

Caracterización del factor sigma de tipo ECF
CorE2 de *Myxococcus xanthus* y estudio de su
actividad reguladora en respuesta a metales

Francisco Javier Marcos Torres
TESIS DOCTORAL

Granada, 2016



ugr

Universidad
de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Francisco Javier Marcos Torres
ISBN: 978-84-9125-860-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43670>



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

Caracterización del factor sigma de tipo ECF
CorE2 de *Myxococcus xanthus* y estudio de su
actividad reguladora en respuesta a metales

Memoria presentada por el Licenciado Francisco Javier Marcos Torres para
optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Francisco Javier Marcos Torres
Granada, Enero de 2016



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 y Juana Pérez Torres.

José Muñoz Dorado
Catedrático de la Universidad de Granada

Juana Pérez Torres
Catedrática de la Universidad de Granada

El doctorando Francisco Javier Marcos Torres y los directores de la tesis, el Dr. José Muñoz Dorado y la Dra. Juana Pérez Torres, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando 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, Enero de 2016

Directores de la tesis:

José Muñoz Dorado

Catedrático de la Universidad de Granada

Juana Pérez Torres

Catedrática de la Universidad de Granada

Doctorando:

Francisco Javier Marcos Torres

Caracterización del factor sigma de tipo ECF CorE2 de *Myxococcus xanthus* y estudio de su actividad reguladora en respuesta a metales

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a un contrato de investigación de tres años de duración concedido por el grupo de investigación "Desarrollo Procariótico", referencia BIO318 financiado por el proyecto "Microbial Comparative Genomics" CONSOLIDER-INGENIO 2010, MICINN, referencia CSD2009-00006, así como a un contrato de 5 meses, concedido por el mismo grupo de investigación, financiado por el Programa de Fortalecimiento de las Capacidades I+D+i de la Universidad de Granada. La investigación llevada a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los proyectos "Microbial Comparative Genomics" CONSOLIDER-INGENIO 2010, MICINN, referencia CSD2009-00006 y "Estudios sobre rutas de transducción de señales mediadas por proteínas quinasas de tipo eucariota durante el desarrollo", MINECO, referencia BFU2012-33248 (70% FEDER).



Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral, lejos de ser un trabajo individual, es un proyecto que ha llegado a su fin gracias a la colaboración, apoyo y ánimo de muchas personas de mi entorno, tanto profesional, familiar y social. Cualquiera que me conozca sabrá que mi personalidad me dificulta bastante decir todas estas cosas que en muchísimas ocasiones son necesarias, así que quisiera aprovechar para dar las gracias en este apartado a toda la gente que más lo merece (aunque eso convierta a estas páginas en la sección más difícil de redactar de toda esta memoria).

Quiero empezar agradeciendo a mis directores de tesis José Muñoz y Juana Pérez, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta en mi vida, por confiarme este proyecto y por apoyarme, guiarme y alentarme a continuar incluso en los momentos más complicados. También por toda la dedicación que me han demostrado, sobre todo en estos últimos meses de grandes esfuerzos. Podría decir mucho de ellos, pero creo que no hay palabras para describir todo lo que han hecho por mí durante estos años.

Continuando en el entorno profesional, agradecer a mis compañeros de laboratorio Aurelio, Marina y Elena, que además de ser una buenísima compañía, desde que entré hace años como alumno interno hasta el momento en que deposito esta tesis, me han estado ayudando y enseñando, resolviendo todas mis dudas y buscando respuestas a mis interminables preguntas como si fueran las suyas propias, y que han resultado ser imprescindibles para la realización de esta Tesis Doctoral.

También quiero agradecer a la gente que ha pasado por el laboratorio y que se han convertido en buenos compañeros que recuerdo con cariño incluso tiempo después de haberse marchado. En primer lugar a Carmen y María a quienes he tenido ocasión de conocer dentro y fuera del laboratorio y se han convertido en una gran amistad. También a todos aquellos que han pasado por el laboratorio a los que teníamos que enseñar pero que han acabado enseñándome mucho a mí, en especial mencionar a Sheila y Fede (que fueron

mis primeros “niños”), y a Gonzalo, Álex, Alba, Cristian, Lucía, Lolu, Bea y Miguel. De todos ellos quiero señalar la colaboración de María, Sheila y Fede en la elaboración de alguna de las cepas obtenidas en esta Tesis Doctoral.

Es necesaria una mención especial para Nuria, con quien por desgracia no he tenido ocasión de coincidir por demasiado tiempo. ¿Quién iba a decirme que aquella profesora que me dio las prácticas de microbiología durante la licenciatura, estaría trabajando en aquellos momentos en establecer la base de lo que luego se convertiría en mi proyecto de investigación al que le he dedicado tanto?

Además, quiero darles las gracias a todos los miembros del grupo de investigación, tanto los que siguen como los que han formado parte alguna vez de él, por hacer la convivencia y el día a día del laboratorio tan ameno, de forma que no resulte tan difícil ir cada día a trabajar. Y también al resto de compañeros del departamento, incluyendo a la gente de la segunda planta y del sótano, tanto los que siguen como los que ahora están continuando su carrera profesional en otros lugares, nunca olvidaré todos los *Journals club*, porras, y juergas varias que hemos compartido juntos.

También quiero agradecer la colaboración de los grupos de investigación de Silvia Atrià en la Universitat de Barcelona y de Mercé Capdevila en la Universitat Autònoma de Barcelona por su colaboración en la realización de gran parte de esta tesis, y sobretodo por su constante ayuda y apoyo a la hora de resolver mis interminables dudas. También quiero destacar el buen ambiente de trabajo, el compañerismo, la amabilidad y lo mucho que me enseñaron Silvia, Sebas, Ana y Elena, así como el resto de compañeros del departamento de genética durante mi estancia en Barcelona, haciendo que me sintiera como uno más.

Quiero ahora dedicar un agradecimiento especial a toda mi familia, quizás los que más han sufrido el trabajo que conlleva esta tesis (algunos puede que lo hayan sufrido incluso más que yo), ya que ha supuesto que las visitas tuvieran que ser pocas y breves, pero que han aguantado la relación a distancia durante tantos años. Primero de todo agradecer a mi madre, que junto con mis sobrinos, quizás sea la que más me ha echado de menos, y que desde bien pequeño ha estado animándome a aspirar siempre a lo mejor y a esforzarme y trabajar duro por alcanzarlo, que nunca ha dudado de mí, y que me ha apoyado en cada uno

de los pasos que me han llevado hasta este punto por dolorosos que fueran para ella.

Mis sobrinos, África y Alan, que durante gran parte de la redacción de esta memoria han aceptado como unos campeones que su "Tito Pachi" tiene que trabajar y que no jugará con ellos hasta más tarde. Que me han dado todos esos dibujos que atesoro para demostrarme lo mucho que me echan de menos y lo que me quieren, y con los que disfruto de pasar cada momento que estoy en casa.

A mis hermanas, Raquel y Ester, y mis cuñados Jose Andrés y Roberto, muchísimas gracias por todo, por ser no sólo mi familia, sino también mis amigos. Tener a alguien así en tu familia con quien disfrutar tanto al salir, charlar, tomar un café o una cerveza o ir a comer es algo que no tiene precio y por lo que siempre estaré agradecido. También a mi abuelo Elías y mis tíos y primas Natalia y María, con los que disfruto de su compañía en cada una de mis visitas en las que nos ponemos al día del tiempo que ha pasado, y que me han enseñado el significado de la palabra familia.

También agradecer a mi padre y a Sonia que me han apoyado y que me han enseñado tanto, con los que siempre es una alegría juntarnos y conversar de todo, y que siempre me han demostrado todo su cariño.

Por último, y no menos importante, agradecer a todos mis amigos. En primer lugar a los que, al igual que mi familia, han tenido que soportar la distancia. A María, que emprendió conmigo el viaje a Granada que ha concluido en este punto de mi vida, y con la que he compartido tantas vivencias y tantas anécdotas, porque somos unos desgraciados con suerte, y pese a todo siempre salimos adelante, y porque este año también ha representado un punto muy importante de su vida: la llegada de la pequeña Helena. A todo el grupo de Eco Teatre (tanto miembros activos como inactivos), que saben que los echo muchísimo de menos y que en cada visita estoy deseando verlos porque hay poca gente con la que me ría tanto como con ellos. A todos los amigos de la Línea y Algeciras, en especial a Rafa, que siempre han permanecido a mi lado viniendo a visitarme en cada ocasión, porque saben que es difícil mantener las amistades a distancia y aún así cuentan conmigo para todo, por todo lo que les echo de menos (y me consta que ellos a mí) y por todo el cariño que me demuestran en cada visita tanto mía como suya.

Y por supuesto, no me olvido de la gente de Granada, que ha convertido estos años en un viaje inolvidable y que ha hecho que estos años de tesis pasen volando. A Cristina y Álex, con los que he compartido todas mis penas delante de una jarra de cerveza bien fría. A Elena y Carmen, que se han convertido en un pilar fundamental para mí en Granada; a Elena, que siempre ha compartido conmigo ese gusto por la comida y el cine basura, esas noches de pizza y peli, y con la que siempre he podido hablar de todo, por absurdo o políticamente incorrecto que sea, y a Carmen, por soportar que ambos hablemos de todo, por absurdo o políticamente incorrecto que sea, y por ser la lanzada, la protectora y la que siempre tiene la facilidad para alegrarte el día con cualquier ocurrencia.

Pese a que esta es la gente que más relevancia ha tenido en la realización de esta Tesis Doctoral, no son los únicos, pero no era mi intención extenderme en esta sección (pese a que no lo haya logrado). A todos los que han contribuido y han estado a mi lado todos estos años (a mis amigos de toda la vida, al grupo de astrofísicos, compañeros de la carrera, al personal del centro de instrumentación científica y al de la universidad de Granada, además del resto de amigos y familiares), a todos ellos muchas gracias.

Índice

Índice

I. Introducción	1
1.1. Mixobacterias	1
1.2. <i>Myxococcus xanthus</i>	3
1.3. Sistemas de transducción de señales en bacterias	6
1.3.1. Sistemas de un componente	7
1.3.2. Sistemas de dos componentes	8
1.3.3. Proteínas quinasa de tipo eucariótico (ELPK)	9
1.3.4. Factores sigma	11
1.3.4.1. Factores σ^{54}	12
1.3.4.2. Factores σ^{70}	13
1.4. Factores sigma de tipo ECF	19
1.4.1. Dependientes de factor antisigma	20
1.4.1.1. No caracterizados con un factor antisigma putativo	20
1.4.1.2. Regulados por proteólisis del factor antisigma anclado a la membrana	21
1.4.1.3. Regulados por cambio conformacional del factor antisigma	22
1.4.1.4. Regulados por cascadas de interacción proteína-proteína	24
1.4.1.5. Regulados por intercambio en el factor antisigma con una proteína mimética	25
1.4.2. Independientes de factor antisigma	26
1.4.2.1. No caracterizados y sin factor antisigma conocido	26
1.4.2.2. Regulados por transcripción directa del factor sigma	26
1.4.2.3. Regulados por proteínas quinasa de tipo eucariótico	27

1.4.2.4. Regulados por extensión C-terminal	28
1.5. Resistencia a metales en <i>M. xanthus</i>	32
1.5.1. Proteínas implicadas en la resistencia a metales	32
1.5.2. Mantenimiento de la homeostasis del cobre en <i>M. xanthus</i>	36
II. Objetivos	41
III. Materiales y métodos	45
3.1. Materiales	45
3.1.1. Cultivo de microorganismos	45
3.1.1.1. Microorganismos	45
3.1.1.2. Medios de cultivo	46
3.1.2. Materiales empleados para el desarrollo de técnicas de Biología Molecular	51
3.1.2.1. Soluciones y tampones	51
3.1.2.2. Kits comerciales	53
3.1.2.3. Reactivos, compuestos y consumibles	54
3.1.2.4. Enzimas	56
3.1.2.5. Plásmidos	56
3.1.2.6. Oligonucleótidos	58
3.1.3. Instrumentos	60
3.1.4. Bases de datos y servidores	62
3.2. Métodos	65
3.2.1. Manipulación de microorganismos	65
3.2.1.1. Cultivo de microorganismos	65
3.2.1.1.1. Cepas de <i>E. coli</i>	65
3.2.1.1.2. Cepas de <i>M. xanthus</i>	65
3.2.1.2. Preparación de células para transformación de ADN	66
3.2.1.2.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	66
3.2.1.2.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>M. xanthus</i>	67

3.2.1.3. Introducción de ADN en células de <i>E. coli</i> y <i>M. xanthus</i>	67
3.2.1.3.1. Transformación por choque térmico	67
3.2.1.3.2. Electroporación de <i>M. xanthus</i>	68
3.2.1.4. Análisis de la expresión de genes de <i>M. xanthus</i>	68
3.2.1.4.1. Construcción de fusiones transcripcionales <i>lacZ</i>	69
3.2.1.4.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa	70
3.2.1.4.2.1. Análisis cualitativo	70
3.2.1.4.2.2. Análisis cuantitativo	71
3.2.1.5. Mutantes de delección en fase	72
3.2.1.5.1. Construcción de mutantes de delección en fase	73
3.2.1.5.2. Caracterización fenotípica de mutantes de delección en fase	75
3.2.1.5.2.1. Caracterización fenotípica durante el crecimiento vegetativo	75
3.2.1.5.2.2. Caracterización fenotípica durante el ciclo de desarrollo	76
3.2.2. Manipulación de ADN	77
3.2.2.1. Extracción de ADN	77
3.2.2.1.1. Extracción de ADN cromosómico	77
3.2.2.1.2. Extracción de ADN plasmídico	77
3.2.2.2. Electroforesis de ADN	78
3.2.2.2.1. Electroforesis en geles de agarosa	78
3.2.2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	79
3.2.2.3. Amplificación por PCR	80
3.2.2.4. Digestión enzimática de ADN	81
3.2.2.5. Ligación de ADN	82
3.2.2.6. Purificación de ADN de geles de agarosa	83
3.2.2.7. Secuenciación de ADN	83
3.2.2.8. Southern blot	84
3.2.2.8.1. Preparación del gel	84
3.2.2.8.2. Transferencia de ADN	85
3.2.2.8.3. Marcaje de ADN con digoxigenina	86
3.2.2.8.4. Prehibridación e hibridación del ADN	86

3.2.2.8.5. Detección de las sondas hibridadas mediante reacción con fosfatasa alcalina	87
3.2.2.9. Mutaciones puntuales	89
3.2.3. Manipulación de ARN	91
3.2.3.1. Extracción de ARN	91
3.2.3.2. RT-PCR	92
3.2.3.3. Amplificación rápida de extremos 5' de ADNc (RACE)	93
3.2.4. Manipulación de proteínas	95
3.2.4.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes	95
3.2.4.2. Tinción de geles con azul coomassie	96
3.2.4.3. Medida de la concentración de proteínas	96
3.2.4.4. Purificación de proteínas a pequeña escala	97
3.2.4.4.1. Inducción de proteínas en <i>E. coli</i>	97
3.2.4.4.2. Separación de extractos celulares	98
3.2.4.4.3. Purificación por columnas GSTrap-4B	100
3.2.4.5. Purificación de proteínas a gran escala	100
3.2.4.5.1. Inducción de proteínas en <i>E. coli</i>	101
3.2.4.5.2. Purificación por matriz de glutatión sefarosa	101
3.2.4.6. Estudios de unión de metales a las proteínas	103
3.2.4.6.1. ICP-OES	103
3.2.4.6.2. Espectrometría de masas	104
3.2.4.6.3. Análisis del espectro UV-Vis y de DC	105
IV. Resultados	109
4.1. Factores sigma de tipo CorE (grupo ECF44). Análisis genómico	109
4.2. Estudio del clúster de <i>corE2</i> y su papel en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i> .	115
4.2.1. Análisis bioinformático del clúster de <i>corE2</i>	115
4.2.1.1. Estudio bioinformático del gen <i>MXAN_5262</i>	115
4.2.1.1.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>MXAN_5262</i>	116

4.2.1.1.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen <i>MXAN_5262</i>	118
4.2.1.2. Estudio bioinformático del gen <i>MXAN_5263 (corE2)</i>	123
4.2.1.2.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>MXAN_5263 (corE2)</i>	124
4.2.1.2.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen <i>MXAN_5263</i>	124
4.2.1.3. Estudio bioinformático del gen <i>MXAN_5264</i>	126
4.2.1.3.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>MXAN_5264</i>	126
4.2.1.3.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen <i>MXAN_5264</i>	127
4.2.1.4. Estudio bioinformático del gen <i>MXAN_5265</i>	132
4.2.1.4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen <i>MXAN_5265</i>	132
4.2.1.4.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen <i>MXAN_5265</i>	135
4.2.2. Estudio de la expresión de los genes del clúster de <i>corE2</i>	141
4.2.2.1. Análisis del perfil de expresión de los genes <i>MXAN_5262</i> , <i>MXAN_5263</i> , <i>MXAN_5264</i> y <i>MXAN_5265</i>	141
4.2.2.1.1. Obtención de las cepas JM52ZY2, JM52ZY3, JM52ZY4 y JM52ZY5	141
4.2.2.1.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa de las cepas obtenidas	141
4.2.2.2. Análisis de la expresión conjunta de los genes <i>MXAN_5262</i> , <i>MXAN_5263</i> , <i>MXAN_5264</i> y <i>MXAN_5265</i>	145
4.2.3. Estudio de la regulación de los genes del clúster de <i>corE2</i> por parte del factor sigma <i>CorE2</i>	148
4.2.3.1. Construcción de la cepa portadora de la delección en fase de la región σ_2 del gen <i>corE2</i> e introducción de la fusión transcripcional <i>5265-lacZ</i> a la misma	148
4.2.3.2 Análisis de la expresión del gen <i>MXAN_5265</i> en el mutante de delección en fase $\Delta corE2$	150
4.2.3.3. Recuperación de la expresión dependiente de metales del gen <i>MXAN_5265</i> mediante la reintroducción del gen <i>corE2</i>	151

4.2.4. Papel de los genes del clúster de <i>corE2</i> en la resistencia a metales y la formación de cuerpos fructíferos	154
4.2.4.1. Papel de los genes del clúster de <i>corE2</i> en la resistencia a metales	154
4.2.4.2. Papel de los genes del clúster de <i>corE2</i> en el ciclo de desarrollo	155
4.2.4.2.1. Construcción de las cepas mutantes JM52IF2, JM52IF4 y JM52IF5 ($\Delta 5262$, $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$, respectivamente)	156
4.2.4.2.2. Análisis del fenotipo de las cepas mutantes durante el ciclo de desarrollo	157
4.3. Investigando el mecanismo de acción de los factores sigma de tipo CorE	162
4.3.1. Estudio de la autorregulación de CorE2	162
4.3.1.1. Construcción de la cepa JM52IF3ZY3 (<i>corE2-lacZ-ΔcorE2</i>)	162
4.3.1.2. Análisis de la expresión de <i>corE2</i> en el mutante Δ <i>corE2</i>	162
4.3.2. Búsqueda del factor antisigma de CorE2	164
4.3.3. Determinación del promotor reconocido por los factores sigma del grupo ECF44	167
4.3.4. Análisis de la región rica en cisteínas de CorE2	173
4.3.4.1. Papel del CRD en el funcionamiento de CorE2	173
4.3.4.1.1. Construcción de la cepa JM52IF3DCRD (Δ <i>corE2</i> _{CRD})	173
4.3.4.1.2. Construcción de la cepa JM52IF3DCRDZY5 (<i>5265-lacZ-ΔcorE2</i> _{CRD})	176
4.3.4.1.3. Análisis de la expresión del gen <i>MXAN_5265</i> en el mutante de delección en fase Δ <i>corE2</i> _{CRD}	176
4.3.4.2. Estudio de la participación de los residuos clave del CRD en la actividad de CorE2	178
4.3.4.2.1. Construcción de cepas portadoras de mutaciones puntuales en el CRD de CorE2	178
4.3.4.2.2. Análisis del efecto de cada mutación puntual sobre la actividad de CorE2	179
4.3.5. Papel de la distribución de cisteínas en la especificidad de metales	185

4.3.6. Análisis del motivo CxC de CorE2	189
4.3.6.1. Construcción de los mutantes CorE2 ^{C108A} y CorE2 ^{C110A}	189
4.3.6.2. Análisis de la participación de las cisteínas del CxC en la actividad de CorE2	189
4.3.7. Estudio de la capacidad de unión a metales de los factores sigma de tipo CorE	191
4.3.7.1. Purificación de las proteínas CorE y CorE2	191
4.3.7.2. Estudio de la unión a metales por parte de CorE y CorE2	194
4.3.7.2.1. Estudio de la unión a metales de CorE	195
4.3.7.2.2. Estudio de la unión a metales de CorE2	203
V. Discusión	213
5.1. Factores sigma de tipo CorE	213
5.2. Estudio y caracterización del factor sigma de tipo ECF CorE2	216
5.3. Estudio del ambiente genético de <i>corE2</i>	217
5.4. Estudio del mecanismo de acción de los factores sigma de tipo CorE	223
VI. Conclusiones	233
VII. Bibliografía	237
Apéndices	263
Apéndice 1	263
Apéndice 2	264
Apéndice 3	265
Apéndice 4	267
Apéndice 5	274
Apéndice 6	289

Introducción

I. Introducción

1.1. Mixobacterias

Las mixobacterias son unas de las bacterias más complejas conocidas. Esta complejidad se debe principalmente a su inusual ciclo de vida. Estas bacterias Gram negativas están clasificadas según su secuencia de ARNr 16S como δ -proteobacterias, y filogenéticamente constituyen el orden *Myxococcales* que comprende a géneros y especies de diversa naturaleza. De este modo encontramos metabolismos que van desde las bacterias proteolíticas y bacteriolíticas (como *Myxococcus xanthus*) hasta las celulolíticas (como *Sorangium cellulosum*) y desde la aerobiosis estricta de la mayoría hasta la anaerobiosis facultativa (como *Anaeromyxobacter dehalogenans*).

Una de sus características principales es su capacidad de diferenciación en esporas de resistencia denominadas mixósporas, agrupadas en el interior de estructuras macroscópicas multicelulares llamadas cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos pueden diferir en gran medida entre los distintos miembros del orden *Myxococcales*, siendo en muchas ocasiones un factor importante para la identificación de la especie, y pudiendo ser tan complejos como los de *Stigmatella aurantiaca* o *Chondromyces apiculatus*, donde un grupo de esporangiolos se agrupan sobre un pedúnculo, dándole a los cuerpos una estructura en forma de árbol (Figura 1.1). Esta diferenciación se desencadena al encontrarse en escasez de nutrientes, de forma que las bacterias, ahora convertidas en mixósporas, entran en un estado de “hibernación” hasta que vuelve a haber nutrientes disponibles en el medio (Whitworth, 2008). Las mixósporas presentan diversas morfologías, en ocasiones provocando un señalado cambio morfológico de la estructura general en forma de bastón de estas bacterias hasta esporas completamente esféricas (como en *M. xanthus*). Estas esporas confieren a las mixobacterias resistencia a factores externos como la desecación, el calor, los ultrasonidos y la radiación (Claessen *et al.* 2014).

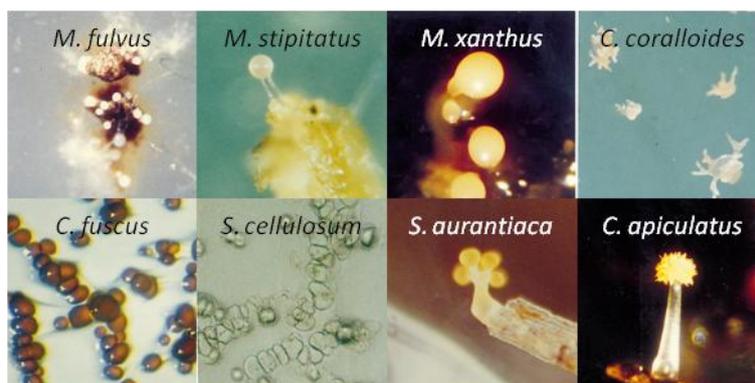


Figura 1.1. Diversidad en el grupo de las mixobacterias. Cuerpos fructíferos de algunos de los miembros más representativos de las mixobacterias: *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *M. xanthus*, *Corallocooccus coralloides*, *Cystobacter fuscus*, *S. cellulosum*, *S. aurantiaca* y *C. apiculatus* (adaptado de Dawid, 2000).

La mayoría de las mixobacterias viven en el suelo, predominantemente de climas tropicales y templados. Sin embargo, se han encontrado especies de mixobacterias en regiones de todo el mundo (Dawid, 2000). Existen mixobacterias capaces de sobrevivir en las turberas ácidas, así como algunas adaptadas a vivir a pHs superiores a 9, desde las mixobacterias psicrófilas encontradas en la Antártida hasta las que soportan temperaturas elevadas como las del desierto del Sahara, desde las alturas del Everest hasta profundidades por debajo del nivel del mar, donde habitan las mixobacterias marinas (Rückert y Heym, 1977; Rückert, 1978; Dawid, 2000; Iizuka *et al.*, 2003; Brinkhoff *et al.*, 2012; Velicer *et al.*, 2014).

Otra de las características más interesantes de las mixobacterias, y que ha suscitado un gran interés por parte de los investigadores, es su rico metabolismo secundario. La mayoría de las especies de este orden obtienen sus nutrientes mediante la depredación de otros microorganismos como bacterias u hongos (Pérez *et al.*, 2014), de modo que en su genoma poseen una batería de enzimas hidrolíticas, antibióticos, y compuestos diversos, algunos de los cuales han demostrado tener aplicaciones para tratar el cáncer y algunas enfermedades virales (Berleman y Kirby, 2009; Fleta-Soriano *et al.*, 2014; Schäberle *et al.*, 2014).

Es posible que esta complejidad metabólica y de su ciclo de vida esté relacionada con que los genomas de las mixobacterias se encuentran entre los más grandes de los procariotas. Mientras que otras bacterias, como por ejemplo *Escherichia coli*, poseen genomas de cerca de 5 Mb, el genoma de las

mixobacterias es aproximadamente el doble de grande, con tamaños como las 9,14 Mb de *M. xanthus* o las 13,03 Mb de *S. cellulosum*, conteniendo aproximadamente un cuarto del número de genes del genoma humano.

La primera mixobacteria descrita, *Cystobacter aureus*, bajo el nombre de *Polyangium vitellinum*, fue descubierta por el botánico alemán H.F. Link en 1809, quien al ver los cuerpos fructíferos la consideró un hongo (Link, 1809). Esta clasificación se mantuvo hasta casi un siglo después, en 1892, cuando el botánico americano Roland Thaxter identificó las especies descubiertas hasta la fecha como mixobacterias (Thaxter, 1892). Durante los años siguientes, y con el auge de la Biología Molecular, las mixobacterias fueron sujeto de numerosas investigaciones enfocadas a desentrañar las bases moleculares que se esconden tras el desarrollo y comportamiento multicelular y social bacteriano. Por entonces, *M. xanthus* se convirtió en la mixobacteria más estudiada y mejor descrita, pasando a ser la especie modelo de este orden.

1.2. *Myxococcus xanthus*

Pese a que *S. cellulosum* ha sido muy estudiada por su metabolismo secundario de gran interés biotecnológico, así como *S. aurantiaca* por la complejidad estructural de sus cuerpos fructíferos, *M. xanthus* es la mixobacteria más estudiada a nivel fisiológico y genético como referente de todo el orden *Myxococcales*.

M. xanthus fue descrita por primera vez por J. M. Beebe en 1941 (Beebe, 1941). Es una mixobacteria de coloración amarilla que según las condiciones ambientales puede adquirir tonalidad anaranjada o marrón. Es móvil por deslizamiento y esta movilidad es más eficiente sobre superficies sólidas. Las células vegetativas poseen la típica forma bacilar de las mixobacterias, con unas dimensiones de aproximadamente 0,7-0,8 x 4-8 μm . Durante el ciclo de desarrollo son capaces de formar cuerpos fructíferos de forma esférica u ovalada de entre 300 y 400 μm de diámetro y de coloración marrón oscura o gris que producirán mixósporas también esféricas y de 1,7-2,2 μm de diámetro.

La coloración amarillenta de esta especie viene determinada por un pigmento conocido como DKxanteno, que parece ser importante para la formación de esporas viables durante el ciclo de desarrollo (Dziewanowska *et*

al., 2014). Aún así, estas bacterias pueden adquirir una tonalidad anaranjada gracias a la producción de carotenoides. Estos carotenoides son sintetizados para proteger a las células contra el estrés fotooxidativo, y son inducidos por la luz azul (Galbis-Martínez, 2012) y por el contacto con el cobre en condiciones de temperatura subóptimas para el crecimiento (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005).

Durante la fase vegetativa del ciclo de vida de *M. xanthus*, las células crecen por bipartición mientras tengan nutrientes en el medio (Figura 1.2). En la naturaleza, estos nutrientes los obtienen mediante la depredación de otros microorganismos tanto procariotas como eucariotas, para lo cual se asocian en comunidades llamadas enjambres de elevada densidad celular para optimizar la liberación y el uso de los antibióticos y enzimas (Velicer y Vos, 2009; Pérez *et al.*, 2015). De esta forma, los enjambres “cazan” a su presa con una estrategia que en la literatura es conocida como manada de lobos por la forma en que los enjambres rodean a la colonia presa (Berleman y Kirby, 2009). Sin embargo, *M. xanthus* posee un segundo patrón de ataque frontal, en el que puede penetrar directamente en la colonia presa para lisar sus células. Recientemente se ha observado que el patrón de depredación empleado depende del tipo de presa (Pérez *et al.*, 2014). Este comportamiento, combinando tanto el ataque frontal como el ataque en manada de lobos, es propio del recién definido grupo de depredadores con estrategias de mixobacterias que incluye, aparte de las mixobacterias, a algunas especies del género *Herpetosiphon* (Pérez *et al.*, 2015)

Cuando *M. xanthus* se encuentra en escasez de nutrientes, y existe suficiente densidad celular, comienza la fase de desarrollo de su ciclo de vida (Figura 1.2). La carencia de nutrientes hace que las bacterias tengan problemas para disponer de todos los aminoácidos necesarios para la correcta síntesis de proteínas. El ciclo de desarrollo se desencadena ante la falta de ARNs de transferencia cargados con sus correspondientes aminoácidos. Como respuesta a estas condiciones se detiene la síntesis de proteínas y la célula comienza a sintetizar nucleótidos altamente fosforilados, como guanosina tetra y penta fosfato o (p)ppGpp (Harris *et al.*, 1998). En este momento, las bacterias comienzan a alinearse y a moverse formando un patrón ondulado conocido como *rippling*, que podría ser consecuencia de la lisis celular y no del propio ciclo de desarrollo (Berleman *et al.*, 2006). Durante estas primeras etapas del ciclo de desarrollo es importante la participación de la señal A, una señal extracelular que permite a *M. xanthus* percibir si hay una densidad celular

suficiente para iniciar el ciclo de desarrollo, y cuya respuesta viene regulada por el sistema de dos componentes SasSR (Guo *et al.*, 2000).

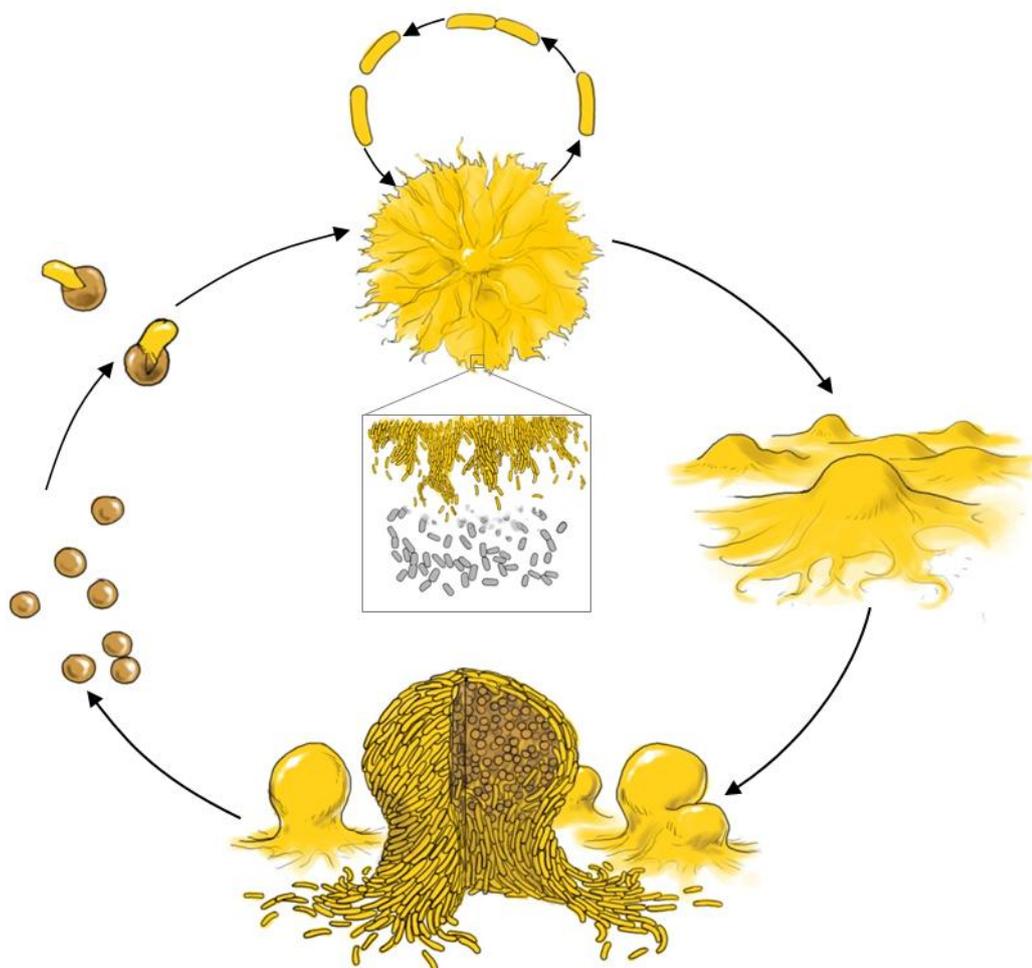


Figura 1.2. Ciclo de vida de *M. xanthus*. Los enjambres de bacterias depredan a otros microorganismos mientras se dividen por fisión binaria (ciclo vegetativo) hasta que los nutrientes se agotan y las células migran hacia unos puntos de agregación, donde forman los cuerpos fructíferos y se diferencian en mixósporas de resistencia que no germinarán hasta que vuelven a detectar nutrientes (ciclo de desarrollo). Adaptado de García-Bravo, 2015

Una vez en esta situación, dará comienzo la fase de agregación, en la que las bacterias del enjambre se asociarán para formar los centros de agregación. Hacia estos centros comenzarán a desplazarse las filas de células rodeando el núcleo central hasta formar un cuerpo fructífero de morfología esférica. En este momento parte de los bacilos que se encuentran formando este cuerpo fructífero inmaduro comenzarán la fase de esporulación, adoptando la morfología esférica y de resistencia que conocemos como mixóspora. Ante la falta de nutrientes, todas las células del enjambre expresan los genes que regulan el inicio del ciclo de desarrollo, sin embargo, los genes tardíos sólo los

expresarán aquellas que darán lugar a las mixósporas. Esta diferencia de expresión tiene lugar gracias a la señal C, otra señal extracelular que alcanza una mayor concentración en las zonas donde hay mayor densidad celular (Julien *et al.*, 2000), dejando a las células periféricas sin finalizar el proceso de esporulación. Estas células periféricas, sin embargo, también cumplen una función dentro del cuerpo fructífero al proteger a la estructura de la acción de otros microorganismos (O'Connor y Zusman, 1991; Lee *et al.*, 2012a).

Todo el proceso, desde la detección de falta de nutrientes hasta la formación de las primeras esporas, puede tardar entre 16 y 24 horas, y entre las 24 y las 48 horas ya deberían haberse formado los cuerpos fructíferos maduros. Cuando las mixósporas detectan la presencia de nutrientes en el medio tiene lugar la germinación, donde las cubiertas de la espora se romperán y las células cambiarán de nuevo su morfología a la típica forma de bastón, comenzando de nuevo el ciclo vegetativo (Otani *et al.*, 1995).

1.3. Sistemas de transducción de señales en bacterias

El menor tamaño de las bacterias con respecto a las células eucariotas les permite tener una mayor proporción superficie/volumen, lo que les proporciona una mayor exposición a su entorno, tanto a las condiciones beneficiosas como sería la adquisición de nutrientes, como a las perjudiciales como la exposición a agentes dañinos como la radiación, sustancias tóxicas o metales como el cobre, el zinc o el cadmio. Por ello, las bacterias han desarrollado multitud de mecanismos de transducción de señales para responder rápidamente a cualquier tipo de cambio ambiental y evitar o disminuir el daño celular. Estos mecanismos son muy importantes en una bacteria como *M. xanthus*, que además requiere una gran coordinación y precisión para llevar a cabo procesos tan complejos como la depredación y la formación de cuerpos fructíferos durante el ciclo de desarrollo, donde las células no sólo tienen que percibir los cambios ambientales, sino que tienen que comunicarse las unas con las otras. El gran tamaño del genoma de una bacteria suele estar relacionado con una mayor cantidad de genes reguladores y sistemas de señalización (Konstantinidis y Tiedje, 2004). En el caso de *M.*

xanthus, con 9,14 Mb, se cree que la mayoría de estos genes de señalización provienen de la duplicación y divergencia génica (Pérez et al., 2008). Estas tres características: su alta exposición a los cambios ambientales, su necesidad de comunicación para llevar a cabo su complejo ciclo de vida, y el gran tamaño de su genoma, convierten a *M. xanthus* en un buen modelo para estudiar los mecanismos de transducción de señales.

Los sistemas de transducción de señales en bacterias se han adaptado a formas muy diversas, desde la sencillez de los sistemas de un componente hasta las complejas rutas de señalización iniciadas por la acción de las proteínas quinasas de tipo eucariótico. Mientras que los sistemas más sencillos tienen un modo de acción más rápido al no tener intermediarios entre la detección y la respuesta, los más complejos permiten una mayor regulación y precisión de la respuesta al tener más elementos intermedios en la ruta de señalización.

1.3.1. Sistemas de un componente

Los sistemas de un componente, como hemos comentado anteriormente, son los más sencillos en su mecanismo de actuación, ya que no requieren de otros reguladores para ejercer su acción, es decir, la propia molécula posee un dominio sensor del estímulo y un dominio efector de unión al ADN y carecen de una histidina quinasa y/o de un dominio receptor (Ulrich et al., 2005). *M. xanthus* posee en su genoma 315 sistemas de un componente, entre los que podemos destacar el represor CarH, involucrado en la regulación de la síntesis de carotenoides (Figura 1.3).

En ausencia de luz, CarH utiliza la cobalamina (vitamina B₁₂) como ligando en forma de adenosilcobalamina (AdoB₁₂) para unirse al ADN e impedir que tenga lugar la transcripción de los genes regulados. En presencia de luz, la adenosilcobalamina sufre una fotólisis y se convierte en hidroxilcobalamina (OHB₁₂), desestabilizando la unión del represor al ADN y permitiendo que tenga lugar la expresión de los genes de síntesis de carotenoides en respuesta a la luz (Ortiz-Guerrero et al., 2011; Jost et al., 2015; Kutta et al., 2015).

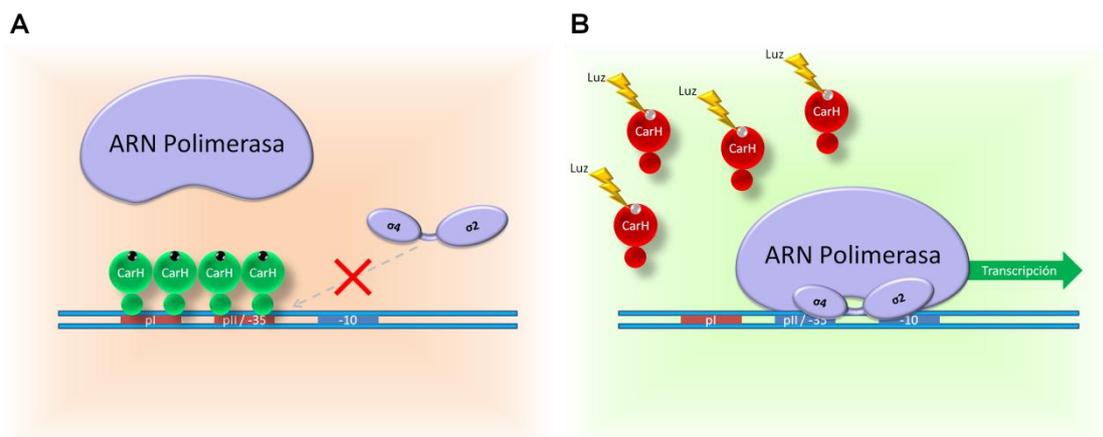


Figura 1.3. Sistemas de un componente. Funcionamiento del sistema de un componente de *M. xanthus* CarH. Cuando el regulador se encuentra activo se une al ADN e impide la unión de la subunidad sigma de la ARN polimerasa (A). Al entrar en contacto con la luz esta unión se desestabiliza y puede comenzar la transcripción desde su promotor (B).

1.3.2. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes suponen un sistema de regulación más complejo en el que el dominio sensor del estímulo y el dominio efector de unión al ADN se encuentran en dos proteínas distintas, denominadas en la mayoría de los casos histidina quinasa y regulador de respuesta, respectivamente.

En el caso de las bacterias Gram negativas, las histidina quinasa se encuentran normalmente como dímeros anclados a la membrana citoplasmática con su dominio sensor hacia el espacio periplásmico y el dominio quinasa en el citoplasma. Por su parte, el regulador de respuesta suele ser una proteína citoplasmática que consta de un dominio receptor y un dominio efector (Perry *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012). Al detectar el estímulo por el dominio sensor, la histidina quinasa se autofosforila en un residuo de histidina de su dominio catalítico y posteriormente esta señal es transmitida al regulador de respuesta, fosforilándolo en un residuo de ácido aspártico de su dominio receptor.

En el genoma de *M. xanthus* hay codificados más de 119 sistemas de dos componentes. Uno de estos sistemas es CorSR, un sistema de dos componentes que se encuentra regulando nueve genes de la región del cobre 1 de *M. xanthus* y que está implicado en el mantenimiento de la resistencia a este metal (Sanchez-Sutil *et al.*, 2013) (Figura 1.4). La histidina quinasa CorS a través de su

dominio sensor es capaz de detectar el cobre presente en el espacio periplásmico, reforzando la dimerización del regulador y transmitiendo así la señal al dominio catalítico de la histidina quinasa (resultados sin publicar). Por su parte, el regulador de respuesta CorR es una *Enhancer Binding Protein* (EBP), un tipo de proteína activadora que media la respuesta en los promotores de los factores sigma 54 al unirse a la secuencia UAS (*Upstream Activation Sequence*) aguas arriba del promotor (Dworkin *et al.*, 1997; Bush y Dixon, 2012; Samuels *et al.*, 2013).

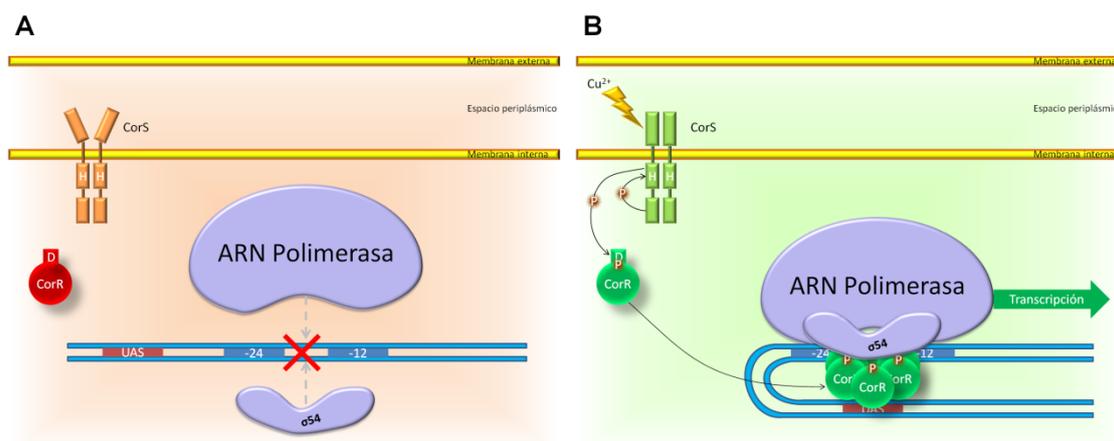


Figura 1.4. Sistemas de dos componentes. Funcionamiento del sistema de dos componentes de *M. xanthus* CorSR. Cuando el regulador se encuentra inactivo no puede tener lugar la unión de la subunidad sigma 54 de la ARN polimerasa (A). Al detectar cobre se produce un cambio conformacional que refuerza la dimerización de la histidina quinasa CorS favoreciendo su activación, y el regulador de respuesta CorR se une al ADN permitiendo la transcripción de los genes de resistencia al cobre (B).

1.3.3. Proteínas quinasa de tipo eucariótico (ELPK)

El sistema formado por las proteínas quinasa de tipo eucariótico y las fosfatasa es probablemente el más complejo de todos ya que participan un mayor número de componentes en su ruta de transducción de señales, permitiendo ajustar adecuadamente la respuesta al estímulo mediante la regulación independiente de todas las proteínas implicadas. Pese a que en un inicio se pensaba que estos mecanismos sólo estaban presentes en eucariotas, tras su inicial descubrimiento en *M. xanthus* y la secuenciación de numerosos genomas bacterianos se han podido encontrar en aproximadamente dos tercios de las especies procariontas secuenciadas (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2008).

Estas rutas están dominadas por proteínas quinasa que al detectar el estímulo al que responden se fosforilan de manera reversible en sus residuos de serina, treonina y/o tirosina para activarse, y una vez activadas utilizan su dominio quinasa para fosforilar un sustrato e iniciar una cascada de señalización que terminará provocando una respuesta específica al estímulo. Finalmente esta ruta de señalización es inactivada por una fosfatasa que desfosforila las proteínas fosforiladas por la quinasa (Inouye *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2014; Dworkin, 2015). Este tipo de sistemas de transducción de señales suele estar implicado en las bacterias en procesos como esporulación, desarrollo, virulencia, adaptación al estrés y otros procesos que requieren de un alto grado de precisión en su respuesta, de modo que no es de extrañar que este tipo de proteínas quinasa sean muy abundantes en bacterias con comportamiento multicelular como las mixobacterias (Pérez *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011).

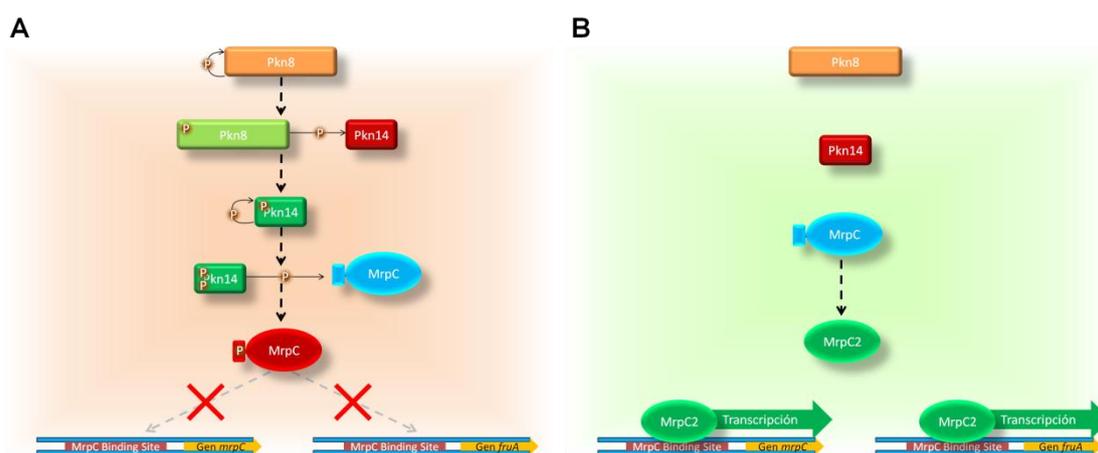


Figura 1.5. Proteínas quinasa de tipo eucariótico (ELPK). Ruta de transducción de señales de las quinasa de tipo eucariótico Pkn8 y Pkn14 de *M. xanthus*. Cuando Pkn8 se autofosforila es capaz de fosforilar a Pkn14 y éste, tras una autofosforilación, transfiere el grupo fosfato al regulador transcripcional MrpC, que una vez fosforilado no es capaz de iniciar la transcripción de los genes del desarrollo (A). Cuando Pkn8 se mantiene inactivo, Pkn14 también permanece sin fosforilar, y esto permite que MrpC sea procesado hasta MrpC2 e inicie la transcripción de los genes del desarrollo (B).

M. xanthus codifica 100 quinasa de tipo eucariótico, mientras que otras especies, como *E. coli* carecen de este tipo de reguladores. Un ejemplo de ruta llevada a cabo por estas proteínas es la de las quinasa Pkn8 y Pkn14 de *M. xanthus* (Figura 1.5). Ambas se encargan de regular los activadores transcripcionales MrpC y FruA esenciales para la formación de cuerpos

fructíferos y para la esporulación. Durante el desarrollo, el regulador MrpC es procesado para convertirse en MrpC2, su forma más activa, capaz de unirse activando los promotores de *mrpC* y *fruA*. Durante el crecimiento vegetativo, Pkn8 se activa autofosforilándose, fosforilando posteriormente a Pkn14, que tras autofosforilarse fosforila a MrpC. MrpC es inactivo cuando está fosforilado, de modo que se inhibe la transcripción de los genes reguladores del desarrollo *mrpC* y *fruA* (Inouye *et al.*, 2008).

1.3.4. Factores sigma

El cuarto tipo de mecanismo de transducción de señales está representado por los factores sigma de tipo ECF (*Extracitoplasmic Function*). Estos reguladores responden a estímulos del entorno interviniendo de forma directa en la transcripción de los genes regulados. El núcleo de la ARN polimerasa bacteriana, formado por dos subunidades α , una β , una β' y una ω , necesita de una subunidad adicional llamada factor sigma para iniciar la transcripción. Sin esta subunidad, el núcleo de la ARN polimerasa es capaz de llevar a cabo las funciones de transcripción, elongación y terminación, pero no puede iniciar la transcripción por sí mismo. Este factor sigma reconoce el promotor tras asociarse con el núcleo de la ARN polimerasa formando la holoenzima ARN polimerasa, capaz de iniciar la transcripción desde el promotor (Lee *et al.*, 2012b). Los factores sigma de tipo ECF son un tipo de factor sigma especializado encargado de reconocer específicamente los promotores de ciertos genes. Este reconocimiento, mediante diversos mecanismos que serán discutidos más adelante, sólo tendrá lugar bajo el estímulo que requiera la expresión de los genes regulados (Mascher, 2013).

Los factores sigma son muy diversos, de modo que para comprender mejor el funcionamiento de estos mecanismos de transducción de señales haremos un breve repaso a los distintos miembros que forman parte de los factores sigma. En la actualidad se conocen dos familias de factores sigma: σ^{54} y σ^{70} . Pese a que los factores σ^{54} y σ^{70} son muy similares en su función general, no comparten ningún dominio ni estructura entre sí (Merrick, 1993). Mientras que los factores σ^{70} reconocen las dos regiones promotoras típicas en bacterias situadas a -10 y -35, los promotores reconocidos por los factores σ^{54} se encuentran situados en las posiciones -12 y -24.

1.3.4.1. Factores σ^{54}

Aunque los factores σ^{54} son capaces de reconocer su promotor por sí solos, no pueden iniciar la transcripción en ausencia de un factor activador del tipo EBP unido a la secuencia UAS situada aproximadamente a 100-150 pares de bases del promotor (Ghosh *et al.*, 2010). Los factores σ^{54} están presentes en aproximadamente un 60% de los procariotas, aunque rara vez suele haber más de un regulador de este tipo (Wigneshweraraj *et al.*, 2008).

Los factores σ^{54} estructuralmente se dividen en tres regiones (Figura 1.6). La región I, de 25 a 50 aminoácidos, es la encargada de interactuar con las proteínas activadoras y de unirse a la región -12. La región II, de 60 a 110 aminoácidos, puede o no estar presente, y es muy variable entre grupos. En la región III, de aproximadamente 400 aminoácidos, podemos destacar una zona de unión a la ARN polimerasa al comienzo de la región, y otra de unión al ADN al final de la misma. En la región de interacción con el ADN, encontramos el X-link, un motivo que se entrelaza al ADN del promotor, el motivo HTH (*Helix-Turn-Helix*) de unión al ADN, y la caja RpoN, un motivo muy conservado dentro de los factores σ^{54} , situado en el extremo carboxilo de la proteína, encargado del reconocimiento del promotor (Cannon *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996; Burrows *et al.*, 2004; Bose *et al.*, 2008).

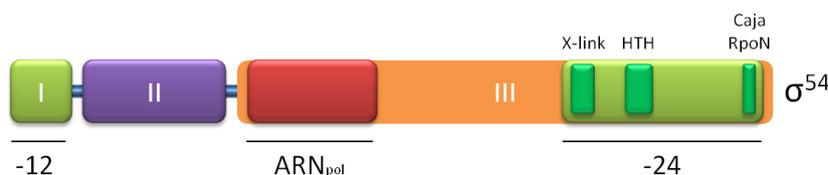


Figura 1.6. Estructura de los factores σ^{54} . En verde están señaladas las regiones de unión al ADN y en rojo las de unión al núcleo de la ARN polimerasa.

En *M. xanthus*, al igual que en otras bacterias, sólo hay un factor σ^{54} , pero mientras que en otras bacterias estos factores sigma se encuentran regulando procesos no esenciales muy diversos como la fijación de nitrógeno, el transporte de dicarboxilato y la síntesis o degradación de diversos compuestos (Merrick, 1993), en esta mixobacteria el único regulador σ^{54} es esencial para el crecimiento vegetativo de la bacteria (Keseler y Kaiser, 1997).

1.3.4.2. Factores σ^{70}

Los factores σ^{70} poseen cuatro dominios bien caracterizados (σ_1 , σ_2 , σ_3 y σ_4) que a su vez pueden dividirse en otras subregiones, aunque su presencia varía entre los miembros de los cuatro grupos en los que se divide esta familia de reguladores. La región 1 es la menos conservada y es característica de los factores sigma del grupo I y algunos del grupo II. Esta región puede a su vez dividirse en las subregiones 1.1 y 1.2. La subregión 1.1 parece funcionar como inhibidor de la unión al ADN en los factores sigma libres del núcleo de la ARN polimerasa (Österberg *et al.*, 2011). La subregión 1.2, por su parte, interacciona con una región rica en G+C llamada “discriminador” que se encuentra aguas abajo de la región -10 del promotor, y que dependiendo del tipo de secuencia y la fuerza de la interacción reprime o activa la transcripción (Haugen *et al.*, 2008). Entre la región 1 y 2 normalmente encontramos una región de tamaño variable no conservada llamada NCR (*Non-Conserved Region*) (Figura 1.7).

La región 2 está presente en todos los factores σ^{70} y es la más conservada de todas. En términos generales, es la región encargada de unirse al núcleo de la ARN polimerasa y a la posición -10 del promotor. Puede dividirse en cuatro subregiones que van desde la 2.1 hasta la 2.4 (Figura 1.7). Las subregiones 2.1 y 2.2 son importantes para unirse al núcleo de la ARN polimerasa (Wilson y Lamont, 2006), la subregión 2.3 es la encargada de separar las dos hebras de ADN en el punto de inicio de la transcripción y la 2.4 es la encargada de reconocer la secuencia promotora en la posición -10 (Österberg *et al.*, 2011). En algunos factores sigma se ha identificado una subregión 2.5 encargada de reconocer la secuencia espaciadora del promotor en las posiciones de -14 a -16, que parece marcar una diferencia clave entre el mecanismo de acción de los factores sigma del grupo I y del grupo II (Typas y Hengge, 2006).

La región 3 sólo está presente en los factores sigma de los grupos I, II y III, y se subdivide en tres subregiones: la 3.0, la 3.1 y la 3.2 (Figura 1.7). La subregión 3.0 es capaz de reconocer un elemento promotor -10 extendido en caso de estar presente (Koo *et al.*, 2009a y b). La subregión 3.1 contiene un motivo HTH que podría participar en conjunto con la subregión 3.0 en la unión al ADN, mientras que la subregión 3.2 es importante para la unión del factor sigma al núcleo de la ARN polimerasa (Lonetto *et al.*, 1992; Wösten, 1998).

Al igual que la región 2, la 4 suele estar presente en todos los tipos de factores σ^{70} . Es la región encargada de reconocer la secuencia -35 del promotor,

y a su vez se divide en las subregiones 4.1 y 4.2 (Figura 1.7). La subregión 4.1 es capaz de unirse a activadores de la transcripción u otro tipo de reguladores como los factores antisigma cuando éstos están presentes, mientras que la subregión 4.2 es específicamente la responsable de reconocer la secuencia promotora en posición -35 (Wösten, 1998; Sharma y Chatterji, 2006).

Basándose en estas diferencias estructurales y en su función, la familia de factores σ_{70} está dividida en cinco grupos (Helmann, 2002), y son los factores sigma de los grupos III y IV (antiguamente englobados en el grupo III) los que son conocidos como factores sigma alternativos.

Factores sigma primarios o esenciales (Grupo I)

El grupo I engloba a los llamados factores sigma primarios, responsables de la transcripción de la mayoría de genes esenciales que se expresan durante el crecimiento exponencial. Los factores sigma del grupo I típicamente poseen 4 dominios (σ_1 , σ_2 , σ_3 y σ_4) y la región no conservada entre los dominios σ_1 y σ_2 (Figura 1.7). La mayoría de bacterias sólo poseen un factor sigma de este tipo y están muy conservados, realizando funciones similares, si no idénticas (Gruber y Bryant, 1996). La secuencia reconocida por este grupo también está muy conservada, uniéndose al hexámero TTGACA en la posición -35 y a TATAAT en -10, con un espaciador entre ambas de 16 a 18 nucleótidos, aunque se ha comprobado que puede iniciarse la transcripción desde promotores de factores sigma primarios que carecen de la región -35, siempre que posean un elemento promotor -10 extendido TGnTATAAT (Kumar *et al.*, 1993). El factor sigma primario o esencial de *M. xanthus*, SigA, fue originalmente descrito en 1982 (Rudd y Zusman, 1982), aunque no fue identificado como tal hasta varios años más tarde (Kroos e Inouye, 2008). Este promotor reconoce la secuencia consenso típica en -35, pero sin embargo la región -10 no está tan conservada en esta bacteria, siendo más rica en G y C.

Factores sigma no esenciales de tipo primario (Grupo II)

Los factores σ_{70} del grupo II, también llamados factores sigma no esenciales de tipo primario, son muy similares estructuralmente a los del grupo I. Sin embargo, los genes que regulan no son esenciales para la viabilidad celular. Según su función, a su vez, pueden agruparse en tres subgrupos: factores sigma de fase estacionaria, factores sigma de cianobacterias y factores sigma de bacterias Gram positivas ricas en G+C (Gruber y Bryant, 1996).

Los factores sigma de fase estacionaria son aquellos similares al factor sigma RpoS de *E. coli*. Este factor sigma responde a diferentes situaciones de estrés, como es la entrada del cultivo en la fase estacionaria, el estrés oxidativo o el choque térmico. Los genes regulados por RpoS codifican proteínas de diversas funciones involucradas en la prevención y reparación de daños al ADN, en la morfología celular, la regulación de los genes de virulencia, la osmoprotección y la termotolerancia, entre otras. La similitud estructural entre RpoS y el factor sigma primario de *E. coli* RpoD hace que RpoS pueda unirse a la secuencia promotora reconocida por RpoD. Es por ello que *E. coli* posee una compleja regulación de ambos factores sigma para que puedan ejercer su función dependiendo del estado celular (Hengge-Aronis, 2002).

Los factores sigma del grupo II de las cianobacterias se agrupan en los alineamientos formando un grupo compacto y se considera que están involucrados en los ritmos circadianos y la fase post-exponencial de estas bacterias (Gruber y Bryant, 1996).

Por último, los factores sigma del grupo II de las bacterias Gram positivas de alto contenido en G+C comprenden al grupo más variado de factores sigma, y parecen estar involucrados en funciones muy diversas tales como el metabolismo secundario de bacterias productoras de antibióticos como *Streptomyces coelicolor* (Fuji *et al.*, 1996).

En *M. xanthus* se pensaba que no existía ningún factor sigma del grupo II. Sin embargo, se vio que el factor sigma SigD tenía una estructura muy similar a SigA, así como a RpoS de *E. coli*. El motivo por el cual no se consideraba parte del grupo II de factores sigma es porque carece de la región 1.1, presente sólo en los factores sigma del grupo I y del grupo II, así como de parte de la región 3.1 que está presente en los grupos del I al III (Ueki e Inouye, 1998). Sin embargo, funcionalmente se trata de un factor sigma de fase estacionaria, ya que su participación es crucial durante esta fase del crecimiento. Además, parece estar implicado en la producción de las señales A y C durante el desarrollo, denotando la importancia de este factor sigma durante la escasez de nutrientes (Viswanathan *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta la similitud estructural con RpoS, pese a la falta de algunas regiones, y su importancia durante la fase estacionaria, se puede concluir que SigD es un factor sigma perteneciente al grupo II.

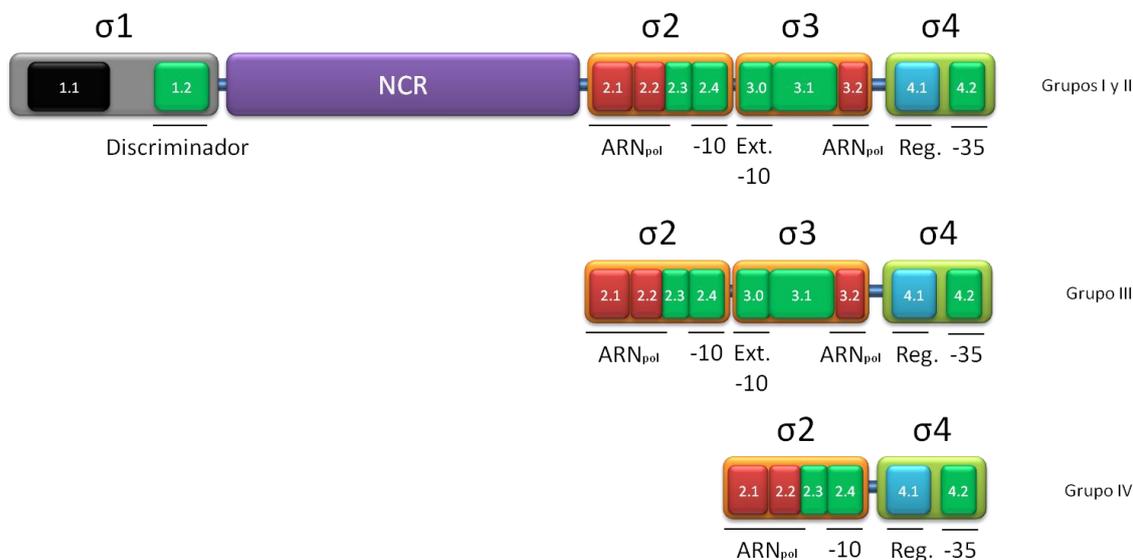


Figura 1.7. Estructura de los factores σ_{70} . Estructura de los grupos representantes de los factores sigma-70. En azul están señaladas las regiones de unión a reguladores, en verde las de unión al ADN y en rojo las de unión al núcleo de la ARN polimerasa.

Factores sigma flagelares, de choque térmico o esporulación (Grupo III)

El grupo III es el primer grupo de factores sigma alternativos, está estructuralmente más distanciado de los grupos I y II, ya que sólo conserva los dominios σ_2 , σ_3 y σ_4 (**Figura 1.7**). Los miembros del grupo III suelen a su vez agruparse en subgrupos funcionales como factores sigma flagelares, de choque térmico o esporulación.

En la síntesis de flagelos participan multitud de genes, por lo que este proceso requiere de varios grados de regulación. Los genes de clase 1 regulan positivamente a los de la clase 2, y éstos últimos son los encargados de las primeras etapas de la construcción del cuerpo basal del flagelo. Entre los genes de clase 2 es donde se encuentran los factores sigma del grupo III encargados de la síntesis del flagelo, ya que éstos se encuentran regulando la síntesis de los genes de clase 3 (Helmann, 1991). Los productos de los genes encargados de la construcción del cuerpo basal actúan también como represores del factor sigma hasta que se la formación del cuerpo basal se haya completado (Brown y Hughes, 1995).

Los factores sigma de choque térmico responden a estreses ambientales diversos mediante las proteínas de choque térmico, que actúan reparando y previniendo los daños provocados a la célula (Hecker *et al.*, 1996). El factor sigma modelo para el subgrupo de factores sigma de choque térmico es el factor σ^{32} o RpoH de *E. coli*. En ausencia de condiciones de estrés, RpoH se encuentra interaccionando con DnaK y este complejo es inmediatamente degradado por una metaloproteasa. Al aumentar la temperatura, DnaK se une a las proteínas desnaturalizadas en lugar de a RpoH, ya que tiene una mayor preferencia por ellas, por lo que RpoH es liberado y puede activar los genes de respuesta al choque térmico (Gamer *et al.*, 1996; El-Samad *et al.*, 2005).

Los factores sigma de esporulación intervienen a distintos niveles en la regulación de la formación de las esporas en bacterias capaces de formar estas células de resistencia en géneros como *Bacillus*, *Clostridium* o *Streptomyces*. Se han identificado hasta cinco factores sigma que intervienen en la esporulación de *B. subtilis*: σ^H , que interviene en las últimas etapas del crecimiento exponencial y que es necesario para que comience la esporulación, σ^F y σ^G , que actúan al nivel de la espora en las primeras y últimas fases de la esporulación, respectivamente, y σ^E y σ^K , que actúan regulando la esporulación en las etapas temprana y tardía de este proceso, respectivamente (Molle *et al.*, 2003; de Hoon *et al.*, 2010; McKenney *et al.*, 2013).

En *M. xanthus* hay 5 factores sigma pertenecientes al grupo III: SigB, SigC, SigE, SigF y SigG. Los factores sigma SigB, SigC y SigE parecen tener una gran similitud a la secuencia consenso denominada caja RpoH conservada en los factores sigma de choque térmico, sin embargo, no parecen inducirse ante un choque térmico ni activar la transcripción de proteínas de choque térmico, pero sí parecen estar involucrados en la esporulación y la diferenciación celular (Apelian e Inouye, 1990; Ueki e Inouye, 2001). SigF, por su parte, parece estar implicado en la movilidad social (Ueki *et al.*, 2005), mientras que SigG se cree que puede estar regulando algún tipo de sistema de secreción de tipo III de función desconocida (Kroos e Inouye, 2008).

Factores sigma de tipo ECF (Grupo IV)

El grupo IV engloba a los factores sigma de tipo ECF (*ExtraCitoplasmic Function*), sobre los que profundizaremos más adelante. Este grupo estaba incluido con anterioridad en el grupo III, sin embargo, debido a sus diferencias con el resto de miembros del grupo fueron catalogados como un grupo aparte.

Estructuralmente se diferencian del resto de los grupos anteriores por conservar únicamente los dominios σ_2 y σ_4 (Figura 1.7). Estos factores sigma se caracterizan por responder a estímulos extracitoplasmáticos y regular genes de función extracitoplasmática, aunque cada vez más se está observando que algunos miembros de este grupo tienen funciones mucho más amplias (Gruber y Gross, 2003). Debido a la diversidad de estímulos a los que responden, los factores sigma de tipo ECF suelen ser los factores σ_{70} más abundantes en el genoma de las bacterias, especialmente en las más complejas.

La mayoría de los factores sigma de tipo ECF comparten tres generalidades en cuanto a su modo de acción. La primera es que su actividad viene regulada por un factor antisigma anclado a la membrana que secuestra al factor sigma impidiendo su unión al ADN hasta la llegada del estímulo. La segunda es que se unen en la posición -35 del promotor a una secuencia "AAC", y, por último, la transcripción de la mayoría de genes que codifican para un factor sigma de tipo ECF está regulada por ellos mismos (Mascher, 2013). En *M. xanthus* podemos encontrar 46 factores sigma de tipo ECF (Abellón-Ruíz *et al.*, 2014; Muñoz-Dorado *et al.*, 2014), de los cuales se han descrito sólo CarQ, EcfA, RpoE y CorE. CarQ se encuentra regulando la síntesis de carotenoides (Elías-Arnanz *et al.*, 2008), EcfA interviene en la expresión de algunos genes del estadio temprano del desarrollo (Kroos e Inouye, 2008), RpoE está relacionado con la movilidad tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el desarrollo (Ward *et al.*, 1998) y CorE regula la transcripción de genes de resistencia al cobre (Gómez-Santos *et al.*, 2011; Muñoz-Dorado *et al.*, 2012).

CarQ se encuentra entre los primeros factores sigma de tipo ECF descritos y es el mejor caracterizado (Lonetto *et al.*, 1994). Este factor sigma se activa en presencia de luz azul produciendo carotenoides para proteger a la célula del daño foto-oxidativo mediante un sistema de factor sigma, antisigma y anti-antisigma codificados por el operón *carQRS* y el gen *carF* (Elías-Arnanz *et al.*, 2008). En ausencia de luz, CarQ se encuentra secuestrado físicamente por el factor antisigma CarR, una proteína de membrana que se desestabiliza en presencia de luz azul (Figura 1.8).

