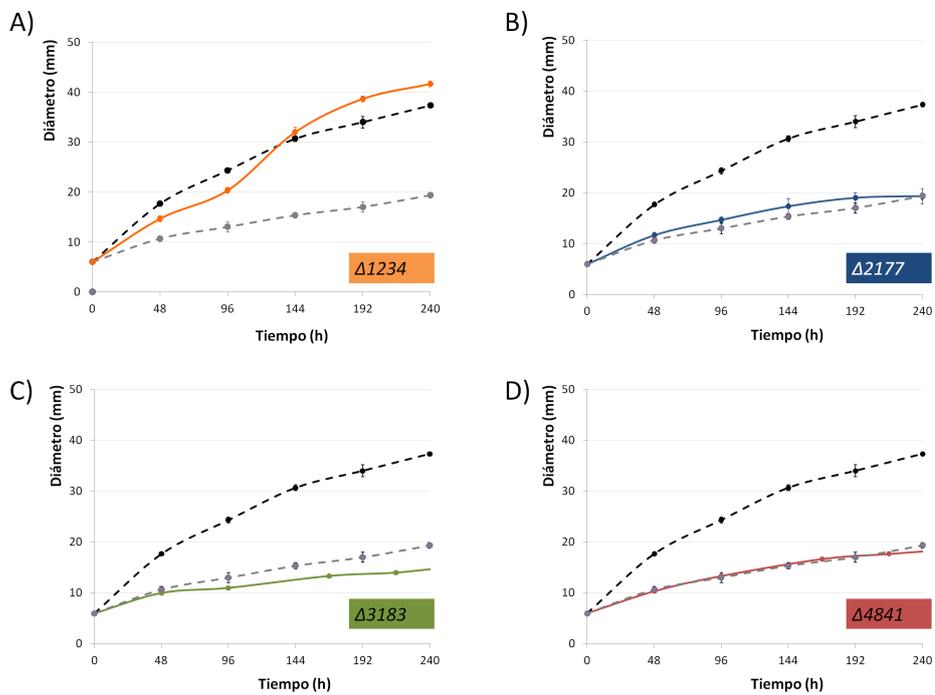


Figura 6.13: Estudio de la movilidad social en las cepas mutantes para las pseudoquinazinas, $\Delta 1234$, $\Delta 2177$, $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$, en comparación con las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

En la cepa $\Delta 2176$ no se aprecian cuerpos fructíferos bien formados hasta transcurridas 48 h, mientras que en las cepas $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$ se forman agregados difusos que hasta las 72 h no adquieren una forma madura y compacta. Estas dos cepas presentan retraso incluso comparadas con la cepa DK1622 *tan*. Esto quiere decir que el retraso en estos mutantes ha sido provocado por la mutación y no simplemente por un cambio a fase *tan*.

Respecto a la morfología de los cuerpos fructíferos, en los cuatro mutantes aparecen diferencias en comparación con la cepa silvestre DK1622. En las cepas $\Delta 1233$ y $\Delta 4842$ los cuerpos fructíferos que se forman son de menor tamaño que en ambos controles, mientras que en los mutantes $\Delta 2176$ y $\Delta 3182$ aparecen cuerpos más voluminosos de lo habitual.

En cuanto a los **mutantes para las pseudoquinastas**, mostrados en la figura 6.15, todas las cepas presentan retraso en la formación de cuerpos fructíferos respecto a la cepa control DK1622. En el mutante $\Delta 1234$, aparecen menor número de cuerpos, y se observan frentes de bacterias en estado vegetativo que se deslizan fuera de la gota (48 h). Presenta más retraso que la cepa mutante de la quinasa compañera, $\Delta 1233$.

El mutante $\Delta 2177$ es el que más retraso presenta de todos los mutantes para las pseudoquinastas. Al igual que la cepa $\Delta 1234$, también presenta mayor retraso que el mutante de su quinasa asociada, $\Delta 2176$, e incluso más retraso que el control DK1622 *tan*. Tras 48 h, es capaz de formar cuerpos más grandes que los de las cepas control, al igual que ocurría en el mutante $\Delta 2176$.

Los mutantes $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$ forman cuerpos fructíferos más tarde que la cepa DK1622, pero antes la cepa DK1622 *tan*. Forman agregados incluso antes que los mutantes de sus quinastas asociadas, las cepas $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$. Los cuerpos que forman ambas cepas son más pequeños que los de la cepa silvestre.

Esporulación y germinación

El ciclo de desarrollo culmina con la formación de esporas dentro de los cuerpos fructíferos, que al reencontrarse con un medio rico en nutrientes germinan, dando lugar a nuevas células vegetativas. El análisis de la capacidad de formación de mixosporas y de la germinación de éstas fue realizado según se describe en el apartado 3.7.2.

El análisis de la **capacidad de esporulación** nos aportó los resultados reflejados en la figura 6.16. En los mutantes de las quinastas (figura 6.16, apartado A), las cepas $\Delta 1233$ y $\Delta 3182$ presentaron deficiencias en la esporulación, pues sólo formaron un 64 % y un 71 % de mixosporas respecto al silvestre. Por el contrario, las cepas $\Delta 2176$ y $\Delta 4842$ presentan una mayor producción (161,8 % y 115,2 % respectivamente). Sólo en la cepa $\Delta 2176$ se observan niveles de formación de esporas tan elevados como los de la cepa control DK1622 *tan*.

En cuanto a los mutantes de las pseudoquinastas (figura 6.16, apartado B), la cepa $\Delta 1234$ presentó grandes deficiencias en la esporulación, incluso más que el mutante de su quinasa asociada $\Delta 1233$, pues sólo fue capaz de formar el 8 % de las mixosporas que formó el silvestre DK1622. Por el contrario, las cepas $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$ presentan

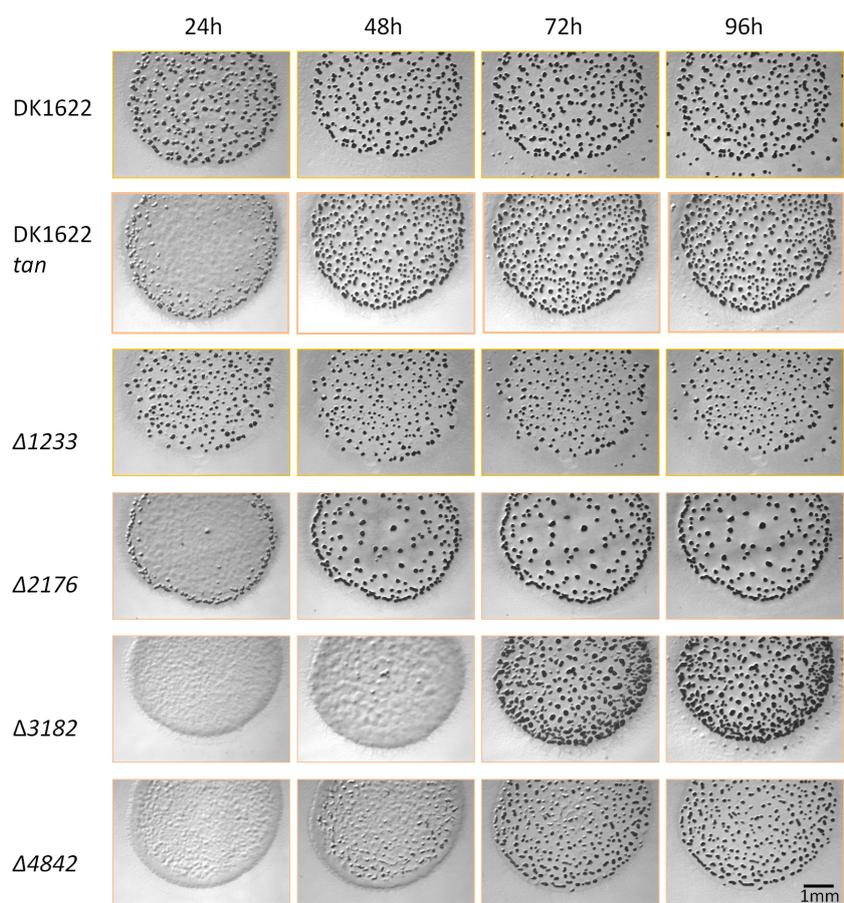


Figura 6.14: Fructificación en las cepas mutantes para las quinasas, $\Delta 1233$, $\Delta 2176$, $\Delta 3182$ y $\Delta 4842$, durante el ciclo de desarrollo, en comparación con las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*.

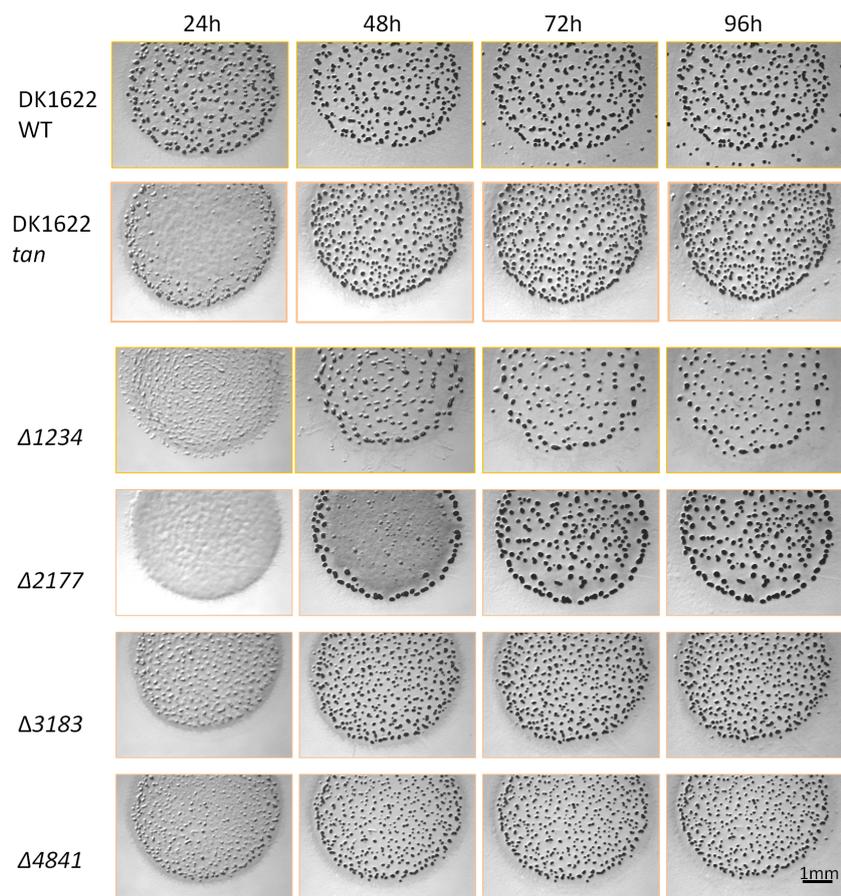


Figura 6.15: Fructificación en las cepas mutantes para las pseudoquinasas, $\Delta 1234$, $\Delta 2177$, $\Delta 3183$ y $\Delta 4841$, durante el ciclo de desarrollo, en comparación con las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*.

6.4. Fenotipo de los mutantes individuales para las quinasas

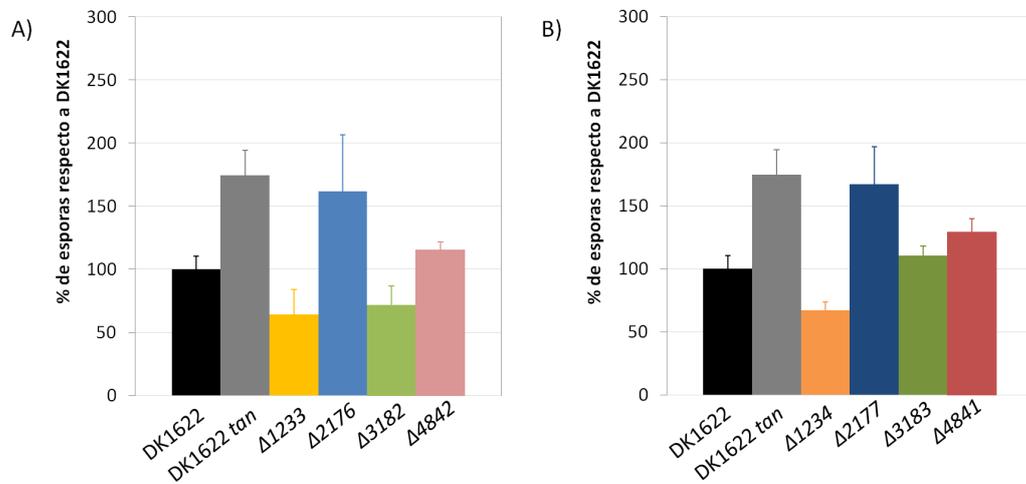


Figura 6.16: Cuantificación de la capacidad relativa de esporulación en los mutantes sencillos de las quinasas (A) y de las pseudoquinasas (B). Las esporas fueron contadas tras 96 h de desarrollo en medio CF. Se han representado los datos como un porcentaje respecto a la esporulación de la cepa DK1622. Los datos de la cepa DK1622 *tan* también aparecen representados como porcentaje respecto a la esporulación del silvestre DK1622. Las barras de error representan la desviación estándar.

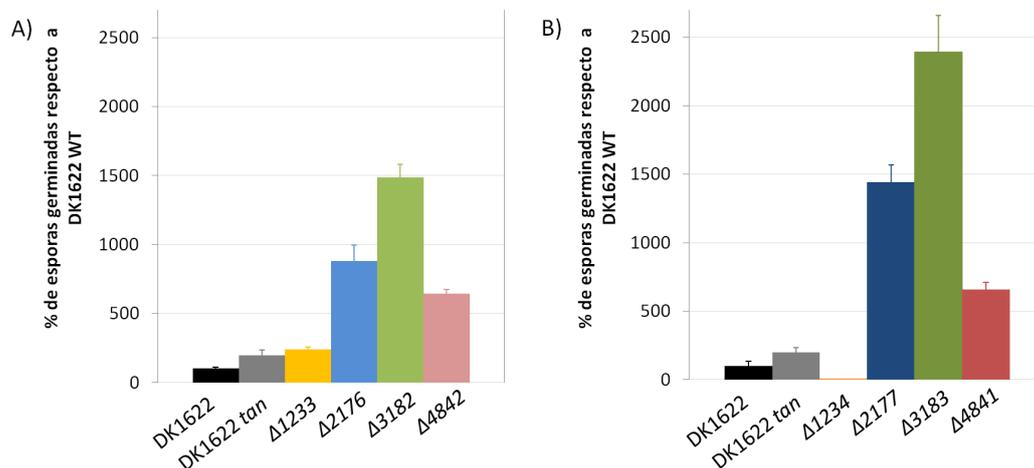


Figura 6.17: Cuantificación de la capacidad relativa de germinación de las esporas procedentes de las cepas mutantes de las quinasas (A) y de las pseudoquinasas (B). Las mismas esporas que fueron contadas tras 96 h de desarrollo, fueron sometidas al proceso de germinación. Se han representado los datos como porcentaje de la capacidad de germinación respecto a la cepa DK1622. Las barras de error representan la desviación estándar.

una producción de esporas ligeramente superior a la del silvestre amarillo: 110,3% y 129,2% respectivamente. Destaca la producción de esporas del mutante $\Delta 2177$, que es muy superior a la del control DK1622, alcanzando un 243,9%. Al igual que ocurría en el mutante de su quinasa compañera $\Delta 2176$, presenta una capacidad de esporulación similar a la cepa silvestre *tan*.

La **capacidad de germinación** de las esporas producidas por las cepas mutantes es también diferente según la cepa. Mientras que las esporas formadas por el mutante $\Delta 1234$ han perdido viabilidad y solo conservan un 5% de la capacidad de germinación del silvestre, en los otros mutantes la capacidad de germinación se ve incrementada, en mayor o menor grado, respecto al control DK1622 (6.17). La cepa mutante $\Delta 1233$ presenta una capacidad de germinación de más de el doble que la del la cepa silvestre (234%). Sin embargo, es mucho más destacable la capacidad de germinación de los mutantes en fase *tan*, es decir, $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4842$ y $\Delta 4841$, que es muy superior a la de cualquiera de las dos cepas control, DK1622 y DK1622 *tan*.

6.5. Sinopsis del fenotipo de los mutantes y conclusiones

A modo de resumen, podemos concluir que la delección de forma individual de cada quinasa, así como de cada pseudoquinasa, tiene efectos fenotípicos. En primer lugar, destacan las cepas mutantes $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$ por presentar un desequilibrio en el cambio de fase, conteniendo mayoritariamente células en fase *tan*. Por otro lado, los mutantes de la pareja de quinastas MXAN_1233 y MXAN_1234 se mantienen en la misma fase *yellow* que la cepa silvestre. Además, entre las dos cepas mutantes en fase *yellow*, llama la atención el mutante $\Delta 1234$ por presentar grandes defectos en el desarrollo.

Paralelamente, y de forma independiente a estos experimentos, [Dziewanowska et al. \(2014\)](#) realizaron estudios de expresión génica diferencial entre cepas silvestres *yellow* y *tan*, y encontraron que los genes codificantes de pseudoquinastas MXAN_1234, MXAN_2177, MXAN_3183 y MXAN_4841 disminuyeron su expresión significativamente en la cepa *tan* de *M. xanthus*. Este dato concuerda con el hecho de que la eliminación de las pseudoquinastas provocó una reversión al morfotipo *tan* en tres de los cuatro mutantes, puesto que se ha provocado en dichas cepas una eliminación de la expresión de estos genes. Esta coincidencia reafirma que el fenotipo *tan* encontrado no es un artefacto. Por tanto, existen razones, aportadas tanto por los resultados de este trabajo como por otros miembros de la comunidad científica, para pensar de que **estas quinastas y pseudoquinastas están implicadas, de una forma directa o indirecta, en el proceso de variación de fases de *M. xanthus*.**

Como se ha descrito anteriormente, la fase *tan* de *M. xanthus* presenta unos rasgos fenotípicos muy diferentes en cuanto a movilidad y capacidad de desarrollo respecto a las colonias que en su mayoría contienen células en fase *yellow*. Esta condición hace que sea difícil atribuir un fenotipo determinado a los mutantes *tan*. Sin embargo, ya sea de forma directa o indirecta a través del cambio de fase provocado, en las cepas mutantes $\Delta 2176$, $\Delta 2177$, $\Delta 3182$, $\Delta 3183$, $\Delta 4841$ y $\Delta 4842$ se observan efectos fenotípicos en varias etapas del ciclo de vida. Generalmente presentan mejor crecimiento vegetativo en medio líquido, y defectos en la movilidad.

Cepa	Q/PS	Crecimiento	Mov. A	Mov. S	Fructificación	Esporas	Germinación
$\Delta 1233$	Q						
$\Delta 1234$	PQ						
$\Delta 2176$	Q						
$\Delta 2177$	PQ						
$\Delta 3182$	Q						
$\Delta 3183$	PQ						
$\Delta 4842$	Q						
$\Delta 4841$	PQ						

Amarillo		
Tan		
Menos: -	Más: +	Igual: =
Menos: --	Más: ++	
Menos: ---	Más: +++	

Tabla 6.1: Resumen gráfico cualitativo del cambio fenotípico en los ocho mutantes de quinasa y pseudoquinasa. Los fenotipos han sido comparados con la cepa silvestre DK1622 natural. Q: mutante de quinasa; PQ: mutante de pseudoquinasa.

Durante el ciclo de desarrollo, vemos que todos los mutantes, ya sean *yellow* o *tan*, presentan cierto grado de retraso en la fructificación. Los efectos de las mutaciones se manifiestan incluso durante los procesos de esporulación y germinación, que de forma general se ven potenciados en las cepas mutantes. Para ofrecer una visión global de los efectos de las deleciones, se ha establecido un sistema cualitativo y así poder observar mejor las tendencias en cada fenotipo con respecto a la cepa silvestre DK1622 (tabla 6.1).

Los mutantes con fenotipo amarillo $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$, similar al silvestre, no están afectados en el crecimiento vegetativo. Uno de ellos, la cepa $\Delta 1234$, presenta ligeras deficiencias en movilidad. Sin embargo, ambos presentan un ligero retraso en la formación de cuerpos fructíferos (tonos rojos). Con respecto al resto de los mutantes, que presentan un fenotipo *tan*, se observa como todos crecen más en medio líquido y alcanzan antes las fase estacionaria (tonos verdes). Se observa también que todos los mutantes presentan deficiencias en la movilidad, y en el ciclo de desarrollo (tonos rojos). Los resultados de la producción de esporas y germinación son sin embargo muy difíciles de interpretar ya que hay una gran variabilidad entre los mutantes. Se observa, no obstante, que los mutantes con fenotipo *tan* presentan gran retraso en la fructificación pero producen esporas muy eficientes en germinación.

Por último, cabe destacar que tanto **la deleción de una quinasa como de su pseudoquinasa compañera provocan, por lo general, cepas con un fenotipo parecido**. Una posible interpretación de este resultado es que ambas proteínas

funcionan en un mismo proceso o ruta de señalización. En cada mutante dicha ruta se ve bloqueada a un nivel diferente, pero en ambos casos ha sido afectado el mismo proceso, resultando en un fenotipo similar.

En vista de este resultado, que muestran que eliminando una u otra quinasa de la pareja se causa un efecto parecido, se decidió realizar mutantes dobles para eliminar simultáneamente la quinasa y la pseudoquinasa de la misma pareja.

Capítulo 7

Construcción de mutantes de delección en fase de múltiples quinastas

Para profundizar más en el papel fisiológico de las parejas de quinasa-pseudoquinasa en el ciclo de vida de *M. xanthus*, se procedió a construir mutantes dobles de algunas de las parejas.

Se escogió en primer lugar la pareja MXAN_1233-MXAN_1234 por ser la única cuyos mutantes individuales mantuvieron la fase *yellow*, de modo que los efectos de las mutaciones son más fáciles de comparar con la cepa silvestre original. Además, nos resultó interesante estudiar la pseudoquinasa MXAN_1234, puesto que la cepa $\Delta 1234$, de entre todos los mutantes de las pseudoquinastas, fue la única que mostró un descenso en la esporulación en lugar de un incremento.

En segundo lugar, decidimos escoger otra pareja para hacer seguimiento de algunos de los mutantes con fenotipo *tan*. De entre todas las parejas, la pareja de quinastas MXAN_2176-MXAN_2177 nos pareció la más interesante pues sus cepas mutantes $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$ destacaron por la enorme capacidad de esporulación y germinación que poseen en comparación con ambas cepas silvestres *yellow* y *tan*.

Por último, en paralelo la construcción de los mutantes dobles, y aprovechando los plásmidos diseñados para dichas mutaciones, se construyó también una cepa mutante cuádruple, carente de las dos parejas quinasa-pseudoquinasa mencionadas anteriormente.

7.1. Construcción de los plásmidos portadores de las delecciones dobles

Se diseñaron y construyeron dos plásmidos portadores de una doble delección, siguiendo la misma metodología utilizada para construir los plásmidos portadores de las delecciones individuales (ver apartado 3.7.1). En ambos plásmidos se utilizaron, como fragmentos flanqueantes de la delección, un fragmento de 800 pb justo aguas

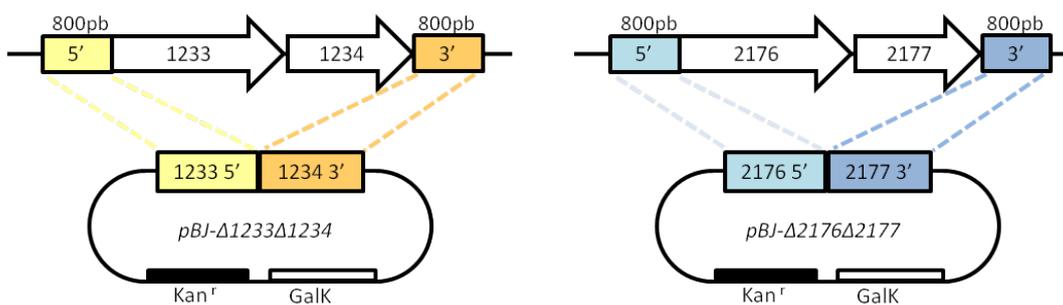


Figura 7.1: Esquema de la construcción de los plásmidos portadores de las delecciones dobles, pBJ-Δ1233-Δ1234 y pBJ-Δ2176-Δ2177.

arriba del gen de la quinasa (MXAN_1233 ó MXAN_2176) y un fragmento de 800 pb justo al final del gen para la pseudoquinasa (MXAN_1234 ó MXAN_2177). Las parejas de cebadores utilizadas para amplificar estos fragmentos por PCR aparecen en el apartado 2.4. Ambos fragmentos se clonaron contiguos en el vector pBJ113 unidos por un sitio de restricción de 6 pb. De esta forma, se obtuvieron los plásmidos pBJ-Δ1233Δ1234 y pBJ-Δ2176Δ2177, ilustrados en la figura 7.1, que servirán para introducir las dobles mutaciones en la cepa silvestre DK1622, así como para construir un mutante cuádruple.

7.2. Construcción de las cepas portadoras de las mutaciones dobles Δ1233Δ1234 y Δ2176Δ2177 y cuádruple Δ1233Δ1234 Δ2176Δ2177

Los plásmidos se introdujeron, por separado, mediante electroporación, en la cepa silvestre de *M. xanthus* y se integraron en el cromosoma mediante un proceso de doble recombinación homóloga, sustituyendo a la pareja funcional de quinasa-pseudoquinasa. Este procedimiento se explica con más detalle en el apartado 3.7.1.

Para diferenciar las colonias mutantes de las revertientes a silvestre fue necesario realizar un Southern blot, al igual que se hizo durante la obtención de los mutantes individuales. Los Southern blots de comprobación realizados para cada cepa mutante, Δ1233-Δ1234 y Δ2176-Δ2177, se muestran en la figura 7.2, apartados A y B.

A continuación, para construir la cepa mutante cuádruple, se partió de la cepa mutante doble Δ2176-Δ2177, a la que se introdujo mediante electroporación el plásmido pBJ-Δ1233-Δ1234. Mediante un proceso equivalente de recombinación homóloga, el fragmento portador de la doble delección Δ1233-Δ1234 sustituyó a la pareja de quinazas MXAN_1233-MXAN_1234, resultado en una cepa con dos parejas de quinasa-pseudoquinasa mutadas, a la que denominamos Δcuádruple. El proceso de integración en el cromosoma y obtención de las cepas silvestres también fue comprobado mediante Southern blot, el cual se muestra en la figura 7.2, apartado C.

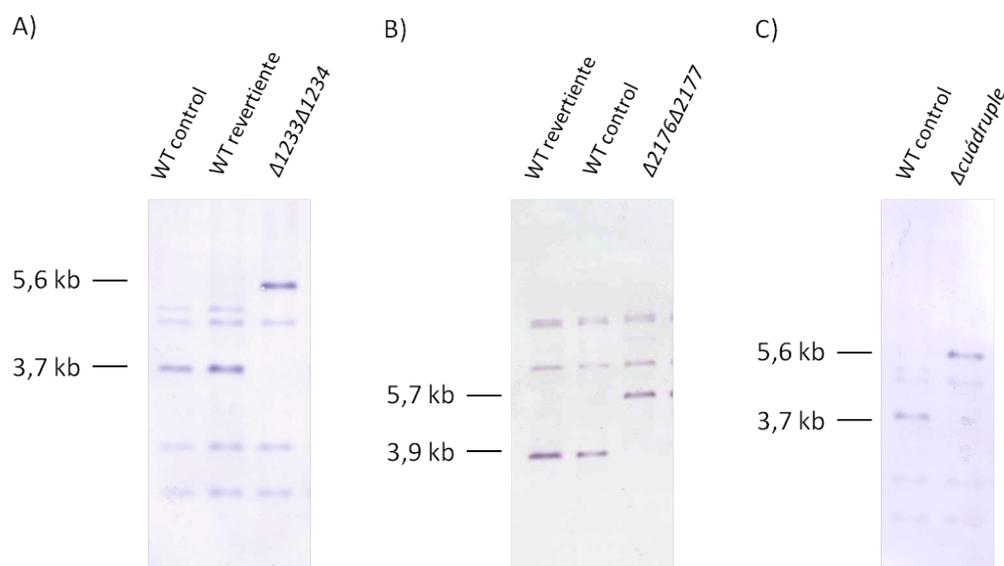


Figura 7.2: Southern blot de comprobación de las cepas mutantes múltiples. A) Comprobación de la cepa $\Delta 1233\text{-}\Delta 1234$. Todos los cromosomas se digirieron con *SalI*. Los tamaños esperados de los fragmentos fueron: 3,7 kb en el caso de la cepa silvestre, y 5,6 kb para las cepas mutantes. Como sonda se utilizó el fragmento 800 pb aguas arriba del gen *MXAN_1233*. B) Comprobación de la cepa $\Delta 2176\text{-}\Delta 2177$. Todos los cromosomas se digirieron con *XhoI*. Los tamaños esperados de los fragmentos fueron: 3,9 kb en el caso de la cepa silvestre, y 5,7 kb para las cepas mutantes. Como sonda se utilizó el fragmento 800 pb aguas arriba del gen *MXAN_2176*. C) Comprobación de la cepa Δ cuádruple. Sobre la cepa mutante $\Delta 2176\text{-}\Delta 2177$ se introdujo la mutación $\Delta 1233\text{-}\Delta 1234$, así que las condiciones del Southern fueron las mismas utilizadas en el apartado A: los cromosomas se digirieron con *SalI*, y la sonda provino del fragmento 800 pb aguas arriba del gen *MXAN_1233*. Los tamaños esperados fueron: 3,7 kb en el caso de la cepa silvestre, y 5,6 kb para la cepa mutante.