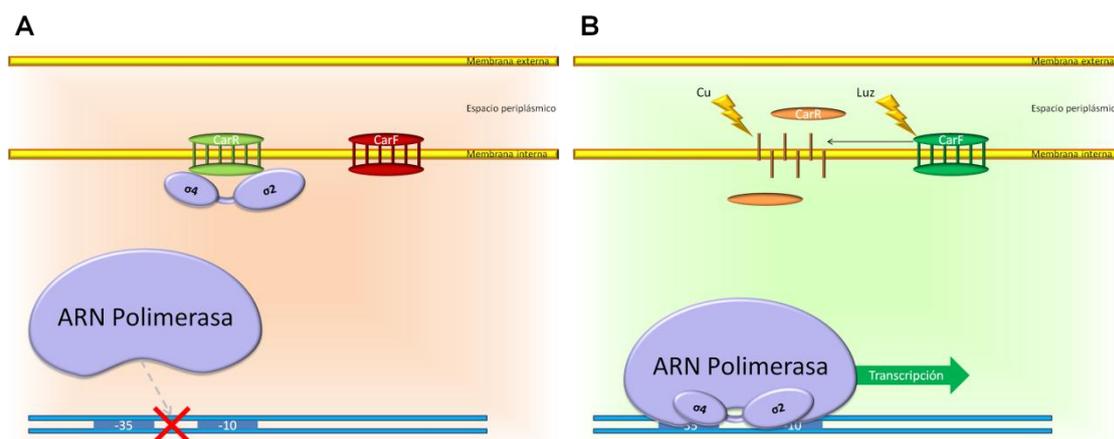


Figura 1.8. Factores sigma de tipo ECF. Modelo del funcionamiento típico de un factor sigma regulado por un factor antisigma y un factor anti-antisigma (CarQ de *M. xanthus*). En ausencia de estímulos el factor sigma CarQ se encuentra secuestrado por su antisigma CarR, impidiendo que se una al promotor (A). Tras la incidencia de la luz, el anti-antisigma CarF se activa, desestabilizando a CarR y liberando con ello al factor sigma CarQ, que ahora será capaz de unirse al ADN. Alternativamente el cobre es capaz de desestabilizar la unión de CarR a CarQ (B).

Sin embargo, la detección de la luz no se realiza de forma directa, sino que es percibida por la protoporfirina IX que, al excitarse por la luz, genera oxígeno singlete que es el estímulo necesario para la expresión del sistema CarQRS (Galbis-Martinez *et al.*, 2012). Este estímulo es detectado por el factor anti-antisigma CarF, una proteína de membrana que interacciona físicamente con el antisigma CarR provocando su eliminación para que el factor sigma CarQ quede libre (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Además, la inactivación de CarR puede llevarse a cabo también en respuesta al cobre de una manera independiente de CarF y de la luz (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005) (Figura 1.8).

1.4. Factores sigma de tipo ECF

Los factores sigma de tipo ECF, como hemos comentado antes, pertenecen al grupo IV de los factores sigma, y son los factores sigma más pequeños ya que sólo conservan las regiones 2 y 4 de su estructura para unirse a las regiones -10 y -35 del promotor respectivamente. Debido a su simplicidad estructural y a su carencia general de dominios reguladores, la mayoría de estos factores sigma requieren de un factor antisigma que module su actividad, generalmente inhibiéndola.

El factor antisigma es una proteína transmembrana que tiene una gran afinidad por el factor sigma, de modo que en ausencia de estímulo, el factor sigma se encuentra secuestrado por el antisigma. Este factor antisigma tiene un dominio sensor que al detectar el estímulo libera al factor sigma permitiendo su unión al núcleo de la ARN polimerasa y a la secuencia promotora para que se inicie la transcripción de los genes de respuesta a ese estímulo. Los factores sigma y antisigma generalmente se cotranscriben para que su proporción siempre se mantenga 1:1, de forma que no quede factor sigma sin secuestrar en ausencia de estímulo (Missiakas y Raina, 1998; Ho y Ellermeier, 2012). Sin embargo, en esta relación sigma-antisigma pueden intervenir otras proteínas como los anti-antisigmas o los co-antisigmas que inhiben o activan a los antisigmas, respectivamente.

A continuación, comentaremos los distintos modos de regulación descritos hasta el momento para modular la actividad de los factores sigma de tipo ECF. Según sus mecanismos de activación y estructura, los factores sigma se han agrupado en 50 grupos (Mascher, 2013), aunque es posible que en un futuro este número aumente, ya que no todos los factores sigma de tipo ECF se pueden englobar en uno de estos grupos.

1.4.1. Dependientes de factor antisigma

1.4.1.1. No caracterizados con un factor antisigma putativo

Debido a la diversidad de estímulos y mecanismos de señalización existentes en los factores sigma de tipo ECF, así como las rutas de señalización que involucran varios tipos de sistemas de transducción de señales, hay una gran cantidad de factores sigma de tipo ECF cuyo mecanismo de activación aún no ha sido descrito o demostrado experimentalmente. Para algunos de ellos se ha encontrado un antisigma putativo o experimental, pero no se ha determinado su mecanismo de acción. Es muy probable que muchos de estos factores sigma desvelen nuevos mecanismos de regulación muy distintos a los observados hasta el momento (Mascher, 2013). Entre los grupos para los que se ha designado un factor antisigma putativo, pero se desconoce el mecanismo de acción por el cual se encuentran regulados encontramos a los grupos ECF18-19, con un antisigma de estructura muy conservada; los ECF23, ECF21 y ECF25,

donde los dos últimos también conservan un antisigma de características muy similares; el grupo de los ECF26, muy grande y diverso con tres arquitecturas de factores antisigma descritas; el heterogéneo grupo ECF30, donde aproximadamente la mitad de los miembros funcionarían con un antisigma mientras que la otra mitad tendrían otro mecanismo de acción; y finalmente los grupos ECF27-28, ECF31, ECF33-35, ECF37-38 y ECF40 (Starón *et al.*, 2009).

No obstante, para algunos factores sigma de tipo ECF sí se ha descrito su mecanismo de activación e inactivación dependiente de un factor antisigma. En base a algunos de sus rasgos comunes, los distintos grupos se han clasificado a su vez en distintos tipos de factores sigma de tipo ECF dependientes de factor antisigma que describiremos brevemente a continuación.

1.4.1.2. Regulados por proteólisis del factor antisigma anclado a la membrana

Este tipo de mecanismo de regulación es el más común y abundante entre los factores sigma de tipo ECF, así como el más estudiado. Engloba a los grupos del 1 al 4, también llamados factores sigma de tipo RpoE_{Eco}, por su parecido a σ^E de *E. coli*, encargado de mantener la integridad de la membrana en condiciones de estrés. El mecanismo es básicamente el descrito anteriormente, en el que un factor antisigma anclado a la membrana, tras la detección del estímulo, libera al factor sigma (Figuras 1.8 y 1.9). En *E. coli* el factor antisigma RseA sufre una serie de procesos proteolíticos en los que se corta primero el dominio periplásmico, y posteriormente su única hélice transmembrana, liberando el dímero sigma-antisigma al citoplasma, donde la porción citoplasmática del antisigma sufrirá un tercer paso de degradación por la proteasa ClpXP (Chaba *et al.*, 2007). En este caso, la porción sensora de este sistema de transducción de señales sería la proteasa DegS encargada de degradar la porción periplásmica, que detecta las porinas de membrana externa (OMP) mal plegadas, iniciando así su actividad catalítica. Además, un segundo regulador, RseB, encargado de fortalecer la afinidad de RseA por RpoE, debe liberar al factor antisigma para obtener una respuesta completa (Egler *et al.*, 2005; Chaba *et al.*, 2011). Los factores sigma del grupo ECF17 o de tipo SigU también podrían actuar del mismo modo (Mascher, 2013).

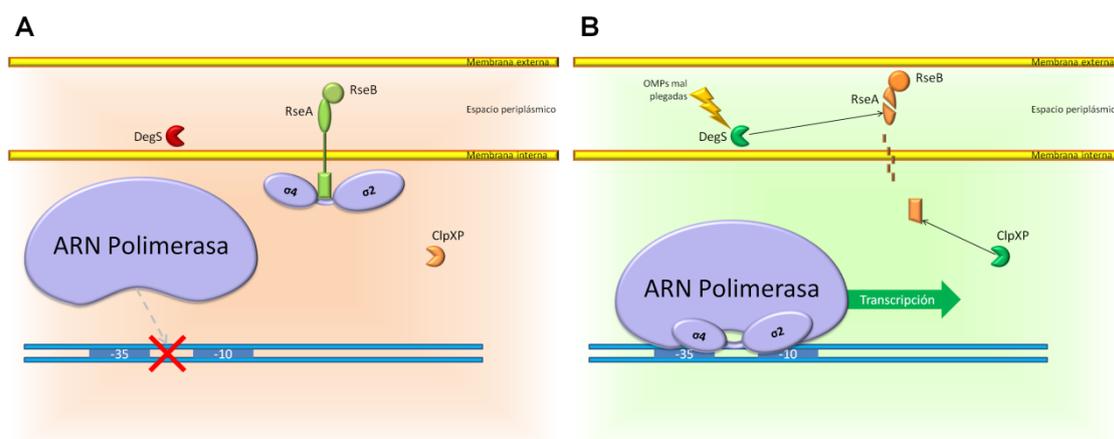


Figura 1.9. Factor sigma regulado por proteólisis del antisigma anclado a la membrana. Modelo del funcionamiento del factor sigma RpoE de *E. coli*. En condiciones normales el factor sigma RpoE se encuentra secuestrado por su antisigma RseA, impidiendo que se una al promotor (A). Tras detectar proteínas de membrana mal plegadas, la proteasa DegS degrada la porción periplásmica de RseA, mientras que ClpXP degrada la porción citoplásmica permitiendo la liberación del factor sigma RpoE y su unión al ADN (B).

1.4.1.3. Regulados por cambio conformacional del factor antisigma

La liberación del factor sigma por parte de un factor antisigma no siempre es por degradación de este último. Algunos factores antisigma, tras detectar el estímulo, sufren un cambio conformacional que disminuye su afinidad por el factor sigma, liberándolo e iniciando la transcripción de los genes que regula. Este es el caso del sistema CnrXYH de *Cupriavidus metallidurans* (ECF20) (Figura 1.10), donde la proteína sensora CnrX detecta cobalto y níquel en el espacio periplásmico y provoca un cambio conformacional en el antisigma CnrY que hace que se libere el factor sigma CnrH encargado de regular la transcripción de los genes de resistencia a metales (Trepeau *et al.*, 2011; Maillard *et al.*, 2015). Los factores antisigma del grupo ECF16 podrían actuar de forma similar mediante un factor antisigma con seis dominios transmembrana (Masloboeva *et al.*, 2012).

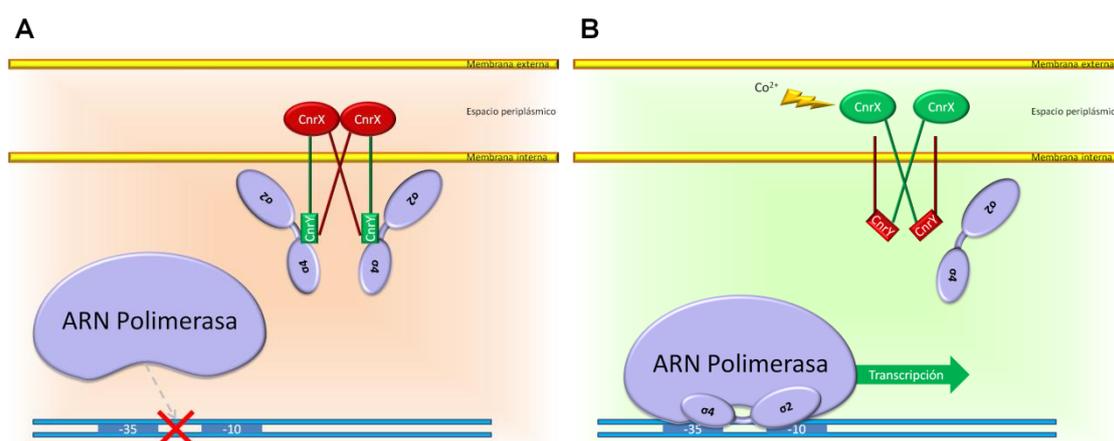


Figura 1.10. Factor sigma regulado por cambio conformacional del factor antisigma. Modelo del funcionamiento del sistema CnrXYH de *C. metallidurans*. En ausencia del metal, el factor sigma CnrH se encuentra secuestrado por el complejo que actúa como factor antisigma CnrXY, impidiendo su unión al promotor (A). Tras detectar níquel o cobalto, la proteína sensora CnrX provoca un cambio estructural que termina liberando al factor sigma para que tenga lugar la transcripción de los genes de resistencia a metales (B).

Una pequeña proporción de factores antisigma, sin embargo, no se encuentran anclados a la membrana, sino que se encuentran en su forma soluble en el citoplasma. Estos factores antisigma son muy similares en secuencia a los de los grupos ECF1-4, pero la liberación del factor sigma tiene lugar por un cambio conformacional en lugar de por degradación del factor antisigma. Este tipo de mecanismo tiene lugar en los factores sigma de los grupos ECF11 al ECF14 (Mascher, 2013), donde uno de los mecanismos mejor estudiados es el sistema sigma-antisigma SigR-RsrA de *S. coelicolor* (ECF12). En este sistema, los genes de resistencia al estrés oxidativo se encuentran bajo el control del factor sigma SigR, que en condiciones normales se encuentra secuestrado a nivel del citoplasma por el factor antisigma RsrA. RsrA es una proteína con un elevado contenido en cisteínas que parecen ser las encargadas de detectar el estado redox de la célula. En condiciones de estrés oxidativo, las cisteínas de RsrA forman puentes disulfuro que provocan un cambio en la estructura de la molécula que hace que el factor sigma sea liberado (Jung *et al.*, 2011).

1.4.1.4. Regulados por cascadas de interacción proteína-proteína

Algunas rutas de señalización involucradas en la liberación del factor sigma por parte de su antisigma pueden venir dadas por una cascada de interacciones proteína-proteína desde la proteína sensora al factor antisigma. Este es el caso del sistema FecI/FecR de toma de hierro que engloba a los grupos ECF5 hasta el ECF9, y el grupo ECF10, que sigue un sistema similar pero que se encuentra regulando la toma y degradación de polisacáridos complejos (Figura 1.11).

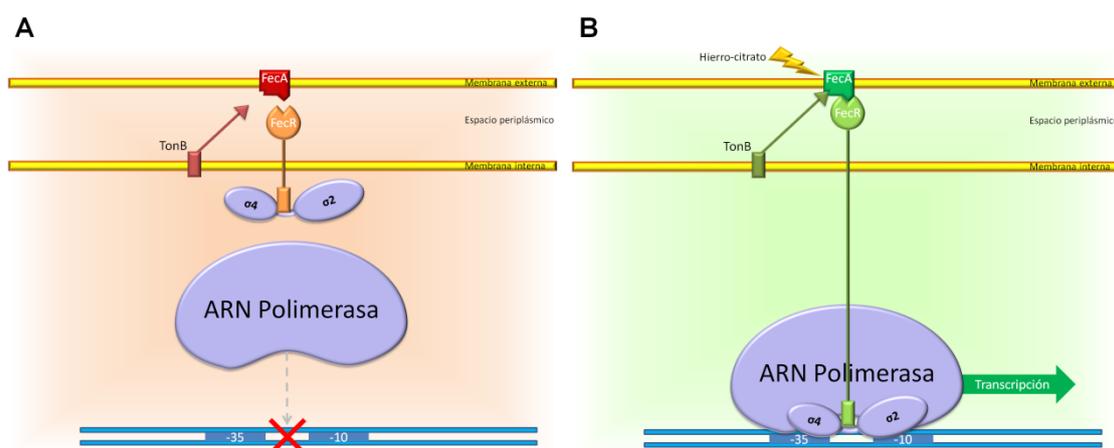


Figura 1.11. Factor sigma regulado por una cascada de interacción. Modelo del funcionamiento del sistema FecI/FecR. En ausencia de hierro, el factor sigma FecI se encuentra secuestrado por su antisigma FecR, impidiendo su unión al promotor (A). Tras detectar el estímulo, varias proteínas sensoras interaccionan provocando la activación del factor sigma y facilitando su unión al ADN (B).

En el sistema FecI/FecR una proteína de membrana externa es la encargada de detectar el hierro acomplejado en los sideróforos y ésta, mediante una interacción en la que también interviene el receptor de membrana interna TonB, transmite la señal a FecR, el factor antisigma de FecI. Además, en este tipo de sistema, la función del factor antisigma no se limitaría a secuestrar e inhibir al factor sigma, sino que también podría activar al factor sigma y facilitar su unión al núcleo de la ARN polimerasa (Brooks y Buchanan, 2008).

1.4.1.5. Regulados por intercambio en el factor antisigma con una proteína mimética

Este mecanismo es característico de los factores sigma ECF15 o de tipo EcfG típicos de las α -proteobacterias. Este sistema de regulación se basa en la aparición en el citoplasma de una proteína similar al factor sigma que es secuestrada por el factor antisigma en su lugar, dejando al factor sigma libre para actuar (Figura 1.12). Este tipo de regulación también es un ejemplo de un mecanismo que incluye a los sistemas de dos componentes, ya que en este sistema de transducción de señales participan tanto los sistemas de dos componentes como los factores sigma de tipo ECF (Foreman *et al.*, 2012).

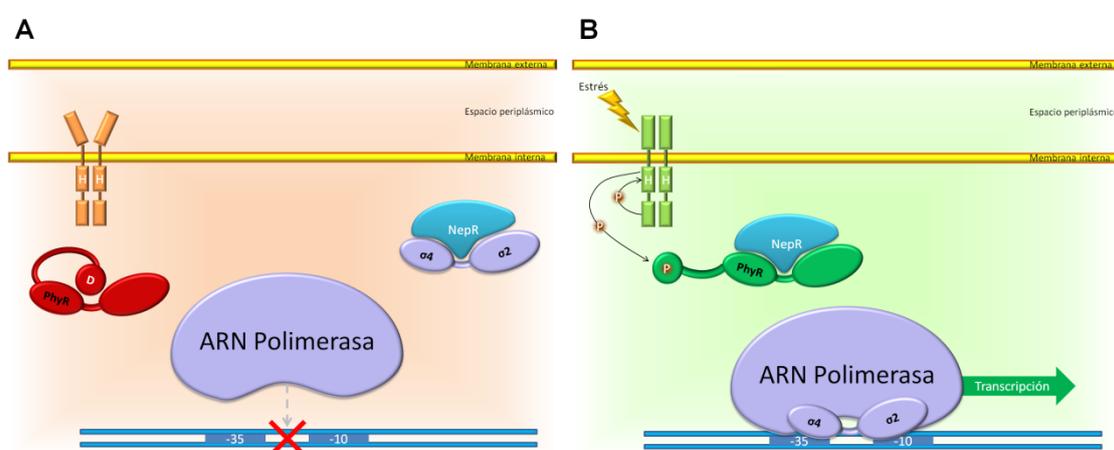


Figura 1.12. Factor sigma regulado por intercambio en el factor antisigma con una proteína mimética. Modelo del funcionamiento del factor sigma EcfG. En ausencia del estímulo, el factor antisigma NepR secuestra al factor sigma impidiendo su unión al ADN (A). En situaciones de estrés el regulador de respuesta PhyR de un sistema de dos componentes, tras ser fosforilado, mimetiza al factor sigma ocupando su lugar en el factor antisigma, dejándolo libre para iniciar la transcripción desde su promotor (B).

En este caso, la histidina quinasa del sistema de dos componentes se encarga de fosforilar a un regulador de respuesta, PhyR, cuya función no será unirse al ADN, sino mimetizar la estructura del factor sigma. En ausencia del estímulo, el factor sigma EcfG se encuentra secuestrado por su antisigma NepR, y el regulador de respuesta PhyR se encuentra plegado dejando su extremo amino inaccesible. Sin embargo, en situaciones de estrés, la histidina quinasa fosforila a PhyR y su región N-terminal, de estructura similar al factor sigma, queda expuesta permitiendo que sustituya al factor sigma EcfG al unirse al antisigma en su lugar pudiéndose llevar a cabo la transcripción de los genes regulados por este factor sigma (Campagne *et al.*, 2012; Herrou *et al.*, 2012).

1.4.2. Independientes de factor antisigma

1.4.2.1. No caracterizados y sin factor antisigma conocido

Los mecanismos de activación independientes de factor antisigma no son muy comunes entre los que han sido caracterizados, pero las recientes investigaciones revelan cada vez más estrategias distintas que no parecen requerir de la acción de un factor antisigma. Como sucede con los factores sigma cuyo mecanismo depende de un factor antisigma, hay muchos grupos de los cuales no hay evidencias sobre su mecanismo de activación. Al tratarse de grupos poco comunes y recién descritos, son poco frecuentes. Entre los grupos descritos pero no caracterizados encontramos a los ECF22 y ECF24, muy similares a los grupos ECF21, ECF23 y ECF25 con antisigma; el grupo ECF30, en el que, como comentamos anteriormente, aproximadamente la mitad de sus miembros carecen de un factor antisigma descrito; y los grupos ECF29 y ECF36 (Staroń *et al.*, 2009).

1.4.2.2. Regulados por transcripción directa del factor sigma

La activación transcripcional del factor sigma es una estrategia de regulación de la actividad que no depende de factor antisigma, aunque no es una de las más extendidas dentro de los factores sigma independientes de antisigma, ya que hasta la fecha sólo se han descrito dos ECFs con este mecanismo de activación. Estos dos factores sigma son los representantes de los grupos ECF32 y ECF39: HrpL de *Pseudomonas syringae*, encargado de regular los genes de virulencia de este patógeno, y SigE de *S. coelicolor*, encargado de regular los genes de la síntesis del glicano de la pared celular en situaciones de estrés respectivamente (Staroń *et al.*, 2009; Mascher, 2013) (Figura 1.13). En ambos casos se ha observado que la expresión del factor sigma viene controlada por un sistema de dos componentes, HrpRS para el factor sigma HrpL (Jovanovic *et al.*, 2014), y CseBC para el factor sigma SigE (Hutchings *et al.*, 2006).

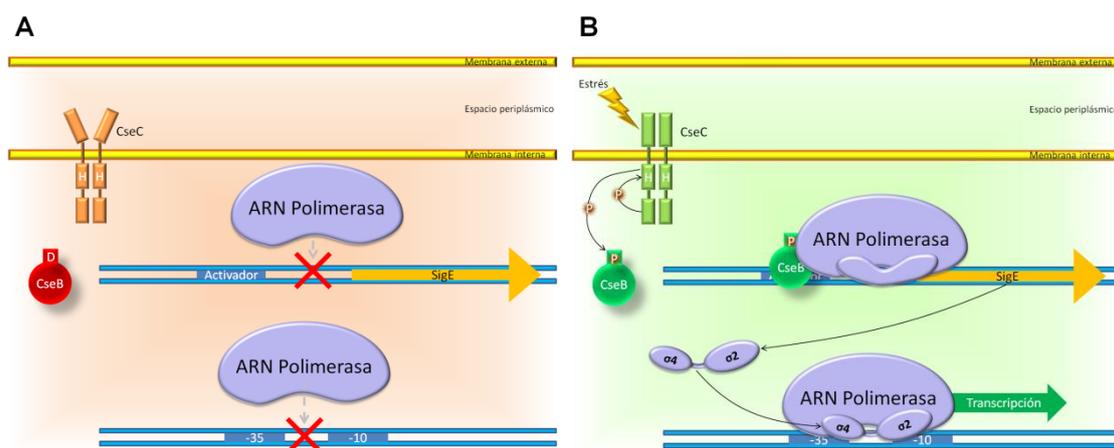


Figura 1.13. Factor sigma regulado por transcripción directa del factor sigma. Modelo del funcionamiento del factor sigma SigE de *S. coelicolor*. En ausencia del estímulo, no hay factor sigma en el citoplasma (A). En situaciones de estrés el sistema de dos componentes CseBC detecta el estímulo e inicia la transcripción de SigE, que tras ser sintetizado comienza la transcripción de los genes regulados por él (B).

1.4.2.3. Regulados por proteínas quinasa de tipo eucariótico

Pese a que no se han estudiado experimentalmente, muchos factores sigma de tipo ECF de los que aún no se conoce su mecanismo de acción se encuentran codificados directamente junto a una proteína quinasa de tipo eucariótico. Se ha observado que los factores sigma agrupados en el grupo ECF43 conservan entre sí ciertos residuos que podrían ser clave para la señalización por parte de las quinasas de tipo eucariótico (Starón *et al.*, 2009). También se han encontrado varios módulos de señalización bien conservados que consisten en una Ser/Thr proteína quinasa y un factor sigma de tipo ECF, y que han sido incluidos dentro de los grupos denominados del ECFSTK1 al ECFSTK4 (Jogler *et al.*, 2012). Pese a que estos mecanismos carecen de base experimental, no parece inverosímil que estas proteínas quinasa se encarguen de regular la actividad de sus respectivos factores sigma de tipo ECF (Figura 1.14). De hecho, pese a que no se trate de un factor sigma de tipo ECF, se ha comprobado experimentalmente que la serina-treonina proteína quinasa PknE se encuentra reprimiendo al factor sigma SigB en *Mycobacterium tuberculosis* (Parandhaman *et al.*, 2014).

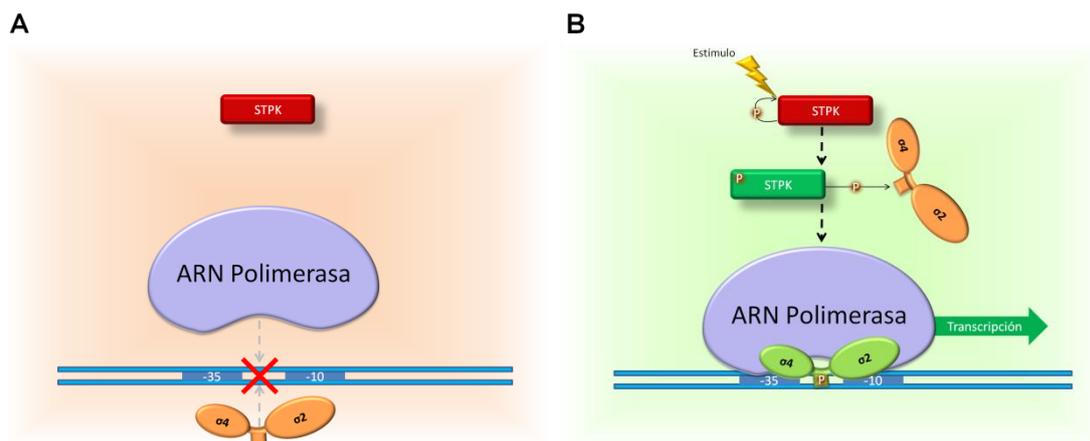


Figura 1.14. Factor sigma regulado por proteína serina-treonina quinasa. Modelo hipotético del funcionamiento de un factor sigma de este grupo. En ausencia del estímulo el factor sigma se encontraría inactivo incapaz de unirse al ADN (A). Tras la llegada del estímulo, la proteína quinasa sería la encargada de activar al factor sigma, que sería ahora capaz de unirse a su promotor (B).

1.4.2.4. Regulados por extensión C-terminal

Finalmente, algunos factores sigma de tipo ECF contienen una región extra en su extremo carboxilo que es la encargada de modular la actividad de la proteína. Hasta la fecha se han encontrado cuatro grupos con extensiones C-terminales: los grupos ECF41, ECF42, ECF01-Gob y el grupo al que pertenece el factor sigma que se estudiará en esta Tesis Doctoral, el grupo ECF44 (Jogler *et al.*, 2012; Muñoz-Dorado *et al.* 2012; Wecke *et al.*, 2012; Mascher, 2013).

Los miembros del grupo ECF41 poseen una extensión C-terminal de unos 100 aminoácidos con tres dominios bien conservados. Según se ha observado, esta extensión sería la encargada de inactivar al factor sigma en ausencia de estímulo así como de activarlo en presencia del mismo. La delección de la extensión C-terminal al completo inactiva al factor sigma, mientras que la eliminación de parte de esta extensión hace que ésta permanezca activa incluso en ausencia del estímulo (Mascher, 2013). Se han propuesto tres mecanismos de acción para este grupo de factores sigma. El primero consistiría en una inhibición por parte de la extensión C-terminal que cesaría por un cambio conformacional ante la llegada del estímulo. El segundo contempla la posibilidad de que las extensiones fueran capaces de dimerizar la proteína impidiendo que ejerza su función, y que esta capacidad de dimerización se pierda tras la llegada del estímulo. Por último, el tercer mecanismo propuesto

es un cambio conformacional en respuesta al estímulo que pudiera dejar expuesto un lugar de corte en la proteína (Figura 1.15) (Wecke *et al.*, 2012).

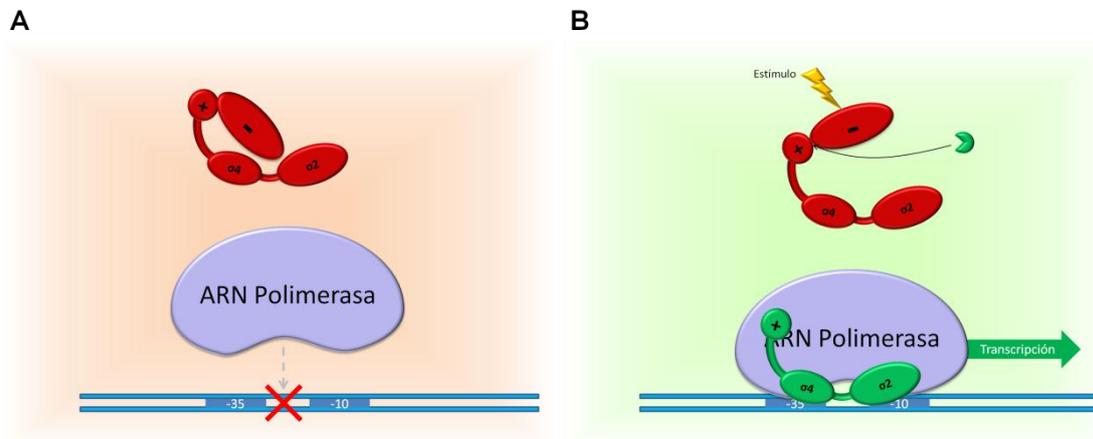


Figura 1.15. Factor sigma regulado por extensión C-terminal. Modelo hipotético del funcionamiento de un factor sigma del grupo ECF41. En ausencia del estímulo el factor sigma se encontraría en una conformación en la que la porción inhibitoria de su extensión C-terminal, le impediría a su promotor (A). El estímulo, provocaría un cambio conformacional que dejaría expuesto un sitio de corte que eliminaría la porción inhibitoria del factor sigma, permitiendo su unión al ADN (B).

El grupo ECF42 aún no ha sido caracterizado experimentalmente, pero se ha observado que posee una extensión C-terminal de unos 200 aminoácidos con dominios TPR (*Tetratricopeptide Repeat*), relacionados con las interacciones proteína-proteína y que guardan microsintenia con las proteínas de función desconocida DGPF (Starón *et al.*, 2009).

El grupo ECF01-Gob contiene una extensión C-terminal de hasta 1000 aminoácidos con varios dominios transmembrana y dominios WD40. Su presencia en el grupo de los *Planctomycetes*, que se caracterizan por tener una estructura seminucleada, junto con la presencia de dominios transmembrana, sugiere que este grupo de factores sigma ha evolucionado para facilitar la transducción de señales entre el citoplasma y el nucleóide (Jogler *et al.*, 2012).

El grupo ECF44 es el de los factores sigma de tipo CorE. A lo largo de esta Tesis Doctoral se profundizará en el estudio de este grupo de factores sigma, por lo que a continuación explicaremos con mayor detalle las características conocidas hasta el momento del grupo ECF44.

Factores sigma de tipo CorE (Grupo ECF44)

El único miembro descrito del grupo ECF44 hasta ahora es el factor sigma de *M. xanthus* CorE (*Copper Regulated ECF sigma factor*), de ahí que a los miembros de este grupo se les llame factores sigma de tipo CorE (Mascher, 2013). Como su propio nombre indica, la activación de CorE depende de la presencia de cobre en el citoplasma, iniciando así la transcripción de los genes de resistencia a dicho metal. Al contrario que la mayoría de factores sigma de tipo ECF, en CorE no existe una autorregulación completa de la expresión de su propio gen (*MXAN_3426*), sino una autorregulación parcial en presencia de cobre (Gomez-Santos, 2009).

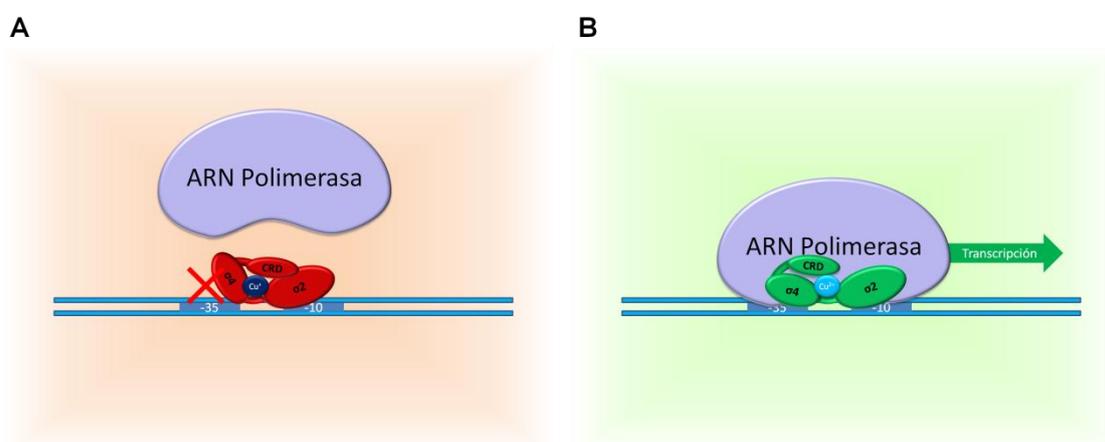


Figura 1.16. Modelo de funcionamiento del factor sigma CorE de *M. xanthus*. En ausencia de cobre o en un ambiente en que predomina el Cu^+ , el factor sigma CorE adquiriría una conformación inactiva que impediría su correcta unión al promotor (A). La entrada de cobre provocaría un aumento repentino de la concentración de Cu^{2+} , llegando a penetrar al citoplasma, uniéndose a CorE y provocando un cambio conformacional que permitiría su unión al ADN (B).

Además, CorE, tal y como hemos comentado anteriormente, no se encuentra regulado por un factor antisigma ni por ninguna otra proteína. Para regular su propia activación e inactivación sólo requiere de la presencia de cobre en sus distintos estados de oxidación, y es el estado de oxidación del cobre el responsable del peculiar perfil de expresión de los genes regulados por CorE. Tras la entrada de cobre a la célula los genes dependientes de CorE aumentan su expresión alcanzando un pico a las 2 horas, tras lo cual los niveles de expresión bajan abruptamente. Se ha comprobado que esto es debido a que el agente activador de CorE es el Cu^{2+} , que dado el ambiente reductor y la acción de las proteínas de unión a metales, sólo está presente durante unas

horas en el citoplasma. Cuando el Cu^{2+} pasa a Cu^+ , éste inactiva al factor sigma impidiendo su unión al ADN, tal y como se ha demostrado tras los estudios de movilidad electroforética en presencia de cobre y distintos quelantes, en los que CorE sólo era capaz de unirse al ADN cuando el Cu^{2+} predomina en el medio (Figura 1.16) (Gomez-Santos *et al.*, 2011).

Al contrario que los factores sigma del grupo ECF41, donde aparentemente el mecanismo de activación e inactivación requeriría de algún tipo de digestión parcial de la proteína, la inactivación de CorE no se debe a ningún tipo de degradación parcial del factor sigma, ya que se ha observado que la proteína es estable hasta 24 horas tras la adición de cobre al medio, por lo que se supone que la presencia y el estado de oxidación del metal provoca algún cambio conformacional en la proteína que determina su estado de activación (Gomez-Santos, 2009).

La región que ejerce la función reguladora y que es común dentro de este grupo de factores sigma es un dominio C-terminal rico en cisteínas (CRD, *Cysteine Rich Domain*) de 38 aminoácidos que contiene 6 cisteínas muy conservadas. Se ha comprobado que esta extensión C-terminal es esencial para CorE, ya que su delección impide el correcto funcionamiento del factor sigma. Además, mediante diversas mutaciones puntuales de cada una de las cisteínas, se ha comprobado que ciertos residuos son importantes para los procesos de activación y/o inactivación. En concreto, las cisteínas 192 y 194 parecen participar en los procesos de activación e inactivación; la cisteína 184 parece ser crucial para la inactivación de CorE; y la cisteína 189 es esencial para la activación (Gomez-Santos *et al.*, 2011). Este dominio se asemeja mucho a los dominios de unión a metales de otras proteínas donde las cisteínas coordinan la unión del metal cuando éste está presente, o forman puentes disulfuro entre sí cuando está ausente (Muñoz-Dorado *et al.*, 2012).

CorE está involucrado en la homeostasis del cobre en *M. xanthus* regulando la expresión de parte de la región del cobre 1 que consiste en, al menos, 20 genes contiguos, involucrados en la resistencia a metales de los que hablaremos a continuación.

1.5. Resistencia a metales en *M. xanthus*

Muchos metales, como por ejemplo el magnesio, el hierro, el calcio, el cobre o el zinc, son esenciales para los microorganismos, ya que son necesarios para muchas enzimas bacterianas en su centro activo o en un punto estructuralmente importante. Sin embargo, en el ambiente cambiante del suelo, *M. xanthus* se ve expuesto a cantidades variables de estos metales, llegando en ocasiones a niveles tóxicos para la bacteria. Debido a la presencia de estos metales y de otros que, sin ser esenciales, pueden provocar daños celulares al entrar en el citoplasma, estas bacterias han desarrollado diversas estrategias para hacer frente a su toxicidad y a mantener la homeostasis de metales como el cobre, que son tanto tóxicos como esenciales.

La regulación de metales pesados es actualmente un campo de investigación muy estudiado debido a la presencia de éstos en cantidades nocivas en el ambiente y a que cada vez más se descubre la implicación de metales como el cobre en enfermedades como el cáncer de próstata y el Alzheimer y las enfermedades de Menkes, Wilson (Strausak *et al.*, 2001; Safi *et al.*, 2014). El estudio de las bases de funcionamiento de diversos reguladores y proteínas implicadas en la resistencia a metales, así como el análisis de la afinidad de estos metales por las metaloproteínas presentes en varios organismos ha resultado crucial para el desarrollo de nuevas estrategias contra este tipo de enfermedades. En las bacterias podemos encontrar distintas proteínas implicadas en la resistencia a metales. Entre ellas se encuentran las ATPasas de tipo P_{1B}, los sistemas de eflujo de metales pesados (o transportadores de tipo CBA), los facilitadores de la difusión de cationes (o bombas de tipo CDF), las oxidasas multicobre y las metalochaperonas.

1.5.1. Proteínas implicadas en la resistencia a metales

ATPasas de tipo P_{1B}

Las ATPasas de tipo P_{1B} forman parte de la familia de las proteínas de membrana transportadoras de cationes y son los principales componentes de resistencia a metales extendidos entre las bacterias (Rademacher y Masepohl, 2012). Estas proteínas generalmente transportan cobre y plata, pero también

pueden exportar zinc, cobalto, cadmio y plomo fuera del citoplasma. Como su propio nombre indica, para este transporte se requiere de la hidrólisis de ATP para transportar los cationes (**Figura 1.17**). Esto tiene lugar mediante un ciclo catalítico en el que un residuo de ácido aspártico del motivo DKTGT de la ATPasa se autofosforila (Argüello *et al.*, 2007). *M. xanthus* codifica tres ATPasas de tipo P_{1B} muy similares entre sí a las que se ha denominado CopA (MXAN_3415), CopB (MXAN_3422) y CopC (MXAN_0979), de las cuales se ha comprobado que CopA y CopB están involucradas en el transporte de Cu⁺ del citoplasma al espacio periplásmico (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2010b).

Oxidasas multicobre

Las oxidasas multicobre son una familia de metaloproteínas capaces de oxidar una gran variedad de sustratos. A esta familia pertenecen enzimas como las lacasas, las ascorbato oxidasas y las ferroxidasas, y todas se caracterizan por conservar 10 residuos de histidina y uno de cisteína que serán los responsables de unir los cuatro átomos de cobre necesarios para llevar a cabo su función (Dittmer y Kanost, 2010). En muchas bacterias estas enzimas están implicadas en la resistencia al cobre, comúnmente trabajando en conjunto con las ATPasas de tipo P_{1B}. Cuando éstas exportan el Cu⁺ al espacio periplásmico, las oxidasas multicobre se encargan de oxidar el Cu⁺ a Cu²⁺, su forma menos tóxica (**Figura 1.17**) (Cortes *et al.*, 2015).

En la mayoría de las bacterias sólo hay una de estas oxidasas multicobre codificada en su cromosoma, y si existe alguna adicional es en un plásmido de resistencia (Voloudakis *et al.*, 2005). No obstante, *M. xanthus* posee tres oxidasas multicobre en su cromosoma, CuoA, CuoB y CuoC (MXAN_3420, MXAN_3425 y MXAN_3432, respectivamente), cada una especializada en un mecanismo de respuesta al cobre diferente (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007). Debido a su modo de acción y su perfil de expresión, hay evidencias para pensar que la oxidasas multicobre CuoA actúa conjuntamente con la ATPasa CopA y que CuoB actúa junto a CopB. La posible relación entre CuoC y CopC es únicamente especulativa, ya que ambos genes tienen distinto perfil de expresión y se les atribuye un mecanismo de acción diferente (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2010b).

Metalochaperonas

Las metalochaperonas son proteínas de pequeño tamaño especializadas en unir metales catiónicos con el fin de trasladar dichos metales y cederlos a las enzimas que los requieran, y al mismo tiempo reducir su toxicidad evitando la presencia del metal en su estado libre (Figura 1.17) (Nies, 2012; Argüello *et al.*, 2013). Estas metalochaperonas se encuentran mayoritariamente en el espacio periplásmico de las bacterias (Petrarca *et al.*, 2010), aunque algunas de ellas pueden encontrarse en el citoplasma (Napolitano *et al.*, 2012). En *M. xanthus* hay una metalochaperona (MXAN_3427) que se encuentra regulada por el factor sigma CorE y que parece tener una localización periplásmica. Pese a que se ha especulado sobre la existencia de una metalochaperona encargada de suministrarle el cobre a CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011), las investigaciones llevadas a cabo con ella revelaron que esta metalochaperona citoplasmática no estaba implicada en la activación/inactivación del factor sigma.

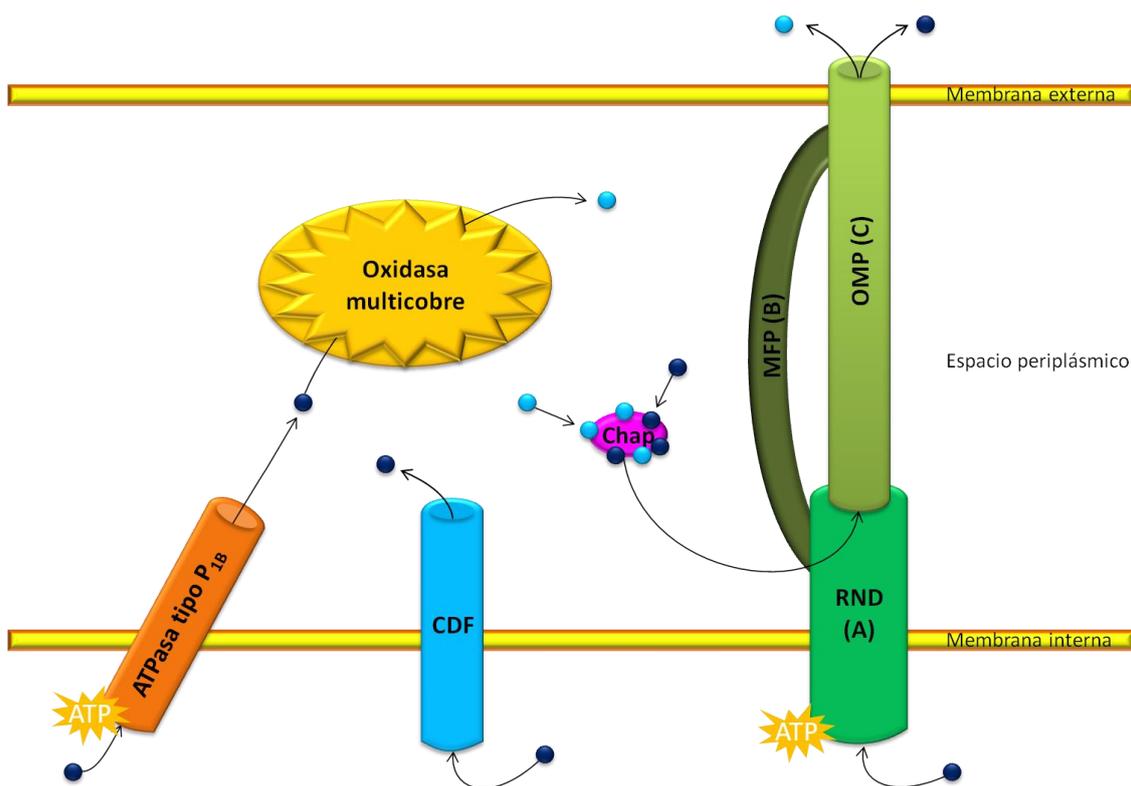


Figura 1.17. Representación de los distintos mecanismos de resistencia a metales encontrados en los procariotas. Los círculos azules representan átomos de cobre, los más oscuros representan Cu^+ , mientras que los más claros representan Cu^{2+} . En naranja una ATPasa de tipo $\text{P}_{1\text{B}}$, en amarillo una oxidasa multicobre, en rosa una metalochaperona, en verde un transportador de tipo CBA y en azul un facilitador de la difusión de cationes.

Transportadores de tipo CBA

Los sistemas de eflujo de metales pesados son también llamados transportadores de tipo CBA debido a las subunidades C, B y A que los conforman. Su función es expulsar los metales pesados desde el citoplasma y/o desde el espacio periplásmico hasta el exterior de la bacteria (Bondarczuk y Piotrowska-Seget, 2013; Argüello *et al.*, 2012). El componente A es la bomba central del sistema y pertenece a la familia RND (*Resistance, Nodulation and cell Division*), que utiliza un sistema antiporte para exportar el metal al exterior. El componente C es un conducto de salida que atraviesa el periplasma conocido como OMF (*Outer Membrane Factor*) y el componente B es una proteína de fusión que estabiliza la unión de las subunidades A y C llamado MFP (*Membrane Fusion Protein*) (Figura 1.17) (Rensing *et al.*, 1997).

Estos sistemas de eflujo especializados en metales pesados son llamados HME-RND para diferenciarlos de los sistemas especializados en expulsar compuestos orgánicos hidrofóbicos y anfífilos HAE-RND, y otros grupos de sistemas como los NFE-RND, SecDF-RND y ESH-RND encargados del transporte del factor de nodulación, del sistema accesorio de secreción de proteínas y de la homeostasis del esteroide eucariótico respectivamente (Tseng *et al.*, 1999). En *M. xanthus* hay seis sistemas CBA caracterizados como de tipo HME-RND. Dentro de estos seis sistemas encontramos tres identificados bioinformáticamente como sistemas Cus de expulsión de cobre (Cus1, Cus2 y Cus3) y tres sistemas de expulsión de cobalto, zinc y cadmio (Czc1, Czc2 y Czc3). Sin embargo, se ha demostrado que esta clasificación no es del todo exacta, ya que en *M. xanthus* Cus1 se encarga de expulsar zinc en vez de cobre, y el sistema Czc3 no parece estar implicado en la expulsión de metales pesados (Moraleta-Muñoz *et al.*, 2010a).

Facilitadores de la difusión de cationes

Los facilitadores de la difusión de cationes, son también llamados CzcD, ya que el primero en ser identificado fue el gen CzcD de *C. metallidurans* (anteriormente *Alcaligenes eutrophus*), el cual forma parte en la regulación de un sistema de expulsión de metales pesados de tipo CBA (Nies *et al.*, 1989). Parece ser que la función de estos facilitadores de la difusión de cationes es la de exportar metales divalentes a través de la membrana citoplasmática sirviendo de proteína “tamponadora” de metales pesados. Estas proteínas actúan

importando metales como el cobalto y el zinc cuando éstos son necesarios en el citoplasma, y enlazándolos y exportándolos al espacio periplásmico cuando su concentración es demasiado elevada. De esta forma, establece un sistema de resistencia a metales pesados que ejerce su función a concentraciones inferiores a las necesarias para activar sistemas más activos como las ATPasas de tipo P_{1B} o los sistemas de eflujo HME-RND (Anton *et al.*, 1999). Estos sistemas parecen funcionar como un sistema antiporte de K⁺ o H⁺, en ocasiones siendo importantes para la toma de potasio (Guffanti *et al.*, 2002). En *M. xanthus*, hay un ortólogo de la proteína CzcD codificado por el gen *MXAN_5264*, adyacente al gen para el factor sigma del grupo ECF44 CorE2. A lo largo de esta tesis profundizaremos, entre otras cosas, en el posible rol de esta proteína de eflujo de cationes.

1.5.2. Mantenimiento de la homeostasis del cobre en *M. xanthus*

Los mecanismos de resistencia a metales mejor estudiados en *M. xanthus* son los del mantenimiento de la homeostasis del cobre, ya que pese a que esta bacteria no es especialmente resistente a este metal, posee un gran número de parálogos de los genes de resistencia al cobre. Esto es debido a que cada uno de estos genes parálogos está especializado en un tipo de acción en respuesta al metal. Estos parálogos se encuentran agrupados en dos regiones denominadas región del cobre 1 y región del cobre 2, además de algunos sistemas más dispersos por el cromosoma, como el Cus3 y los sistemas Czc1, Czc2 y Czc3. La región del cobre 2 consta de los genes del *MXAN_0979* al *MXAN_0990*, y contiene los genes para CopC, y los sistemas Cus1 y Cus2 de los que hemos hablado anteriormente. Esta región carece de un regulador conocido y el perfil de expresión de los genes de los que consta no parece indicar que esté regulado por un único regulador. La región del cobre 1 abarca desde el gen *MXAN_3413* hasta el gen *MXAN_3432* y tiene un doble sistema de regulación por parte del factor sigma de tipo ECF CorE y del sistema de dos componentes CorSR.

El factor sigma CorE está implicado en la respuesta temprana al cobre, inactivando la transcripción de los genes que regula a las dos horas tras la entrada del cobre al citoplasma. Este factor sigma regula la parte de la región del cobre 1 que va desde el gen *MXAN_3422* al *MXAN_3426*, controlando la expresión de los genes *copB* y *cuoB* y parte de su propia expresión. Además,

CorE también se encuentra regulando la expresión de los genes *MXAN_3427* (metalochaperona) y *copA* (Figura 1.18) (Gómez-Santos *et al.*, 2011).

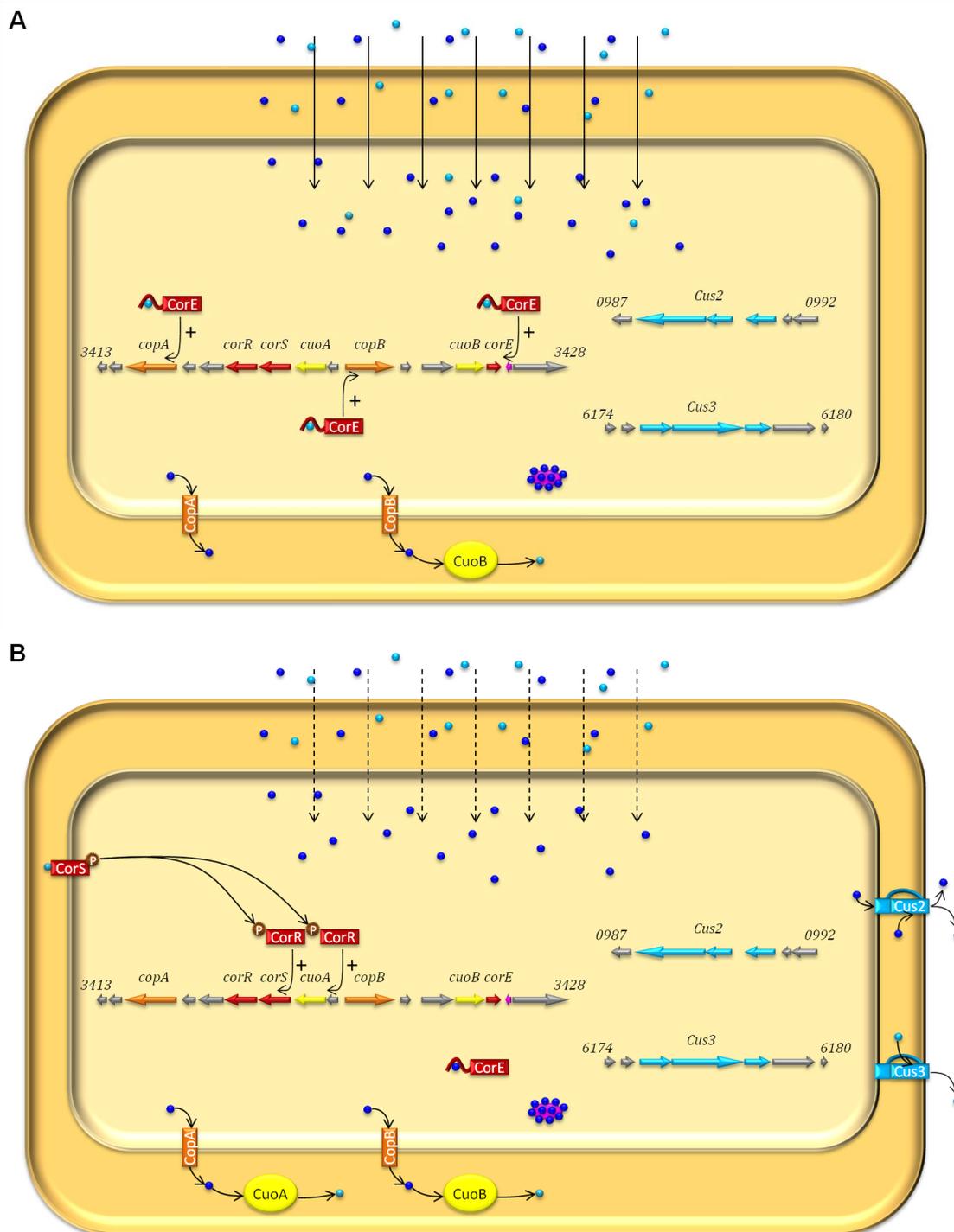


Figura 1.18. Representación esquemática de la respuesta al cobre en *M. xanthus*. A. Respuesta temprana, regulada por el factor sigma CorE. B. Respuesta mantenida, controlada por el sistema de dos componentes CorSR. Los círculos azules representan átomos de cobre, los más oscuros representan Cu^+ , mientras que los más claros representan Cu^{2+} .

Por otra parte, el sistema de dos componentes CorSR está especializado en el mantenimiento de la respuesta al cobre, de forma que para obtener una resistencia completa se necesita preadaptar las células a dicho metal para inducir todos los genes de resistencia al cobre. CorSR se encuentra regulando los 9 genes que forman el operón *curA* (*MXAN_3413-MXAN_3421*), donde podemos encontrar los genes *copA* y *cuoA* mencionados anteriormente (Sánchez-Sutil *et al.*, 2013).

De este modo queda definida la respuesta al cobre de 15 genes de respuesta a metales con dos estrategias distintas, una respuesta inmediata y otra mantenida en el tiempo. Hay muchos genes de respuesta a metales pesados de los cuales aún no se conoce el regulador encargado de inducir su expresión, como son el de los sistemas Czc y Cus, el de los genes localizados en la región del cobre 2, el de la oxidasa multicobre CuoC y el del homólogo del facilitador de la difusión de cationes CzcD, además de otros genes sin caracterizar que puedan participar en la resistencia a los metales pesados.

Objetivos

II. Objetivos

Myxococcus xanthus codifica en su genoma un gran número de sistemas de transducción de señales debido a que requiere de sistemas precisos de señalización para llevar a cabo su complejo ciclo de vida, en donde la comunicación intercelular para coordinar movimientos y comportamiento es esencial. Pero además, como cualquier otro procarionta, necesita este tipo de mecanismos para la detección y respuesta a estímulos externos, como la presencia de metales pesados, con el objeto de asegurar su supervivencia.

El tercer pilar de mecanismos de transducción de señales en procariontas está representado por los factores sigma de tipo ECF. Este grupo de reguladores interviene en numerosos procesos y presenta una gran diversidad de mecanismos de acción y estímulos reconocidos, lo cual ha permitido su clasificación en 50 grupos. Uno de los grupos más recientes propuesto es el de los factores sigma de tipo ECF44, cuyo único miembro caracterizado hasta la fecha es el factor sigma CorE de *M. xanthus*. CorE es capaz de detectar directamente el cobre en el citoplasma y cambiar su estado de activación e inactivación en función del estado de oxidación del metal. El descubrimiento de este mecanismo de acción ha llevado a la búsqueda de parálogos en el genoma de *M. xanthus* que ha permitido identificar un segundo gen al que hemos denominado *corE2*, cuyo estudio podría permitirnos conocer en mayor profundidad el funcionamiento de este grupo de factores sigma en particular y de los factores sigma de tipo ECF que funcionan sin antisigma, en general.

En esta Tesis Doctoral, por tanto, procederemos a analizar el mecanismo de acción del metalorregulador CorE2. Para ello, durante la realización de esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Identificar otros miembros del grupo ECF44 de factores sigma presentes en otros procariontas mediante un análisis de genómica comparada.

2. Análisis desde un punto de vista bioinformático, genético y microbiológico del clúster de *corE2*.
3. Realizar un estudio comparativo entre CorE y CorE2 para profundizar en el mecanismo de acción de los factores sigma del grupo ECF44.

Materialles y métodos

III. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Cultivo de microorganismos

3.1.1.1. Microorganismos

E. coli TOP10 (Invitrogen)

Genotipo: *F*⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$, Φ 80*lacZ*(*del*)M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara\text{-}leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(*Sm*^R), *endA1*, *nupG*

Utilización: Esta cepa se usó para la manipulación de los diversos plásmidos utilizados en este trabajo, realizando transformaciones en células competentes con mezclas de ligación, plásmidos y los productos de amplificación de las mutaciones puntuales.

E. coli BL21 Star (DE3) (Invitrogen)

Genotipo: *F*⁻, *ompT*, *hsdS_B* (*r_Bm_B*⁻), *gal*, *dcm*, *rne131* (DE3)

Utilización: Se empleó esta cepa para la inducción, producción y purificación de proteínas. Se transformaron células competentes con los plásmidos derivados del vector comercial pGEX 4T-1 para la producción de proteínas fusionadas con la GST (Glutathione S-Transferase) y su expresión fue inducida con IPTG, ya que la cepa posee la ARN polimerasa del fago T7 capaz de transcribir los genes bajo el control de su promotor cuando es inducida con este compuesto.

M. xanthus DZF1 (Morrison y Zusman, 1979)

Genotipo: *pilQ1*

Utilización: Esta cepa fue considerada como silvestre y fue la utilizada como objeto de estudio para la mayoría de objetivos contenidos en esta Tesis Doctoral. Debido a una mutación *pilQ1* en los *pili* de tipo IV esta cepa tiene una menor capacidad de agregación, lo que permite su cultivo en medio líquido, al contrario que la cepa silvestre de *M. xanthus* DK1622 que forma agregados en medio líquido, impidiendo su crecimiento en suspensión. Además de cómo estudio directo, fue utilizada como trasfondo genético para introducir las modificaciones genéticas deseadas (mutaciones, fusiones transcripcionales, mutaciones puntuales, etc). Todas las cepas derivadas de *M. xanthus* DZF1 construidas y/o utilizadas en esta Tesis Doctoral vienen recogidas en el Apéndice 1.

3.1.1.2. Medios de cultivo

LB (Lysogenic Broth) (Miller, 1972)

Microorganismos cultivados: cepas de *E. coli*

Composición:

Triptona	1%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	1%
Agar (sólo en sólido)	1,5%
pH	7,2

CTT (Casitone-Tris) (Hodgkin y Kaiser, 1977)

Microorganismos cultivados: cepas de *M. xanthus*

Composición:

Casitona	1%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5%
0,1 M fosfato potásico, pH 7,6	1%
1M Tris-HCl, pH 7,6	1%
Agar (sólo en sólido)	1,5%

CF (Clone Fruiting agar) (Hagen *et al.*, 1978)

Microorganismos cultivados: cepas de *M. xanthus*

Composición:

Tris-HCl, pH 7,6	10 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	8 mM
K ₂ NaPO ₄ , pH 6,8	1 mM
(NH ₄)SO ₄	0,02%
Casitona	0,015%
Citrato sódico	0,2%
Piruvato sódico (tras esterilizar)	0,1%
Agar	1,5%

Compuestos adicionados (incorporados tras esterilizar los medios):

Ampicilina

Concentración final: 50 µg/ml (LB)

Utilización: Se utilizó para la selección de cepas de *E. coli* portadoras de plásmidos derivados del pGEX 4T-1.

Cloruro de cadmio, cloruro de zinc y sulfato de cobre

Concentraciones finales:
0,3 mM CdCl₂ (LB)
0,3 mM ZnCl₂ (LB)
0,5 mM CuSO₄ (LB)

Utilización: Se usaron para la producción a gran escala de las proteínas en presencia de estos metales.

III. Materiales y métodos

Diamida, dicloruro de paraquat, hidróxido de tert-butilo, peróxido de hidrógeno, persulfato sódico, cloruro de cobalto, nitrato de plata y sulfato de hierro (III)

Concentraciones finales:	0,5 mM diamida (CTT/CF) 0,15-0,25 mM dicloruro de paraquat (CTT/CF) 0,1-0,3 mM hidróxido de tert-butilo (CTT/CF) 0,3-0,4 mM peróxido de hidrógeno (CTT/CF) 0,1 mM persulfato sódico (CTT/CF) 1 mM CoCl ₂ (CTT/CF) 0,025-0,1 mM AgNO ₃ (CTT/CF) 1 mM Fe ₂ (SO ₄) ₃ (CTT/CF)
Utilización:	Se emplearon para el análisis cualitativo de la inducción de genes en presencia de estos compuestos inoculando las cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> en medios con X-gal.

Galactosa

Concentración final:	1% (CTT)
Utilización:	Se utilizó como agente bacteriostático para impedir el crecimiento de aquellas cepas de <i>M. xanthus</i> que no hubieran perdido el plásmido pBJ113 portador del gen de la galactoquinasa durante la construcción de mutantes de delección en fase.

IPTG (isopropil β -D-1-thiogalactopiranosido)

Concentración final:	0,1-1 mM (LB)
Utilización:	Se empleó para inducir la expresión de los genes clonados en los plásmidos derivados del pGEX 4T-1 bajo el control del promotor <i>tac</i> y el operador <i>lac</i> . La concentración final utilizada varió en función de si la producción era a pequeña o gran escala.

III. Materiales y métodos

Kanamicina	
Concentración final:	25 µg/ml (LB) 40-80 µg/ml (CTT)
Utilización:	Se empleó para la selección y mantenimiento de cepas de <i>E. coli</i> y <i>M. xanthus</i> portadoras de plásmidos derivados del pBJ113 y pKY481 ya fuera en forma de plásmido o integrado en el cromosoma por recombinación homóloga.

Nitrato de cadmio	
Concentración final:	7,5-100 µM (CTT/CF)
Utilización:	Se empleó para el análisis cualitativo de la inducción de genes en presencia de este metal inoculando las cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> en medios con X-gal. También se empleó para la medida cuantitativa de la actividad β-galactosidasa de dichas cepas en presencia del metal y para inducir ciertos genes para la posterior extracción de ARN de la cepa silvestre. Además se utilizó para estudiar la resistencia de las distintas cepas de <i>M. xanthus</i> a este metal.

Nitrato de zinc	
Concentración final:	0,2-0,5 mM (CTT/CF)
Utilización:	Se empleó para el análisis cualitativo de la inducción de genes en presencia de este metal inoculando las cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> en medios con X-gal. También se empleó para la medida cuantitativa de la actividad β-galactosidasa de dichas cepas en presencia del metal. Además se utilizó para estudiar la resistencia de las distintas cepas de <i>M. xanthus</i> a este metal.

III. Materiales y métodos

Oxitetraciclina	
Concentración final:	25 µg/ml (LB) 8-15 µg/ml (CTT)
Utilización:	Se utilizó para la selección de cepas de <i>E. coli</i> y <i>M. xanthus</i> portadoras de plásmidos derivados del pNG10A ya fuera en forma de plásmido o integrado en el cromosoma por recombinación homóloga.

Sulfato de cobre	
Concentración final:	0,02-0,6 mM (CTT/CF)
Utilización:	Se empleó para el análisis cualitativo de la inducción de genes en presencia de este metal inoculando las cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> en medios con X-gal. También se empleó para la medida cuantitativa de la actividad β-galactosidasa de dichas cepas en presencia del metal y para inducir ciertos genes para la posterior extracción de ARN de la cepa silvestre. Además se utilizó para estudiar la capacidad de formación de cuerpos fructíferos de las distintas cepas de <i>M. xanthus</i> en presencia de este metal.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)	
Concentración final:	40 µg/ml (LB) 100 µg/ml (CTT/CF)
Utilización:	Como sustrato de la enzima β-galactosidasa, dando lugar a un producto de coloración azul que permite distinguir aquellas cepas de <i>E. coli</i> con un plásmido con un gen <i>lacZ</i> funcional (azules) de las que lo tienen inactivo por la incorporación de un inserto (blancas). Se empleó también para el análisis cualitativo de la inducción de la enzima β-galactosidasa en cepas de <i>M. xanthus</i> portadoras de fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> .

3.1.2. Materiales empleados para el desarrollo de técnicas de Biología Molecular

3.1.2.1. Soluciones y tampones

Lavado y resuspensión de cultivos y extractos celulares

Nombre	Composición
Tampón TM	10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM MgSO ₄
Solución de sulfato magnésico para la preparación de células competentes	10 mM MgSO ₄
Tampón de cloruro cálcico para la preparación de células competentes	50 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl, pH 8
Tampón de cloruro cálcico con glicerol para la conservación de células competentes	50 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl, pH 8; 20% glicerol

Determinación cuantitativa de la actividad β-galactosidasa

Nombre	Composición
Tampón Z	0,1 M Na ₂ HPO ₄ ; 10 mM KCl; 1 mM MgSO ₄ ; 0,35% β-mercaptoetanol; pH 7
Solución de carbonato sódico	1 M Na ₂ CO ₃

Electroforesis de ADN

Nombre	Composición
TAE 50X (Sambrook y Russell, 2001)	2 M Tris-acetato; 1 mM EDTA (<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>), pH 8
TBE 5X (Sambrook y Russell, 2001)	0,45 M Tris-borato; 1mM EDTA, pH 8
Solución de acrilamida 29:1	29% acrilamida; 1% bis-acrilamida
Tampón de carga de ADN 5X (Sambrook y Russell, 2001)	0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% glicerol

III. Materiales y métodos

Electroforesis de proteínas

Nombre	Composición
PBS (Sambrook y Russell, 2001)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Tampón de carga de proteínas 2X	160 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>); 0,024% azul de bromofenol; 20% glicerol; 0,5% β-mercaptoetanol
Tampón de carrera	192 mM licina; 25 mM Tris; 0,1% SDS

Southern blot

Nombre	Composición
Solución de despurinación	0,25 N HCl
Solución de desnaturalización (Sambrook y Russell, 2001)	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Solución de neutralización (Sambrook y Russell, 2001)	3 M acetato sódico, pH 5,5
SSC 20X (Sambrook y Russell, 2001)	3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7
Tampón maleico	150 mM NaCl; 0,1 M ácido maleico, pH 7
Solución de lavado 2X	SSC 2X; 0,1% SDS
Solución de lavado 0,1X	SSC 0,1X; 0,1% SDS
Solución de bloqueo	10% de reactivo de bloqueo (Roche) en tampón maleico
Tampón de lavado	3% de Tween 20 en tampón maleico
Tampón de detección	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ , pH 9,5
Solución de desarrollo del color	2% de NBT/BCIP (<i>nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>) en tampón de detección
Tampón TE (Sambrook y Russell, 2001)	Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM, pH 8

III. Materiales y métodos

Tinción y decoloración de geles de proteínas

Nombre	Composición
Solución I (tinción)	25% isopropanol; 10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie
Solución II (tinción)	10% isopropanol; 10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie
Solución III (tinción)	10% ácido acético glacial; 0,003% azul Coomassie
Solución IV (decoloración)	10% ácido acético glacial

Purificación de proteínas

Nombre	Composición
Tampón de unión	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
Tampón de elución	50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM glutatión reducido (GSH)

3.1.2.2. Kits comerciales

Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Contenidos empleados: Tampón de lisis; solución de precipitación de proteínas; solución de ARNasa A; solución de rehidratación de ADN.

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)

Contenidos empleados: Tampón de resuspensión con ARNasa A; tampón de lisis; tampón de unión; tampón de lavado I; tampón de lavado II; tampón de elución; tubos de centrifuga de filtrado *High Pure*; tubos de recolección.

III. Materiales y métodos

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

Contenidos empleados: Tampón de unión; tampón de lavado; tampón de elución; tubos de centrifuga de filtrado *High Pure*; tubos de recolección.

QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent)

Contenidos empleados: ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra; tampón de reacción 10X; *DpnI*; mezcla de dNTPs.

High Pure RNA Isolation Kit (Roche)

Contenidos empleados: Tampón de lisis/unión; ADNasa I; tampón de incubación de la ADNasa I; tampón de lavado I; tampón de lavado II; tampón de elución; tubos de filtro de centrifuga *High Pure*; tubos de recolección.

5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)

Contenidos empleados: Tampón de PCR 10X; 25mM MgCl₂; mezcla de dNTPs 10 mM; 0,1 M DTT; reverso transcriptasa SuperScript II; mezcla 10 μM de ARNasas; tampón de extensión 5X; TdT; cebador AUAP.

3.1.2.3. Reactivos, compuestos y consumibles

Casa comercial	Productos
Analema	Azul de bromofenol
GE Healthcare	Membrana Amersham Hybond™ - N ⁺ Columnas GStrap-4B Glutathione Sepharose 4B Columna Superdex 75 10/300 GL
BD	Triptona Extracto de levadura Agar Casitona
Bio-Rad	Bio-Rad Protein Assay SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range Azul Coomassie BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Biosinth AG	X-Gal

III. Materiales y métodos

Casa comercial	Productos	
Biotium	Gel-Red	
Millipore	Parafilm Filtros de esterilización Millex GP	Membranas para diálisis Tubos concentradores Centriprep
Panreac	Sulfato de cobre	Isopropanol
Promega	Glicina	
Pronadisa	Agarosa	
Roche	NBT/BCIP Molecular Weight Marker II DIG DNA Labeling mix 10X DIG Easy Hyb Granules Anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments Deoxynucleoside triphosphate Set (dATP)	Tris-Base Molecular Weight Marker VIII Hexanucleotide mix 10X Reactivo de bloqueo IPTG Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets
Scharlau	HCl	Ácido acético glacial
Serva	Bis-acrilamida	β -mercaptoetanol
Sigma	NaCl Ampicilina Cloruro de zinc Tetraciclina KH ₂ PO ₄ Diamida Galactosa Nitrato de plata Persulfato sódico (NH ₄)SO ₄ Piruvato sódico Glicerol KCl EDTA Acrilamida Acetato sódico SDS Glutación reducido Perlas de vidrio Isopropanol Persulfato amónico DEPC (<i>Diethylpyrocarbonate</i>)	NaOH Cloruro de cadmio Kanamicina MgSO ₄ Cloruro de cobalto Dicloruro de Paraquat Hidróxido de Tert-Butilo Peróxido de hidrógeno Sulfato de hierro (III) Citrato sódico CaCl ₂ Na ₂ HPO ₄ Carbonato sódico Ácido bórico Xileno cianol Ácido maleico Tween 20 Agua HPLC ONPG (<i>Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside</i>) TEMED (<i>Tetramethylethylenediamine</i>) LiCl
Whatman	3 MM Chr Chromatography Paper	

3.1.2.4. Enzimas

<u>GE Healthcare:</u>	Trombina
<u>Thermo scientific:</u>	Endonucleasas de restricción FastDigest™
<u>Invitrogen:</u>	SuperScript III RT, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor y ARNasa H
<u>Roche:</u>	T4-DNA ligase, Klenow y lisozima
<u>Sigma:</u>	Taq DNA Polymerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<u>Takara:</u>	PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

3.1.2.5. Plásmidos

Los vectores listados a continuación fueron utilizados como material de partida para la construcción y posterior utilización de los plásmidos específicos necesarios para cada caso. Todos los plásmidos construidos durante esta Tesis Doctoral vienen recogidos en el Apéndice 2. Los marcadores Km^R, Amp^R, y Tet^R hacen referencia a los genes de resistencia a la kanamicina, ampicilina y tetraciclina, respectivamente.

pBJ113 (Julien <i>et al.</i> , 2000)	
Tamaño aproximado:	5000 pb
Marcadores:	Km ^R , <i>galK</i>
Utilización:	El plásmido pBJ113 fue utilizado para la construcción de los distintos mutantes de delección en fase por sus dos marcadores: el de resistencia a kanamicina que permite identificar las cepas con el plásmido insertado en su cromosoma, y el de la galactoquinasa, que proporciona sensibilidad a la galactosa. Además el sitio de clonación múltiple se encuentra en medio del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , por lo que al clonar un inserto se pierde la actividad de dicho gen, pudiendo hacer una selección blanco/azul en placas con X-gal durante la construcción de los plásmidos.

III. Materiales y métodos

pKY481 (Cho y Zusman, 1999)

Tamaño aproximado: 8300 pb

Marcadores: Km^R

Utilización: Este plásmido posee el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* aguas abajo del sitio de clonación múltiple (MCS) de modo que al introducir la secuencia promotora de un gen podemos monitorizar la expresión de dicho gen analizando la expresión de la β -galactosidasa. También posee el gen *lacY* para permitir su transporte y determinar su actividad. Este es el plásmido utilizado para construir todas las fusiones transcripcionales *lacZ*.

pGEX-4T-1 (GE Healthcare)

Tamaño aproximado: 4900 pb

Marcadores: Amp^R

Utilización: Empleado para fusionar las proteínas CorE y CorE2 a la proteína GST para su posterior purificación. Posee un promotor inducible con IPTG que permitió la expresión de las proteínas de fusión en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3).

pNG10A (Gómez-Santos *et al.*, 2012)

Tamaño aproximado: 4700 pb

Marcadores: Tet^R

Utilización: Se usó como base para la construcción del plásmido pMT00, por su marcador de resistencia a tetraciclina. El promotor dependiente de cobre del gen *cuoA* fue eliminado y sustituido por el gen *corE2* y un fragmento de 800 pb aguas arriba del mismo.

pNG00 (Gómez-Santos *et al.*, 2011)

Tamaño aproximado: 5300 pb

Marcadores: Tet^R

Utilización: Este plásmido fue utilizado como molde para las mutaciones puntuales realizadas sobre el gen *corE* como anteriormente (Gómez-Santos *et al.*, 2011).

3.1.2.6. Oligonucleótidos

En la siguiente tabla se recogen todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral. Todos los oligonucleótidos han sido representados en dirección 5' → 3' y los sitios de restricción, en caso de poseerlos, se encuentran subrayados.

Tabla 3.1. Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Secuencia (5'–3')	Utilización
Lac5262Xho	CCGCTCGAGCGGCACGACGATGGTCGAGAA	Amplificación de la región aguas arriba de <i>MXAN_5262</i> para obtener la cepa portadora de la fusión transcripcional <i>5262-lacZ</i>
Lac5262BamHI	CCGGGATCCATGTGCACACTCCCTCGCCT	
Lac5263KpnI	CCGGTACCGGGAGCGCTGCTGTTACCC	Amplificación de la región aguas arriba de <i>MXAN_5263</i> para obtener la cepa portadora de la fusión transcripcional <i>5263-lacZ</i>
Lac5263BamHI	CCGGATCCATCGCGGTGCATCAGCGGG	
Lac5264KpnI	ACTGGTACCCGCTCTTCGACACCGGTGC	Amplificación de la región aguas arriba de <i>MXAN_5264</i> para obtener la cepa portadora de la fusión transcripcional <i>5264-lacZ</i>
Lac5264BamHI	TGTGGATCCATGGAGAACGGCTCCTTCG	
Lac5265KpnI	GACGGTACCGTGTGCTGGGCGTCGTCC	Amplificación de la región aguas arriba de <i>MXAN_5265</i> para obtener la cepa portadora de la fusión transcripcional <i>5265-lacZ</i>
Lac5265BamHI	GGAGGATCCATCAGGCTGCCCTTTGTGG	
62RTF	GTGGGTATGTCTACGTGGCC	Amplificación por RT-PCR del gen <i>MXAN_5262</i>
62RTR	GGTGAAGGACTGTGGTTGG	
65RT	CCCCGAACTCGGAGAAGAAC	Síntesis del ADNc para la RT-PCR
64RTF	CACCGTGTCCAGCTTCACCA	Amplificación por RT-PCR del gen <i>MXAN_5264</i>
64RTR	GCTTCACGTCGTCGAGGAAG	
CorE2(r2)USXbaI	GGATCTAGAGGCGCGGGGACCACGGTCGT	Amplificación de la región aguas arriba de <i>corE2</i> para obtener el mutante $\Delta corE2$
CorE2(r2)USBamHI	GTTGGATCCCAGGAGCGCGAGGACCTCCGG	
CorE2(r2)DSBamHI	GAGGGATCCCAGGGCGCGCCCTGCGGGCC	Amplificación de la región aguas abajo de <i>corE2</i> para obtener el mutante $\Delta corE2$
CorE2(r2)DSEcoRI	CGCGAATTCCGCGTTGACAACGATGCCCAT	
C2US	CCGGAGGTCCCTCGCGCTCCTG	Comprobación e identificación por PCR de los mutantes $\Delta corE2$ y $\Delta corE2_{CRD}$
CRDDS	TTACAGTCCGCCCGCCTCCTC	
CorE2F	CCTGGTACCGGCGGACGGATGGCACGGCGG	Amplificación del gen <i>corE2</i> y su región aguas arriba para obtener el plásmido pMT00
CorE2R	GTTGGATCCCTCCCTCCTGACGACGCGCCT	
5262USXbaI	GCTTCTAGAAGCGAGCACACCGACGACGCC	Amplificación de la región aguas arriba del gen <i>MXAN_5262</i> para obtener el mutante $\Delta 5262$
5262USBamHI	CCCGGATCCCATGTGCACACTCCCTCGCCT	
5262DSBamHI	CACGGATCCTGATGCACCGCGATGTGCGAG	Amplificación de la región aguas abajo del gen <i>MXAN_5262</i> para obtener el mutante $\Delta 5262$
5262DSEcoRI	AGCGAATTCCAGCGAGCCGGACAGGATGCCA	
5264USXbaI	CGGTCTAGAGGGGCTGGTCGCGGACCTCTC	Amplificación de la región aguas arriba del gen <i>MXAN_5264</i> para obtener el mutante $\Delta 5264$
5264USBamHI	GTGGGATCCCATGGAGAACGGCTCCTTCGT	
5264DSBamHI	GGCGGATCCTAACCGGGGCCAGGCGCGTC	Amplificación de la región aguas abajo

III. Materiales y métodos

5264DSEcoRI	GGGGAATTCATGGCGGCGTAGGGCAGGCCA	del gen <i>MXAN_5264</i> para obtener el mutante $\Delta 5264$
5265USXbaI	TGGTCTAGACGGGCTCATCTTCGTGGGGA	Amplificación de la región aguas arriba del gen <i>MXAN_5265</i> para obtener el mutante $\Delta 5265$
5265USBamHI	CGGGGATCCCATCAGGCTGCCCTTTGTTG	
5265DSBamHI	GAAGGATCCTAGTCACCTCGCGGCCCGGA	Amplificación de la región aguas abajo del gen <i>MXAN_5265</i> para obtener el mutante $\Delta 5265$
5265DSEcoRI	CGAGAATTCCTCTTCTGCTGCTGCGCCC	
3422GSP1	GAGCTGCACCCAGATGGAA	Síntesis del ADNc para el 5' RACE
APT17	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTT TTTTTTT	Síntesis de la segunda hebra a partir de la cola poliA durante el 5' RACE
3422GSP2Clon	GCAAAGCTTCCGGCAAGCCGAAGAGCA	Amplificación del producto del 5' RACE para posterior clonación y secuenciación
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
CorE2(CRD)USXbaI	AGCTCTAGAACGGGAGCTCAGCCGGGGGCT	Amplificación de la región aguas arriba del CRD de <i>corE2</i> para obtener el mutante $\Delta corE2_{CRD}$
CorE2(CRD)USBamHI	GGTGGATCCCCTGCTCCAGCCTCCGGCC	
CorE2(CRD)DSBamHI	TGCGGATCCGAGGAGGCGGGCGGACTGTAA	Amplificación de la región aguas abajo del CRD de <i>corE2</i> para obtener el mutante $\Delta corE2_{CRD}$
CorE2(CRD)DSEcoRI	GTGGAATTCATGGACCTCGGACACCCCTGG	
CorE2C169AF	GCTGGAGCAGGCGCCGGAACCACTTGC	Sustitución de la cisteína 169 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT69
CorE2C169AR	GCAAGTGGTTCGGCCGCTGCTCCAGC	
CorE2DelT172F	GCGTGCGGAACCTGCTGCCGCAAG	Delección de la treonina 172 en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT72
CorE2DelT172R	CTTGCGGCAGCAGGTTCCGCACGC	
CorE2C173AF	GTGCGGAACCACTGCCTGCCGCAAGGGC	Sustitución de la cisteína 173 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT73
CorE2C173AR	GCCCTTGCGGCAGGCAGTGGTTCGCAC	
CorE2C174AF	CGGAACCACTTGCGCCGCAAGGGCTGC	Sustitución de la cisteína 174 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT74
CorE2C174AR	GCAGCCCTTGCGGGCGCAAGTGGTTCG	
CorE2C178AF	GGGGCAGTCCACGGCGCCCTTGCGGCAG	Sustitución de la cisteína 178 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT78
CorE2C178AR	CTGCCGCAAGGGCGCCGTGGACTGCCCC	
CorE2D180AF	GGGCTGCGTGGCCTGCCCTGCG	Sustitución del ácido aspártico 180 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT80
CorE2D180AR	CGCAGGGGCAGGCCACGCAGCCC	
CorE2C181AF	CTCCTCGCAGGGGCGTCCACGCAGCCC	Sustitución de la cisteína 181 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT81
CorE2C181AR	GGGCTGCGTGGACGCCCCCTGCGAGGAG	
CorE2C183AF	CCCGCCTCCTCGGCGGGCAGTCCAC	Sustitución de la cisteína 183 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT83
CorE2C183AR	GTGGACTGCCCGCCGAGGAGCGGG	
CorEA185CF	GTGCGGTACGTGCTGCTCGCACGGCTGT	Sustitución de la alanina 185 por una cisteína en el plásmido pNG00 para obtener el plásmido mutante pMTCorE85
CorEA185CR	ACAGCCGTGCGAGCAGCACGTACCGCAC	
CorE2C108AF	GGAGACACAGGCGGCGACGGTCCGCTCC	Sustitución de la cisteína 108 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT08
CorE2C108AR	GGAGCGGACCGTCCGCGCTGTGTCTCC	
CorE2C110AF	GAGCGTGGAGACAGCGGCGCAGACGGTC	Sustitución de la cisteína 110 por una alanina en el plásmido pMT00 para obtener el plásmido mutante pMT10
CorE2C110AR	GACCGTCTGCGCCGCTGTCTCCACGCTC	
CorEProtFW	ACGGATCCAGCGACATGAATCAGGGAGCG	Amplificación del gen <i>corE</i> para introducirlo en el plásmido pGEX-4T-1
CorEProtRV	CGGAATTCTCATGCCCTTCGCGCTCCCGCA	
CorE2ProtFW	CCGGATCCTGCGAGGCTGGGGCCATGTCC	Amplificación del gen <i>corE2</i> para introducirlo en el plásmido pGEX-4T-1
CorE2ProtRV	GGGAATTCTTACAGTCCGCCCGCCTCCTC	

3.1.3. Instrumentos

Agitadores

Marca comercial	Instrumentos
IKA	Agitador orbital KS 130 Basic y vórtex MS1 Minishaker
Infors HT	Agitador orbital Labotron
Selecta	Agitador magnético Agimatic-S

Intrumentos de medición

Marca comercial	Instrumentos
Sartorius	Balanza M-Pact AX423 y balanza de precisión BP61S
Crison	pHmetro GLP 22
Agilent	Espectrofotómetro Varian Cary 50
Thermo scientific	Espectrofotómetro Spectronic 20D+ y NanoDrop 2000
Gilson	Propipeta Macroman

Electroforesis

Marca comercial	Instrumentos
Takara	Sistema de electroforesis horizontal Mupid-One
Jordan Scientific	Sistema de electroforesis horizontal Gel-o-Submarine
Bio-Rad	Fuente de alimentación Power-Pac 300, sistema de electroforesis horizontal Mini-Subcell GT, sistema de electroforesis vertical Mini-Protean y transiluminador Universal Hood II
Sigma-Aldrich	Sistema de electroforesis vertical

III. Materiales y métodos

Control de la temperatura

Marca comercial	Instrumentos
MMM Medcenter GmbH	Estufa Incucell
New Bruswick Scientific	Estufa con agitador orbital Innova 40
Binder	Estufa con refrigeración KB 400
Thermo scientific	Arcón de ultracongelación (-80°C)
Raypa	Autoclave Raypa steam sterilizer
Scotsman	Máquina de hielo Scotsman
Selecta	Baño Precisdig y baño Precistern
Labnet	Baño seco digital AccuBlock
Techne	Termociclador Progene
Bio-Rad	Termociclador MJ Mini Personal Thermal Cyler
Stuart Scientific	Horno de hibridación Hybridisation oven/shaker SI 20H

Centrífugas

Marca comercial	Instrumentos
Beckman Coulter	Centrífuga Allegra 64R
Eppendorf	Centrífuga 5415R
Hettich	Centrífuga Mikro 200R

Otros instrumentos

Marca comercial	Instrumentos
RoveBloc	Termosellador Futura Jr.
Bio-Rad	Secador de geles 583 Gel Dryer, cubetas para la electroporación Gene Pulser <i>E. coli</i> 1 mm gap y electroporador Gene Pulser Xcell
GE-Healthcare	Fraccionador ÄKTAprime plus
Branson	Sonicador 2000LPe
Olympus	Lupa de aumento Olympus SZ

3.1.4. Bases de datos y servidores

KEGG (Kanehisa *et al.*, 2014): Base de datos con la información de distintos genomas y rutas metabólicas, incluyendo el genoma de *M. xanthus* con datos sobre parálogos y ortólogos de cada uno de sus genes (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=mx).

NCBI: Portal del National Center for Biotechnology que proporciona acceso a multitud de bases de datos y herramientas bioinformáticas. De ellas destacar las más empleadas durante la realización de esta Tesis Doctoral:

Pubmed: Base de datos de publicaciones científicas para la búsqueda de información bibliográfica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Protein database: Base de datos de proteínas secuenciadas para la búsqueda de secuencias de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

BLAST: Herramienta bioinformática para la búsqueda de proteínas (BLASTP) y genes (BLASTN) en las bases de datos por homología con una secuencia dada (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

GenBank: Base de datos de genes y de nucleótidos secuenciados para la búsqueda de secuencias de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

SANGER: Portal del Instituto Sanger con acceso a la herramienta Artemis de visualización y anotación de genomas (Rutherford *et al.*, 2000) (<https://www.sanger.ac.uk/resources/software/>).

ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005): Plataforma online con acceso a multitud de herramientas bioinformáticas. Se empleó para el cálculo del peso molecular y el punto isoelectrico teóricos de las proteínas (http://web.expasy.org/compute_pi/).

ESPrIPT (Robert y Gouet, 2014): Herramienta que permite la edición de los alineamientos múltiples obtenidos mediante ClustalW para optimizar su visualización y mejorar su análisis (<http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>).

I-TASSER (Roy *et al.*, 2010): Servidor que integra algoritmos de gran precisión para la predicción de la estructura terciaria y función de las proteínas (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

NPS@ (Combet *et al.*, 2000): Al igual que el ExPASy se trata de una plataforma que da acceso a un gran número de herramientas bioinformáticas. Fue empleada para realizar los alineamientos múltiples de proteínas y ADN (ClustalW) (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html).

EMBL-EBI: Portal del European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute, que similarmente al NCBI, posee numerosas bases de datos y acceso a herramientas bioinformáticas. De ellas destacamos:

Pfam (Finn *et al.*, 2013): Base de datos para la identificación de dominios en una secuencia de proteínas (<http://pfam.xfam.org/>).

Interpro (Mitchell *et al.*, 2015): Al igual que la base de datos Pfam, Interpro también proporciona información sobre los dominios encontrados en una secuencia de proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011): Herramienta para el alineamiento de múltiples secuencias de proteínas o ADN que permite generar árboles filogenéticos de proximidad entre cada uno de los miembros (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

AmiGO (Gene Ontology Consortium, 2015): Base de datos que proporciona información funcional sobre genes y proteínas, y hace una clasificación de dichas funciones en distintos grupos (<http://amigo.geneontology.org/amigo>).

CBS: Portal del Centro para el análisis de secuencias biológicas de la Universidad técnica de Dinamarca, que proporciona un numeroso surtido de herramientas de análisis de secuencias, entre las que podemos destacar las empleadas para confirmar la presencia de péptido señal en proteínas:

LipoP (Juncker *et al.*, 2003): Herramienta para la detección de los motivos propios de la secuencia señal típica de lipoproteínas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>).

SignalP (Petersen *et al.*, 2011): Herramienta para la detección del péptido señal en la secuencia de aminoácidos de una proteína (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

TatP (Bendtsen *et al.*, 2005): Herramienta para la detección del péptido señal *twin-arginine* en la secuencia de aminoácidos de una proteína (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>).

SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998): Servidor para la predicción de dominios transmembrana en la secuencia de una proteína (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

WebLOGO (Crooks *et al.*, 2004): Herramienta para la creación de una representación de múltiples secuencias destacando la conservación de algunos motivos (<http://weblogo.berkeley.edu/>)

3.2. Métodos

3.2.1. Manipulación de microorganismos

3.2.1.1. Cultivo de microorganismos

3.2.1.1.1. Cepas de *E. coli*

Todas las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB, tanto sólido como líquido. Cuando fueron incubadas en medio líquido fueron sometidas a una agitación de 200 rpm y a 37°C de temperatura. En medio sólido también fueron incubadas a 37°C en placas con Bacto-agar al 1,5%, sembradas con la espátula de Driglasky o con asa de siembra. Para la inducción de proteínas en *E. coli* a pequeña escala, además de la incubación a 37°C fueron incubadas a 30°C y a 15°C para estudiar la producción en cada una de las condiciones. Finalmente todas las producciones de proteína a gran escala fueron llevadas a cabo a 37°C.

Cuando las condiciones lo requerían, las cepas de *E. coli* se sembraron en placas con X-gal y antibiótico para la selección de colonias portadoras de las diversas construcciones de plásmidos. Las distintas cepas se conservaron en medio LB con glicerol al 20% a -80°C.

3.2.1.1.2. Cepas de *M. xanthus*

Crecimiento vegetativo

Los cultivos de *M. xanthus* se realizaron tanto en medio líquido como sólido. El cultivo en medio líquido se realizó en tubos o matraces de medio CTT a 30°C y 300 rpm. Las cepas de *M. xanthus* cultivadas en medio sólido fueron incubadas a 30°C en placas de CTT con Bacto-agar al 1,5% sembrando directamente en estrías con asa de siembra, en sobrecapa en medio CTT semisólido (Bacto-agar al 0,8%), o concentrando un cultivo líquido de partida hasta una densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) de 15 y repartiéndolo en gotas.

Las cepas portadoras de genes de resistencia a antibióticos fueron cultivadas en CTT (sólido o líquido) con su correspondiente antibiótico. Para los análisis cualitativos de la actividad β -galactosidasa se añadió X-gal hasta una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$, y diversos metales y oxidantes al medio de cultivo sólido (Apartado 3.1.1.2). En los estudios de resistencia a metales se utilizaron distintas concentraciones de cadmio y zinc en medio líquido (Apartado 3.1.1.2). Las distintas cepas de *M. xanthus* fueron conservadas en medio CTT con glicerol al 20% a -80°C .

Ciclo de desarrollo

El ciclo de desarrollo fue estudiado en placas de medio CF sólido, que es escaso en nutrientes, para favorecer la formación de cuerpos fructíferos, a una temperatura de 30°C . En todos los casos las cepas fueron sembradas en gotas de 10-20 μl de una DO_{600} de 15, concentrándolas a partir de un cultivo líquido previo.

Al igual que durante el crecimiento vegetativo, para estudiar la actividad β -galactosidasa de las distintas cepas de forma cualitativa se añadió X-gal hasta una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$, y diversos metales y oxidantes a las concentraciones indicadas en cada experimento (Apartado 3.1.1.2). Del mismo modo, para analizar la sensibilidad a los metales durante el ciclo de desarrollo de las distintas cepas mutantes, se utilizaron varias concentraciones de cobre, cadmio y zinc (Apartado 3.1.1.2).

3.2.1.2. Preparación de células para transformación de ADN

3.2.1.2.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, las células de *E. coli* fueron transformadas por choque térmico, por lo que fue necesario permeabilizar previamente las células para facilitar la entrada del ADN. Para esto se hizo un tratamiento con CaCl_2 siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

Partiendo de 40 ml de cultivo en fase exponencial, se enfría en hielo durante 10 minutos para centrifugarlo a continuación a 4°C , a 4000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente el sedimento se resuspende en 40 ml de 10 mM MgSO_4 , se vuelve a incubar en hielo 15 minutos y se centrifuga de nuevo. Éste es de nuevo resuspendido en 20 ml de 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 8,

incubado en hielo otros 15 minutos y centrifugado en las condiciones anteriores. Por último las células fueron concentradas a un volumen de 2 ml en una solución de 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 20% glicerol (p/v) y se conservaron a -80°C hasta su uso.

3.2.1.2.2. Preparación de células electrocompetentes de *M. xanthus*

La introducción de ADN en células de *M. xanthus* se hizo por electroporación, por lo que la preparación de las células para hacerlas electrocompetentes consistió meramente en una serie de lavados con agua HPLC estéril para retirar todo el medio de cultivo y las sales del concentrado celular. Estos lavados se realizaron tal y como se detalla a continuación.

De un cultivo en fase exponencial de la cepa de *M. xanthus* a electroporar se toma 1,5 ml y se centrifuga a temperatura ambiente a 10000 rpm durante 2 minutos. El sedimento es resuspendido en 1 ml de agua HPLC estéril y se centrifuga de nuevo. Tras dos ciclos más de lavado y centrifugado, el sedimento, ahora varias veces concentrado, está listo para ser utilizado inmediatamente.

3.2.1.3. Introducción de ADN en células de *E. coli* y *M. xanthus*

3.2.1.3.1. Transformación por choque térmico (Hanahan, 1983)

Para introducir los distintos plásmidos utilizados durante esta Tesis Doctoral en células de *E. coli* se utilizaron aproximadamente 45 µl de las células competentes previamente preparadas y se incubaron durante 15-30 minutos en hielo junto con 1-10 ng del plásmido a transformar, o en el caso de mezclas de ligación durante 30 minutos con 5 µl de la mezcla de ligación.

A continuación la mezcla de células competentes y plásmido, o mezcla de ligación, es sometida a un choque térmico al pasarla rápidamente del hielo a un baño a 42°C, donde permanecerá dos minutos. Posteriormente se añade a la mezcla 0,4 ml de medio LB y se incuba a 37°C y a 200 rpm durante 30 minutos en el caso de una transformación de plásmido y durante 60 minutos en el caso de la transformación de una mezcla de ligación para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión de los marcadores presentes en el plásmido. Finalmente, se toman 100 µl de este cultivo y se siembran en LB sólido o líquido

con los componentes apropiados para la selección y diferenciación de las cepas portadoras de los marcadores presentes en el plásmido.

3.2.1.3.2. Electroporación de *M. xanthus* (Kashefi y Hartzell, 1995)

La electroporación se empleó para introducir el ADN plasmídico de interés en las distintas cepas de *M. xanthus*. Al sedimento de células electrocompetentes recién preparadas se le añadió aproximadamente 1 μg del ADN a transformar, previamente dializado en una membrana de diálisis Millipore durante 30 minutos, y se llevó a un volumen final de unos 40 μl . La mezcla fue transferida al fondo de una cubeta de electroporación de 1 mm de anchura y fue sometida a un choque eléctrico bajo las siguientes condiciones:

Voltaje:	650 V
Capacitancia:	25 μF
Resistencia:	186 Ω

Rápidamente tras la electroporación las células electroporadas se recuperaron en 1 ml de CTT y se transfirió a un tubo con otro 1,5 ml de medio de cultivo. Los 2,5 ml fueron incubados a 30°C en agitación durante 6 horas para permitir la integración del plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga y la expresión de los genes de resistencia a antibióticos presentes en él. Finalmente el cultivo fue sembrado en sobrecapa, con CTT semisólido sobre placas de medio sólido con el antibiótico correspondiente, con distintas cantidades del cultivo inicial.

3.2.1.4. Análisis de la expresión de genes de *M. xanthus*

Para analizar el perfil y niveles de expresión de los distintos genes de estudio, así como sus agentes y condiciones inductoras, se realizaron fusiones transcripcionales entre el codón de inicio de dichos genes y el gen de la β -galactosidasa de *E. coli lacZ*. Además, estas construcciones nos proporcionaron información sobre el papel regulador de algunas proteínas al introducir las en cepas mutantes de delección en fase para sus presuntos reguladores. Al analizar la actividad β -galactosidasa de estas cepas podemos extrapolar los resultados obtenidos, utilizando las unidades de actividad enzimática, a unidades de expresión del gen.

3.2.1.4.1. Construcción de fusiones transcripcionales *lacZ*

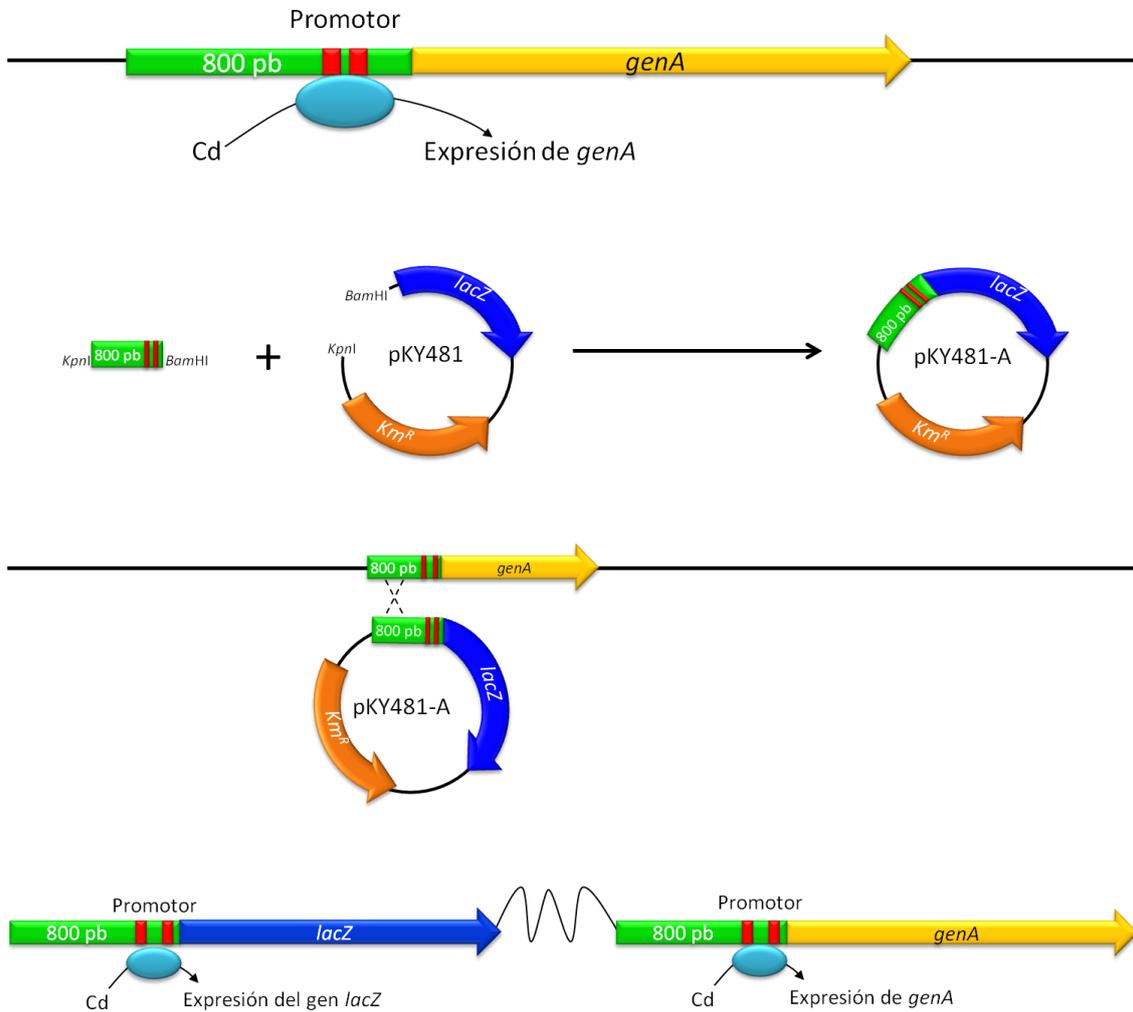


Figura 3.1. Modelo esquemático que ilustra la estrategia seguida para construir una fusión transcripcional *lacZ* con un gen hipotético *A* inducido por cadmio. Un fragmento de aproximadamente 800 pb conteniendo el promotor del gen que queremos estudiar se clona en el plásmido pKY481 y dicho plásmido se introduce en la bacteria para que se integre en el cromosoma por recombinación homóloga. En el ejemplo el promotor del gen *A* que responde a cadmio es capaz de inducir a su vez el *lacZ* de *E. coli*.

Para la construcción de estas fusiones transcripcionales se introdujo la secuencia promotora del gen de estudio en el plásmido pKY481 (Cho y Zusman, 1999). Este plásmido tiene el gen *lacZ* de la β -galactosidasa de *E. coli* a continuación del sitio de clonación múltiple (MCS), de forma que la secuencia promotora se pueda insertar en fase con el gen *lacZ*. Como agente selectivo el plásmido posee el marcador de resistencia a la kanamicina (Figura 3.1), de forma que las cepas que porten dicho plásmido serán capaces de crecer en medios con este antibiótico.

3.2.1.4.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa

3.2.1.4.2.1. Análisis cualitativo

La actividad β -galactosidasa puede observarse cualitativamente mediante la degradación de esta enzima del compuesto X-gal, que produce un compuesto de coloración azulada. De esta forma, añadiendo X-gal a los medios de cultivo podemos monitorizar la actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de fusiones transcripcionales *lacZ* y así estudiar la expresión de nuestro gen.

Esta técnica se empleó para encontrar las condiciones o agentes inductores de los genes de estudio, añadiendo a las placas de CTT o CF diferentes concentraciones de metales u oxidantes y 100 $\mu\text{g/ml}$ de X-gal. Las cepas portadoras de la fusión transcripcional fueron concentradas hasta una DO_{600} de 15 y sembradas en gotas de 10 μl , y se hizo un seguimiento para observar cambios en su coloración. Como control negativo se ha empleado la cepa silvestre de *M. xanthus* DZF1 que no debe presentar ninguna coloración adicional a la propia de la cepa. El análisis cualitativo también ha sido utilizado para hacer un seguimiento y un estudio previo al análisis cuantitativo, permitiéndonos hacer una estimación de la cantidad de actividad que tendrá la cepa finalmente.

El análisis de la coloración con X-gal también ha sido utilizado para seleccionar colonias de *E. coli* con plásmidos que permitan la selección blanco-azul.

3.2.1.4.2.2. Análisis cuantitativo (Kroos *et al.*, 1986)

Para hacer una valoración precisa de la actividad β -galactosidasa que presenta una cepa portadora de una fusión *lacZ* que nos permita extrapolarlo a patrones y niveles de expresión, así como comparar cepas entre sí, se cuantificó dicha actividad a partir de extractos de las cepas a analizar siguiendo los siguientes pasos:

Obtención de extractos de M. xanthus

Previamente a obtener el extracto celular de las cepas, éstas se sometieron a un cultivo en las condiciones bajo las que queremos analizar la expresión del gen de estudio. Para ello las cepas de *M. xanthus* fueron cultivadas en medio CTT líquido con antibiótico para mantener la presión selectiva sobre las células portadoras de la fusión transcripcional, y cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para llevarlo a una DO₆₀₀ de 15, y fue repartido entre las distintas placas a razón de 200 μ l de cultivo por placa en gotas de unos 20 μ l aproximadamente. Las células sometidas a diversos tratamientos fueron recogidas a distintos tiempos para evaluar el perfil de expresión de los genes en función del tiempo y se almacenaron a -20°C hasta la obtención del extracto.

A continuación, para obtener el extracto proteico, las células fueron resuspendidas en 200 μ l de tampón TM y sometidas a 10 pulsos de sonicación de 30 segundos de duración, manteniendo las muestras en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas presentes en el extracto. A las muestras procedentes de cuerpos fructíferos se les añadió 0,2 g de perlas de vidrio de un diámetro $\leq 106 \mu$ m para favorecer la ruptura de la pared celular bajo estas circunstancias. Finalmente las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13000 rpm en frío, tras lo cual el sobrenadante conteniendo el extracto celular fue separado y conservado a -20°C hasta la medida de la actividad β -galactosidasa, en ningún caso conservándolo más de una semana, minimizando así en la medida de lo posible la proteolisis (Kirazov *et al.*, 1993).

Medida de la actividad β -galactosidasa

Una vez obtenido el extracto proteico, se midió la concentración de proteínas totales de cada una de las muestras para igualar las concentraciones en la valoración de la actividad β -galactosidasa. Esta medida se basa en el cambio de color que sufre el sustrato ONPG a amarillo cuando es hidrolizado por la β -galactosidasa, que nos permite cuantificarlo como cambio en la absorbancia medida a una longitud de onda de 420 nm (A_{420}). Debido a la coloración amarilla de los extractos de *M. xanthus*, aparte de los controles negativos sin extracto se pusieron distintos controles con extractos pero sin ONPG, cuya A_{420} fue restada a la de las muestras a analizar. La reacción tuvo lugar a 37°C en 450 μ l de tampón Z con 1 mg/ml de ONPG (salvo en los controles de coloración) recién preparado, a los que se le añadieron 50 μ g de extracto de proteínas, completando hasta un volumen final de 500 μ l con tampón TM. El cambio de color fue monitorizado y la reacción se detuvo añadiendo 500 μ l de carbonato sódico 1 M cuando se alcanzaba una A_{420} de entre 0,6 y 0,9 aproximadamente, o tras 3 horas de reacción, anotando el tiempo requerido para que la reacción alcanzase la absorbancia deseada. Finalmente, la medida de la A_{420} de las distintas muestras fue utilizada para calcular la actividad específica mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Específica} = \frac{213 \cdot A_{420}}{\text{Volumen} \cdot \text{Concentración} \cdot \text{Tiempo}}$$

De este modo, la actividad β -galactosidasa se representa en nmol de O-nitrofenol producido por minuto por miligramo de proteína.

3.2.1.5. Mutantes de delección en fase

Con el fin de averiguar la función que puedan tener ciertos genes o regiones de éstos, en el ciclo de vida de *M. xanthus*, se construyeron mutantes de delección en fase para dichos genes en los que la región a deleccionar era eliminada del cromosoma de la bacteria manteniendo la pauta de lectura para evitar alterar la expresión de los genes situados en sentido 3' de la transcripción. Una vez obtenidos estos mutantes se realizaron pruebas fenotípicas para ver cómo afecta la pérdida de este gen o región al crecimiento vegetativo o al ciclo de desarrollo de *M. xanthus* así como estudios para analizar cómo ha afectado dicha mutación a la expresión de otros genes.

3.2.1.5.1. Construcción de mutantes de delección en fase

La construcción de estos mutantes se realizó en dos pasos: primero introduciendo un plásmido, diseñado para integrarse en el cromosoma mediante recombinación homóloga en un extremo de la región a deleccionar, y un segundo paso en el que se facilita la pérdida de dicho plásmido por un segundo evento de recombinación al otro extremo, de modo que se pierda junto con el plásmido la región de ADN que queremos eliminar. Para ello se diseñaron los plásmidos conteniendo un fragmento de 800 pb, aproximadamente, aguas arriba de la región a deleccionar y a continuación un segundo fragmento del mismo tamaño correspondiente a la región aguas abajo.

El vector empleado para esto fue el pBJ113, que contiene el gen de resistencia a kanamicina y el gen de la galactoquinasa, que confiere sensibilidad a la galactosa. El gen de resistencia a kanamicina servirá para seleccionar las cepas que hayan incorporado el plásmido en la primera fase de la construcción del mutante, mientras que el gen de la galactoquinasa nos permitirá obtener colonias que lo hayan perdido en la segunda fase. De este modo ambos fragmentos, tras ser amplificados por PCR, fueron digeridos en sus extremos por las enzimas para las que se les había incorporado sitios diana (generalmente *Xba*I y *Bam*HI para el fragmento aguas arriba, y *Bam*HI y *Eco*RI para el fragmento aguas abajo) e incorporados mediante una ligación en un plásmido pBJ113 digerido con las enzimas de los extremos (generalmente *Xba*I y *Eco*RI) (Figura 3.2). En los casos en los que la ligación de ambos fragmentos a la vez presentaba dificultades se incorporó primero uno de los fragmentos y posteriormente el plásmido con un inserto fue digerido para introducir el segundo. La mezcla de ligación fue transformada por choque térmico en *E. coli*, y las bacterias transformantes fueron cultivadas en medios con X-gal. El sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido pBJ113 está situado dentro del gen de la β -galactosidasa *lacZ* por lo que, tras la inserción de los fragmentos, el gen queda interrumpido y nos permite diferenciarlo de los plásmidos sin inserto, en los que la β -galactosidasa degrada el X-gal produciendo un compuesto de color azul.

III. Materiales y métodos

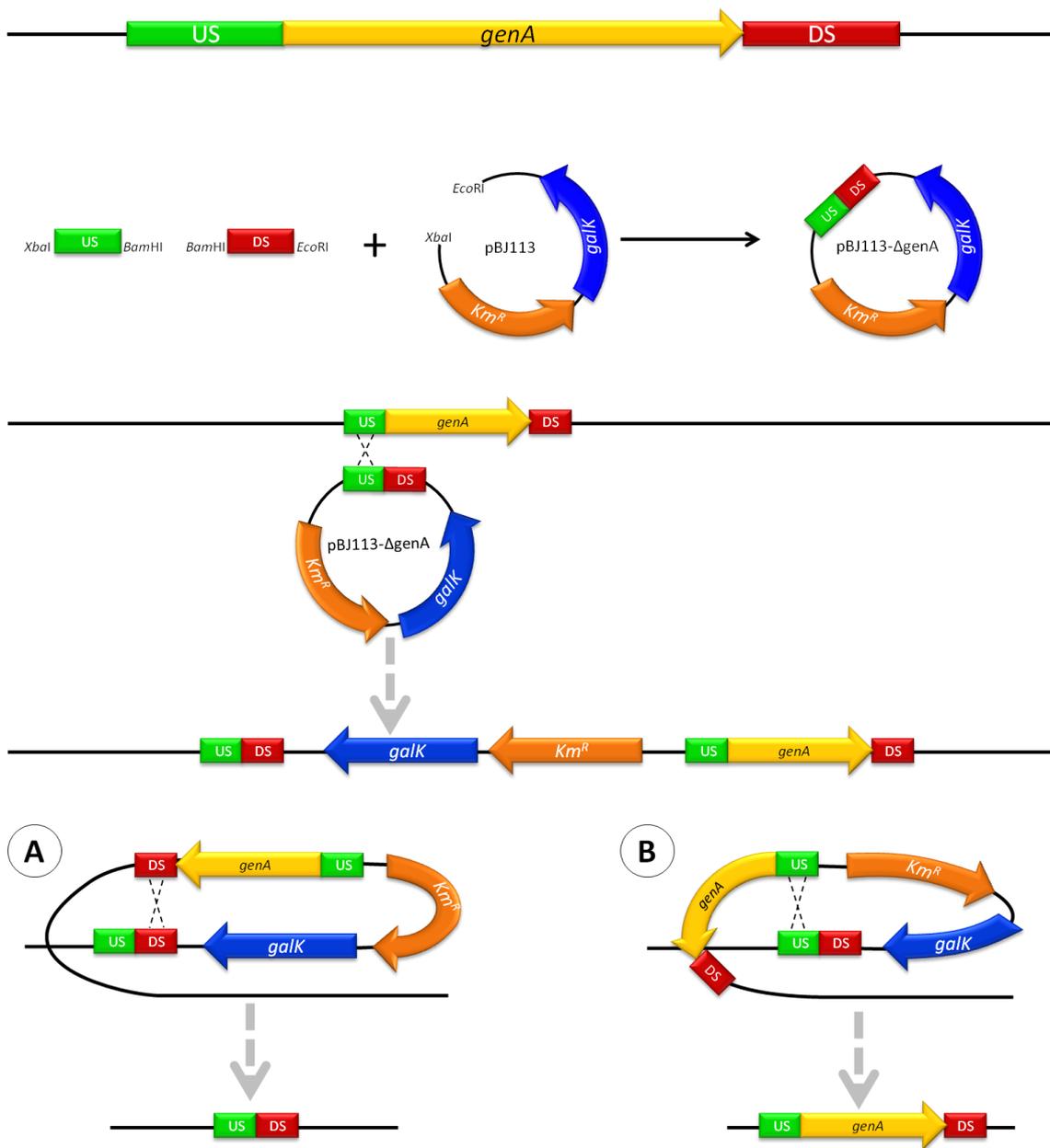


Figura 3.2. Modelo esquemático que ilustra la estrategia seguida para construir un mutante de deleción en fase. Un fragmento de aproximadamente 800 pb aguas arriba del gen a deleciónar y otro aguas abajo se clonan en el plásmido pBJ113 y dicho plásmido se introduce en la bacteria para que se integre en el cromosoma por recombinación homóloga. Una vez integrado en el cromosoma se favorece una segunda recombinación en la que podemos tener dos situaciones según dónde tenga lugar la recombinación. **A.** Obtención del mutante de deleción en fase. **B.** Reversión al genotipo silvestre.

Tras ser comprobados por secuenciación, los plásmidos fueron electroporados en *M. xanthus* y estas células fueron sembradas en sobrecapa en CTT con kanamicina para evitar el crecimiento de las bacterias que no hubieran incorporado el plásmido. Las colonias recombinantes fueron comprobadas por Southern blot para confirmar la integración del plásmido en el cromosoma por la región correcta. Esta recombinación podía tener lugar por cualquiera de los dos fragmentos, el de aguas arriba o el de aguas abajo, resultando en ambos casos la bacteria con el plásmido pBJ113 en su cromosoma y con ambos fragmentos duplicados a la que llamamos cepa intermediaria o merodiploide (Figura 3.2).

Para favorecer la pérdida del plásmido, se cultivaron las células intermediarias sin la presión selectiva de la kanamicina durante 24 horas, permitiendo que las bacterias que sufran una recombinación homóloga, perdiendo así el inserto, puedan sobrevivir. A continuación se realizaron diluciones seriadas que fueron plaqueadas en medio CTT con galactosa al 1%, que dificulta el crecimiento de las cepas portadoras del gen de la galactoquinasa. Debido a que la recombinación homóloga puede tener lugar por cualquiera de los dos fragmentos duplicados, existe la posibilidad de que vuelva a recombinar el mismo fragmento por el que se había insertado en el cromosoma, lo que haría que la cepa revierta a su genotipo silvestre (Figura 3.2.B). Por este motivo, las bacterias capaces de crecer en medio con galactosa, pero no en kanamicina, fueron seleccionadas para comprobar mediante Southern blot si se trataba de los mutantes de delección en fase o si por el contrario habían revertido a silvestres.

3.2.1.5.2. Caracterización fenotípica de mutantes de delección en fase

Una vez obtenidos los distintos mutantes de delección en fase se procedió a su caracterización fenotípica para dilucidar el rol del gen deleccionado durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*.

3.2.1.5.2.1. Caracterización fenotípica durante el crecimiento vegetativo

El fenotipo durante el crecimiento vegetativo fue analizado en medio líquido monitorizando el crecimiento del cultivo en distintas condiciones. Para ello se hizo un seguimiento de la DO₆₀₀ de la cepa silvestre y de los mutantes de delección en fase en tubos de 5 ml de CTT con o sin metales.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: se hizo un preinóculo en 5 ml de CTT de ambos cultivos y cuando ambos cultivos alcanzaron la fase exponencial (aproximadamente tras 24 horas de cultivo) se preparó un inóculo llevándolos a una DO_{600} de partida de 0,05 para que ambos inóculos se sincronizaran y se encontraran en el mismo estado de crecimiento. Tras un día de cultivo, se empleó el inóculo (aún en fase exponencial) para diluirlo en los tubos de CTT sin metales o con distintas cantidades de zinc o cadmio (indicadas en cada figura en la sección de Resultados). Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se midió la DO_{600} a los tiempos indicados en cada experimento y figura con un espectrofotómetro Spectronic 20D+.

En los casos en los que se pretrataron las células con metales para estudiar la tolerancia a éstos cuando los mecanismos de resistencia a metales están activados, se añadió al inóculo zinc o cadmio a las concentraciones finales de 0,2 mM y 0,01 mM, respectivamente, y tras 24 horas de cultivo se utilizaron para inocular los tubos de CTT empleados para la curva de crecimiento.

3.2.1.5.2.2. Caracterización fenotípica durante el ciclo de desarrollo

Para observar los defectos en la formación de cuerpos fructíferos se hizo un seguimiento del ciclo de desarrollo de los mutantes y de la cepa silvestre sobre placas del medio pobre en nutrientes CF. Si además queríamos observar diferencias en la resistencia a metales durante el ciclo de desarrollo, se añadieron al medio de cultivo los metales a estudiar.

Tanto las cepas mutantes como la silvestre fueron cultivadas en medio CTT líquido hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 24 horas) y dichos cultivos fueron utilizados para preparar el inóculo utilizado para el experimento. Para ello se llevaron a una DO_{600} de 0,05 y se cultivaron hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 1, de forma que todas las cepas estuvieran en el mismo estado a la hora de iniciar el ciclo de desarrollo. Estos cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en tampón TM hasta una DO_{600} final de 15. Las bacterias concentradas fueron repartidas en gotas de 10 μ l en las placas de CF con o sin metales, y la formación de cuerpos fructíferos fue monitorizada con una lupa de aumento Olympus SZ tomando fotografías a los tiempos indicados.

3.2.2. Manipulación de ADN

3.2.2.1. Extracción de ADN

3.2.2.1.1. Extracción de ADN cromosómico

Para extraer el ADN cromosómico de las células de *M. xanthus* con el fin de utilizarlo como molde para las reacciones de PCR o para emplearlo en las comprobaciones por Southern blot, se empleó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega. Se centrifugó 1 ml de cultivo líquido de una DO₆₀₀ de 1, aproximadamente, durante 5 minutos a 10000 rpm y se lisaron las células con el tampón de lisis del kit incubándolas a 80°C durante 5 minutos. Posteriormente se trató la muestra con la solución de ARNasa A del kit para degradar el ARN, incubándola a 37°C durante 15-60 minutos y se precipitaron las proteínas con la solución de precipitación incubando la mezcla en hielo durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo el ADN genómico fue sometido a una precipitación y a varios lavados con isopropanol y etanol al 70%, y finalmente fue rehidratado en 20-100 µl de solución de rehidratación, incubándolo a 65°C durante una hora o a 4°C unas 16 horas aproximadamente.

3.2.2.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico de células de *E. coli* se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche. Las células crecidas en placa se recogieron con el asa de siembra y se transfirieron a un tubo eppendorf, mientras que los cultivos líquidos fueron centrifugados a 15000 rpm durante 2 minutos para obtener el sedimento. A continuación las células se resuspendieron en el tampón de resuspensión conteniendo ARNasa para eliminar el ARN de la muestra y se lisaron con el tampón de lisis, que utiliza NaOH y SDS para romper las membranas celulares. Luego se añadió el tampón de unión, que le proporciona al ADN la capacidad de unirse a la columna de afinidad empleada posteriormente para la limpieza, y que permite que en frío las proteínas y restos celulares formen un precipitado floculante. Tras una centrifugación para separar el ADN del precipitado, el sobrenadante fue transferido a una columna de afinidad donde se realizaron varios lavados con las soluciones proporcionadas por el kit. Finalmente se añadieron a la columna

de afinidad de 40 a 100 μ l de tampón de elución, que vuelve a cambiar la propiedad de unión del ADN a la columna de afinidad, permitiendo su recuperación en el tampón de elución.

3.2.2.2. Electroforesis de ADN

La visualización de fragmentos de ADN de distintos tamaños en una misma muestra, así como la estimación del tamaño de distintos fragmentos de ADN se realizó mediante la técnica de electroforesis. Esta técnica se basa en la movilidad diferencial, según su tamaño, de las moléculas cargadas embebidas en una matriz expuesta a un campo eléctrico. De este modo, al correr simultáneamente una muestra de ADN de un tamaño y peso molecular conocidos y nuestra muestra, podemos deducir el tamaño del ADN contenido en nuestra muestra por comparación. En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos tipos de matrices para correr el ADN: geles de agarosa para fragmentos de un tamaño superior a 500 pb y geles de poliacrilamida para fragmentos de un tamaño inferior.

3.2.2.2.1. Electroforesis en geles de agarosa

Cada gel fue preparado con agarosa al 0,7% (p/v) en tampón TAE 1X. Para ello fue calentado hasta su completa disolución y vertido en el molde que permitiría preparar el gel con las dimensiones y el número de pocillos deseados. Tras su solidificación, se colocó en un sistema de electroforesis horizontal con TAE 1X (sistema de electroforesis horizontal Mini-Subcell GT de Bio-Rad, Mupid-One de Takara o Gel-o-Submarine de Jordan Scientific según el tamaño del gel) y se cargaron las muestras en los pocillos del mismo tras adicionarles el tampón de carga 5X que le proporcionaría densidad a la muestra para permanecer en el pocillo y color para hacer un seguimiento del estado de la electroforesis. Como referencia del tamaño del ADN se empleó el marcador de peso molecular Molecular Weight Marker II de Roche (ADN del fago λ digerido con *Hind*III).

El gel con las muestras cargadas se sometió a un campo eléctrico de 100 V durante unos 20-30 minutos para separar bien los fragmentos de ADN de distintos tamaños, salvo en el caso del Southern blot, en el que se empleó un voltaje de 20-25 V durante 16 horas aproximadamente. Una vez separados los fragmentos se interrumpió el campo eléctrico y el gel fue sumergido en una

solución de GelRed en TAE 1X durante 10 minutos para la tinción del ADN. Esta tinción permitió ver las bandas de ADN en el gel al ser iluminadas con la luz ultravioleta emitida por un transiluminador Universal Hood II de Bio-Rad. La posición de las bandas con respecto al marcador molecular permitió identificar el tamaño de los fragmentos de ADN, mientras que su intensidad fue utilizada para calcular su concentración.

3.2.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para fragmentos pequeños se utilizaron los geles de poliacrilamida como matriz para la electroforesis. Para la preparación del gel de poliacrilamida para ADN se utilizó una concentración final del 5% de acrilamida utilizando para ello la siguiente composición:

- 4,15 ml de solución de acrilamida 29:1 (29% acrilamida, 1% bis-acrilamida)
- 19,425 ml de agua MilliQ®
- 2,5 ml de TBE 5X
- 0,2 ml de persulfato amónico 10%
- 0,01 ml de TEMED

Al ser los catalizadores de la polimerización de la poliacrilamida, el persulfato amónico y el TEMED se añadieron después del resto de componentes. La solución se vertió en el molde para geles de poliacrilamida y se dejó polimerizar unos 15 minutos aproximadamente. El gel se sumergió en un sistema de electroforesis vertical Bio-Rad Mini-Protean con tampón TBE 0,5X y fue sometido antes de cargar la muestra a un campo eléctrico de 100 V durante 15 minutos para eliminar las partículas que pudieran interferir en la electroforesis. Posteriormente se procedió de manera similar a la descrita para los geles de agarosa, cargando la muestra previamente mezclada con tampón de carga 5X y el marcador molecular Molecular Weight Marker VIII de Roche (ADN del plásmido pUCBM21 digerido con *HpaII* junto con el mismo plásmido digerido con *DraI* y *HindII*) y sometiéndolo a un voltaje de 100 V durante 40-50 minutos. Finalmente se llevó a cabo la tinción del gel en una solución de GelRed en TAE 1X y se visualizó el ADN exponiéndolo a la luz ultravioleta emitida por un transiluminador.

3.2.2.3. Amplificación por PCR

La amplificación por PCR se basa en la síntesis *in vitro* de copias de un fragmento de ADN específico mediante el uso de una polimerasa termoestable que permita varios ciclos de amplificación y un par de fragmentos de ADN complementarios a la región a amplificar que sirven de cebadores para la reacción (Saiki *et al.*, 1988). Los diferentes oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación están listados en la **Tabla 3.1**, la mayoría de ellos con sitios de restricción incorporados para facilitar su posterior clonación.

Se emplearon polimerasas de dos marcas comerciales distintas: la PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase de Takara y la *Taq* DNA Polymerase de *Thermus aquaticus* de Sigma. La polimerasa PrimeSTAR es una polimerasa con corrección de errores que permite amplificar fragmentos de ADN con una gran precisión y un muy bajo porcentaje de mutaciones. Es por ello que esta polimerasa fue utilizada para la mayoría de procesos de clonación y construcciones en los que la integridad de la secuencia de ADN fuera prioritaria. La *Taq* ADN polimerasa de Sigma, por el contrario, permite la amplificación de fragmentos más específicos, eliminando la presencia de secuencias inespecíficas y con un alto porcentaje de éxito. Esta polimerasa se empleó para la amplificación de fragmentos que no estaban destinados a clonación ni a un experimento específico en el que la presencia de errores en la secuencia pudiera influir en el resultado, como por ejemplo para generar las sondas de hibridación para Southern blot o para la RT-PCR. La reacción de PCR tenía la siguiente composición con un volumen final de 50 µl:

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase		<i>Taq</i> DNA Polymerase	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
ADN molde	10-200 ng	ADN molde	10-200 ng
Tampón GC PrimeSTAR™ 2X	25 µl	Tampón de PCR 10X	5 µl
DMSO	5 µl	DMSO	5 µl
100 µM cebadores	1 µl de cada	100 µM cebadores	1 µl de cada
10 mM mezcla de dNTPs	4 µl	10 mM mezcla de dNTPs	4 µl
Polimerasa (5 unidades/µl)	0,5 µl	Polimerasa (2,5 unidades/µl)	0,5 µl
H ₂ O MilliQ®	Hasta 50 µl	H ₂ O MilliQ®	Hasta 50 µl

III. Materiales y métodos

Una vez terminada la mezcla de reacción se sometió a 30 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones según el tipo de polimerasa:

Método	PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase		<i>Taq</i> DNA Polymerase	
FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	TEMPERATURA	TIEMPO
DESNATURALIZACIÓN	98°C	10 min	94°C	10 min
AMPLIFICACIÓN (x30)				
-Desnaturalización	98°C	0,5 min	94°C	1 min
-Hibridación	50-70°C	0,5 min	50-70°C	2 min
-Elongación	72°C	1 min/Kb	72°C	1,5 min/Kb
ELONGACIÓN	72°C	12 min	72°C	12 min

El resultado de la reacción de amplificación el ADN se corrió en un gel de agarosa para confirmar la presencia del fragmento del tamaño deseado y se limpió con el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit de Roche. En este proceso de limpieza, el ADN se mezcló con el tampón de unión, que permitiría la retención del ADN a la columna de afinidad empleada para la limpieza, y se transfirió a dicha columna, por el que se hizo pasar la muestra mediante una breve centrifugación. La columna de afinidad fue posteriormente sometida a varios lavados con el tampón de lavado y se recuperó el ADN de él en 40-100 µl de tampón de elución.

3.2.2.4. Digestión enzimática de ADN

Para cortar el ADN por zonas específicas se emplearon las enzimas de restricción FastDigest de la casa comercial Fermentas (Thermo Scientific). Las enzimas empleadas reconocen secuencias palindrómicas concretas y las cortan dejando dos extremos cohesivos, lo cual facilita la ligación de dos fragmentos digeridos con la misma enzima en la orientación deseada. En la mayoría de los casos, dichas regiones específicas fueron introducidas mediante amplificación por PCR, utilizando cebadores con las regiones diana incorporadas, o se utilizaron las regiones presentes en el sitio de clonación múltiple de un vector. En otros casos se utilizaron las regiones de corte conocidas de una secuencia para identificarla mediante su digestión (digestiones de comprobación) o bien se utilizaron para digerir ADN genómico con el fin de generar fragmentos que nos permitieran identificar una cepa concreta mediante Southern blot.

La mayoría de las reacciones de digestión se hicieron en un volumen final de 100 μl , añadiendo a la muestra a digerir 10 μl de tampón 10X y 3 μl de enzima. En las digestiones simultáneas con dos enzimas de restricción se utilizaron 2 μl de cada una, y en cualquier caso nunca superando el límite de adición de enzima de 1 μl de enzima por cada 20 μl de reacción para evitar la actividad estrella de algunas enzimas. Esta mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 5-30 minutos según la enzima empleada y el tipo de muestra a digerir. En los casos que no permitían la digestión simultánea con dos enzimas se digirió con una y posteriormente se precipitó el ADN para retirar la primera enzima y digerirla a continuación con la segunda. Esta precipitación se llevó a cabo añadiendo 1 μl de acetato sódico 3 M y 25 μl de etanol absoluto por cada 10 μl de muestra, e incubándola a -20°C durante al menos 15 minutos, tras lo cual se centrifugó en frío durante otros 15 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70%.

Las digestiones de comprobación se llevaron a cabo en un volumen menor, ya que su finalidad no requiere grandes cantidades de producto digerido. Se digirieron 5 μl de muestra, a los que se les añadió 1 μl de cada enzima de restricción, en un volumen final de 20 μl para las digestiones con una sola enzima y en un volumen final de 40 μl para las digestiones con dos enzimas, añadiendo 2 y 4 μl de tampón 10X en cada caso, respectivamente.

3.2.2.5. Ligación de ADN

Para enlazar dos fragmentos de ADN con extremos compatibles se realizó una ligación con la enzima T4-DNA ligase de Roche. Para ligar un producto de PCR a un vector digerido se utilizó una proporción de 20 ng de vector por cada 40 ng de producto de PCR en un volumen final de 20 μl . Para determinar la concentración de ambos fragmentos a ligar se corrió 1 μl de cada muestra en un gel de agarosa y se determinó el peso molecular de cada fragmento como se explica en el apartado 3.2.2.2.1. A la mezcla de ambos fragmentos se añadieron 2 μl del tampón de la enzima ligasa proporcionado por la casa comercial, y la mezcla fue incubada a 37°C durante 5 minutos e inmediatamente fue transferida a hielo durante 10 minutos. A esta reacción se le añadió finalmente 1 unidad de enzima ligasa y se incubó a 16°C durante 16 horas aproximadamente.

La mezcla de ligación, conteniendo los fragmentos ligados con éxito y los vectores religados (vuelto a cerrar por su sitio de restricción), así como los fragmentos digeridos sin ligar, fue a continuación transformada en *E. coli* para la obtención de colonias separadas conteniendo un único plásmido. Estas colonias fueron resembradas y se les realizó una extracción de ADN plasmídico para observar el incremento de tamaño del vector al incorporar el producto de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa. Los plásmidos que tras la ligación insertaron un fragmento de ADN, fueron sometidos a digestiones de comprobación y a secuenciación para comprobar que la construcción era la deseada.

3.2.2.6. Purificación de ADN de geles de agarosa

Para separar un único fragmento de ADN de una muestra que contiene varios fragmentos de tamaños distintos se preparó un gel de agarosa que se corrió a un voltaje que permitiera una buena separación de los fragmentos y, tras la tinción y revelado del mismo, la banda fue recortada del gel con la ayuda de un bisturí bajo la luz ultravioleta de un transiluminador. Para separar el ADN de la agarosa se empleó el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit de Roche. Se determinó el peso del fragmento de agarosa en la balanza de precisión Sartorius BP61S y se añadieron 300 μl de tampón de unión por cada 100 mg. A continuación el gel fue disuelto en el tampón mediante una incubación a 56°C durante 10 minutos, agitando la mezcla en el vórtex cada 2-3 minutos. En cuanto la agarosa estuvo completamente disuelta se le añadieron 150 μl de isopropanol a temperatura ambiente por cada 100 mg de agarosa. A continuación, la mezcla se hizo pasar por la columna de afinidad proporcionada por el kit comercial y se le realizaron varios lavados con el tampón de lavado. Finalmente el ADN retenido en la columna de afinidad se recuperó en 40-100 μl de tampón de elución.

3.2.2.7. Secuenciación de ADN

Para la secuenciación de ADN, unos 10-20 μl del ADN a secuenciar a una concentración entre 100 y 200 ng/ μl y unos 5-10 μl de los cebadores utilizados para la secuenciación del fragmento a una concentración 10 μM se llevaron a la unidad de información genética del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada donde fueron secuenciados con el secuenciador 3130

Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Hitachi) que utiliza el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) por electroforesis capilar para determinar la secuencia de un fragmento de ADN siguiendo las instrucciones suministradas por el proveedor del secuenciador.

3.2.2.8. Southern blot

La técnica del Southern blot (Southern, 1975) se utilizó para identificar a una cepa mediante la hibridación de un producto de digestión del ADN genómico de tamaño conocido con una sonda marcada con digoxigenina. Esta técnica se ha dividido en cinco pasos: preparación del gel, transferencia de ADN, marcaje de ADN con digoxigenina, prehibridación e hibridación del ADN, y por último detección de las sondas hibridadas mediante reacción con fosfatasa alcalina.

3.2.2.8.1. Preparación del gel

Tras diseñar la digestión que nos permita identificar a nuestras cepas, se extrajo el ADN genómico de todas las cepas a analizar, así como el de la cepa silvestre a modo de control, tal y como se explica en el apartado 3.2.2.1.1. Finalmente se digirieron 10 μ l de ADN genómico en un volumen final de 100 μ l con la enzima seleccionada, y se corrió un gel preparativo con 8 μ l de cada muestra digerida para comprobar su correcta digestión y comparar su concentración. Este gel preparativo sirvió para cargar un gel de mayores dimensiones con 8-20 μ l de muestra según su concentración y el marcador de peso molecular *Molecular Weight Marker II*. Este gel se sometió a un voltaje de 20-25 V durante 16 horas, aproximadamente, para permitir una buena separación de los fragmentos del ADN genómico digerido.

El gel fue teñido con GelRed y se le tomó una foto en un transiluminador con una regla para tener una referencia de la posición de cada una de las bandas del marcador de peso molecular (ya que tras la transferencia ya no serán visibles). A continuación, el gel se lavó en solución de despurinación durante 3 minutos y, tras varios lavados en agua destilada, se lavó dos veces en solución de desnaturalización durante 15 minutos. Tras un breve enjuague en agua destilada de nuevo, se incubó con solución de neutralización durante 30 minutos y finalmente, tras lavarlo en agua destilada, se le añadió SSC 2X hasta la transferencia del ADN.

3.2.2.8.2. Transferencia de ADN

El ADN contenido en el gel de agarosa fue transferido a un filtro de nylon para su posterior hibridación y revelado. Para realizar esta transferencia se empleó una bandeja con SSC 20X sobre la que se colocó una placa de cristal para realizar todo el montaje posterior. Conectando la superficie de la placa de cristal con el SSC 20X se colocaron tres tiras de papel Whatman 3MM de la forma que se indica en la **Figura 3.3**. Sobre este papel se colocó el gel de agarosa lavado en SSC 2X, e inmediatamente sobre él una membrana de nylon, aproximadamente del tamaño del gel, previamente enjuagada en agua MilliQ® y lavada en SSC 2X. Sobre la membrana se colocaron tres trozos de papel Whatman 3MM del tamaño de la membrana humedecidos en SSC 2X. Por último se colocaron varias servilletas de papel secas y se colocó peso sobre ellas para mejorar la absorción. Todo este sistema permitió la circulación del SSC 20X de la bandeja por las tiras de papel Whatman 3MM, atravesando el gel y arrastrando el ADN con él, que quedará retenido en la membrana cuando la solución la atraviese para llegar al papel Whatman 3MM y a las servilletas de arriba. La transferencia se llevó a cabo durante unas 16 horas, reemplazando las servilletas húmedas por otras secas y rellenando la bandeja de SSC 20X cuando era necesario.

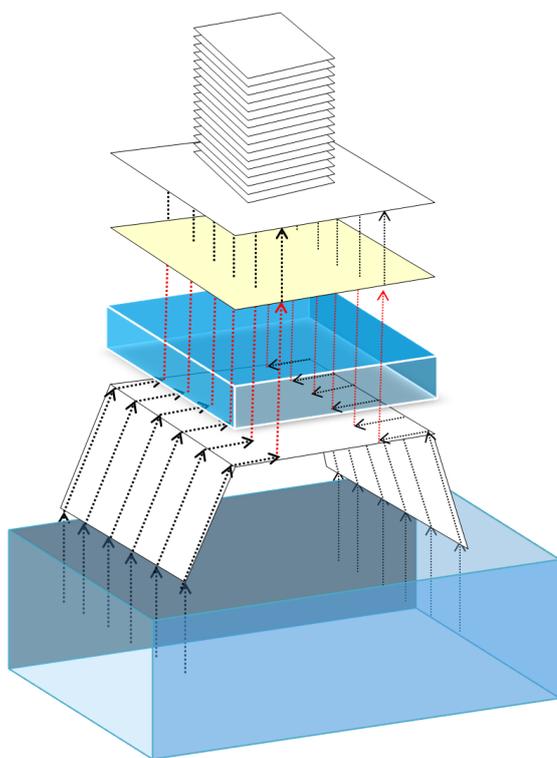


Figura 3.3. Representación esquemática de la transferencia del ADN del gel de agarosa a la membrana de nylon. La solución de SSC de la cubeta asciende por el papel Whatman (flechas negras) y atraviesa el gel de agarosa de forma vertical arrastrando con ella al ADN (flechas rojas) que quedará retenido en la membrana de nylon mientras que el resto de la solución continuará ascendiendo debido a la presión y la absorción de las servilletas.

Tras la transferencia se marcó el contorno del gel en la membrana para tener una referencia de las dimensiones exactas del gel, y se tiñó el gel con GelRed para asegurar que la transferencia había tenido lugar con éxito. La membrana se lavó en SSC 2X durante 10 minutos, y tras su secado se fijó el ADN a 80°C durante 2 horas. A continuación, la membrana se reservó hasta la prehibridación e hibridación con la sonda marcada con digoxigenina.