7.3. Análisis fenotípico de los mutantes dobles y del mutante cuádruple

7.3.1. Ciclo vegetativo

Variación de fases

Tras la obtención de las cepas, el primer análisis que se realizó fue la determinación de la proporción de células *yellow* y *tan* de cada una de ellas. Para ello, se realizaron diluciones decimales que se inocularon en placas de CTT para posteriormente contar las colonias separadas y clasificarlas en las categorías *yellow*, *tan*, o en *no clasificadas* en el caso de no poderlas clasificar claramente en una de las dos categorías.

Como primer resultado observamos que la cepa mutante doble $\Delta 1233\Delta 1234$ presentaba una mayoría de células en fase *tan* ($71\% \pm 5$, figura 7.3). Este resultado contrasta con el encontrado en los mutantes individuales de esa misma pareja, las cepas $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$, que presentaban una gran mayoría de células en fase *yellow*, incluso más que el silvestre DK1622 (figura 6.4). Sin embargo, observamos que el mutante $\Delta 1233\Delta 1234$, pese a tener apariencia *tan*, conservó más células en fase *yellow* ($34 \pm 5\%$) que el resto de mutantes *tan* e incluso que la cepa silvestre DK1622 *tan* ($10 \pm 4\%$).

Por otro lado, las cepas $\Delta 2176\Delta 2177$ y Δ cuádruple presentaron una mayoría de células con fenotipo *tan*, un $88 \pm 7\%$ y $99 \pm 1\%$, respectivamente (figura 7.3), al igual que las cepas $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$ y que la mayoría de los mutantes individuales (figura 6.4).

En conclusión, al eliminar dos de las parejas quinasa-pseudoquinasa, y también al eliminarlas conjuntamente en el mutante cuádruple, *M. xanthus* presentó un fenotipo *tan*. Esto pone de manifiesto una vez más la implicación, directa o indirecta, de las parejas de quinazinas analizadas en el proceso de variación de fases de *M. xanthus*, dado que incluso partiendo de mutantes sencillos *yellow*, como en el caso de $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$, el mutante doble resultante presenta fenotipo *tan*.

Crecimiento en medio líquido

Tanto las cepas mutantes como las dos cepas silvestres fueron cultivadas en condiciones de crecimiento vegetativo durante 48 h. Durante este tiempo se midió periódicamente la densidad celular de cada cultivo. En la figura 7.4 se pueden ver las curvas de crecimiento resultantes.

En primer lugar, vemos que el mutante doble $\Delta 1233\Delta 1234$, pese a presentar fenotipo *tan*, mostró una curva solapada con la del silvestre DK1622, probablemente debido al considerable contenido de células *yellow* en este mutante. Por otro lado, el mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ tuvo un crecimiento más acelerado y llegó antes a la fase estacionaria, asemejándose más a la cepa silvestre *tan*. Por su parte, el mutante Δ cuádruple mostró un crecimiento intermedio entre los dos tipos de silvestres.

7.3. Fenotipo de los mutantes dobles y cuádruple

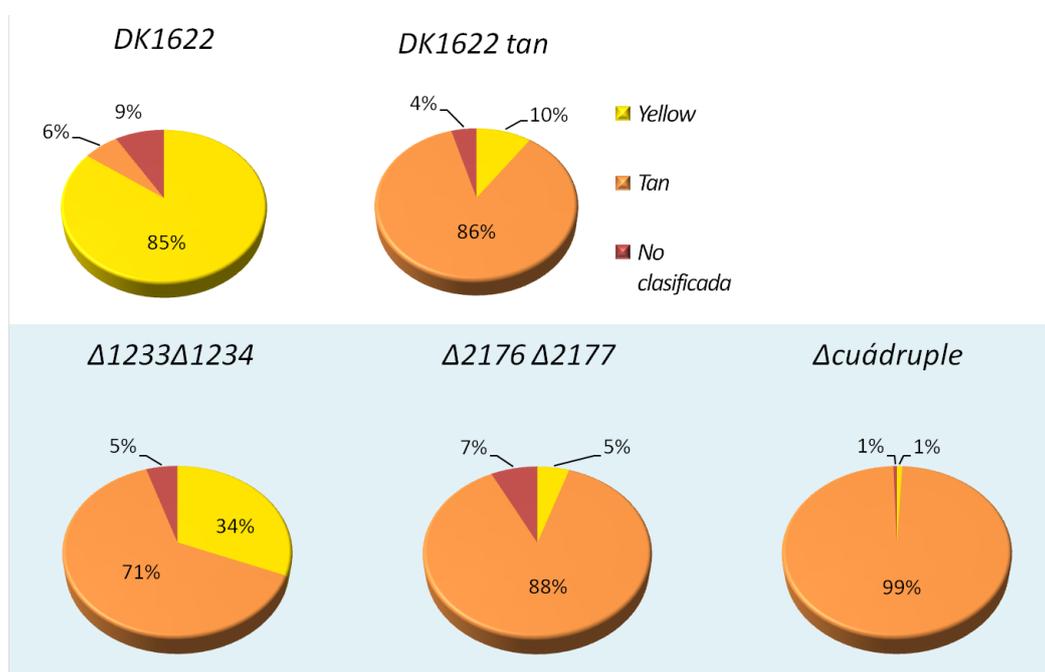


Figura 7.3: Porcentaje de células *yellow* y *tan* en las cepas mutantes de las parejas quinasa-pseudoquinasa: $\Delta 1233\Delta 1234$, $\Delta 2176\Delta 2177$ y Δ cuádruple en comparación con las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. Los datos proceden de recuentos de más de 300 colonias en los tres casos.

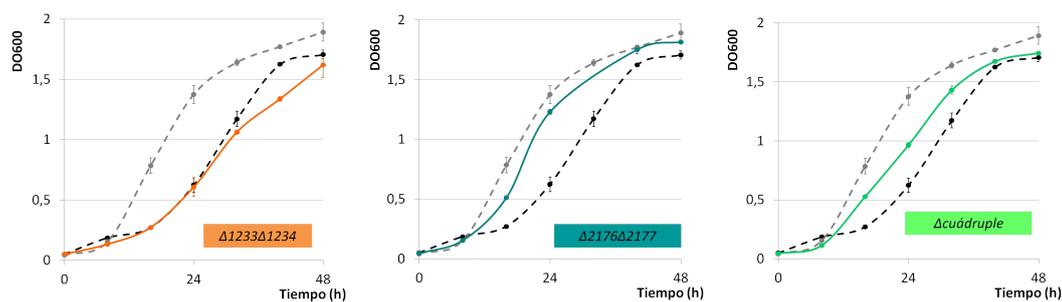


Figura 7.4: Crecimiento vegetativo de los mutantes múltiples de las parejas quinasa-pseudoquinasa: $\Delta 1233\Delta 1234$ (A), $\Delta 2176\Delta 2177$ (B) y Δ cuádruple (C), en comparación con las cepas silvestres DK1622 (línea punteada negra) y DK1622 *tan* (línea punteada gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

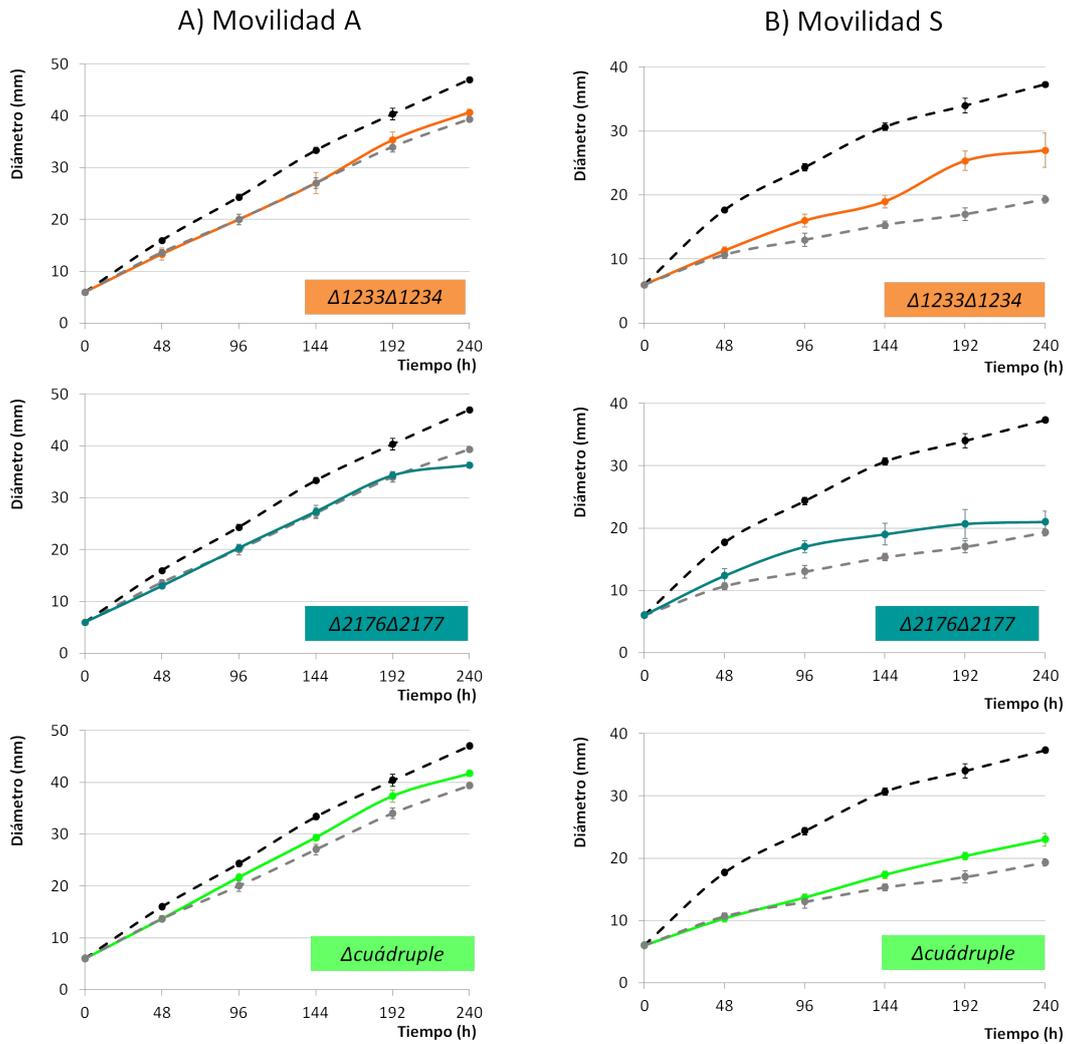


Figura 7.5: Movilidad A (columna A) y S (columna B) en los mutantes múltiples de las parejas quinasa-pseudoquinasa: $\Delta 1233\Delta 1234$, $\Delta 2176\Delta 2177$ y $\Delta cuádruple$, en comparación con las cepas silvestres DK1622 (línea punteada negra) y DK1622 *tan* (línea punteada gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

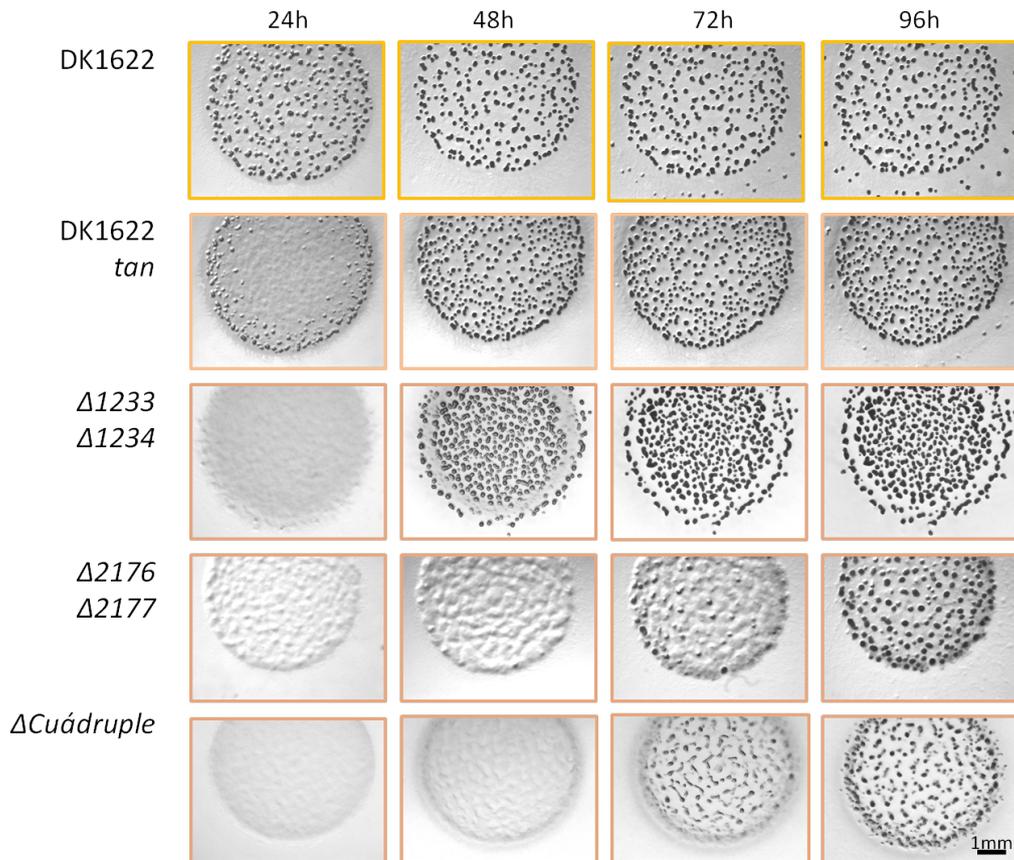


Figura 7.6: Fructificación en los mutantes múltiples de las parejas de quinasa-pseudoquinasa: $\Delta 1233\Delta 1234$, $\Delta 2176\Delta 2177$ y Δ cuádruple, comparadas con las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*.

Movilidad social y aventurera

En la figura 7.5, apartado A, podemos ver el resultado en cuanto a movilidad aventurera de los mutantes. Tanto el mutante $\Delta 1233\Delta 1234$ como el mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ presentaron una movilidad aventurera muy similar a la cepa silvestre DK1622 en fase *tan*, y ambas presentaron menor capacidad de movilidad aventurera que la cepa silvestre DK1622. En cuanto al mutante Δ cuádruple, se observó también una capacidad de movilidad aventurera defectuosa comparada con la cepa silvestre DK1622.

En referencia a la movilidad social (figura 7.5, apartado B) vemos que las tres cepas mutantes presentaron un defecto notable en la capacidad de movilidad, respecto a la cepa silvestre DK1622. En este aspecto fenotípico, todas se asemejan más a la cepa DK1622 *tan*.

7.3.2. Ciclo de desarrollo

Fructificación

Las tres cepas mutantes presentaron un retraso en la fructificación respecto a la cepa DK1622. Estas cepas, con fenotipo *tan*, se retrasaron en la formación de cuerpos

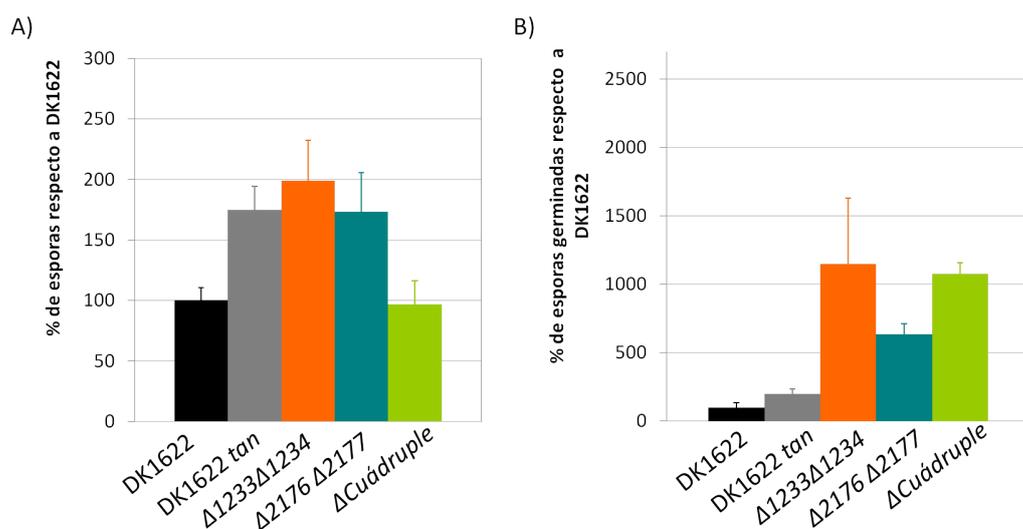


Figura 7.7: Cuantificación de la capacidad relativa de esporulación (A) y germinación (B) en los mutantes múltiples $\Delta 1233\Delta 1234$, $\Delta 2176\Delta 2177$ y Δ cuádruple. Se han representado los datos como porcentaje de esporulación respecto a la cepa DK1622. Los datos de la cepa DK1622 *tan* también aparecen representados como un porcentaje respecto a la esporulación del silvestre DK1622. Las esporas fueron recogidas tras 96 h de desarrollo. Las barras de error representan la desviación estándar.

incluso comparándolas con la cepa control *tan* (figura 7.6).

Observamos que el mutante $\Delta 1233\Delta 1234$ presentó un retraso de unas 24 h respecto al silvestre convencional DK1622, y que este retraso fue aún mayor que el que presentaron los mutantes individuales $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$. El mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ también estuvo más retrasado que los individuales $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, y aparecieron cuerpos fructíferos solamente tras 96 h. En el caso del mutante Δ cuádruple, el retraso fue mucho más pronunciado que el de los dos mutantes dobles anteriores.

En cuanto a la morfología de los cuerpos fructíferos, los cuerpos de los mutantes dobles aparecen especialmente voluminosos, incluso más que los de la cepa DK1622 *tan*. Sin embargo, en la cepa Δ cuádruple comenzaron a verse cuerpos mal formados, muchos de ellos translúcidos, indicativo de que no son maduros.

En resumen, al eliminar de forma independiente dos parejas completas de quinasas pseudoquinasa, el retraso en la fructificación es más pronunciado que en sus respectivos mutantes individuales, y los cuerpos no maduran bien al eliminar las dos parejas al mismo tiempo. Podemos concluir que estas quinasas intervienen de forma directa o indirecta en el desarrollo, y que los efectos se pronuncian cuantas más quinasas se eliminan.

Esporulación y germinación

En primer lugar, en cuanto a la **esporulación**, observamos que los mutantes dobles $\Delta 1233\Delta 1234$ y $\Delta 2176\Delta 2177$ formaron mayor número de esporas que el silvestre DK1622. La esporulación de estas cepas, sin embargo, fue similar a la de la cepa DK1622 *tan* (ver figura 7.7, apartado A).

Cabe destacar que el mutante doble $\Delta 1233\Delta 1234$ produjo más esporas que los mutantes individuales de la misma pareja quinasa-pseudoquinasa, probablemente debido a su fenotipo *tan*, ya que hemos comprobado que las cepas *tan* suelen producir más esporas.

El mutante doble $\Delta 2176\Delta 2177$, sin embargo, produjo menos cantidad de esporas que los mutantes individuales de la misma pareja quinasa-pseudoquinasa, a pesar de ser todas las cepas *tan*. Esto podría explicarse por que el mutante doble presenta más retraso en el desarrollo que los dos individuales, y por tanto la esporulación se retrasa.

El mutante Δ *cuádruple* esporuló a los mismos niveles que la cepa silvestre DK1622. Sin embargo, ya hemos visto que el resto de su fenotipo es más similar al de una cepa DK1622 *tan*. Desde este punto de vista, la esporulación es baja en el mutante Δ *cuádruple* al compararlo con la cepa control *tan*. Esta baja producción de esporas era esperable dado el deficiente estado de maduración de los cuerpos fructíferos a las 96 h.

En cuanto a la **germinación**, observamos un patrón similar al de anteriores mutantes, pues la cantidad de esporas germinadas en medio nutritivo fue mucho más elevada que en las dos cepas control (figura 7.7, apartado B). En los mutantes $\Delta 1233\Delta 1234$ y Δ *cuádruple* llegaron a germinar unas 10 veces más esporas que en la cepa DK1622.

Por tanto, la eliminación de las quinasas por parejas provoca un incremento en la producción de esporas, y dichas esporas poseen una mayor eficiencia de germinación. Es posible que estas quinasas regulen de algún modo la cantidad de esporas que se producen en los cuerpos fructíferos, y que también tengan efectos en la futura capacidad de germinación de estas esporas.

Capítulo 8

Construcción de un mutante de delección en fase para cuatro parejas de quinasa-pseudoquinasa

Ya hemos observado que el principal rasgo fenotípico de muchos de los mutantes de las quinastas y pseudoquinastas, tanto individuales como múltiples, consiste en un cambio de fase a *tan*. Otro rasgo fenotípico mayoritario es el retraso en el ciclo de desarrollo que culmina en una gran producción de esporas, que poseen además gran capacidad de germinación.

Pese a observar efectos en el fenotipo con tan solo deleccionar estos genes de forma individual, al estar trabajando con genes parálogos cabe la posibilidad de que el resto de quinastas o pseudoquinastas estén compensando parcialmente la carencia de una o algunas de ellas. Con objeto de estudiar el papel fisiológico global de las 4 parejas de quinasa-pseudoquinasa, procedimos a construir una cepa mutante de delección carente de las 4 parejas de genes parálogos. A esta cepa mutante la denominamos Δ *óctuple*.

8.1. Construcción de los cuatro plásmidos portadores de las delecciones dobles

Al igual que procedimos en el apartado anterior de esta tesis, se construyeron plásmidos portadores de delecciones dobles para todas las parejas de quinasa-pseudoquinasa. Ya se disponía de los plásmidos pBJ- Δ 1233 Δ 1234 y pBJ- Δ 2176 Δ 2177 construidos para obtener el mutante cuádruple (capítulo), y se construyeron de la misma manera los plásmidos pBJ- Δ 3182 Δ 3183 y pBJ- Δ 4842 Δ 4841.

Para cada plásmido se utilizaron, como fragmentos flanqueantes de la mutación, un fragmento de 800 pb justo aguas arriba del gen codificante para la quinasa y un fragmento de 800 pb justo al final del gen codificante para la pseudoquinasa. Los cuatro plásmidos construidos aparecen en la figura 8.1. Los fragmentos clonados quedaron unidos por un sitio de restricción *Bam*HI de 6 pb. Las parejas de cebadores utilizadas para amplificar los fragmentos por PCR aparecen en el apartado 2.4.

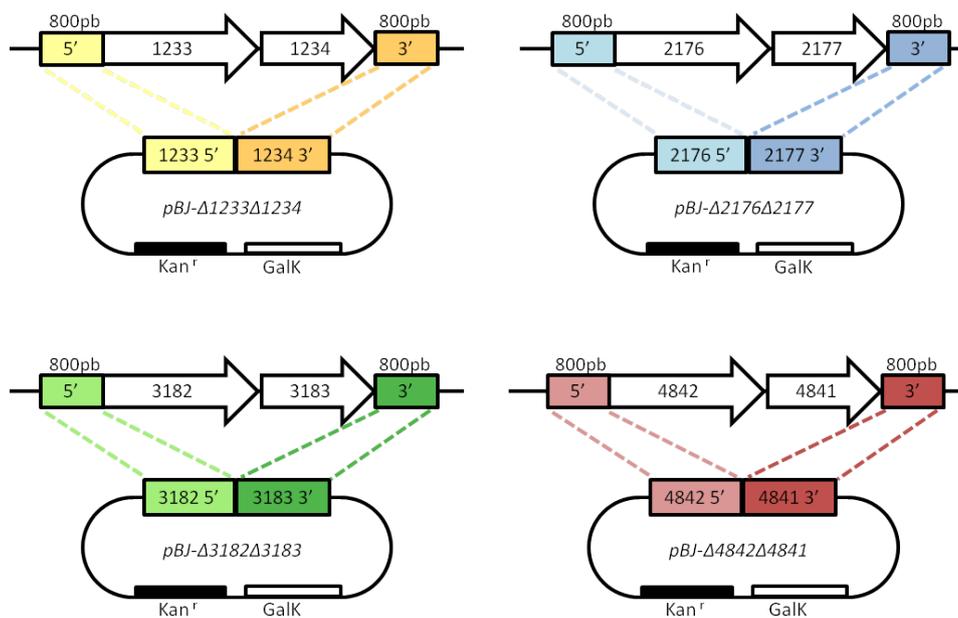


Figura 8.1: Plásmidos diseñados para la obtención del mutante de deleción Δ óctuple. Se construyó un plásmido para deleccionar cada pareja de quinasa-pseudoquinasa. Plásmidos pBJ- $\Delta 1233\Delta 1234$, pBJ- $\Delta 2176\Delta 2177$, pBJ- $\Delta 3182\Delta 3183$ y pBJ- $\Delta 4842\Delta 4841$.

8.2. Construcción de la cepa mutante óctuple

La estrategia seguida para la obtención del mutante óctuple fue la introducción de cada uno de los plásmidos portadores de las deleciones dobles en *M. xanthus*, partiendo de la cepa silvestre, y acumulando mutaciones dobles en la cepa hasta obtener un mutante con las cuatro parejas delecionadas. Este procedimiento se inició desde diversos puntos: por un lado, se partió de las dos cepas mutantes dobles ya construidas en el capítulo anterior (7), sobre las que se fueron introduciendo los demás plásmidos portadores de deleciones dobles. Por otro lado, paralelamente, se emprendió la obtención de nuevos mutantes dobles, electroporando los plásmidos nuevos pBJ- $\Delta 3182\Delta 3183$ y pBJ- $\Delta 4842\Delta 4841$ en la cepa silvestre *M. xanthus*.

Finalmente, el camino mediante el cual se logró obtener el mutante óctuple fue el siguiente: en primer lugar se electroporó en la cepa silvestre el plásmido pBJ- $\Delta 3182\Delta 3183$ para obtener el mutante $\Delta 3182\Delta 3183$. Sobre esta cepa mutante doble, se introdujo el plásmido pBJ- $\Delta 4842\Delta 4841$ para obtener un mutante cuádruple $\Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$. Sobre esta cepa, a su vez, se introdujo el plásmido pBJ- $\Delta 1233\Delta 1234$ para obtener una cepa mutante séxtuple, con las deleciones $\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$. Finalmente, sobre esta cepa se electroporó el plásmido pBJ- $\Delta 2176\Delta 2177$, que tras las apropiadas recombinaciones homólogas, dio lugar a la cepa mutante con los ocho genes delecionados, $\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 2176\Delta 2177 \Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4841\Delta 4842$ ó Δ óctuple. Para cada cepa mutante obtenida durante el proceso de obtención del mutante óctuple, se realizó un Southern blot con objeto de corroborar que cada una de las deleciones había sido exitosa antes de dar el siguiente paso. Los Southern blots elaborados se presentan en la figura 8.2.