3.2.2.8.3. Marcaje de ADN con digoxigenina

Para crear la sonda que hibridara con el fragmento de ADN deseado se utilizó de molde un producto de PCR, generalmente de una de las regiones introducidas en el cromosoma de *M. xanthus*. Se utilizaron 15 µl de ADN (de 10 a 300 ng) y se desnaturalizaron calentándolos a 100°C durante 10 minutos. A continuación se enfriaron en hielo durante otros 10 minutos y se le adicionaron 2 µl de la mezcla de hexanucleótidos 10X, 2 µl de la solución DIG-DNA labeling mix 10X y 1 µl de la enzima Klenow. Se incubó la mezcla a 37°C de 4 a 20 horas y se precipitó adicionando 2 µl de 0,2 M EDTA, pH 8, 2 µl de 4M LiCl y 60 µl de etanol absoluto conservándolo a -80°C durante un mínimo de media hora. Finalmente se centrifugó en frío durante 15 minutos a máximas revoluciones y el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de tampón TE.

3.2.2.8.4. Prehibridación e hibridación del ADN

Tras haber fijado el ADN a la membrana, ésta se humedeció con SSC 2X antes de la prehibridación. A continuación se prehibridó la membrana con 8 ml de Dig Easy Hyb en un horno de hibridación SI 20H durante un mínimo de 2 horas a 42°C. Una vez realizada la prehibridación, se hirvió la sonda durante 10 minutos, se enfrió en hielo durante otros 10 minutos y se mezcló con otros 8 ml de Dig Easy Hyb hasta una concentración final de 5-25 ng/ml. Se sustituyeron los 8 ml de Dig Easy Hyb sin sonda de la membrana por la mezcla con la sonda recién preparada y se incubó en el horno de hibridación a 42°C durante unas 16 horas aproximadamente (Figura 3.4).

Tras la hibridación del ADN se realizaron una serie de lavados para retirar de la membrana toda la sonda que no se hubiera unido específicamente a nuestro fragmento deseado. Para ello se lavó dos veces la membrana durante 5 minutos con solución de lavado 2X, y otras dos veces durante 15 minutos con

solución de lavado 0,1X. Finalmente se le dio un enjuague de 1-5 minutos en tampón de lavado en agitación.

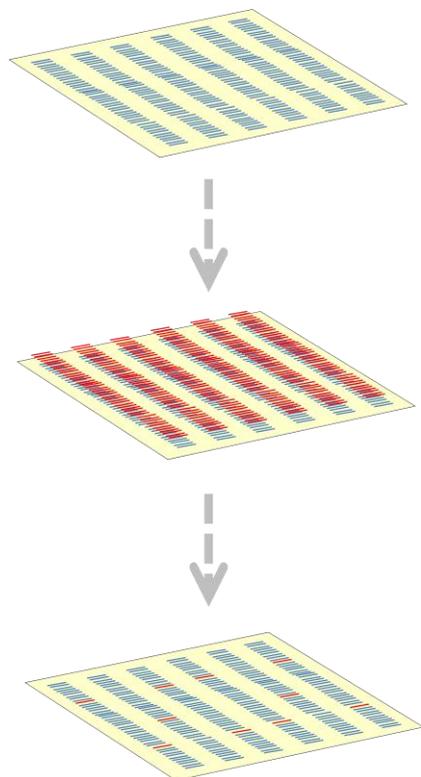


Figura 3.4. Representación esquemática de la fase de hibridación del ADN retenido en la membrana de nylon. El rastro continuo de ADN de cada una de las calles (líneas azules) se somete a una hibridación con la sonda marcada con digoxigenina específica para una de las bandas (líneas rojas). Tras una serie de lavados, sólo permanecerán los fragmentos de sonda marcada unidos al ADN de nuestro interés.

3.2.2.8.5. Detección de las sondas hibridadas mediante reacción con fosfatasa alcalina

Una vez que en la membrana sólo permanece la sonda unida al ADN específicamente (**Figura 3.4**), se sometió a una incubación con solución de bloqueo durante 30 minutos, con el objetivo de inmovilizar la sonda marcada con digoxigenina en la membrana. Tras esta incubación, se diluyó 10000 veces el anticuerpo anti-digoxigenina en 50 ml de solución de bloqueo. Esta solución de anticuerpo se adicionó a la membrana y se incubó durante media hora con el fin de que los anticuerpos se unieran específicamente a la sonda marcada presente en la membrana. Para retirar los anticuerpos que no se hubieran unido se lavó la membrana dos veces en tampón de lavado durante 15 minutos, de forma que sólo permanecieran en la membrana los anticuerpos unidos a la sonda (**Figura 3.5**).

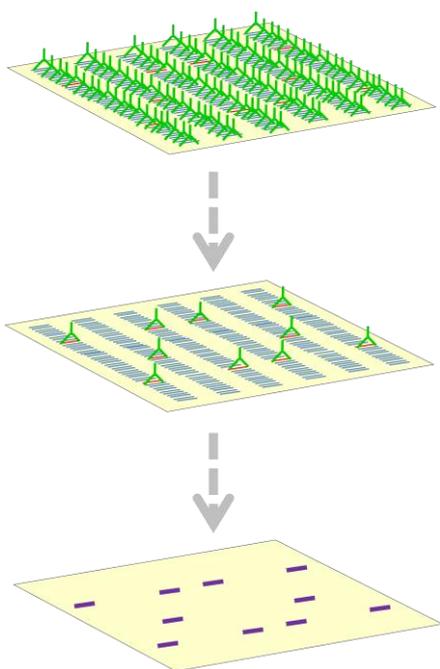


Figura 3.5. Representación esquemática de la fase de detección de la sonda. La membrana de nylon con la sonda marcada con digoxigenina unida al ADN se incubó con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (en verde), y tras varios lavados sólo permanecerán los anticuerpos unidos específicamente a la sonda marcada. Tras incubarla con la solución de desarrollo de color, los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina producirán una coloración morada en la membrana.

El anticuerpo anti-digoxigenina está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, de forma que nos permita detectar su presencia de un modo colorimétrico al revelar la membrana. Para detectar la presencia del anticuerpo se equilibró primero la membrana con tampón de detección durante 2-5 minutos y se prepararon 10 ml de solución de desarrollo de color añadiendo 200 μ l del sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP a 10 ml de tampón de detección. La membrana equilibrada se introdujo en una bolsa de plástico donde se introdujo la solución de desarrollo de color y, tras eliminar todas las burbujas de aire, se selló la bolsa y se guardó evitando la incidencia de la luz hasta que se observara el precipitado violeta como consecuencia de la reacción de la fosfatasa alcalina de los anticuerpos. Para detener la reacción se extrajo la membrana de la funda de plástico y se lavó durante 5 minutos en agua MilliQ®. La distancia entre los bordes del gel marcados a lápiz en la membrana y las bandas fue medida y comparada con la distancia entre los bordes del gel y el tamaño de las bandas del estándar de peso molecular en la fotografía tomada en las primeras fases del Southern blot, confirmando así si las bandas reveladas tenían el tamaño esperado y por lo tanto se trataba de la cepa correcta.

3.2.2.9. Mutaciones puntuales

Para las mutaciones de un sólo aminoácido en los factores sigma CorE y CorE2 se utilizó el kit comercial QuickChange II site-directed mutagenesis kit de Agilent. Los plásmidos pNG00 y pMT00 (conteniendo los genes *corE* y *corE2*, respectivamente) se utilizaron como molde para llevar a cabo una amplificación con un par de cebadores modificados para introducir la mutación deseada en los nuevos plásmidos. Estos cebadores fueron diseñados utilizando el programa QuickChange Primer Design Program de Agilent. La mezcla de reacción con un volumen final de 50 µl contenía lo siguiente:

Componente	Cantidad
ADN molde	10-100 ng
Tampón de reacción 10X	5 µl
DMSO	5 µl
10 µM cebadores	125 ng de cada
10 mM mezcla de dNTPs	1 µl
Polimerasa Pfu (2,5 unidades/ µl)	1 µl
H ₂ O MilliQ®	Hasta 50 µl

La mezcla de reacción se sometió a la amplificación por PCR con las condiciones descritas abajo (Tabla 3.2), y a continuación se añadieron 2,5 unidades de la enzima de digestión *DpnI* y se incubó durante 2 horas a 37°C. Esta enzima se encarga de digerir los plásmidos metilados y hemimetilados, de forma que el ADN molde quedaría degradado al provenir de una síntesis *in vivo*, mientras que el ADN producto de la amplificación, al provenir de una síntesis *in vitro*, no estará metilado y por lo tanto no se digerirá. Los plásmidos con la mutación puntual se transformaron en *E. coli* para obtener un único plásmido en cada colonia. Los plásmidos ya aislados fueron llevados a secuenciar para corroborar que llevaban la mutación deseada y descartar otras mutaciones adicionales.

Los plásmidos con las mutaciones deseadas fueron electroporados en las cepas mutantes de *M. xanthus* $\Delta corE$ y $\Delta corE2$ que además eran portadoras de fusiones transcripcionales para genes regulados por dichos factores sigma (*cuoB* y *MXAN_5265*, respectivamente). De esta forma se sustituía el regulador

III. Materiales y métodos

delecionado por otro con una mutación puntual y se podía monitorizar el efecto de dicha mutación sobre la expresión génica gracias a la fusión *lacZ*.

Tabla 3.2. Condiciones para la amplificación de los plásmidos sometidos a mutagénesis dirigida.

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO (min)
DESNATURALIZACIÓN	95°C	0,5
AMPLIFICACIÓN (x30)		
-Desnaturalización	95°C	0,5
-Hibridación	55°C	1
-Elongación	68°C	1/Kb
ELONGACIÓN	68°C	12

3.2.3. Manipulación de ARN

3.2.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial High Pure RNA Isolation kit. Todo el material empleado para la extracción fue debidamente tratado con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0,1% durante toda una noche para eliminar las ARNasas que pudieran degradar nuestra muestra. El agua MilliQ® se trató también con DEPC al 0,1% y se mantuvo en agitación hasta el día siguiente.

Se sembraron aproximadamente 1×10^9 células (0,2 ml de cultivo a DO_{600} de 15) en placas con los medios que establecieran las condiciones inductoras del ARN deseado y se recogieron entre las 2 y las 24 horas. Las células se resuspendieron en 0,2 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8, y se les añadieron 4 μ l de lisozima 50 mg/ml, tras lo cual se incubaron durante 10 minutos a 37°C para facilitar la lisis de las células. A continuación se le añadió 0,4 ml de tampón de lisis/unión y se transfirió la mezcla a la columna de afinidad proporcionada por el kit. Tras atravesar la muestra la columna, los ácidos nucleicos quedarían retenidos en ella gracias al tampón de unión, de forma que se colocaron 100 μ l de tampón de incubación de ADNasa conteniendo 10 μ l de ADNasa I directamente sobre la columna, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente para degradar el ADN y que quedara sólo el ARN. Después de la degradación del ADN por la ADNasa se lavó varias veces la columna con los tampones de lavado I y II y se recuperó el ARN de la columna en 50 μ l de tampón de elución y se repartió en alícuotas de 5 μ l.

Debido a que es importante la degradación completa de todo el ADN, se dio un tratamiento adicional a la muestra con ADNasa I, añadiendo 1 unidad de enzima por cada μ g de ARN extraído y 1 μ l de tampón 10X hasta un volumen final de 10 μ l. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se detuvo añadiéndole 1 μ l de solución Stop e incubándola a 70°C durante 10 minutos. Las alícuotas de 10 μ l de ARN se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.2.3.2. RT-PCR

La técnica de RT-PCR se empleó para sintetizar un ADN complementario (ADNc) a partir de un ARNm, para emplearlo a continuación como molde en una PCR y ver así los genes que comparten un solo ARNm utilizando cebadores específicos para dichos genes.

A una alícuota de 10 μ l de ARN (con una concentración mínima de 1 pg/ μ l) se le añadió 1 μ l de un oligonucleótido 10 μ M complementario al ARNm a analizar, 1 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM y 1 μ l de agua libre de ARNasas para completar los 13 μ l finales. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y se pasó inmediatamente a hielo para enfriarla, de forma que se facilitara la unión del cebador al ARNm. A continuación se preparó la siguiente reacción (las marcas comerciales de cada uno de los componentes están listadas en el apartado 3.1.2.4):

Componente	Cantidad
ARN + Primer + dNTPs	13 μ l
Tampón de la primera hebra 5X	4 μ l
0,1 M DTT	1 μ l
RNAse OUT® (40 unidades/ μ l)	1 μ l
SuperScript III RT (200 unidades/ μ l)	1 μ l

La mezcla fue incubada a 55°C durante 1 hora para que tuviera lugar la síntesis del ADNc completo y tras ello se inactivó la reacción a 70°C durante 15 minutos. Finalmente, para eliminar el ARN presente en la reacción, se utilizaron 2 unidades de ARNasa H, incubando la reacción a 37°C durante 20 minutos. Una vez obtenido, el ADNc se utilizó como molde para una PCR tal y como se explica en el apartado 3.2.2.3, utilizando la ADN polimerasa de sigma para minimizar la aparición de bandas inespecíficas, y los productos de amplificación se observaron en un gel de poliacrilamida para determinar la presencia o ausencia de amplificación partiendo del cDNA. Como control negativo para descartar una amplificación producto de contaminación por ADN se realizaron las mismas reacciones de PCR utilizando otra alícuota del mismo ARN como molde.

3.2.3.3. Amplificación rápida de extremos 5' de ADNc (RACE)

Para determinar experimentalmente el promotor reconocido por CorE se utilizó el kit comercial *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* de Invitrogen. Este método nos permite amplificar el extremo de un ADNc que, tras su secuenciación, nos permitirá conocer el extremo 5' del ARNm y por lo tanto sus regiones promotoras situadas en las posiciones -10 y -35 desde dicho punto.

Partiendo de una alícuota de 10 μ l de ARN (con una concentración entre 0,1 y 0,5 μ g/ μ l) se sintetizó el ADNc de cadena sencilla de forma similar a como se hizo para la RT-PCR, añadiéndole en este caso 5 μ l del cebador que anillaría con el ARNm (3422GSP1), y añadiendo 10 μ l de agua libre de ARNasas hasta lograr un volumen final de 25 μ l. Para facilitar la unión del cebador al ARNm se calentó a 70°C durante diez minutos y luego se precalentó a 50°C hasta que se completó la mezcla de la reacción. De forma separada se preparó la mezcla de la reacción con los siguientes componentes hasta un volumen final de 24 μ l:

Componente	Cantidad
Tampón de PCR 10X	5 μ l
25 mM MgCl ₂	5 μ l
0,1 M DTT	5 μ l
10 mM mezcla de dNTPs	2,5 μ l
Agua libre de ARNasas	6,5 μ l

Esta mezcla se precalentó también a 50°C y tras alcanzar esa temperatura se mezcló con los 25 μ l de mezcla del ARN con el primer y se le adicionaron 200 unidades de la retrotranscriptasa SuperScript II para completar los 50 μ l de volumen final. Esta reacción se incubó a 50°C durante 50 minutos para permitir la síntesis del ADNc y se detuvo a 70°C durante 15 minutos. El ADNc finalmente se trató con 1 μ l de *RNAse mix* a 37°C durante 30 minutos para eliminar el ARN original y dejar únicamente el ADNc. A la muestra de ADNc se le eliminaron los restos de enzimas y tampón limpiando con el kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit*, recuperándolo en 50 μ l.

A continuación se le añadió una secuencia repetida adicional al extremo 5' del ADNc. En el caso de *M. xanthus*, al ser una bacteria rica en G+C, tal y como sugiere el protocolo, en lugar de adicionar una cola de poli-citosinas, se añadió

III. Materiales y métodos

una cola de poli-adeninas. Para ello se cogieron 10 μ l de ADNc y se añadieron 5 μ l de tampón de extensión, 2,5 μ l de 2 mM dATP y 6,5 μ l de agua MilliQ® para llevarlo a un volumen final de 24 μ l. La mezcla se calentó a 94°C durante 2 ó 3 minutos, se enfrió en hielo, y se añadió 1 μ l de la enzima TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) para completar hasta los 25 μ l. La reacción tuvo lugar durante 10 minutos a 37°C y se paró mediante otra incubación de 10 minutos a 65°C. A continuación, se sintetizó la segunda cadena de ADN del ADNc utilizando el cebador APT17, que introduce una secuencia específica tras la cola de poli-adeninas (con la que anillará más adelante el oligonucleótido AUAP). Para ello se preparó la siguiente composición para la reacción:

Componente	Cantidad
ADNc con cola poliA	25 μ l
Tampón de PCR 10X	4 μ l
25 mM MgCl ₂	3,5 μ l
0,1 M DTT	5 μ l
10 mM mezcla de dNTPs	2,5 μ l
10 mM cebador APT17	1 μ l
Agua MilliQ®	8 μ l

Esta mezcla se precalentó a 50°C durante 2 minutos antes de añadirle 200 unidades de la retrotranscriptasa SuperScript II (con capacidad de utilizar también ADN como molde). La reacción tuvo lugar durante 50 minutos a 50°C, tras lo cual se limpió con el kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit*, recuperándolo de nuevo en 50 μ l.

Por último, se utilizaron 10 μ l del ADN de doble cadena como molde para una PCR en la que se utilizaría el cebador AUAP que se uniría a la extensión de la cola PoliA y un cebador específico (3422GSP2Clon) para el gen a analizar. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Hind*III y *Sal*I cuyas dianas habían sido incorporadas en los primers 3422GSP2Clon y AUAP, respectivamente, y fue clonado en el vector pBJ113 para facilitar su secuenciación.

3.2.4. Manipulación de proteínas

3.2.4.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes

La observación de proteínas se hizo mediante la técnica de electroforesis en geles de poli(acrilamida) desnaturizantes. El factor desnaturizante es el SDS, motivo por el que esta técnica es también conocida como SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Esta técnica, similar a la de electroforesis de ADN, separa las proteínas de una muestra en base a su peso molecular someténdolas a un campo eléctrico que atraviesa la matriz de poli(acrilamida).

Dado el tamaño de las proteínas a observar, se escogió un gel de 1 mm de grosor y con una concentración de acrilamida al 17,5%. La porción inferior del gel será la que separe las proteínas, mientras que en la porción superior se prepara una mezcla de acrilamida a una concentración mucho menor (5%) para que toda la muestra se concentre y parta de un mismo punto antes de penetrar en la porción inferior. Para esto se preparó primero el gel separador de acrilamida al 17,5%, se transfirió al molde para el gel y se le añadió un poco de isopropanol para garantizar que el límite superior quedara recto. Se dejó polimerizar el gel y se le retiró el isopropanol para preparar y añadir el gel concentrador de acrilamida al 5% con el peine para generar los pocillos que separarán cada una de las muestras. La composición de cada una de las porciones del gel es la siguiente:

Componentes	Acrilamida al 17,5% (Gel separador)	Acrilamida al 5% (Gel concentrador)
Acrilamida 30% (p/v)	11,7 ml	1,67 ml
Bis-acrilamida 1% (p/v)	1,47 ml	1,3 ml
1 M Tris-HCl pH 8,7	6,7 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,625 ml
SDS 10% (p/v)	0,2 ml	0,1 ml
H ₂ O MilliQ®	-	6,28 ml
TEMED	6,7 µl	5 µl
Persulfato amónico 10% (p/v)	67 µl	50 µl

Al igual que con los geles de poliacrilamida para el ADN, el TEMED y el persulfato amónico fueron los últimos componentes añadidos para que la polimerización no comenzara hasta que estuvieran presentes todos los componentes necesarios.

Todas las muestras se trataron a 100°C durante 10 minutos justo antes de cargarlas. Las muestras se corrieron, junto a 10 µl del estándar de peso molecular *SDS-PAGE Broad-Range Molecular Weight Standard* como referencia de peso molecular, a un amperaje constante de 30 mA en tampón de carrera hasta que el frente de azul de bromofenol del tampón de carga de las muestras llegó al final del gel.

3.2.4.2. Tinción de geles con azul coomassie

Para poder observar las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida se tiñeron los geles con azul coomassie para que éste se uniera a las proteínas, y luego se destiñeron para que sólo permanecieran teñidas las proteínas mientras que el gel volvía a su coloración transparente. Para esto se prepararon tres soluciones de tinción con azul coomassie, ácido acético glacial y proporciones decrecientes de isopropanol a las que se llamó solución de tinción I, II y III, y una solución IV de decoloración sin azul coomassie. El gel recién corrido se tiñó en solución de tinción I durante 16 horas, aproximadamente, tras lo cual se sustituyó por la solución de tinción II con la que se tiñó durante unas 8 horas. A continuación se retiró la solución de tinción II y se añadió la solución de tinción III en la que estuvo en agitación durante 16 horas, aproximadamente. Finalmente se eliminó la coloración azul del gel con la solución IV de decoloración hasta alcanzar el nivel de decoloración deseado.

Tras la tinción, para conservar los geles, éstos se secaron sobre papel Whatman 3MM, previamente humedecido en agua destilada, en un secador de geles en condiciones de vacío a 80°C durante tres horas.

3.2.4.3. Medida de la concentración de proteínas

La medida de la concentración de proteínas para conocer la eficiencia de la purificación de las proteínas, así como para ajustar los volúmenes empleados para la cuantificación de la actividad β -galactosidasa, se hizo mediante el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay.

Este reactivo al diluirse en una muestra con proteínas cambia de color rojo a azul, volviéndose de un azul más intenso a mayor concentración de proteínas, de forma que se puede estimar la concentración de proteínas mediante una lectura de la A_{595} de una solución con dicho reactivo.

Previamente a la medida se preparó una curva que sirviera de patrón utilizando diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (de 2 a 14 $\mu\text{g/ml}$ en incrementos de 2 $\mu\text{g/ml}$) diluida en agua hasta un volumen de 800 μl y 200 μl de reactivo. Tras esperar entre 5 minutos y una hora para que tuviera lugar la reacción se preparó la curva patrón de referencia midiendo su A_{595} . A continuación se diluyeron las muestras a medir manteniendo las mismas proporciones de 800 μl de muestra diluida en agua y 200 μl de reactivo, y se midió su A_{595} tras el tiempo de reacción adecuado, calculando así su concentración siempre que se mantuviera entre los límites del patrón, con el programa Varian Cary Win UV Concentration.

3.2.4.4. Purificación de proteínas a pequeña escala

Para purificar las proteínas CorE y CorE2 se utilizó el sistema de fusión GST (Glutathione S-Transferase). Este sistema fusiona la proteína GST a la proteína codificada por la secuencia nucleotídica clonada en el plásmido introduciendo un sitio de corte para la trombina entre ambas para su posterior separación. Antes de utilizar este sistema para la producción de cantidades suficientes como para hacer los estudios de metalación, se probó la inducción y la eficiencia de la purificación por este sistema a pequeña escala para descartar posibles futuros problemas.

3.2.4.4.1. Inducción de proteínas en *E. coli*

Para generar una fusión de la proteína a purificar con la GST se empleó el plásmido pGEX 4T-1 (GE-Healthcare), clonando ambos genes en fase con el sitio de inicio de la construcción. El codón de inicio ATG fue eliminado ya que en gran parte de las proteínas maduras éste se pierde (Meinzel *et al.*, 1993).

Ambos plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se incubaron 16 horas a 37°C en medio LB con ampicilina. De ahí se inocularon tres matraces de 60 ml de LB con 1 ml de cultivo y se dejaron crecer durante dos horas a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0,6 aproximadamente.

En ese momento se trasladaron dos de los matraces a 30°C y a 15°C para probar la inducción a distintas temperaturas. Tras la aclimatación del cultivo (15 minutos) se tomaron 11 ml del cultivo que servirían como tiempo 0 previo a la inducción, de los cuales 1 ml se utilizó para medir la DO₆₀₀, otro mililitro se centrifugó durante 1 minuto a 15000 rpm y se conservó el sedimento a -20°C, y los 9 ml restantes se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm conservando el pellet también a -20°C. A continuación se añadió a los cultivos IPTG a una concentración final de 0,1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante, y se tomaron 11 ml repartiéndolos de la misma forma que el tiempo 0 de cada uno de los tiempos indicados a continuación:

Cultivo a 37°C	Cultivo a 30°C	Cultivo a 15°C
1 hora	2 horas	2 horas
2 horas	4 horas	5 horas
4 horas	6 horas	10 horas
24 horas	24 horas	24 horas

3.2.4.4.2. Separación de extractos celulares

Para comprobar la eficiencia de la inducción y la disponibilidad de la proteína inducida se separaron tres fracciones del extracto celular, y se observó su contenido en proteínas en geles de poliacrilamida. Primero, para observar la inducción de la proteína se observaron las proteínas totales de cada una de las muestras de sedimento proveniente del mililitro centrifugado. Tras comprobar la efectividad de la inducción, para ver la disponibilidad de la proteína se emplearon los 9 ml centrifugados restantes para separar las fracciones soluble e insoluble, ya que la proteína debe estar soluble para purificarla por el método empleado.

Proteínas totales

A los sedimentos recogidos anteriormente de 1 ml de cultivo se les añadió 0,1 ml de tampón PBS y 0,1 ml de tampón de carga 2X, y se sonicaron en frío durante tres minutos a pulsos de 30 segundos. Las muestras se hirvieron a 100°C durante 10 minutos antes de cargarlas, y la cantidad de muestra a cargar en cada pocillo del gel de poliacrilamida se calculó según la siguiente fórmula para igualar la concentración de proteínas:

$$\text{Volumen a cargar} = \frac{235}{\text{DO}_{600} \cdot 10}$$

Donde 235 es la constante del tipo de gel utilizado y 10 es el factor de concentración utilizado. Se realizó la tinción del gel con azul coomassie y se observó la presencia de bandas de gran intensidad en la zona esperada para su peso molecular, comparando la eficiencia a los diferentes tiempos y temperaturas probados.

Fracción soluble

El pellet recogido anteriormente de 9 ml de cultivo se resuspendió en 0,9 ml de 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (manteniendo así el factor de concentración de 10) y se le añadieron 9 µl de un stock de lisozima a 10 mg/ml. Las muestras con la lisozima se incubaron a 30°C durante 15 minutos para permitir la lisis celular. A continuación se sonicaron todas las muestras durante 5 minutos en frío a pulsos de 30 segundos y se centrifugaron en frío durante 10 minutos a 14000 g. El sedimento se conservó para obtener la fracción insoluble, mientras que del sobrenadante se transfirieron 200 µl a un tubo eppendorf para analizar la fracción soluble. De estos 200 µl se tomaron 100 µl y se mezclaron con otros 100 µl de tampón de carga 2X. Después de hervir la muestra a 100°C durante 10 minutos, se corrió en un gel de poliacrilamida en la misma proporción que para las proteínas totales de la misma muestra. Tras la tinción del gel se pudo comparar cómo afectaba la temperatura y el tiempo de inducción a la cantidad de proteína en la fracción soluble.

Fracción insoluble

El sedimento conservado tras la centrifugación para obtener la fracción soluble se lavó dos veces en 750 µl de 20 mM Tris-HCl pH 7,5 centrifugándolo durante 5 minutos a 10000 g. Tras los lavados se resuspendió el pellet en 0,9 ml de SDS 1%. De estos 0,9 ml se tomaron también 100 µl y se mezclaron con otros 100 µl de tampón de carga 2X, utilizando el mismo procedimiento para cargar el gel que para la fracción soluble, y observando el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la proporción de proteína recombinante en la fracción insoluble.

3.2.4.4.3. Purificación por columnas GSTrap-4B

Una vez escogido el mejor tiempo y temperatura de inducción en *E. coli* para nuestras proteínas se procedió a su purificación por medio de las columnas GSTrap-4B. Para ello se repitió la inducción recogiendo 25 ml del cultivo sólo al tiempo y temperatura óptimos. De estos 25 ml se separó 1 ml para medir la DO₆₀₀ del cultivo y los 24 ml restantes se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm.

El sedimento se resuspendió en 2,06 ml de tampón de unión, previamente filtrado con un filtro de 0,45 µm, y se le añadieron 0,34 ml de inhibidor de proteasas 7X. Se sonicó la muestra durante 5 minutos a pulsos de 20 segundos y se centrifugó durante 5 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante se filtró, y las proteínas recombinantes se purificaron con un fraccionador ÄKTAPrime Plus y con la columna GSTrap-4B. La columna GSTrap posee una matriz de glutatión seferosa que retendrá en ella todas las proteínas GST del extracto celular. Tras el paso por la columna de tampón de unión se introdujo la muestra y se dejó pasar más tampón de unión para que toda la muestra que no había quedado retenida por el glutatión saliese de la columna. Estas muestras sin proteína purificada se recogieron para comprobar posteriormente en un gel de poliacrilamida la eficiencia de la unión a la columna. Una vez se alcanzó el punto en que las fracciones obtenidas de la columna carecían de proteínas, se introdujo el tampón de elución, conteniendo un exceso de glutatión reducido para que la proteína se separara de la columna. Estas muestras de proteína recombinante purificada se recogieron en alícuotas de 1,5 ml y se corrieron en un gel de poliacrilamida a un volumen de 25 µl de muestra con 25 µl de tampón de carga 2X. Para separar la porción GST de nuestra proteína se digirió con 10 µl de solución de trombina (1 U/µl en PBS) por cada mg de proteína en el eluido a temperatura ambiente de 2 a 16 horas.

3.2.4.5. Purificación de proteínas a gran escala

Para los estudios de unión a metales de CorE y CorE2 se produjeron ambas proteínas purificadas en presencia y ausencia de metales por el mismo sistema GST, pero con la finalidad de obtener mayores cantidades de proteína y analizarlas posteriormente. Estas producciones se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona.

3.2.4.5.1. Inducción de proteínas en *E. coli*

La inducción de ambas proteínas en presencia y ausencia de metales se realizó en todos los casos del mismo modo. Se prepararon 5 litros de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 mg/ml repartidos en 5 matraces de 900 ml y uno de 0,5 litros. El matraz de 0,5 litros se inoculó con la bacteria de *E. coli* con el plásmido transformado y se dejó a 37°C en agitación de 220 rpm durante 16 horas aproximadamente. Este cultivo sirvió de inóculo para la inducción, añadiendo 100 ml en cada uno de los 5 matraces de 900 ml para completar 1 litro de cultivo. Tras dejarlo crecer unos 90 minutos se le añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM, y media hora después se añadió 1 ml de 0,5 M sulfato de cobre, de 0,3 M cloruro de zinc o de 0,3 M cloruro de cadmio a cada uno cuando era necesario.

El cultivo con el IPTG y los metales se incubó durante 2 horas y media a 37°C en agitación a 220 rpm, y se centrifugó en frío a 7700 rpm durante 5 minutos. El sedimento centrifugado se resuspendió en 125 ml de PBS pH 7,3 y se le añadió 125 µl de β-mercaptoetanol. A continuación se sonicó todo en frío durante ocho minutos a pulsos de 0,6 segundos. Para obtener el extracto se centrifugó la muestra a 4°C y 12000 rpm durante 40 minutos, conservando el sobrenadante.

3.2.4.5.2. Purificación por matriz de glutatión sefarosa

Para purificar las proteínas inducidas se utilizó una matriz de perlas de glutatión sefarosa 4B. Se prepararon 3 tubos Falcon con 0,9 ml de perlas de glutatión sefarosa y se lavaron con 10 ml de PBS pH 7,3 frío centrifugándolas a 500 g durante 3 minutos a 4°C. Una vez lavadas se les añadió el sobrenadante del extracto obtenido anteriormente y se incubaron con él durante una hora permitiendo que nuestras proteínas recombinantes se unieran a la matriz de glutatión sefarosa (**Figura 3.6**). A continuación, para retirar las proteínas no unidas, las perlas se lavaron tres veces con PBS pH 7,3 frío burbujeado con argón, centrifugando a 500 g durante 5 minutos a 4°C.

Para separar nuestra proteína de la matriz se resuspendió en 475 µl/l de PBS, pH 7,3, frío burbujeado con argón con 25 µl/l de trombina, y se incubó unas 16 horas, aproximadamente, a 17°C para que tuviera lugar la digestión (**Figura 3.6**). La porción líquida se recogió y se centrifugó dos veces durante 2

minutos a 13000 rpm para eliminar las perlas restantes. A continuación se utilizó una columna Centriprep (previamente lavada con agua destilada en frío a 2500 g durante 30 minutos) para concentrar la muestra, centrifugándola en frío a 2500 g hasta reducir el volumen a 500 μ l aproximadamente.

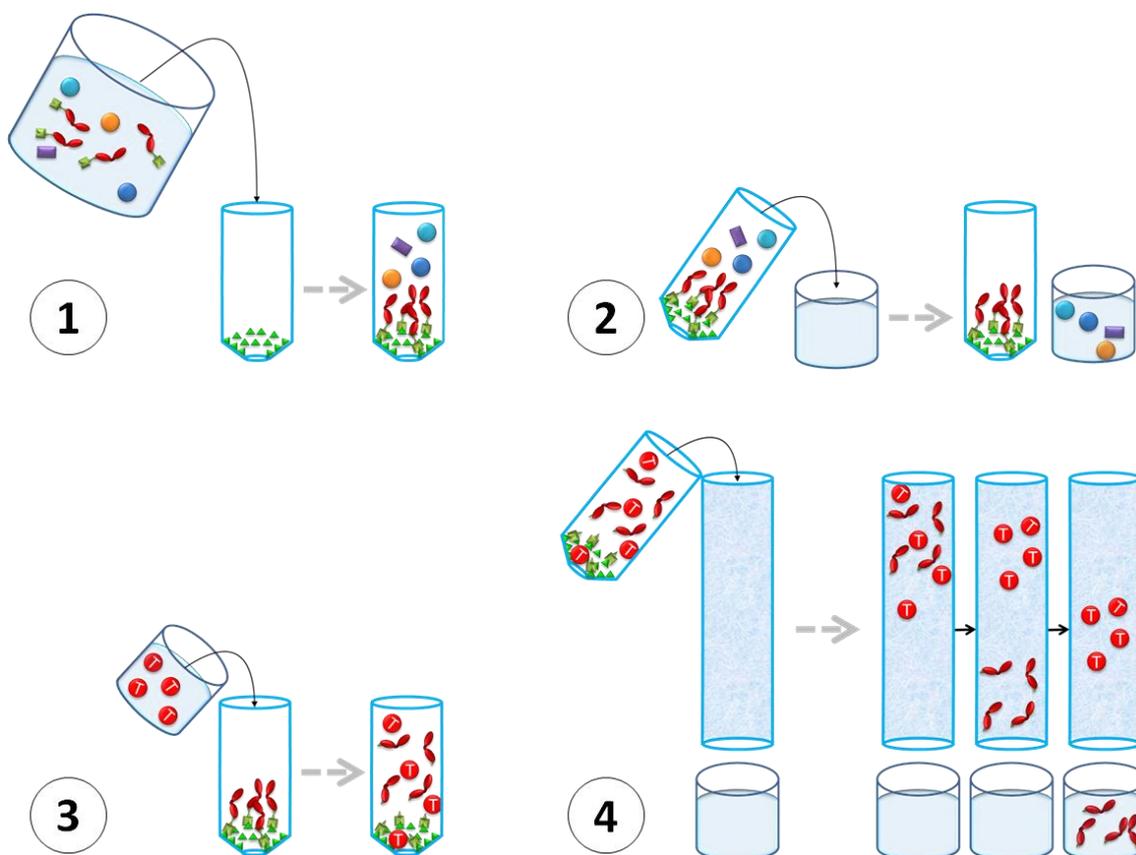


Figura 3.6. Modelo esquemático que ejemplifica la estrategia seguida para purificar las proteínas CorE y CorE2. 1. El extracto de proteínas con el factor sigma (rojo) fusionado a la GST (cuadrados verdes) es transferido a un tubo Falcon con las perlas de glutatión sefarosa (triángulos verdes). 2. Tras varios lavados, en el tubo Falcon sólo permanecerá la matriz con las perlas de glutatión sefarosa unidas a nuestra proteína. 3. Tras añadir la trombina e incubar la muestra con ella, el factor sigma se separa de la GST unida al glutatión sefarosa. 4. La trombina y el factor sigma se separan por peso molecular mediante una columna de FPLC.

Finalmente, para separar la trombina de nuestra proteína se utilizó una columna de FPLC Superdex-75 10/300 GL con un Fraccionador ÄKTAPrime Plus, recuperando la muestra a un flujo constante de 0,8 ml/min de 50 mM Tris-HCl, pH 7 (Figura 3.6). El seguimiento de la absorbancia a 215 nm, 254 nm y 280

nm (específicos para enlaces peptídicos, enlaces metálicos y aminoácidos aromáticos, respectivamente) nos permitió separar fracciones distintas de nuestra proteína que podrían tener características diferentes.

3.2.4.6. Estudios de unión de metales a las proteínas

Las producciones de proteínas purificadas fueron llevadas al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona para su análisis por parte de personal especializado. Los estudios contenidos en esta Tesis Doctoral incluyen ICP-OES (espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente), espectrometría de masas, y análisis del espectro UV-Vis (ultravioleta-visual) y de DC (dicroísmo circular).

3.2.4.6.1. ICP-OES

Esta técnica conocida como ICP-OES, también llamada ICP-AES (Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente) nos permite cuantificar la cantidad de átomos de un elemento en concreto presente en una muestra. El plasma acoplado inductivamente es capaz de atomizar los átomos de la muestra y excitar los electrones más externos de los átomos, para que a continuación seamos capaces de medir la emisión característica de cada átomo liberada al relajarse los electrones excitados. Para cuantificar la cantidad de átomos presentes en la muestra se preparó una curva patrón con cantidades conocidas de los elementos a analizar (azufre, zinc, cadmio y cobre). Las longitudes de onda utilizadas para la detección de cada elemento y los límites mínimos de detección de cada uno con esta técnica se muestran a continuación:

Elemento	Longitud de onda	Límite de detección
S	182,040 nm	0,2 ppm
Zn	213,856 nm	0,1 ppm
Cu	324,803 nm	0,05 ppm
Cd	228,802 nm	0,05 ppm

La cantidad de azufre se utiliza para estimar la cantidad de nuestra proteína presente en la muestra relacionándola con la cantidad de aminoácidos con átomos de azufre que tiene la proteína (cisteínas y metioninas) mediante la fórmula:

El factor de dilución se calculó en base al peso de la muestra tras diluirla en 3 ml de HNO₃ (medio ácido para facilitar la atomización de la muestra) dividido entre el peso de la muestra antes de diluirla. Con la concentración en mol/l de cada uno de los metales en las muestras podemos calcular cuántos átomos de metal hay por cada proteína gracias a la fórmula:

$$\frac{\text{---}}{\text{---}}$$

De cada una de las muestras se hicieron dos réplicas, con dos volúmenes diferentes de muestra (50 µl y 100 µl), de forma que una vez obtenidos los resultados se pudo calcular la desviación estándar entre ambas medidas.

3.2.4.6.2. Espectrometría de masas

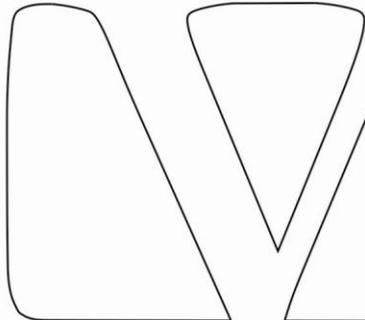
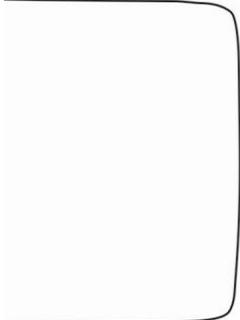
La espectrometría de masas nos permite analizar las distintas moléculas de una muestra separándolas en función de su masa y su carga. El resultado nos proporciona una gráfica con la intensidad en el eje de ordenadas y la relación masa/carga en el eje de abscisas. A partir de la intensidad podemos estimar la proporción de cada una de las moléculas de nuestra muestra, mientras que a partir de la relación masa/carga podemos averiguar la masa de cada una de las moléculas. Conociendo la masa teórica de nuestra proteína se puede saber qué metales hay unidos a ella.

La masa de la proteína puede averiguarse con la fórmula $P = Z \times m - Z$, donde P es el peso molecular exacto del péptido, Z representa la carga del ión y m la masa representada en el eje de abscisas. Esto nos permitió averiguar con gran precisión los distintos pesos moleculares observados en nuestra proteína, y analizando las diferencias entre ellos se pudo identificar qué elementos estaban enlazados a la misma provocando estos cambios en su peso molecular. Se realizaron dos tratamientos para cada muestra, uno a pH neutro y otro a pH ácido. Esto es porque, debido a su similar peso molecular, es imposible distinguir entre los átomos de cobre y de zinc enlazados a la proteína, pero al dar un tratamiento ácido, los metales divalentes se separan de la proteína, permitiendo observar la presencia de Cu⁺ en nuestras muestras.

3.2.4.6.3. Análisis del espectro UV-Vis y de DC

Los análisis de espectros de UV-Vis (espectro ultravioleta-visible) y de DC (Dicroísmo Circular) pertenecen al ámbito de la espectroscopía óptica, que proporciona información sobre las características estructurales de una molécula utilizando radiación electromagnética en la región del ultravioleta-visible. La base de estas técnicas es la absorción o emisión de energía por parte de una molécula, midiendo la intensidad y longitud de onda de la energía radiada. Ambas técnicas son dos formas distintas de analizar la misma interacción de la luz polarizada con moléculas ópticamente activas, pero mientras que los espectros de UV-Vis nos proporcionan información sobre la absorción de energía de la luz polarizada incidente por parte de las moléculas, el DC analiza la capacidad de las moléculas de desviar un haz de luz polarizada en un plano, emitiendo en su lugar un haz de luz polarizado elípticamente.

En los casos en los que la calidad del espectro lo permitía, los datos de dicroísmo circular se utilizaron con el programa bioinformático CDPro (Sreerama y Woody, 2000) para estimar la proporción de hélices alfa presentes en nuestra muestra. Para ello se determinó dicho valor con los algoritmos CDSSTR, SELCON3 y CONTINLL, y se utilizó aquél que daba un menor error NRMSD (*Normalized Root-Mean-Square Deviation*). Cabe señalar que, aunque el dicroísmo circular es una técnica muy útil para estudiar la estructura de las proteínas, no se conoce la base teórica en profundidad suficiente que explique la relación entre el espectro y la estructura molecular, por lo que las herramientas empleadas se basan en datos fundamentalmente empíricos.



Resultados

IV. Resultados

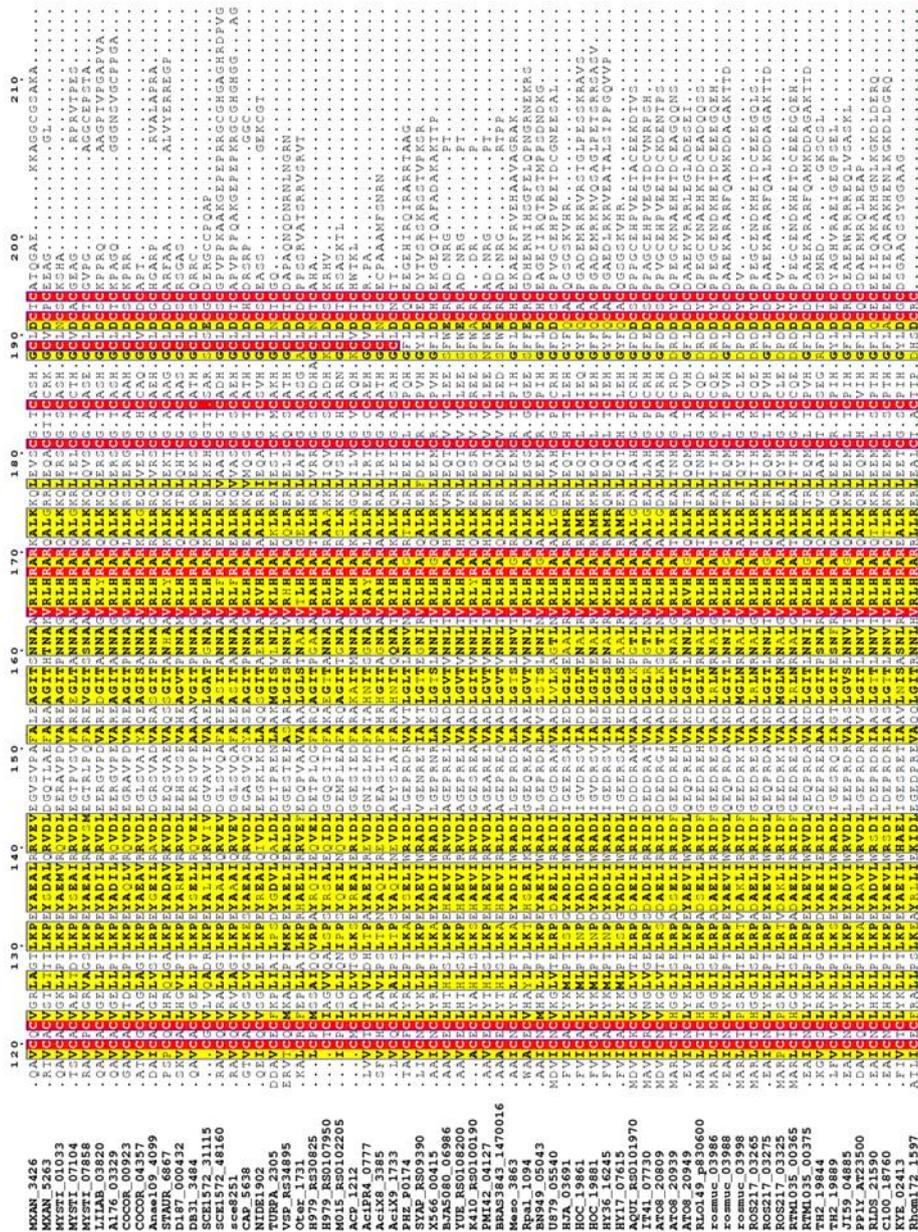
4.1. Factores sigma de tipo CorE (grupo ECF44). Análisis genómico

El establecimiento de los factores sigma de tipo CorE como un nuevo grupo de factores sigma de tipo ECF (ECF44) (Mascher, 2013), de los cuales CorE (MXAN_3426) es el único miembro caracterizado, ha creado la necesidad de profundizar en lo que se conoce sobre estos metalorreguladores. En el momento de su descubrimiento sólo se encontraron 21 factores sigma en total pertenecientes a este grupo (Gómez-Santos *et al.*, 2011). En la actualidad, tras realizar un BLAST utilizando la secuencia de CorE como referencia, podemos encontrar hasta 67 factores sigma del grupo ECF44 en los genomas anotados, más de tres veces la cantidad descrita tan solo cuatro años antes (Figura 4.1).

De estos 67 factores sigma de tipo CorE, 17 pertenecen al orden *Myxococcales* y comparten secuencia con algunas acidobacterias y algunos miembros de los órdenes *Nitrospirales*, *Opitutales*, *Spirochaetales* y *Verrucomicrobiales*. Por otra parte, 37 de las bacterias que contienen un factor sigma del grupo ECF44 pertenecen al grupo de las alfa proteobacterias. Esto parece indicar que este tipo de factores sigma se encuentra muy extendido dentro de las proteobacterias, ya que son en las alfa y delta proteobacterias donde se encuentran un mayor número de reguladores de este tipo.

No obstante, pese a que esto pudiera sugerir que por motivos filogenéticos los factores sigma de las delta proteobacterias pudieran ser más similares a los de las alfa proteobacterias, no es así. Los encontrados en las acidobacterias son mucho más similares en secuencia a los de las delta proteobacterias, separando a los factores sigma de tipo CorE de las alfa proteobacterias como un grupo de reguladores más distanciado del resto, siendo la presencia de una cisteína (Cys189 en CorE) en los factores sigma de las delta proteobacterias y similares la diferencia más notable entre ambos grupos (Figura 4.1).

Figura 4.1. Alineamiento múltiple de la secuencia de los factores sigma de tipo CorE. En él se ven señalados los dominios $\sigma 2$ y $\sigma 4.2$ (en azul), situado entre ambos un motivo CxC conservado en todos los factores sigma pertenecientes a este grupo (en rojo) y el dominio rico en cisteínas (CRD, en verde). Los factores sigma con una cisteína en la posición 189 en CorE aparecen en la porción superior del alineamiento, mientras que los factores sigma típicos de las alfa proteobacterias que carecen de dicho residuo se encuentran en la porción inferior. La correspondencia entre los nombres identificadores, el número de acceso de la secuencia de aminoácidos, y la especie se puede consultar en el Apéndice 3. La numeración superior hace referencia a la posición del aminoácido en la secuencia de CorE (MXAN_3426).



Realizando un alineamiento de la secuencia de las 17 secuencias de los dominios ricos en cisteínas encontrados en este tipo de factores sigma ECF en las mixobacterias, podemos encontrar tres patrones distintos muy conservados de distribución de sus cisteínas, sugiriendo tres grupos de factores sigma, que podrían estar especializados en tres funciones distintas: CorE, CorE2 y CorE3 (Figura 4.2). Tanto los factores sigma con CRD de tipo CorE como los de tipo CorE2 constan de una extensión C-terminal con seis cisteínas, cinco de las cuales serían comunes a todos los miembros de las mixobacterias, y una cisteína que cambia de posición entre ambos grupos. En los CRDs de tipo CorE, la cisteína adicional se encuentra después del motivo central de cinco cisteínas, en ocasiones tras una larga extensión de aminoácidos (Figura 4.2). En los CRDs de tipo CorE2, sin embargo, esta cisteína adicional se encuentra adyacente a la segunda cisteína, formando un motivo CC, en lugar del típico motivo CA conservado en el resto de factores sigma (Figura 4.2). Los dominios ricos en cisteínas de tipo CorE3 en cambio, sólo conservan las cinco cisteínas principales conservadas en todos los factores sigma de tipo CorE de las mixobacterias, careciendo tanto del motivo CC del grupo CorE2 como de la Cys adicional que aparece en el grupo de CorE (Figura 4.2).

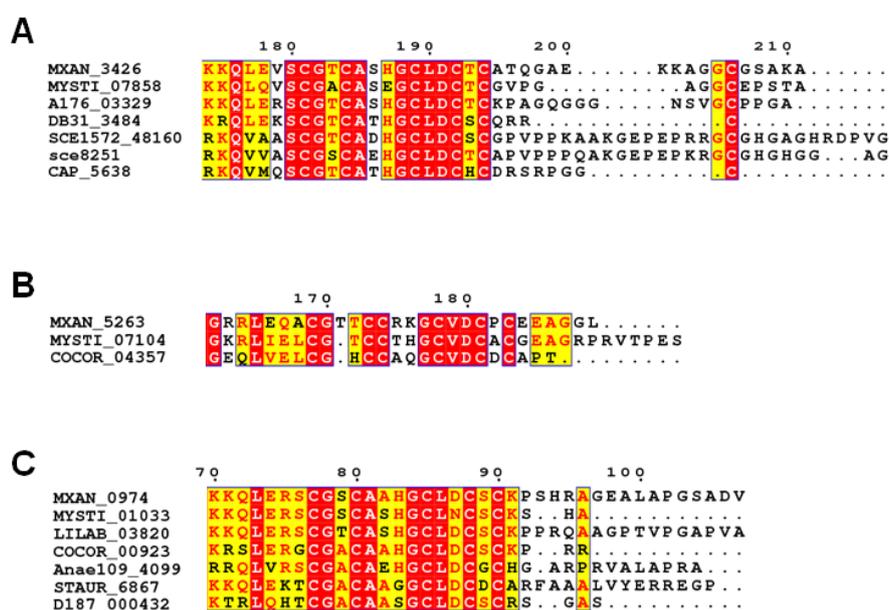


Figura 4.2. Alineamiento múltiple de la secuencia de los CRD de los factores sigma ECF44 de las mixobacterias. **A.** Factores sigma con CRD de tipo CorE. **B.** Factores sigma con CRD de tipo CorE2. **C.** Factores sigma con CRD de tipo CorE3. La correspondencia entre los nombres identificadores, el número de acceso de la secuencia de aminoácidos, y la especie se puede consultar en el Apéndice 3. La numeración superior en los paneles **A**, **B** y **C** hace referencia a la posición del aminoácido en las secuencias de *M. xanthus* CorE (MXAN_3426), CorE2 (MXAN_5263) y CorE3 (MXAN_0974), respectivamente.

Como se observa en la **Figura 4.2**, *Myxococcus stipitatus* tiene los tres tipos de factores sigma de tipo CorE en su genoma, lo que podría deberse a que cada uno de ellos está especializado en un mecanismo de acción concreto. *Myxococcus xanthus*, sin embargo, carece del factor sigma del grupo CorE3, pero contiene un gen (*MXAN_0974*) que codifica una proteína hipotética con un CRD de tipo CorE3 y una región similar a la del dominio σ_4 de los factores sigma de tipo ECF, y a la que le falta el dominio σ_2 (**Figura 4.3**).

Al analizar la sintenia de los genes localizados alrededor de cada factor sigma del grupo ECF44 en todas las especies de mixobacterias, vemos una gran conservación de genes que aparecen en la proximidad de los factores sigma de los grupos CorE y CorE3. Así, en *M. xanthus* ambos genes con CRD de tipo CorE y CorE3 se encuentran en las regiones del cobre 2 y 1, respectivamente. Los genes de resistencia a cobre localizados en dichas regiones están además presentes en las otras mixobacterias (**Figura 4.4**).

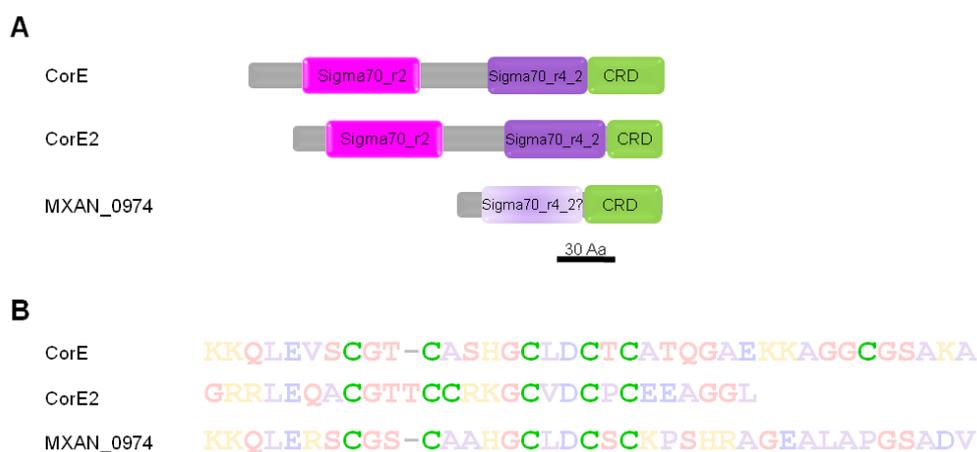


Figura 4.3. A. Arquitectura de dominios de las tres proteínas con un dominio CRD. CorE y CorE2 tienen las regiones σ_2 (Sigma70_r2, PF04542) y σ_4 (sigma70_r4_2, PF08281) típicas de los factores sigma de tipo ECF. MXAN_0974 muestra una similitud de secuencia de un 40,4% con CorE y 36,5% con CorE2 dentro de la región σ_4 . B. Detalle de la secuencia del CRD de las tres proteínas con las cisteínas resaltadas en verde.

Sorprendentemente, el ambiente genético de *corE2* no está bien conservado en los genomas de las mixobacterias (**Figura 4.4**). Como primer paso para el estudio del mecanismo de acción de los factores sigma de tipo CorE, profundizaremos en varios aspectos del papel y funcionamiento de CorE2 y de los genes que forman parte de su clúster, analizando el patrón de expresión de dichos genes y su posible función en el ciclo de vida y en la respuesta a metales de *M. xanthus*.

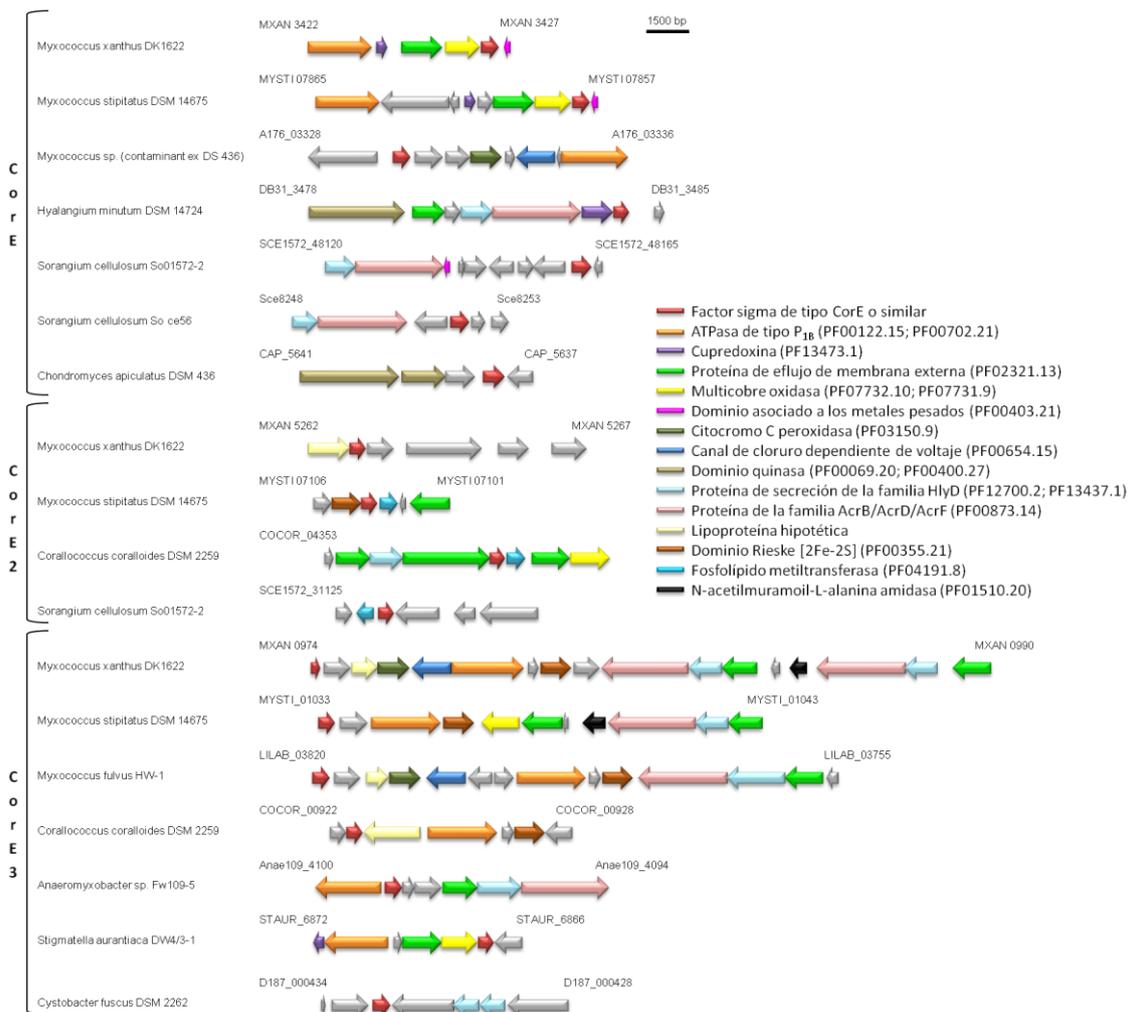


Figura 4.4. Análisis del ambiente genético de los factores sigma de tipo CorE (en rojo) de las mixobacterias. Cada una de las regiones ha sido agrupada según el tipo de CRD que presenta el factor sigma (de tipo CorE, CorE2 o CorE3).

4.2. Estudio del clúster de *corE2* y su papel en el ciclo de vida de *M. xanthus*.

4.2.1. Análisis bioinformático del clúster de *corE2*

En *M. xanthus*, *corE2* (MXAN_5263) forma parte de un clúster que contiene un gen que codifica una lipoproteína hipotética (MXAN_5262) situado aguas arriba de *corE2* y dos genes que codifican dos metaloproteínas: un sistema de eflujo de cationes (MXAN_5264) similar al facilitador de la difusión de cationes CzcD de *Cupriavidus metalidurans* (Anton *et al.*, 1999) y una proteína (MXAN_5265) con un dominio Kelch seguido de un dominio glioxal oxidasa que se asemeja al producto del gen del desarrollo *fbfB* de *Stigmatella aurantiaca* (Silakowski *et al.*, 1998) (Figura 4.5). A continuación procederemos a analizar cada uno de los genes localizados en este clúster y las proteínas que codifican cada uno de ellos.



Figura 4.5. Ambiente genético del gen *corE2*. En amarillo, el gen para la lipoproteína MXAN_5262, en rojo, el gen para el factor sigma CorE2 (MXAN_5263), en azul, el gen para el sistema de eflujo de cationes MXAN_5264, y en verde, el gen que codifica para la proteína con un dominio glioxal oxidasa MXAN_5265.

4.2.1.1. Estudio bioinformático del gen MXAN_5262

El gen MXAN_5262 se encuentra aguas arriba del gen que codifica para CorE2 y orientado en la misma dirección que él, separados por una distancia de tan solo 9 nucleótidos en el genoma. Debido a esto es de esperar que ambos genes estén relacionados de alguna forma, por lo que en este apartado procederemos a caracterizar bioinformáticamente este gen antes de analizar su relación con CorE2.

4.2.1.1.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *MXAN_5262*

El gen *MXAN_5262*, según está anotado en la base datos del NCBI, está constituido por 1695 nucleótidos. Sin embargo, al alinear la secuencia de aminoácidos de *MXAN_5262* con la de sus proteínas ortólogas de otras mixobacterias (Figura 4.6), vemos que el sitio de inicio de la traducción más probable es la metionina que ocupa la posición 66, con lo que el tamaño real del ORF del gen *MXAN_5262* sería de 1500 pares de bases, codificando una proteína de 499 aminoácidos. Dicha metionina estaría codificada por un codón ATG (en lugar del GTG codificado por la primera metionina) que es el codón de inicio más frecuente.

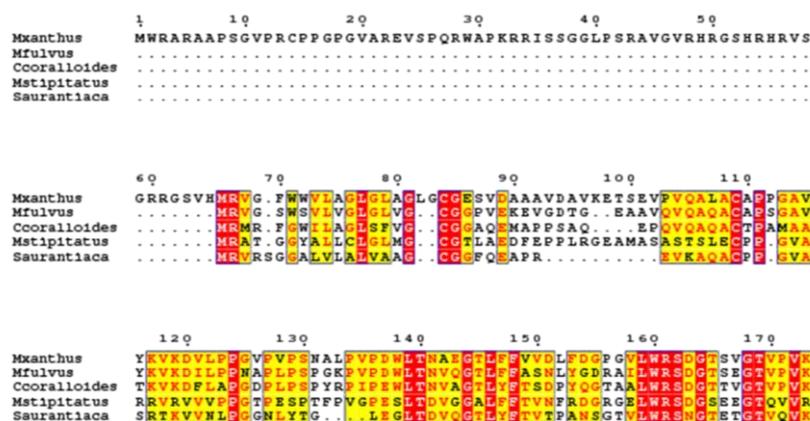


Figura 4.6. Alineamiento del inicio de varias lipoproteínas encontradas entre varias especies de mixobacterias. El codón de inicio del resto así como los motivos encontrados parece indicar que la lipoproteína de *M. xanthus* *MXAN_5262* comenzaría en la posición 66. *Mxanthus* se corresponde con *MXAN_5262* de *M. xanthus* (WP_011555229); *Mfulvus* con LILAB_05325 de *M. fulvus* (WP_013936155); *Cooralloides* con COCOR_05151 de *C. coralloides* (WP_014397944); *Mstipitatus* con MYSTI_02108 de *M. stipitatus* (WP_015347699); y *Saurantiaca* con STAUR_6940 de *S. aurantiaca* (WP_002609381). La numeración superior hace referencia a la posición del aminoácido en la secuencia de *MXAN_5262*.

Además, el uso de codones de la región anterior a esta metionina nos indica que sólo un 73,8% de los tripletes posee una base G/C ocupando la tercera posición, frente al 89,2% del resto de la secuencia, como es de esperar para una bacteria con un elevado contenido en G+C (Figura 4.7) (Inouye *et al.*, 1989), y la secuencia GAGGGAG situada a 8 nucleótidos del inicio sugiere la presencia de un sitio de unión al ribosoma en dicho punto. Tal y como hemos comentado anteriormente, la secuencia codificante para esta proteína terminaría a 9 nucleótidos de distancia aguas arriba de *MXAN_5263* (*corE2*), mientras que aguas arriba del propio gen *MXAN_5262* el gen más cercano se encontraría a 267 pares de bases y en orientación inversa.

IV. Resultados

CATGCAAGGCTCCTTTTCGGATGGGGAAGCCCGAGATGATGAATCACCCCTTCCTCGCGCTGAAGCACGCACCAG

```

-195 - GTG TGG CGC GCC AGG GCG GCC CCA TCC GGT GTT CCG AGG TGT CCT CCA GGC CCA GGT GTC - -136
-065 - fM W R A R A A P S G V P R C P P G P G V - -046

-135 - GCG CGG GAG GTG TCA CCC CAG CGG TGG GCG CCG AAG CGT CGG ATT TCC TCC GGG GGG CTG - -076
-045 - A R E V S P Q R W A P K R R I S S G G L - -026

-075 - CCC TCC AGG GCA GTT GGC GTC CGC CAC CGG GGG TCT CAC CGT CAC CGG GTT TCG GGC AGG - -016
-025 - P S R A V G V R H R G S H R H R V S G R - -006

-015 - CGA GGG AGT GTG CAC
-005 - R G S V H

0001 - ATG CGC GTC GGG TTC TGG TGG GTC CTG GCT GGC CTG GGG TTG GCG GGT CTG GGG TGC GGT - 0060
0001 - fM R V G F W W V L A G L G L A G L G C G - 0020

0061 - GAG TCC GTG GAT GCG GCG GCA GTG GAT GCG GTG AAG GAG ACC TCG GAG GTG CCA GTG CAG - 0120
0021 - E S V G T D A A G V D A V K E T S E V P V Q - 0040

0121 - GCC CTG GCC TGC GCG CCG CCG GGC GTC TAC AAG GTG AAG GAC GTC CTG CCG CCG GGT - 0180
0041 - A L A C A P P G A V Y K V K D V L P P G - 0060

0181 - GTG CCG GTG CCT TCC AAC GCC TTG CCG GTC CCC GAC TGG CTG ACG AAC GCG GAG GGC ACG - 0240
0061 - V P V P S N A L P V P D W L T N A E G T - 0080

0241 - CTC TTC TTC GTG GTC GAC CTC TTC GAC GGC CCC GGC GTC CTG TGG CGC AGT GAC GGC ACC - 0300
0081 - L F F V V D L F D G P G V L W R S D G T - 0100

0301 - TCC GTG GGC ACC GTG CCT GTG AAG GAG TTC CCC GTG ATT GCG GGG ACC TAC CGC GAC TTC - 0360
0101 - S V G T V P V K E F P V I A G T Y R D F - 0120

0361 - TCG CCG CTC GTC GCG GTG GGG ACT CGC GTC TTC TTT CTG GTG AAG GAC CCC GTG GTC GGA - 0420
0121 - S P L V A V G T R V F F L V K D P V V G - 0140

0421 - CCG GAA CTG TGG GTC AGC GAT GGC ACT GAG GCG GGC ACG CGG CTC GTG CGG GAC TTC GCG - 0480
0141 - R E L W V S D G T E A G T R L V R D F A - 0160

0481 - CCA GGC CCC GCC AGT GAC GAC CTG ATG CTC TTC GCT TCG GTG GGG GAT GTG CTG ACC TTC - 0540
0161 - P G P A S D D L M L F A S V G D V L T F - 0180

0541 - TTC CGC CGA CCG GCC TCG AGG GGG CCG CTG GAG CTG TGG CGC TCG GAC GGG ACT GAG GTG - 0600
0181 - F R R P A S R G P L E L W R S D G T E V - 0200

0601 - GGA ACG TTC CGC TTG GTG ACC TTC GGC GCG CAG GAC TCG TTT GAG TCG GGG GTG CCC CCG - 0660
0201 - G T F R L V T F G A Q D S F E S G V P P - 0220

0661 - GTC GCG GGA GCG CTG CTG TTC ACC CTG CAC GAC GCG CCG AAT GGC ACC TAC CTG TGG CCG - 0720
0221 - V A G A L L F T L H D A A N G T Y L W R - 0240

0721 - ACG GAT GGC ACG GCG GCG GGG ACC ACG GTC GTC AAG CGG CTG GAC GCA GAT CTG GTC TGG - 0780
0241 - T D G T A A G T T V V K R L D A D L V W - 0260

0781 - ACG CAG GGC ACG GCC GTC ACT GCG ACG GGC CTG AGC GTG TTT TCC TTC TAC GAT GAA GGC - 0840
0261 - T Q G T A V T A T G L S V F S F Y D E G - 0280

0841 - CCC ATC ACG GAG GTG TGG CGG ACG GAT GGC ACG CCG GGC GGC ACG GTG CGC CTG GAC TCC - 0900
0281 - P I T E V W R T D G T P G G T V R L D S - 0300

0901 - TTC GGC GGC TAC GTG AGG TTG CTG GGC GCG CTG GGT GGG TAT GTC TAC GTG GCC TCT GGC - 0960
0301 - F G G Y V R L L G A L G G Y V Y V A S G - 0320

0961 - ACC GCG GGC GGC TCC GCG TTG AAG CTC TCC CGC CTG TCG CTC GCG GGC GGT GGC AAG GCG - 1020
0321 - T A G G S A L K L S R L S L A G G G K A - 0340

1021 - ACG GCG ACG TGG CTG CCC AAC CGC TAC GCG GGC CAG CCC GAC GCG CGG CCC TAC GTC GAG - 1080
0341 - T A T W L P N R Y A G Q P D A R P Y V E - 0360

1081 - TAC TCG CCG GTC GCG GGC GGG AAG CTC TAC GTG TCC ATG GCC ATT GGC ACC TCG GGG CCC - 1140
0361 - Y S A V A G G K L Y V S M A I G T S G P - 0380

1141 - GCG CCG CGC GAA GTG GGC CTC TGG GTG ACG GAT GGC ACG GAA GCG GGG ACA CGG GAG CTC - 1200
0381 - A P R E V G L W V T D G T E A G T R E L - 0400

1201 - AGC CGG GGG CTC TTC ACC GGC GAC GAG AAC TAC TCG CCG CTC TTC GAC ACC GGT GCC GGG - 1260
0401 - S R G L F T G D E N Y S P L F D T G A G - 0420

1261 - ACG CTG CTC TTC AGC GCG GAC GGC GGC GAG ACG GGG TTG GAG CCC TGG GTG ACG GAC GGC - 1320
0421 - T L L F S A D L G G E T G L E P W V T D G - 0440

1321 - ACG CCC GGA CGG ACG GGG CTG GTC GCG GAC CTC TCT CCG TTG GGG GGC TCC AAC CCA CAG - 1380
0441 - T P G R T G L V A D L S P L G G S N P Q - 0460

1381 - TCC TTC ACC CGG GTG GGC AGC ACC CTC TTC TTC CGG GCC CGC TCT GAC ACG CGA GGC AAC - 1440
0461 - S F T R V G S T L F F R A R S D T R G N - 0480

1441 - GCG CTG TGG GCC ATG CCC GCC ACC GTG GGC TGT CCC ACG CAG GAA GTC CAC GCC CGC TGA - 1500
0481 - A L W A M P A T V A C P T Q E V H A R * - 0500

```

Figura 4.7. Secuencia de codones del gen *MXAN_5262*. Arriba la secuencia intergénica aguas arriba con el codón de inicio del gen *MXAN_5261* marcado en rojo, y a continuación la secuencia anotada como parte del gen *MXAN_5262*, pero que en base a las evidencias continuaría formando parte de la secuencia intergénica aguas arriba.