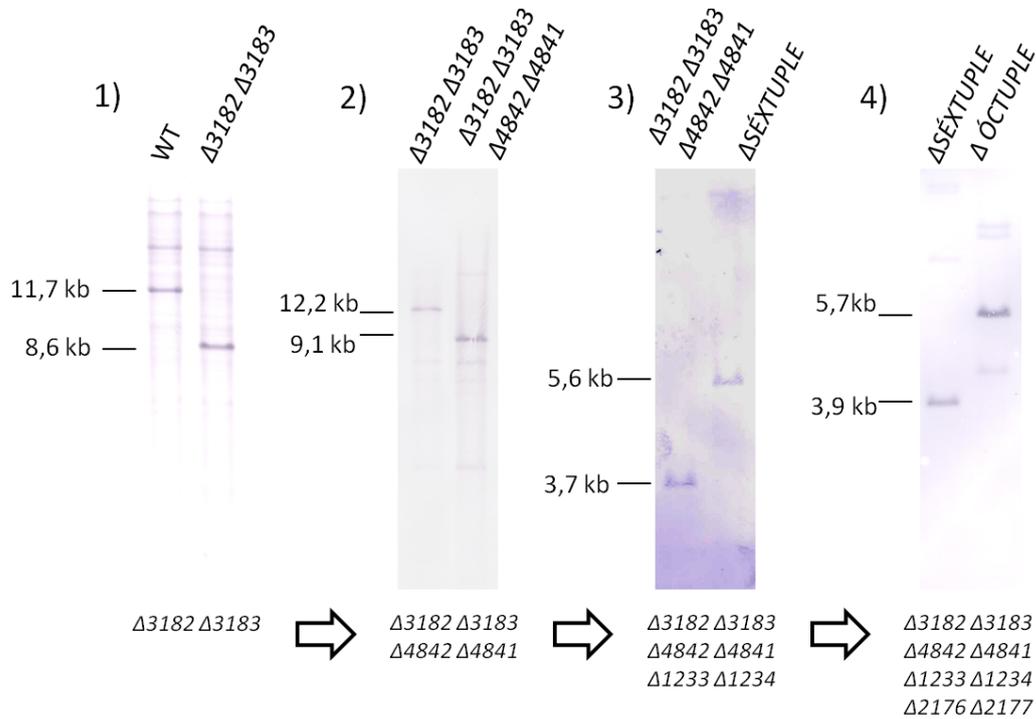


Figura 8.2: Southern-blot elaborados en cada paso para la obtención del mutante óctuple. 1) El cromosoma del primer mutante doble ($\Delta 3182 \Delta 3183$) obtenido fue digerido con *Pst*I, dando una banda de 8,6 kb en lugar de 11,7 kb de la cepa silvestre. La sonda utilizada fue un fragmento de 800 pb aguas arriba del gen MXAN_3182. 2) El cromosoma del mutante cuádruple obtenido fue digerido con *Xho*I, dando lugar a un fragmento de 9,1 kb en lugar de 12,2 kb. Como control para comparar se utilizó la cepa mutante doble, que fue utilizada como receptora del nuevo plásmido. Como sonda se utilizó un fragmento de 800 pb aguas arriba del gen MXAN_4842. 3) Para la comprobación del mutante séxtuple se digirió el cromosoma con *Sal*I, dando un fragmento de 5,6 kb en lugar del fragmento de 3,7 kb de la cepa $\Delta 3182 \Delta 3183 \Delta 4842 \Delta 4841$ receptora. Se utilizó como sonda el fragmento de 800 pb aguas arriba del gen MXAN_1233. 4) Finalmente, para verificar la obtención del mutante óctuple se digirieron los cromosomas con *Xho*I, dando 3,9 kb en la cepa $\Delta séxtuple$ que se uso como control y 5,7 kb en el mutante óctuple, utilizando como sonda el fragmento de 800 pb aguas arriba del gen MXAN_2176.

8.3. Análisis fenotípico del mutante óctuple

8.3.1. Ciclo vegetativo

Variación de fases

Tras delecionar las 4 parejas de quinasas, la cepa $\Delta\acute{o}ctuple$ presentó un aspecto *tan*, al igual que ocurrió con otras delecciones simples de estas mismas quinasas (capítulos 6 y 7). En la figura 8.3, la cepa mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ se compara con las dos fases de la cepa silvestre, *yellow* y *tan*. Se observa la similitud en las proporciones con la cepa WT *tan*, aunque el mutante presenta aún menor proporción de células *yellow*.

Crecimiento en medio líquido

Tanto la cepa mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ como las cepas silvestres *yellow* y *tan* fueron cultivadas en condiciones de crecimiento vegetativo durante 48 h. Durante este tiempo se midió periódicamente la densidad celular de cada cultivo para calcular la curva de crecimiento representada en la figura 8.4.

Como ya habíamos visto previamente, las cepas silvestres *yellow* y *tan* difieren en la velocidad de crecimiento, alcanzando antes la cepa *tan* la fase estacionaria. En este caso, la cepa mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ presentó un crecimiento semejante a la cepa silvestre *tan*, alcanzando al mismo tiempo la fase estacionaria.

Movilidad social y aventurera

En la figura 8.5, apartado A, podemos ver que el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ presenta una movilidad aventurera igual a la de la cepa silvestre DK1622 en fase *tan*, y ambas presentan menor capacidad de movilidad aventurera que la cepa silvestre DK1622 en fase *yellow*. En cuanto a la movilidad social (apartado B) observamos la misma tendencia, viéndose que el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ muestra una movilidad social igual a la de la cepa WT *tan*.

8.3.2. Ciclo de desarrollo

Fructificación

La cepa $\Delta\acute{o}ctuple$ presentó un desarrollo retrasado respecto a la cepa silvestre *yellow*. Si hacemos la misma comparación con el morfotipo silvestre *tan*, se observa un desarrollo paralelo. Los cuerpos fructíferos del mutante aparecen más voluminosos que los de ambos silvestres, al igual que ocurría con los mutantes dobles $\Delta 1233\Delta 1234$ y $\Delta 2176\Delta 2177$.

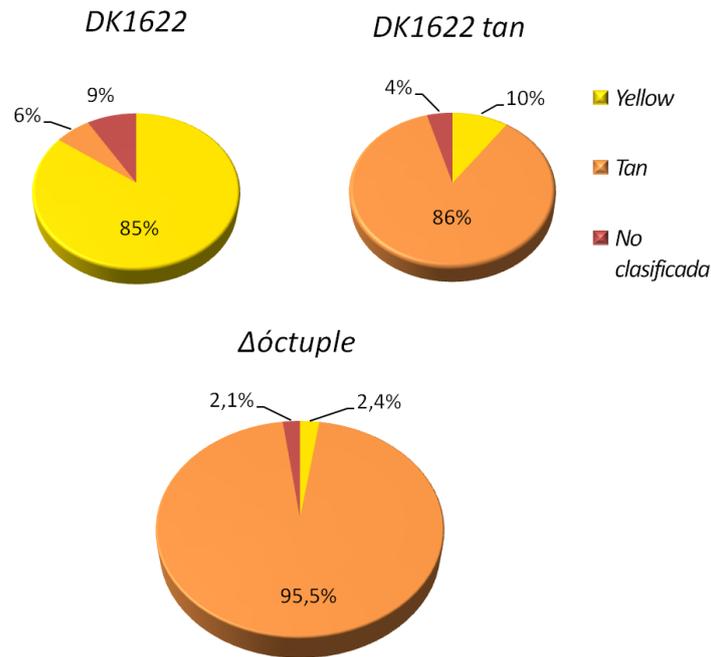


Figura 8.3: Variación de fases de la cepa mutante Δ óctuple, en comparación con la cepa silvestre DK1622 original y DK1622 en fase *tan*. Los datos proceden de un recuento de 376 colonias.

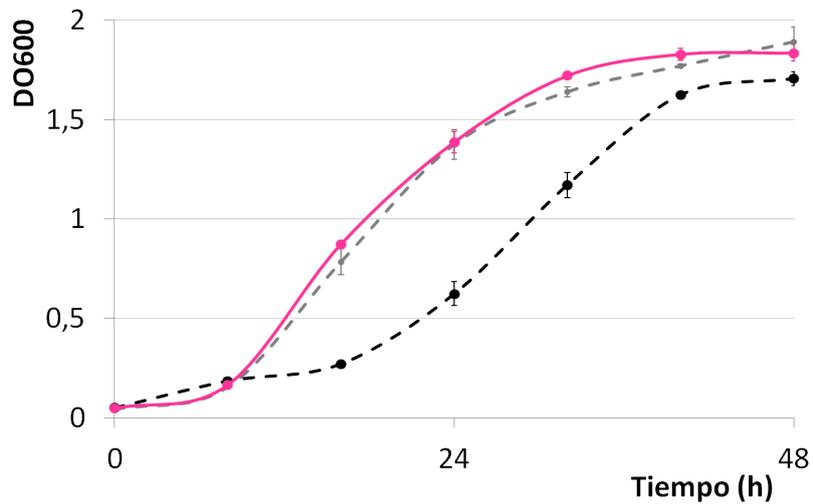


Figura 8.4: Crecimiento vegetativo en medio líquido de las cepas silvestres DK1622 *yellow* (línea punteada negra) y DK1622 *tan* (línea punteada gris) y de la cepa mutante Δ óctuple (rosa). Las barras de error representan la desviación estándar.

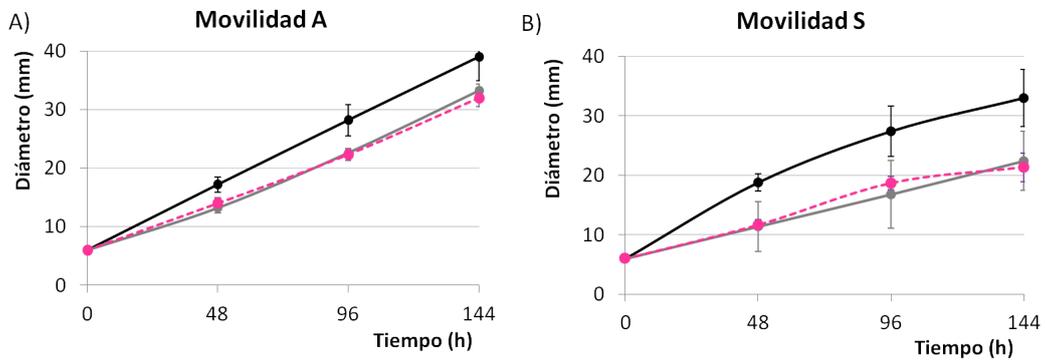


Figura 8.5: Estudio de la movilidad aventurera (A) y social (B) en el mutante de las ocho quinonas Δ óctuple (rosa) en comparación con las cepas silvestres DK1622 *yellow* (negro) y *tan* (gris). Las barras de error representan la desviación estándar.

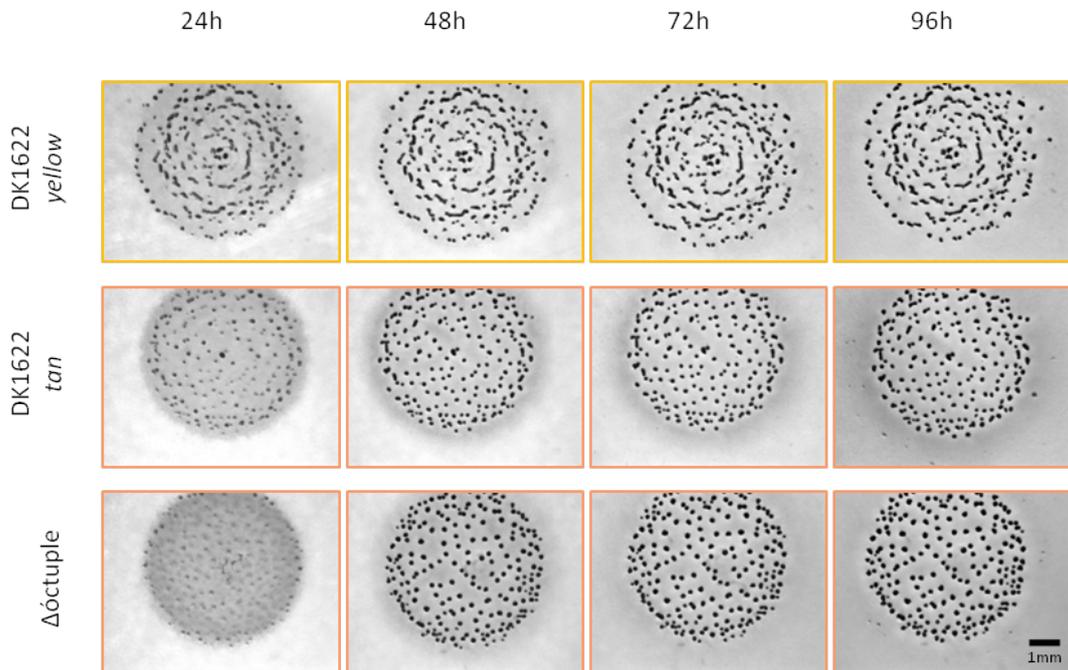


Figura 8.6: Ciclo de desarrollo en las cepas silvestres DK1622 *yellow*, DK1622 *tan*, y mutante Δ óctuple.

Acumulación de hierro

Adicionalmente a los estudios rutinarios de evaluación del ciclo de desarrollo llevados a cabo en los demás mutantes, tuvimos la posibilidad de evaluar la acumulación de hierro intracelular en el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$.

El análisis fue motivado por el descubrimiento de [Dziewanowska et al. \(2014\)](#), según el cual las cepas de *M. xanthus* con morfotipo *tan* modifican la expresión de ciertos grupos de genes con respecto a las variedades de morfotipo *yellow*. Entre estos genes se encuentran los pertenecientes a la ruta biosintética del sideróforo **mixoquelina**, además de otros sistemas de adquisición y transporte del hierro, cuya expresión incrementa en las variedades *tan*.

Ante este hallazgo decidimos evaluar la capacidad de acumulación de hierro en la cepa $\Delta\acute{o}ctuple$. Las cepas silvestres DK1622, DK1622 *tan* y $\Delta\acute{o}ctuple$ fueron incubadas en medio de cultivo inductor del desarrollo (CF) con 0.5mM FeCl₃, así como en el mismo medio CF sin hierro que sirvió como control.

Tras una incubación de 24 h, el hierro intracelular se midió mediante ICP-OES (ver apartado 3.8). Esta técnica permite cuantificar elementos de una muestra que se encuentren a muy bajas concentraciones. Los análisis se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Lawrence J. Shimkets de la Universidad de Georgia (Athens, EEUU) durante el año 2014.

Los resultados mostrados en la figura 8.7 revelaron que existe acumulación de hierro en todas las cepas al ser cultivadas en un medio rico en este metal. Además, se observaron diferencias entre la cepa silvestre DK1622 *yellow* y las otras dos cepas de morfotipo *tan*: las cepas DK1622 *tan* y $\Delta\acute{o}ctuple$ acumularon mayor cantidad de hierro intracelular. Este resultado concuerda con el incremento en la expresión de genes relacionados con la adquisición y el transporte de este metal detectado en las variantes *tan* ([Dziewanowska et al., 2014](#)). Si se comparan las dos cepas *tan* entre sí, se aprecia que el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ posee una ligera disminución en la capacidad de acumulación de hierro respecto al silvestre DK1622 *tan*, lo que podría indicar que las mutaciones han tenido un leve efecto, directo o indirecto, en la capacidad de acumulación de hierro de la cepa $\Delta\acute{o}ctuple$. Es posible que la adquisición del metal en un enjambre de *M. xanthus* esté regulada por la proporción de células *yellow* y *tan* de la población.

Esporulación y germinación

El recuento de esporas en el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ reveló una producción de esporas mayor que en ambos silvestres (figura 8.8, apartado A). Se puede ver que produjo más del doble de esporas que el WT *yellow* (215 %), y algo superior al WT *tan*.

En cuanto a la germinación (figura 8.8, apartado B), observamos que al cultivarse las esporas en medio nutritivo de nuevo, la cantidad de esporas germinadas en el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ es menor que en cualquiera de las cepas silvestres. Su capacidad de germinación representa un 32,5 % de la cepa silvestre DK1622 *yellow*.

En resumen, al eliminar todas las parejas de quinasas parálogas seguimos apreciando una reversión a la fase *tan*. Los defectos en la movilidad y el retraso en el

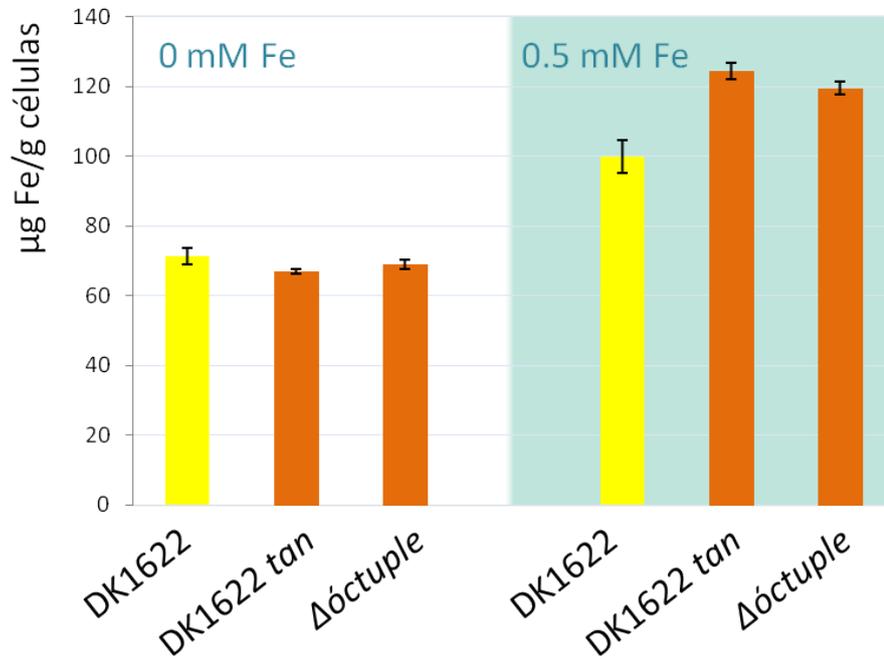


Figura 8.7: Acumulación intracelular de hierro durante el desarrollo en las cepas silvestres DK1622 *yellow*, DK1622 *tan*, y mutante Δ óctuple. Las barras de error representan la desviación estándar.

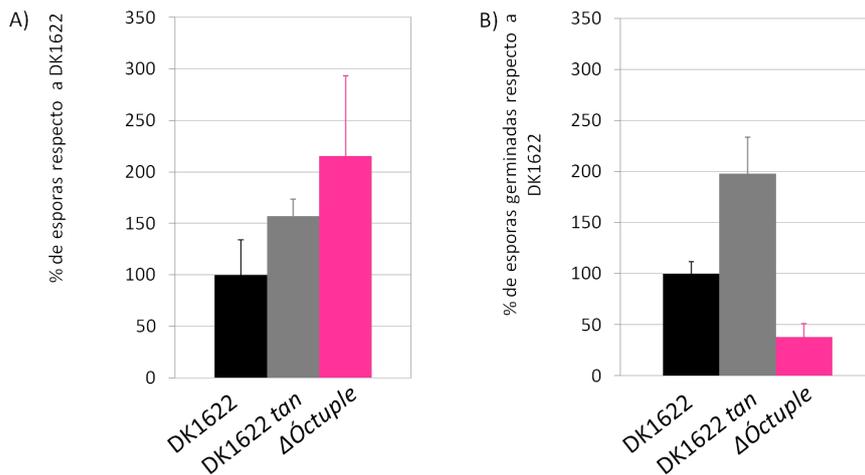


Figura 8.8: Cuantificación de la capacidad relativa de esporulación (A) y germinación (B) del mutante Δ óctuple respecto a las cepas silvestres DK1622 *yellow* y DK1622 *tan*. Las esporas fueron contadas tras 96 h de desarrollo. Esas mismas esporas fueron sometidas al proceso de germinación. Las barras de error representan la desviación estándar.

desarrollo también se observan, probablemente debido al gran porcentaje de células *tan*.

Como ocurría en la mayor parte de mutantes *tan*, el mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ termina formando más cantidad de esporas que las cepas silvestres. Sin embargo, una diferencia clara con el resto de cepas mutantes *tan* es la capacidad de germinación, que se ve muy disminuida, incluso comparándola con la cepa silvestre DK1622 *yellow*. La conjunción de ambos resultados podría significar que la delección de las cuatro parejas de quinasas tiene como consecuencia un incremento en la capacidad de diferenciación de los bacilos vegetativos en mixosporas cocoideas quiescentes, pero que dicha diferenciación no se realiza mediante el proceso adecuado, de modo que las mixosporas resultantes no son plenamente funcionales, lo que lleva a una disminución en su capacidad para germinar.

8.4. Análisis de dos mutantes antagónicos

Tras deleccionar las 4 parejas de quinasas, la cepa mutante $\Delta\acute{o}ctuple$ presentó un aspecto *tan*, al igual que ocurría con otras cepas mutantes (ver capítulos 6 y 7). Ya se ha explicado cómo en el camino de obtención del mutante óctuple se obtuvieron nuevas cepas mutantes adicionales. Tanto $\Delta 3182\Delta 3183$ como $\Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$ presentaron fenotipo *tan*. Sin embargo, la colonia mutante $\Delta\acute{s}extuple$ ($\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$) presentó un aspecto *yellow*. Este dato nos resultó muy interesante, así que decidimos evaluar esta cepa.

Nos enfocamos en el ciclo de desarrollo, pues ya hemos observado que es sobretodo durante esa etapa donde se aprecian más claramente los efectos de las delecciones. Otra razón para centrarnos en el desarrollo fue que los otros mutantes *yellow* no se vieron afectados durante el crecimiento vegetativo.

Las únicas quinasas que quedan en la cepa $\Delta\acute{s}extuple$ son la pareja MXAN_2176-MXAN_2177, así que se decidió comparar dicha cepa con su mutante antagónico, la cepa mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ que se construyó en el capítulo 7.

La figura 8.9, apartado A, muestra la fructificación del mutante $\Delta\acute{s}extuple$. Pese a no observarse un retraso en la fructificación como en todos los mutantes, al ser comparado con la cepa silvestre DK1622 mostró cuerpos fructíferos de pequeño tamaño, deformados y translúcidos, indicativo de una incorrecta maduración. Este fenotipo contrastó con el observado en el mutante *tan* $\Delta 2176\Delta 2177$, que presentó bastante retraso, pero que finalmente formó cuerpos voluminosos y opacos.

En el apartado B de la figura 8.9 se representan los datos relativos a la esporulación y a la germinación del mutante $\Delta\acute{s}extuple$. En esta cepa ambos procesos se ven muy perjudicados debido a las delecciones, mientras que en el mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ los efectos de la delección son totalmente opuestos, pues la eficiencia de esporulación y germinación se ven muy incrementadas.

En el apartado C de la figura 8.9 se ha representado esquemáticamente el genotipo de cada cepa, $\Delta 2176\Delta 2177$ y $\Delta\acute{s}extuple$, para visualizar de qué manera son complementarios estos mutantes.

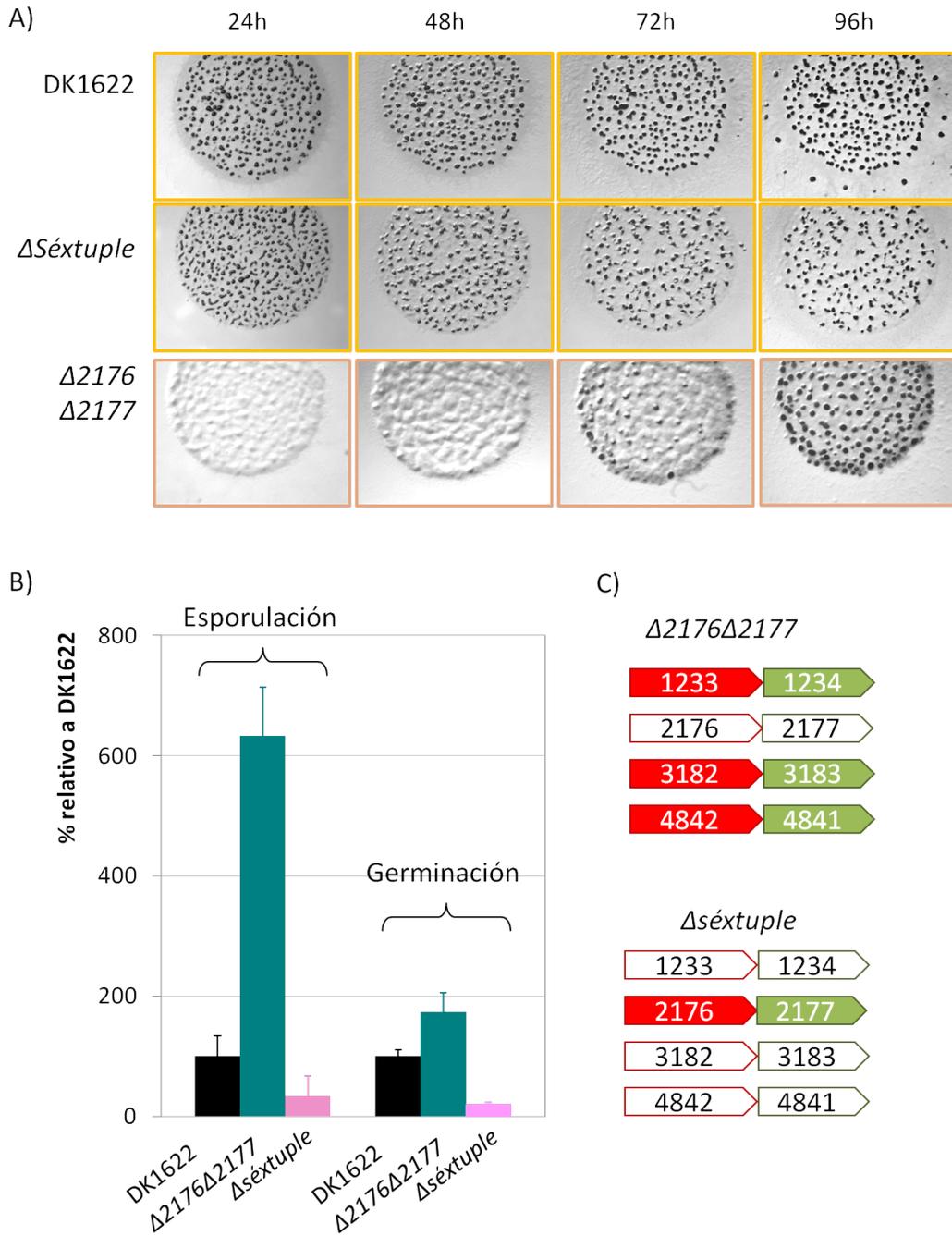


Figura 8.9: Ciclo de desarrollo en las cepas silvestres DK1622 *yellow*, mutante Δ séxtuple y mutante Δ 2176 Δ 2177. A) Fructificación. B) Esporulaci3n y germinaci3n. C) Esquema del genotipo de cada una de las cepas comparadas. Los genes coloreados est3n presentes en la cepa, mientras que los genes representados en blanco han sido deletados.

En conclusión, los mutantes $\Delta s\acute{e}xtuple$ y $\Delta 2176\Delta 2177$ presentan un genotipo complementario, y esto se refleja en unos caracteres fenotípicos totalmente opuestos. El mutante $\Delta s\acute{e}xtuple$ proviene de un mutante cuádruple con fenotipo *tan*, y al deletionar todas las parejas de quinasas excepto la pareja MXAN_2176-MXAN_2177 se vuelve *yellow*. Dicho mutante produce menor cantidad de esporas (33 % del silvestre) cuya capacidad de germinar es apenas un 8 % la del silvestre. Por otro lado, el mutante $\Delta 2176\Delta 2177$ presenta un morfotipo *tan*, al igual que los respectivos mutantes individuales $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$. Presenta elevada esporulación, produciendo esporas son muy viables. De modo que, es posible que la pareja MXAN_2176-MXAN_2177 tenga un papel antagónico al de las otras tres parejas de parálogos. Esta pareja podría favorecer la permanencia en fase *yellow* y propiciar una regulación negativa de la formación de esporas.

Nos preguntamos qué elemento podría ser diferente en esta pareja de quinasas, que las distinguiera del resto de parálogos, y advertimos que a nivel de secuencia se puede encontrar una diferencia. **La pseudoquinasa MXAN_2177 presenta un extremo carboxilo diferente al resto de pseudoquinasas**, debido a una duplicación en tandem de la secuencia de ADN al final del gen en la que no se mantiene la pauta de lectura (figura 8.10). Debido a esta modificación, este nuevo fragmento puede representar una zona de regulación que funciona de manera diferente y exclusiva en esta quinasa.

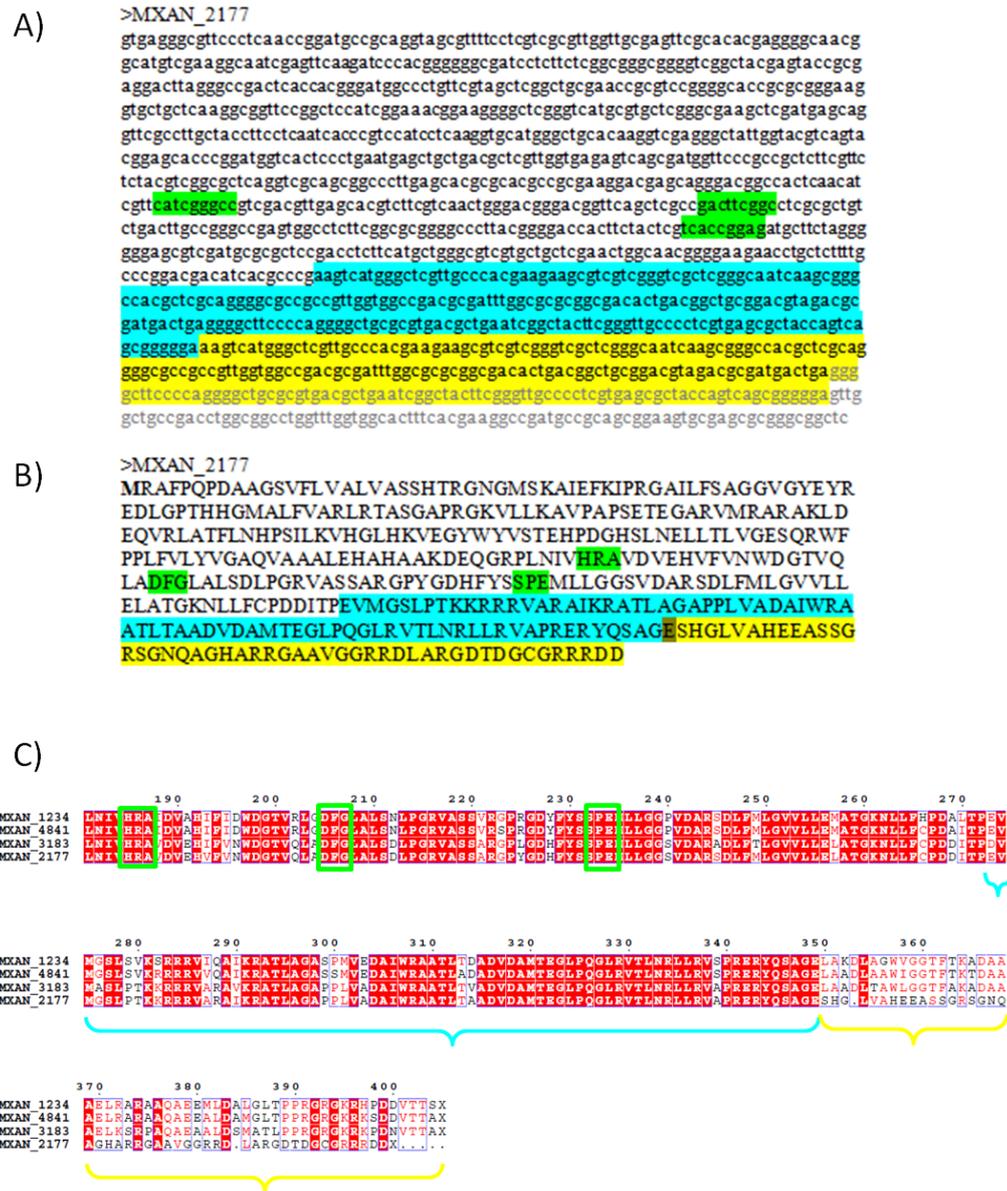


Figura 8.10: Sección C-terminal de la pseudoquinasa MXAN_2177. A) Secuencia de ADN. B) Secuencia proteica. C) Fracción final del alineamiento de las cuatro pseudoquinasas. En azul se muestra el fragmento de la secuencia que después aparece repetida. En amarillo se muestra el fragmento repetido en la secuencia de ADN, que aparece en otra pauta de lectura, dando lugar a secuencia proteica diferente. En verde aparecen señalados los motivos conservados del dominio quinasa, HRD (HRA), DFG y A/SPE.

Capítulo 9

Diseño de una colección de vectores para la expresión de genes controlada por cobre

Debido a las dificultades para establecer un fenotipo determinado causado por las deleciones, y deducir de ahí la función concreta que desempeñan las parejas quinasa-pseudoquinasa en el ciclo de vida de *M. xanthus*, se pensó en otra posible línea de estudio. Se decidió optar por una estrategia de sobreexpresión de estas quinastas para amplificar sus efectos y verlos reflejados fenotípicamente en *M. xanthus*. Como parte de este objetivo, en nuestro grupo de investigación diseñamos y construimos una serie de vectores de expresión dependiente de Cu^{2+} , cuyo funcionamiento está basado en el funcionamiento del promotor del gen *cuoA* de *M. xanthus* (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007).

El gen *cuoA* (MXAN_3420) codifica una proteína perteneciente a la familia de las oxidasas multicobre involucrada en la resistencia al cobre de esta mixobacteria. El perfil de expresión del gen *cuoA* se estudió introduciendo el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor *PcuoA* en *M. xanthus*, y midiendo a continuación la actividad β -galactosidasa añadiendo diferentes concentraciones de cobre al medio de cultivo correspondiente (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007). En ausencia de cobre, *cuoA* no se expresa a un nivel detectable, mientras que los niveles crecen linealmente con la adición de cobre al medio de cultivo hasta alcanzar su máxima expresión con $800 \mu\text{M}$ Cu^{2+} durante el ciclo vegetativo, y $60 \mu\text{M}$ durante el desarrollo.

Para la construcción de los vectores se utilizaron técnicas de biología molecular descritas en la sección 3). Los vectores pNG1A y pNG10A se construyeron partiendo del vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985); pMAT3 deriva de pSWU30 (Wu *et al.*, 1997) y pMAT4 deriva de pSL105 (Jakovljevic *et al.*, 2008). En los cuatro vectores se introdujo el promotor del gen *cuoA* de *M. xanthus* DK1622, que fue amplificado por PCR a partir del cromosoma, utilizando los cebadores indicados en la sección 2.4. A continuación del promotor existen sitios de restricción múltiples para poder clonar el gen de interés (figura 9.1). Se insertaron, además, diferentes genes de resistencia a antibióticos (Tet^r o Kam^r) para permitir la selección de cepas

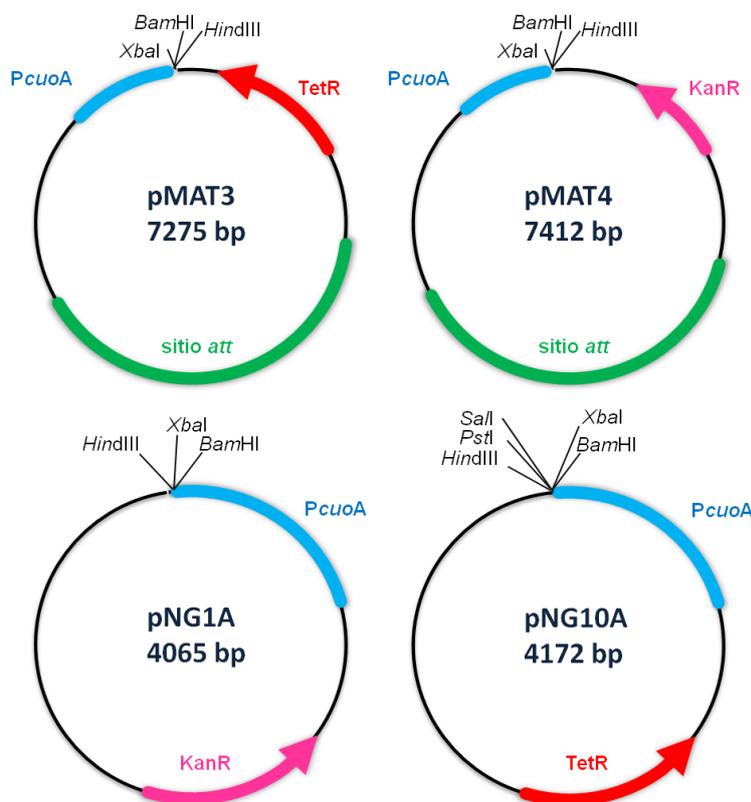


Figura 9.1: Colección de vectores que permiten expresar genes bajo el control del promotor *PcuoA* dependiente de cobre. El tamaño de cada vector aparece señalado en pares de bases (bp). Azul: promotor dependiente de cobre. Rojo: gen de resistencia a tetraciclina. Rosa: gen de resistencia a kanamicina. Verde: sitio *attB* de integración al cromosoma. Las dianas de restricción del sitio de clonación múltiple están indicadas en negro. Tomado de [Gómez-Santos et al. \(2012\)](#).

transformantes, y permitir además la co-transformación con otros vectores portadores de otra resistencia.

Los vectores utilizados en *M. xanthus* siempre son integrativos. En este caso, la integración en el cromosoma se produce, bien a través de un sitio de unión a fagos (*attB*) en los vectores pMAT, o bien a través del propio promotor *PcuoA*.

Previamente a la utilización de los vectores en *M. xanthus* DK1622, se realizó un análisis del efecto de la concentración de cobre en el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo en dicha cepa silvestre.

Para estudiar la sensibilidad al cobre durante el crecimiento vegetativo, la bacteria se cultivó en medio CTT líquido al que se añadieron concentraciones crecientes de cobre. En la figura 9.2 se muestra que la cepa DK1622 es capaz de crecer hasta una concentración de 0,5 mM Cu^{2+} . A concentraciones mayores, las células comienzan a presentar defectos en el crecimiento.

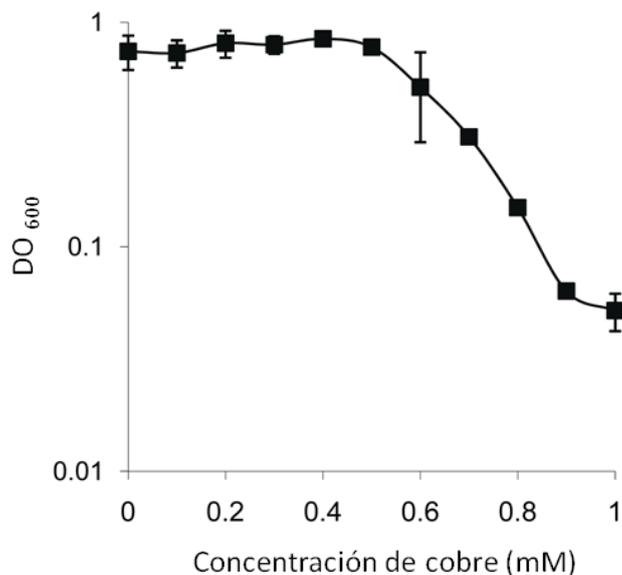


Figura 9.2: Crecimiento vegetativo de *M. xanthus* en medio líquido en presencia de cobre. La densidad óptica (DO₆₀₀.) del cultivo se midió tras 24 h de incubación a 30 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas. Tomado de [Gómez-Santos et al. \(2012\)](#).

Para estudiar los efectos de la concentración de cobre sobre la movilidad en medio sólido, se inoculó la bacteria en fase de crecimiento exponencial, en forma de gotas, en placas de CTT suplementado con diferentes concentraciones de cobre, así como en placas control sin cobre, y se midió el diámetro de las gotas en la placa tras 96 h de incubación. La gráfica revela que la movilidad se ve poco afectada al exponer la bacteria a concentraciones de cobre menores de 0,5 mM. En este rango, tanto la movilidad A como S disminuyen como máximo un 10 % respecto a los respectivos controles sin cobre. A concentraciones mayores de cobre, provocan una disminución lineal de la capacidad de movilidad (figura 9.3).

Para estudiar la sensibilidad al cobre durante el ciclo de desarrollo, las células cultivadas en medio CTT líquido se concentraron y se inocularon en forma de gotas en medio CF suplementado con concentraciones crecientes de cobre. En la figura 9.4 A) se aprecia que la formación de cuerpos fructíferos empieza a verse afectada a concentraciones de Cu²⁺ de 80 μM.

Además de observar la formación de cuerpos, se hizo un recuento de mixosporas tras 96 h de incubación en medio CF con cobre. En este aspecto del fenotipo, vemos que a pequeñas concentraciones de cobre (20 μM) ya se ve afectada negativamente la producción de esporas.

En resumen, los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* empieza a verse afectado a concentraciones de 600 μM. Por otro lado la cepa es más sensible al metal durante el ciclo de desarrollo: se observan defectos en la fructificación a concentraciones de 80 μM, mientras que los defectos en la esporulación comienzan a percibirse a concentraciones de 20 μM.

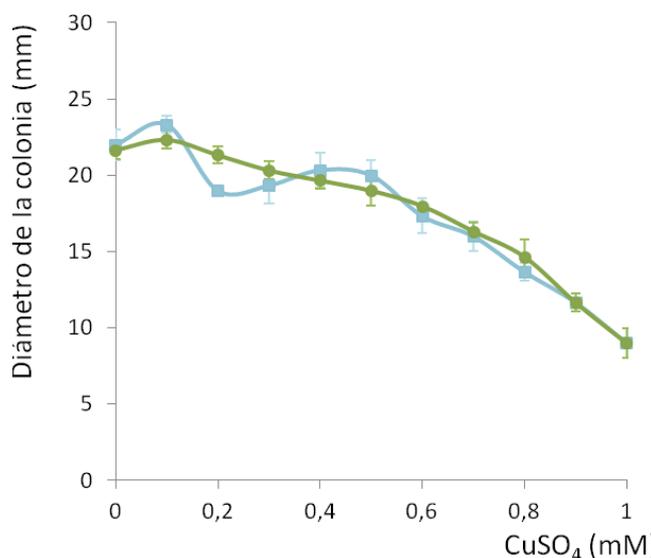


Figura 9.3: Efecto del cobre en la movilidad social (azul) y aventurera (verde) de *M. xanthus*. Se inocularon gotas de cultivo líquido en placas de medio CTT con concentraciones crecientes de cobre, y se midió el diámetro de estas gotas tras 96 h de incubación. Adaptada de Gómez-Santos *et al.* (2012).

Como se ha indicado en los apartados anteriores, los efectos fenotípicos de la mayoría de los mutantes de las quinasas analizadas se manifestaron durante fructificación y especialmente en los procesos de esporulación y germinación. Por tanto, las pequeñas concentraciones de cobre que han de añadirse al medio para inducir la expresión en los vectores pueden interferir con el fenotipo observado durante el desarrollo y la esporulación de los mutantes.

Recordaremos también que la mayoría de los mutantes de las quinasas presentaron fenotipo de la variedad *tan*. Simultáneamente a la construcción de estos vectores y de los mutantes, el grupo de investigación de Patricia Hartzel (Universidad de Idaho, EEUU) presentó una comunicación al *39th International Conference on the Biology of the Myxobacteria* (Hartzel, 2012), en la cual conectaba el morfotipo *tan* con el metabolismo de los metales, especificando que la presencia de hierro en el medio favorece la reversión al morfotipo *yellow*. Estos resultados fueron posteriormente publicados unos años más tarde (Dziewanowska *et al.*, 2014).

En relación a la acumulación de metales, en nuestro laboratorio hemos observado una mayor capacidad de acumulación de hierro de las variedades *tan* (ver figura 8.7). En microorganismos, el metabolismo del hierro y del cobre frecuentemente se encuentran relacionados, y en ocasiones el cobre, aún estando a bajas concentraciones, puede llegar a sustituir los átomos de hierro de determinadas metaloproteínas (Waldron *et al.*, 2009; Macomber y Imlay, 2009).

En vista de los efectos del cobre sobre el fenotipo de la cepa silvestre, y de la influencia de los metales en el cambio de fase, se descartó realizar una sobreexpresión de las Ser/Thr quinasas con los vectores pMAT y pNG, puesto que, aunque la adición de cobre al medio produce, especialmente durante el desarrollo, solo pequeñas

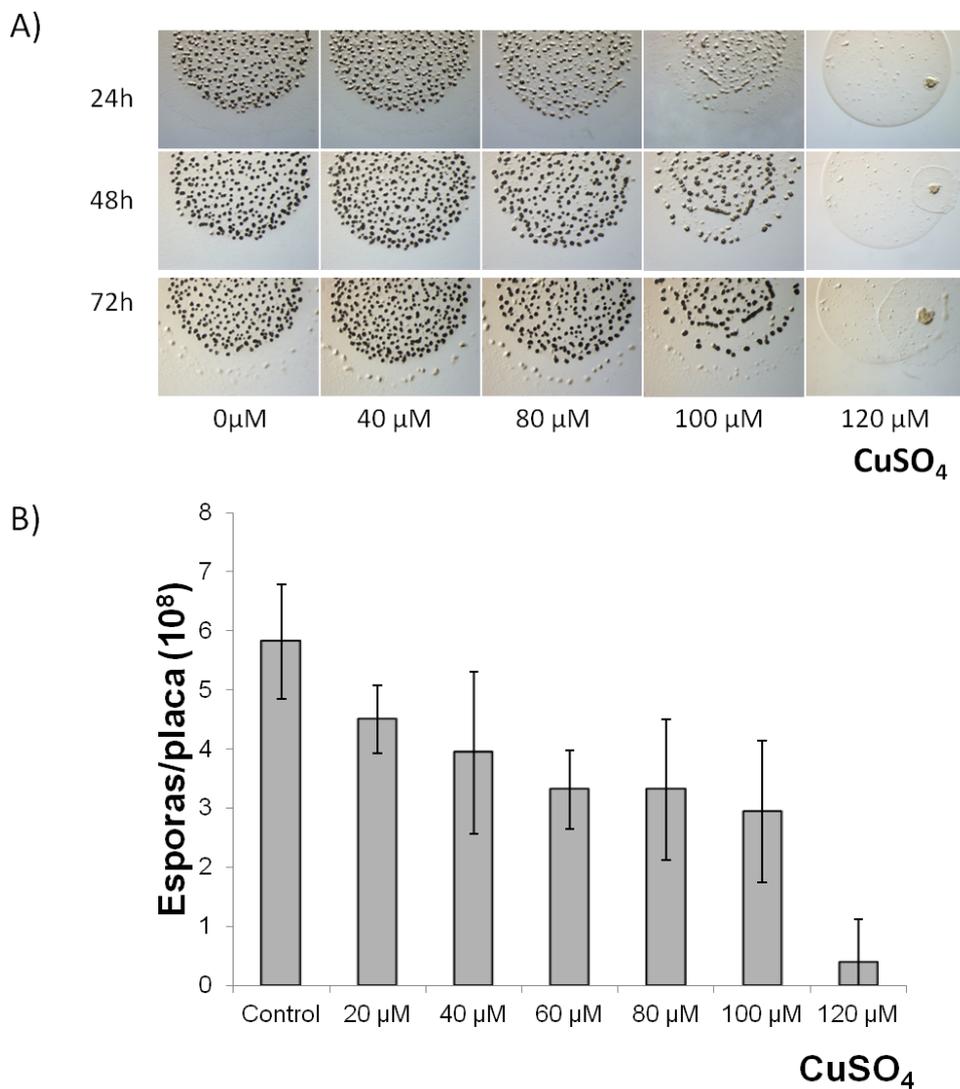


Figura 9.4: Desarrollo de *M. xanthus* en presencia de cobre. A) Formación de cuerpos fructíferos en medio CF a diferentes concentraciones de cobre tras diferentes tiempos de incubación. B) Producción de esporas tras 96 h de incubación en CF a distintas concentraciones de cobre. Las barras de error representan la desviación estándar. Adaptado de Gómez-Santos *et al.* (2012).

alteraciones fenotípicas, éstas podrían enmascarar los efectos de la sobreexpresión de las quinasas. Por lo tanto, desafortunadamente tuvimos que abandonar esta estrategia. Sin embargo me gustaría destacar que estos resultados fueron publicados en la revista *Applied and Environmental Microbiology* [Gómez-Santos *et al.* \(2012\)](#). Los vectores han tenido gran aceptación en la comunidad científica dedicada a las mixobacterias y están siendo utilizados por muchos grupos de investigación en todo el mundo para la expresión controlada de determinados genes ([Harms *et al.*, 2013](#); [Iniesta, 2014](#); [Iniesta *et al.*, 2012](#); [Nan *et al.*, 2013](#); [Treuner-Lange *et al.*, 2013](#)).

Capítulo 10

Transmisión de las señales del desarrollo en los mutantes de delección

El fenotipo de los mutantes de delección nos mostró que las parejas de quinasas-pseudoquinasas están implicadas en el cambio de fase y en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. Los efectos en el desarrollo pueden aparecer de forma indirecta, debido a que el desequilibrio entre variantes *yellow* y *tan* impide un desarrollo normal desde el estado vegetativo. Nos resultó interesante averiguar en qué momento el desarrollo comienza a verse afectado en los mutantes de las quinasas y pseudoquinasas. Por este motivo, monitorizamos a lo largo del tiempo la transmisión de las señales del desarrollo mediante fusiones del gen *lacZ*.

Escogimos analizar las dos señales del desarrollo más importantes y mejor estudiadas: la señal A, que se produce y transmite tras 2 h en ausencia de nutrientes; y la señal C, que se produce desde las 6 h de inanición y a lo largo de todo el desarrollo, con concentraciones en aumento hasta la fase de esporulación (ver 1.1.4).

El seguimiento se realizó mediante una fusión del gen *lacZ* de *E. coli* a dos genes de *M. xanthus*: uno cuya expresión es dependiente de la correcta transmisión de la señal A, y otro gen cuya expresión depende de la transmisión de la señal C. En el caso de la señal A, se escogió el gen *spi* (MXAN_4276), que comienza a expresarse tras 2 h del comienzo del desarrollo y es totalmente dependiente de la transmisión de la señal A (Kroos *et al.*, 1986; Keseler y Kaiser, 1995). Para monitorizar la transmisión de la señal C, se escogió el gen *fmgE* (MXAN_3464), que comienza su expresión tras 6 h de desarrollo (Kroos *et al.*, 1986; Son *et al.*, 2011).

10.1. Construcción de cepas silvestres portadoras de fusiones *lacZ* en los marcadores del desarrollo

Se construyeron 2 plásmidos a partir del vector pKY481, uno de ellos portador de la fusión *spi-lacZ* y otro portando la fusión *fmgE-lacZ*. En cada plásmido se clonó un fragmento de 800 pb que incluía las 100 primeras pares de bases de cada gen. A

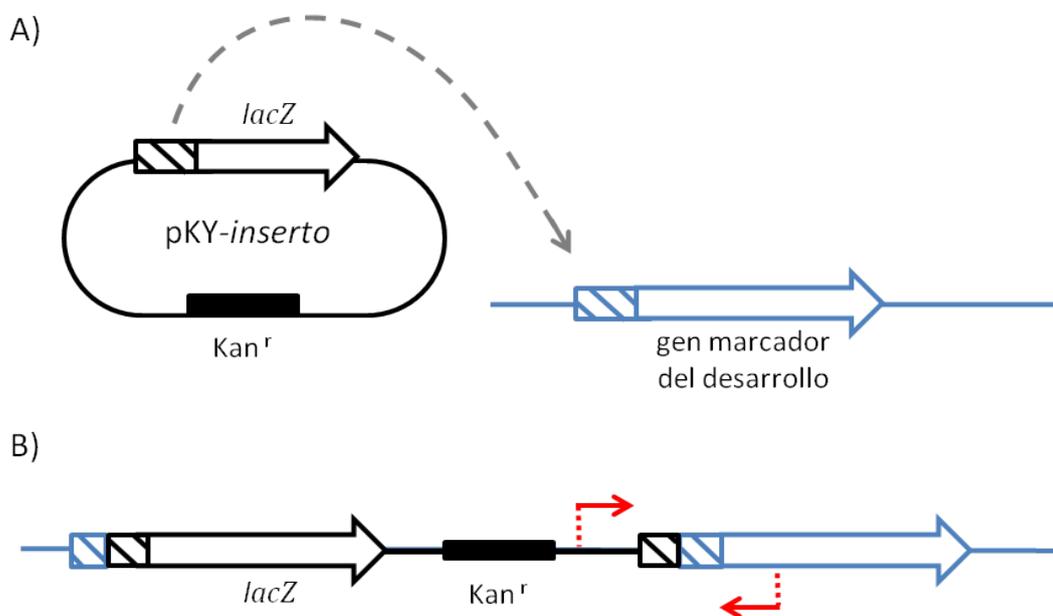


Figura 10.1: Construcción de fusiones *lacZ* con genes dependientes de las señales del desarrollo. A) Esquema del lugar de inserción del plásmido. El plásmido (negro) se insertará mediante recombinación homóloga en el cromosoma a través del fragmento amplificado por PCR (rayado). B) Esquema de la comprobación de la integración del plásmido mediante PCR. En rojo se muestran de forma esquemática los cebadores utilizados para la amplificación. Se espera obtener un fragmento de PCR sólo en aquellas cepas que integran correctamente el plásmido.

continuación de este primer fragmento codificante quedaría fusionado el gen de la β -galactosidasa portado por el vector pKY481, en la fase de lectura correcta. De esta manera evitamos eliminar ese primer fragmento codificante de los genes, pues en el caso de *fmgE* se ha demostrado que interviene en la regulación de la expresión (Son *et al.*, 2011). Los cebadores utilizados para amplificar cada fragmento aparecen en el apartado 2.4.

En primer lugar, quisimos estudiar la transmisión de estas señales en la cepa silvestre DK1622, y especialmente en la cepa silvestre DK1622 *tan* aislada en el apartado 6.3. Cada uno de los plásmidos construidos, denominados pKY-*spi-lacZ* y pKY-*fmgE-lacZ*, se electroporaron en las dos cepas silvestres de *M. xanthus* para lograr su inserción en el cromosoma (ver apartado 3.6.1).

Su integración en el cromosoma se comprobó mediante PCR, utilizando un cebador que hibridaba dentro del plásmido y otro que hibridaba fuera de éste, en el cromosoma del hospedador (ver figuras 10.1 y 10.2). Se escogió una colonia correcta de cada construcción, tras haber comprobado de forma cualitativa que todas las colonias presentaban el mismo patrón de expresión. Se obtuvieron así cuatro cepas, denominadas DK1622-*spi lacZ*, DK1622*tan-spi lacZ*, DK1622-*fmgE lacZ*, y DK1622*tan-fmgE lacZ*.

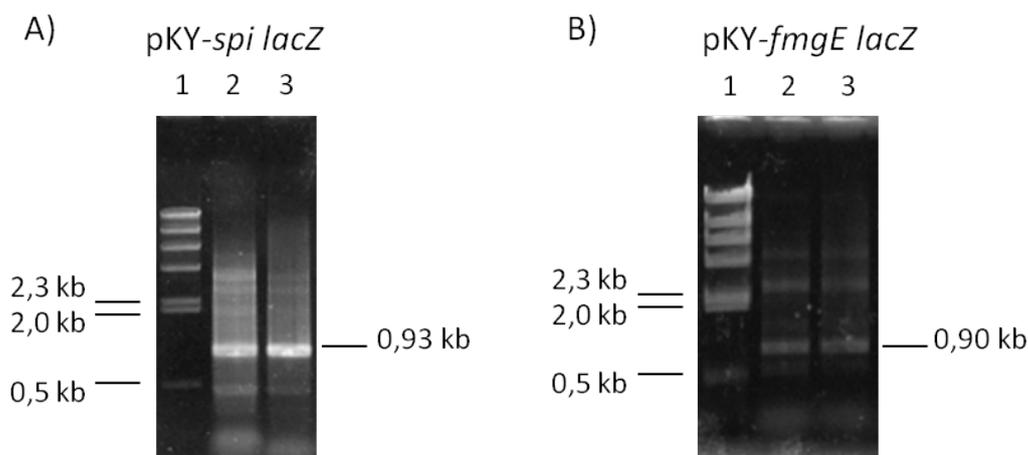


Figura 10.2: PCR de comprobación de la inserción correcta de los plásmidos pKY-*spi-lacZ* y pKY-*fmgE-lacZ* en la cepa DK1622. A) Inserción de pKY-*spi-lacZ*. Para las colonias correctas se esperaba un fragmento de PCR de aproximadamente 0,93 Kpb. Calles: 1) estándar; 2) DK1622; 3)DK1622 *tan*. B) Inserción de pKY-*fmgE-lacZ*. Para las colonias correctas se esperaba un fragmento de PCR de unas 0,9 Kpb. Calles: 1) estándar; 2) DK1622; 3)DK1622 *tan*.