4.2.1.1.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen *MXAN_5262*

La proteína codificada por el gen *MXAN_5262* está constituida por 500 aminoácidos, con un peso molecular estimado de, aproximadamente, 52,17 kDa y con un pI de 4,79.

Al analizar detenidamente la secuencia, observamos que la proteína resultante no presenta secuencias con homología significativa con ningún dominio descrito en la base de datos de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Sin embargo, analizando la misma secuencia en la base de datos Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) se puede identificar un motivo recién caracterizado de repeticiones ELWxxDGT (IPR030916), que es frecuente en las delta-proteobacterias y que aparece repetido tres veces en nuestra proteína, desde el aminoácido 129 al 168, desde el 223 al 252 y desde el 420 al 465. No obstante, al observar la secuencia, podemos encontrar que estas repeticiones estarían probablemente formando parte de unas repeticiones más cortas, de aproximadamente 14 aminoácidos de longitud y repetidas hasta en 7 ocasiones en esta proteína y en las proteínas homólogas de otras mixobacterias. Alineando las regiones presentes en *MXAN_5262* junto con las de sus homólogas, se ha podido generar un logo de la misma que nos ha permitido encontrar más de 200 proteínas que contienen dicha repetición más corta (Figura 4.8). En nuestra búsqueda hemos observado que esta repetición está presente en multitud de proteínas sin dominios definidos, así como en la proteína hialina de numerosas bacterias y otras proteínas de unión al calcio.



Figura 4.8. HMM-Logo de la región repetida localizada en las lipoproteínas de las mixobacterias. El alineamiento se realizó utilizando 35 secuencias de aminoácidos procedentes de los 7 fragmentos de las cinco lipoproteínas ortólogas en las mixobacterias.

Al realizar un BLAST con la secuencia de aminoácidos de la proteína de *M. xanthus* encontramos bastantes similitudes con otras proteínas presentes en especies del suborden *Cystobacterineae*, todas ellas con dichas repeticiones conservadas a lo largo de su secuencia y anotadas como posibles lipoproteínas (Figura 4.9).

Teniendo en cuenta esto, procedimos a confirmar la posibilidad de que el producto del gen *MXAN_5262* pudiera ser una lipoproteína. Uno de los recursos más utilizados para la identificación de lipoproteínas es la herramienta LipoP, que es capaz de encontrar el péptido señal típico de las lipoproteínas en una secuencia de aminoácidos. Según LipoP, la proteína *MXAN_5262* sería una lipoproteína con un péptido señal para la SpII (Signal peptidase II) que cortaría en la secuencia LAGLG*CGESV, en donde el asterisco indicaría el sitio de corte (Figura 4.9). Este recurso informático además nos indica la posible localización de la lipoproteína ateniéndose al residuo que ocupa la posición 2 a partir del sitio de corte. En *E. coli*, las lipoproteínas unidas a la membrana interna poseen un residuo de aspártico en la posición 2, y por lo tanto, al tener una glicina en dicha posición, nuestra lipoproteína no sería de membrana interna. Sin embargo, recientemente se ha observado que esta generalidad no siempre se aplica a todas las especies (Tanaka et al., 2007), por lo que es aconsejable contrastar estos resultados con otras lipoproteínas de la especie en cuestión.

En *M. xanthus* también se han establecido ciertos parámetros conservados localizados en el extremo amino de las lipoproteínas que nos permiten averiguar su posición (Bhat et al., 2011). Según este consenso (Figura 4.10) la lipoproteína *MXAN_5262* sería una proteína exportada a la matriz extracelular, ya que tal y como se ha visto con otras lipoproteínas de *M. xanthus*, la alanina en la posición 7 es un aminoácido clave para dicha exportación y sin este residuo la proteína queda retenida en cualquiera de las dos membranas lipídicas de la envuelta celular bacteriana (Bhat et al., 2011).

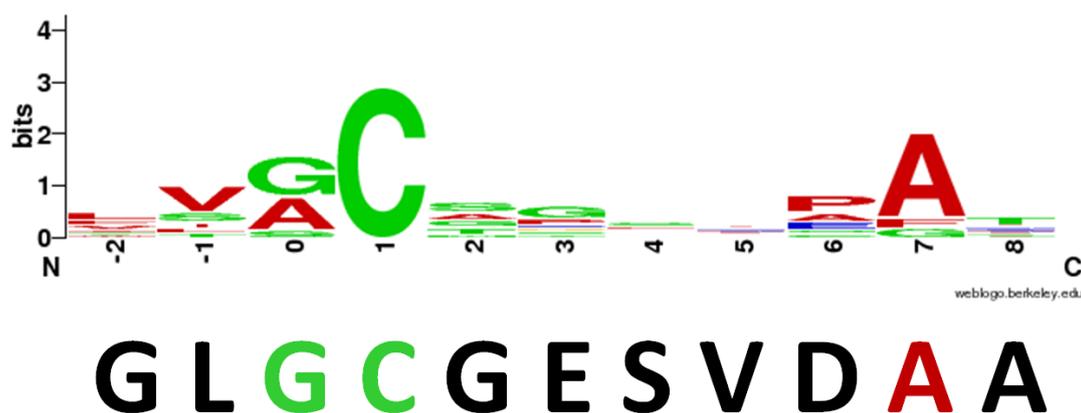


Figura 4.10. HMM-Logo del consenso descrito para las lipoproteínas exportadas a la matriz extracelular en *M. xanthus* (arriba, adaptado de Bhat *et al.*, 2011) y secuencia al inicio de la lipoproteína MXAN_5262 (abajo).

Pese a que la base de datos Pfam no nos indica homología significativa con ningún dominio descrito, es posible observar homología con las familias PfamB. Las familias PfamB agrupan dominios no anotados y de menor calidad que los PfamA, ya que se generan automáticamente a partir del recurso informático ADDA (*Automatic Domain Decomposition Algorithm*). De este modo, encontramos dos regiones conservadas que se corresponden con el dominio Pfam-B_258, presente en estructuras similares en diversas proteínas de naturaleza muy distinta en un amplio espectro de especies. El primer dominio ocuparía desde el aminoácido 114 al 219 y el segundo iría desde el residuo 351 al 494, conteniendo cada uno de ellos dos de las repeticiones descritas anteriormente (Figura 4.11). Debido a que dichos dominios han sido generados automáticamente y su función no ha sido analizada, no podemos deducir qué repercusión tendrá esto sobre la función de la proteína.

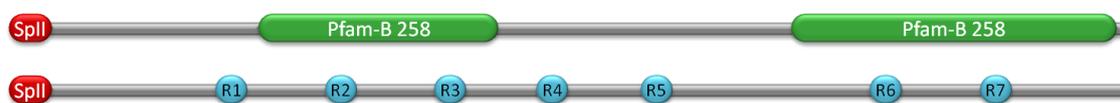


Figura 4.11. Representación esquemática de la lipoproteína MXAN_5262 con los dominios y motivos identificados señalados. En rojo el péptido señal SpII, en verde la región con un dominio Pfam-B 258 y en azul las siete repeticiones de aminoácidos halladas.

La secuencia de la proteína MXAN_5262 se introdujo en la herramienta informática I-TASSER para tratar de predecir su estructura terciaria más probable y compararla con estructuras de función conocida que nos puedan dar indicios de su posible rol en el ciclo de vida de *M. xanthus* (Figura 4.12). Esta herramienta es capaz de predecir la estructura y función de las proteínas mediante sucesivos alineamientos. Este recurso fragmenta la secuencia de aminoácidos y busca estructuras homólogas en sus bases de datos, posteriormente ensambla esos fragmentos y realiza los análisis estadísticos apropiados para establecer qué modelo es el más probable.

La estructura proporcionada posee dos lóbulos concéntricos de láminas beta, orientados casi perpendicularmente el uno con el otro, y con una serie de bucles orientados en la periferia de cada uno de los lóbulos en una forma similar a una espiral, donde curiosamente se encuentra cada una de las repeticiones ELWxxDGT (Figura 4.12). Los dos dominios Pfam-B 258 identificados se encontrarían cada uno en uno de los lóbulos y cubriendo aproximadamente la mitad de dicha porción. Una de las proteínas con mayor similitud estructural al modelo es la proteína con repeticiones de WD-40 de función desconocida Npun_R6612 de *Nostoc punctiforme* con un TM-Score (valor estadístico que indica la similitud estructural entre dos proteínas) de 0,881 y con una cobertura del 89,2% de la proteína. Las herramientas de predicción de función de I-TASSER asemejan la lipoproteína con una celobiohidrolasa específica de extremos reductora de oligoxyloglucanos con una confianza del 20,1%, y le asignan las funciones biológicas depositadas en la base de datos AmiGO como GO:0030243 y GO:0009251 con un 51% de confianza cada uno, que se corresponden con los procesos metabólicos de la celulosa y los procesos catabólicos de los glucanos, respectivamente. Esta lipoproteína no puede estar implicada en el metabolismo de la celulosa, ya que *M. xanthus* es una bacteria sin capacidad celulolítica. No obstante, es posible que sí esté relacionada en cierto modo con la catálisis de ciertos hidratos de carbono como los glucanos.

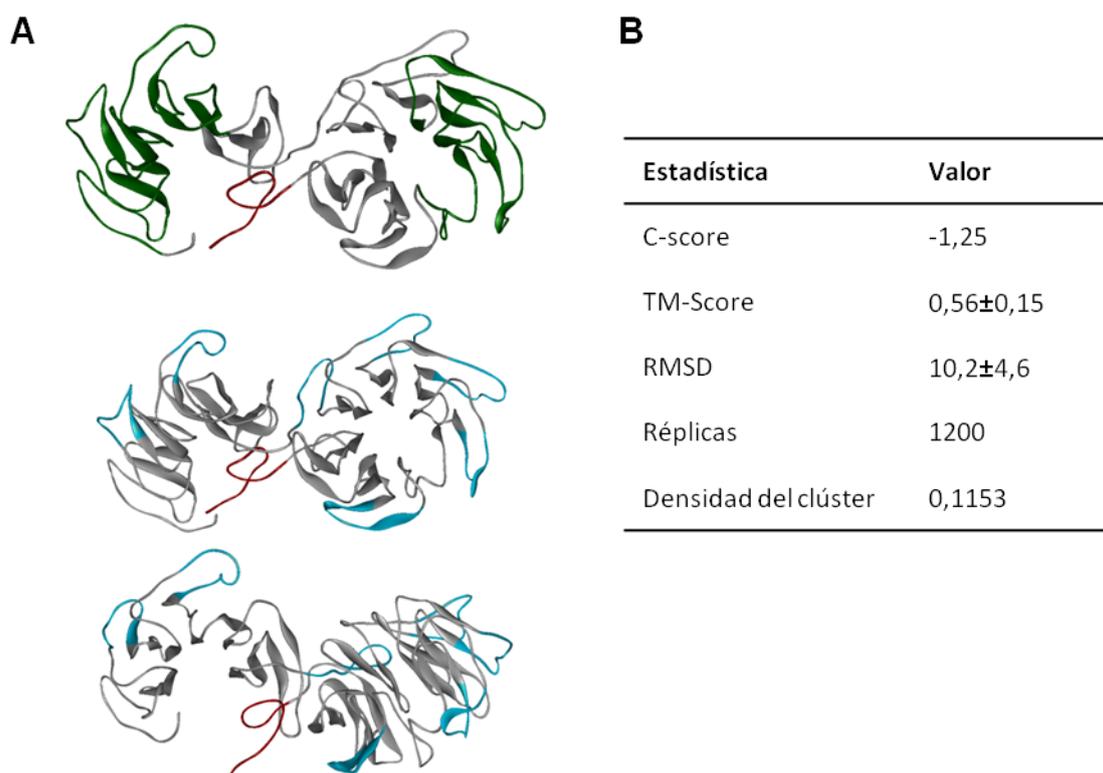


Figura 4.12. Modelo de la estructura terciaria de la lipoproteína MXAN_5262 proporcionado por la herramienta I-TASSER y coloreada según el código asignado anteriormente a cada dominio (A) y valores estadísticos obtenidos de la generación del modelo (B). El C-score es el valor de confianza, que oscila normalmente entre -5 y 2. Cuanto mayor sea el valor, mejor será la calidad de la predicción del modelo. TM-Score, es un valor que indica la similitud estructural entre dos estructuras, un TM-Score > 0,5 indica un modelo de topología correcta y un TM-Score < 0,17 indica una similitud aleatoria. En el ensamblaje de estructuras se acaban generando diversas réplicas. Éstas son posteriormente agrupadas en clústeres, de forma que la densidad del clúster nos da una idea de lo frecuente que ha sido una estructura en el análisis, y por lo tanto de la calidad del modelo.

4.2.1.2. Estudio bioinformático del gen *MXAN_5263 (corE2)*

Como hemos comentado anteriormente, el inicio del gen *corE2* se encuentra situado a tan solo 9 pares de bases del codón de terminación del gen *MXAN_5262*, sugiriendo una posible expresión de forma conjunta de ambos genes, que se analizará en profundidad más adelante. A continuación describiremos algunos de los aspectos que podemos deducir a partir del análisis bioinformático de la secuencia de dicho gen.

4.2.1.2.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *MXAN_5263* (*corE2*)

La secuencia del gen *MXAN_5263* está constituida por 570 pares de bases. El final de dicho ORF se encuentra situado a 55 pares de bases del codón de inicio del gen situado aguas abajo en el genoma. El gen *MXAN_5263* contiene la información para sintetizar una proteína de 189 aminoácidos, con una secuencia muy similar a la de CorE, a la que hemos llamado CorE2. El análisis de la secuencia nos indica que el uso de codones de este gen es el esperado para una bacteria con un alto contenido en G+C, con una G/C en la tercera posición del 94% de los tripletes (Figura 4.13) (Inouye et al., 1989).

```

                                                                 TGATGCACCGCG
001 - ATG TGC GAG GCT GGG GCC ATG TCC CCG GAG GTC CTC GCG CTC CTG CTC CAG AAC CGC CAG - 060
001 - fM  C  E  A  G  A  M  S  P  E  V  L  A  L  L  L  Q  N  R  Q  - 020
061 - CGC TTC CTC GCC TTC CTG ACC CCA CAC GTC GGG AGC GTC GAG GCG GCG GAG GAG GTG CTC - 120
021 - R  F  L  A  F  L  T  P  H  V  G  S  V  E  A  A  E  E  V  L  - 040
121 - CAG GCC GCG CTG CTC AAG AGC GTG GAA CGC GGG AGC ACC CTG CGT GAG GAG GAG CGG GCG - 180
041 - Q  A  A  L  L  K  S  V  E  R  G  S  T  L  R  E  E  E  R  A  - 060
181 - GTG GCC TGG TTC TAC CGC CTG CTT CGC AAC GCG CTC ATC GAC CGC TAC CGG CAC GAG CAG - 240
061 - V  A  W  F  Y  R  L  L  R  N  A  L  I  D  R  Y  R  H  E  Q  - 080
241 - CGC CAG GGG CGC GCC CTG CGG GCC TTC GCC GAG GAG AGC CCC CTG TCC ACC GAG GAC GCG - 300
081 - R  Q  G  R  A  L  R  A  F  A  E  E  S  P  L  S  T  E  D  A  - 100
301 - GCG GAA CTG GAG CGG ACC GTC TGC GCC TGT GTC TCC ACG CTC ACC ACC ACC CTG AAG CCG - 360
101 - A  E  L  E  R  T  V  C  A  C  V  S  T  L  T  T  T  L  K  P  - 120
361 - GAG TAC TCC GAC GCG CTC CAG CGG GTG GAC CTG GAC GGG CAG ACC CTG GCG GAG TTC GCG - 420
121 - E  Y  S  D  A  L  Q  R  V  D  L  D  G  Q  T  L  A  E  F  A  - 140
421 - GAG GCA GCC GGC ATC ACC CAC ACC AAC GCG AAG GTG CGC CTC CAC CGG GCC CGG CAG GCG - 480
141 - E  A  A  G  I  T  H  T  N  A  K  V  R  L  H  R  A  R  Q  A  - 160
481 - CTG GGC CGG AGG CTG GAG CAG GCG TGC GGA ACC ACT TGC TGC CGC AAG GGC TGC GTG GAC - 540
161 - L  G  R  R  L  E  Q  A  C  G  T  T  C  C  R  K  G  C  V  D  - 180
541 - TGC CCC TGC GAG GAG GCG GGC GGA CTG TAA
181 - C  P  C  E  E  A  G  G  L  *
```

Figura 4.13. Secuencia de codones del gen *MXAN_5263* con los aminoácidos deducidos de la misma. En la primera línea se muestra la secuencia intergénica, con el codón de terminación del gen *MXAN_5262* marcado en rojo.

4.2.1.2.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen *MXAN_5263*

CorE2 está constituido por una secuencia de 189 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 20,9 kDa y un pI de 5,88.

Al estudiar la secuencia de esta proteína encontramos dos áreas que presentan una gran homología con las regiones típicas de los factores sigma de tipo ECF: el dominio σ_2 , registrado en la base de datos Pfam como PF04542, desde el aminoácido 16 hasta el 81 (con un E-valor de $5,7 \times 10^{-7}$), y el dominio $\sigma_{4.2}$, registrado como PF08281, desde el aminoácido 113 al 161 (con un E-valor

de $2,6 \times 10^{-6}$). Ambos dominios son esenciales para la actividad de estos reguladores, y por lo tanto presentan una secuencia muy conservada de aminoácidos, siendo el $\sigma 2$ el más conservado en esta proteína. El dominio $\sigma 2$ está implicado en el reconocimiento y la unión a la región -10 del promotor, mientras que el $\sigma 4.2$ reconoce la región -35 del mismo gracias a un motivo hélice-giro-hélice presente en su estructura. Teniendo en cuenta que la región -35 del promotor es la más conservada entre los factores sigma de tipo ECF y la -10 la más variable, llama la atención que el dominio $\sigma 4.2$ sea el menos similar a la secuencia consenso típica de esta región.

Además, al igual que CorE, CorE2 presenta una extensión C-terminal desde el aminoácido 162 (justo a continuación de la región $\sigma 4.2$) hasta el final de la proteína muy rica en residuos de cisteínas. Esta extensión es característica de los factores sigma de tipo ECF del grupo 44, y se ha demostrado que, al menos en el caso de CorE, es imprescindible para su acción reguladora (Gómez-Santos *et al.*, 2011). La base de datos Interpro confirma que se trata de un factor sigma de tipo ECF al detectar en la secuencia el dominio *RNA polymerase sigma-70 like domain*, registrado como IPR014284 desde el aminoácido 15 al 164 (con un E-valor de $1,3 \times 10^{-15}$) (Figura 4.14).

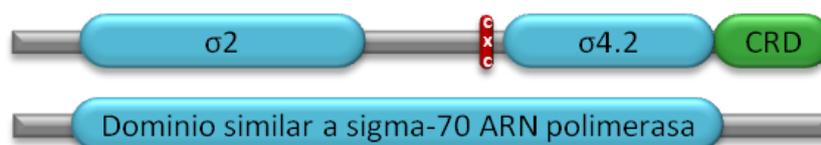


Figura 4.14. Representación esquemática de los dominios que aparecen en el factor sigma CorE2 utilizando las bases de datos de Pfam (arriba) e Interpro (abajo), representados en color azul. En rojo se ha representado el motivo CxC, y en verde, el CRD.

Estudiando más detenidamente la secuencia de aminoácidos de este tipo de factores sigma hemos encontrado otra región muy conservada entre los miembros de este grupo que no se encuentra presente en el resto de los factores sigma de tipo ECF. Se trata de un motivo CXC, situado aproximadamente entre los dominios $\sigma 2$ y $\sigma 4.2$.

CorE2 es una proteína citoplasmática, ya que no se han encontrado dominios transmembrana ni péptido señal para los sistemas Sec ni Tat. Esto es esperable teniendo en cuenta que los factores sigma actúan regulando la transcripción, la cual se lleva a cabo en el citoplasma.

Para dilucidar la estructura terciaria más probable de CorE2, se analizó la secuencia de aminoácidos mediante el programa bioinformático I-TASSER. Como era de esperar, CorE2 posee una estructura típica de los factores sigma de tipo ECF, con una similitud estructural con el factor sigma de *E. coli* SigmaE, con un TM-Score de 0,798 y una cobertura del 85,2% (Figura 4.15).

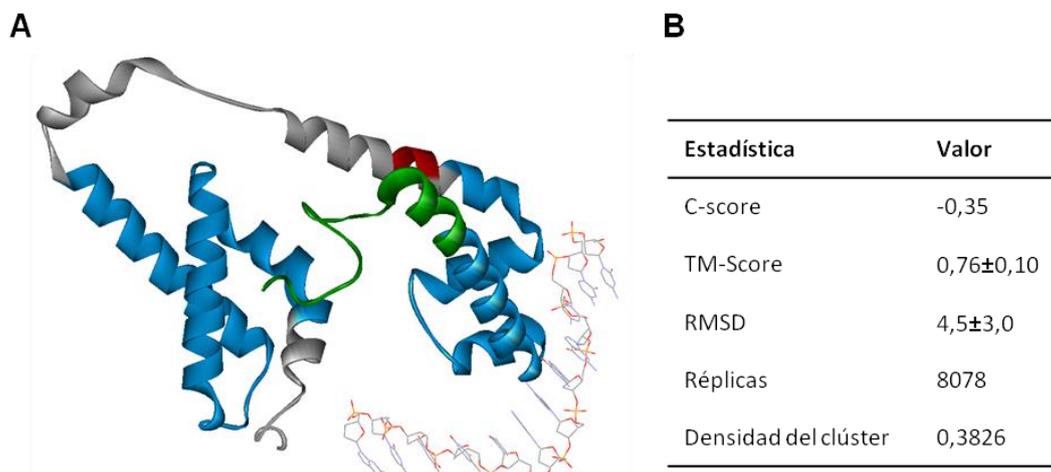


Figura 4.15. Modelo de la estructura terciaria del factor sigma CorE2 unido a un fragmento de ADN, proporcionado por la herramienta I-TASSER, y coloreado según el código asignado anteriormente a cada dominio (A) y valores estadísticos obtenidos de la generación del modelo (B).

4.2.1.3. Estudio bioinformático del gen *MXAN_5264*

Aguas abajo del gen que codifica CorE2, y justo a 55 pares de bases de él como comentamos anteriormente, se encuentra el gen *MXAN_5264*, orientado en el mismo sentido que *corE2* y la secuencia codificante de la lipoproteína *MXAN_5262* (Figura 4.5).

4.2.1.3.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *MXAN_5264*

MXAN_5264 es un gen de 948 pares de bases que codifica para una proteína de 315 aminoácidos. A 462 pares de bases aguas abajo del gen *MXAN_5264* se encuentra el gen *MXAN_5265*, el último gen a estudiar de este clúster y del cual hablaremos más adelante. Como en la mayoría de bacterias con un elevado contenido en G+C, en el 92,1% de los codones se encuentra una base G/C en la tercera posición (Figura 4.16) (Inouye et al., 1989).

IV. Resultados

TAA

```

001 - ATG GCG GGA CAC TCG CAC TCC CAC TCG CAC TCC CAC TCG CAC TCT CAC GGA CAC GGG CAC - 060
001 - FM A G H S H S H S H S H S H S H S H G H G H - 020
061 - GCG CAC GCC GCG CCC GAT TCG CAC AGC CGG GCC TTC ATG CTC GGC ATC GGT CTC AAC CTG - 120
021 - A H A A P D T S H S R A F M L G I G - 040
121 - GCC TTC GTC GGC GTC GAA GCC ACG TAT GGC ATC CTG TCC GGC TCG CTC GCC CTG CTG GCG - 180
041 - A F V G V E A T Y G I L S G S L A L L A - 060
181 - GAT GCG GGG CAC AAC CTG AGT GAC GTG CTG GGG CTC GTC CTC GCC TGG GGG GCC AGC GTC - 240
061 - D A G H N L S D V L G L V L A W G A S V - 080
241 - CTG GGC CGG CGC AAG GCG ACG GAG CGC CAT ACC TAC GGC TTC CGG AGC GCC ACC ATC CTG - 300
081 - L G R R K A T E R H T Y G F R S A T I L - 100
301 - GCC GCG CTG CTC AAC GCC CTG TTG CTG CTG GTC GCG GTG GGG GGC ATG GGC TGG GAG GCG - 360
101 - A A L L N A L L L L V A V G G M G W E A - 120
361 - GTG CGG CGG CTG GGG CAG CCC GCC ACC GTG TCC AGC TTC ACC ATC ATG TCG GTG GCG GGC - 420
121 - V R R L G Q P A T V S S F T I M S V A G - 140
421 - ATG GGC ATC GTT GTC AAC GCG GCC ACG GCG CTG CTC TTC TGG AAG GGC CGC GAG CGC GAC - 440
141 - M G I V V N A A T A L L F W K G R E R D - 160
481 - CTC AAC ATC CGA GGC CTC CTC CAC CTG GCC GCT GAC GCG GCC GTG TCG CTG GGC GTC - 540
161 - L N I R G A F L H L A A D A A V S L G V - 180
541 - GTC CTG GCG GGT CTC CTC ATC TAC TAC ACG GGT TGG GCG TGG CTG GAC CCG GTG GTG ACG - 600
181 - V L A G L L I Y Y T G W A W L D P V V T - 200
601 - CTG GTC ATC GCG GGC CTC ATC TTC GTG GGG ACG TGG GGG CTG CTC AAG GAC TCC GTC AAC - 660
201 - L V I A G L I F V G T W G L L K D S V N - 220
661 - CTC GCG CTC CAG GCG GTG CCG GGA CAC ATC GAC GTG CGT CAG GTG CGC GAG CGG CTC GTT - 720
221 - L A V P G H I D V R Q V R E R L V - 240
721 - CAG ACT CCA GGG GTG TCC GAG GTC CAT GAC CTG CAC GTC TGG GCC ATG AGC ACC ACC GAG - 780
241 - Q T P G V S E V H D L H V W A M S T T E - 260
781 - GCC GCG CTC ACC GCG CAC CTC GTC ATG CCG GAG CCG CGG CTG GAC GAC GCC TTC CTC GAC - 840
261 - A A L T A H L V M R E P R L D D A F L D - 280
841 - GAC GTG AAG CCG CCG CTC CAT GAC GAG TTC GGC ATC GAG CAC ATC ACG CTC CAG GTG GAG - 900
281 - D V K R L H D E F G I E H I T L Q V E - 300
901 - GAG GGA GCG CTC ACG GGT TGC TGC CAG CTC GCG TTC GAG CCT GCC TGA
301 - E G A L T G C C Q L A F E P A *

```

Figura 4.16. Secuencia de codones del gen *MXAN_5264* con los aminoácidos deducidos de la misma. En la primera línea se muestra la secuencia intergénica, con el codón de terminación del gen *MXAN_5263* marcado en rojo.

4.2.1.3.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen *MXAN_5264*

El gen *MXAN_5264* codifica una proteína de 315 aminoácidos, que posee un peso molecular estimado de 33,6 kDa y un pI de 6,35. Con el fin de analizar la homología de esta proteína con otras de secuencia similar se procedió a realizar un BLAST. El resultado obtenido indica que un gran número de proteínas de otras bacterias, todas ellas bombas de eflujo de cationes, presentan un alto grado de homología con la proteína *MXAN_5264* de *M. xanthus*. Como podemos observar en la **Figura 4.17**, todas las bombas de eflujo de cationes conservan la secuencia *signature* o firma típica de las proteínas de eflujo de cationes de tipo CDF (Montanini *et al.*, 2007) y son bastante similares entre sí, con la excepción de los primeros aminoácidos. Estos primeros residuos, pese a conservar en general un gran número de histidinas, varían según la especie y el tipo de bomba. Estas histidinas han sido relacionadas con la función de captar

los metales para su posterior transporte al exterior, por lo que se considera que están localizadas en la región citoplasmática (Montanini *et al.*, 2007).

La proteína de eflujo de cationes más estudiada desde el punto de vista estructural y de unión a metales en procariotas es el facilitador de la difusión de cationes *Zn* de *E. coli*, especializado en el eflujo de zinc. Esta proteína actúa de forma dimérica uniendo el zinc en tres sitios de unión distintos: el sitio A, el sitio activo de transporte de zinc, el cual es coordinado entre los residuos de ácido aspártico 45 y 49 de la hélice transmembrana 2, y la histidina 153 y el ácido aspártico 157 de la hélice 5; el sitio B, coordinando la unión del zinc en el bucle que conecta las hélices transmembrana 2 y 3 por el residuo de ácido aspártico 68, y la histidina 75; y el sitio C, que adopta la estructura de una metalochaperona, situado en el dominio C-terminal de la proteína, coordinado entre las histidinas 232, 261 y 283, y el ácido aspártico 285. De dichos sitios de unión al zinc, los más conservados entre los transportadores de tipo CDF son los sitios A y C (Lu y Fu, 2007; Lu *et al.*, 2009). Como se observa en la **Figura 4.17**, en la proteína MXAN_5264 podría mantenerse un sitio de transporte activo o sitio A entre las histidinas 64 y 169 y los ácidos aspárticos 68 y 173, y se observan ciertos residuos con capacidad de coordinar metales que podrían formar parte de un sitio C entre la histidina 249 y el ácido aspártico 276.

No obstante, desde el punto de vista funcional, el más conocido de estos sistemas de expulsión de cationes es el facilitador de la difusión de cationes *CzcD* de *C. metallidurans*, con el que MXAN_5264 comparte un 31,72% de identidad. Las proteínas de la familia CDF pueden clasificarse en varios grupos y subgrupos en base a la similitud de su secuencia (Nies, 2003).

Al comparar la secuencia de varias proteínas distribuidas entre los distintos grupos y subgrupos con la de la proteína MXAN_5264 de *M. xanthus* mediante un Clustal Omega, hemos podido relacionar la proteína de *M. xanthus* con los distintos grupos de facilitadores de la difusión de cationes. La proteína más similar resultó ser All7610 de la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC 7120, con la que guarda un 59,41% de identidad, lo que indica que, por similitud, MXAN_5264 sería miembro del grupo CDF2 y más específicamente del subgrupo 2e, típico de proteobacterias y cianobacterias, y al que se le atribuye el zinc como el sustrato a transportar más probable (**Figura 4.18**).

IV. Resultados

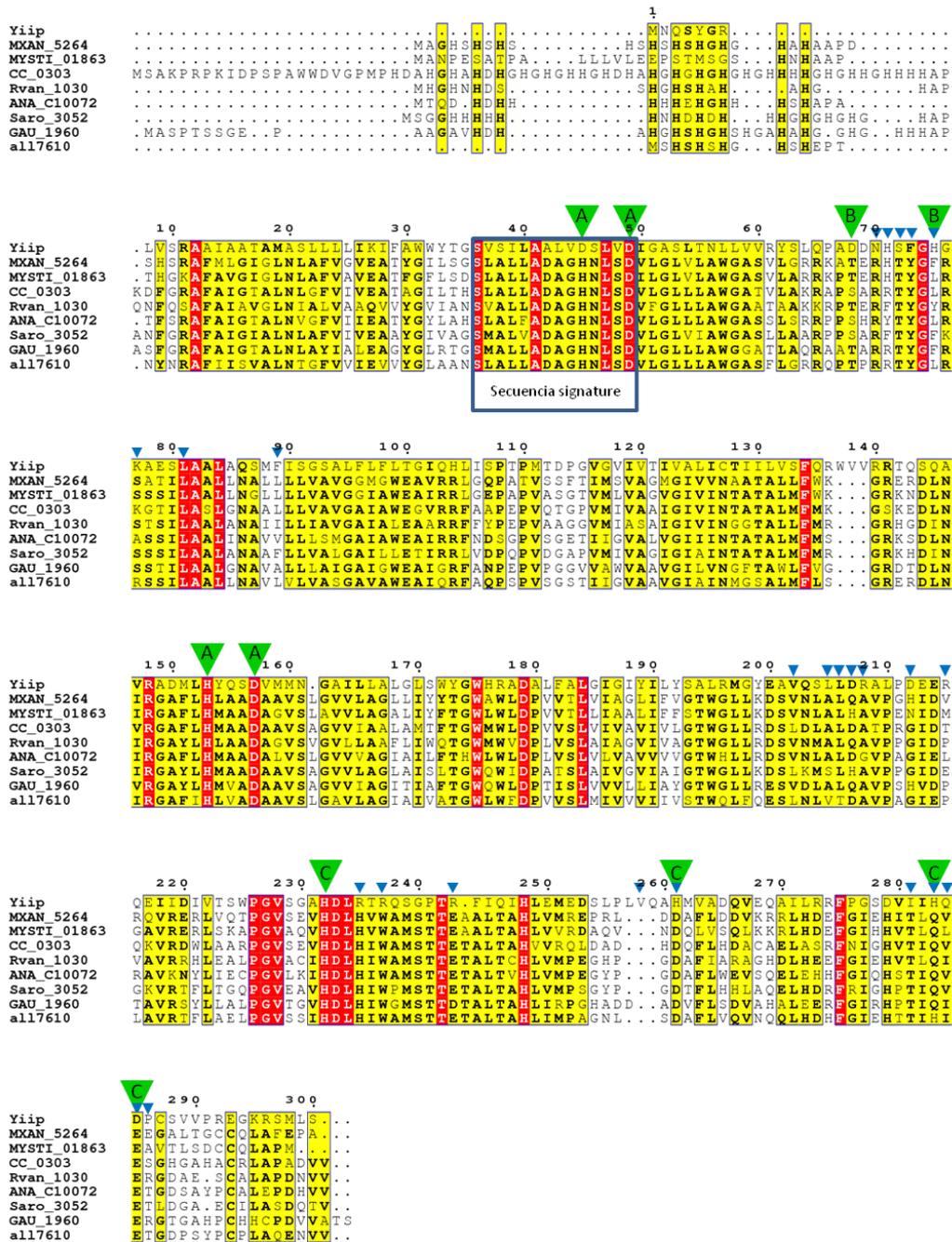


Figura 4.17. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del facilitador de la difusión de cationes YiiP, MXAN_5264 y otros ortólogos. En él se ven señalados los tres sitios de unión al zinc (triángulos verdes) y los residuos de dimerización (triángulos azules) de YiiP. YiiP se corresponde con *E. coli* (WP_001076742); MXAN_5264 con *M. xanthus* (WP_011555231); MYSTI_01863 con *M. stipitatus* (WP_015347457); CC_0303 con *Caulobacter crescentus* (WP_010918192); Rvan_1030 con *Rhodomicrobium vannielii* (WP_013418708); ANA_C10072 con *Anabaena* sp. 90 (WP_015078049); Saro_3052 con *Novosphingobium aromativorans* (WP_011446691); GAU_1960 con *Gemmatimonas aurantiaca* (WP_012683449); y all7610 con *Nostoc* sp. (WP_010993938). La numeración superior hace referencia a la posición del aminoácido en la secuencia de YiiP.

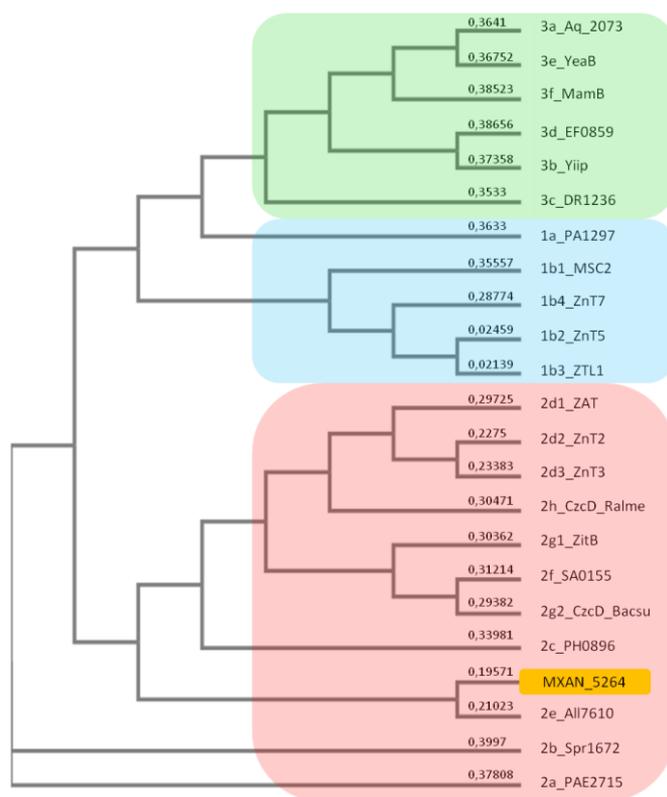


Figura 4.18. Árbol filogenético representando la distancia genética entre MXAN_5264 (en amarillo) y los miembros tipo de cada uno de los grupos y subgrupos de CDFs (grupo 1, en azul; grupo 2, en rojo; y grupo 3, en verde). La distancia genética aparece indicada sobre la rama que aparece junto al nombre de la proteína. MXAN_5264 se corresponde con *M. xanthus* (WP_011555231); 3a_Aq_2073 con *Aquifex aeolicus* (NP_214420); 3e_YeaB y 2g2_CzcD_Bacsu con *Bacillus subtilis* (WP_003233995 y NP_390542, respectivamente); 3f_MamB con *Magnetospirillum gryphiswaldensis* (WP_024080579); 3d_EF0859 con *Enterococcus faecalis* (NP_814601); 3b_Yiip y 2g1_ZitB con *E. coli* (WP_001076742 y YP_002406746, respectivamente); 3C_DR1236 con *Deinococcus radiodurans* (WP_010887879); 1a_PA1297 con *Pseudomonas aeruginosa* (NP_249988); 1b1_MSC2 con *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010491); 1b4_ZnT7, 1b2_ZnT5, 1b3_ZTL1, 2d2_ZnT2 y 2d3_ZnT3, con *Homo sapiens* (NP_001138356, NP_075053, AAL84188, NP_001004434 y NP_003450, respectivamente); 2d1_ZAT con *Arabidopsis thaliana* (NP_850459); 2h_CzcD_Ralme con *C. metallidurans* (WP_004635344); 2f_SA0155 con *Staphylococcus aureus* (AAW37452); 2c_PH0896 con *Pyrococcus horikoshii* (WP_048053568); 2e_All7610 con *Nostoc* sp. (WP_010993938); 2b_Spr1672 con *Streptococcus pneumoniae* (NP_359264) y 2a_PAE2715 con *Pyrobaculum aerophilum* (AAL64387).

La base de datos Pfam confirma que dicha proteína pertenecería a la familia de las proteínas de eflujo de cationes (PF01545) con una homología que cubre desde el aminoácido 34 al 300, (con un E-valor de 4×10^{-40}). Esto lo confirma la base de datos Interpro, la cual detecta un dominio transmembrana de eflujo de cationes (IPR027469) desde el aminoácido 28 al 220 (con un E-valor de $2,4 \times 10^{-52}$) (Figura 4.19).



Figura 4.19. Representación esquemática de los dominios y motivos que aparecen en la bomba de eflujo de cationes MXAN_5264. En azul se ha representado el dominio típico de las proteínas de eflujo de cationes, en rojo las regiones transmembrana.

Como es de esperar, dado que se trata de una bomba de expulsión de cationes, MXAN_5264 es una proteína anclada a la membrana citoplasmática. Posee seis regiones transmembrana de 23 aminoácidos cada una según la herramienta bioinformática SOSUI (**Figura 4.19**). No se ha encontrado péptido señal con Signal P, y pese a que el servidor TatP señala una posible secuencia para este sistema de secreción en la posición 24 con un valor estadístico de 0,642. Aunque se considera positivo todo valor por encima de 0,51, al no observarse la arginina doble necesaria para este sistema de secreción, no es probable que MXAN_5264 sea secretada por este tipo de sistema de translocación de proteínas.

Para el estudio comparativo de la estructura terciaria más probable de esta proteína, se introdujo la secuencia MXAN_5264 en el recurso online I-TASSER.

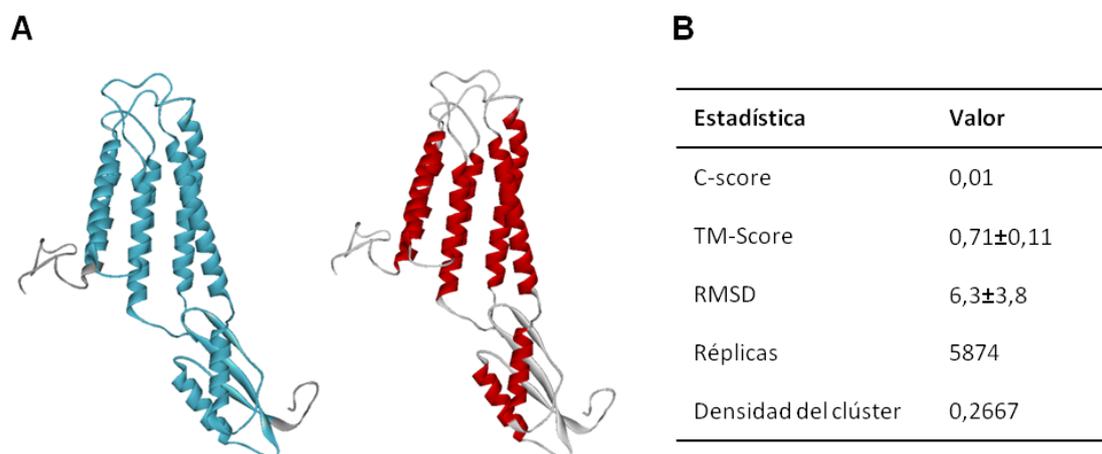


Figura 4.20. Modelo de la estructura terciaria de la proteína de eflujo de cationes MXAN_5264 proporcionado por la herramienta I-TASSER y coloreado según el código asignado anteriormente a cada dominio (A) y valores estadísticos obtenidos de la generación del modelo (B).

Como se observa, la proteína MXAN_5264 se asemeja estructuralmente en gran medida a la proteína de expulsión de cationes Yiip de *E. coli* de la que hemos hablado anteriormente, con una cobertura del 92,1% y un TM-Score de 0,905 (Figura 4.20). Esta proteína se asocia en forma dimérica para confeccionar un sistema antiporte Zn^{2+}/H^{+} . Ya que la estructura y el mecanismo de la proteína Yiip han sido estudiados en profundidad, podemos utilizar la estructura tridimensional generada para crear un modelo del mecanismo de acción de MXAN_5264, en el cual podemos localizar los sitios A, B y C encargados de coordinar la unión al zinc y transportarlo al exterior.

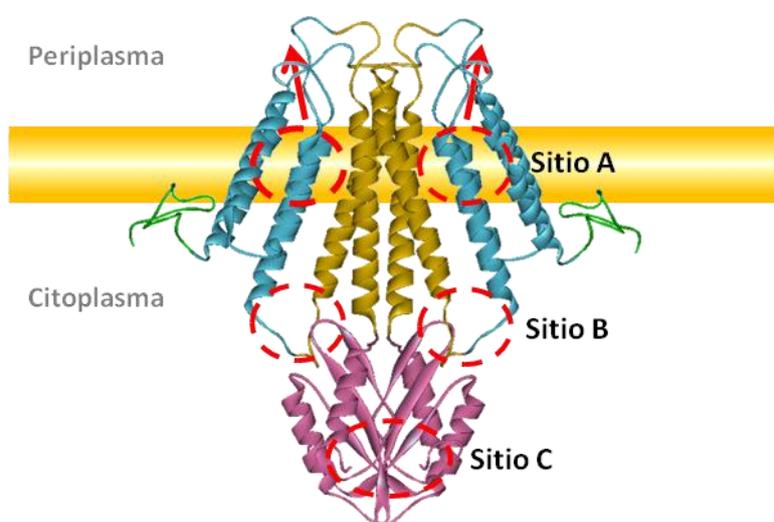


Figura 4.21. Representación esquemática del sistema de funcionamiento de la bomba MXAN_5264 utilizando el modelo tridimensional proporcionado por I-TASSER y el modelo de eflujo de zinc sugerido por Lu *et al.*, 2009 para Yiip.

4.2.1.4. Estudio bioinformático del gen MXAN_5265

El gen MXAN_5265 se encuentra a continuación del gen MXAN_5264, orientado en el mismo sentido que el resto de los genes estudiados durante la realización de esta Tesis Doctoral.

4.2.1.4.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen MXAN_5265

Tal y como se encuentra anotado en la base de datos del NCBI, MXAN_5265 es un gen de 3144 pb que codifica para una proteína de 1047 aminoácidos. No obstante, al igual que ocurre con el gen MXAN_5262, al alinear su secuencia de aminoácidos con la de otras proteínas de secuencia similar en otras

IV. Resultados

mixobacterias (Figura 4.22), observamos que las proteínas más similares comienzan en un codón situado más abajo, próximo a la metionina situada en la posición 148. Esto sumado a que en la región anterior a esta metionina solamente el 70,1% de los tripletes posee una base G/C ocupando la tercera posición, frente al 91,9% del resto del gen indica que el sitio de inicio de la traducción más probable es la metionina 148. Además, como ocurría en el caso de MXAN_5262, el nuevo codón de inicio se trata de un codón ATG, mucho más frecuente que el GTG previamente anotado y la secuencia AAAGGG situada en posición -7 respecto a este nuevo codón de inicio podría tratarse de un sitio de unión al ribosoma para la traducción de este gen (Figura 4.23).

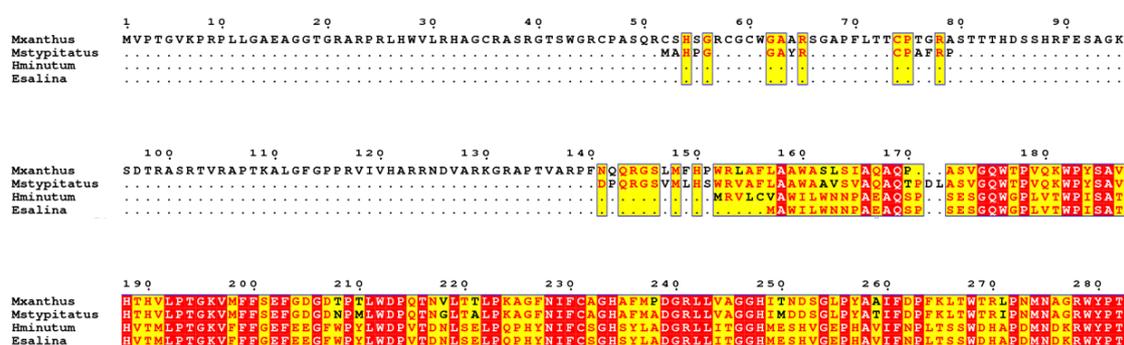


Figura 4.22. Alineamiento de varias proteínas hipotéticas encontradas entre otras especies de mixobacterias similares a la proteína codificada por el gen MXAN_5265. Mxanthus se corresponde con *M. xanthus* (WP_011555232); Mstypitatus con *M. stipitatus* (WP_015350574); Hminutum con *H. minutum* (WP_044186172); y Esalina con *Enhygromyxa salina* (WP_044186172). La numeración superior hace referencia a la posición del aminoácido en la secuencia de MXAN_5265.

De este modo, el gen MXAN_5265 en realidad está constituido por 2703 pares de bases, y codifica una proteína de 900 aminoácidos. Así pues, el gen MXAN_5265 se encontraría a 462 pb del gen MXAN_5264 analizado con anterioridad, y a 611 pb del gen MXAN_5266 situado aguas abajo de él y que codifica para una proteína hipotética de función aún por determinar (Figura 4.23).

TGA CGCGGGCCCGGAGCCGGCC

-441 - GTG GTG CCC ACG GGC GTG AAG CCC CGG CCT CTG CTT GGA GCG GAG GCC GGG GGG ACA GGA GCG GCC CGG CCC CGG CTC CAT TGG GTG CTC - -352
-147 - fM V P T G V K P R P L L G A E A G G T G R A R P R L H W V L - -118

-351 - AGG CAC GCC GGG TGT CGT GCT TCA CGG GGC ACG TCT TGG GGA AGG TGC CCA GCG AGT CAG CGG TGT AGC CAT TCG GST CGC TGC GGA TGT - -262
-117 - R H A G C R A S R G T S W G R C P A S Q R C S H S G R C G C - -088

-261 - TGG GGC GCT GCC CGC AGT GGC GCT CCC TTC CTC ACG ACC TGC CCG ACT GGC AGA GCG TCT ACC ACG ACT CAC GAC AGC AGC CAC CGA TTC - -172
-087 - W G A A R S G A P F L T T C P T G R A S T T T H D S S H R F - -058

-171 - GAG TCC GCT GGG AAA TCC GAC ACG CGT GCC TCA CGG ACG GTC CGG GCC CCG ACG AAG GCG CTG GGG TTC GGT CCA CCC CGC GTC ATT GTC - -082
-057 - E S A G K S D T R A S R T V R A P T K A L G F G P P R V I V - -028

-081 - CAC GCA GCG CGG AAC GAT GTG GCT CGC AAG GGC CGT GCG CCT ACC GTT GCG CGA CCT TTC AAC CAA CAA AGG GGC AGC CTG
-027 - H A R R N D V A R K G R A P T V A R P F N Q Q R G S L

4.2.1.4.2. Análisis bioinformático de la proteína codificada por el gen *MXAN_5265*

La proteína de 900 aminoácidos codificada por el gen *MXAN_5265* tendría un peso molecular estimado de 98,2 kDa y un pI de 6,43. Realizando un BLAST con su secuencia en la base de datos del NCBI encontramos varias proteínas homólogas en otras mixobacterias, como por ejemplo en *M. stipitatus*, y en las mixobacterias marinas *Hyalangium minutum* y *Enhygromyxa salina*. Como se observa en la **Figura 4.24**, todas ellas tienen regiones muy conservadas, lo que indica que estos residuos deben ser importantes para la función de la enzima. Se pueden encontrar proteínas muy similares en otras especies de mixobacterias, como en *S. aurantiaca*, pero abarcan un tamaño que no cubre toda la extensión de la proteína.

Al introducirla en la base de datos Pfam sólo observamos homología con otros dominios en la primera mitad de la proteína, mientras que la mitad que llega hasta el extremo carboxilo de la proteína no presenta ninguna homología con ningún dominio descrito, ni siquiera en los PfamB. Desde el extremo amino al carboxilo encontramos una región con homología a la familia *Glyoxal oxidase N-terminus* (PF07250) (con un E-valor de $3,4 \times 10^{-10}$), un motivo Kelch (PF01344) (con un E-valor de $2,6 \times 10^{-4}$) y un dominio de función desconocida DUF1929 (PF09118) (con un E-valor de 3×10^{-25}). La región *Glyoxal oxidase N-terminus* (desde el aminoácido 64 al 194) es un dominio presente en el extremo amino de las enzimas de tipo glioxal oxidasa encargadas de la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos y de la producción de agua oxigenada a partir de oxígeno y, según se observa en la base de datos Pfam, es frecuente encontrarla junto al dominio de función desconocida DUF1929. El motivo Kelch (desde el aminoácido 229 al 271) es una región presente en una gran cantidad de enzimas que le proporciona a la proteína una estructura de hélice enrollada y que es frecuente en enzimas como la galactosa oxidasa. El DUF1929 (desde el aminoácido 366 al 460) es un dominio sin acción catalítica definida que adopta la forma de un fardo de láminas beta alrededor de un núcleo hidrofóbico, que suele estar presente con frecuencia en enzimas como la glioxal oxidasa o la galactosa oxidasa. Además, tal y como se ha descrito previamente, las enzimas de tipo glioxal oxidasa presentan tres módulos bastante conservados encargados de coordinar la unión a los metales (Whittaker y Whittaker, 2006).

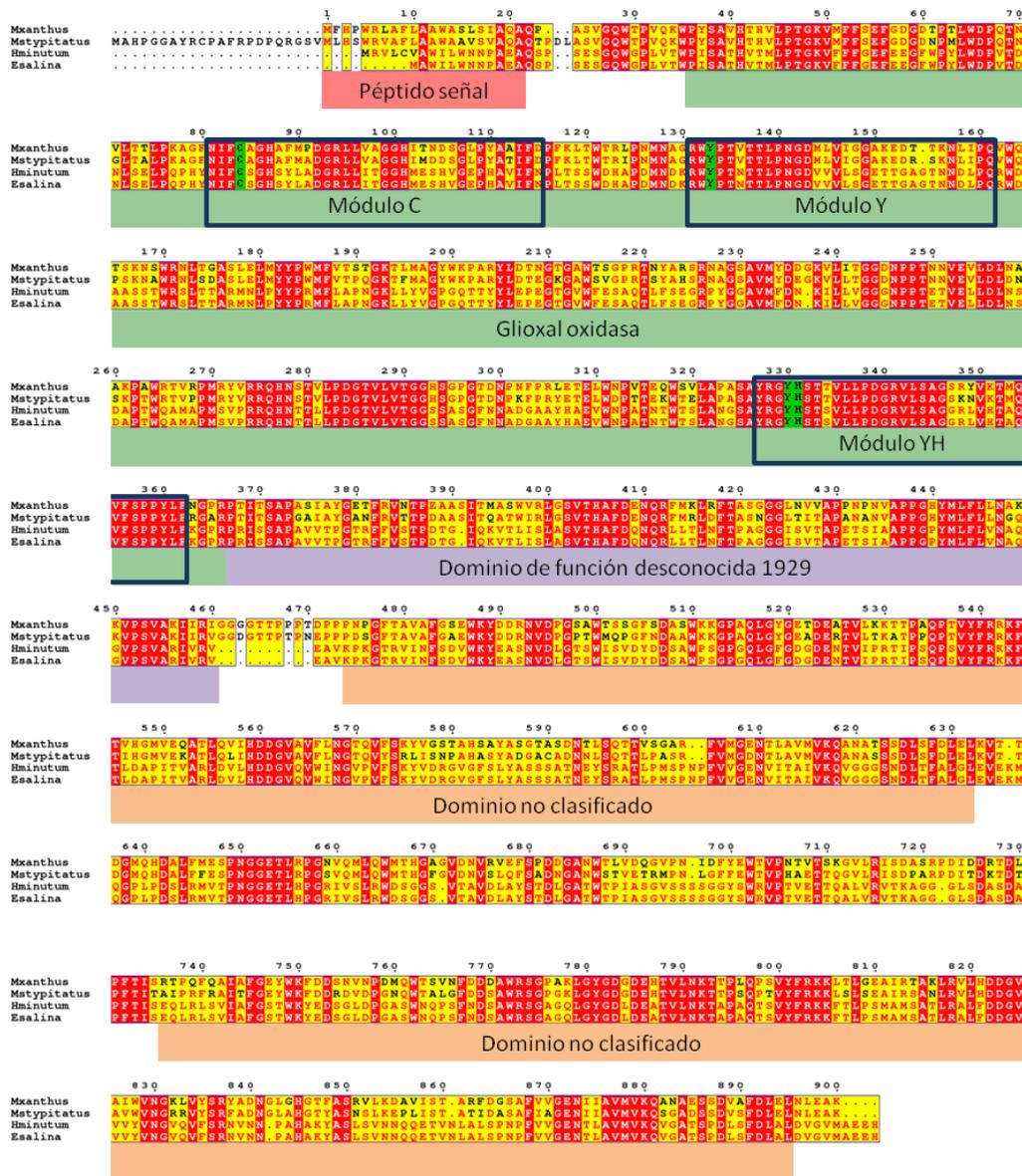


Figura 4.24. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de MXAN_5265 y sus proteínas ortólogas. En él se ven señalados el péptido señal (en rojo), el dominio gloxal oxidasa (en verde), con los tres módulos típicos de estas proteínas enmarcados y sus residuos clave destacados en verde, el dominio de función desconocida 1929 (en morado) y los dominios no caracterizados que han sido identificados (en naranja). Mxanthus se corresponde con *M. xanthus* (WP_011555232); Mstipitatus con *M. stipitatus* (WP_015350574); Hminutum con *H. minutum* (WP_044186172); y Esalina con *Enhygromyxa salina* (WP_044186172). La numeración superior hace referencia a la posición del aminoácido en la secuencia de MXAN_5265.

De manera similar que para la proteína MXAN_5264, por homología se procedió a la identificación de los distintos módulos y residuos que coordinan metales en la proteína, localizando la cisteína 84 en el módulo C, la tirosina 133 en el módulo Y, y la tirosina 331 y la histidina 332 en el módulo YH como posibles aminoácidos responsables de esta función. (Figura 4.25).



Figura 4.25. Representación esquemática de los dominios que aparecen en la glicoxal oxidasa MXAN_5265 utilizando las bases de datos de Pfam (arriba) e Interpro (abajo), representando en verde los dominios glicoxal oxidasa, en azul el motivo Kelch y en morado los dominios de función desconocida 1929. En rojo se ha representado el péptido señal y en naranja los motivos no clasificados encontrados.

Además de presentar homología con los dominios Pfam anteriormente mencionados, haciendo un análisis en mayor profundidad podemos observar la presencia de la región Pfam-B_1609 desde el aminoácido 185 al 346. Como hemos comentado anteriormente, los dominios PfamB carecen de la calidad de información proporcionada por los PfamA habituales. El Pfam-B_1609 puede estar presente en diversos tipos de proteína, entre ellas algunas galactosa oxidasas, proteínas de resistencia al cobre y otras enzimas que presentan también los motivos Kelch y el DUF1929 que tiene nuestra proteína. Además, la base de datos Interpro confirma la presencia del dominio glicoxal oxidasa registrado como IPR009880, pero ocupando la región que va desde el aminoácido 36 al 366 (con un E-valor de $1,5 \times 10^{-15}$). Sin embargo, ninguna base de datos es capaz de proporcionarnos información sobre la zona que ocupa la segunda mitad de la proteína de, aproximadamente, 440 aminoácidos de extensión.

Analizando con un mayor detalle la secuencia de la proteína que no se corresponde con ningún dominio descrito, se observa una región más o menos extensa que se encuentra repetida más adelante en la secuencia. Ambas regiones contienen varios motivos bastante conservados entre sí, y con las regiones presentes en sus proteínas homólogas. La primera región abarca desde el aminoácido 474 hasta el 632, y la segunda desde el 736 hasta el 895. Al realizar un BLAST únicamente con la secuencia de esta región se encuentran 128 secuencias homólogas, con algunos de sus aminoácidos muy conservados

en todas ellas. Esta región se encuentra no sólo en proteínas similares a la MXAN_5265, como glioxal oxidasas u oxidasas dependientes de cobre como las galactosa oxidasas, sino que se puede encontrar en enzimas como fosfatasas y metalofosfatasas, manosidasas, metalofosfoesterasas, o en proteínas de señalización para la ruta de translocación de proteínas *twin-arginine*, ya sea dos veces como en el caso de nuestra glioxal oxidasa, o una única vez en toda la proteína, como ocurre en otras proteínas. Este dominio no caracterizado se encuentra distribuido en diversos grupos de procariotas, y como es de esperar, está presente en las proteínas de numerosas mixobacterias. Alineando la secuencia de las 13 regiones más similares procedentes de mixobacterias se ha podido generar un logo que representa los motivos más conservados en este dominio no caracterizado (**Figura 4.26**).

Como se puede observar, se trata de un dominio que posee numerosos residuos de ácido aspártico, algunos de ellos formando motivos que podrían estar conformando nuevos sitios de unión a metales como los motivos YDD, FDD y HDD, bastante conservados en estos dominios sin caracterizar (**Figura 4.26**). Todo esto parece indicar que, no sólo por su homología con la glioxal oxidasa, sino por su riqueza y configuración de residuos con capacidad de coordinar metales, la proteína MXAN_5265 es una metaloproteína.

Al utilizar el recurso SOSUI para predecir dominios transmembrana, esta base de datos nos indica que MXAN_5265 se trata de una proteína soluble en su totalidad. Además, no se trata de una proteína citoplasmática, ya que la herramienta SignalP nos revela la presencia de un péptido señal con un valor estadístico de 0,752 y un Cutoff de 0,570, con una posición de corte entre los aminoácidos 21 y 22. Por tanto, la proteína debe ser segregada, bien al espacio periplásmico o al espacio extracelular.

Como para el resto de las proteínas, también introdujimos la secuencia de aminoácidos de esta proteína en el servidor de predicción de estructura y función de proteínas I-TASSER. Como podemos observar en la **Figura 4.27**, la estructura más probable tiene una forma que se asemeja a dos circunferencias formadas por láminas beta, una de ellas conteniendo todos los dominios previamente caracterizados, y la otra agrupando la otra mitad de la proteína que no presenta homología con ningún dominio descrito. Ambas circunferencias se encontrarían unidas entre sí formando un ángulo de 90° aproximadamente.

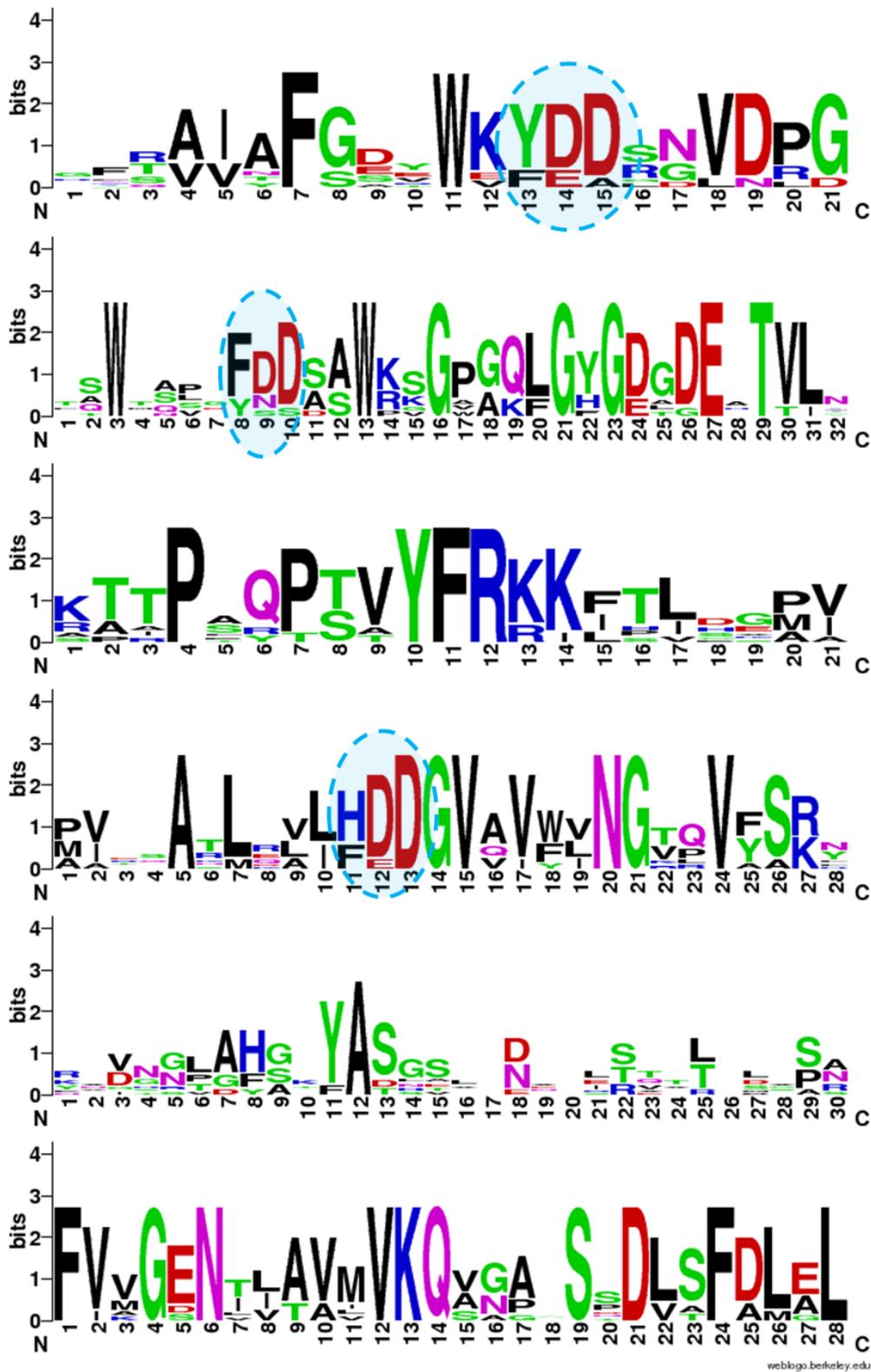


Figura 4.26. HMM-Logo del dominio localizado en la secuencia de la proteína MXAN_5265 en el extremo carboxilo. El alineamiento se realizó utilizando 37 secuencias de aminoácidos procedentes de los dominios de treinta proteínas ortólogas. Los posibles sitios de unión a metales están resaltados de azul.

La proteína de estructura más similar al modelo proporcionado por I-TASSER es la xiloglucanasa BAD11543.1 de *Geotrichum sp.* M128, con un TM-Score de 0,791 y con una cobertura del 80,8%. Además, al igual que con la lipoproteína MXAN_5262, las herramientas de predicción de función asemejan la proteína MXAN_5265 en base a su estructura con una celobiohidrolasa específica de extremos reductora de oligoxyloglucanos con una confianza del 31,3%, y le asignan las actividades depositadas en la base de datos AmiGO como GO:0016899 (actividad oxidoreductasa sobre grupos CH-OH utilizando oxígeno como aceptor) con un 44% de confianza, y GO:0046872 (Unión a iones metálicos) con un 43% de confianza; así como las funciones biológicas GO:0044248, GO:0042221 y GO:0016999 (proceso catabólico celular, respuesta a químicos, y proceso metabólico de antibióticos, respectivamente) con un 54% de confianza cada uno, y GO:0022610 y GO:0009628 (adhesión biológica y respuesta a estímulos abióticos, respectivamente) con un 44% de confianza.

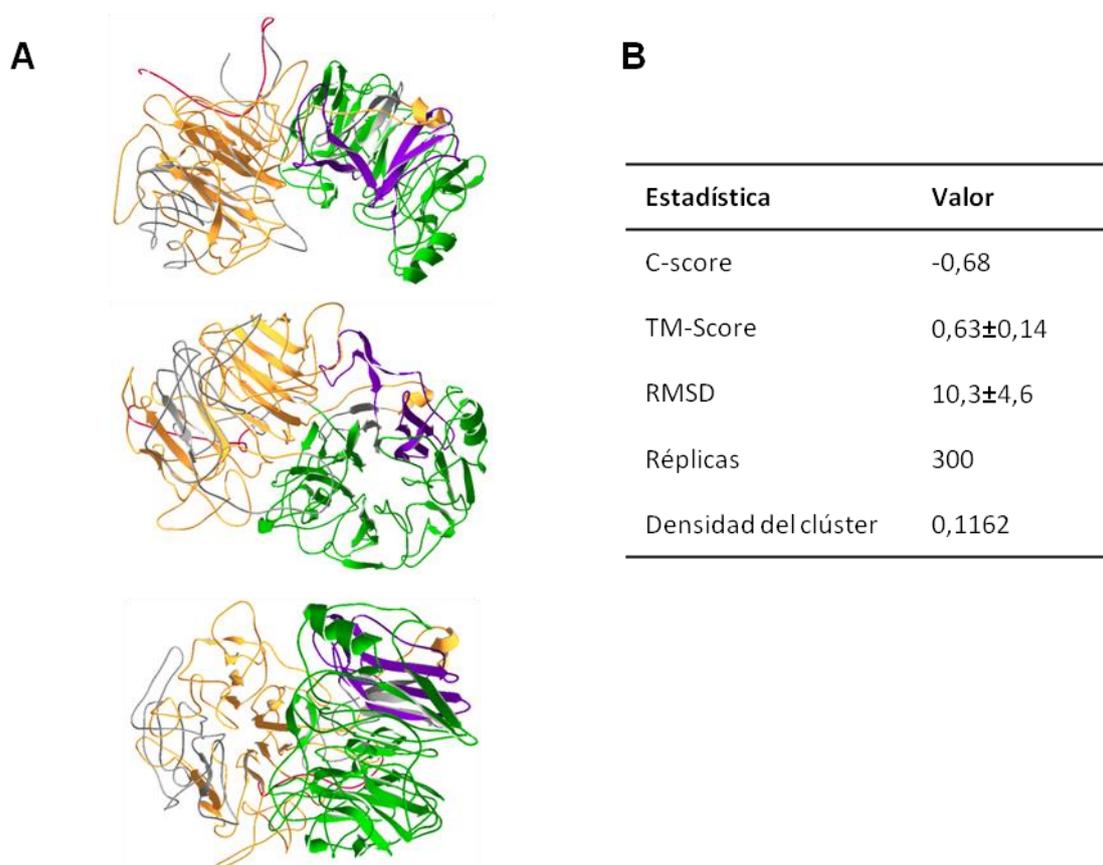


Figura 4.27. Modelo de la estructura terciaria de la proteína hipotética MXAN_5265 proporcionado por la herramienta I-TASSER coloreado según el código asignado anteriormente a cada dominio (A), y valores estadísticos obtenidos de la generación del modelo (B).