10.2. Transmisión de la señal A y C en las cepas silvestres *yellow* y *tan*

La actividad enzimática de cada cepa silvestre se analizó de forma cualitativa y cuantitativa durante el desarrollo. La evaluación cualitativa se realizó añadiendo X-gal al medio de desarrollo CF. El X-gal adquiere un tono azul cuando es metabolizado por la enzima β -galactosidasa. La intensidad en la coloración es proporcional al nivel de expresión de la enzima y, por tanto, al nivel de expresión de los genes marcadores del desarrollo *spi* y *fmgE*, dependientes de la transmisión de la señal A y C, respectivamente. Esta observación cualitativa aparece representada en la figura 10.3, apartado A. A su vez, el estudio cuantitativo se realizó mediante el ensayo *in vitro* de la actividad enzimática β -galactosidasa, descrito en Kroos *et al.* (1986) y en el apartado 3.6.3 de esta tesis. Los resultados obtenidos tras el ensayo se muestran en la figura 10.3.

Tanto el análisis cualitativo como el cuantitativo mostraron una expresión en el tiempo concordante con lo descrito en la bibliografía. En las dos cepas silvestres, tanto *yellow* como *tan*, el marcador de la señal A, *spi*, se expresó de forma temprana con un máximo a las 12 h, y el gen marcador de la señal C se detectó a partir de las 24 h en ambas cepas. Considero necesario aclarar que la señal C comienza transmitiéndose en poca cantidad, y sus niveles van en aumento hasta que se completa el proceso de esporulación. Por ello, aunque la expresión de *fmgE* comience a las 6 h de desarrollo, los niveles no fueron detectables hasta pasadas 12-24 h.

En cuanto a la comparación de las dos cepas silvestres, vimos que la cepa DK1622 *tan* muestra un patrón simultáneo a la cepa silvestre *yellow* en la expresión del marcador de la señal A, aunque los niveles de expresión son algo menores.

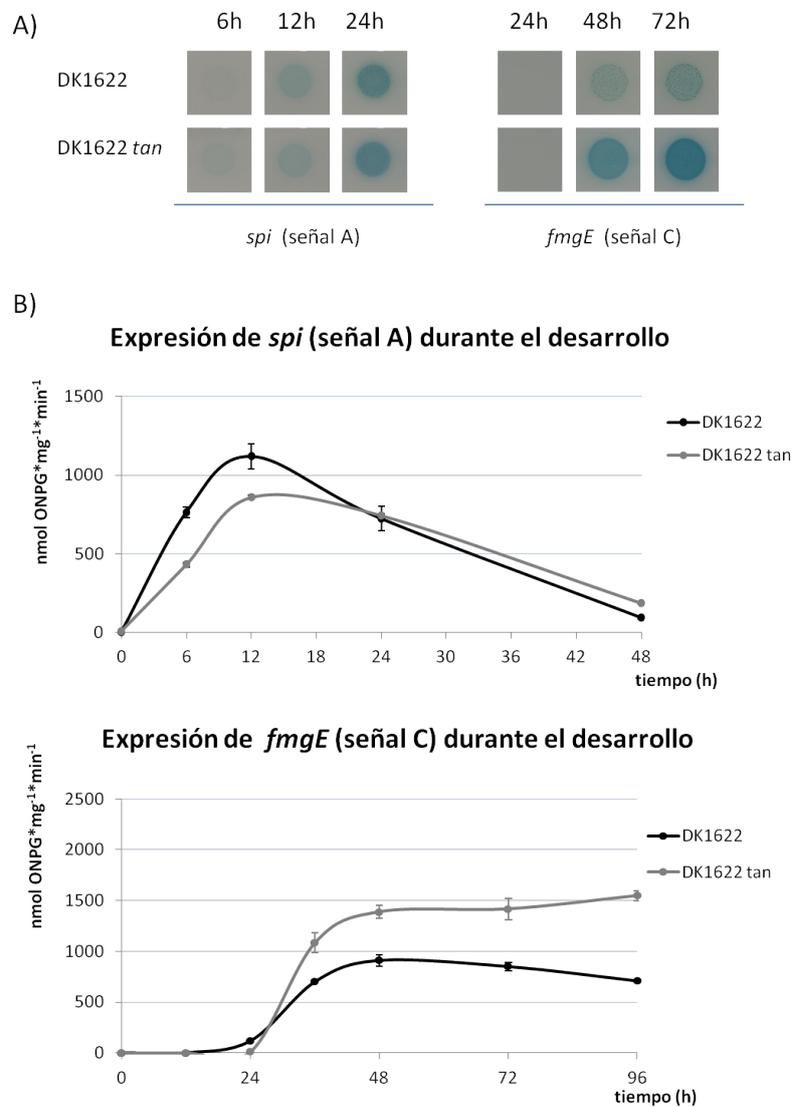


Figura 10.3: Expresión de los genes marcadores del desarrollo *spi* y *fmgE* en las cepas silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. A) Análisis cualitativo, añadiendo X-gal al medio de desarrollo CF-agar. B) Análisis cuantitativo, midiendo la actividad enzimática β -galactosidasa *in vitro*. Las barras de error representan la desviación estándar.

Una diferencia destacable entre las dos cepas silvestres es que la cepa DK1622 *tan*, pese a presentar un patrón en el tiempo similar al de la cepa DK1622, muestra un nivel de señal C mayor, especialmente transcurridas las 96 h del desarrollo. Estos niveles elevados de transmisión de la señal C puede explicar la elevada producción de esporas que detectábamos en esta misma cepa (ver sección 6.3).

El motivo por el cual en la cepa DK1622 *tan* se transmite mejor esta señal nos es, sin embargo, desconocido. Todos los estudios de cambio de fase llevados a cabo en *M. xanthus* apuntan a que las células en fase *tan* están destinadas a transformarse en las esporas durante el ciclo de desarrollo (Laue y Gill, 1995; Dahl *et al.*, 2011). Teniendo esto en cuenta es posible que las células *tan* sean altamente receptivas a la señal C, que es la responsable de inducir la esporulación, y que para ello posean gran cantidad de receptores para esta señal.

Pese a los numerosos estudios que se han llevado a cabo hasta el momento, el mecanismo de recepción de la señal C continúa siendo desconocido. La hipótesis de que las variedades *tan* contienen más capacidad receptora de esta señal puede apuntar hacia un nuevo camino para la búsqueda de este receptor. Las células *tan* son minoritarias en las poblaciones silvestres de *M. xanthus* y generalmente se evita trabajar con cepas que presentan este fenotipo (Hodgkin y Kaiser, 1979). Este puede ser el motivo por el que aún no se ha encontrado un receptor.

10.3. Transmisión de las señales A y C en los mutantes de las quinasas

Como se ha visto previamente, todos los mutantes realizados, desde los individuales hasta el mutante óctuple, ven su fenotipo afectado en mayor o menor medida durante el desarrollo, mostrando más retraso que la cepa silvestre y muchas veces seguido de una mayor esporulación. Para ver en qué punto estas mutaciones están afectando al desarrollo, monitorizamos los mismos marcadores del desarrollo que previamente medimos en las cepas silvestres.

Para realizar este análisis, de entre todos los mutantes se escogieron los cuatro mutantes individuales $\Delta 1233$, $\Delta 1234$, $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, y el mutante Δ óctuple. Se decidió trabajar con mutantes individuales para poder evaluar los efectos de la delección de un único gen, y se eligieron estos cuatro por ser representantes de dos parejas de quinasas interesantes: los mutantes de la pareja MXAN_1233-MXAN_1234 fueron los únicos que presentaron un fenotipo *yellow* y podrían ser comparados con la cepa silvestre original de *M. xanthus*, mientras que la pareja MXAN_2176-MXAN_2177 presentó la peculiaridad de tener una pseudoquinasa modificada en su extremo carboxilo, y además serviría para evaluar la transmisión de señales del desarrollo en un mutante de fenotipo *tan*. El mutante Δ óctuple se escogió para evaluar el efecto global de la delección de las cuatro parejas en la transmisión de las señales del desarrollo.

Los mismos plásmidos pKY-*spi-lacZ* y pKY-*fmgE-lacZ*, portadores de las fusiones en los genes marcadores del desarrollo, fueron introducidos en los mutantes mencionados. Así, se consiguieron las cepas $\Delta 1233$ -*spi-lacZ*, $\Delta 1234$ -*spi-lacZ*, $\Delta 2176$ -*spi-lacZ*, $\Delta 2177$ -*spi-lacZ* y Δ óctuple-*spi-lacZ* por un lado, y por otro lado

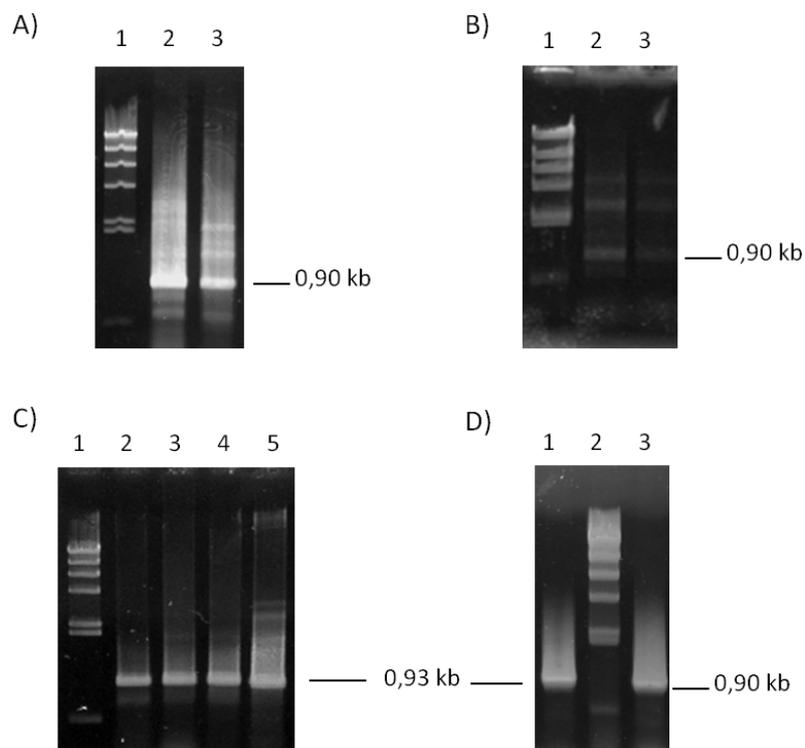


Figura 10.4: Comprobación de la correcta inserción de los plásmidos pKY-*spi-lacZ* y pKY-*fmgE lacZ* en las cepas mutantes. Se esperaba un fragmento de PCR de 0,93 Kpb para las cepas portadoras del plásmido pKY-*spi-lacZ* (señal A) y un fragmento de PCR de 0,9 Kpb para las cepas portadoras del plásmido pKY-*fmgE lacZ*. A) Comprobación de la inserción del plásmido en *fmgE* (señal C) en los mutantes $\Delta 1233$ (calle 2) y $\Delta 1234$ (calle 3). B) Comprobación de la inserción del plásmido en *fmgE* (señal C) en los mutantes $\Delta 2176$ (calle 2) y $\Delta 2177$. C) Comprobación de la inserción del plásmido en *spi* (señal A) en los mutantes $\Delta 1233$ (calle 2) y $\Delta 1234$ (calle 3), $\Delta 2176$ (calle 4) y $\Delta 2177$ (calle 5). D) Comprobación de la inserción de los plásmidos en el mutante $\Delta \acute{o}ctuple$: calle 1, inserción en *spi*; calle 3, inserción en *fmgE*.

las cepas $\Delta 1233$ -*fmgE-lacZ*, $\Delta 1234$ -*fmgE-lacZ*, $\Delta 2176$ -*fmgE-lacZ*, $\Delta 2177$ -*fmgE-lacZ* y $\Delta \acute{o}ctuple$ -*fmgE-lacZ*. La inserción correcta de los plásmidos en el cromosoma de cada cepa se comprobó también mediante PCR (figura 10.4). A continuación, la expresión de los genes marcadores fue medida de forma cuantitativa (ver figura 10.5). Se ha comparado gráficamente cada una de las cepas mutantes individuales con su cepa control correspondiente *yellow* o *tan*, de acuerdo al fenotipo descrito en el capítulo 6.4. En el caso del mutante $\Delta \acute{o}ctuple$ se ha representado junto a las dos cepas control.

En primer lugar comenzaremos exponiendo lo observado en la transmisión de la señal A (figura 10.5, gráficas A, C y E). En los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ observamos una transmisión de esta señal muy por debajo del silvestre DK1622 *yellow*. Era lo esperado después de observar el retraso de estos dos mutantes en el fenotipo. Transcurridas 48 h la transmisión de la señal A en el mutante $\Delta 1233$ se recupera,

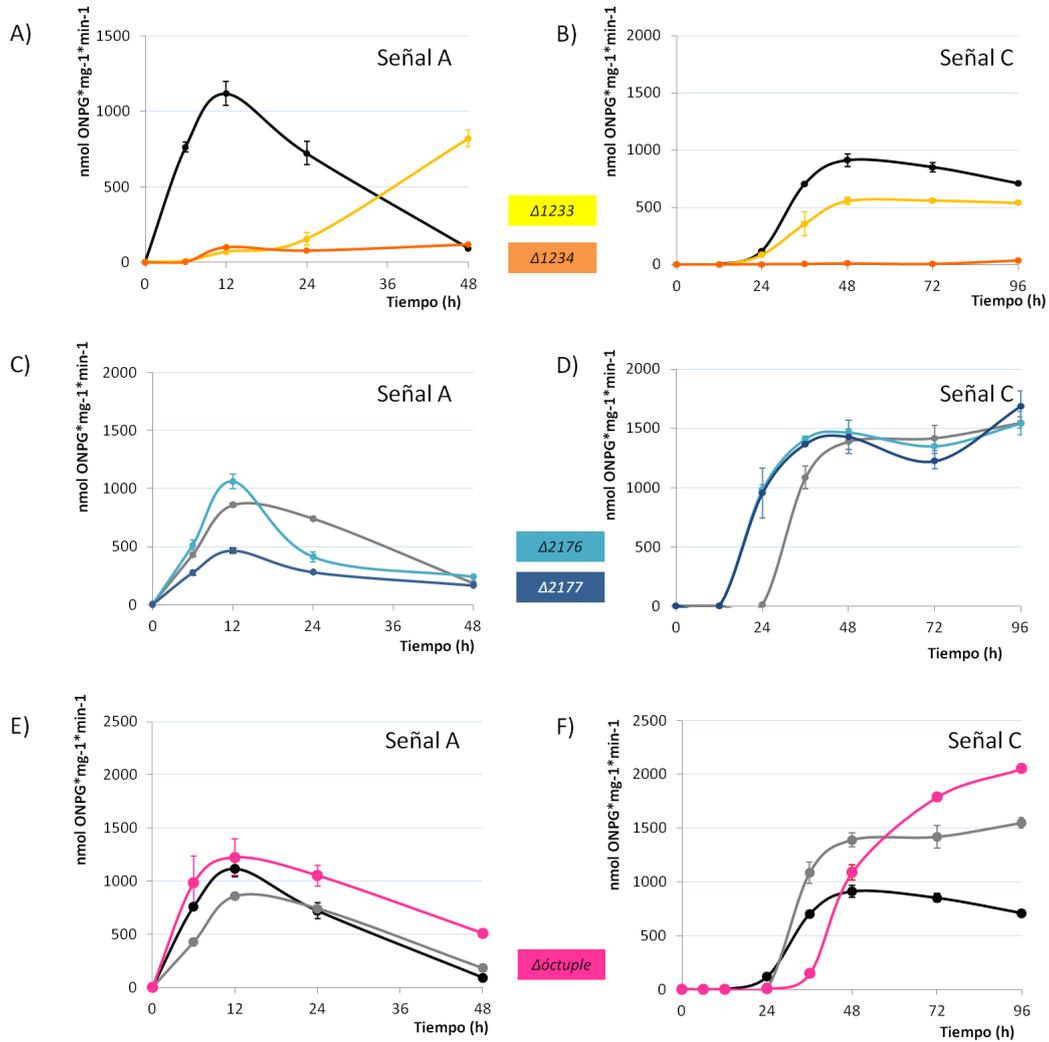


Figura 10.5: Expresión cuantitativa de los genes marcadores del desarrollo *spi* y *fmgE* en los mutantes. Como controles aparecen las cepas silvestres DK1622 (negro) y DK1622 *tan* (gris). A) Transmisión de la señal A en $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$, en comparación con el control DK1622. B) Transmisión de la señal C en $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$, en comparación con el silvestre DK1622. C) Transmisión de la señal A en $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, en comparación con el control DK1622 *tan*. D) Transmisión de la señal C en $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, en comparación con el control DK1622 *tan*. E) Transmisión de la señal A en el mutante $\Delta \text{octuple}$, en comparación con los silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. F) Transmisión de la señal C en el mutante $\Delta \text{octuple}$, en comparación con los silvestres DK1622 y DK1622 *tan*. Las barras de error representan la desviación estándar.

pero sin alcanzar los niveles del silvestre. El mutante $\Delta 1234$ mantiene una muy baja transmisión durante todo el desarrollo. En los mutantes $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$ observamos una transmisión de la señal A simultánea a la de la cepas control DK1622 y DK1622 *tan*. En el mutante $\Delta 2177$ los niveles de expresión se muestran por debajo de la cepa control DK1622 *tan*. El mutante $\Delta \text{óctuple}$ presenta también una transmisión de la señal A similar a la de las cepas control, si bien se detecta un ligero aumento en los niveles de expresión del gen *spi* respecto a los dos controles.

Observemos ahora la transmisión de la señal C (figura 10.5, gráficas B, D y F, en la columna derecha), que es la desencadenante de la agregación y la esporulación durante el desarrollo. Los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ presentan una transmisión de la señal menor que la del silvestre DK1622. En el caso del mutante $\Delta 1234$ la transmisión es prácticamente indetectable. Los niveles de transmisión concuerdan con los niveles de esporulación vistos en estos mutantes (figura 6.16), puesto que el mutante $\Delta 1233$ presentaba una esporulación del 64 % y el mutante $\Delta 1234$ apenas un 8 % respecto al silvestre amarillo. En los mutantes $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$, ambos de morfotipo *tan*, la señal C es igual de elevada que en el control DK1622 *tan*. Además, en los mutantes existe un adelanto en la transmisión de unas 12 h. Esto contrasta con el retraso que mostraban en la fructificación (figuras 6.14 y 6.15). Sin embargo, concuerda con los elevados niveles de esporulación detectados (figura 6.16). En el mutante $\Delta \text{óctuple}$ observamos un retraso en la transmisión de la señal C, de unas 12 h, seguido de un incremento en los niveles de transmisión que superan a los de ambas cepas silvestres. También se corresponden los datos con los datos encontrados al analizar la esporulación del mutante (figura 8.8), en los que vimos cómo el mutante, a pesar de la óctuple delección, produjo más esporas que ambas cepas control.

En resumen, de nuevo observamos patrones diferentes según los mutantes, indicando que los papeles de estas quinasas y pseudoquinasas en los procesos fisiológicos en los que participan no son idénticos, pese a ser codificadas por genes parálogos.

Los datos obtenidos muestran que los mutantes $\Delta 1233$ y $\Delta 1234$ tienen defectos en la transmisión de las señales A y C, por lo que esta pareja de quinasa-pseudoquinasa parece que es necesaria en etapas tempranas del desarrollo.

Por otro lado, los mutantes $\Delta 2176$ y $\Delta 2177$ presentan un ligero adelanto en la transmisión de la señal C, por lo que el papel de esta pareja de quinasa-pseudoquinasa podría residir en una regulación negativa o inhibidora de la transmisión de la señal C.

Finalmente, al eliminar las cuatro parejas de quinasa-pseudoquinasa, la transmisión de la señal A no se ve muy afectada. Sin embargo, la transmisión de la señal C se retrasa y después incrementa hasta niveles superiores a los de la cepa silvestre. Todo parece indicar que estas quinasas, en su conjunto, de forma directa o indirecta a través de la regulación del cambio de fase, intervienen en correcta regulación de la transmisión de la señal C.

Capítulo 11

Análisis de interacciones proteína-proteína mediante un sistema de doble híbrido bacteriano

Para dilucidar el papel de estos genes en la fisiología de *M. xanthus*, otra estrategia a seguir fue estudiar la ruta de transducción de señales en la que estas quinasas intervienen.

Las quinasas funcionan como interruptores moleculares de las rutas de transducción de señales, fosforilando otras proteínas para activar o desactivar su función. En estas cascadas de fosforilación, interaccionan físicamente con otras proteínas para fosforilarlas, o bien interaccionan alostéricamente como en el caso de las pseudoquinasas.

Estas parejas se conservan tanto en *M. xanthus* como en otras especies de mixobacterias, siguiendo el mismo orden, conservándose la **microsintenia**. Esto nos llevó a deducir que estas proteínas funcionan conjuntamente y van a coexistir en algún momento del ciclo de vida de *M. xanthus*.

Para probar la hipótesis de que la quinasa y la pseudoquinasa de una misma pareja interaccionan y participan en la misma ruta de transducción de señales, el primer paso que se tomó fue la búsqueda de interacciones proteína-proteína, tanto homooligoméricas (quinasa-quinasa y pseudoquinasa-pseudoquinasa), como heterooligoméricas (quinasa-pseudoquinasa).

11.1. Predicción bioinformática de interacciones proteína-proteína con la base de datos STRING

Los estudios de interacción entre proteínas se iniciaron con la pareja de quinasa-pseudoquinasa MXAN_1233-MXAN_1234. Dicha pareja se escogió como un ejemplo representante del resto de parejas al igual que se hizo en la sección 4.5, pues a nivel

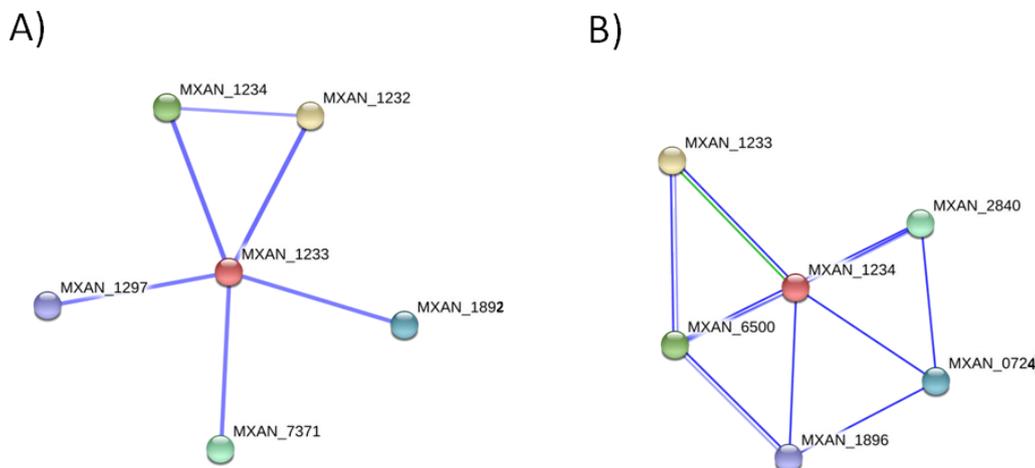


Figura 11.1: Predicción interacciones proteína-proteína más probables para las quinasas MXAN_1233 (A) y MXAN_1234 (B). Las asociaciones han sido predichas en función del contexto genético, y la coocurrencia de genes en otras bacterias. El grosor de la línea es proporcional al grado de asociación, que está representado por un valor de confianza S . Sólo se muestran las interacciones cuyo valor de confianza es elevado ($S > 0.9$).

de secuencia proteica todas las parejas son muy similares (a excepción el extremo carboxilo de la pseudoquinasa MXAN_2177).

Para encontrar las primeras evidencias que apoyaran nuestra hipótesis de forma bioinformática, se utilizó la base de datos STRING de predicción de interacciones proteína-proteína. Esta base de datos crea redes de interacciones de una proteína problema a partir de su contexto genético, coocurrencia de genes en otras especies, y evidencias experimentales cuando éstas existen.

La figura 11.1 muestra las interacciones predichas por la base de datos STRING para la pareja MXAN_1233 y MXAN_1234. Introduciendo como proteína problema MXAN_1233 la base de datos propone, entre las posibles proteínas interactuantes, la quinasa MXAN_1234. Además, observamos que se predice una interacción con la proteína hipotética MXAN_1232 situada aguas arriba, y que posee un parólogo (MXAN_3181) en otra de las 4 parejas de quinasas de *M. xanthus* que se estudian en esta tesis. Cabe destacar que el resto de interacciones predichas se producen con otras Ser/Thr quinasas de *M. xanthus*, lo cual es plausible, puesto que las quinasas suelen formar cascadas de reacción donde unas quinasas activan a otras.

De forma recíproca, tomando como proteína problema MXAN_1234, también obtenemos una interacción predicha con la proteína MXAN_1233. El resto de proteínas que teóricamente podrían interactuar con la pseudoquinasa también pertenecen a la familia de las Ser/Thr quinasas.

11.2. Ensayo de interacción proteína-proteína mediante un sistema de doble híbrido bacteriano

Para obtener evidencias experimentales de las interacciones proteína-proteína entre la pareja MXAN_1233-MXAN_1234 hemos utilizado el sistema de doble híbrido bacteriano (DHB) BACTH (Battesti y Bouveret, 2012). Los sistemas de doble híbrido permiten descubrir y estudiar interacciones proteína-proteína *in vivo*.

11.2.1. Sistema de doble híbrido bacteriano BACTH

El sistema BACTH (*Bacterial Adenilate Cyclase Two-Hybrid*) utilizado en este trabajo se basa en las propiedades de la **adenilato ciclasa de *Bordetella pertusis***. Esta enzima consta de dos subunidades, denominadas T25 y T18, que necesitan estar en contacto físico para transformar el ATP en AMPc, y no son activas por separado (figura 11.2, apartados A y B). Al fusionar dos proteínas que interactúan a cada una de las subunidades de la adenilato ciclasa, la actividad enzimática se reconstituye y se produce AMPc. El AMPc producido se unirá a la proteína CAP (proteína activadora por catabolito) y se activará la transcripción los operones *lac* y *mal*, que actuarán como genes reporteros. Así, utilizando una cepa de *E. coli* carente de actividad adenilato ciclasa (*cyoA-*) como hospedadora, podemos revelar interacciones proteicas fusionando nuestras proteínas problema a las subunidades T25 y T18 de la adenilato ciclasa.

11.2.2. Construcción de los plásmidos

Para este trabajo se construyeron plásmidos que nos permitían probar todas las combinaciones posibles de interacciones. Así, la quinasa MXAN_1233 fue fusionada tanto a T25 como a T18 por su extremo amino (figura 11.3, A), ya que al predecirse una proteína transmembrana (apartado 4.4.2) era necesario asegurar que ambas subunidades de la adenilato ciclasa permanecieran en el lado citoplasmático de la célula. Por el contrario, MXAN_1234, al ser predeciblemente una proteína soluble, fue fusionada a T18 y a T25 tanto por su extremo amino como por su extremo carboxilo (figura 11.3, B). Los cebadores utilizados para la amplificación y clonación en los vectores aparecen en la sección 2.4. Todos los fragmentos de PCR fueron clonados en la misma pauta de lectura que T18 y T25, utilizando las enzimas *Bam*HI y *Kpn*II. La correcta inserción y pauta de lectura fueron comprobadas mediante secuenciación de los plásmidos.

11.2.3. Ensayo de las interacciones proteína-proteína

Para la evaluación cualitativa de las interacciones, así como para la medida cuantitativa de la actividad β -galactosidasa, se siguió un protocolo modificado de Battesti y Bouveret (2012) (ver 3.5). Las combinaciones posibles de plásmidos fueron cotransformadas en la cepa de *E. coli* BTH101, mutante para la adenilato ciclasa. En la tabla 11.1 aparecen las parejas de plásmidos transformadas y las interacciones que se testaron con cada una.

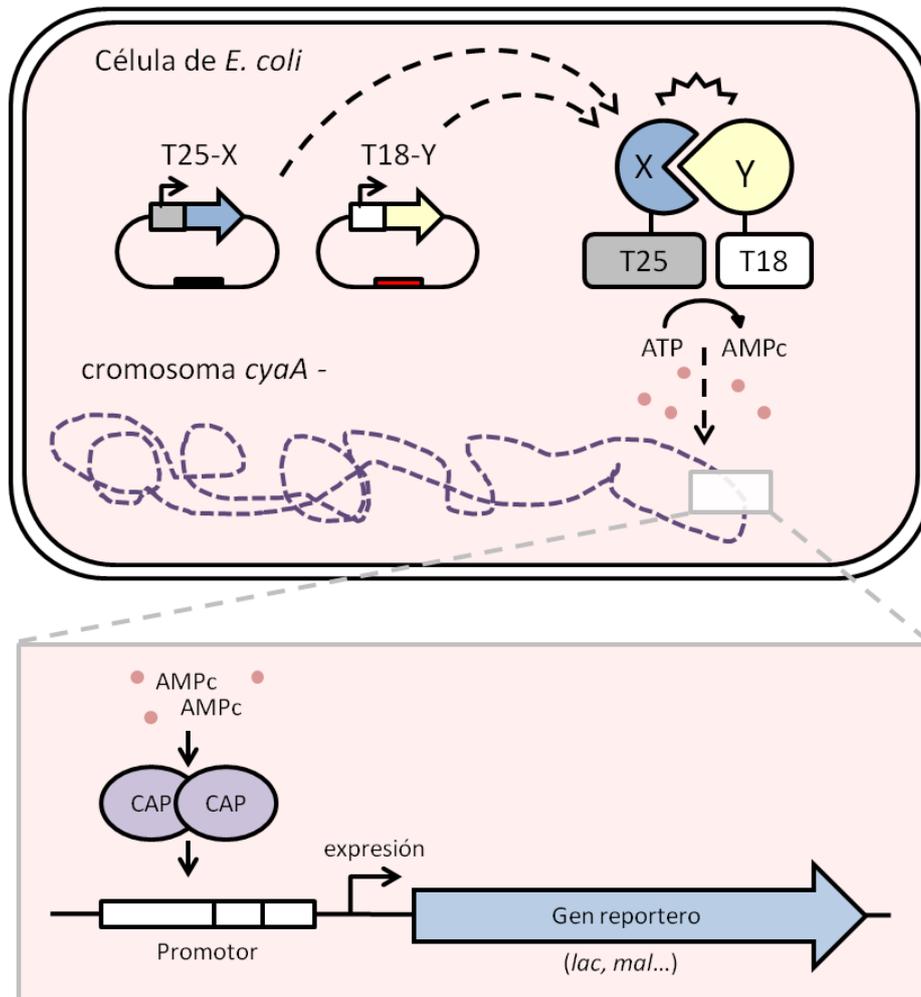


Figura 11.2: Esquema del sistema de doble híbrido bacteriano BACTH. La adenilato ciclasa de *B. pertusis* requiere que sus dos subunidades T25 (gris) y T18 (blanco) se encuentren en contacto para sintetizar AMPc. Cuando una cepa de *E. coli cyaA*- es contranformada con los plásmidos que expresan las subunidades T25 y T18 fusionadas a sendas proteínas X e Y que interaccionan entre sí, la adenilato ciclasa se reconstituye, recuperándose la síntesis de AMPc. La presencia de AMPc en la célula provoca la unión de la proteína activadora del catabolismo (CAP) a la región promotora del operón *lac* y/o *mal* de *E. coli*, y activa la expresión de los genes reporteros. Adaptado de Battesti y Bouveret (2012).

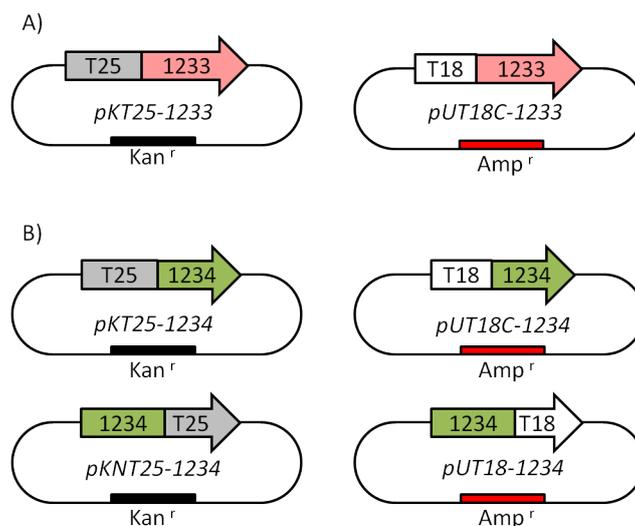


Figura 11.3: Plásmidos construidos para el ensayo del DHB, portadores de las proteínas de fusión con MXAN_1233 (A) y MXAN_1234 (B).

Para el estudio cualitativo, se inocularon gotas de las cepas cotransformantes a partir de un cultivo líquido crecido en LB, en medio agar MacConkey. Estas placas se incubaron durante 48 h a 30 °C, aunque las interacciones positivas ya fueron visibles a las 24 h, momento en el que se tomaron las fotografías (figura 11.4). Como se observa en dicha figura, las cepas que presentaban una interacción positiva clara fueron las contrasformadas con las parejas de vectores pUT18-1234/pKT25-1234 y pUT18C-1234/pKNT25-1234. La cepa que contenía la pareja pUT18C-1234/pKT25-1234 presentaba también aspecto positivo, aunque con una interacción más débil.

Los valores de actividad obtenidos en el ensayo cuantitativo se representan en la figura 11.5. En ella se observa que, mientras el control positivo presenta niveles alrededor de 3.500 unidades (nmol ONPG/mg·min), el control negativo, es decir, los plásmidos sin inserto, sólo presentan alrededor de 60 unidades.

La interacción del homodímero MXAN_1233-MXAN_1233 (figura 11.5, apartado A) presentó una actividad de 59,2 unidades, similar al control negativo, por lo que se considera que no se ha detectado interacción de la quinasa MXAN_1233 consigo misma.

Por otro lado, al testar la interacción de la pseudoquinasa MXAN_1234 consigo misma, hubo ciertas combinaciones que mostraron una actividad significativamente mayor que el control negativo. Concretamente, las combinaciones pUT18-1234/pKT25-1234 y pUT18C-1234/pKNT25-1234 (marcados como 1234 18-25 y 1234 18C-25N respectivamente en la figura 11.5) mostraron actividades de 196 y 609 unidades respectivamente. Este resultado coincidió con lo observado en el ensayo cualitativo (figura 11.4). Sin embargo, la combinación pUT18C-1234/pKT25-1234 que en dicho ensayo cualitativo mostró una señal positiva, no mostró una señal mayor que el control negativo en el recuento cualitativo (51,7 unidades de la interacción, frente a 59,2 unidades del control negativo). Así pues, consideramos este resultado negativo,

Homooligómero quinasa MXAN_1233	pUT18C-1233 pKT25-1233				
Homooligómero pseudoquinasa MXAN_1234	pUT18C-1233 pKT25-1233	pUT18-1234 pKNT25-1234	pUT18C-1234 pKT25-1234	pUT18C-1234 pKNT25-1234	
Heterooligómero quinasa pseudoquinasa	pUT18C-1233 pKT25-1233	pUT18-1234 pKNT25-1234	pUT18C-1234 pKT25-1234	pUT18C-1234 pKNT25-1234	

Tabla 11.1: Combinaciones de plásmidos cotransformadas y ensayadas.

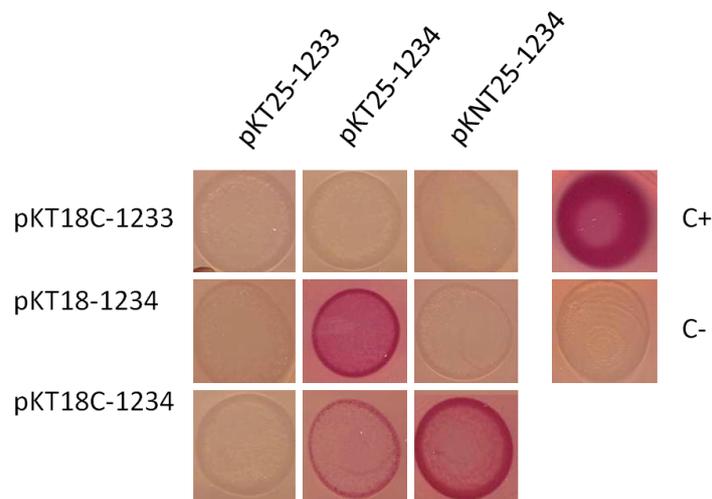


Figura 11.4: Ensayo cualitativo de la interacción proteína-proteína entre MXAN_1233 y MXAN_1234. Las cepas de *E. coli* BTH101 cotransformadas con dos plásmidos conteniendo proteínas de fusión candidatas a interactuar, fueron inoculadas en agar-MacConkey e incubadas durante 48 h a 30 °C. Las interacciones positivas aparecen como colonias rosas, mientras que las negativas presentan un aspecto incoloro. Como control positivo se utilizó una cepa que coexpresaba T25 y T18 fusionadas a dominios de cremallera de leucina (Zip, C+); como control negativo (C-) se utilizaron los plásmidos pKT25 y pUT18 sin inserto.

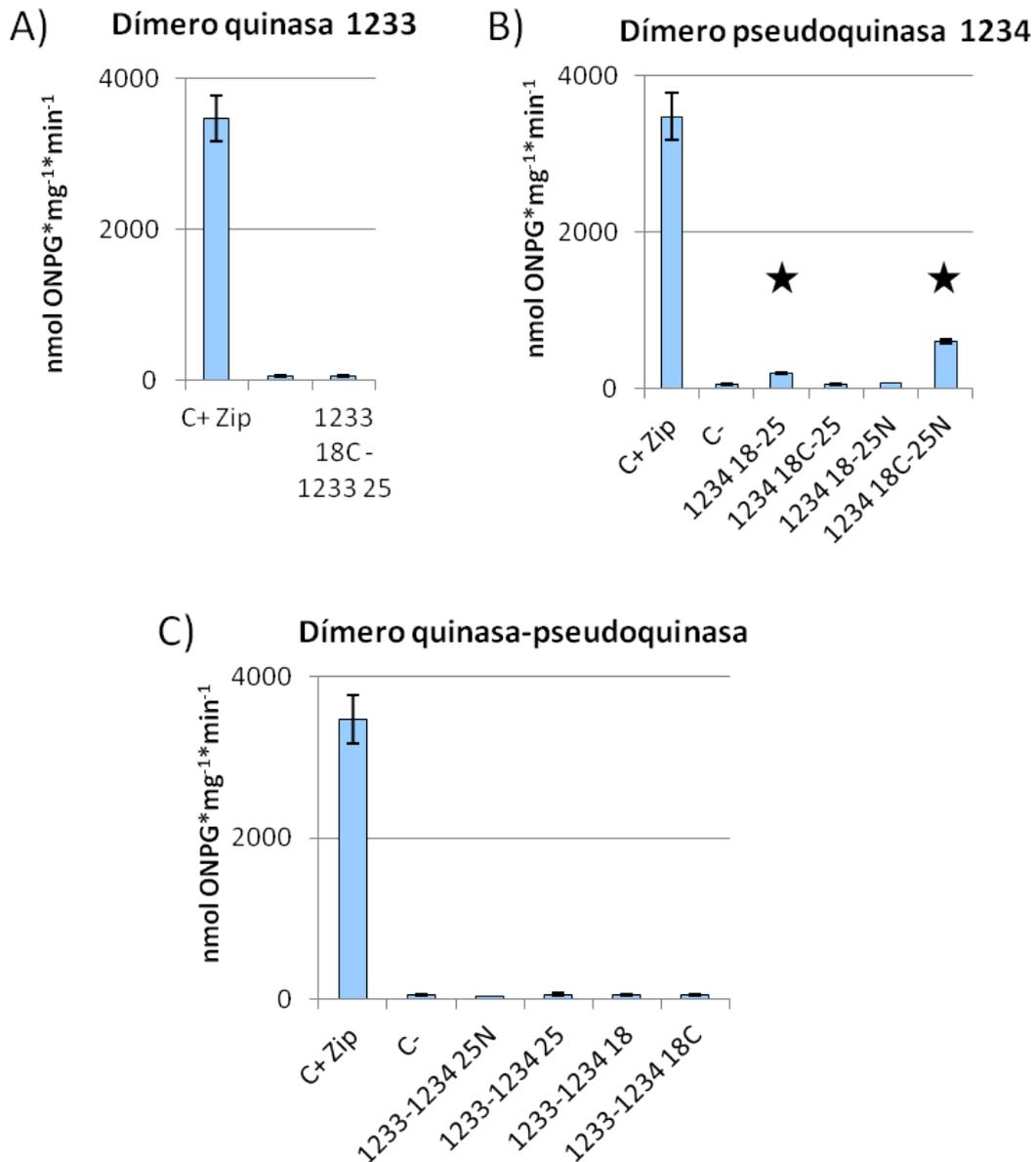


Figura 11.5: Ensayo cuantitativo de la interacción proteína-proteína entre MXAN_1233 y MXAN_1234. El nivel de la interacción se representa como nmol ONPG/mg·min. A) Interacción del homodímero MXAN_1233-MXAN_1233, en la que ninguna de las combinaciones fue positiva. B) Interacción del homodímero MXAN_1234-MXAN_1234, en la que las interacciones positivas están señaladas con estrellas. C) Interacción del heterodímero MXAN_1233-MXAN_1234, en la que ninguna de las combinaciones resultó positiva. Las barras de error representan la desviación estándar.

ya que se ha descrito que ocasionalmente la cepa de *E. coli* BTH101 donde se ha testado la interacción puede generar mutantes *lac+* y *mal+* y dar falsos positivos con una tasa de 10^{-8} y 10^{-9} respectivamente (Karimova *et al.*, 1998).

Finalmente, no se detectó interacción quinasa-pseudoquinasa mediante este método, puesto que ninguna combinación de todas las posibles mostró niveles de actividad β -galactosidasa significativamente mayores que los del control negativo (figura 11.5).

Esto nos permite concluir que la pseudoquinasa presenta interacción consigo misma. Además, según las combinaciones de vectores que han mostrado interacción, podemos saber que las moléculas interactúan con una orientación cabeza-cola, es decir, el extremo amino de una con el extremo carboxilo de la otra, puesto que estas orientaciones son las que nos han mostrado unos resultados positivos tanto en el ensayo cualitativo como en el cuantitativo.

No fue así en el caso del ensayo MXAN_1233-MXAN_1233, en el que no se detectó que la quinasa transmembrana formase homodímeros. Muchas de las Ser/Thr quinasa descritas, tanto eucariotas como procariotas, funcionan de forma dimerica, pero también es cierto que algunas de ellas necesitan la unión a un ligando para desencadenar la dimerización (Pereira *et al.*, 2011; Zorba *et al.*, 2014; Burgess y Bayliss, 2015). Por tanto, es posible que en el ensayo del DHB no se hayan dado las condiciones necesarias para desencadenar la formación de dímeros.

Por otro lado, la ausencia de interacción entre MXAN_1233 y MXAN_1234 no descarta que la quinasa pueda fosforilar a la pseudoquinasa. Las interacciones enzima-sustrato son muy dinámicas y poco duraderas en el tiempo, y pueden ser difíciles de detectar con éste método. Sin embargo, la pseudoquinasa probablemente carezca de actividad enzimática y regule su función mediante mecanismos alostéricos. Este tipo de interacciones son más estables y, por tanto, más fáciles de detectar.

En resumen, el análisis por DHB ha permitido concluir que no existe interacción detectable con este método en el caso de formarse homooligómeros de la quinasa (MXAN_1233) ni tampoco en el caso de la formación de heterooligómeros quinasa-pseudoquinasa (MXAN_1233/MXAN_1234). Sin embargo, sí se ha descubierto **interacción de la pseudoquinasa consigo misma, formando homooligómeros**. Además, por la información que nos aportan las distintas combinaciones de vectores utilizados, probablemente exista una dimerización cabeza-cola de la pseudoquinasa MXAN_1234. En la figura 11.6 se representa esquemáticamente la localización subcelular de la quinasa MXAN_1233 y la pseudoquinasa MXAN_1234, y sus posibles modos de interactuar.

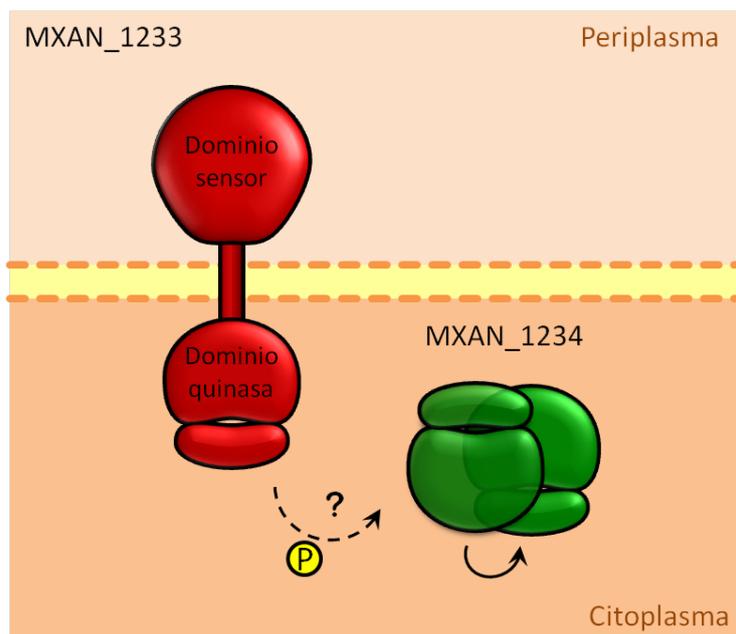


Figura 11.6: Esquema de la localización subcelular e interacciones proteicas entre MXAN_1233 y MXAN_1234. La quinasa MXAN_1233 posee un dominio extracitoplasmático que actuaría como dominio sensor, y un dominio quinasa que podría fosforilar a la pseudoquinasa. Por su parte, la pseudoquinasa ha mostrado interactuar, formando dímeros, con una orientación cabeza-cola.

Parte V

Conclusiones

Conclusiones / *Conclusions*

1. El análisis de genoma de *M. xanthus* ha permitido determinar que existen cuatro copias paralogas de genes emparejados que codifican Ser/Thr quinasas, que además aparecen en otras mixobacterias del suborden *Cystobacterineae*, y que conservan la microsintenia en el entorno génico. Generalmente, los genes codificantes de estas parejas de quinasas aparecen junto a un gen con un dominio DUF:2381 que sólo ha sido identificado en mixobacterias.

The analysis of the genome of M. xanthus allowed to determine that there are four paralogous pairs of genes encoding Ser/Thr kinases, that are conserved in other myxobacteria in the suborder Cystobacterineae and maintain microsynteny in their genetic neighbourhood. Generally, the genes encoding these pairs of kinases are accompanied by a gene that encodes a domain DUF:2381 that has been identified only in myxobacteria.

2. El análisis bioinformático reveló que la primera quinasa de cada pareja es una proteína transmembrana con un dominio quinasa funcional citoplasmático y un dominio globular periplásmico. La segunda quinasa de la pareja se ha clasificado como una proteína soluble en el citoplasma y ha sido catalogada como una pseudoquinasa por carecer del residuo de ácido aspártico del motivo conservado HRD, clave para la actividad catalítica.

Bioinformatic analysis revealed that the first kinase in the pair is a transmembrane protein with a catalytically active cytoplasmic domain and a periplasmic globular domain. The second kinase in the pair was classified as a cytoplasmic soluble protein and has been catalogued as a pseudokinase, since the catalytic aspartate residue is missing in the conserved HRD motif.

3. Las Ser/Thr quinasas y pseudoquinasas están implicadas, ya sea directa o indirectamente, en el proceso de variación de fases de *M. xanthus*, pues la mayoría de los mutantes de delección, tanto individuales, como múltiples, como óctuple, mostraron enjambres con morfotipo *tan*.

The kinases and pseudokinases are involved either directly or indirectly in the process of phase variation of M. xanthus, since the majority of the individual

deletion mutants, as well as most of the multiple deletion mutants, including the octuple mutant, showed swarms with a tan morphotype.

4. Los mutantes de delección con fenotipo *yellow* presentan un desarrollo simultáneo al de la cepa silvestre DK1622, pero son defectuosos en la formación de cuerpos fructíferos maduros y mixosporas viables. Por el contrario, los mutantes de delección con fenotipo *tan* presentan retraso durante el desarrollo, exhibiendo finalmente un incremento en la eficiencia de formación de mixosporas viables.

The deletion mutants with a yellow phenotype present simultaneous development with the wild type strain DK1622, but are defective in the formation of mature fruiting bodies and viable myxospores. In contrast, deletion mutants with a tan phenotype exhibit a delay in development, eventually exhibiting increased efficiency in the formation of viable myxospores.

5. El gen MXAN_2177 muestra una duplicación en tandem en la secuencia de ADN que confiere a la proteína un extremo carboxilo diferente al del resto de pseudoquinasas. Esta pseudoquinasa pertenece a la pareja de quinasa pseudoquinasa MXAN_2176-MXAN_2177, que por sí sola favorece la reversión a morfotipo *yellow* e inhibe la correcta maduración de las mixosporas.

The gene MXAN_2177 shows a tandem duplication in the DNA sequence that confers to the protein a carboxyl-terminus different from that of the rest of pseudokinases. This pseudokinase belongs to the kinase-pseudokinase pair MXAN_2176-MXAN_2177, which by itself promotes reversion to yellow morphology and inhibits correct myxospore maturation.

6. Las parejas de quinasa-pseudoquinasa contribuyen a regular negativamente la transmisión de la señal C durante el ciclo de desarrollo, pues la delección de las cuatro parejas en la cepa mutante óctuple provoca un incremento en la transmisión de dicha señal.

The pairs of kinase-pseudokinase contribute to negatively regulate C-signal transmission during development cycle, since the deletion of the four pairs of kinases in the octuple mutant strain causes an increased transmission of that signal.

7. La pseudoquinasa MXAN_1234 muestra una interacción proteína-proteína consigo misma, formando homooligómeros con una orientación cabeza-cola. Sin embargo, según los resultados del ensayo de doble híbrido bacteriano, no se detectan homooligómeros de la quinasa MXAN_1233 ni heterooligómeros de la quinasa MXAN_1233 con la pseudoquinasa MXAN_1234 .

The pseudokinase MXAN_1234 shows protein-protein interaction with itself, forming homooligomers with a head-to-tail orientation. However, according to

the results of the bacterial two-hybrid assay, there is no perceptible protein-protein interaction in the kinase MXAN_1233 with itself, neither between the kinase MXAN_1233 and the pseudokinase MXAN_1234, .

Parte VI

Bibliografía

Bibliografía

- Bardy, S. L., Ng, S. Y., y Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149(2):295–304.
- Battesti, A. y Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58(4):325–334.
- Bayliss, C. D. y Palmer, M. E. (2012). Evolution of simple sequence repeat-mediated phase variation in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1):39–44.
- Bentley, S. D. y Parkhill, J. (2004). Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual Review of Genetics*, 38:771–791.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1):248–254.
- Burgess, S. G. y Bayliss, R. (2015). The structure of c290a: C393a aurora a provides structural insights into kinase regulation. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71(3):0–0.
- Burnside, K. y Rajagopal, L. (2012). Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 15(2):125–131.
- Campbell, A., Viswanathan, P., Barrett, T., Son, B., Saha, S., y Kroos, L. (2015). Combinatorial regulation of the *dev* operon by MrpC2 and FruA during *Myxococcus xanthus* development. *Journal of Bacteriology*, 197(2):240–251.
- Capra, E. J. y Laub, M. T. (2012). The evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66:325.
- Castañeda García, A. (2008). Análisis de las proteínas quinasa de tipo eucariota de *Myxococcus xanthus*: caracterización molecular de la proteína PksA (MXAN_5696). *Tesis Doctoral, Universidad de Granada*.
- 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*. *Molecular Microbiology*, 34(2):268–281.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., y Deleage, G. (2000). Nps@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3):147–150.

- Dahl, J. L., Ulrich, C. H., y Kroft, T. L. (2011). Role of phase variation in the resistance of *Myxococcus xanthus* fruiting bodies to *Caenorhabditis elegans* predation. *Journal of Bacteriology*, 193(19):5081–5089.
- Damle, N. P. y Mohanty, D. (2014). Mechanism of autophosphorylation of mycobacterial PknB explored by molecular dynamics simulations. *Biochemistry*, 53(28):4715–4726.
- Dar, A. C. (2013). A pickup in pseudokinase activity. *Biochemical Society Transactions*, 41(4):987–994.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., *et al.* (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl 2):W465–W469.
- Diez, J., Martinez, J. P., Mestres, J., Sasse, F., Frank, R., y Meyerhans, A. (2012). Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microbial Cell Factories*, 11(52):10–1186.
- Duong-Ly, K. C. y Peterson, J. R. (2013). The human kinome and kinase inhibition. *Current Protocols in Pharmacology*, pages 2–9.
- Dziewanowska, K., Settles, M., Hunter, S., Linqvist, I., Schilkey, F., y Hartzell, P. L. (2014). Phase variation in *Myxococcus xanthus* yields cells specialized for iron sequestration. *PLoS One*, 9(4):e95189.
- Eyers, P. A. y Murphy, J. M. (2013). Dawn of the dead: protein pseudokinases signal new adventures in cell biology. *Biochemical Society Transactions*, 41(4):969–974.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., *et al.* (2013). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, page gkt1223.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., von Mering, C., *et al.* (2013). String v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41(D1):D808–D815.
- Furusawa, G., Dziewanowska, K., Stone, H., Settles, M., y Hartzell, P. (2011). Global analysis of phase variation in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 81(3):784–804.
- Galperin, M. Y. (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial iq, extroverts and introverts. *BMC microbiology*, 5(1):35.
- Gee, C. L., Papavinasasundaram, K. G., Blair, S. R., Baer, C. E., Falick, A. M., King, D. S., Griffin, J. E., Venghatakrishnan, H., Zukauskas, A., Wei, J.-R., *et al.* (2012). A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. *Science Signaling*, 5(208):ra7.

- Goldman, B., Bhat, S., y Shimkets, L. J. (2007). Genome evolution and the emergence of fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *PLoS One*, 2(12):e1329.
- Goldman, B., Nierman, W., Kaiser, D., Slater, S., Durkin, A., Eisen, J., Ronning, C., Barbazuk, W., Blanchard, M., Field, C., *et al.* (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41):15200–15205.
- Gómez-Santos, N., Treuner-Lange, A., Moraleda-Muñoz, A., García-Bravo, E., García-Hernández, R., Martínez-Cayueta, M., Pérez, J., Søgaard-Andersen, L., y Muñoz-Dorado, J. (2012). Comprehensive set of integrative plasmid vectors for copper-inducible gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Applied and environmental microbiology*, 78(8):2515–2521.
- Graves, L. M., Duncan, J. S., Whittle, M. C., y Johnson, G. L. (2013). The dynamic nature of the kinome. *Biochemical Journal*, 450(1):1–8.
- Han, K., Li, Z., Peng, R., Zhu, L., Zhou, T., Wang, L. G., Li, S., Zhang, X., Hu, W., Wu, Z., *et al.* (2013). Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulosum* genome from an alkaline milieu. *Scientific Reports*, 3.
- Hanks, S. K. y Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal*, 9(8):576–596.
- Harms, A., Treuner-Lange, A., Schumacher, D., y Søgaard-Andersen, L. (2013). Tracking of chromosome and replisome dynamics in *Myxococcus xanthus* reveals a novel chromosome arrangement. *PLoS Genetics*, 9(9):e1003802.
- Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (myxobacteriales): genes controlling movement of single cells. *Molecular and General Genetics MGG*, 171(2):167–176.
- Hunter, T. (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602):2513–2516.
- Iniesta, A. A. (2014). Parabs system in chromosome partitioning in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *PLoS One*, 9(1):e86897.
- Iniesta, A. A., García-Heras, F., Abellón-Ruiz, J., Gallego-García, A., y Elías-Arnanz, M. (2012). Two systems for conditional gene expression in *Myxococcus xanthus* inducible by isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside or vanillate. *Journal of Bacteriology*, 194(21):5875–5885.
- Innan, H. y Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, 11(2):97–108.
- Inouye, S. y Nariya, H. (2008). Dual regulation with Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp TCS in *Myxococcus xanthus*. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*, pages 111–121. Springer.