4.2.2. Estudio de la expresión de los genes del clúster de *corE2*

4.2.2.1. Análisis del perfil de expresión de los genes *MXAN_5262*, *MXAN_5263*, *MXAN_5264* y *MXAN_5265*

4.2.2.1.1. Obtención de las cepas JM52ZY2, JM52ZY3, JM52ZY4 y JM52ZY5

El perfil de expresión de los genes de este clúster se analizó construyendo cuatro cepas portadoras de una fusión transcripcional entre el codón de inicio de cada uno de estos genes y el gen *lacZ* de *E. coli* (JM52ZY2, JM52ZY3, JM52ZY4 y JM52ZY5 para los genes *MXAN_5262*, *MXAN_5263*, *MXAN_5264* y *MXAN_5265*, respectivamente). Estas cepas se obtuvieron mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1.4.1 de Materiales y métodos. De este modo, se amplificó un fragmento de aproximadamente unos 800-900 pares de bases para cada uno de los genes utilizando los cebadores listados en la **Tabla 3.1**, y los fragmentos obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* (con la excepción del gen *MXAN_5262*, para el cual se empleó la enzima *XhoI* en lugar de *KpnI*). Los fragmentos digeridos se insertaron en el plásmido pKY481 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y los plásmidos resultantes (pKY481-5262, pKY481-5263, pKY481-5264 y pKY481-5265, Apéndice 2) fueron comprobados por digestiones con enzimas de restricción y por secuenciación. Dichos plásmidos fueron introducidos en la cepa de fenotipo silvestre de *M. xanthus* DZF1 mediante electroporación para que se integrara en el cromosoma por recombinación homóloga. Para corroborar que las colonias resistentes a kanamicina que crecieron tras las distintas electroporaciones se trataban en efecto de nuestras cepas de interés, se realizó un Southern blot para cada construcción a partir del ADN genómico de las mismas.

4.2.2.1.2. Análisis de la actividad β -galactosidasa de las cepas obtenidas

Las cepas obtenidas se cultivaron en placas de medio CTT con X-gal en ausencia y presencia de distintos metales. Al contrario de lo que sucedía con *CorE* (Gómez-Santos *et al.*, 2011), ninguno de los cuatro genes analizados aumentaba su expresión en presencia de cobre. Sorprendentemente, el propio gen *corE2*, así como el gen de la lipoproteína *MXAN_5262*, no mostraron

expresión con ninguno de los metales probados. Sin embargo, las dos proteínas identificadas aguas abajo de *corE2*, mostraron una expresión dependiente de cadmio y zinc (Figura 4.28A). Con el fin de descartar que esta respuesta fuese consecuencia del efecto oxidante del metal y no del propio metal, todas las fusiones fueron cultivadas en placas de CTT con X-gal y distintos agentes oxidantes para ver si se observaban los mismos patrones de expresión.

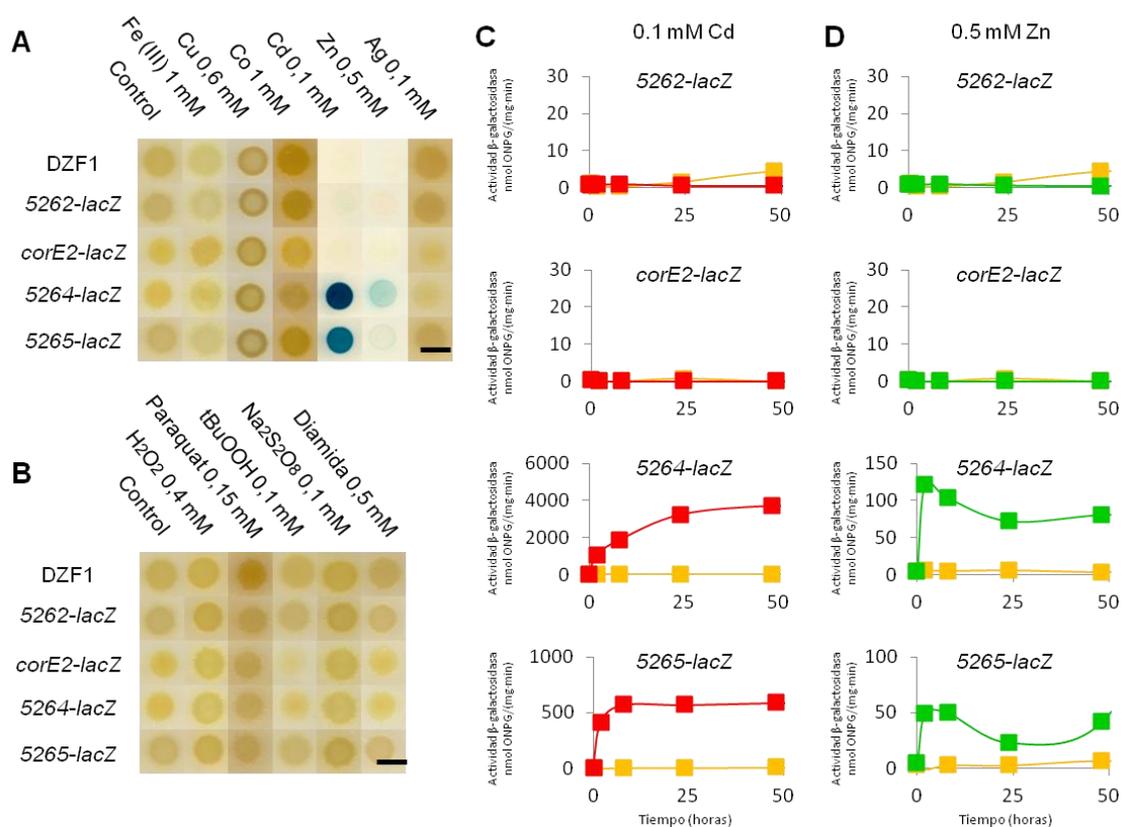


Figura 4.28. Expresión de los genes localizados en el clúster de *corE2* durante el crecimiento vegetativo. **A.** Análisis cualitativo de las fusiones *lacZ* para los genes de la región de *corE2* en presencia de diversos metales. **B.** Análisis cualitativo de estas fusiones en presencia de agentes oxidantes. Las fotografías fueron tomadas tras 96 horas de incubación. **C** y **D.** Cuantificación de la actividad específica β -galactosidasa de las cuatro fusiones *lacZ*. Las células fueron crecidas en CTT sin metales (líneas amarillas), con 0,1 mM de cadmio (panel **C**, líneas rojas) o con 0,5 mM de zinc (panel **D**, líneas verdes), y las muestras se recogieron a los tiempos indicados en cada figura para su medida de actividad específica. Las barras en los paneles **A** y **B** representan 5 mm. Las barras de error en los paneles **C** y **D** representan la desviación estándar entre tres medidas independientes.

Como se ve en la **Figura 4.28B**, los genes *MXAN_5264* y *MXAN_5265* no se inducen en presencia de ninguno de los agentes oxidantes ensayados, por lo que la expresión observada en la **Figura 4.28A** se debe únicamente a la presencia del metal. Ambos genes muestran un perfil de expresión que aumenta rápidamente durante las primeras horas en presencia de ambos metales, alcanzando un máximo en presencia de cadmio entre las 8 y 24 horas tras la inducción, en el cual los niveles de expresión se estabilizan (**Figura 4.28C**). La expresión dependiente de zinc, sin embargo, muestra un máximo a las dos horas, tras el cual la expresión de ambos genes disminuye paulatinamente hasta mantenerse a un nivel bastante elevado por un largo periodo de tiempo (**Figura 4.28D**). Los niveles de expresión alcanzados en presencia de zinc son mucho menores que los alcanzados en presencia de cadmio, indicando una mayor afinidad de la respuesta frente al cadmio que frente al zinc.

A continuación se procedió a analizar el perfil de expresión de estos cuatro genes durante el ciclo de desarrollo, tanto en ausencia como en presencia de metales. Como podemos observar en la **Figura 4.29**, los cuatro genes del clúster de *corE2* se expresan durante el ciclo de desarrollo en ausencia de metales, lo que indica una posible implicación de estos genes durante la formación de los cuerpos fructíferos. Como se puede observar, la inducción de los cuatro genes tiene lugar a distintos niveles, y el efecto observado por parte de los metales y agentes oxidantes ensayados es el mismo que el que se obtuvo durante el ciclo vegetativo. En ausencia de metales, el máximo de expresión se obtiene aproximadamente a las 48 horas tras haber iniciado el ciclo de desarrollo, manteniéndose a niveles elevados hasta las 72 horas.

Los genes *MXAN_5262* y *corE2* muestran un perfil de expresión muy similar, aunque los niveles de actividad alcanzados sean del orden de diez veces menores en el caso de *corE2*, permaneciendo prácticamente inalterados en presencia de cadmio y zinc (**Figuras 4.29D** y **E**). La expresión del gen *MXAN_5264* durante el ciclo de desarrollo es la más baja de todo el clúster, siendo casi imperceptible. No obstante, esta inducción resulta evidente tras un análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa de la cepa (**Figura 4.29C**). El perfil de expresión de este gen en presencia de zinc es muy similar en ambas condiciones (durante el ciclo vegetativo y el ciclo de desarrollo), mientras que en presencia de cadmio observamos una marcada sobreexpresión del mismo durante el ciclo de desarrollo.

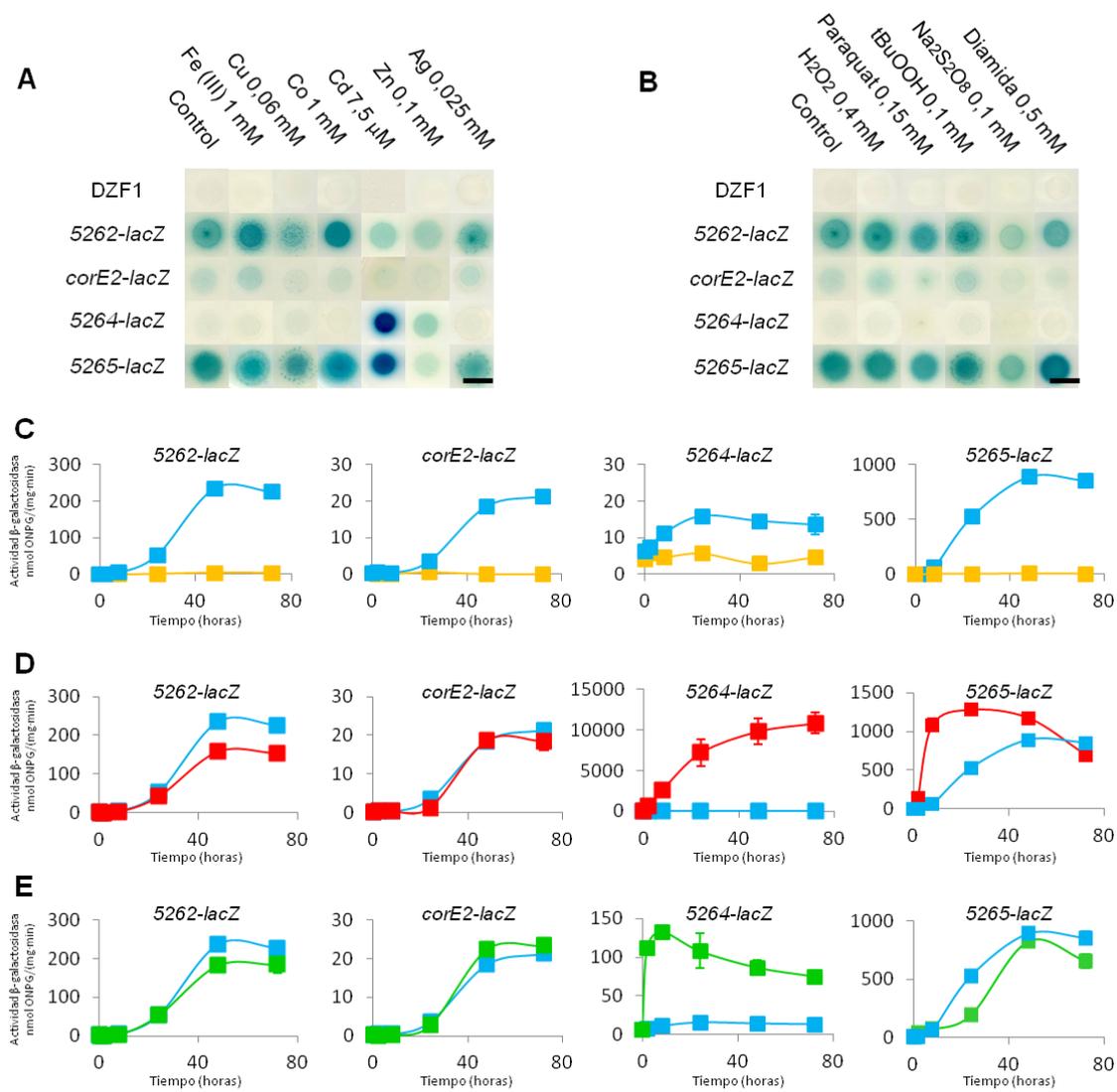


Figura 4.29. Expresión de los genes localizados en el clúster de *corE2* durante el ciclo de desarrollo. **A.** Análisis cualitativo de las fusiones *lacZ* para los genes de la región de *corE2* en presencia de diversos metales. **B.** Análisis cualitativo de estas fusiones en presencia de agentes oxidantes. Las fotografías fueron tomadas tras 96 horas de incubación. **C, D y E.** Cuantificación de la actividad específica β -galactosidasa de las cuatro fusiones *lacZ*. Las células fueron cultivadas en CTT (panel **C**, líneas amarillas) y en CF sin metales (líneas azules), con 0,1 mM de cadmio (panel **D**, líneas rojas) o 0,5 mM de zinc (panel **E**, líneas verdes). Las muestras se recogieron a los tiempos indicados en cada figura para su medida de actividad específica. Las barras en los paneles **A** y **B** representan 5 mm. Las barras de error en los paneles **C, D** y **E** representan la desviación estándar entre tres medidas independientes.

En el caso del gen *MXAN_5265*, los niveles de expresión durante el desarrollo en ausencia de metales son los más elevados del clúster, de forma que cuando inducimos el gen con cadmio durante este ciclo, parte de dicha expresión queda enmascarada, resultando en una conjunción de la expresión dependiente e independiente de metales (Figura 4.29). Todos estos datos revelan una intrincada red de regulación en este clúster, con diversos reguladores controlando su expresión a distintos niveles y en distintas condiciones. Esta regulación será analizada a continuación para conocer si los cuatro genes de este clúster forman parte del mismo operón y si los dos genes que responden a la inducción por metales se encuentran regulados por CorE2.

4.2.2.2. Análisis de la expresión conjunta de los genes *MXAN_5262*, *MXAN_5263*, *MXAN_5264* y *MXAN_5265*

Tras el análisis de expresión de los cuatro genes hemos podido observar un patrón de expresión dual, con los cuatro genes expresándose durante el desarrollo en ausencia de metales y los dos últimos genes del clúster mostrando una expresión dependiente de los metales divalentes Cd y Zn. Éste hecho, sumado a la proximidad y orientación de dichos genes, llevó a analizar su co-expresión bajo las condiciones inductoras de ambos patrones de expresión: durante el ciclo vegetativo en presencia de 0,1 mM de cadmio y durante el ciclo de desarrollo sin ningún metal adicionado.

Tras 48 horas de inducción en ambas condiciones, se extrajo el ARN total de la cepa silvestre de *M. xanthus* y se utilizó como molde para la síntesis del ADNc a partir del gen *MXAN_5265* utilizando el primer 65RT (Figura 4.30A). Del ADNc obtenido del ciclo de desarrollo se realizó una PCR utilizando los primers 62RTF y 62RTR, para amplificar parte del gen *MXAN_5262* y comprobar si las secuencias codificantes de los cuatro genes se transcriben en un único ARNm. La misma estrategia fue utilizada partiendo del ADNc del ciclo vegetativo tras una inducción con cadmio, realizando aparte de la PCR previamente descrita, una que amplificara parte del gen *MXAN_5264* con los oligonucleótidos 64RTF y 64RTR (Figura 4.30A).

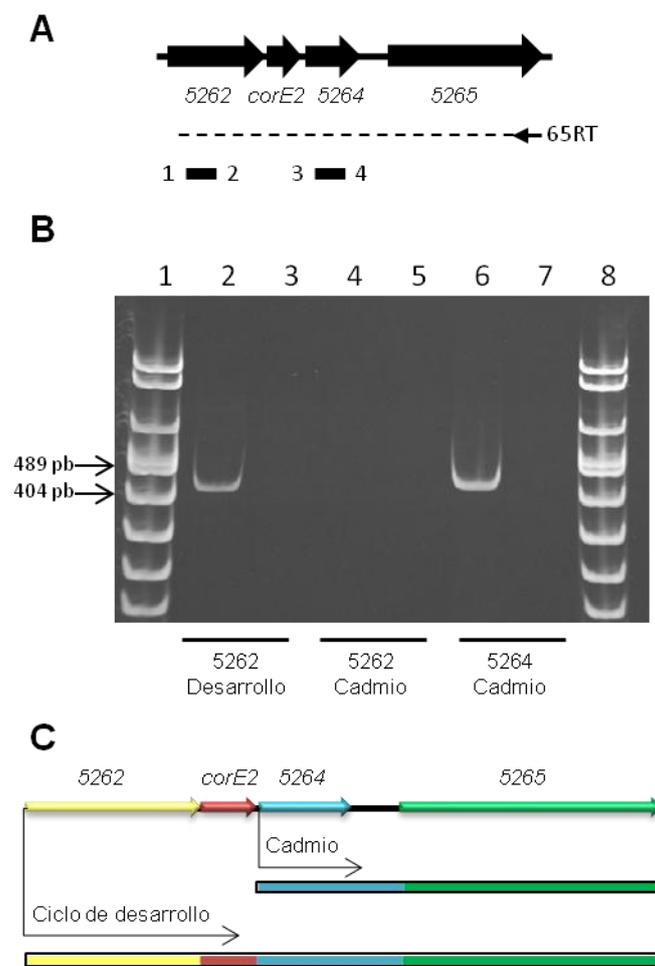


Figura 4.30. Coexpresión de los genes localizados en la región *corE2*. **A.** Estrategia utilizada para analizar la cotranscripción de los cuatro genes. El ADNc está representado como una línea discontinua para señalar que su longitud es desconocida, y el cebador 65RT utilizado para sintetizarlo como una flecha (no a escala). Los productos de PCR están representados como líneas sólidas bajo el ADNc. Los cebadores utilizados para cada PCR están señalados con números: 1 corresponde a 62RTF, 2 a 62RTR, 3 a 64RTF y 4 a 64RTR. **B.** Experimento de RT-PCR. Calles 1 y 8, DNA molecular weight marker VIII. Calles 2 y 3, productos de PCR para el gen *MXAN_5262* utilizando como molde el ADNc y ARN (control negativo), respectivamente, obtenidos de las células en desarrollo. Calles 4 y 5, productos de PCR para el gen *MXAN_5262* utilizando como molde el ADNc y ARN (control negativo), respectivamente, obtenidos de los cultivos con cadmio 0,1 mM. Calles 6 y 7, productos de PCR para el gen *MXAN_5264* utilizando como molde el ADNc y ARN (control negativo), respectivamente, obtenidos de los cultivos con cadmio 0,1 mM. **C.** Esquema representando los dos operones presentes en el clúster de *corE2*, uno dependiente de cadmio y otro dependiente del ciclo de desarrollo.

Como puede observarse en la **Figura 4.30B** (calles 3, 5 y 7), los controles negativos en los que se utilizó el ARN total como molde de las PCRs confirmaron la ausencia de contaminación del ARN de partida con restos de ADN. Los resultados obtenidos revelan que durante el ciclo de desarrollo tiene lugar la expresión conjunta de los cuatro genes (desde el gen *MXAN_5262* hasta el *MXAN_5265*) analizados, mientras que la expresión dependiente de metales no afecta a los genes iniciales (calles 2 y 4 de la **Figura 4.30B**) tal y como habíamos observado en los análisis de la expresión de las fusiones *lacZ* (**Figura 4.28**). Sin embargo la expresión del gen *MXAN_5265* en presencia de cadmio sí se da conjuntamente con el gen *MXAN_5264*. Estos datos parecen confirmar la presencia de dos operones regulados diferencialmente en la región de *corE2*: uno que comprende a los cuatro genes y que se expresa durante el desarrollo, y otro que contiene sólo a los dos últimos genes (*MXAN_5264* y *MXAN_5265*) y se expresa en presencia de cadmio (**Figura 4.31C**).

4.2.3. Estudio de la regulación de los genes del clúster de *corE2* por parte del factor sigma CorE2

Para determinar si la expresión de los genes del clúster de *corE2* se encuentra bajo el control del factor sigma CorE2, se construyó un mutante de delección $\Delta corE2$ en el que se eliminó el dominio esencial σ_2 , y esta cepa se utilizó como trasfondo genético para introducirle el plásmido pKY481-5265 con la fusión transcripcional *lacZ* para el gen *MXAN_5265*.

4.2.3.1. Construcción de la cepa portadora de la delección en fase de la región σ_2 del gen *corE2* e introducción de la fusión transcripcional 5265-*lacZ* a la misma

Debido a que el gen *MXAN_5264*, el primer gen del operón, se encuentra muy próximo al extremo 3' del gen *corE2*, se corría el riesgo de que parte o la totalidad de la secuencia del promotor dependiente de cadmio y zinc estuviera contenida dentro de la secuencia del gen *corE2*, y que, por lo tanto, se eliminara en caso de construir un mutante en el que se delecionara el gen *corE2* completo. Por ello, se procedió a la obtención de una cepa a la cual se le eliminó solamente la región σ_2 del factor sigma CorE2 (Figura 4.31). Esta región es esencial para la unión de los factores sigma al ADN, ya que interacciona con la región promotora -10, y es muy importante para la correcta unión al núcleo de la ARN polimerasa. Por ello, este mutante de delección debe originar una proteína sin actividad.



Figura 4.31. Dominios presentes en CorE2 en la cepa silvestre (WT) y en la cepa JM52IF3 ($\Delta corE2$).

Para la construcción de este mutante de delección en fase se amplificaron mediante PCR dos fragmentos de unas 800 pb cada uno partiendo del ADN genómico de la cepa silvestre de *M. xanthus*, uno de ellos situado aguas arriba de la región σ_2 del gen, empleando los oligonucleótidos CorE2(r2)USXbaI y CorE2(r2)USBamHI como cebadores, y el otro justo aguas abajo de la región σ_2 a deleccionar utilizando los primers CorE2(r2)EcoRI y CorE2(r2)BamHI. El

fragmento situado aguas arriba (r2CorE2US) contenía los sitios de restricción para *Xba*I en el extremo 5' y para *Bam*HI en el 3', mientras que el situado aguas abajo (r2CorE2DS) contiene los sitios para *Bam*HI y *Eco*RI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Ambos productos de PCR fueron digeridos con las endonucleasas apropiadas e insertados mediante un proceso de ligación en el vector pBJ113 previamente digerido con *Xba*I y *Eco*RI tal y como se explica en el apartado 3.2.1.5.1 de Materiales y métodos para obtener finalmente el plásmido pBJ113 Δ r2CorE2. Este plásmido fue sometido a distintas combinaciones de digestiones y a su secuenciación para confirmar que la construcción era correcta.

El plásmido pBJ113 Δ r2CorE2 fue electroporado en la cepa silvestre de *M. xanthus* para que, una vez en el interior celular, los fragmentos clonados en el plásmido recombinaran con las regiones homólogas del cromosoma permitiendo así que éste se integrara en el genoma de la bacteria. Tras la electroporación, las células fueron cultivadas en placas de medio CTT con kanamicina, de forma que sólo aquellas bacterias que hubieran incorporado el plásmido fueran capaces de crecer. Tras varios días de incubación se seleccionaron varias colonias resistentes a este antibiótico para comprobar mediante Southern blot que el plásmido había recombinado en el lugar correcto. Esto nos dio como resultado varias cepas intermediarias Δ r2corE2-Intermediario.

Una vez seleccionada una de estas cepas intermediarias, se cultivó en CTT sin antibiótico para eliminar la presión selectiva y favorecer la recombinación entre las regiones duplicadas, lo que ocasionaría la pérdida del plásmido y, en consecuencia, la del gen de resistencia a kanamicina y el de la galactoquinasa, los cuales aparecen en el plásmido pBJ113 (Julien *et al.*, 2000). De nuevo, este entrecruzamiento puede producirse por cualquiera de los dos fragmentos duplicados. Si el fragmento en el que se produce el segundo evento de recombinación es el mismo en el que tuvo lugar la primera recombinación, obtendríamos cepas de genotipo silvestre, mientras que si la segunda recombinación se produce en el otro fragmento, obtendríamos el mutante de delección en fase para la región σ 2 de CorE2 (ver apartado 3.2.1.5.1 de Materiales y métodos).

Debido a la pérdida de ambos genes marcadores, el de la galactoquinasa, que confiere sensibilidad a la galactosa, y el de la resistencia a la kanamicina, las bacterias que hayan pasado por un segundo proceso de recombinación

homóloga serán aquellas que crezcan en placas de CTT con galactosa y que no sean capaces de crecer en presencia de kanamicina. Para seleccionar el mutante deleción, las células del intermediario merodiploide se cultivaron durante 24 h ausencia de kanamicina y galactosa, para permitir que se diera el segundo evento de recombinación. A continuación, se realizaron diluciones seriadas, que fueron sembradas en medios sin kanamicina pero con galactosa. Las colonias resultantes fueron finalmente analizadas para conocer si el intermediario había evolucionado hacia la cepa silvestre o hacia el mutante de deleción. En este caso, las cepas de interés no fueron sometidas a un Southern blot, ya que la resolución del método no permitía distinguir de forma decisiva entre la diferencia de 198 pb que existía entre la cepa silvestre y el mutante de deleción en fase. Para comprobar esta construcción, se extrajo el ADN genómico de todas las cepas, la silvestre y los posibles mutantes, el cual se utilizó como molde para una PCR que fue secuenciada para confirmar que provenía del mutante $\Delta corE2$.

Tras la obtención del mutante $\Delta corE2$, se le introdujo por electroporación la fusión transcripcional $5265-lacZ$ para obtener la cepa JM52IF3ZY5 ($5265-lacZ-\Delta corE2$). Las colonias resistentes a kanamicina que crecieron tras la electroporación fueron sometidas a una comprobación por Southern blot para confirmar que el plásmido portador de la fusión transcripcional había recombinado correctamente con su región homóloga en el cromosoma.

4.2.3.2 Análisis de la expresión del gen *MXAN_5265* en el mutante de deleción en fase $\Delta corE2$

Una vez obtenida la construcción $5265-lacZ-\Delta corE2$, esta cepa se utilizó para comparar la expresión del gen *MXAN_5265* en la bacteria silvestre y la mutante, en presencia de ambos metales inductores, zinc y cadmio. Como se observa en las Figuras 4.32A y B, la ausencia de CorE2 funcional provoca la pérdida de la expresión dependiente de cadmio y zinc de este gen, demostrando que la inducción dependiente de metales de este operón está bajo el control de este factor sigma.

Para determinar si la expresión independiente de metales observada en los cuatro genes durante el ciclo de desarrollo también era dependiente de CorE2, se cuantificó la actividad β -galactosidasa de las cepas silvestre y mutante portadoras de fusiones entre el gen *MXAN_5265* y *lacZ* (JM52ZY5 y JM52IF3ZY5) en medio sin nutrientes CF que no contenía cadmio ni zinc. Como

se puede ver en la **Figura 4.32C**, CorE2 no es responsable de la expresión del operón formado por cuatro genes que se induce durante el ciclo de desarrollo, ya que el perfil y los niveles de expresión que presenta el gen *MXAN_5265* en la bacteria silvestre y en el mutante $\Delta corE2$ son prácticamente idénticos. Esto confirma la presencia de un sistema de regulación complejo en este clúster, con varios elementos reguladores que funcionan en respuesta a los metales y al agotamiento de nutrientes.

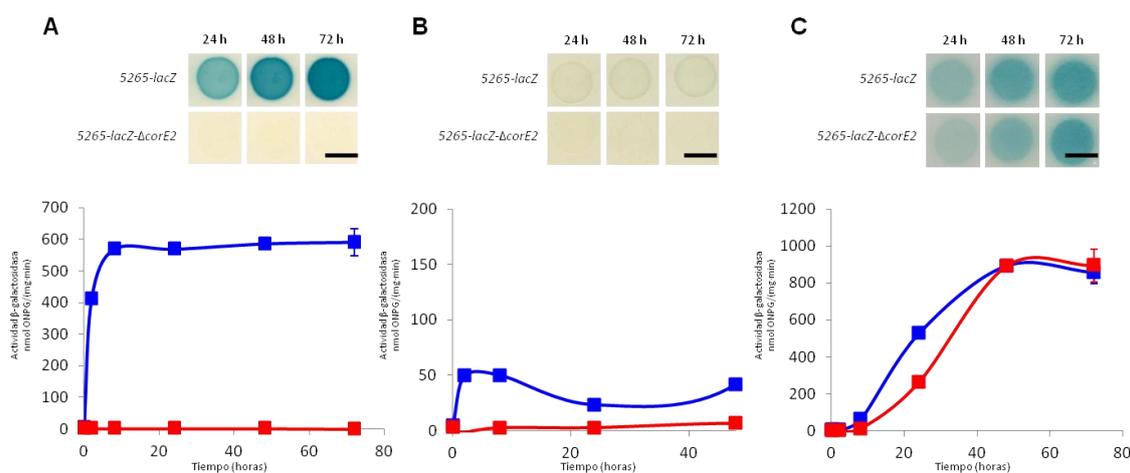


Figura 4.32. Regulación del gen *MXAN_5265* por parte de CorE2. Expresión del gen *MXAN_5265* en la cepa silvestre (azul) y en el mutante $\Delta corE2$ (rojo) en presencia de una concentración 0,1 mM de cadmio (A) o de 0,4 mM de zinc (B), o durante el ciclo de desarrollo en ausencia de metales (C). La expresión se monitorizó de forma cuantitativa (arriba) y cualitativa (abajo). Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar entre tres medidas independientes. Las barras en las imágenes representan 5 mm.

4.2.3.3. Recuperación de la expresión dependiente de metales del gen *MXAN_5265* mediante la reintroducción del gen *corE2*

Para descartar que la pérdida de expresión dependiente de metales del gen *MXAN_5265* observada en el apartado anterior se deba a la manipulación genética de la cepa y no a la ausencia de CorE2, se procedió a reintroducir el gen *corE2* íntegro en la cepa JM52IF3ZY5 (*5265-lacZ-ΔcorE2*). Para ello, se construyó el plásmido pMT00, portador de un gen de resistencia a tetraciclina, así como la secuencia completa del gen *corE2* y una secuencia de unas 800 pb aguas arriba de *corE2* para facilitar la recombinación e integración en el cromosoma, quedando la expresión de *corE2* bajo el control de su mismo promotor.

Para esta construcción se amplificó la región correspondiente a *corE2* y su región aguas arriba mediante PCR utilizando los cebadores CorE2F y CorE2R. A continuación, el producto de PCR fue digerido con las endonucleasas *KpnI* y *BamHI*. El fragmento digerido fue introducido en el vector pNG10A, el cual posee un marcador de resistencia a tetraciclina (Gómez-Santos *et al.*, 2012). Este vector fue en primer lugar digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* para extraerle la secuencia del promotor dependiente de cobre *PcuoA*. Tras separar los dos fragmentos obtenidos en un gel de agarosa se purificó la banda correspondiente al plásmido. A continuación se ligaron el plásmido purificado y el producto de PCR para obtener finalmente el plásmido pMT00. Al igual que en los casos anteriores el plásmido fue comprobado por sucesivas digestiones y fue secuenciado antes de continuar trabajando con él.

Este plásmido fue electroporado en la cepa JM52IF3ZY5. Tras varios días de incubación se seleccionaron las colonias capaces de crecer en medio de cultivo con kanamicina y tetraciclina, y se analizaron mediante Southern blot para comprobar que el plásmido se había integrado en el cromosoma en la región deseada.

Al analizar la expresión del gen *MXAN_5265*, y tal y como se observa en la Figura 4.33A y B, al introducir *corE2* el gen *MXAN_5265* vuelve a transcribirse cuando se adiciona cadmio al medio de cultivo. Analizando cuantitativamente los niveles de expresión, podemos ver que hay un incremento en la expresión de *MXAN_5265* en la cepa JM52SDM00 (*5265-lacZ-corE2^{WT}-ΔcorE2*) con respecto a la silvestre (Figura 4.33C). Debido a la posición de *corE2* en el genoma, aguas arriba de los genes que regula, es posible que al introducir el gen en una cepa con un *corE2* truncado se hayan duplicado las regiones promotoras, lo que explicaría este aumento de los niveles de expresión. Los datos obtenidos confirmarían que CorE2 es el responsable de la expresión dependiente de cadmio del operón que contiene los dos genes localizados aguas abajo de su propio gen.

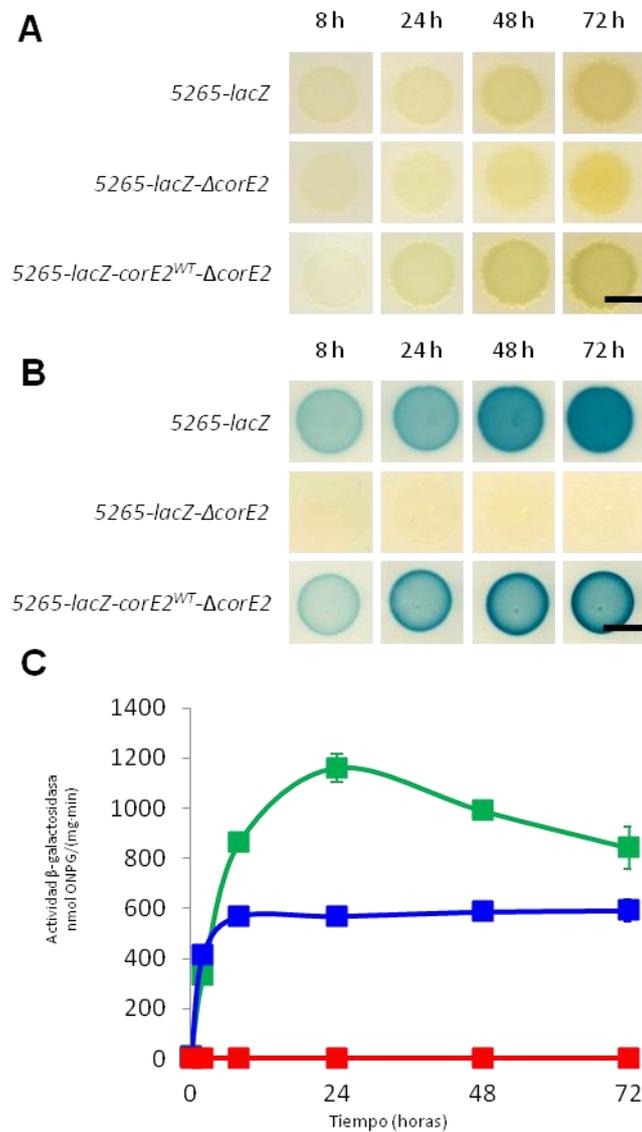


Figura 4.33. Complementación de la regulación dependiente de metales del mutante $\Delta corE2$. **A** y **B**. Expresión del gen *MXAN_5265* en la cepa silvestre, en el mutante $\Delta corE2$, y en la cepa *CorE2'* en ausencia de metales (panel **A**) o con una concentración 0,1 mM de cadmio (panel **B**). **C**. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa de las cepas silvestre (azul), $\Delta corE2$ (rojo), y *corE2'* (verde) en presencia de una concentración de cadmio de 0,1 mM. Las barras en los paneles **A** y **B** representan 5 mm. Las barras de error en el panel **C** representan la desviación estandar entre tres medidas independientes.

4.2.4. Papel de los genes del clúster de *corE2* en la resistencia a metales y la formación de cuerpos fructíferos

4.2.4.1. Papel de los genes del clúster de *corE2* en la resistencia a metales

Dado el patrón de expresión dependiente de cadmio y zinc de los genes *MXAN_5264* y *MXAN_5265*, podemos esperar que éstos jueguen un papel importante en la resistencia a metales. Debido a que la expresión de ambos viene controlada por el factor sigma *CorE2*, el estudio de su rol en la resistencia a metales fue analizado comparando la tolerancia de la cepa silvestre DZF1 y del mutante $\Delta corE2$ a distintas concentraciones de zinc y de cadmio.

Este experimento fue realizado en medio CTT líquido que contenía distintas concentraciones de zinc y cadmio. Cuando el crecimiento de las cepas silvestre y mutante fue analizado a las 32 horas después de inocular las cepas en medio con metal (midiendo la DO_{600} del cultivo), no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas (Figuras 4.34A y B). Sin embargo, se ha descrito en el estudio de otros mecanismos de homeostasis de metales que para que dichos mecanismos estén completamente activados, la célula requiere una preadaptación al metal de estudio (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2010a). Mediante esta estrategia se pueden observar diferencias más significativas que cuando el experimento se realiza en las condiciones mencionadas anteriormente. Por este motivo, ambas cepas fueron en primer lugar incubadas durante 24 horas en presencia de 10 μ M de cadmio ó 0,2 mM de zinc. Tras este tiempo fueron transferidas a un nuevo medio de cultivo con concentraciones más elevadas de ambos metales para determinar si se observaban diferencias en crecimiento en estas condiciones. Como puede verse en la Figura 4.34D, la resistencia al zinc de la cepa mutante $\Delta corE2$ se vio fuertemente afectada tras la preadaptación del cultivo a este metal. En cuanto a la tolerancia al cadmio, las diferencias entre ambas cepas también aumentaron tras la preadaptación al metal, pero no se observó un cambio tan notable como con el zinc (Figura 4.34C). Estos datos confirman la implicación del regulador *CorE2*, y por tanto de los genes bajo su control, en la resistencia a metales pesados.

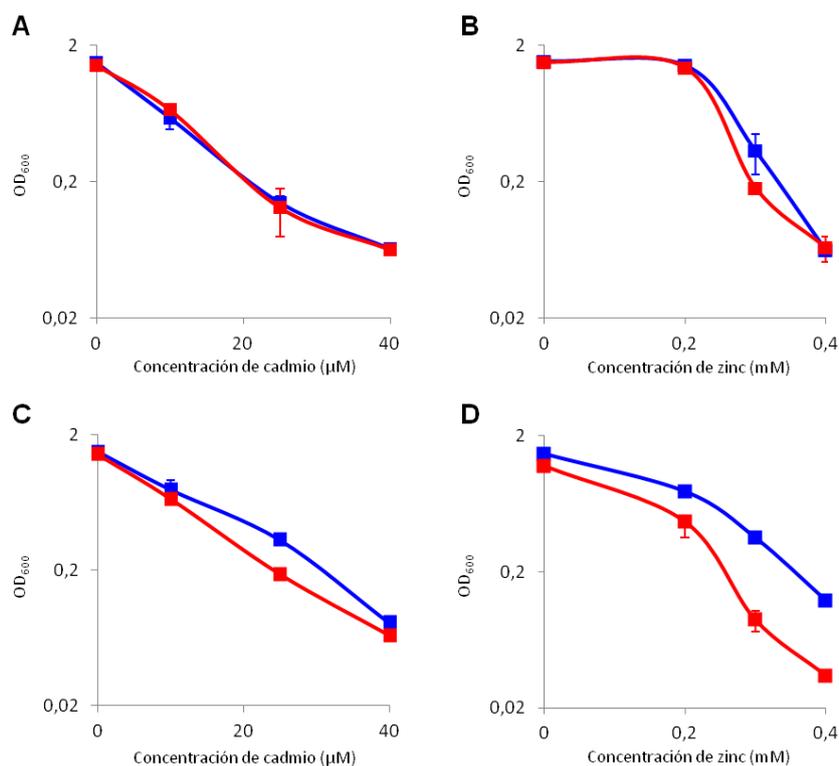


Figura 4.34. Fenotipo del mutante $\Delta corE2$. **A** y **B**. Un cultivo de la cepa silvestre (líneas azules) y del mutante $\Delta corE2$ (líneas rojas) se incubó durante 24 horas en medio CTT sin metales y se diluyó hasta una DO_{600} de 0,05 en medio CTT líquido conteniendo las concentraciones de cadmio (panel **A**) y zinc (panel **B**) indicadas. La DO_{600} de los cultivos se determinó tras 32 horas de incubación. **C** y **D**. Se siguió el mismo procedimiento que en los experimentos de los paneles **A** y **B**, pero el cultivo inicial de 24 horas se llevó a cabo en presencia de una concentración 10 μM de cadmio (panel **C**) o 0,2 mM de zinc (panel **D**). Las barras de error representan la desviación estandar entre tres medidas independientes.

4.2.4.2. Papel de los genes del clúster de *corE2* en el ciclo de desarrollo

Debido a que los cuatro genes del clúster de *corE2* se expresan durante el ciclo de desarrollo, es posible que aparte de estar implicados en la resistencia a metales, como se ha mencionado en el apartado anterior, desempeñen también algún papel importante durante la formación de los cuerpos fructíferos. Debido a que en este caso no conocemos al regulador transcripcional responsable de la inducción del operón que contiene los cuatro genes, se decidió construir una serie de mutantes de delección en fase para cada uno de los genes del clúster y hacer un seguimiento de la capacidad de cada uno para formar cuerpos fructíferos.

4.2.4.2.1. Construcción de las cepas mutantes JM52IF2, JM52IF4 y JM52IF5 ($\Delta 5262$, $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$, respectivamente)

Para la construcción de las cepas mutantes JM52IF2, JM52IF4 y JM52IF5 se procedió a eliminar la secuencia completa de cada uno de los genes, dejando únicamente el codón de inicio y el de terminación, con un sitio *Bam*HI entre ambos. En primer lugar se construyeron los plásmidos pBJ113 Δ 5262, pBJ113 Δ 5264 y pBJ113 Δ 5265 tal y como se explica en el apartado 3.2.1.5.1 de Materiales y métodos, portadores de secuencia de 800-900 pares de bases aguas arriba y otra aguas abajo de la región a delecionar, unidas entre sí por un sitio de restricción *Bam*HI. Estos dos fragmentos se clonaron en el vector pBJ113 digerido con *Xba*I y *Eco*RI. Para amplificar los diferentes fragmentos se emplearon los oligonucleótidos 5262USXbaI, 5262USBamHI, 5262DSBamHI y 5262DSEcoRI para el plásmido pBJ113 Δ 5262; 5264USXbaI, 5264USBamHI, 5264DSBamHI y 5264DSEcoRI para el plásmido pBJ113 Δ 5264; y 5265USXbaI, 5265USBamHI, 5265DSBamHI y 5265DSEcoRI para el plásmido pBJ113 Δ 5265. Tras la construcción de los tres plásmidos, se comprobó que eran correctos mediante digestiones con las enzimas de restricción apropiadas para cada uno de ellos. Además, los tres plásmidos fueron secuenciados para confirmar que la secuencia era la correcta. Una vez obtenidos los tres plásmidos, fueron dializados y electroporados independientemente en *M. xanthus* para que se integraran en el cromosoma de la cepa silvestre mediante recombinación homóloga. Tras la electroporación, las cepas fueron sembradas en medio con kanamicina, para que sólo crecieran aquellas colonias que hubieran integrado los plásmidos. Las colonias resistentes a kanamicina resultantes fueron comprobadas por Southern blot (apartado 3.2.2.8 de Materiales y métodos) para asegurar que la recombinación homóloga hubiera tenido lugar correctamente.

Una vez obtenidas las tres cepas intermediarias, se cultivaron en medio sin antibiótico durante 24 horas, con la finalidad de que al eliminar la presión selectiva se consiguieran bacterias en donde se hubiera perdido el plásmido por entrecruzamiento entre las regiones duplicadas. Al eliminarse el plásmido, y como ya se mencionó anteriormente, se perderá con él el gen de resistencia a kanamicina y el gen de la galactoquinasa, por lo que las bacterias resultantes de este segundo evento de recombinación serán sensibles a la kanamicina pero resistentes a la galactosa. Para seleccionar estas bacterias se realizaron diluciones de la bacteria intermediaria crecida en ausencia de antibiótico y se

sembraron en medio con galactosa. Las cepas seleccionadas de cada una de las construcciones, capaces de crecer en medios con galactosa, e incapaces de hacerlo en medios con kanamicina, fueron analizadas mediante Southern blot para distinguir entre las que habían revertido a silvestres y las que habían evolucionado hacia el mutante de delección en fase deseado.

4.2.4.2.2. Análisis del fenotipo de las cepas mutantes durante el ciclo de desarrollo

Una vez obtenidas las cepas mutantes, se analizó y comparó la capacidad de formar cuerpos fructíferos de las cepas DZF1 (silvestre), JM52IF2 ($\Delta 5262$), JM52IF3 ($\Delta 5263$), JM52IF4 ($\Delta 5264$) y JM52IF5 ($\Delta 5265$), para averiguar el efecto que cada mutación tiene en el ciclo de desarrollo.

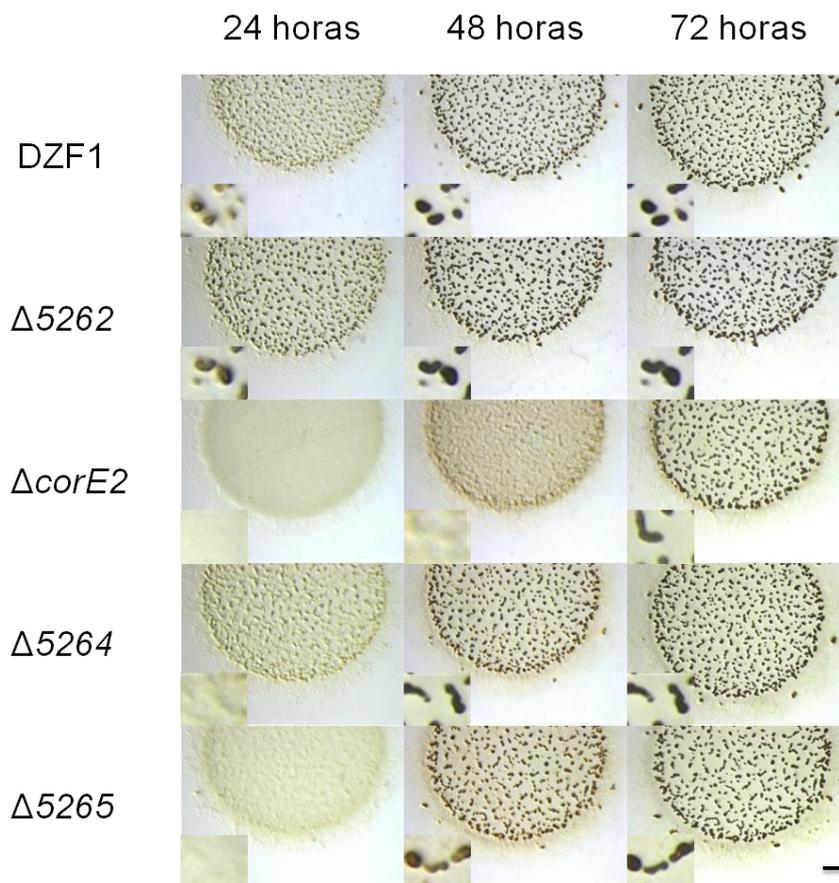


Figura 4.35. Fenotipo de los cuatro mutantes de delección en fase del clúster *corE2* ($\Delta 5262$, $\Delta corE2$, $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$) durante el ciclo de desarrollo en ausencia de metales. El detalle de los cuerpos fructíferos puede observarse en la parte inferior izquierda de cada imagen. La barra representa 1 y 0,2 mm en las imágenes generales y ampliadas, respectivamente.

Como puede verse en la **Figura 4.35**, cuando las cepas fueron cultivadas en medio CF, inductor del ciclo de desarrollo, tanto el mutante $\Delta 5263$ ($\Delta corE2$), como los mutantes para los genes regulados por CorE2 ($\Delta 5264$ y $\Delta 5265$), muestran un ligero retraso en la formación de cuerpos fructíferos. Los mutantes $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$, sin embargo, lograron completar las primeras fases del desarrollo a las 48 horas, siendo el mutante de la glioxal oxidasa en el que mayor retraso se ha observado de las dos. La cepa $\Delta 5262$ no presenta ningún defecto en la formación de cuerpos fructíferos, incluso parece completar el ciclo de desarrollo antes que la cepa silvestre. Todos estos datos parecen confirmar la relación de estos cuatro genes en general, y el factor sigma CorE2 en particular, con el ciclo de desarrollo.

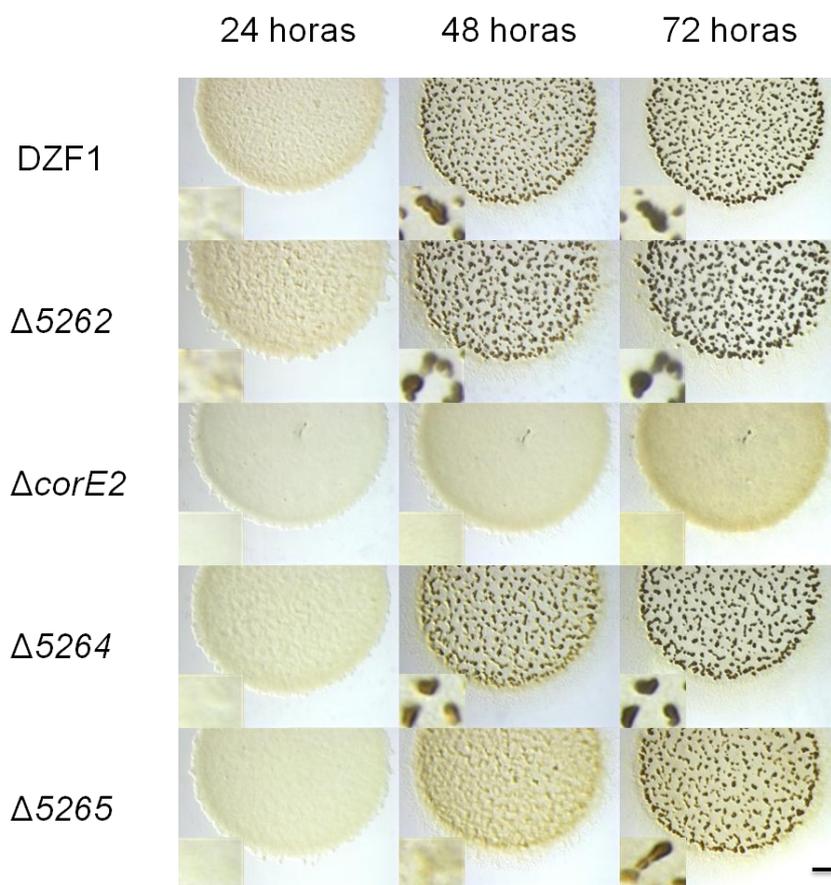


Figura 4.36. Fenotipo de los cuatro mutantes de delección en fase del clúster *corE2* ($\Delta 5262$, $\Delta corE2$, $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$) durante el ciclo de desarrollo en presencia de 20 μM de cadmio. El detalle de los cuerpos fructíferos puede observarse en la parte inferior izquierda de cada imagen. La barra representa 1 y 0,2 mm en las imágenes generales y ampliadas, respectivamente.

A continuación, se analizó el papel de los cuatro genes del clúster de *corE2* durante el desarrollo en presencia de metales. Cuando se analizó el ciclo de desarrollo en presencia de 20 μM de cadmio, la cepa ΔcorE2 fue incapaz de iniciar el desarrollo incluso tras 72 horas de incubación, mientras que la cepa silvestre (y las cepas $\Delta 5262$ y $\Delta 5264$) se desarrolló prácticamente con normalidad a las 48 horas. La cepa $\Delta 5265$ presenta una situación intermedia, en la que parece iniciar el ciclo de desarrollo a las 48 horas, aunque no completa la formación de cuerpos fructíferos compactos ni siquiera a las 72 horas (Figura 4.36).

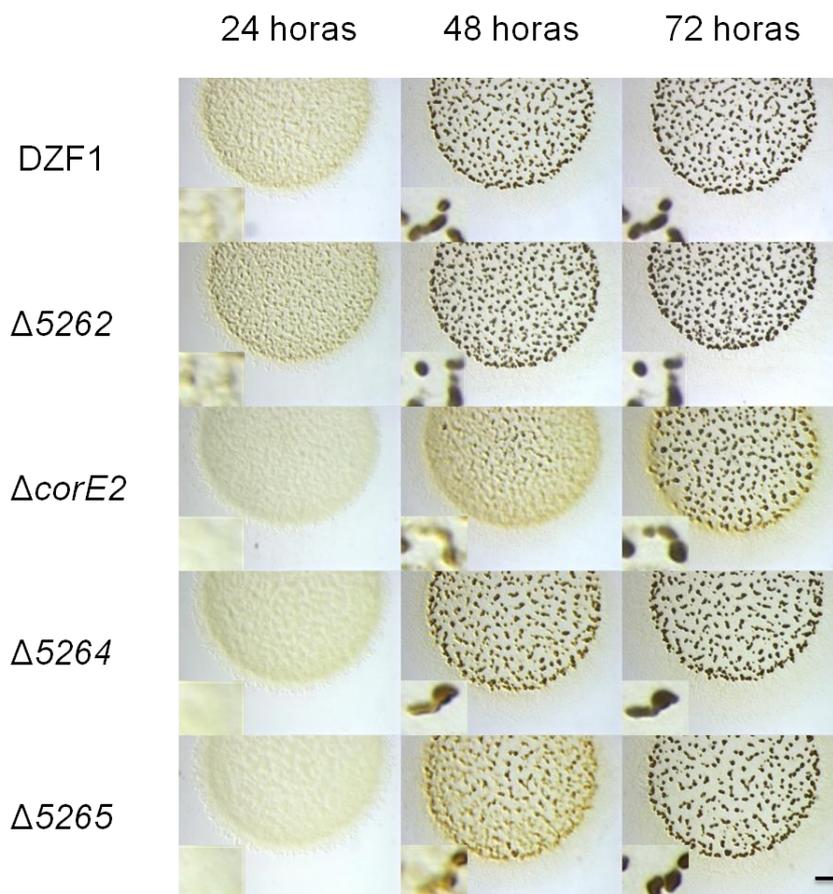


Figura 4.37. Fenotipo de los cuatro mutantes de delección en fase del clúster *corE2* ($\Delta 5262$, ΔcorE2 , $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$) durante el ciclo de desarrollo en presencia de 0,2 mM de zinc. El detalle de los cuerpos fructíferos puede observarse en la parte inferior izquierda de cada imagen. La barra representa 1 y 0,2 mm en las imágenes generales y ampliadas, respectivamente.

Los resultados obtenidos con zinc son similares a los obtenidos con cadmio, aunque con un efecto más atenuado (Figura 4.37), lo que sugiere que el efecto sobre la resistencia al zinc es mucho menor durante el ciclo de desarrollo que durante el crecimiento vegetativo, mientras que la resistencia al cadmio que proporcionan los genes regulados por CorE2 es mucho mayor durante el desarrollo. Todo esto parece indicar que tanto *corE2* como los genes regulados por él son necesarios para la correcta formación de cuerpos fructíferos y para una completa resistencia a la toxicidad del zinc y el cadmio en distinta medida según la fase de su ciclo de vida en la que se encuentre la bacteria.

Además, el grado en que afectan las distintas mutaciones al ciclo de desarrollo nos ayuda a comprender el grado en que participa cada uno de los genes en este fenotipo: de los dos genes regulados por CorE2, el que mayor efecto parece tener sobre el ciclo de desarrollo y sobre la resistencia a metales parece ser el gen que codifica para la glioxal oxidasa MXAN_5265, mientras que la bomba de expulsión de cationes MXAN_5264 parece tener un efecto menor sobre ambos. De este modo, el mutante del gen que codifica para CorE2, regulador de ambos genes, suma el efecto de ambas mutaciones, observándose un fenotipo más acusado en ambos procesos. Los resultados de la formación de cuerpos fructíferos en presencia de cadmio y zinc han permitido observar la sensibilidad de las cepas mutantes del clúster de *corE2* a ambos metales, pero no han permitido ver una recuperación del retraso en el ciclo de desarrollo como sucedía con CorE cuando la cepa mutante era incubada con cobre (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Para comprobar si el cobre tenía la capacidad de recuperar la capacidad de formación de cuerpos fructíferos de las cepas mutantes del clúster de *corE2*, se inocularon todos los mutantes que mostraban un retraso en el desarrollo en presencia de distintas cantidades de cobre, y se monitorizó la formación de cuerpos fructíferos a las 24 horas. Como se observa en la Figura 4.38, las cepas mutantes recuperan cierta capacidad de formar cuerpos fructíferos a las 24 horas con concentraciones de cobre de 60 μ M.

De este modo, concluimos que tanto CorE2 como los genes regulados por él juegan un papel tanto en la resistencia a metales como en la correcta formación de los cuerpos fructíferos durante el ciclo de desarrollo.

IV. Resultados

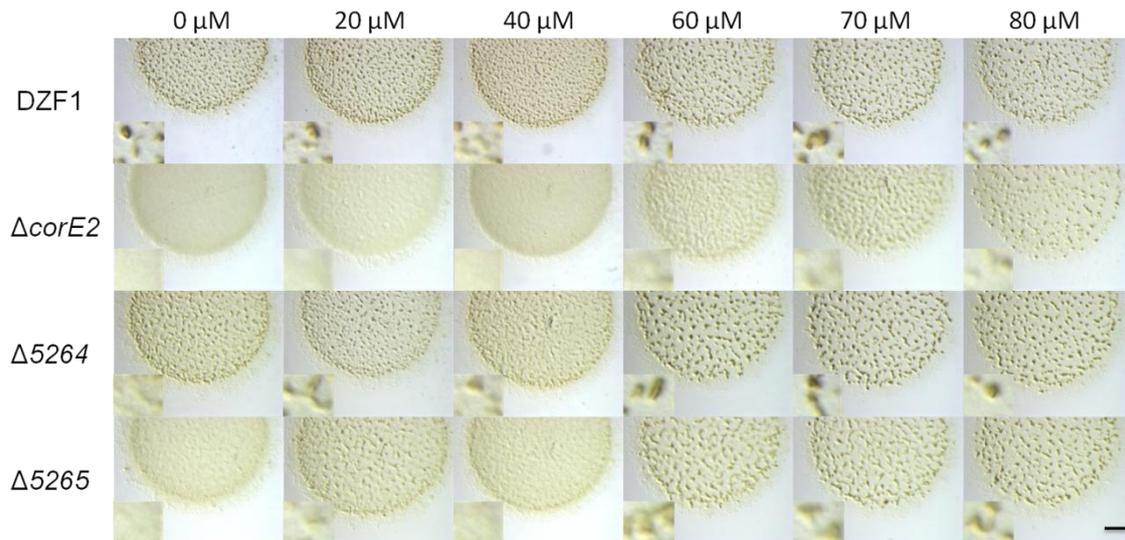


Figura 4.38. Capacidad de formación de cuerpos fructíferos de los cuatro mutantes de delección en fase del clúster *corE2* ($\Delta 5262$, ΔcorE2 , $\Delta 5264$ y $\Delta 5265$ en presencia de distintas concentraciones de cobre tras 24 horas de incubación. El detalle de los cuerpos fructíferos puede observarse en la parte inferior izquierda de cada imagen. La barra representa 1 y 0,2 mm en las imágenes generales y ampliadas, respectivamente.

4.3. Investigando el mecanismo de acción de los factores sigma de tipo CorE

Una vez hecho un análisis general de los factores sigma del grupo ECF44 en general y de CorE2 en particular, se procedió a realizar un estudio comparativo entre los dos factores sigma de este tipo codificados por *M. xanthus*, CorE y CorE2. Debido a que hasta ahora sólo se ha caracterizado el factor sigma CorE, responsable de la respuesta temprana al cobre en *M. xanthus*, muchas de sus características se han supuesto comunes a todo el grupo. El descubrimiento y el estudio de un segundo miembro de este grupo pueden arrojar luz a sobre este tipo de factores sigma, permitiéndonos distinguir entre rasgos comunes a los factores sigma de tipo CorE y rasgos particulares específicos de cada miembro, así como descubrir nuevas peculiaridades y características de este grupo de metalorreguladores.

4.3.1. Estudio de la autorregulación de CorE2

Pese a no haberse observado inducción del gen *corE2* dependiente de metales (Figuras 4.28 y 4.29) y a que se ha demostrado que la expresión del operón durante el ciclo de desarrollo no se encuentra regulada por este factor sigma (Figura 4.32C), dado que una de las principales características de los factores sigma de tipo ECF es estar autorregulados total o parcialmente (Helmann, 2002; Gómez Santos *et al.*, 2011), se procedió a estudiar si CorE2 regulaba su propia expresión.

4.3.1.1. Construcción de la cepa JM52IF3ZY3 (*corE2-lacZ-ΔcorE2*)

Para ello, se introdujo el plásmido pKY481-5263, conteniendo la fusión transcripcional *lacZ* para el gen *corE2*, en el mutante de delección en fase $\Delta corE2$ mediante electroporación. Como en los casos anteriores, esta fusión fue analizada por Southern blot para corroborar que la recombinación homóloga había tenido lugar de la forma correcta.

4.3.1.2. Análisis de la expresión de *corE2* en el mutante $\Delta corE2$

La actividad β -galactosidasa de esta fusión transcripcional fue analizada tanto en la cepa silvestre como en el mutante $\Delta corE2$, y tanto en presencia como

en ausencia de 7,5 μM de cadmio, el metal inductor de CorE2, de manera cualitativa y cuantitativa para ver posibles diferencias en los niveles de expresión durante el ciclo de desarrollo. Como se observa en la **Figura 4.39**, la ausencia del regulador transcripcional CorE2 no afecta a su propia inducción dependiente del ciclo de desarrollo ni a los niveles alcanzados en presencia de cadmio, presentando el mismo patrón de expresión que la cepa silvestre en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, al contrario que su homólogo CorE, el cual se autorregula parcialmente, la expresión de CorE2 depende por completo de la acción de otro regulador.

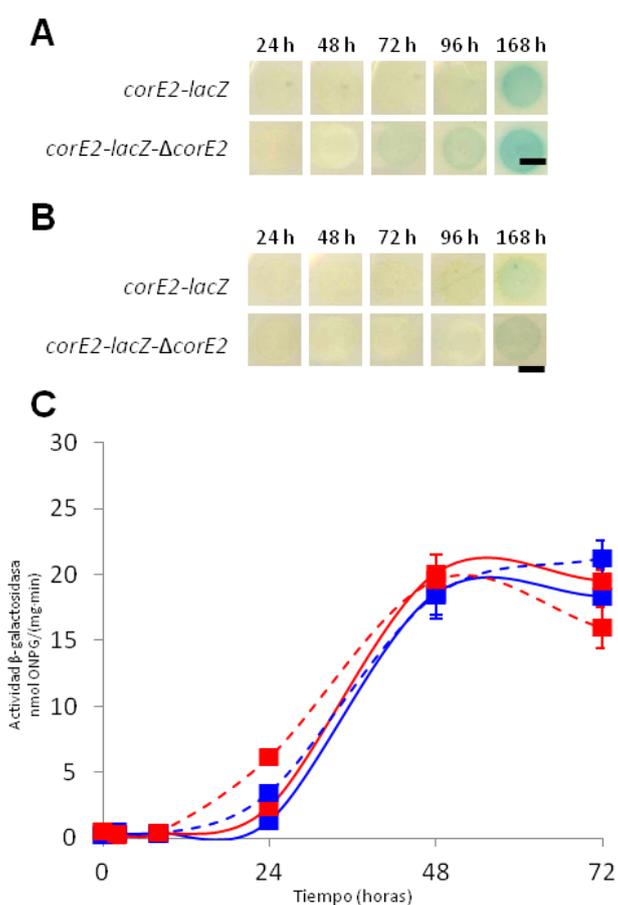


Figura 4.39. Autorregulación de *corE2*. **A** y **B**. Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa en la fusión *corE2-lacZ* en la cepa silvestre y el mutante $\Delta corE2$ sobre placas de CF con X-gal sin metales (panel **A**) y con 7,5 μM de cadmio (panel **B**). Las barras representan 5 mm. **C**. Análisis cuantitativo de la actividad específica β -galactosidasa de la fusión *corE2-lacZ* en la cepa silvestre (líneas azules) y el mutante $\Delta corE2$ (líneas rojas) durante el ciclo de desarrollo en ausencia de metales (líneas continuas) y con 7,5 μM de cadmio (líneas discontinuas). Las barras de error indican la desviación estándar de tres medidas independientes.

4.3.2. Búsqueda del factor antisigma de CorE2

Como hemos comentado en la Introducción, una de las características más comunes entre los factores sigma de tipo ECF es la presencia de un factor antisigma, generalmente cotranscrito con el propio factor sigma, encargado de secuestrarlo para impedir la transcripción de los genes que regula en ausencia de estímulo. Sin embargo, una de las peculiaridades de CorE es la ausencia de un factor antisigma que module su actividad. En su lugar, el propio factor sigma es el encargado de detectar el estímulo y activarse o inactivarse según el caso gracias a su CRD (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Pese a que se ha propuesto que todos los factores sigma de tipo CorE funcionan de un modo similar (Mascher, 2013), se ha sugerido que la lipoproteína de membrana (MXAN_5262) que se cotranscribe con CorE2 pudiera actuar como su factor antisigma (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). Según el análisis bioinformático de la secuencia de la lipoproteína llevado a cabo durante la realización de esta tesis y que se ha tratado con anterioridad, ésta no podría funcionar como el factor antisigma de CorE2, ya que esta lipoproteína parece ser exportada a la matriz extracelular, imposibilitando por ello su interacción con CorE2, una proteína citoplasmática. No obstante, el análisis bioinformático no permite sacar conclusiones taxativas, ya que carecemos de datos experimentales al respecto.

Con el fin de confirmar experimentalmente que el producto del gen MXAN_5262 no funciona como el factor antisigma de CorE2, se procedió a analizar los efectos de la delección del gen MXAN_5262 construida previamente sobre la expresión del gen MXAN_5265, el cual es regulado por CorE2 como hemos visto antes. En caso de que esta lipoproteína actuara como factor antisigma, al deleccionar el gen que lo codifica, el factor sigma ECF asociado quedaría libre siempre, y ejercería su función de expresar los genes que regula en ausencia de estímulo. Es decir, si la lipoproteína MXAN_5262 actuara como antisigma de CorE2, al deleccionarla, los genes regulados por CorE2 se expresarían aún en ausencia de cadmio en el medio. Si, por el contrario, al eliminar el gen MXAN_5262, CorE2 siguiera modulando su actividad en función de la presencia o ausencia de cadmio, podríamos descartar que esta lipoproteína actuara como antisigma de CorE2 (Gómez-Santos *et al.*, 2011).

IV. Resultados

Para comprobarlo, la fusión transcripcional *5265-lacZ* fue introducida en el mutante de delección en fase JM52IF2 ($\Delta 5262$), y a continuación se determinó la actividad β -galactosidasa de la cepa obtenida tanto en presencia como en ausencia de cadmio.

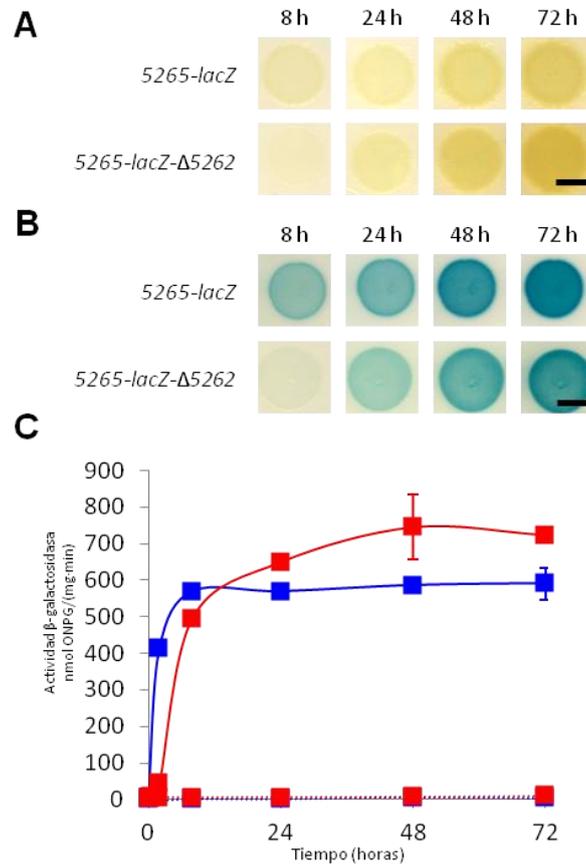


Figura 4.40. La lipoproteína codificada por el gen *MXAN_5262* no funciona como el factor antisigma de CorE2. **A** y **B**. Seguimiento de las cepas silvestre y $\Delta 5262$ portadoras de la fusión *5265-lacZ* sobre placas de CTT en ausencia de metales (panel **A**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **B**). Para el análisis cualitativo, las placas también contenían X-gal para monitorizar la actividad β -galactosidasa. **C**. Análisis cuantitativo de la expresión dependiente de cadmio del gen *MXAN_5265* regulado por CorE2 en el trasfondo genético de la cepa silvestre y del mutante $\Delta 5262$. La cepa silvestre (líneas azules) y la mutante (líneas rojas) se incubaron en placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) y con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). La actividad específica β -galactosidasa se determine en los extractos celulares recogidos en los tiempos indicados en la figura. Las barras de error indican la desviación estándar de tres medidas independientes. Las barras en los paneles **A** y **B** representan 5 mm.