- 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*. *Journal of Bacteriology*, 190(7):2411–2421.
- Johnson, L. N., Noble, M. E., y Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2):149–158.
- Julien, B., Kaiser, A. D., y Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16):9098–9103.
- Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11):5952–5956.
- Kaiser, D. (2003). Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1):45–54.
- Kaiser, D. (2004). Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 58:75–98.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., y Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(D1):D199–D205.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., y Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10):5752–5756.
- Kashefi, K. y Hartzell, P. L. (1995). Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*-defect. *Molecular Microbiology*, 15(3):483–494.
- Kennelly, P. J. (2014). Protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation in the Archaea. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14):9480–9487.
- Keseler, I. M. y Kaiser, D. (1995). An early A-signal-dependent gene in *Myxococcus xanthus* has a σ 54-like promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(16):4638–4644.
- Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D., y Mijakovic, I. (2011). Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(10):989–994.
- Komano, T., Franceschini, T., y Inouye, S. (1987). Identification of a vegetative promoter in *Myxococcus xanthus*: a protein that has homology to histones. *Journal of Molecular Biology*, 196(3):517–524.
- Konovalova, A., Petters, T., y Sogaard-Andersen, L. (2010). Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2):89–106.
- Konovalova, A., Wegener-Feldbrügge, S., y Sogaard-Andersen, L. (2012). Two intercellular signals required for fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* act sequentially but non-hierarchically. *Molecular Microbiology*, 86(1):65–81.

- Kroos, L., Kuspa, A., y Kaiser, D. (1986). A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Developmental Biology*, 117(1):252–266.
- Laue, B. E. y Gill, R. E. (1994). Use of a phase variation-specific promoter of *Myxococcus xanthus* in a strategy for isolating a phase-locked mutant. *Journal of Bacteriology*, 176(17):5341–5349.
- Laue, B. E. y Gill, R. E. (1995). Using a phase-locked mutant of *Myxococcus xanthus* to study the role of phase variation in development. *Journal of Bacteriology*, 177(14):4089–4096.
- Lee, B., Holkenbrink, C., Treuner-Lange, A., y Higgs, P. I. (2012). *Myxococcus xanthus* developmental cell fate production: heterogeneous accumulation of developmental regulatory proteins and reexamination of the role of MazF in developmental lysis. *Journal of Bacteriology*, 194(12):3058–3068.
- Li, S., Zhou, X., Li, P., Han, K., Li, W., Li, Z., Wu, Z., y Li, Y. (2012). The existence and diversity of myxobacteria in lake mud – a previously unexplored myxobacteria habitat. *Environmental Microbiology Reports*, 4(6):587–595.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9):5443–5448.
- Lombana, T. N., Echols, N., Good, M. C., Thomsen, N. D., Ng, H.-L., Greenstein, A. E., Falick, A. M., King, D. S., y Alber, T. (2010). Allosteric activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknB. *Structure*, 18(12):1667–1677.
- Lynch, M. y Force, A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, 154(1):459–473.
- Macomber, L. y Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20):8344–8349.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2008). Brock. Biology of Microorganisms 12th edn. *International Microbiology*, 11:65–73.
- Martin, Z., Paul, K. F., Tracy, P., y William, N. H. (2013). Characterization of *Staphylococcus aureus* EssB, an integral membrane component of the Type VII secretion system: atomic resolution crystal structure of the cytoplasmic segment. *Biochemical Journal*, 449(2):469–477.
- Mauriello, E. M., Mignot, T., Yang, Z., y Zusman, D. R. (2010). Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2):229–249.
- Meharena, H. S., Chang, P., Keshwani, M. M., Oruganty, K., Nene, A. K., Kannan, N., Taylor, S. S., y Kornev, A. P. (2013). Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation. *PLoS Biology*, 11(10):e1001680.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50):19128–19133.
- Meiser, P., Weissman, K. J., Bode, H. B., Krug, D., Dickschat, J. S., Sandmann, A., y Müller, R. (2008). DKxanthene biosynthesis—understanding the basis for diversity-oriented synthesis in myxobacterial secondary metabolism. *Chemistry & Biology*, 15(8):771–781.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Min, X., Lee, B.-H., Cobb, M. H., y Goldsmith, E. J. (2004). Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension. *Structure*, 12(7):1303–1311.
- Mukherjee, K., Sharma, M., Urlaub, H., Bourenkov, G. P., Jahn, R., Südhof, T. C., y Wahl, M. C. (2008). CASK Functions as a Mg²⁺ independent neurexin kinase. *Cell*, 133(2):328–339.
- Müller, F.-D., Treuner-Lange, A., Heider, J., Huntley, S. M., y Higgs, P. I. (2010). Global transcriptome analysis of spore formation in *Myxococcus xanthus* reveals a locus necessary for cell differentiation. *BMC genomics*, 11(1):264.
- Muñoz-Dorado, J., Gómez-Santos, N., y Pérez, J. (2012). A novel mechanism of bacterial adaptation mediated by copper-dependent rna polymerase σ factors. *Transcription*, 3(2):63–67.
- Muñoz-Dorado, J., Higgs, P. I., y Montserrat, E.-A. (2014). Abundance and complexity of signalling mechanisms in myxobacteria. In *Myxobacteria: Genomics, Cellular and Molecular Biology*, pages 127–149. Caister Academic Press.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., y Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, 67(5):995–1006.
- Nan, B., Bandaria, J. N., Moghtaderi, A., Sun, I.-H., Yildiz, A., y Zusman, D. R. (2013). Flagella stator homologs function as motors for myxobacterial gliding motility by moving in helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16):E1508–E1513.
- Nan, B., McBride, M. J., Chen, J., Zusman, D. R., y Oster, G. (2014). Bacteria that glide with helical tracks. *Current Biology*, 24(4):R169–R173.
- Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack Jr, R. L., y Golemis, E. A. (2013). Aurora A kinase AURKA in normal and pathological cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(4):661–687.
- O’Connor, K. A. y Zusman, D. R. (1991). Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 173(11):3342–3355.

- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., y O'Halloran, T. V. (2001). The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33):30670–30677.
- Page, C. A. y Krause, D. C. (2013). Protein kinase/phosphatase function correlates with gliding motility in *Mycoplasm pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 195(8):1750–1757.
- Pereira, S. F., Goss, L., y Dworkin, J. (2011). Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1):192–212.
- Pérez, J., Castañeda García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R., y Muñoz Dorado, J. (2008). Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41):15950–15955.
- Robert, X. y Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new END script server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1):W320–W324.
- Roy, A., Kucukural, A., y Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4):725–738.
- Ruggiero, A., De Simone, P., Smaldone, G., Squeglia, F., y Berisio, R. (2012). Bacterial cell division regulation by Ser/Thr kinases: a structural perspective. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8):756.
- Saier Jr, M. H. (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *The Journal of Membrane Biology*, 214(1-2):75–90.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., y Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491.
- Sánchez-Sutil, M. C., Gómez-Santos, N., Moraleda-Munoz, A., Martins, L. O., Pérez, J., y Muñoz-Dorado, J. (2007). Differential expression of the three multicopper oxidases from *Mycococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 189(13):4887–4898.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12):5463–5467.
- Scheeff, E. D., Eswaran, J., Bunkoczi, G., Knapp, S., y Manning, G. (2009). Structure of the pseudokinase VRK3 reveals a degraded catalytic site, a highly conserved kinase fold, and a putative regulatory binding site. *Structure*, 17(1):128–138.
- Shah, I. M., Laaberki, M.-H., Popham, D. L., y Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/ Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell*, 135(3):486–496.
- Shaw, A. S., Kornev, A. P., Hu, J., Ahuja, L. G., y Taylor, S. S. (2014). Kinases and pseudokinases: lessons from RAF. *Molecular and Cellular Biology*, 34(9):1538–1546.

- Shi, W. y Zusman, D. R. (1993). The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8):3378–3382.
- Shimkets, L. y Woese, C. (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20):9459–9463.
- Shimkets, L. J. (1999). Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1):525–549.
- Son, B., Liu, Y., y Kroos, L. (2011). Combinatorial regulation by MrpC2 and FruA involves three sites in the *fmgE* promoter region during *Myxococcus xanthus* development. *Journal of Bacteriology*, 193(11):2756–2766.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3):503–517.
- Spröer, C., Reichenbach, H., y Stackebrandt, E. (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3):1255–1262.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., y Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1):183–215.
- Taylor, S. S., Shaw, A., Hu, J., Meharena, H. S., y Kornev, A. (2013a). Pseudokinases from a structural perspective. *Biochemical Society Transactions*, 41(4):981–986.
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J. M., Keshwani, M. M., y Kornev, A. P. (2013b). PKA: lessons learned after twenty years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(7):1271–1278.
- Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., *et al.* (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology*, 87(2):235–253.
- Ueki, T. y Inouye, S. (2006). A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in myxobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1):21–29.
- Van Der Woude, M. W. (2006). Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2):190–197.
- Van Der Woude, M. W. y Bäumlér, A. J. (2004). Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(3):581–611.
- Velicer, G. J. y Hillesland, K. L. (2008). Why cooperate? The ecology and evolution of myxobacteria. In *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, pages 17–40. American Society for Microbiology Press Washington, DC.
- Velicer, G. J. y Vos, M. (2009). Sociobiology of the myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63:599–623.

-
- Viklund, H. y Elofsson, A. (2008). OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics*, 24(15):1662–1668.
- Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., y Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, 460(7257):823–830.
- Whitworth, D. E. y Cock, P. J. (2008). Two-component signal transduction systems of the myxobacteria. In *Myxobacteria, Multicellularity and Differentiation*, pages 169–189. American Society for Microbiology Press Washington, DC.
- Wireman, J. W. y Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 129(2):798–802.
- Wu, S. S., Wu, J., y Kaiser, D. (1997). The *Myxococcus xanthus* pili locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Molecular microbiology*, 23(1):109–121.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1):103–119.
- Zeqiraj, E. y van Aalten, D. M. (2010). Pseudokinases – remnants of evolution or key allosteric regulators? *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6):772–781.
- Zorba, A., Buosi, V., Kutter, S., Kern, N., Pontiggia, F., Cho, Y.-J., y Kern, D. (2014). Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. *eLife*, 3:e02667.

Parte VII

Apéndice

Secuencias de las quinasas

**MXAN_1233, MXAN_2176,
MXAN_3182 y MXAN_4842**

MXAN 1233

000000001 ATG AAC GTG ATT TCG ATA TTC CCG CGT GCT GGG ATG TCC GTT GAT GGT TGG CGT GTC ATC
M N V I S I F P R A G M S V D G W R V I

000000061 AGG GAG CTT GGG AAC GGT GGT TTT GCA GTC GTT TTC CTA GTT GAG AAA CAC GGC CGC AGA
R E L G N G G F A V V F L V E K H G R R

000000121 AGT GCG CTC AAG GTG GCG CGC CAC CGA GAT TCA AGC GGG GAC GAA AAG CAA ACT CAC GCA
S A L K V A R H R D S S G D E K Q T H A

000000181 AGG ACG CTC CGG GAG CTA GCG GCG CTC CTT CTC CTG GAC CAT CCG AAC ATC GTC AAG CAT
R T L R E L A A L L L L D H P N I V K H

000000241 CGT GGG TAT GGG TAC TCC GAG CAT GGG AAC GTC TAT CTC GCG CTT GAA TAT ATT GAT GGT
R G Y G Y S E H G N V Y L A L E Y I D G

000000301 TGG ACG CTA GCG GAG TGG GCG GAA CGA AAA CAC CCC ACG GTG CGG GAG GTC TTG CAA GTC
W T L A E W A E R K H P T V R E V L Q V

000000361 TTC GAC AAG CTT TGC TCC GCA CTG TCA TAC ATG CAC AGT CGC GGC GTC CTG CAT CGG GAT
F D K L C S A L S Y M H S R G V L H R D

000000421 TTG AAG CTG TCC AAC GTT CTG ATT CGA AAG AGC GAT GGA GAG CCA ATC ATC ATC GAC TTT
L K L S N V L I R K S D G E P I I I D F

000000481 AGT TGT GCG AAC TAC TCA TTG GCC GAA GAG CTT ACG GAT GCG GGC TTG CCC CCA GGC ACG
S C A N Y S L A E E L T D A G L P P G T

000000541 GAC CGC TTT CGC GCG CCT GAG CAA TTC CAA TGG CTC CGA GAG CAC AAG GCG GAG CAC CGC
D R F R A P E Q F Q W L R E H K A E H R

000000601 GCG AAG TAC GCC TTT CAA GTC GCG GAC GAG ATT TTC GCG ATT GGT GCG ATG CTC TAT GAG
A K Y A F Q V A D E I F A I G A M L Y E

000000661 TTG CTG ACC GAC CCC CGC CCG ACC GAG ATT CAA GCG CGC TTT TCG CTC AAC AGT ACA GTC
L L T D P R P T E I Q A R F S L N S T V

000000721 GCA TTG CCC CCG CCC GCG CGT GCG TTG AAC GTG CGC GTG CCG GAA GCG TTG AAC GAC CTC
A L P P P A R A L N V R V P E A L N D L

000000781 GTC GCG AGC GTC CTA TCG CGG GAC CCT GCA AAG CGC CCC GTC GAC ACC GAG GCA CTA CGT
V A S V L S R D P A K R P V D T E A L R

000000841 CGC GAA CTA GGC GAA CTC CTG GCC TAT TCG AGC GCG GAG TAC CTG ACC CCG GTG CAT CCA
R E L G E L L A Y S S A E Y L T P V H P

000000901 CCG TCC GAG CAG CGG CAG GAG GAA CCA TCT GAA CAG CGG GTG CCC CCA GTT GCG GAC CCA
P S E Q R Q E E P S E Q R V P P V A D P

000000961 AGC CTT CCT GGG GCG CCT ACG CGT TCT GTC CGG GGA TGG CGC GGG CTC CTA GGG GGC CTA
S L P G A P T R S V R G W R G L L G G L

000001021 GCG GCC CTC ATC GTG CTC GTC GTG GCA GGG GGC TTC TGG CTC AGC CAG GGG GAA CCT CCG
A A L I V L V V A G G F W L S Q G E P P

000001081 CAG CCA CGA GAG CCG CAG GTT GCT AGT GCG CCA CCG GCT CCT AGT TCC CCA CAT TCC GCG
Q P R E P Q V A S A P P A P S S P H S A

000001141 CCG CTC ACA TCG GCC GCC CCT GCT ATG TCA CCA GTT AGC CCC CCG CCT GTG CCA TCG ACG
P L T S A A P A M S P V S P P P V P S T

000001201 GGC CTC GCG ACT GCC GCA CCG AAG GAA GGT TCA ACC GTG AAG ACG ACT CCG TCA CCC GAG
G L A T A A P K E G S T V K T T P S P E

000001261 GTC CCA CCC CAA GGC CGC CAG CCA CGC GGT AGG GCG AAG GCC ACC GCT GTT GCC GAC TGC
V P P Q G R Q P R G R A K A T A V A D C

000001321 GCG ACG ATG ACG CTC GTT GCG GCG CTC GCG GCG GGC TGC CCC GGA GCC CAG ATG CGT CCC
A T M T L V A A L A A G C P G A Q M R P

000001381 GAG TCG TTC ACC TGC CCG GCT GAT GCG GAA GAG GTA ATG CGG GAG GAT CTT CGT TGG AGG
 E S F T C P A D A E E V M R E D L R W R

000001441 GTG AAC CAG CGT TTC GTG CTC ACC TTA AAT GCC CGG CAT GGC CCG GAC GAT GAC GTG TGG
 V N Q R F V L T L N A R H G P D D D V W

000001501 TTC ACG GCT GGT TCG GAA GTG GTG GGA GTG GTT CCG AAG GGC GTC CCC TCG GAC CAG CGA
 F T A G S E V V G V V P K G V P S D Q R

000001561 GCG GTT ACC CCA CCA GGG ACA CGC TTC TAC GGC AAG GCT TAC TTC CTA TCG GAC CGA ATG
 A V T P P G T R F Y G K A Y F L S D R M

000001621 GGC CGC TCG GAG GGG CCT GCA TTG GTC ATC CGC TAT GAC CGC GTG AAG CTG CCG GGG CAG
 G R S E G P A L V I R Y D R V K L P G Q

000001681 GAT GAA CGT CCC ATC TGC TTC GTC GTC GAG TCT CAC TCT GAG GTT TAC GAA GAC GGT CGG
 D E R P I C F V V E S H S E V Y E D G R

000001741 GTG AAG TCG TAC AAT TCG GGA GGG GGT TAC GTC GTT GAC CGC TGG CCC TGA
 V K S Y N S G G G Y V V D R W P *

MXAN 2176

000000001 ATG AAC GTG ATT TCG ATG TTT CCA CCC CCT GGT ACG ACC ATC GAT GGG TGG AGT GTC GTC
M N V I S M F P P P G T T I D G W S V V

000000061 AGA GAG ATT GGA AAC GGT GGT TTT GCA GTC GTC TAT CTC GTC GAA AAG CAT GGC CGT CGA
R E I G N G G F A V V Y L V E K H G R R

000000121 TGC GCG CTC AAG TTA GCT CGC CAC CGG GAT TCG AGT GGG GAC GAC AAG CAG ACT CAC GCG
C A L K L A R H R D S S G D D K Q T H A

000000181 CGG ACG CTT CGA GAG CTT TCG GCA CTC CTC CTT CTG GAC CAT CCG AAC ATC GTC AAG CAC
R T L R E L S A L L L L D H P N I V K H

000000241 CGT GGG TAT GGA TAC TCC GAG CAG GGA AAT GTC TAT CTC GCG CTC GAG TAC GTA GAG GGG
R G Y G Y S E Q G N V Y L A L E Y V E G

000000301 TGG ACC CTT GCT GAA TGG GCG GAG CGT AAA CAC CCC ACG GTT CAA GAG GTC TTG CAG GTC
W T L A E W A E R K H P T V Q E V L Q V

000000361 TTC GAC AAG ATT TCC GCC GCG CTT TCG TAC ATG CAC GGC CGT GGC GTC CTA CAT CCG GAT
F D K I S A A L S Y M H G R G V L H R D

000000421 TTG AAG CTG TCC AAC GTT CTG ATT CGG AAG AGC GAT GGA GAG CCG GTC ATT ATC GAC TTT
L K L S N V L I R K S D G E P V I I D F

000000481 AGC TGT GCC AGC TAC TCG TTG GCT GAA GAG CTG ACG GAT TGG GGC TTG CCT CCG GGG ACG
S C A S Y S L A E E L T D W G L P P G T

000000541 GAC CGC TTT CGC GCG CCG GAG CAG TTC GCA TGG CTT CGG GAG CAC AAG GCC GAA CAG CGC
D R F R A P E Q F A W L R E H K A E Q R

000000601 GCG AAG TAC GCC TTC CGC GTC GCG GAC GAG ATT TTC GCG GTC GGC GCC ATG CTC TAT GAG
A K Y A F R V A D E I F A V G A M L Y E

000000661 TTG CTG ACC GAC CCC CGA CCC ACG GAG GTT CAA GCG CGA GTT ACG CTC AAC AGC ACC GTC
L L T D P R P T E V Q A R V T L N S T V

000000721 ATG AAG CCG CCT CCT GCG CGT GCG TTG AAC GTG CGT GTT CCA GAA GCT CTG AAC GAC CTC
M K P P P A R A L N V R V P E A L N D L

000000781 GTT GAT TGC ATC CTG TCG CGT GAC CCG GCC AAG CGC CCC GTC GAC TCA GAG GCT CTA CGT
V D C I L S R D P A K R P V D S E A L R

000000841 CGT GAG CTG GGC GAA CTC CTG GCC TAT TCG AGT GCG GAG TTC CTA CGC CCG GTG CAT CCG
R E L G E L L A Y S S A E F L R P V H P

000000901 CCG TCC GAG CAA CGG AAG CCG GAG GCA CCT GGG CCG GTG CGC CCT GCC GTA GAG GTG CCG
P S E Q R K P E A P G P V R P A V E V P

000000961 AAC TCG CCA GAT GCC CTT GAG CGT GGC CCT GTG CGG ACT GGA ATG GGC CTC TTG GCG GGC
N S P D A L E R G P V R T G M G L L A G

000001021 GTG GCA ACC CTC ATC TCG TTG GTC GTG GCT GGG GGC TTC TTG CTC ACC CGA GGG GAA CCC
V A T L I S L V V A G G F L L T R G E P

000001081 ACG GAG CCC GGG GCG CCG ACC GTC GCT GGT GCG CCG AGC CCG CAG AGC CCT CCT TAT TCG
T E P G A P T V A G A P S P Q S P P Y S

000001141 GCT CCG CGC ACG TCG TCT GCC CCT GCT ATG TCA CCT CCT AGC CCC CCG CCT GTG CTG CTG
A P R T S S A P A M S P P S P P P V L L

000001201 ACG GGG CAA GTA ACT GCC GCT CCG AAG GAA GGT TCA ACC GTG AAG ACG ACT CCG TCA CCC
T G Q V T A A P K E G S T V K T T P S P

000001261 GAG GTC CCA CCC CAA GGA CGC CAG TTA CGC GGG AGG ACG AAG GCC GCC GTT GCT GCC GAC
E V P P Q G R Q L R G R T K A A V A A D

000001321 TGC GCG ACG ATG ACG CTC GTT GCG GCA CTC GCG GCG GGT TGC CCC AGT GCC CAG ATT CCG
C A T M T L V A A L A A G C P S A Q I R

000001381 CCT GAG GCG TTC ACT TGC CCG GCT GGT GCG GAA GAG TCG ATG CCG GAG GAT CTC CGC TGG
 P E A F T C P A G A E E S M R E D L R W

000001441 AAG GTA AAT CAA TCG TTC AAC CTC ACC CTC AAT GCC CGT CAT GGC CCT GAA GAC GTT GTT
 K V N Q S F N L T L N A R H G P E D V V

000001501 TGG TTC ACT GCT GGG GCA GAT GTG GTG GGG GTG GTT CCG AAG GGG GTT CTT TCG GTC CAG
 W F T A G A D V V G V V P K G V L S V Q

000001561 AAT GCG TTT GCT CCG CCT GGG ACG CAT TTC TAC GGC AAG GCG TAT TAC CTA TCT GAC CGA
 N A F A P P G T H F Y G K A Y Y L S D R

000001621 ATG GGC CGC TCG GAG GGA CCC GCG CTG GTC ATC CGC TAC GAC CGA GTG AAG CTG CCG GGG
 M G R S E G P A L V I R Y D R V K L P G

000001681 CAG GAT GAG CGC CCC GTG TGC TTC GTC GTC GAG GCC CCC TCT GAA GGG TAC AGT GAC GGC
 Q D E R P V C F V V E A P S E G Y S D G

000001741 CGG GTG AAG GCG TTT AAC TCA GGG GGC GGC TAC GTC GTG GAC CGC TGG CCC TGA
 R V K A F N S G G G Y V V D R W P *

MXAN 3182

000000001 ATG AAC GTG ATT TCG TTG TTT CCG CCC CCT GGA ACG ACC ATC GAC GGA TGG AGT GTT GTT
M N V I S L F P P P G T T I D G W S V V

000000061 CGG GAG CTT GGA AAC GGA GGG TTT GCA GTC GTC TAC CTC GTC GAG AAG CAC GGT CTC AGA
R E L G N G G F A V V Y L V E K H G L R

000000121 TGC GCG CTC AAG TTG GCG CGC CAC CGG GAT TCG AGT GGG GAC GAC AAG CAG ACT CAC GCA
C A L K L A R H R D S S G D D K Q T H A

000000181 CGG ACG CTT CGG GAG CTT TCG GCC CTC CTC CTC CTG GAC CAT CCG AAC ATC GTC AAG CAC
R T L R E L S A L L L L D H P N I V K H

000000241 CGT GGG TAT GGA TAC TCT GAG CAG GGG AAT GTC TAT CTC GCG CTT GAG TAC GTA GAT GGG
R G Y G Y S E Q G N V Y L A L E Y V D G

000000301 TGG ACC CTT GCC GAA TGG GCG GAG CGT AAA CAC CCC ACG GTT CAG GAG GTT TTG CAT GTC
W T L A E W A E R K H P T V Q E V L H V

000000361 TTC GAC AAG ATT TCC GCC GCG CTT TCG TAC ATG CAC GGC CGT GGT GTC CTG CAT CGG GAT
F D K I S A A L S Y M H G R G V L H R D

000000421 TTG AAA CTG TCC AAC GTT CTG ATT CGG AAG AGC GAT GGA GAG CCG GTC ATC ATC GAC TTT
L K L S N V L I R K S D G E P V I I D F

000000481 AGC TGT GCA AGC TAC TCG TTG GCC GAA GAG CTG ACG GAT TGG GGC TTG CCG CCG GGA ACT
S C A S Y S L A E E L T D W G L P P G T

000000541 GAC CGC TTT CGT GCG CCG GAA CAG TTC ACA TGG CTC CGG GAG CAC AAG GCC GAA CAG CGA
D R F R A P E Q F T W L R E H K A E Q R

000000601 GCG AAG TAC GCC TTC CAA GTT GCG GAC GAG ATT TTC GCC GTC GGG GCG ATG CTC TAT GAG
A K Y A F Q V A D E I F A V G A M L Y E

000000661 TTG CTG ACC GAC CCC CGA CCG ACG GAG GTT CAA GCG CGA GTT ACG CTC AAC AGC ACC GTC
L L T D P R P T E V Q A R V T L N S T V

000000721 ATG AAG CCG CCT CCT GCG CGT GCG TTG AAC GTG CGT GTT CCG GAA GCG CTG AAC GAC CTC
M K P P P A R A L N V R V P E A L N D L

000000781 GTT GAT TGC ATC CTG TCG CGT GAA CCG GCA AGG CGC CCT GTC GAC ACT GAG GCG TTG CGC
V D C I L S R E P A R R P V D T E A L R

000000841 CGG GAG CTG GGC GAA CTC CTG GCC TAT TCG AGC GCG GAG TAC CTA TCC CCG GTG CAT CCG
R E L G E L L A Y S S A E Y L S P V H P

000000901 CCG TCC GAA CAG CGG CCA TTG GAG CCG CCG GAT CAG GTG ATG CCC GAA GTT GCC AAC CCG
P S E Q R P L E P P D Q V M P E V A N P

000000961 CGC CTT CCT GTG TCG CCA ACG CGT TCT GGT CGG GAG AGG TGG GGA CTC GCG GCG GGC TTG
R L P V S P T R S G R E R W G L A A G L

000001021 GCT GCC CTC ATC GCG CTT ACC GTG GCC GGG AGC TTC TTG CTC AGC CGA GGG GAA CCC ACG
A A L I A L T V A G S F L L S R G E P T

000001081 GAG TCC GGG GCG CAG ACC GTC GTT GGT GTG TCG CGC CCG CAG ATC CCT CCA CAT TCC GCG
E S G A Q T V V G V S R P Q I P P H S A

000001141 CCG CTC ACG TCG ACT GCC CCT GCT ATG TCA CCA CCA AGC CCC CCG CCC ATG ACG CTG ACG
P L T S T A P A M S P P S P P P M T L T

000001201 GGC CTT GCG ACT GCC GTT CCG AAG GAA GGT TCA ACC GTG AAG ACG CCT CCG TCA CCT GAG
G L A T A V P K E G S T V K T P P S P E

000001261 TCC CCA CTC CAA GGA CGC CCG TCA CGC GGG AGA ACG AAG GCC GCC GCT GCT GCC GAC TGC
S P L Q G R P S R G R T K A A A A A D C

000001321 GCG ACG ATG ACT CTC GTT GCG GCA CTC GCG GCA GGT TGC CCC AGT GCC CAG ATT CGA CCT
A T M T L V A A L A A G C P S A Q I R P

000001381 GAA GCG TTC ACT TGC CCG GCT GGT GCG GAG GAG GTG ATG CAG GAG GAT CTC CGC TGG AAG
E A F T C P A G G A E E V M Q E D L R W K

000001441 GTG AAT CAG AGT TTC GCG CTC ACC TTG GAT GCC CGC CAT GAG ACG GAC GCC TAC GTT TGG
V N Q S F A L T L D A R H E T D A Y V W

000001501 TTC ACT GCG GGG GCG GAG GTG ATG GGG GTC GTT CCA AAG GGC GTT CCA TCA GCC CAA AGG
F T A G A E V M G V V P K G V P S A Q R

000001561 GCG GTC GCC CCT CCC GGA ACG CGC TTC TAC GGC AAG GCA TAC TTC CTT TCC GAT CGA ATG
A V A P P G T R F Y G K A Y F L S D R M

000001621 GGC CGC TCT GAG GGG CCT GCG CTG GTC ATC CGC TAC GAT CGT GTG AAG CTC CCT GGG CAG
G R S E G P A L V I R Y D R V K L P G Q

000001681 GAC GAG CGC CCG GTT TGC TTC GTC GTC GAG TCG CCT TCC AAG GGC TAC GAA GAT GGC AGG
D E R P V C F V V E S P S K G Y E D G R

000001741 GTG AAG GCG TAC AAC TTA GGT GGC GGC TAC GTC GTA GAC CGT TGG CCC TGA
V K A Y N L G G G Y V V D R W P *

MXAN 4842

000000001 ATG AAG GTG ATT TCG CTA TTT CCG CGT GCC GGG ATG TTC GTT GAT GGC TGG CGC GTC ATT
M K V I S L F P R A G M F V D G W R V I

000000061 AAA GAG ATT GGG AAT GGT GGT TTT GCC GTC GTT TTC CTC GTT GAG AAG AAC GGC CGC AGG
K E I G N G G F A V V F L V E K N G R R

000000121 AGC GCG CTC AAG CTG GCT CGT CAC CGG GAT TCA AGC GGG GAC GAC AAG CAA ACT CAT GCA
S A L K L A R H R D S S G D D K Q T H A

000000181 AGG ACG CTC CGG GAG CTT TCG GCA CTT TTA CTC CTG GGC CAT CCG AAC ATC GTC AAG CAT
R T L R E L S A L L L L G H P N I V K H

000000241 CGC GGG TAT GGG TAC TCC GAG CAT GGG AAT GTC TAT CTC GCG CTT GAG TAC ATT GAT GGT
R G Y G Y S E H G N V Y L A L E Y I D G

000000301 TGG ACG CTA GCG GAG TGG GCG GAG CGG AAA CAC CCA ACG GTG CGG GAG GTC TTG CAG GTT
W T L A E W A E R K H P T V R E V L Q V

000000361 TTC GAC AAG CTC TGC TCT GCA CTG TCA TAC ATG CAC AGT CGC GGC GTC CTG CAT CGG GAT
F D K L C S A L S Y M H S R G V L H R D

000000421 TTG AAG CTA TCC AAC GTT CTG ATT CGA AAG AGC GAT GGA GAG CCA ATC ATC ATC GAC TTT
L K L S N V L I R K S D G E P I I I D F

000000481 AGC TGT GCG AAC TAC TCA TTG GCC GAA GAG CTT ACG GAT GCT GGC TTG CCC CCG GGC ACG
S C A N Y S L A E E L T D A G L P P G T

000000541 GAC CGT TTT CGC GCG CCT GAG CAA TTC AAA TGG CTC CGG GAG CAC AAG GCA GAG CAC CGC
D R F R A P E Q F K W L R E H K A E H R

000000601 GCG AAG TAC GCA TTT CGT GTC GCG GAC GAG ATC TTC GCG GTC GGA GCG ATG CTC TAT GAG
A K Y A F R V A D E I F A V G A M L Y E

000000661 CTG CTG ACA GAC CCC CGC CCG ACC GAG ATT CAA GCG CGC TTT TCG CTC AAC AGT ACG GTC
L L T D P R P T E I Q A R F S L N S T V

000000721 ATA TTG CCC CCA CCC GCG CGT GCG TTG AAC GGA CGC GTG CCG GAA GCG TTA AAT GAC CTC
I L P P P A R A L N G R V P E A L N D L

000000781 GTG GCG AGC ATC CTG TCG CGG GAG CCT GCA AAG CGC CCC GTC GAT ACC GAG GCG CTA CGT
V A S I L S R E P A K R P V D T E A L R

000000841 CGC GAA CTG GGC GAA CTC CTG GCC TAT TCG AGC GCG GAG TAC CTG TCC CCG GTG CAT CCA
R E L G E L L A Y S S A E Y L S P V H P

000000901 CCA TCT GAG CAG AGG CAG GGG GGA ACA TCG GAA CAG CAG ACG CCC GCA GTT GCG AAC TCA
P S E Q R Q G G T S E Q Q T P A V A N S

000000961 AGC CTT CCT GGG GGG CCT ACG CAT ACC GTC CGG GGA TGG CGC GGG CTC GTG GGG GGC CTC
S L P G G P T H T V R G W R G L V G G L

000001021 GCT GCC CTC ATC GCG CTT GTC ATG GCC GGG AGC TTC TGG CTC AGC CGG GGG GAA CCG CCG
A A L I A L V M A G S F W L S R G E P P

000001081 CAG CCA CGA GAG CCG CAG GTT GCC AGT GCG CCA CCT CCT CCC AGT TCC CCA CAT TCC GCG
Q P R E P Q V A S A P P P P S S P H S A

000001141 CCG CTC GTA TCG GCC GCC CCT GCT ATG TCA CCA CCT AGC CCT CCG CCT GTG CTG CTG ACG
P L V S A A P A M S P P S P P P V L L T

000001201 GGC CCT GAG ACT GCC GCT CCG AAG GAA GGT TCA ACC GTG AAG ACG ACT CCG TCA CCC AAG
G P E T A A P K E G S T V K T T P S P K

000001261 GCC CCG ACC CAA GGA CGC CCG TCG GGC GGG AGG ACG AAG GCC ACC GCT GTT GCC GAC TGC
A P T Q G R P S G G R T K A T A V A D C

000001321 GCG ACG ATG ACG CTC GTC GCG GCG CTC GCG GCA GGC TGC CCC GGG GCT CAG ATT CGG CCC
A T M T L V A A L A A G C P G A Q I R P

000001381 GAG TCG TTC ACC TGC CCG TCT GGT GCG GAA GAG ACG ATG CGG GAA GAC CTT CGC TGG GAG
E S F T C P S G A E E T M R E D L R W E

000001441 ATT AAC GAG CCA TTC CGC CTC ACT CTC GAT AGT CGC CAG GGC CCA TTC GAA CAA GTT TGG
I N E P F R L T L D S R Q G P F E Q V W

000001501 TTC ACC GCA GGG GCT GAC GTG GTG GGG GTT GTT CCC AAG GGA GTT GAA CGA CGG CAA CGA
F T A G A D V V G V V P K G V E R R Q R

000001561 GCA GTC GCG CCG CCC GGG ACA ATC TTC TAC GGG AAG GCG TAT TTC CTC TCT GAC CGC ATG
A V A P P G T I F Y G K A Y F L S D R M

000001621 GGG CGC TCG GAG GGG CCT GCG CTA GTC ATC CGC TAC GAC CGT GTG AAG CTG CCG GGA CAG
G R S E G P A L V I R Y D R V K L P G Q

000001681 GAC GAA CGC CCC GTC TGC TTC GTG GTC GAG AAG CCT GCC GAT GGC TAC GAA GAC GGC CGA
D E R P V C F V V E K P A D G Y E D G R

000001741 GTG AAG GCG TTC AAC ACC GGA GGC GGT TAC GTC GTG GAC CGC TGG CCA TGA
V K A F N T G G G Y V V D R W P *

Secuencias de las pseudoquinasas
MXAN_1234, MXAN_2177,
MXAN_3183 y MXAN_4841

MXAN 1234

000000001 ATG CGG CAG GTA GCT TCC TTT GCC GCG TTG GTC GCG AGT CTG CGC ACG AGG GGA AAC GGC
M R Q V A S F A A L V A S L R T R G N G

000000061 ATG TCG CAA GCA ATC GAG TTC AAG ATC CCG CCA GGG GCG ATT CTC TTC TCG GCG GAT GGC
M S Q A I E F K I P P G A I L F S A D G

000000121 GTC GGC TAC GAG TTC CGC GAG GAC TTG GGG CCG ACG CAC CAT GGG ATG TCC CTC TTC GTG
V G Y E F R E D L G P T H H G M S L F V

000000181 GCG CGG CTT CGA AAC TCC TCG GGG GAG CCT CGG GGA AAG GTG CTG CTG AAG GCG GTC CCT
A R L R N S S G E P R G K V L L K A V P

000000241 GCG CCA TCG GTG AAG GAG GGG GGG CGG GTT CGG CGG GCA CGA GCA AAG CTT GAT GAG CAG
A P S V K E G G R V R R A R A K L D E Q

000000301 GTT CGT CTT GCC ACC TCC CTC GCG CAC CCG GCA ATC CTC AAG GTT CAC GGG CTC CAC AAG
V R L A T S L A H P A I L K V H G L H K

000000361 GTA GAG GGC TAC TGG TAC GTC AGC GCT GAG CAT CCA TCC GGG AAC TCC CTG AAT GAG TTG
V E G Y W Y V S A E H P S G N S L N E L

000000421 CTG ACG CTC GCG GTC GAG TGC CGT CGA TGG TTC TCG CCC CTC TTC GTG ATG TTC GTA GGC
L T L A V E C R R W F S P L F V M F V G

000000481 TCG CAG GTG GCG GCA GCT CTT GAG CAC GCG CAC ACG GCG AAG GAT GCC AGC GGA CGC CCA
S Q V A A A L E H A H T A K D A S G R P

000000541 TTG AAC ATC GTT CAC CGA GCC ATC GAC GTC GCG CAC ATC TTC ATC GAC TGG GAC GGG ACG
L N I V H R A I D V A H I F I D W D G T

000000601 GTT CGG CTC GGC GAC TTC GGT CTC GCG CTG TCC AAC TTG CCG GGG CGC GTG GCT TCC TCT
V R L G D F G L A L S N L P G R V A S S

000000661 GTT CGC GGC CCG CGA GGA GAC TAC TTC TAT TCG TCG CCT GAG ATG CTG CTT GGC GGG CCC
V R G P R G D Y F Y S S P E M L L G G P

000000721 GTA GAC GCG CGC TCG GAC CTC TTC ATG TTG GGG GTG GTG CTG CTC GAA ATG GCG ACG GGA
V D A R S D L F M L G V V L L E M A T G

000000781 AAG AAT CTG CTC TTC CAC CCG GAC GCC CTC ACG CCC GAG GTC ATG GGC TCT TTG TCT GTG
K N L L F H P D A L T P E V M G S L S V

000000841 AAG AGT CGT CGG CGA GTC ATT CAG GCC ATC AAG CGG GCC ACG CTG GCC GGG GCG TCA CCC
K S R R R V I Q A I K R A T L A G A S P

000000901 ATG GTG GAG GAC GCG ATT TGG CGT GCC GCG ACG CTG ACG GAT GCG GAC GTG GAC GCG ATG
M V E D A I W R A A T L T D A D V D A M

000000961 ACG GAG GGG CTT CCC CAG GGG CTT CGC GTG ACG CTG AAC CGG CTT CTT CGG GTC TCC CCT
T E G L P Q G L R V T L N R L L R V S P

000001021 CGC GAG CGC TAC CAG TCC GCC GGA GAG CTG GCC AAA GAC CTA GCG GGC TGG GTT GGG GGC
R E R Y Q S A G E L A K D L A G W V G G

000001081 ACC TTC ACG AAG GCT GAT GCC GCT GCG GAA CTC AGG GCG CGT GCA GCT CAG GCA GAA GAG
T F T K A D A A A E L R A R A A Q A E E

000001141 ATG TTG GAT GCG CTG GGG CTC ACG CCG CCT CGC GGT CGC GGC AAG CGC CAC CCG GAT GAC
M L D A L G L T P P R G R G K R H P D D

000001201 GTG ACG ACG TCC TGA
V T T S *

MXAN 2177

000000001 GTG AGG GCG TTC CCT CAA CCG GAT GCC GCA GGT AGC GTT TTC CTC GTC GCG TTG GTT GCG
V R A F P Q P D A A G S V F L V A L V A

000000061 AGT TCG CAC ACG AGG GGC AAC GGC ATG TCG AAG GCA ATC GAG TTC AAG ATC CCA CGG GGG
S S H T R G N G M S K A I E F K I P R G

000000121 GCG ATC CTC TTC TCG GCG GGC GGG GTC GGC TAC GAG TAC CGC GAG GAC TTA GGG CCG ACT
A I L F S A G G V G Y E Y R E D L G P T

000000181 CAC CAC GGG ATG GCC CTG TTC GTA GCT CGG CTG CGA ACC GCG TCC GGG GCA CCG CGC GGG
H H G M A L F V A R L R T A S G A P R G

000000241 AAG GTG CTG CTC AAG GCG GTT CCG GCT CCA TCG GAA ACG GAA GGG GCT CGG GTC ATG CGT
K V L L K A V P A P S E T E G A R V M R

000000301 GCT CGG GCG AAG CTC GAT GAG CAG GTT CGC CTT GCT ACC TTC CTC AAT CAC CCG TCC ATC
A R A K L D E Q V R L A T F L N H P S I

000000361 CTC AAG GTG CAT GGG CTG CAC AAG GTC GAG GGC TAT TGG TAC GTC AGT ACG GAG CAC CCG
L K V H G L H K V E G Y W Y V S T E H P

000000421 GAT GGT CAC TCC CTG AAT GAG CTG CTG ACG CTC GTT GGT GAG AGT CAG CGA TGG TTC CCG
D G H S L N E L L T L V G E S Q R W F P

000000481 CCG CTC TTC GTT CTC TAC GTC GGC GCT CAG GTC GCA GCG GCC CTT GAG CAC GCG CAC GCC
P L F V L Y V G A Q V A A A L E H A H A

000000541 GCG AAG GAC GAG CAG GGA CCG CCA CTC AAC ATC GTT CAT CGG GCC GTC GAC GTT GAG CAC
A K D E Q G R P L N I V H R A V D V E H

000000601 GTC TTC GTC AAC TGG GAC GGG ACG GTT CAG CTC GCC GAC TTC GGC CTC GCG CTG TCT GAC
V F V N W D G T V Q L A D F G L A L S D

000000661 TTG CCG GGC CGA GTG GCC TCT TCG GCG CCG GGC CCT TAC GGG GAC CAC TTC TAC TCG TCA
L P G R V A S S A R G P Y G D H F Y S S

000000721 CCG GAG ATG CTT CTA GGG GGG AGC GTC GAT GCG CGC TCC GAC CTC TTC ATG CTG GGC GTC
P E M L L G G S V D A R S D L F M L G V

000000781 GTG CTG CTC GAA CTG GCA ACG GGG AAG AAC CTG CTC TTT TGC CCG GAC GAC ATC ACG CCC
V L L E L A T G K N L L F C P D D I T P

000000841 GAA GTC ATG GGC TCG TTG CCC ACG AAG AAG CGT CGT CGG GTC GCT CGG GCA ATC AAG CGG
E V M G S L P T K K R R R V A R A I K R

000000901 GCC ACG CTC GCA GGG GCG CCG CCG TTG GTG GCC GAC GCG ATT TGG CGC GCG GCG ACA CTG
A T L A G A P P L V A D A I W R A A T L

000000961 ACG GCT GCG GAC GTA GAC GCG ATG ACT GAG GGG CTT CCC CAG GGG CTG CGC GTG ACG CTG
T A A D V D A M T E G L P Q G L R V T L

000001021 AAT CGG CTA CTT CGG GTT GCC CCT CGT GAG CGC TAC CAG TCA GCG GGG GAA AGT CAT GGG
N R L L R V A P R E R Y Q S A G E S H G

000001081 CTC GTT GCC CAC GAA GAA GCG TCG TCG GGT CGC TCG GGC AAT CAA GCG GGC CAC GCT CGC
L V A H E E A S S G R S G N Q A G H A R

000001141 AGG GGC GCC GCC GTT GGT GGC CGA CGC GAT TTG GCG CGC GGC GAC ACT GAC GGC TGC GGA
R G A A V G G R R D L A R G D T D G C G

000001201 CGT AGA CGC GAT GAC TGA
R R R D D *

MXAN 3183

000000001 ATG TCG AAG GCA ATC GAG TTC AAG ATC CCA CGG GGG GCG ATC CTC TTT TCG GCG GGC GGA
M S K A I E F K I P R G A I L F S A G G

000000061 GTC GGC TAC GAG TAC CGC GAG GAC TTA GGG CCG GCT CAC CAC GGG ATG TCC CTG TTC GTA
V G Y E Y R E D L G P A H H G M S L F V

000000121 GCG AGG CTG CGG GCC GCG TCC GGC GCG CCG CGT GGG AAG GTG CTG CTC AAG GCG GTT CCG
A R L R A A S G A P R G K V L L K A V P

000000181 GCT CCA TCG GAA ACG GAC GGC GCC CGG GTC ATG CGT GCG CGC GCG AAG CTC GAC GAG CAG
A P S E T D G A R V M R A R A K L D E Q

000000241 GTT CGC CTT GCG GCC TTC CTC AAG CAC CCG GCC ATC CTC AAG GTT CAT GGG CTG CAC AAG
V R L A A F L K H P A I L K V H G L H K

000000301 GTC GAG GGC TAT TGG TAC GTC AGC ACG GAG CAC CCG GAC GGC CAC TCC CTG AAT GAG TTG
V E G Y W Y V S T E H P D G H S L N E L

000000361 CTG ACG CTC GTT GGT GAG AGT CAG CGA TGG TTC TCG CCG CTC TTC GTG CTC TAT GTC GGG
L T L V G E S Q R W F S P L F V L Y V G

000000421 GCG CAG GTC GCA GCG GCT CTT GAG CAC GCG CAC GCC GCG AAG GAC GAG CAG GGA CGG CCG
A Q V A A A L E H A H A A K D E Q G R P

000000481 CTA AAC ATC GTT CAT CGA GCC GTT GAC GTT GAG CAC ATC TTC GTC AAC TGG GAC GGG ACG
L N I V H R A V D V E H I F V N W D G T

000000541 GTT CAG CTC GCC GAC TTC GGC CTC GCG CTG TCC GAC TTG CCG GGG CGC GTA GCT TCA TCC
V Q L A D F G L A L S D L P G R V A S S

000000601 GCG CGC GGC CCT TTG GGG GAC CAC TTC TAC TCA TCA CCG GAG ATG CTG CTC GGA GGG AGC
A R G P L G D H F Y S S P E M L L G G S

000000661 GTC GAC GCC CGC GCC GAC CTC TTC ACG CTG GGC GTC GTG CTG CTC GAA CTG GCA ACG GGG
V D A R A D L F T L G V V L L E L A T G

000000721 AAG AAC CTG CTT TTC TGC CCG GAC GAC ATC ACG CCC GAC GTC ATG GCC TCG TTG CCC ACG
K N L L F C P D D I T P D V M A S L P T

000000781 AAG AAG CGT CGG CGG GTT GCT CGG GCG GTC AAG CGG GCT ACG CTC GCA GGG GCG CCG CCG
K K R R R V A R A V K R A T L A G A P P

000000841 TTG GTG GCC GAC GCA ATT TGG CGC GCG GCG ACA CTG ACG GTT GCG GAC GTA GAC GCA ATG
L V A D A I W R A A T L T V A D V D A M

000000901 ACC GAA GGG CTC CCC CAG GGC CTG CGA GTG ACG CTG AAC CGG CTA CTT CGG GTT GCC CCT
T E G L P Q G L R V T L N R L L R V A P

000000961 CGG GAG CGT TAC CAG TCG GCG GGG GAG TTG GCG GCC GAC CTG ACG GCC TGG CTT GGC GGC
R E R Y Q S A G E L A A D L T A W L G G

000001021 ACT TTC GCG AAG GCC GAC GCC GCA GCC GAG CTG AAG TCT CGG CCT GCT CAG GCA GAA GCG
T F A K A D A A A E L K S R P A Q A E A

000001081 GCG CTG GAT TCG ATG GCG ACC CTG CCG CCT CGC GGT CGC GGC AAG CGC AAG CCG GAT AAT
A L D S M A T L P P R G R G K R K P D N

000001141 GTG ACG ACG GCG TGA
V T T A *

MXAN_4841

000000001 ATG CGG CAG GTA GCT TCT TTC GCC GCG TTG GTC GCG AGT CTG CGC ACG AGG GGA AAC GGC
M R Q V A S F A A L V A S L R T R G N G

000000061 ATG TCG AAA GCA ATC GAG TTC AAG ATC CCG CCA GGG GCG ATT CTC TTC TCG GCG GAT GGC
M S K A I E F K I P P G A I L F S A D G

000000121 GTC GGC TAC GAG TTC CGC GAG GAC TTG GGG CCG ACG AAC CAT GGG ATG TCC CTC TTC GTG
V G Y E F R E D L G P T N H G M S L F V

000000181 GCT CGG CTG CGA ACC GCG TCG GGG GAG CCT CGT GGA AAG GTG CTG CTC AAG GCG GTT CCT
A R L R T A S G E P R G K V L L K A V P

000000241 GCG CCA TCG GAG AAG GAA GGG GGG CGG GTT CGG CGG GCG CGA GCA AAG CTG GAT GAG CAG
A P S E K E G G R V R R A R A K L D E Q

000000301 GTT CGT CTT GCC GCC TCT CTT TCT CAT CCC GCG ATC CTC AAG GTC CAT GGG CTC CAT AAG
V R L A A S L S H P A I L K V H G L H K

000000361 GTT GAG GGC TAC TGG TAC GTC AGC GCC GAG CAT CCA TCC GGG AAT TCG CTG AAC GAA CTG
V E G Y W Y V S A E H P S G N S L N E L

000000421 CTG ACG CTT GTT GTC GAG TGC CGT CGA TGG TTC TCG CCC CTC TTC GTG ATG TTC GTA GGC
L T L V V E C R R W F S P L F V M F V G

000000481 TCG CAG GTG GCG GCA GCT CTA GAG CAC GCG CAC ACG GCG AAG GAT GCC AGC GGG CGC CCC
S Q V A A A L E H A H T A K D A S G R P

000000541 TTG AAC ATC GTT CAC CGA GCT ATC GAT GTC GCG CAC ATC TTT ATC GAC TGG GAC GGG ACG
L N I V H R A I D V A H I F I D W D G T

000000601 GTT CGG CTC GGC GAC TTC GGT CTC GCG CTG TCC AAC TTG CCG GGG CGC GTG GCT TCC TCG
V R L G D F G L A L S N L P G R V A S S

000000661 GTT CGC AGC CCG CGA GGG GAC TAC TTC TAT TCG TCG CCT GAG ATG CTG CTT GGC GGG CCC
V R S P R G D Y F Y S S P E M L L G G P

000000721 GTT GAC GCG CGC TCG GAC CTC TTC ATG TTG GGG GTG GTG CTG CTC GAA ATG GCG ACG GGG
V D A R S D L F M L G V V L L E M A T G

000000781 AAG AAT CTG CTC TTC TGC CCG GAT GCC ATC ACG CCC GAG GTC ATG GGC TCG TTG TCC GTG
K N L L F C P D A I T P E V M G S L S V

000000841 AAG CGG CGT CGG CGA GTC GTT CAG GCA ATC AAG CGG GCC ACG CTG GCC GGG GCG TCA TCC
K R R R R V V Q A I K R A T L A G A S S

000000901 ATG GTA GAG GAC GCG ATT TGG CGT GCC GCG ACG CTG GCG GAT GCT GAC GTG GAC GCG ATG
M V E D A I W R A A T L A D A D V D A M

000000961 ACG GAG GGG CTT CCC CAG GGG CTT CGC GTA ACG CTG AAC CGG CTT CTT CGG GTC TCC CCC
T E G L P Q G L R V T L N R L L R V S P

000001021 CGC GAG CGC TAC CAG TCT GCC GGT GAG CTG GCC GCA GAC CTG GCT GCC TGG ATT GGG GGC
R E R Y Q S A G E L A A D L A A W I G G

000001081 ACC TTC ACG AAG ACT GAT GCC GCT GCG GAA CTC AGG GCA CGT GCA GCT CAG GCA GAA GAG
T F T K T D A A A E L R A R A A Q A E E

000001141 GCG CTG GAT GCG ATG GGG CTC ACG CCG CCT CGC GGT CGC GGC AAG CGC AAG TCG GAT GAT
A L D A M G L T P P R G R G K R K S D D

000001201 GTG ACG ACG GCG TGA
V T T A *

Cepas de *M. xanthus* obtenidas durante el desarrollo de esta tesis

Genotipo	Nombre alternativo
DK1622 <i>wild type</i> (<i>tan</i>)	DK1622 <i>tan</i>
$\Delta 1233$	
$\Delta 1234$	
$\Delta 2176$	
$\Delta 2177$	
$\Delta 3182$	
$\Delta 3183$	
$\Delta 4841$	
$\Delta 4842$	
$\Delta 1233\Delta 1234$	
$\Delta 2176\Delta 2177$	
$\Delta 3182\Delta 3183$	
$\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 2176\Delta 2177$	Δ cuádruple
$\Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$	
$\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$	Δ séxtuple
$\Delta 1233\Delta 1234 \Delta 2176\Delta 2177 \Delta 3182\Delta 3183 \Delta 4842\Delta 4841$	Δ óctuple

... continúa en la página siguiente

Genotipo	Nombre alternativo
DK1622- <i>spi lacZ</i>	
DK1622tan- <i>spi lacZ</i>	
DK1622- <i>fmgE lacZ</i>	
DK1622tan- <i>fmgE lacZ</i>	
$\Delta 1233$ - <i>spi-lacZ</i>	
$\Delta 1234$ - <i>spi-lacZ</i>	
$\Delta 2176$ - <i>spi-lacZ</i>	
$\Delta 2177$ - <i>spi-lacZ</i>	
Δ óctuple- <i>spi-lacZ</i>	
$\Delta 1233$ - <i>fmgE-lacZ</i>	
$\Delta 1234$ - <i>fmgE-lacZ</i>	
$\Delta 2176$ - <i>fmgE-lacZ</i>	
$\Delta 2177$ - <i>fmgE-lacZ</i>	
Δ óctuple- <i>fmgE-lacZ</i>	

Tabla 2: Cepas obtenidas durante esta tesis

Plásmidos construidos durante el desarrollo de esta tesis

Nombre	Descripción
pBJ- $\Delta 1233$	$\Delta 1233$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 1234$	$\Delta 1234$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 2176$	$\Delta 2176$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 2177$	$\Delta 2177$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 3182$	$\Delta 3182$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 3183$	$\Delta 3183$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 4841$	$\Delta 4841$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 4842$	$\Delta 4842$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 1233\Delta 1234$	$\Delta 1233\Delta 1234$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 2176\Delta 2176$	$\Delta 2176\Delta 2176$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 3182\Delta 3183$	$\Delta 3182\Delta 3183$ Kan ^r GalK
pBJ- $\Delta 4842\Delta 4841$	$\Delta 4842\Delta 4841$ Kan ^r GalK
pMAT3	P <i>cuoA</i> Mx8 <i>attP int</i> Tet ^r
pMAT4	P <i>cuoA</i> Mx8 <i>attP int</i> Kan ^r
pNG1A	P <i>cuoA</i> Kan ^r
pNG10A	P <i>cuoA</i> Tet ^r

... continúa en la página siguiente

Nombre	Descripción
pKT25-1233	Fusión T25-MXAN_1233 Kan ^r
pUT18C-1233	Fusión T18-MXAN_1233 Amp ^r
pKT25-1234	Fusión T25-MXAN_1234 Kan ^r
pKNT25-1234	Fusión MXAN_1234-T25 Kan ^r
pUT18-1234	Fusión MXAN_1234-T18 Amp ^r
pUT18C-1234	Fusión T18-MXAN_1234 Amp ^r
pKY- <i>spi-lacZ</i>	Kan ^r P <i>spi-lacZY</i>
pKY- <i>fmgE-lacZ</i>	Kan ^r P <i>fmgE-lacZY</i>

Tabla 3: Plásmidos contruidos durante esta tesis.