Como hemos comentado anteriormente, para construir esta cepa se introdujo por electroporación el plásmido pKY481-5265 en el mutante de delección en fase $\Delta 5262$, que se describió cómo fue construido en el apartado 4.2.4.2.1.1 de esta Tesis Doctoral. Como en todos los casos, las colonias resistentes a kanamicina resultantes fueron analizadas por Southern blot para comprobar si el plásmido había recombinado en la región homóloga a la secuencia insertada.

Cuando se determinó la actividad β -galactosidasa de la cepa JM52IF2ZY5 (*5265-lacZ- Δ 5262*) de manera cualitativa y cuantitativa, y se comparó con la de la cepa JM52ZY5 (*5265-lacZ*), se observó que la delección del gen *MXAN_5262* no aumentaba la expresión de CorE2 en ausencia de cadmio (**Figura 4.40A y C**), demostrando que esta lipoproteína no funciona como el factor antisigma de CorE2.

No obstante, la delección del gen *MXAN_5262* retrasa en cierto grado la inducción del gen *MXAN_5265* en presencia de cadmio (**Figura 4.40B y C**), lo que sugiere que esta lipoproteína puede desempeñar algún papel en la ruta de transducción de señales de CorE2.

4.3.3. Determinación del promotor reconocido por los factores sigma del grupo ECF44

Una de las características principales de los factores sigma de tipo ECF, como todo factor sigma, es que regulan la expresión génica gracias a su capacidad para unirse a promotores específicos. Cada factor sigma de la familia $\sigma 70$ reconoce dos secuencias, situadas en las posiciones -35 y -10 del sitio de inicio de la transcripción, uniéndose a ellas e iniciando, junto con el núcleo de la ARN polimerasa, la transcripción de los genes situados en dirección 3' de esta región promotora.

Como cada factor sigma reconoce una secuencia específica, es de esperar que la secuencia reconocida por el factor sigma CorE de *M. xanthus* sea distinta de la que reconoce CorE2. Sin embargo, se ha establecido que para cada uno de los grupos de factores sigma de tipo ECF existe una secuencia promotora consenso conservada (Starón *et al.*, 2009) (Figura 4.41). Es decir, pese a las diferencias que puedan existir entre los promotores de CorE y CorE2, se espera que ciertas bases estén conservadas al pertenecer ambos al mismo grupo de factores sigma.

Con el fin de conocer el consenso del promotor de los factores sigma de tipo ECF44, se realizó un 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a partir del ARNm de un gen regulado por CorE. Debido a las características de la región del cobre en la que se engloban los genes regulados por CorE, se escogió el gen *MXAN_3422 (copB)* como candidato para el estudio de su promotor, ya que la expresión de este gen presenta una dependencia absoluta de CorE y, además, es el gen que ocuparía la primera posición en el ARNm (Figura 4.42A).

Para este estudio se indujo la expresión de *copB* cultivando la cepa silvestre de *M. xanthus* DZF1 en presencia de 0,3 mM de cobre durante dos horas y se extrajo el ARN total del cultivo. A continuación, empleando la metodología descrita en el apartado 3.2.3.3 de Materiales y métodos, se sintetizó el ADNc a partir del ARNm de *copB* utilizando el primer 3422GSP1. Seguidamente se degradó el ARN de la muestra y se añadió una cola de poliadeninas en el extremo 3' del ADNc.

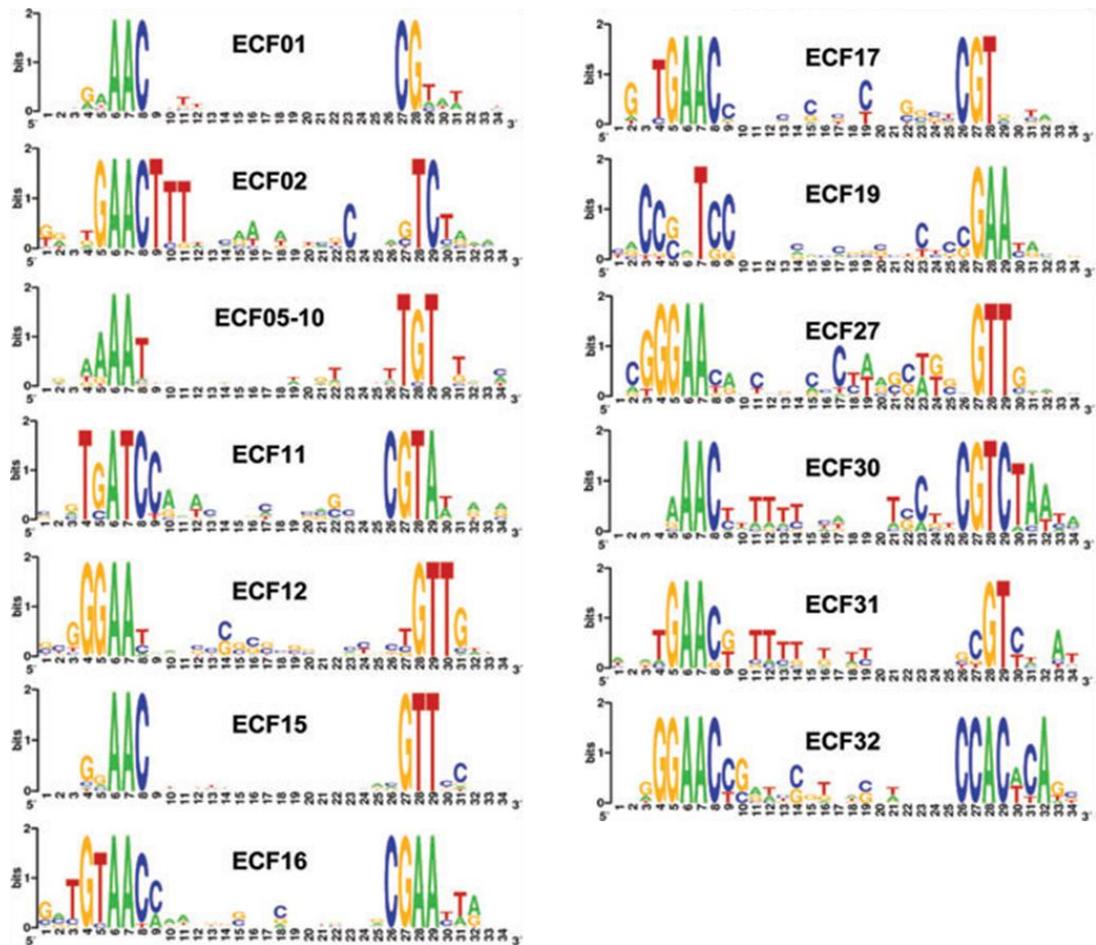


Figura 4.41. HMM-Logos de los promotores de varios grupos de factores sigma de tipo ECF. En ellos puede verse la elevada conservación de las regiones -10 y -35 dentro de cada uno de los grupos caracterizados (Staroń *et al.*, 2009).

Posteriormente, se utilizó el oligonucleótido APT17 para que anillara con esta cola poliA y permitiera la amplificación de la segunda hebra de ADN. Finalmente, este ADN de cadena doble fue amplificado por PCR utilizando los cebadores 3422GSP2Clon y AUAP, y el producto obtenido fue clonado en el vector pBJ113 y secuenciado. El resultado nos reveló la secuencia completa de la región situada a 5' del gen *MXAN_3422* que aparece en el ARNm, pudiendo así identificar el sitio de inicio de la transcripción (+1) y, por tanto, las regiones -10 y -35 del promotor (Figura 4.42B).

IV. Resultados

Para tratar de buscar la región promotora completa se alinearon las secuencias situadas en posición 5' de varios genes regulados por CorE con la de la secuencia obtenida experimentalmente mediante 5' RACE. Tras el alineamiento se obtuvo un consenso bastante conservado de las regiones -10 y -35 del promotor al que se une CorE en *M. xanthus* (Figura 4.48C y D). De este modo la secuencia promotora consenso a la que se uniría CorE sería TGTAAG en posición -35 y CGT en posición -10.

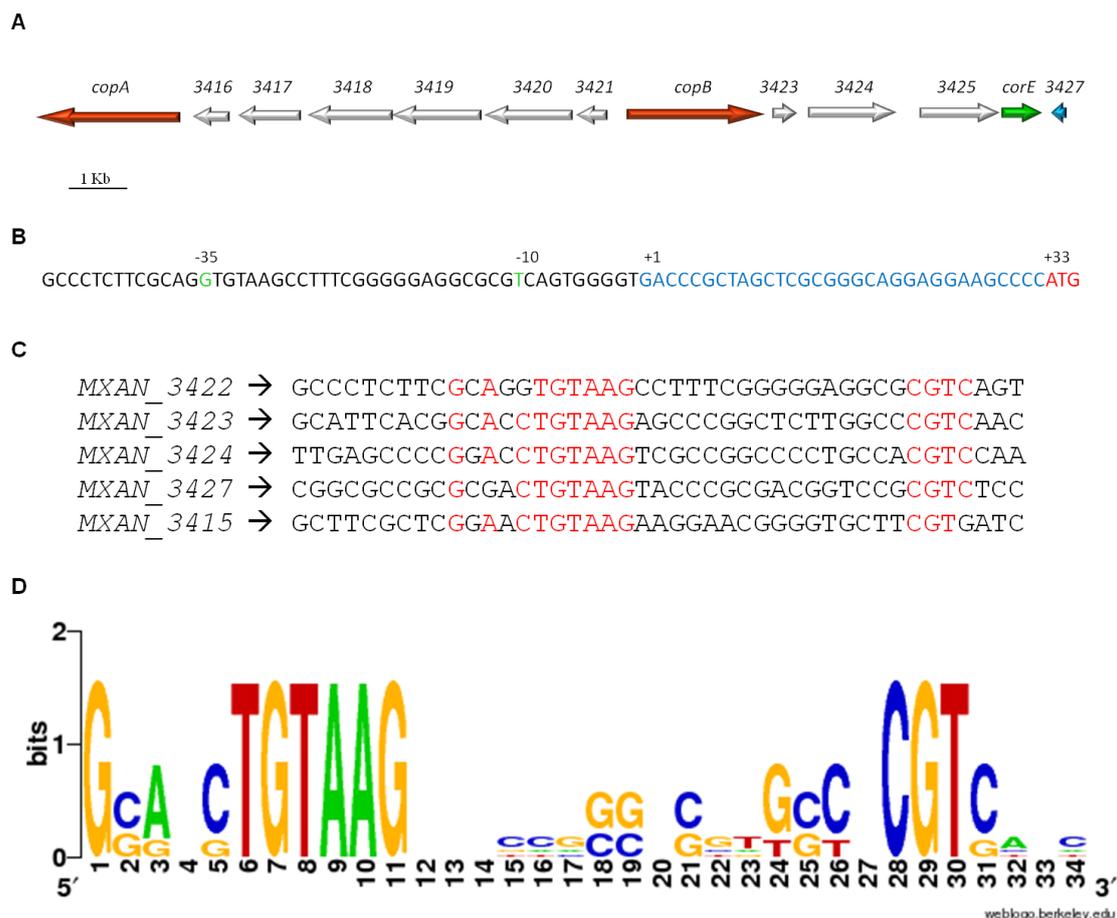


Figura 4.42. Identificación del promotor reconocido por CorE. **A.** Esquema de la región del cobre 1 con los genes cuya regulación dependiente de CorE ha sido demostrada experimentalmente (en rojo, los genes para las ATPasas de tipo P_{1B}, en verde, el gen para el factor sigma CorE, y en azul, el gen para la metalochaperona MXAN₃₄₂₇). **B.** Secuencia aguas arriba de *copB*. En azul, la secuencia obtenida tras el 5' RACE (con el sitio de inicio de la transcripción marcado como +1); el codón de inicio del primer gen se encuentra marcado en rojo; y las bases que ocupan la posición -10 y -35 aparecen marcadas en verde. **C.** Alineamiento de la secuencia aguas arriba de varios genes regulados por CorE, con las bases conservadas en las regiones -10 y -35 resaltadas en rojo. **D.** HMM-Logo de los promotores reconocidos por CorE identificados anteriormente.

Teniendo en cuenta que, como se ha mencionado anteriormente, las secuencias promotoras que reconocen los factores sigma de tipo ECF de un mismo grupo son bastante similares, se utilizó la secuencia que reconoce CorE para localizar una secuencia similar aguas arriba del gen *MXAN_5264* con objeto de determinar bioinformáticamente el promotor reconocido por CorE2. A poca distancia del codón de inicio de *MXAN_5264* encontramos una secuencia con una gran similitud con el promotor de CorE, en la cual la región -10 es idéntica a la reconocida por CorE, mientras que en la región -35 encontramos una citosina (secuencia TGTAAC para CorE2) en el lugar donde aparecía una guanina (secuencia TGTAAG para CorE) (Figura 4.43).

```

                -35                -10                +1
MXAN_3422  TTCGCAGGTGTAAGCCCTTTCGGGGGAGGGCGCGTCAGTGGGGTGACCCGCTAGCTCGCGGGCAGGAGGAAGCCCCATG
MXAN_5264  GGGCGGACTGTAACCGGGGCCAGGGCGGTCGTCAGGAGGGAGAACTGGAACGAAGGAGCCGTTCTCCATG

```

Figura 4.43. Identificación bioinformática del promotor reconocido por CorE2 a partir del promotor reconocido por CorE identificado experimentalmente. Las secuencias -10 y -35 de ambos promotores aparecen representadas en verde. El codón de inicio de los genes *MXAN_3422* y *MXAN_5264* se encuentra marcado en rojo.

A continuación, y ya que los factores sigma del grupo ECF44 aparecen en otras mixobacterias, se decidió realizar una búsqueda de secuencias similares a la del promotor de CorE de *M. xanthus* en las mixobacterias que codifican factores sigma de tipo CorE. Para ello se empleó la herramienta bioinformática Artemis de visualización de genomas. De esta manera se encontraron en total 19 genes con un promotor similar al de CorE. De ellos, 14 presentan ortólogos regulados por este factor sigma en *M. xanthus* (Figura 4.42A): cinco en *M. stipitatus*, seis en *S. cellulosum* So ce56 y tres en *S. cellulosum* So01572 (Tabla 4.1). Además de estos, se han identificado 5 genes con un promotor similar al de CorE, ortólogos al gen de la ATPasa CopC de *M. xanthus* (*MXAN_0979*) situado en la región del cobre 2 (Tabla 4.1). Estos cinco genes se encuentran presentes en especies con un factor sigma de tipo CorE3 (*M. stipitatus*, *M. fulvus*, *C. coralloides* y *Anaeromyxobacter* sp.), por lo que es posible que este tipo de factor sigma sea el encargado de regular la expresión de dicha ATPasa en estas especies.

IV. Resultados

Tabla 4.1. Promotores tipo CorE

Especie (Factor sigma)	Gen regulado	Gen ortólogo	Secuencia
<i>M. xanthus</i> (MXAN_3426)	MXAN_3415	-	CTCGGAAC TGTAAG AAGGAACGGGGTGCTT CGT GATC
	MXAN_3422	-	TTTCGAGG TGTAAG CCTTTCGGGGGAGGCG CGT CAGT
	MXAN_3423	-	ACGGCAC TGTAAG AGCCCGCTCTTGGCC CGT CAAC
	MXAN_3424	-	CCCGGACC TGTAAG TCGCGGCCCTGCCA CGT CCAA
	MXAN_3427	-	CGCGGAC TGTAAG TACCCGGGACGGTCCG CGT CTCC
<i>M. stipitatus</i> (MYSTI_7858)	MYSTI_07857	MXAN_3427	CGAGCCCC TGTAAG CACTCACGGGTCCCG CGT TTTC
	MYSTI_07861	MXAN_3424	GAGGGCG TGTAAG AGCGCTGGGGGCGCT CGT TAGT
	MYSTI_07862	MXAN_3423	GAGGGCG TGTAAG AGCGCTGGGGGCGCT CGT TAGT
	MYSTI_07865	MXAN_3422	TGGGCGGG TGTAAT TCGCGGGAGGTGCCG CGT TGGT
	MYSTI_07868	MXAN_1623	GCCGCG TGTAAC CGCGCAATCAAAC CGT AGGG
	MYSTI_01035	MXAN_0979	AAATCAC TGTAAG AGTCGGCGGCCCTTT CGT TGGC
<i>M. fulvus</i> (LILAB_03820)	LILAB_03785	MXAN_0979	GGACACCC TGTAAG AGCCGGCCGGTGCTT CGT TGGC
<i>S. celulosum</i> So ce56 (sce8251)	sce0502	MXAN_3424	CGGCGAT TGTAAT ACCGCCGGCCCGCG CGT CGGC
	sce2307	MXAN_3423	CGCTCGAC TGTAAT GCGACGGAGACCCGCG CGT CCTC
	sce4013	MXAN_3422	GGGTAGACC TGTAAT CATCGGAGCGACGGCG CGT CTGC
	sce8083	MXAN_3427	GCTCGGG TGTAAT TGGACCCGACGGCT- GC CGT CTCC
	sce8102	MXAN_3420	CGCTCGCC TGTAAT TGGCGGAGGCACGCG CGT CGTC
	sce8106	MXAN_3415	GCTTGGGA TGTAAG GCGGCGCAACCATGAG CGT CAGC
<i>S. celluloseum</i> So01572 (SCE1572_48160)	SCE1572_03525	MXAN_3423	GAAGACCG TGTAAT GCCGTCGGGGCGCG CGT CCGC
	SCE1572_46935	MXAN_3422	GCTCTTCG TGTAAT CCGCGGGGTGCCCTG CGT CTGC
	SCE1572_46990	MXAN_3415	GCTGGGG TGTAAG AAGGCGCAGCCATGAT CGT CGGC
<i>C. coralloides</i> (COCOR_00923)	COCOR_00925	MXAN_0979	TACGCAT TGTAAG AGCGCGCCGGTGCCG CGT TGGC
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5 (Anaer109_4099)	Anaer109_4100	MXAN_0979	CGCCGAG TGTAAG GGTTCGCTCGCTGCTT CGT TAGC
	Anaer109_1015	MXAN_0979	CGGGAG TGTAAG CGGCGTGCCGCGCTA CGT TGAA

Del mismo modo, la búsqueda de la secuencia de la región -35 TGTAAC propuesta para CorE2, reveló en *M. xanthus* otro gen con una secuencia bastante similar en la región promotora (MXAN_1242). Además se encontró dicha secuencia junto a dos genes ortólogos de MXAN_5264 en *M. stipitatus* y en *C. coralloides*, así como aguas arriba de un ortólogo de MXAN_1242 en *M. stipitatus* (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Promotores tipo CorE2

Especie (Factor sigma)	Gen regulado	Gen ortólogo	Secuencia
<i>M. xanthus</i> (MXAN_5263)	MXAN_5264	-	GGGCGGAC TGTAACC GGGGCCAGGCGCT CGT CAGG
	MXAN_1242	-	TCGCCAA TGTAAC GGGCCCGGGGCGT CGT CACC
<i>M. stipitatus</i> (MYSTI_07104)	MYSTI_01863	MXAN_5264	CGGCCGG TGTAACC CGGCGAGCGCCGAG CGT CAGC
	MYSTI_01260	MXAN_1242	TCCAGCAA TGT-ACC GGGCGAGCGGGG CGT CACT
<i>C. coralloides</i> (COCOR_04357)	COCOR_1153	MXAN_5264	GGCCGAA TGTACC GGGCGCCGGTGCGC CGT CACC

Las 29 secuencias promotoras de los genes anteriormente descritos fueron utilizadas para generar un logo del promotor que reconocen los factores sigma de tipo ECF44 (Figura 4.44). La región -35 del consenso es similar a la reconocida por los factores sigma del grupo ECF16 (TGTAAC), y la región -10 (CGT) podemos encontrarla también en los promotores reconocidos por el grupo ECF17, ambos pertenecientes a los factores sigma regulados por un factor antisigma.

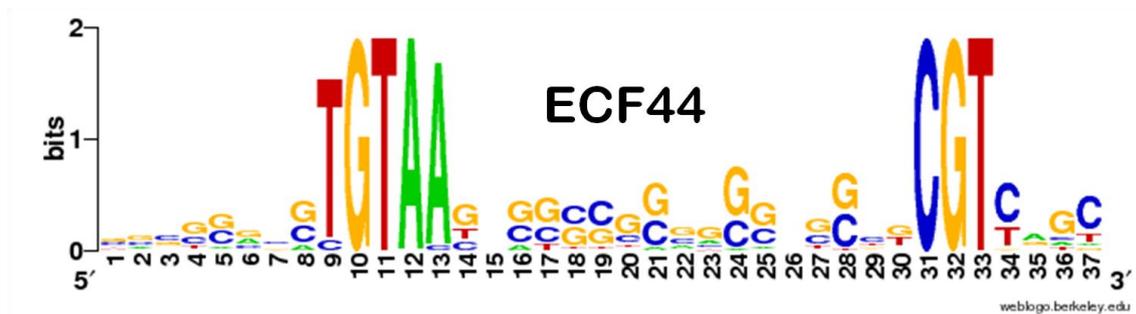


Figura 4.44. HMM-logo para los factores sigma del grupo ECF44. El alineamiento se realizó utilizando las 29 secuencias recogidas en las **Tablas 4.1** y **4.2**.

4.3.4. Análisis de la región rica en cisteínas de CorE2

Una de las características representativas de los factores sigma de tipo ECF44 es la presencia de una extensión carboxilo terminal rica en cisteínas denominada CRD. Esta extensión resultó ser imprescindible para la actividad de CorE y alguno de los residuos presentes en ella demostraron ser cruciales para el sistema de activación e inactivación característico de este factor sigma (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Como miembro del grupo ECF44, CorE2 contiene un CRD que consiste en 28 residuos (frente a los 38 del CRD de CorE). También contiene seis cisteínas, pero en una distribución distinta a la de CorE, a la que hemos denominado conformación de tipo CorE2. Dadas estas diferencias observadas entre las secuencias del CRD en CorE y CorE2 y el hecho de que respondan a metales diferentes y que los perfiles de expresión de los genes regulados por cada uno de estos factores sigma sean también distintos, consideramos interesante estudiar el papel del CRD de CorE2 y de cada una de las Cys que aparecen en esta extensión.

4.3.4.1. Papel del CRD en el funcionamiento de CorE2

4.3.4.1.1. Construcción de la cepa JM52IF3DCRD ($\Delta_{CorE2_{CRD}}$)

Para confirmar si la región rica en cisteínas es esencial para el funcionamiento de CorE2, se procedió a construir un mutante de delección en fase de CorE2, en el cual solamente se había eliminado dicha región. Hay que tener en cuenta que CorE es inactivo sin CRD, siendo incapaz de iniciar la transcripción de los genes que regulaba (Gómez-Santos *et al.*, 2011).

Para la construcción de la cepa JM52IF3DCRD ($\Delta_{CorE2_{CRD}}$), se eliminó la región de 45 pb comprendida entre la primera y la última cisteína del CRD, resultando un factor sigma que mantiene los dos dominios conservados en todos los factores sigma de tipo ECF pero carente de CRD (Figura 4.45). Para ello se amplificaron por PCR dos fragmentos de unas 800 pb cada uno partiendo del ADN genómico de la cepa silvestre de *M. xanthus* DZF1. El primero (CRDCorE2US) contiene las secuencias diana para las enzimas de restricción *Xba*I y *Bam*HI en ambos extremos, cubre la región anterior a la primera cisteína del CRD, y se amplificó empleando los oligonucleótidos CorE2(CRD)US*Xba*I y CorE2(CRD)USBamHI como cebadores. El segundo (CRDCorE2DS), con los

sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* en sus extremos, situado justo a continuación de la última cisteína a deletar, se amplificó utilizando los primers CorE2(CRD)DSEcoRI y CorE2(CRD)DSBamHI. Ambos productos de PCR fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción y fueron insertados mediante un proceso de ligación en el vector pBJ113 previamente digerido con las enzimas *XbaI* y *EcoRI*, tal y como se explica en el apartado 3.2.1.5.1 de Materiales y métodos, para obtener finalmente el vector pBJ113 Δ CorE2_{CRD}. El plásmido fue comprobado mediante diversas digestiones y secuenciado para asegurar que era correcto.



Figura 4.45. Dominios presentes en CoreE2 en la cepa silvestre (DZF1) y en la cepa JM52IF3DCRD ($\Delta corE2_{CRD}$).

El plásmido pBJ113 Δ CorE2_{CRD} fue electroporado en *M. xanthus* DZF1 con la intención de que se integrara en el cromosoma de la cepa silvestre por recombinación homóloga. A continuación, las células fueron cultivadas en medio CTT con kanamicina. Las colonias obtenidas fueron analizadas por Southern blot (apartado 3.2.2.8 de Materiales y métodos).

Una vez seleccionada una de las cepas intermediarias, se favoreció la pérdida del plásmido por una segunda recombinación eliminando la presión selectiva de la kanamicina y haciendo diluciones seriadas en medios con galactosa tal y como se explica en el apartado 3.2.1.5.1 de Materiales y métodos. Según donde tuviera lugar la segunda recombinación podríamos obtener una cepa de genotipo silvestre o el mutante definitivo $\Delta corE2_{CRD}$, por lo que aquellas colonias que perdieron la capacidad de crecer en kanamicina fueron aisladas para un posterior análisis, y así distinguir entre ambos tipos de colonias. Debido al pequeño tamaño de la delección, no se pudo emplear la técnica del Southern blot para distinguir entre silvestre y mutante, de modo que se amplificó por PCR la región que incluía la zona del CRD para esta comprobación. Estos productos de PCR fueron secuenciados para confirmar que se trataban del mutante $\Delta corE2_{CRD}$. De esta manera se confirmó que había

IV. Resultados

colonias que portaban esta mutación, y se eligió una para analizar el fenotipo correspondiente a esta delección.

Para caracterizar este mutante, se determinó su fenotipo durante el ciclo de desarrollo, para conocer el efecto de la delección del dominio rico en cisteínas de CorE2 sobre la formación de cuerpos fructíferos y la resistencia a metales. Como puede verse en la **Figura 4.46** el comportamiento de este mutante de delección fue similar, aunque no idéntico, al del mutante de delección para *corE2* (**Figuras 4.35, 4.36 y 4.37**) con un ligero retraso en la formación de cuerpos fructíferos en ausencia de metales y en presencia de zinc, y con un retraso más pronunciado en presencia de cadmio. Por tanto, el resultado obtenido indica que el dominio CRD de CorE2, al igual que ocurría con el de CorE, es esencial para la actividad de este factor sigma.



Figura 4.46. Fenotipo de la cepa JM52IF3DCRD ($\Delta corE2_{CRD}$). Capacidad de formación de cuerpos fructíferos en ausencia de metales (panel A) o en presencia de 0,2 mM de zinc (panel B) o de 20 μ M de cadmio (panel C). Las fotografías fueron tomadas hasta observar la correcta formación de los cuerpos fructíferos en ambas cepas. Las barras representan 1 mm.

4.3.4.1.2. Construcción de la cepa JM52IF3DCRDZY5 (*5265-lacZ-ΔcorE2_{CRD}*)

Para determinar si el factor sigma mutante había perdido por completo su capacidad para promover la transcripción, se introdujo por electroporación el plásmido pKY481-5265, construido de la manera que ha sido especificada en el apartado 4.2.2.1 de Resultados, para analizar el efecto que la eliminación del CRD de CorE2 pudiera tener sobre la transcripción del gen *MXAN_5265*. Como en los casos anteriores, las colonias resistentes a kanamicina obtenidas tras la electroporación fueron analizadas por Southern blot para corroborar que la recombinación homóloga había tenido lugar de forma correcta.

4.3.4.1.3. Análisis de la expresión del gen *MXAN_5265* en el mutante de delección en fase *ΔcorE2_{CRD}*

Como puede observarse en las **Figura 4.47** (paneles A y C), sin la adición de metales el factor sigma CorE2 mutado no tiene actividad, al igual que le ocurre al factor sigma silvestre. Sin embargo, mientras que el factor sigma silvestre es capaz de activarse en presencia de cadmio, y de expresar en estas condiciones el gen *MXAN_5265*, la proteína mutante de CorE2 a la que se le ha eliminado el CRD ha perdido la capacidad de responder al metal, como se deduce por la ausencia de actividad β-galactosidasa en la cepa JM52IF3DCRDZY5 (**Figura 4.47B** y C). Estos resultados indican que el CRD de CorE2 es imprescindible para que el factor sigma sea activado. Ya que el mismo hecho fue descrito para CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011), es factible deducir que todos los factores sigma del grupo ECF44 (todos ellos con un CRD de características similares) exhiben un mecanismo de acción similar, en donde el CRD es esencial para activar al factor sigma tras detectar el estímulo.

IV. Resultados

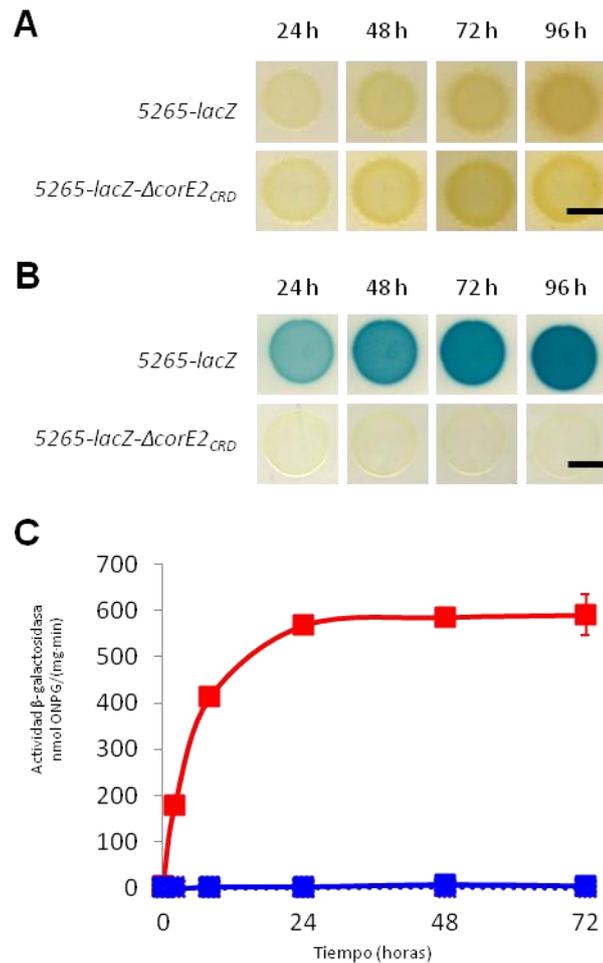


Figura 4.47. Participación del dominio rico en cisteínas en la actividad de CorE2. **A** y **B**. Análisis cualitativo de la actividad β-galactosidasa de las cepas JM52ZY5 (*5265-lacZ*) y JM52IF3DCRDZY5 (*5265-lacZ-ΔcorE2_{CRD}*) en medio CTT sin metales (panel **A**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **B**). Las barras representan 5 mm. **C**. Medida cuantitativa de la actividad β-galactosidasa específica de la fusión *5265-lacZ* introducida en la cepa silvestre (líneas azules) y el mutante de delección en fase $\Delta corE2_{CRD}$ (líneas rojas). Los extractos celulares se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

4.3.4.2. Estudio de la participación de los residuos clave del CRD en la actividad de CorE2

Como ya se ha demostrado para el CRD de CorE, cada una de las cisteínas de esta región cumple una acción en la respuesta a metales. En la **Figura 4.48** podemos ver un resumen de cada uno de los efectos descritos para las cisteínas del CRD de CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Debido a las diferencias en la distribución de cisteínas entre el CRD de CorE y el de CorE2, el metal requerido para su activación y el perfil de expresión de los genes que regulan, es posible que las cisteínas de CorE2 desempeñen una función distinta a la descrita para CorE. Para conocer el papel que cada cisteína del CRD de CorE2 desempeña en la activación e inactivación de este factor sigma, se procedió a mutar las seis cisteínas de CorE2 y a analizar el papel que cada una ejerce.

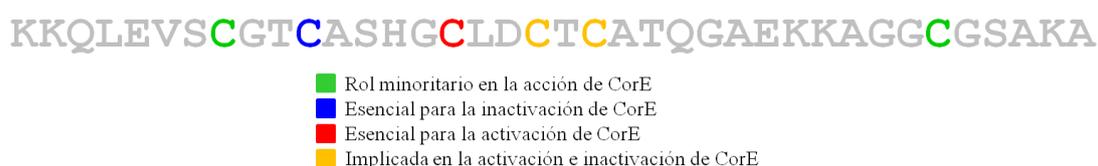


Figura 4.48. Secuencia de aminoácidos del CRD de CorE, resumiendo el rol de cada una de las cisteínas de dicho factor sigma.

4.3.4.2.1. Construcción de cepas portadoras de mutaciones puntuales en el CRD de CorE2

Para analizar qué residuos son responsables de la actividad de CorE2, se mutó individualmente cada una de las cisteínas del CRD, sustituyéndolas por alaninas, así como el residuo de ácido aspártico 180, conservado en el 73% de los CRDs encontrados hasta la fecha (**Figura 4.1**), y la treonina 172, que aparece como un residuo extra únicamente en este factor sigma (**Figuras 4.1, 4.49** y **Tabla 4.3**).

Las distintas mutaciones puntuales se generaron mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2.9 de Materiales y métodos. Como plásmido base sobre el cual realizar las mutaciones se utilizó el vector pMT00, construido en el apartado 4.2.3.3 de Resultados. Tras el proceso de mutagénesis dirigida, los plásmidos fueron secuenciados con el fin de seleccionar aquellos que portaban

IV. Resultados

la mutación deseada y ninguna otra mutación adicional. Los oligonucleótidos utilizados para generar estas mutaciones aparecen listados en la Tabla 3.1 de Materiales y métodos. Estos plásmidos fueron electroporados en la cepa JM52IF3ZY5 (*5265-lacZ-ΔcorE2*), carente de CorE2 funcional y portadora de la fusión transcripcional *lacZ* para el gen *MXAN_5265*.



Figura 4.49. Secuencia de aminoácidos del CRD de CorE2, resaltando cada uno de los residuos mutados en esta Tesis Doctoral.

Tabla 4.3. Mutaciones puntuales realizadas sobre el CRD de CorE2.

Nombre de la cepa	Mutación
JM52SDM69	C169A
JM52SDM72	ΔT172
JM52SDM 73	C173A
JM52SDM 74	C174A
JM52SDM 78	C178A
JM52SDM 80	D180A
JM52SDM 81	C181A
JM52SDM 83	C183A

Tras electroporar cada uno de los plásmidos mutados se seleccionaron las cepas capaces de crecer en medio CTT con kanamicina y tetraciclina y se sometieron a un Southern blot para comprobar que el plásmido se había integrado correctamente por recombinación homóloga.

4.3.4.2.2. Análisis del efecto de cada mutación puntual sobre la actividad de CorE2

El perfil de expresión del gen *MXAN_5265* fue evaluado en presencia y ausencia de cadmio en cada una de las cepas mutantes y se comparó con el de la cepa a la que se le volvió a introducir el gen *corE2* silvestre (JM52SDM00). Atendiendo a los resultados obtenidos, los diferentes residuos se clasificaron en cinco grupos.

Residuos que no intervienen significativamente en la respuesta al cadmio de CorE2

El análisis de las mutaciones puntuales reveló que el perfil de expresión de los mutantes D180A y C183A era casi idéntico al de la cepa silvestre, indicando que ambos residuos no son cruciales en la actividad de CorE2 (Figura 4.50). Esto es sorprendente, sobretodo en el caso del ácido aspártico, tan conservado entre los factores sigma de tipo CorE y con capacidad de coordinar metales.

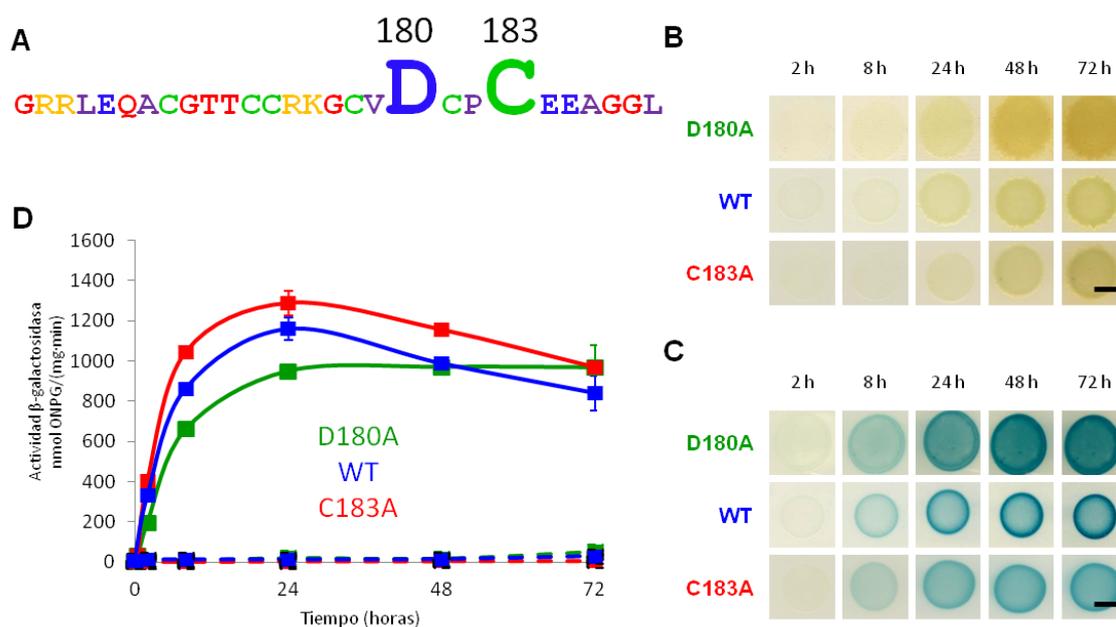


Figura 4.50. Residuos que no intervienen significativamente en la respuesta al cadmio de CorE2. **A.** Secuencia del CRD de CorE2, en donde se resaltan los residuos sometidos a mutagénesis dirigida. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones D180A, C183A y JM52SDM00 (WT) en medio CTT sin metales (panel **B**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en los mutantes (D180A, líneas verdes y C183A, líneas rojas, respectivamente) y en la cepa JM52SDM00 (WT, líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Residuos implicados, pero no esenciales, en el proceso de activación de CorE2

En los mutantes C173A y C181A, CorE mantiene una cierta capacidad de inducción por cadmio. Sin embargo, esta inducción es de tan sólo un 7-15% de la que se observa en la cepa silvestre (Figura 4.51). El hecho de que, en ausencia del metal, el regulador se mantenga inactivo en ambos casos indica que estas cisteínas no intervienen en la inactivación del factor sigma. Sin embargo, los bajos niveles de actividad que se alcanzan al activarlo con cadmio sugieren que ambas cisteínas son importantes, aunque no esenciales, para la activación de CorE2.

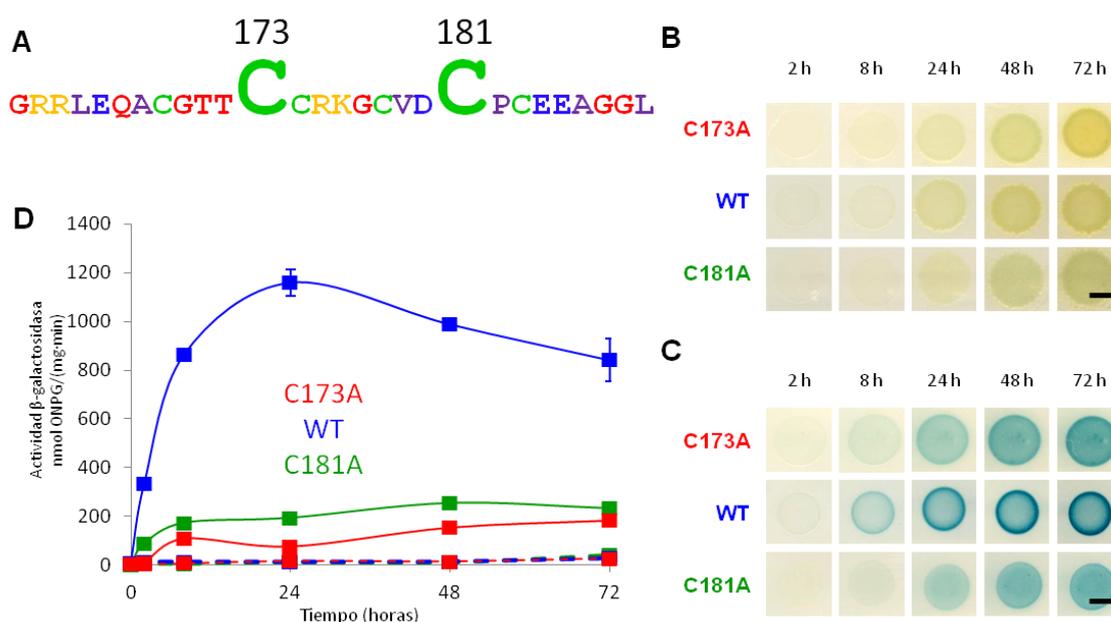


Figura 4.51. Residuos implicados, pero no esenciales, en el proceso de activación de CorE2. **A.** Secuencia del CRD de CorE2, en donde se resaltan los residuos sometidos a mutagénesis dirigida. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones C173A, C181A y JM52SDM00 (WT) en medio CTT sin metales (panel **B**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en los mutantes (C173A, líneas rojas y C181A, líneas verdes, respectivamente) y en la cepa JM52SDM00 (WT, líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Residuos que disminuyen la activación de CorE2

La mutación $\Delta T172$ resultó en un incremento de la expresión del gen *MXAN_5265*, tanto en ausencia como en presencia de cadmio respecto a la cepa silvestre, indicando que este residuo juega un papel en la regulación de los niveles máximos de actividad de CorE2 (Figura 4.52).

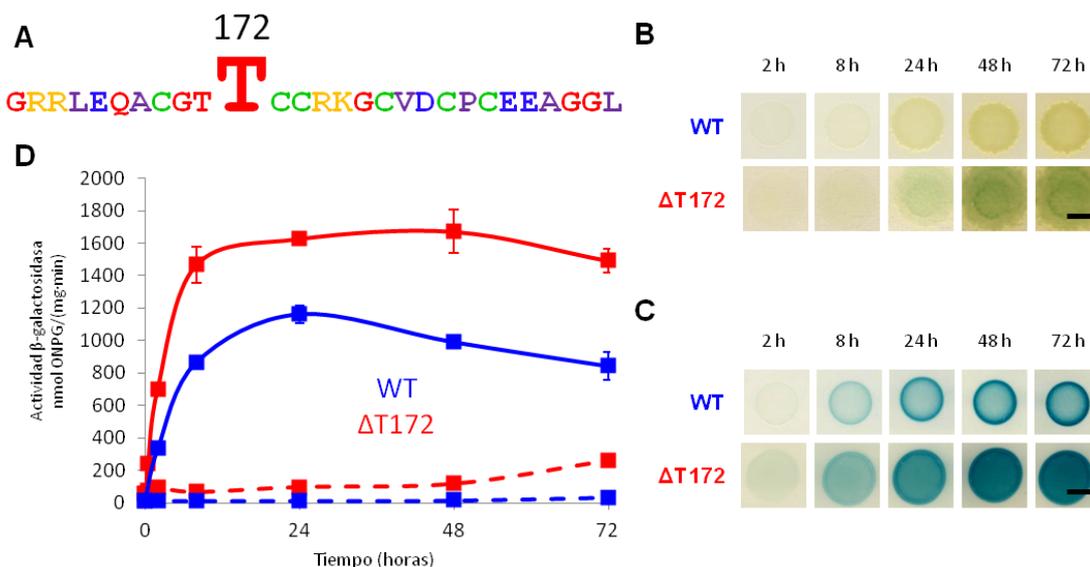


Figura 4.52. Residuos implicados en la inactivación parcial de CorE2. **A.** Secuencia del CRD de CorE2, en donde se resalta el residuo de treonina sometido a mutagénesis dirigida. **B y C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones $\Delta T172$ y JM52SDM00 (WT) en medio CTT sin metales (panel **B**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en el mutante $\Delta T172$ (líneas rojas) y en la cepa JM52SDM00 (líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Residuos implicados en la activación e inactivación de CorE2

Sorprendentemente, cuando la cisteína 174 se muta a alanina, se observa una expresión constitutiva del gen *MXAN_5265* en ausencia de cadmio que alcanza unos niveles similares a los que se alcanzan en presencia del metal inductor (Figura 4.53). Estos datos indican que la cisteína 174 está involucrada tanto en la inactivación de CorE2 en ausencia del metal inductor como en su activación en presencia de cadmio, ya que hay expresión en ausencia de metal, y esos niveles no aumentan en presencia de cadmio.

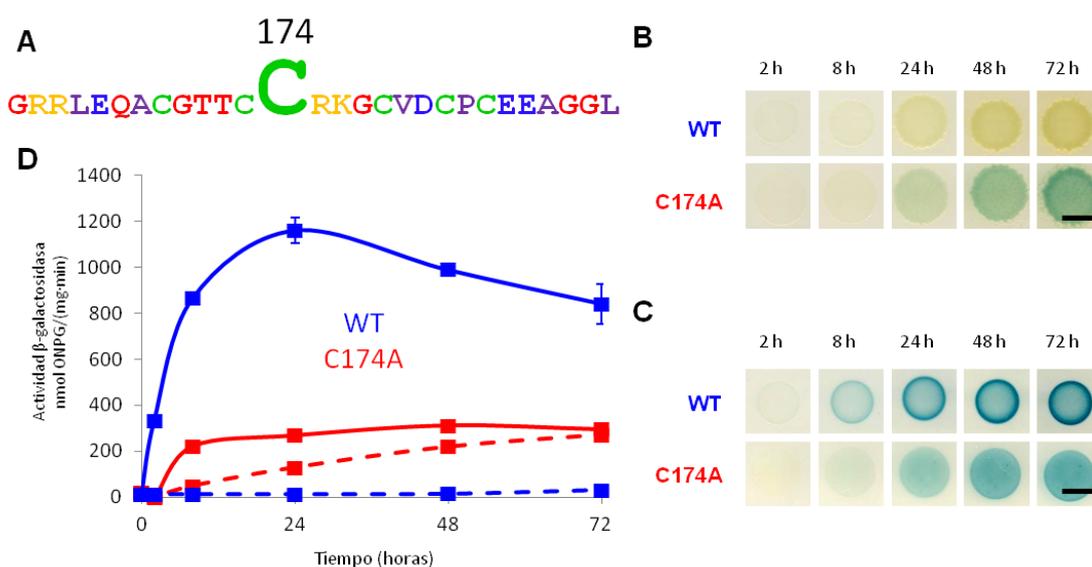


Figura 4.53. Residuos implicados en la activación e inactivación de CorE2. **A.** Secuencia del CRD de CorE2, en donde se resalta el residuo de cisteína sometido a mutagénesis dirigida. **B y C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones C174A y JM52SDM00 (WT) en medio CTT sin metales (panel **B**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en el mutante C174A (líneas rojas) y en la cepa JM52SDM00 (líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Residuos esenciales para la activación de CorE2

Cuando las cisteínas en posición 169 y 178 fueron sustituidas por alaninas, los niveles de expresión alcanzados en ausencia de cadmio eran indetectables, similares a los de la cepa silvestre. Sin embargo, estos factores sigma mutantes eran incapaces de ser activados en presencia de cadmio, con una eliminación casi total (reducción del 98-99,99% en los niveles de expresión comparados con los de la bacteria silvestre) en la expresión del gen *MXAN_5265* en ambos casos (**Figura 4.54**). Esto claramente indica que ambas cisteínas son esenciales para la actividad de CorE2, ya que al mutarlas pierden por completo su capacidad de activarse en presencia de cadmio.

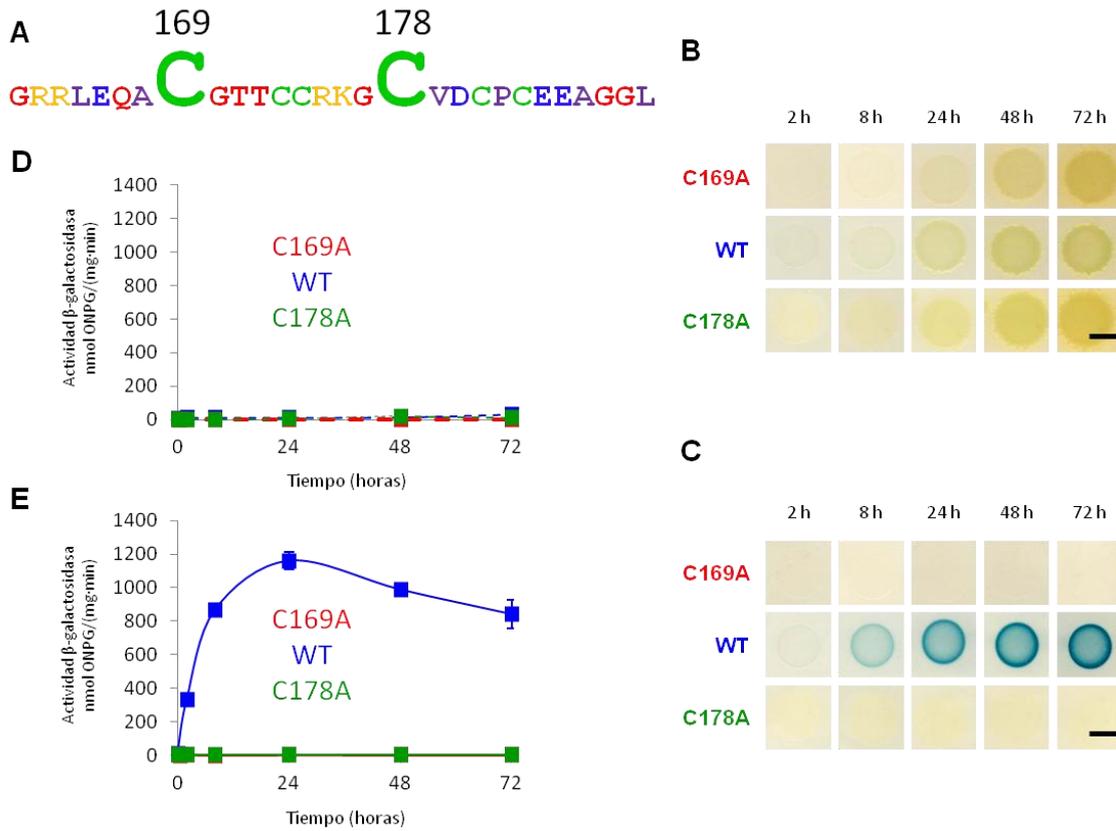


Figura 4.54. Residuos esenciales para la activación de CorE2. **A.** Secuencia del CRD de CorE2, en donde se resaltan los residuos sometidos a mutagénesis dirigida. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones C169A, C178A y JM52SDM00 (WT) en medio CTT sin metales (panel **B**) y con 0,1 mM de cadmio (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D** y **E.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en los mutantes (C169A, líneas rojas y C178A, líneas verdes, respectivamente) y en la cepa JM52SDM00 (WT, líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (panel **D**) o con 0,1 mM de cadmio (panel **E**). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

4.3.5. Papel de la distribución de cisteínas en la especificidad de metales

Debido a la abundancia en cisteínas, se ha postulado que el CRD es el sitio de reconocimiento del metal de los factores sigma de tipo CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que CorE y CorE2 son activados por metales diferentes es posible que las diferencias en la distribución de cisteínas de dicha región estén implicadas en la especificidad del metal que detecta cada uno de estos reguladores. Para confirmar esta hipótesis, se estudiaron las diferencias entre los residuos del CRD de CorE y de CorE2 en busca de aquellos que pudieran ser responsables del reconocimiento de cobre por parte de CorE y de cadmio por parte de CorE2.

Por este motivo, se diseñó una serie de mutaciones para tratar de averiguar qué residuos están implicados en la especificidad de la respuesta a un determinado metal. Entre las diferencias más significativas observadas entre CorE y CorE2 está la presencia de una treonina adicional en la posición 172 que no está presente ni en CorE ni en ninguno de los otros factores sigma de tipo ECF44 (Figuras 4.1 y 4.55). Además, aunque la distribución general de las cisteínas está bien conservada en todos los factores sigma de tipo CorE, hay una cisteína (la cisteína 174 de CorE2) que marca una de las diferencias más importantes entre los dos reguladores caracterizados. El CRD de CorE carece de esta cisteína, con una alanina ocupando su posición (Figura 4.55).



Figura 4.55. Secuencia de aminoácidos del CRD de CorE y CorE2, resaltando los residuos que marcan una diferencia clave entre ambos.

Como se ha observado en el apartado 4.3.4.2.2 de Resultados, al deletar la treonina que ocupa la posición 172 en CorE2, observamos un aumento basal de los niveles de expresión de *MXAN_5265*, con un incremento de aproximadamente un 40%. A continuación, se procedió a estudiar si esta proteína mutante era capaz de responder al cobre, como lo hace CorE. Al cultivar la bacteria portadora de la mutación $\Delta T172$ con cobre, además del aumento de expresión basal del gen *MXAN_5265*, que alcanza unos niveles similares a los obtenidos en bacterias cultivadas en medio sin metales, se puede

este metal alcanzando unos niveles de expresión del gen *MXAN_5265* mayores aún que los alcanzados por la proteína silvestre en presencia de cadmio (Figura 4.57). Estos datos demuestran que el cambio de un sólo residuo del CRD de CorE2 es suficiente para cambiar por completo la especificidad de metales del factor sigma, y que esta cisteína es la responsable de que CorE2 responda a cadmio y no a cobre.

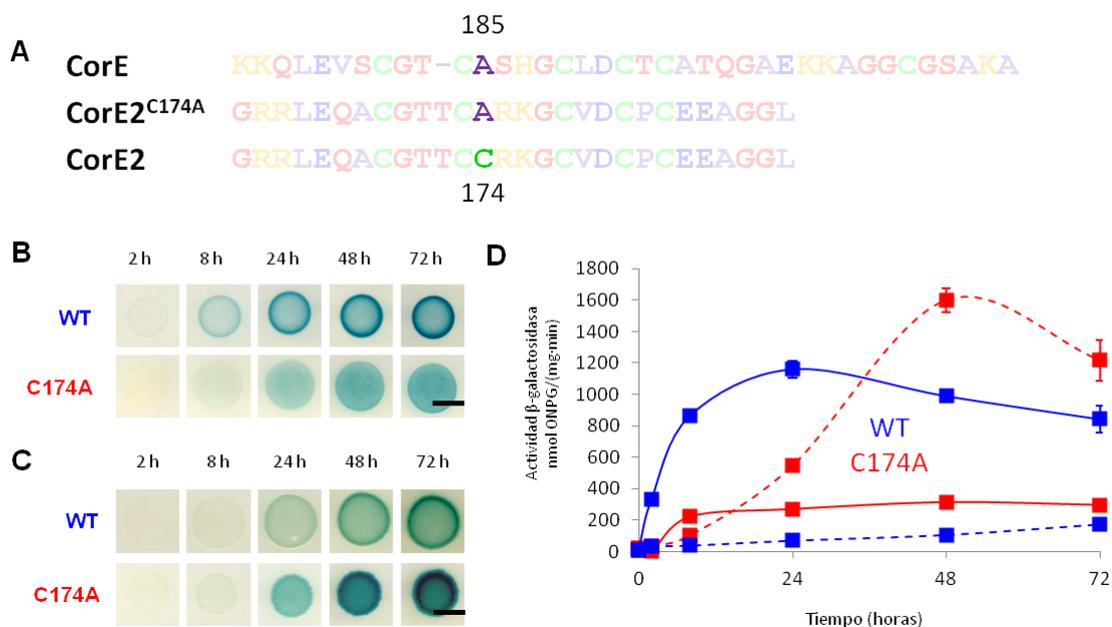


Figura 4.57. Respuesta al cobre del mutante de CorE2 con la mutación de la cisteína 174 a alanina. **A.** Secuencia del CRD de CorE, CorE2 y del mutante CorE2^{C174A}, en donde se resaltan los residuos a analizar. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa en la cepa con la mutación C174A y la JM52SDM00 (WT) en medio CTT con 0,1 mM de cadmio (panel **B**) y con 0,3 mM de cobre (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en el mutante C174A (líneas rojas) y en la cepa JM52SDM00 (líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT con 0,3 mM de cobre (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Para conocer más sobre la relevancia de la posición mutada en CorE2 en el reconocimiento de metales, el residuo de alanina que ocupa esa misma posición en el CRD de CorE fue mutado también, en este caso para reemplazarlo por una cisteína y tratar de asemejar su secuencia a la de CorE2. Para esta construcción se mutó el plásmido pNG00 para cambiar esa alanina por cisteína y el plásmido obtenido con dicha mutación se introdujo por electroporación en la cepa

JM51EBZY, la cual porta una fusión *lacZ* para el gen *cuoB* (uno de los genes regulados por este factor sigma) y una delección en fase para *corE*. A la cepa obtenida se le denominó con el nombre JM51SDM85. Tal y como se observa en la **Figura 4.58**, el mutante $\text{CorE}^{\text{A185C}}$ no se vio afectado significativamente en la inducción de *cuoB* por cobre. No obstante, la expresión de *cuoB* en presencia de cadmio aumentó hasta tres veces en el mutante A185C respecto a la cepa utilizada como silvestre (JM00BZY), alcanzando unos niveles incluso superiores a los observados en la cepa silvestre en presencia de cobre. Aunque no se obtuvo un resultado tan claro como en el caso de la mutación realizada en esta posición en *CorE2*, estos resultados confirman que un único residuo ocupando esta posición en el CRD puede afectar en gran medida al reconocimiento y respuesta a metales de los factores sigma de tipo *CorE*.

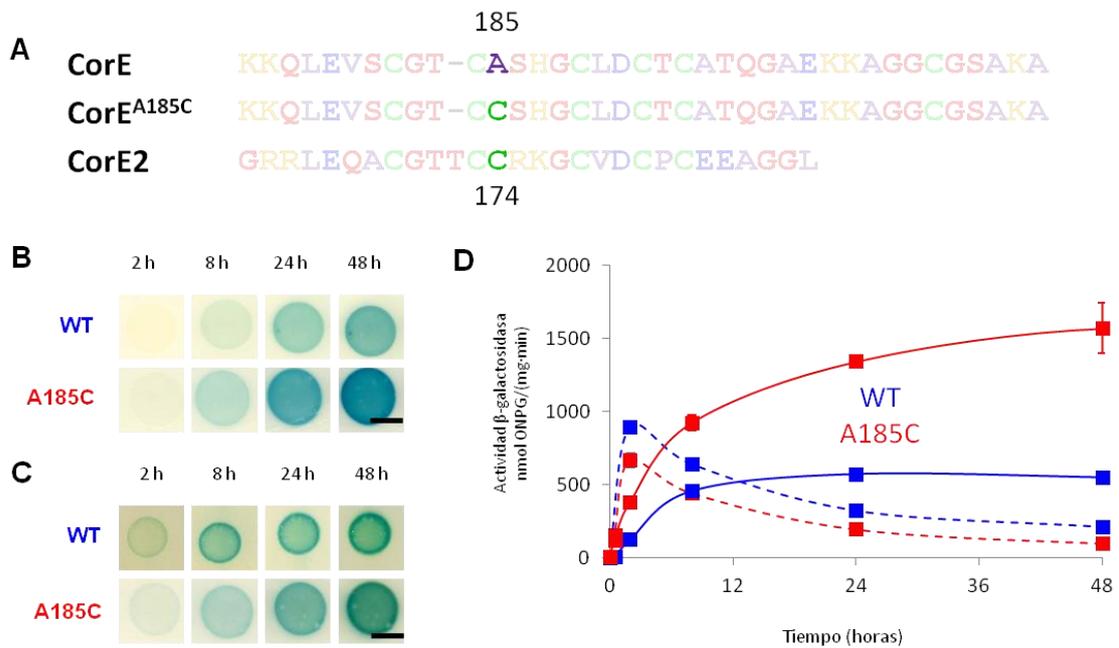


Figura 4.58. Respuesta al cadmio de la mutación de la alanina 185 a cisteína en *CorE*. **A.** Secuencia del CRD de *CorE*, *CorE2* y del mutante $\text{CorE}^{\text{A185C}}$, en donde se resaltan los residuos a analizar. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de la mutación A185C y JM00BZY (WT) en medio CTT con 0,1 mM de cadmio (panel **B**) y con 0,3 mM de cobre (panel **C**). Las barras representan 5 mm. **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *cuoB* en el mutante (líneas rojas) y en la cepa JM00BZY (líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT con 0,3 mM de cobre (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

4.3.6. Análisis del motivo CxC de CorE2

Como ya hemos comentado en el apartado 4.2.1.2.2 de Resultados, cuando se alinean los 67 miembros del grupo ECF44 de factores sigma, aparte del CRD presente en todos los miembros, podemos encontrar un motivo CxC entre los dominios $\sigma 2$ y $\sigma 4$ (Figura 4.1). Este motivo se encuentra conservado en todos los factores sigma de este grupo, y en todos ellos la distancia entre la última cisteína del CxC y la primera del CRD es de exactamente 58 aminoácidos. Debido a que se ha demostrado que las cisteínas son importantes para la actividad de estos factores sigma (Gómez-Santos *et al.*, 2011), se procedió a determinar si este motivo era necesario para la activación de CorE2. Para ello, las cisteínas Cys108 y Cys110 de este factor sigma fueron mutadas individualmente a alaninas del mismo modo descrito para las mutaciones puntuales en el CRD.

4.3.6.1. Construcción de los mutantes CorE2^{C108A} y CorE2^{C110A}

Como construcción de partida se empleó el plásmido pMT00, que contiene el gen silvestre *corE2* y los oligonucleótidos que aparecen listados en la Tabla 3.1 de Materiales y métodos. Tras obtenerse varios plásmidos candidatos portadores de mutaciones, dichos plásmidos fueron secuenciados para confirmar la presencia de la mutación esperada y descartar mutaciones indeseadas. Los plásmidos positivos fueron electroporados en la cepa JM52IF3ZY5, carente de *corE2* y portadora de la fusión *lacZ* para el gen *MXAN_5265*, para obtener las cepas mutantes JM52SDM08 y JM52SDM10. Ambas cepas resistentes a kanamicina y tetraciclina fueron analizadas por Southern blot para confirmar que el plásmido se había integrado correctamente en el cromosoma.

4.3.6.2. Análisis de la participación de las cisteínas del CxC en la actividad de CorE2

Una vez obtenidas ambas cepas mutantes, se analizó la inducción del gen *MXAN_5265* en presencia de cadmio. En ambos casos se observó una pérdida casi total de la expresión del gen *MXAN_5265* (Figura 4.59).

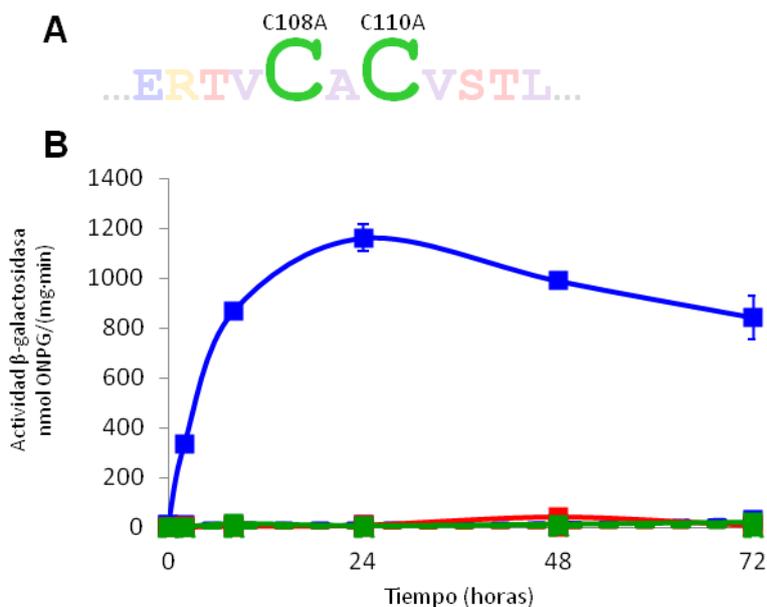


Figura 4.59. Análisis del rol del motivo CxC en la activación de CorE2. **A.** Secuencia del motivo CxC entre los dominios σ_2 y σ_4 de CorE2, donde ambas cisteínas están resaltadas. **B** y **C.** Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de las construcciones C108A, C110A y JM52SDM00 (WT) en medio CTT con 0,1 mM de cadmio (panel **B**) y sin metales (panel **C**). **D.** Análisis cuantitativo de la expresión del gen *MXAN_5265* en los mutantes (C108A, líneas rojas y C110A, líneas verdes, respectivamente) y en la cepa JM52SDM00 (líneas azules). Las células se recogieron a los tiempos indicados de placas de CTT sin metales (líneas discontinuas) o con 0,1 mM de cadmio (líneas continuas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres medidas independientes.

Al sustituir cualquiera de las dos cisteínas por una alanina, CorE2 permanece inactivo en ausencia de metales, y en presencia de cadmio ninguno de los dos factores sigma mutados fue capaz de responder al metal, ya que no se detectó actividad β -galactosidasa en las cepas cultivadas en presencia de 0,1 mM de cadmio (**Figura 4.59B**). Esto sugiere que no sólo las cisteínas del CRD son necesarias para la actividad de estos factores sigma dependientes de metales, sino también que el motivo CxC, presente en todos los miembros de este grupo de reguladores, es esencial para su actividad.

4.3.7. Estudio de la capacidad de unión a metales de los factores sigma de tipo CorE

Como hemos visto anteriormente, los factores sigma de tipo CorE pueden responder a distintos metales según la disposición de cisteínas en su CRD. Esta diferencia podría deberse a que cada proteína es capaz de coordinar unos metales pero no otros, o a que, aunque las dos puedan coordinar los mismos metales, solamente algunos provocan en la proteína el cambio conformacional adecuado para que la proteína se torne activa. Por ejemplo, es posible que la incapacidad de respuesta de CorE2 al cobre se deba a que la proteína unida a cobre adopte una conformación que le impida iniciar la transcripción, o a que la distribución de residuos que intervienen en la unión a metales impide la coordinación de cobre por parte de la proteína, o incluso que la proteína unida al cobre sea inestable, por lo que sería degradada.

Con objeto de responder a estas preguntas, las proteínas CorE y CorE2 se expresaron en *E. coli* y posteriormente se purificaron. Las proteínas heterólogas se utilizaron para analizar la capacidad de unión a metales de estos reguladores por medio de ICP/Masas. Además, se estudió el espectro de dicroísmo circular y de Uv-Vis de las proteínas producidas en presencia de distintos metales para obtener información estructural sobre ambos reguladores en presencia de cada uno de los metales ensayados.

4.3.7.1. Purificación de las proteínas CorE y CorE2

El método más habitual de purificación de proteínas en nuestro grupo de investigación es mediante el uso de colas de histidina fusionadas a uno de los extremos de la proteína que luego servirán para separarlas del resto del extracto proteico mediante su paso por una columna de afinidad. En este caso, sin embargo, la adición de colas de histidina podría alterar los resultados, ya que las histidinas son residuos que habitualmente forman parte de los dominios de unión a metales, sobretodo participando de la unión al cobre (Frausto da Silva y Williams, 1991; Davis y O'Halloran, 2008). Por este motivo, para la expresión y purificación utilizamos el plásmido pGEX-4T-1 que realiza una fusión traduccional del producto del gen objeto de estudio con la proteína GST (Glutathione S-Transferase), introduciendo además un sitio de corte para la trombina para la posterior separación de ambas porciones de la proteína híbrida y obtención de la proteína de interés.

Para la construcción de ambos plásmidos se amplificó por PCR la región que comprende a cada uno de los genes utilizando los primers CorEProtFW y CorEProtRV para CorE y CorE2ProtFW y CorE2ProtRV para CorE2. Ambos productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI y fueron insertados mediante un proceso de ligación en el vector pGEX-4T-1 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, los plásmidos con los genes de CorE y CorE2 (pGEX-CorE y pGEX-CorE2, respectivamente) fueron secuenciados para garantizar que no hubiera mutaciones indeseadas y que se mantuviera la pauta de lectura entre el factor sigma y la proteína GST.

Para corroborar que el sistema de inducción y purificación por GST era adecuado para nuestras proteínas, se hizo inicialmente un ensayo a pequeña escala. Para ello, los plásmidos fueron introducidos en la cepa de *E. coli* BL21 Star™ y los transformantes fueron incubados en medio con IPTG, para inducir la expresión del gen, a distintas temperaturas para encontrar las condiciones óptimas de inducción para cada proteína.

De este cultivo se separaron las fracciones soluble e insoluble, tal y como se explica en el apartado 3.2.4.4.2 de Materiales y métodos, y ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE para detectar la presencia de las dos proteínas. Como se observa en la **Figura 4.60**, la mayoría de la proteína inducida en ambos casos se encontraba en la fracción soluble a una temperatura de 37°C. Por ello se procedió a purificar a pequeña escala las dos proteínas empleando las columnas GSTrap™ 4B. Tras realizar un SDS-PAGE con el extracto obtenido después de la purificación, se pudo comprobar que se obtenía bastante cantidad de proteína pura como para proceder a escalar el procedimiento y llevar a cabo los estudios que se han mencionado anteriormente (**Figura 4.61**).

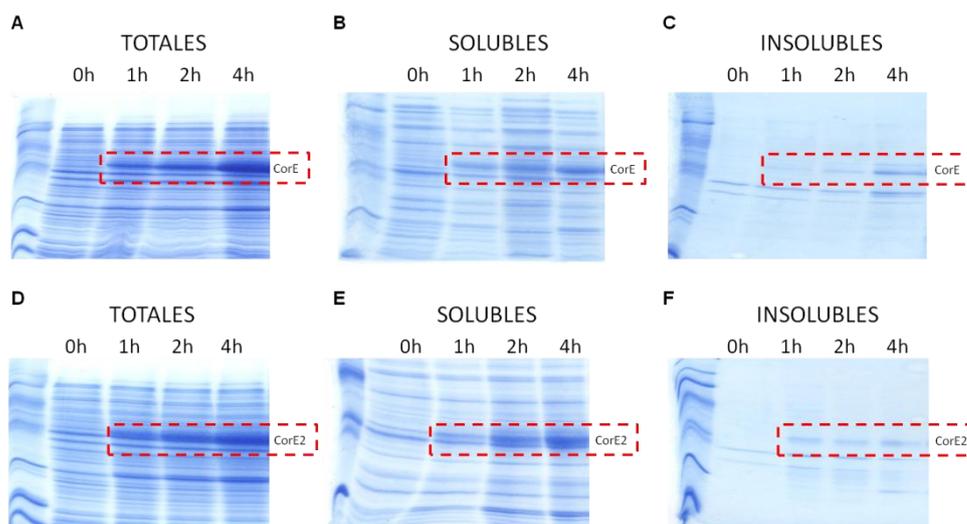


Figura 4.60. Inducción de las proteínas CorE-GST y CorE2-GST en *E. coli* a 37°C **A, B** y **C**. Presencia de la proteína híbrida CorE-GST en los extractos de proteínas totales de *E. coli* (panel **A**), y en las fracciones soluble (panel **B**) e insoluble (panel **C**) obtenidas a partir de dichos extractos. En todos los casos se puede observar la presencia de la proteína híbrida entre los 45 y los 66,2 KDa. **D, E** y **F**. Presencia de la proteína híbrida CorE2-GST en los extractos de proteínas totales de *E. coli* (panel **D**), y en las fracciones soluble (panel **E**) e insoluble (panel **F**) de dichos extractos. La banda correspondiente en cada gel se encuentra enmarcada en una línea roja discontinua. En todos los casos se puede observar la presencia de la proteína híbrida entre los 45 y los 66,2 KDa.

La producción a gran escala de las proteínas CorE y CorE2 en presencia y ausencia de metales se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona, tal y como se explica en el apartado 3.2.4.5 de Materiales y métodos, mientras que los análisis de DC, UV, ICP y masas se realizaron en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona. Por simplificar la presentación de los datos y facilitar la interpretación de los mismos, los resultados obtenidos de la espectrofotometría de masas se encuentran en el Apéndice 5, mientras que en el siguiente apartado vienen recogidos los datos obtenidos tras su análisis.

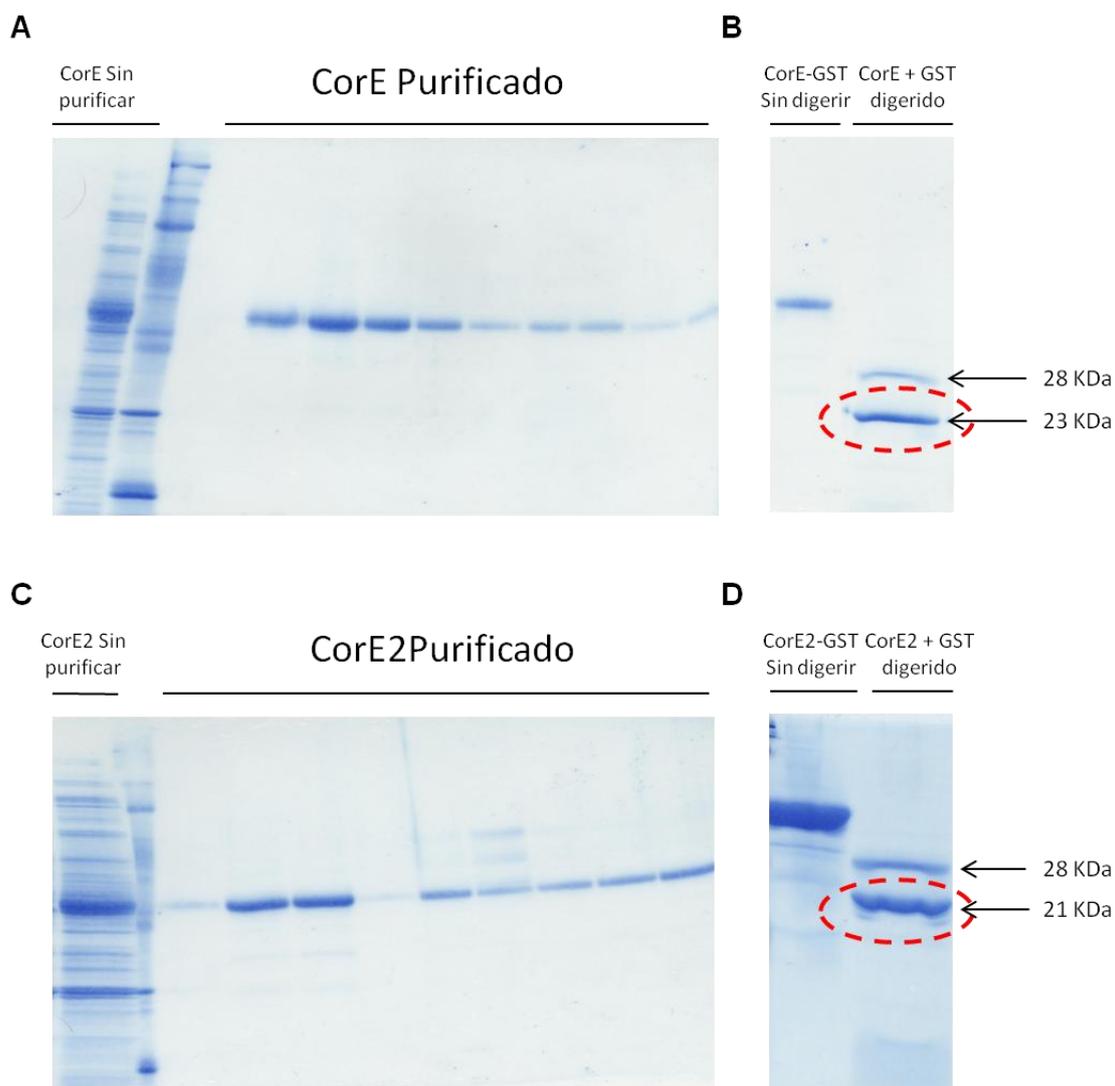


Figura 4.61. Eficiencia de la purificación de las proteínas CorE y CorE2 en *E. coli*. **A** y **C**. Presencia de las proteínas híbridas CorE-GST (panel **A**) y CorE2-GST (panel **C**) tras hacer pasar los extractos de *E. coli* por las columnas de purificación. **B** y **D**. Eficiencia de la separación de las dos porciones de las proteínas híbridas mediante digestión con trombina para liberar la GST de las proteínas CorE (panel **B**) y CorE2 (panel **D**). La banda correspondiente a cada factor sigma se encuentra enmarcada en una línea roja discontinua.

4.3.7.2. Estudio de la unión a metales por parte de CorE y CorE2

Para este estudio se han utilizado las proteínas CorE y CorE2 purificadas para analizar su capacidad de unión a metales. Debido a la activación de CorE por parte de cobre y otros metales divalentes, y a la de CorE2 por parte de cadmio y zinc, estos tres metales serán los empleados en este estudio para cada una de las proteínas adicionándolos al medio de cultivo durante el proceso de inducción de la proteína. Durante la producción de proteínas y separación en la

columna de FPLC, se observaron en todos los casos al menos dos picos tras medir la absorbancia a una longitud de onda de 254 y 280 nm, de modo que el contenido de dichos picos fue separado en muestras distintas (Apéndice 4), y su contenido en metales se analizó de forma independiente.

4.3.7.2.1. Estudio de la unión a metales de CorE

CorE obtenido sin la adición de metales

La producción de CorE sin adicionar ningún tipo de metal dio lugar a dos muestras con una elevada concentración de proteína pura (Apéndice 4). Los análisis del espectro por dicroísmo circular y UV de ambas muestras revela que presentan una estructura rica en hélices alfa (un 97,8% y un 99,9% para cada una de las muestras según el algoritmo CONTINLL), tal y como se espera para estos reguladores (Figura 4.62 y Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Estimación de la estructura secundaria a partir del DC de cada muestra incluida en Resultados utilizando el algoritmo CONTINLL.

Muestra	% Hélices	% Láminas	% Giros	% Desordenada	NRMSD
CorE Sin Metal 1	97,8	2,2	0	0	0,052
CorE Sin Metal 2	99,9	0,1	0	0	0,045
CorE Zn 1	100	0	0	0	0,079
CorE Zn 2	-	-	-	-	-
CorE Cd 2	100	0	0	0	0,014
CorE Cu 1	71	3,2	15,1	10,7	0,039
CorE Cu 2	97,2	1,6	0,5	0,7	0,025
CorE Cu 3	100	0	0	0	0,025
CorE2 Sin Metal 2	71	4,7	17,6	6,7	0,038
CorE2 Zn 2	97,3	2,7	0	0	0,096
CorE2 Cd 2	72,7	3,6	0	23,7	0,043
CorE Cu 1	42,7	6	20,2	31,1	0,044
CorE Cu 2	49,1	5,4	22,3	23,2	0,045

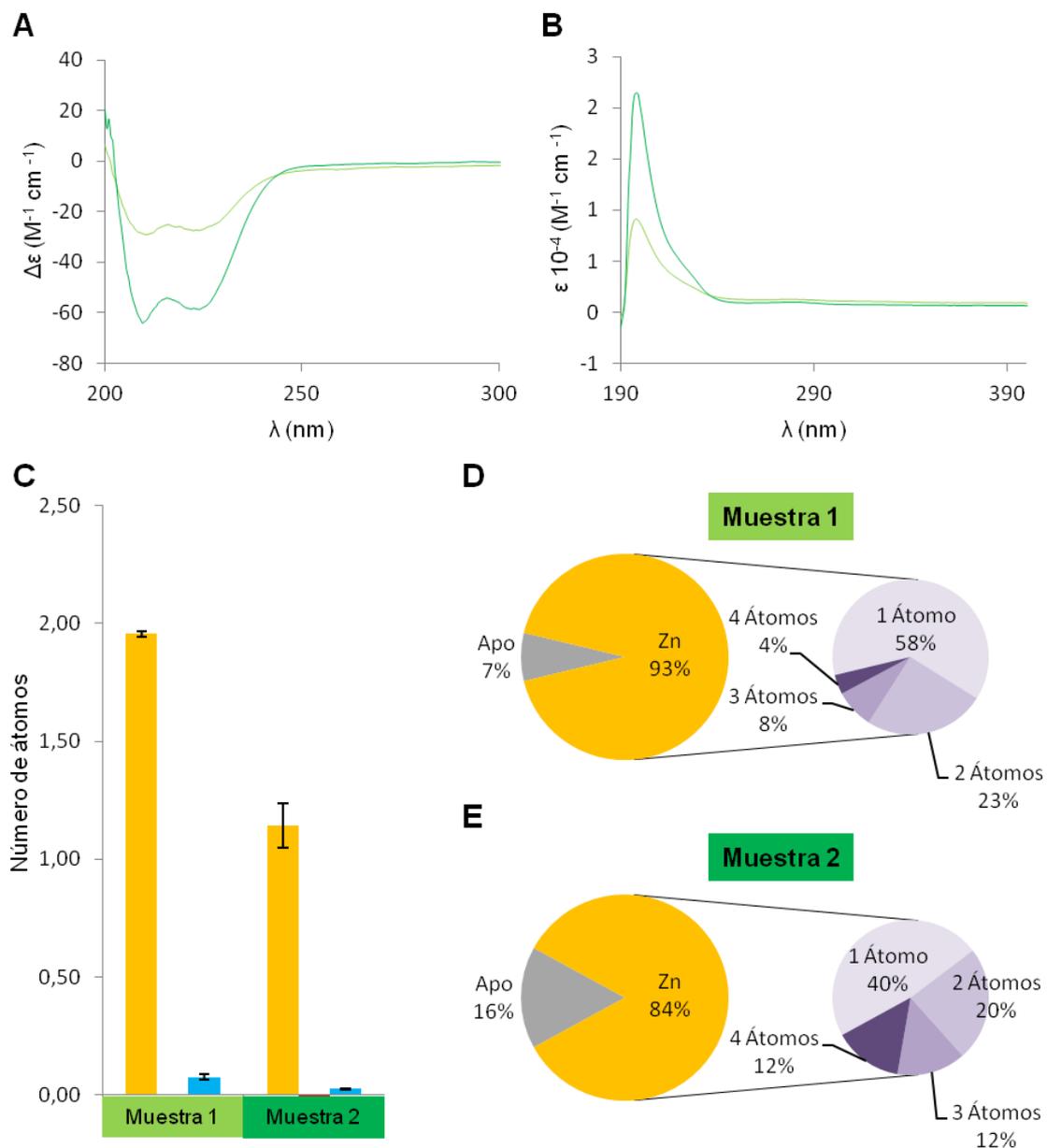


Figura 4.62. Análisis de las muestras de CorE producido en ausencia de metales. **A.** Espectro de dicroísmo circular de las muestras uno y dos (en verde claro y oscuro, respectivamente). **B.** Espectro UV de las muestras uno y dos (en verde claro y oscuro, respectivamente). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína de cada muestra medida por ICP-OAS. **D** y **E.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal determinadas en las muestras uno (panel **D**) y dos (panel **E**) medidas por espectrometría de masas.

Según los resultados de masas e ICP (**Figura 4.62**), aproximadamente la mitad de la proteína unida a metales estaría ligada a un átomo de zinc en ambas muestras obtenidas, mientras que el resto estaría unida a más de un átomo de este metal y hasta un máximo de 4 átomos. De las dos muestras, la dos (que además de ser la mayoritaria, según los resultados de DC y UV, posee una estructura más rica en hélices alfa) es la que posee una mayor proporción de proteína unida a 2, 3 y 4 átomos de zinc. Sin embargo, la muestra dos también es la que tiene mayor proporción de proteína sin unir a metales (un 16% frente al 7% de la muestra uno minoritaria). De esto deducimos que en ausencia de metales adicionados al medio, CorE une un átomo de zinc, estado en el que en base a los datos de los que disponemos de su mecanismo de funcionamiento, se encontraría en su forma inactiva.

CorE obtenido en presencia de zinc

Al adicionar zinc al medio de donde posteriormente CorE fue purificado se obtuvieron de nuevo dos muestras distintas. Al igual que en la producción anterior, la muestra dos es ligeramente mayor que la primera (**Apéndice 4**). Tras estudiar los resultados del dicroísmo circular, observamos que la muestra uno tiene una estructura rica en hélices alfa (un 100% según el algoritmo CONTINLL), y se aprecia una reestructuración de las mismas con respecto a la producción realizada en ausencia de metales (**Figura 4.63** y **Tabla 4.4**). En cuanto a la muestra dos, los resultados obtenidos del DC no pueden emplearse ya que el perfil indica que el detector estaba saturado (**Figura 4.63A**). Al someter las muestras a ICP y masas observamos que en ambos casos toda la proteína está unida a zinc. En el caso de la muestra uno hay una distribución más o menos equitativa que va desde los dos hasta los cinco átomos de zinc, con una ligera mayoría unida a cinco átomos (22%) y con una pequeña proporción unida a uno o seis átomos de zinc (**Figura 4.63D**). En la muestra dos, ligeramente mayoritaria, cerca de la mitad de la proteína se encuentra unida a dos átomos de zinc (**Figura 4.63E**).

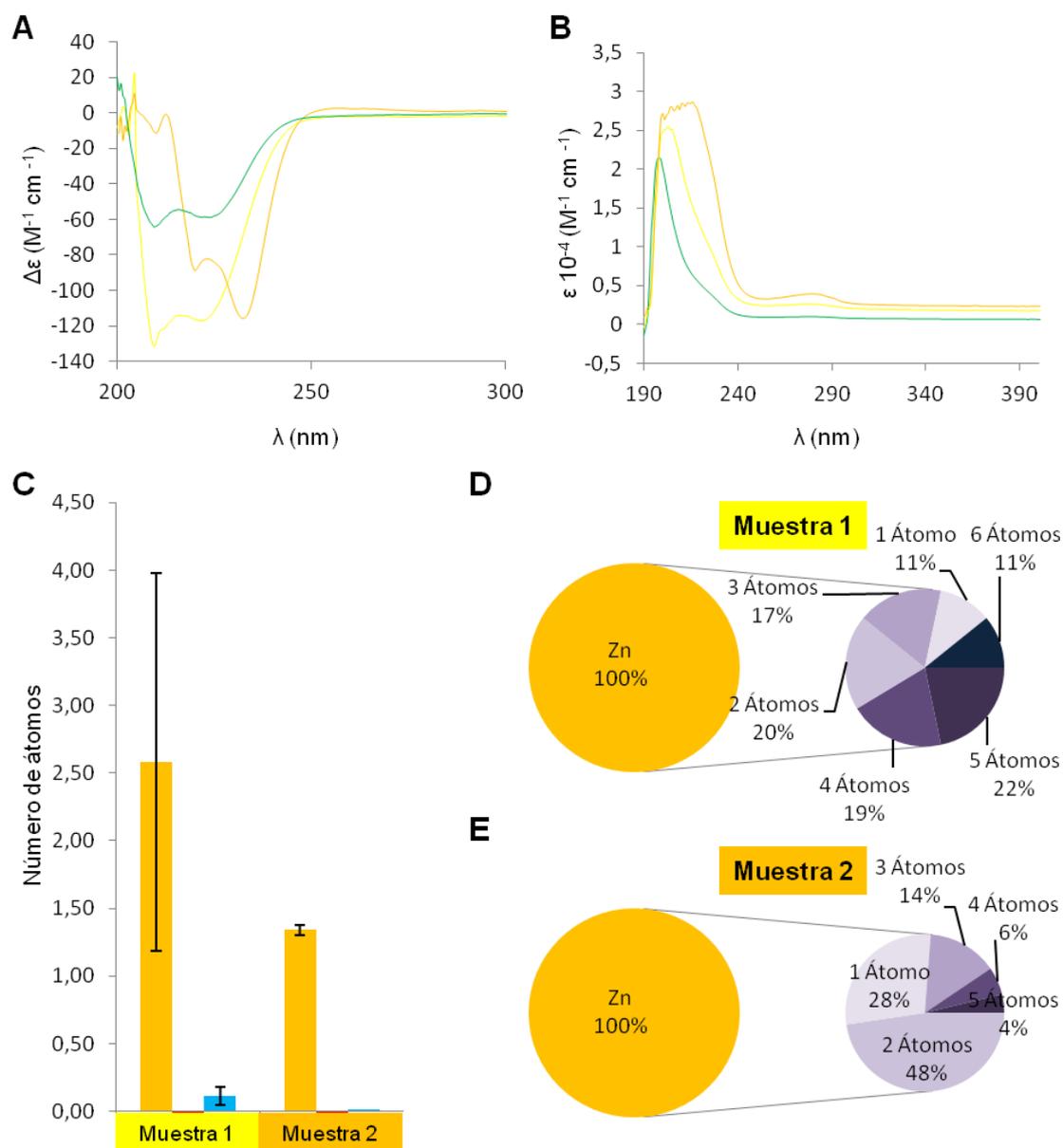


Figura 4.63. Análisis de las muestras de CorE producido en presencia de zinc. **A.** Espectro de dicroísmo circular de las muestras uno y dos (en amarillo claro y oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de las muestras uno y dos (en amarillo claro y oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína de cada muestra medida por ICP-OAS. **D** y **E.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal determinadas en las muestras uno (panel **D**) y dos (panel **E**) medidas por espectrometría de masas.

Teniendo en cuenta que, pese a que la cantidad de proteína de la muestra dos es ligeramente superior a la de la muestra uno, ambas muestras son abundantes. Es posible que la forma unida a dos átomos de zinc observada en la muestra dos se trate de un estado de transición entre el que encontramos al no añadir metales (con CorE unido a un sólo átomo) y el que observamos en la muestra uno (con un 69% de la proteína unida a más de dos átomos de zinc). Otra posibilidad es que la forma óptima de esta proteína sea la observada en la muestra dos, con dos átomos de zinc unidos a la proteína para que esté activa, mientras que las formas observadas en la muestra uno sean producto de una sobreexposición de la proteína al zinc que haya forzado la unión de más átomos del metal a la proteína. En base a los datos que conocemos sobre el estado de activación de CorE en presencia de zinc, sabemos que es capaz de activarse mínimamente a elevadas concentraciones del metal [sin llegar a superar una actividad β -galactosidasa de 20 nmol ONPG/(mg·min) en una cepa portadora de una fusión transcripcional *cuoB-lacZ*]. Reuniendo todos los datos de los que disponemos, podríamos deducir que al pasar CorE de estar unido a un átomo de zinc a dos o más átomos, este regulador es capaz de adoptar una conformación en la que tiene capacidad de iniciar la transcripción.

CorE obtenido en presencia de cadmio

Al producir CorE en presencia de cadmio obtuvimos dos muestras, la segunda de ellas mayoritaria y representando prácticamente la totalidad de la proteína pura (Apéndice 4). Dada su relevancia en este apartado comentaremos únicamente los resultados de dicha muestra mayoritaria. No obstante, los resultados obtenidos para la muestra 1 se encuentran recogidos en el Apéndice 6.

El perfil obtenido por dicroísmo circular confirma que CorE conserva una estructura con abundancia de hélices alfa (un 100% según el algoritmo CONTINLL) al producirla en presencia de cadmio (Figura 4.64 y Tabla 4.4). Por masas e ICP (Figuras 4.64C y D) vemos que toda la proteína se encuentra unida a cadmio en distintas proporciones, pero presenta mucha menos mezcla de complejos que CorE producida en presencia de zinc. Un 64% de la proteína se encuentra unida a 3 átomos de cadmio y un 23% combina la unión de 1 ó 2 átomos de cadmio con un átomo de zinc. Esto parece sugerir una conservación del zinc estructural observado en las muestras producidas sin metales, el cual es sustituido por un átomo de cadmio en una situación de exceso de este metal.

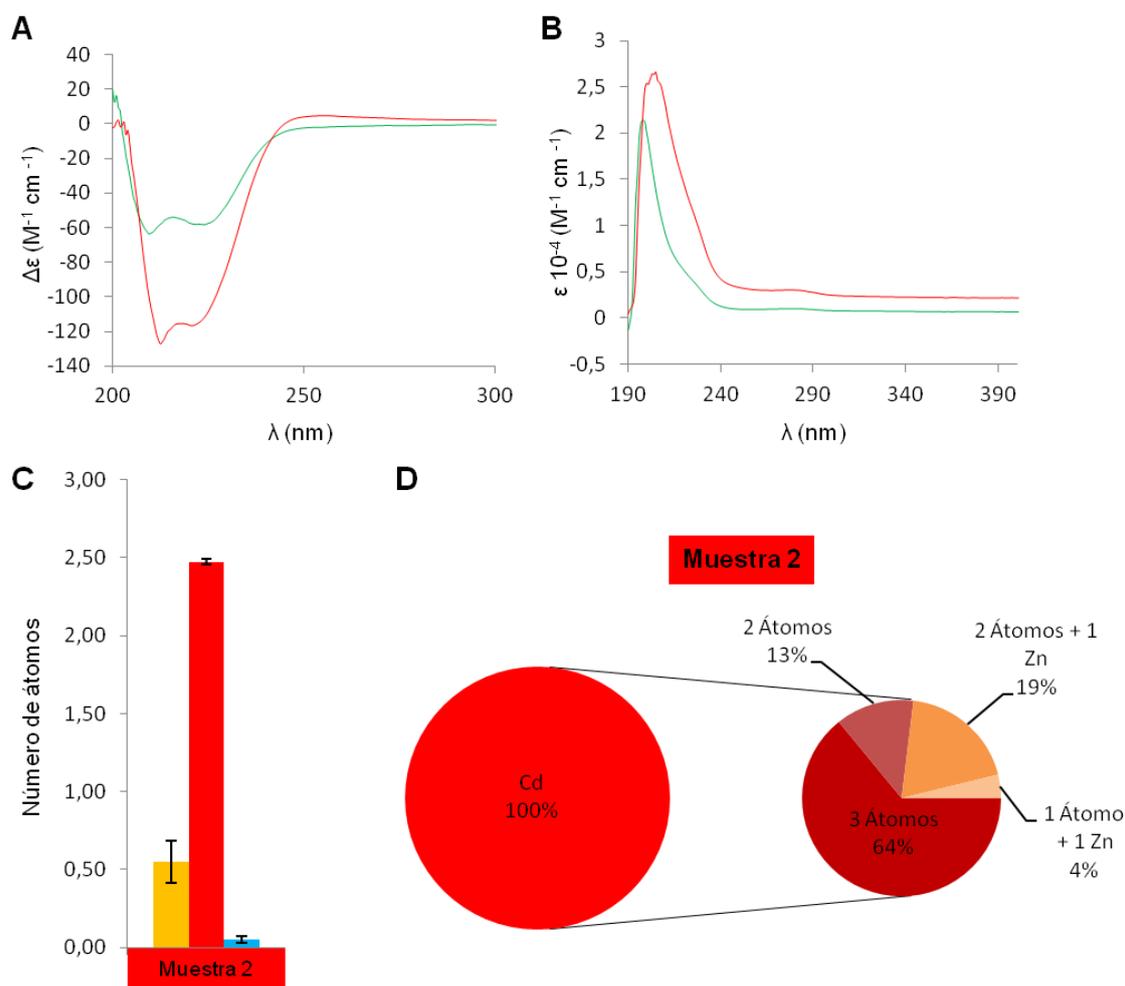


Figura 4.64. Análisis de las muestras de CorE producido en presencia de cadmio. **A.** Espectro de dicroísmo circular de la muestra dos (en rojo) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de de la muestra 2 (en rojo) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína medida por ICP-OAS. **D.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal medido por espectrometría de masas.

CorE obtenido en presencia de cobre

Cuando se realizó la producción de CorE en presencia de cobre se analizaron tres tipos de muestra distintas. Al igual que en los casos anteriores la muestra número dos fue la mayoritaria, mientras que la concentración de la muestra tres resultó ser la menor de las tres (Apéndice 4). Los resultados del análisis del espectro de dicroísmo circular y UV muestran una clara

reestructuración de las hélices alfa de la proteína en estas condiciones. El análisis bioinformático de estos datos revela la habitual abundancia de hélices alfa en la estructura secundaria de la proteína (un 97% y un 100% para las muestras dos y tres, respectivamente, según el algoritmo CONTINLL), con la excepción de la muestra uno, que pese a tener una gran proporción de hélices alfa (71% según el algoritmo CONTINLL), presenta un porcentaje inferior al de las otras dos muestras (**Figura 4.65** y **Tabla 4.4**). Al analizar las tres muestras por masas e ICP vemos que siempre aparece una pequeña proporción (entre un 11 y 17%) de proteína sin unir a metales (forma Apo), mientras que el resto de proteína se encuentra unida a una mezcla de átomos de cobre y zinc.

Debido a las similitudes entre el zinc y el cobre no nos es posible distinguir entre ambos metales mediante la técnica de espectrofotometría de masas. Sin embargo, el ICP nos confirma la presencia de ambos metales en distintas proporciones. En la muestra minoritaria, la muestra tres, un 13% de la proteína está en su forma apo, y aproximadamente la mitad de CorE se encuentra unido a un solo átomo de cobre o zinc, mientras que el resto se encuentra unido a 2, 3 ó 4 átomos de metal. Esta muestra podría corresponderse a la proteína unida al zinc estructural que hemos comentado en los casos anteriores, ya que el ICP sugiere que la abundancia de zinc unido a la proteína es mayor que la del cobre, y las proporciones de cada forma observada recuerdan mucho a las que se obtuvieron para CorE sin metales.

La muestra uno posee un 17% de CorE sin unir a metales, mientras que el resto de la proteína se encuentra unida de manera más o menos equitativa a hasta 5 átomos de metal, con una mayoría (25%) unida a 4 átomos. En cuanto a la muestra mayoritaria, la muestra dos, observamos cómo el 89% de la proteína se encuentra unida a metales. Cerca de la mitad de las proteínas de la muestra dos se encuentran unidas a 4 átomos de cobre y/o zinc, mientras que el resto aumenta la cantidad de átomos de metal unido hasta los 8 átomos. La alteración de la proporción de hélices alfa que observábamos en la muestra uno puede ser debido a que esta muestra podría tratarse de un estado de transición entre las muestras dos y tres (con la mayoría de la proteína unida a 4 y 1 átomos, respectivamente) que poseían una estructura secundaria más estable. Hay que tener en cuenta que el tiempo de inducción de la proteína es superior a su tiempo activo, ya que a partir de las dos horas en presencia de cobre parte de la proteína comienza a inactivarse al unir Cu^+ , por lo que lo más probable es que gran parte de las especies observadas se encuentren en estado inactivo.

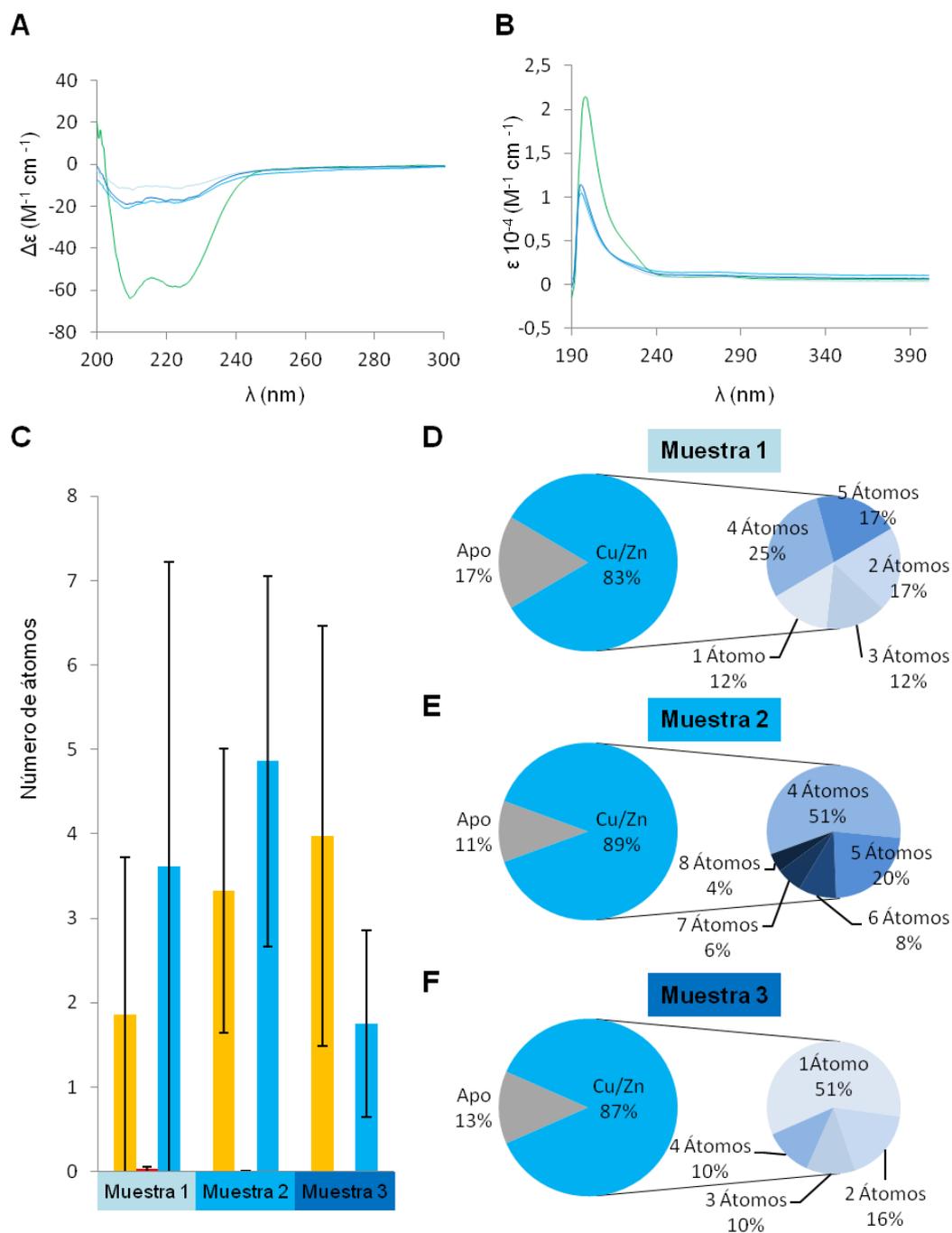


Figura 4.65. Análisis de las muestras de CorE obtenidas en presencia de cobre. **A.** Espectro de dicroísmo circular de las muestras uno, dos y tres (en azul, de más claro a más oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de las muestras uno, dos y tres (en azul, de más claro a más oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína de cada muestra medida por ICP-OAS. **D, E y F.** Porcentaje de las distintas proporciones de proteína unida a metal determinadas en las muestras uno (panel **D**), dos (panel **E**) y tres (panel **F**) medidas por espectrometría de masas.

4.3.7.2.2. Estudio de la unión a metales de CorE2

CorE2 obtenido sin la adición de metales

Al producir CorE2 sin adicionar metales se obtuvieron dos muestras, la primera aparece como un hombro de la segunda, que es la muestra principal (Apéndice 4). Por los mismos motivos comentados anteriormente para CorE, los resultados obtenidos de la muestra número uno de CorE2 producido en ausencia de metales no se comentarán en este apartado, aunque los datos obtenidos de todos los análisis se muestran en el Apéndice 6.

El análisis por masas nos reveló una digestión parcial de todas las muestras de CorE2, dando lugar a varias formas truncadas del regulador. Debido a que la porción mayoritaria en prácticamente todas las muestras es aquella a la que hemos denominado porción A, que conserva tanto el CxC como el CRD, se ha procedido a analizar la unión a metales de este fragmento, ya que, en principio esta fragmentación no debería afectar a ninguna de las regiones de unión a metales propuestas (aunque sí puede afectar a la estructura general de la proteína y a su actividad ya que carecería de la región esencial σ^2). El dicroísmo circular nos revela un perfil irregular, probablemente debido a la fragmentación de la proteína, así como a la mezcla de fragmentos de CorE2 de distintos tamaños y en distintas proporciones (de un 87% a un 91% correspondería a la porción A). En cualquier caso, se pudo determinar que en la estructura de los fragmentos presentes en la muestra predominaban las hélices alfa (un 71% según el algoritmo CONTINLL) (Figura 4.66 y Tabla 4.4). Según los resultados de masas e ICP (Figura 4.66) un 71% de la proteína se encontraría en la forma apo oxidada, es decir, sin unir metales, mientras que el 29% restante estaría unido a un átomo de zinc. Este resultado es muy similar al que se observaba en el caso de CorE, donde la proteína unía un átomo de zinc estructural cuando era producida en ausencia de metales. No obstante, la proporción de proteína sin unir a metales es muy superior a la de CorE, sugiriendo que la presencia de este zinc estructural podría no ser necesaria en este caso, o que se deba a la fragmentación de la proteína.

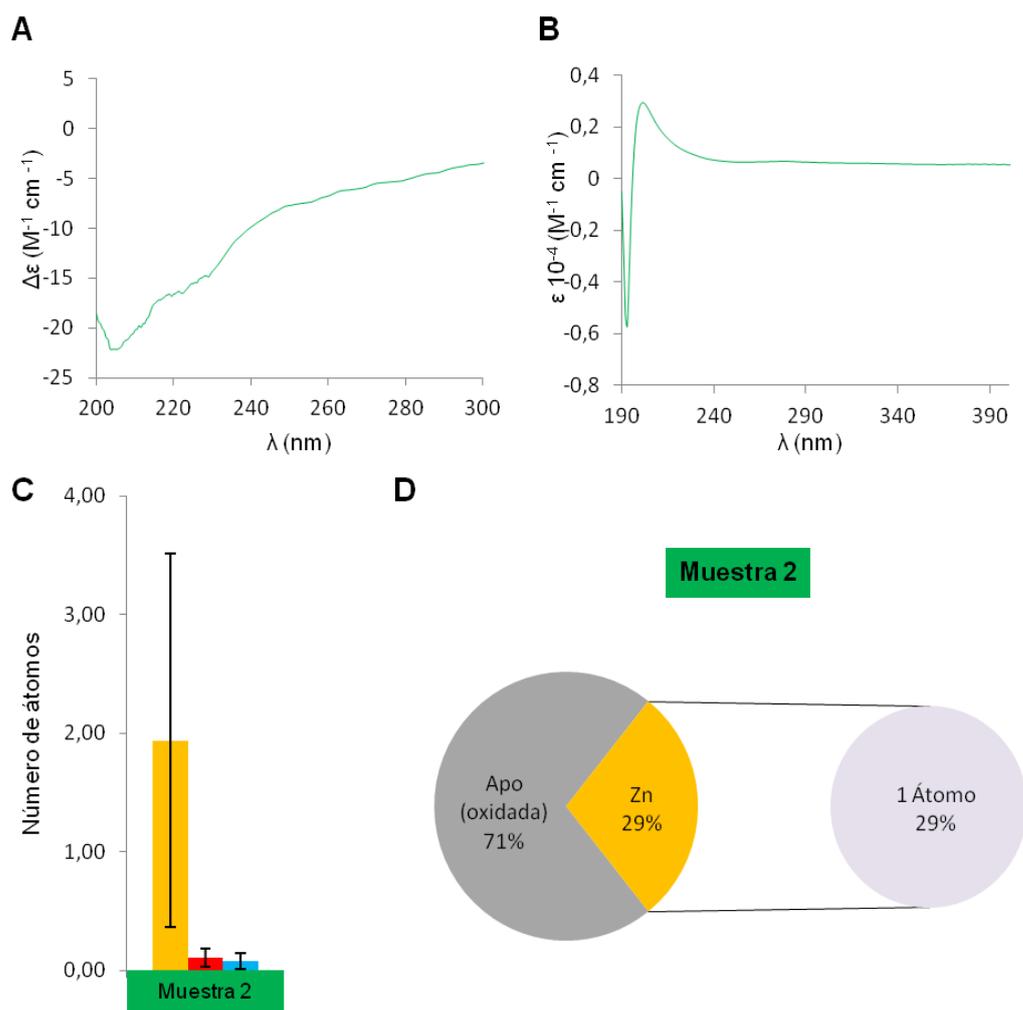


Figura 4.66. Análisis de las muestras de CorE2 producido en ausencia de metales. **A.** Espectro de dicroísmo circular (en verde). **B.** Espectro UV (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína medida por ICP-OAS. **D.** Porcentaje de las distintas proporciones de proteína unida a metal medido por espectrometría de masas.

CorE2 obtenido en presencia de zinc

Cuando se produce la proteína en presencia de zinc también se obtuvieron dos muestras, de las cuales, al igual que en el caso anterior, aquí sólo comentaremos los resultados obtenidos de la segunda, ya que la primera en este caso también representa únicamente un pequeño hombro del pico de la muestra mayoritaria (Apéndice 4). Pese a que la proporción de fragmentos de distintos tamaños es más variable y diversa (sólo el 21%-55% de la proteína sería de la

porción A), parece ser que el perfil de dicroísmo circular es el de una proteína mucho más estable cuando está unida a zinc, con una estructura predominante rica en hélices alfa (un 97,3% según el algoritmo CONTINLL) (Figura 4.67 y Tabla 4.4).

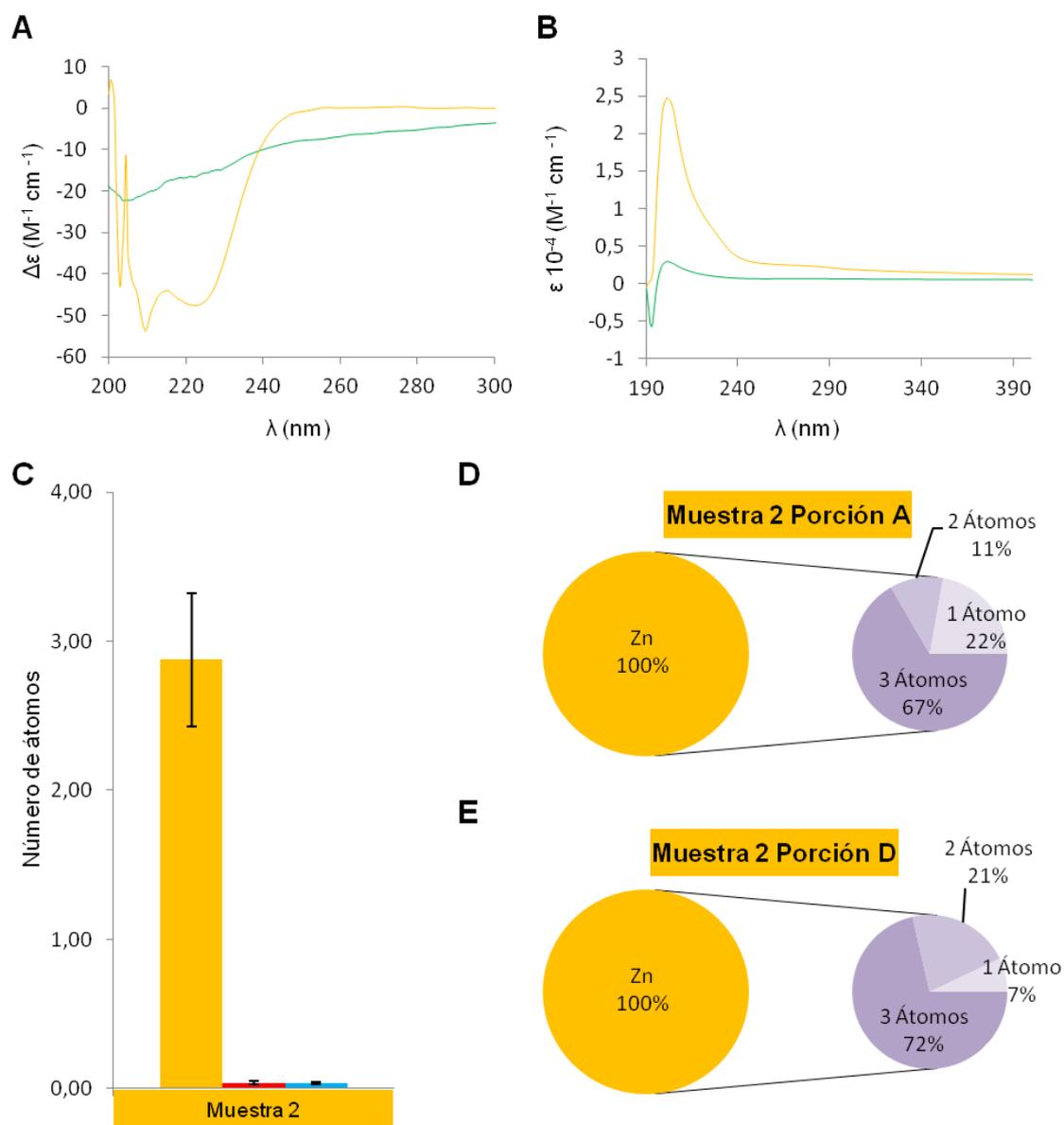


Figura 4.67. Análisis de las muestras de CorE2 producidas en presencia de zinc. **A.** Espectro de dicroísmo circular de la muestra dos (en amarillo) comparado con el de la muestra producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de de la muestra dos (en amarillo) comparado con el de la muestra producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína medida por ICP-OAS. **D** y **E.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal en la porción A (panel **D**) y en la porción D (panel **E**) determinadas en la muestra, medido por espectrometría de masas.

Los resultados de masas e ICP nos indican que toda la proteína de la muestra se encuentra unida a zinc, con un 67% de la porción A unida a tres átomos de zinc, y el resto unida a uno o dos átomos (Figura 4.67). La porción D, también bastante predominante en la muestra (de un 6% a un 53% de la muestra) proporciona unos resultados similares, con un 72% de la proteína unida a tres átomos de zinc (Figura 4.67). Teniendo en cuenta que el zinc es uno de los metales activadores de CorE2, estos resultados indican con bastante claridad que la forma activa de este regulador sería unida a tres átomos de este metal.

CorE2 obtenido en presencia de cadmio

Al realizar la producción en presencia de cadmio se analizaron de nuevo dos tipos de muestras (Apéndice 4), de las cuales se comentarán a continuación los resultados de la muestra número dos, que es la mayoritaria (los resultados obtenidos para la muestra uno podrán observarse en el Apéndice 6).

En este caso la porción A representa de un 87% a un 91% de la muestra. Al igual que sucede al inducir la proteína con zinc, el perfil de dicroísmo circular es mucho más estable y definido, representando una estructura de hélices alfa predominante en la muestra, con una porción significativa de estructuras desordenadas (un 72,7% de hélices alfa y un 23,7% de estructura desordenada según el algoritmo CONTINLL) (Figura 4.68 y Tabla 4.4). Por ICP y masas comprobamos que el 100% de la proteína se encuentra unida al cadmio, en su inmensa mayoría unida a tres átomos de este metal (un 91% de la porción A), mientras que el 9% restante estaba unida a 2 ó 3 átomos de cadmio combinados con un átomo de zinc (Figura 4.68). Al igual que sucedía con el zinc, parece ser que la forma predominante en presencia de este metal activador de CorE2 es unida a tres átomos de cadmio, sugiriendo que la forma activa de CorE2 se encontraría preferentemente unida a tres átomos metálicos, ya sea de cadmio o de zinc. Al igual que con CorE en presencia de cobre, al analizar el perfil de los espectros de DC y UV en presencia de cadmio y compararlo con el de la proteína en ausencia de metales, se observa una reestructuración de las hélices alfa del factor sigma, que podría ser requerida para que la proteína adquiriera el estado activo.

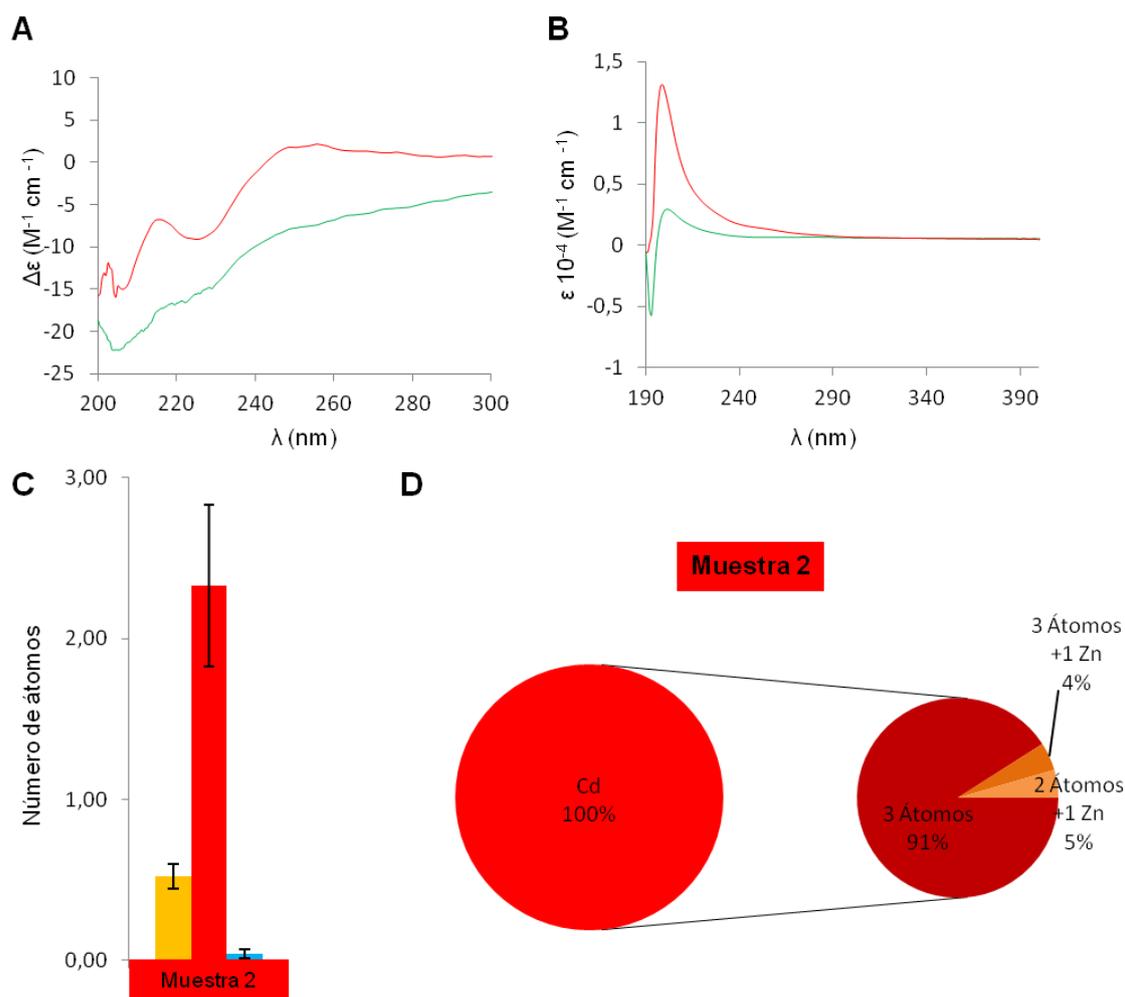


Figura 4.68. Análisis de las muestras de CorE2 producidas en presencia de cadmio. **A.** Espectro de dicroísmo circular de la muestra dos (en rojo) comparado con el de la muestra producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de de la muestra dos (en rojo) comparado con el de la muestra producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína medida por ICP-OAS. **D.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal medido por espectrometría de masas.

CorE2 obtenido en presencia de cobre

Finalmente, dado que el factor sigma mutante CorE2^{C174A} resultó ser capaz de responder al cobre, se analizó la capacidad de CorE2 para unir este metal para observar si su falta de respuesta al cobre se debe a que la distribución de cisteínas del CRD impide la correcta unión del cobre, o a que por el contrario, pese a ser capaz de unir cobre no logra alcanzar su forma activa. Al producir CorE2 en presencia de cobre se analizaron de nuevo dos muestras, ambas lo

suficientemente distanciadas y diferentes como para ser estudiadas en profundidad (Apéndice 4). En ambos casos la porción A es la predominante (un 87% para la muestra uno, y entre un 65% y un 80% para la muestra dos). Al estudiar el perfil de dicroísmo circular de ambas se observan las mismas irregularidades que encontrábamos en CorE2 cuando se inducía sin metales. El porcentaje de hélices alfa es mucho menor que en los casos anteriores (de un 42,7% para la muestra uno y de un 49,1% para la muestra dos según el algoritmo CONTINLL) con un porcentaje también elevado de estructuras irregulares (del 31,1% y del 23,2% para las muestras uno y dos, respectivamente) (Figura 4.69 y Tabla 4.4). Al analizar las dos muestras por masas e ICP observamos que al igual que cuando se incubaba sin metal, una gran proporción de la proteína se encuentra sin unir a metales (aproximadamente la mitad). Al igual que ocurría con CorE, mediante masas no es posible distinguir entre el zinc y el cobre, aunque el ICP es capaz de confirmar la presencia de ambos metales en las proteínas.

En la muestra uno, el 48% de la proteína se encuentra unida a un átomo de metal, y, salvo un 5% que se encuentra unido a dos átomos, el resto de la proteína se encuentra en su forma apo oxidada. La muestra dos posee un 38% de CorE2 unido a cuatro átomos de zinc y/o cobre, mientras que el resto de la proteína se encuentra sin unir a metales (Figura 4.69). Es posible que, al igual que ocurría con CorE, la muestra que sólo une un átomo de metal se corresponda con una porción de la proteína que se encuentra en el mismo estado que en ausencia de metales añadidos, es decir, uniendo únicamente un átomo de zinc estructural, que, además, en el caso de CorE2 no es frecuente encontrarlo. En el caso de la muestra dos, y en base a lo que conocemos de CorE y CorE2, es probable que los cuatro átomos se correspondan con tres átomos de cobre (ya que CorE2 parece necesitar la unión de tres átomos para estar activo) y un átomo de zinc (ya que CorE parecía necesitar un átomo de zinc estructural para coordinar correctamente la unión al cobre). No obstante, pese a que parte de la proteína sea capaz de unir cobre, es posible que CorE2 no adopte una estructura apropiada para iniciar la transcripción de los genes que regula de forma adecuada. El hecho de que la mayor parte de la proteína se encuentre sin unirse a metales cuando se produce sin metales añadidos y en presencia de cobre, y que esta proteína además se encuentre en un estado oxidado, se corresponde con los resultados mostrados anteriormente sobre la activación de CorE2 por parte de cadmio y zinc pero no por cobre o en ausencia de metales.

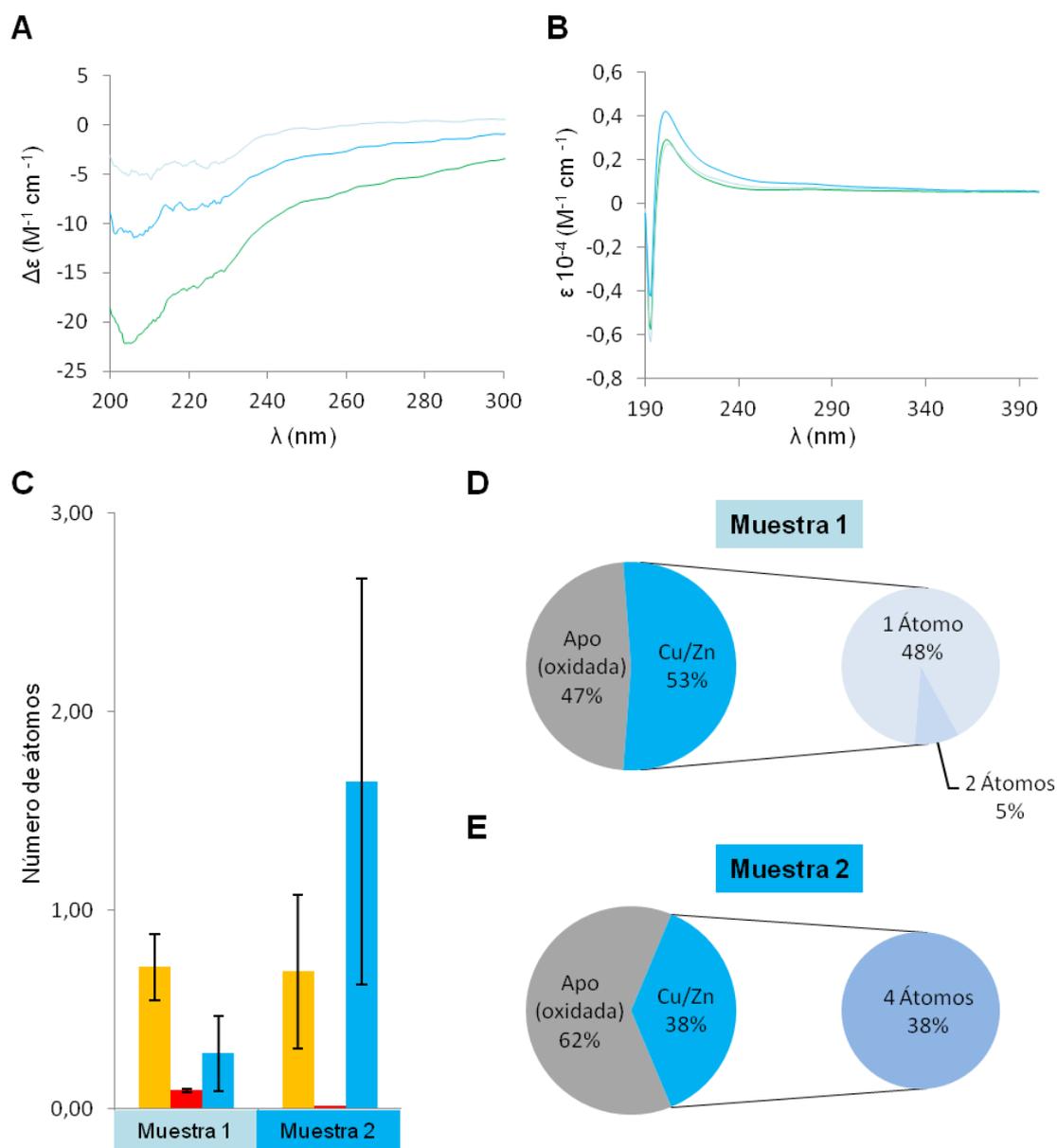
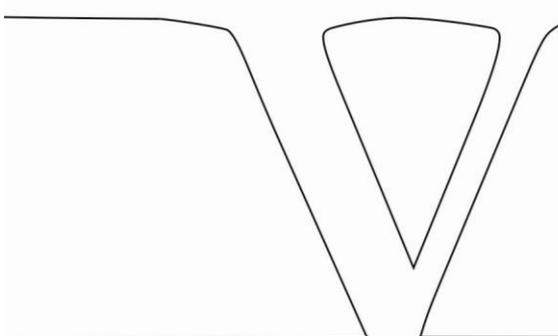


Figura 4.69. Análisis de las muestras de CorE2 producidas en presencia de cobre. **A.** Espectro de dicroísmo circular de las muestras uno y dos (en azul claro y oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **B.** Espectro UV de las muestras uno y dos (en azul claro y oscuro, respectivamente) comparado con el de la muestra dos producida sin metales (en verde). **C.** Cantidad de átomos de zinc (amarillo), cadmio (rojo) y cobre (azul) unidos a cada unidad de proteína de cada muestra medida por ICP-OAS. **D** y **E.** Porcentaje de las distintas formas de proteína unida a metal determinadas en las muestras uno (panel **D**) y dos (panel **E**) medidas por espectrometría de masas.



Discusión

V. Discusión

5.1. Factores sigma de tipo CorE

Los factores sigma de tipo CorE son un tipo de metalorreguladores que recientemente han fundado el grupo de los factores sigma denominado con el nombre ECF44. El único miembro descrito hasta el momento de este grupo (CorE de *M. xanthus*) se caracteriza por presentar un ciclo de activación e inactivación independiente de factores antisigma y por poseer una extensión C-terminal rica en cisteínas (CRD) que es imprescindible para su mecanismo de acción (Mascher, 2013). CorE es responsable de regular la respuesta primaria al cobre en esta bacteria, siendo activado en los primeros momentos tras la adición de cobre, ya que detecta la presencia de Cu^{2+} citoplasmático (el cual se encuentra en este estado de oxidación durante un tiempo corto debido al ambiente reductor del citoplasma), y se inactiva en presencia de Cu^+ , el cual pasa a ser mayoritario cuando la célula recupera el ambiente reductor en este compartimento (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Por otro lado, los residuos de cisteína del CRD de CorE ejercen un papel diferente en el mecanismo de activación/inactivación de este factor sigma (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Dado que se han identificado distintos factores sigma de tipo CorE en *M. xanthus* y otras bacterias con diferentes secuencias en su CRD, es interesante estudiar en mayor profundidad otros factores sigma de este grupo para averiguar cuáles de las características descritas para CorE son comunes para los miembros del grupo de factores sigma ECF44 y cuáles son específicas de este regulador. En esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto analizar en mayor profundidad el mecanismo de acción de los metalorreguladores de tipo CorE caracterizando el factor sigma CorE2 de *M. xanthus*, un segundo miembro de este grupo.

En la actualidad, entre los genomas procariotas secuenciados se pueden encontrar 67 factores sigma con la estructura de CorE, todos ellos con una distribución de cisteínas en su CRD muy conservada, aunque no idéntica (Figura 4.1). La primera diferencia que observamos es la ausencia de una de las cisteínas en aproximadamente la mitad de las bacterias encontradas, ausente en todos los

CRDs de alfa proteobacterias, y en los únicos miembros de las gamma proteobacterias y los bacteroidetes. Esta cisteína, que ocupa la posición 16 en el CRD respecto al inicio propuesto del mismo, está presente sin embargo en todos los factores sigma de este tipo encontrados en las delta proteobacterias, las acidobacterias, nitrospirales, espiroquetas y los dos miembros del *phylum Verrucomicrobia* (Figura 4.1). Esta cisteína ha resultado ser esencial para que tanto CorE como CorE2 puedan alcanzar su forma activa (Gómez-Santos *et al.*, 2011; Figura 4.54), lo que sugiere que este residuo debe ser imprescindible en este grupo. Por el contrario, aquellos factores sigma que carecen de ella deben haber desarrollado otros mecanismos por los que puedan funcionar sin dicho residuo. Es probable que los residuos de metionina o histidina, los cuales son importantes en la unión a metales (Vila y Fernández, 2001), que aparecen en la posición 7 del CRD, y de los que carecen los miembros que sí poseen Cys en la posición 16 (Figura 5.1), ejerzan un papel importante en la activación de estos reguladores.

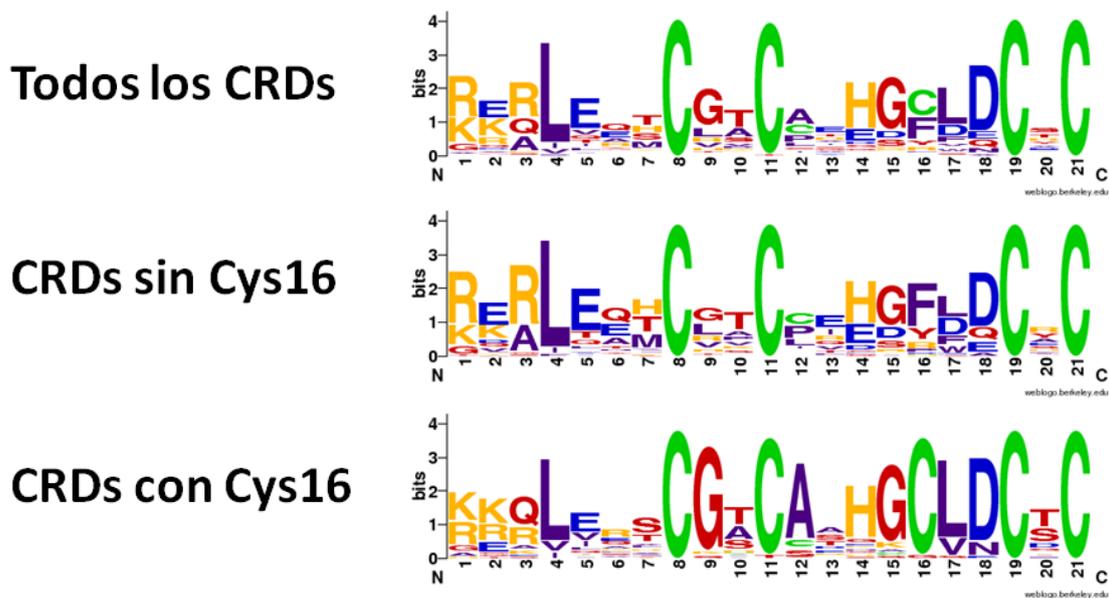


Figura 5.1. HMM-Logo del CRD de los factores sigma de tipo CorE. El alineamiento se realizó utilizando las 67 secuencias de aminoácidos de los factores sigma del grupo ECF44 identificados, conjuntamente y separando los dos grupos principales encontrados según su secuencia.

Dentro de las bacterias que poseen factores sigma con cisteína en la posición 16 podemos observar tres tipos generales de CRDs, con distinta disposición de cisteínas, lo que nos ha llevado a proponer que existen tres tipos diferentes de factores dentro de este grupo, a los que hemos denominado factores sigma de tipo CorE, CorE2 y CorE3 (Figura 4.2). Por lo tanto, de ser cierta esta propuesta, las acidobacterias y las deltaproteobacterias en general presentarían hasta tres tipos de respuesta a metales gobernadas por estos tres tipos de factores sigma de tipo ECF44. Las evidencias experimentales sugieren que los factores sigma con un CRD de tipo CorE estarían especializados en una respuesta temprana y corta al cobre al detectar el Cu^{2+} citoplasmático, mientras que aquellos con un CRD de tipo CorE2, tal y como se ha demostrado en esta Tesis Doctoral, estarían involucrados en una respuesta mantenida al cadmio y al zinc al detectar el Cd^{2+} y el Zn^{2+} presentes en el citoplasma. En cuanto a los factores sigma de tipo CorE3, en la actualidad carecemos de base experimental que nos indique la función fisiológica en la que estarían implicados. Dado que es frecuente que tras un evento de duplicación génica tenga lugar un evento de especialización (Taylor y Raes, 2004), es factible especular que los factores sigma de tipo CorE3 funcionen de manera distinta a como lo hacen los de tipo CorE y CorE2, bien respondiendo a otros metales o hacerlo mediante un mecanismo de activación diferente.

5.2. Estudio y caracterización del factor sigma de tipo ECF CorE2

CorE2 es el segundo miembro descrito del grupo ECF44 de factores sigma. CorE2 tiene un menor tamaño que su parólogo CorE, debido a que éste último alberga una extensión C-terminal con mayor número de residuos. La expresión de este factor sigma, al contrario que CorE, no es inducida por ninguno de los metales ensayados, sino que muestra una expresión baja únicamente durante el ciclo de desarrollo. El regulador responsable de la expresión de CorE2 durante el desarrollo está por identificar. Este gen, tal y como han demostrado los experimentos de RT-PCR (Figura 4.30) aparece en el mismo ARNm que se origina al expresarse el gen para la lipoproteína MXAN_5262, situada aguas arriba de *corE2*.

Durante el crecimiento vegetativo, las diferencias en la resistencia al Zn^{2+} y al Cd^{2+} observadas entre la cepa silvestre y el mutante $\Delta corE2$ son bastante pequeñas, bien porque la resistencia conferida por los genes regulados por CorE2 sea relativamente pequeña, o, más probable, porque otros sistemas más efectivos estén enmascarando el papel desempeñado por ellos. Por ello, al adaptar el mutante al zinc y al cadmio previamente al análisis de la resistencia a ambos metales, se ha observado un aumento de la sensibilidad mostrada por el mutante $\Delta corE2$, el cual se vuelve especialmente sensible al zinc (Figura 4.34).

Durante el ciclo de desarrollo, se observa que el mutante $\Delta corE2$ se ve algo más afectado que la cepa silvestre al formar los cuerpos fructíferos en medios que contienen cadmio o zinc (Figuras 4.36 y 4.37). Este efecto pone de manifiesto la función de conferir resistencia a metales que poseen los genes regulados por este factor sigma. Si bien durante el crecimiento vegetativo era necesario preinducir los cultivos con ambos metales para poder observar un fenotipo evidente, durante el desarrollo no fue necesario precultivar las cepas ni con zinc ni con cadmio para ver dicho efecto. Esto probablemente sea debido a que *M. xanthus* muestra una sensibilidad más acusada a los metales durante el ciclo de desarrollo que durante el crecimiento vegetativo (Sanchez-Sutil *et al.*, 2007).

5.3. Estudio del ambiente genético de *corE2*

La proteína MXAN_5262 se ha caracterizado como una lipoproteína cuyo gen se cotranscribe con el de *CorE2* durante el ciclo de desarrollo de manera independiente de metales (Figura 4.30). Es frecuente encontrar en el genoma de *M. xanthus* lipoproteínas de función desconocida localizadas en la proximidad de genes que forman parte de rutas de transducción de señales. Por ejemplo, una lipoproteína paróloga codificada por el gen *MXAN_6151*, con un 51,3% de identidad con *MXAN_5262*, está situada en el genoma junto al sistema de dos componentes codificado por los genes *MXAN_6149* y *MXAN_6150*. En otras ocasiones, las lipoproteínas aparecen junto a genes relacionados con la homeostasis de metales. Es el caso de las lipoproteínas *MXAN_3417* y *MXAN_3416*, que se encuentran en la región del cobre 1. Aunque inicialmente se postuló que la lipoproteína *MXAN_3417* pudiera estar implicada en la homeostasis del cobre, los resultados obtenidos no fueron concluyentes (Sánchez-Sutil, 2009).

En el caso de la lipoproteína codificada junto con *corE2*, el fenotipo del mutante $\Delta 5262$ parece ser opuesto al observado para el mutante $\Delta corE2$ en lo que respecta a la formación de cuerpos fructíferos. Mientras que la delección del factor sigma provoca un retraso en el desarrollo en ausencia de metales, el mutante de la lipoproteína parece mostrar cierto adelanto con respecto a la cepa silvestre (Figura 4.35). Este tipo de observación, sin embargo, hay que tener en cuenta que es frecuente que aparezca en mutantes de delección de genes que se cotranscriben. Uno de estos ejemplos sería el de los factores sigma y su correspondiente antisigma (Helmann, 2002), o los sistemas toxina-antitoxina responsable de la muerte celular al alcanzar elevadas densidades celulares (Nariya e Inouye, 2008). Sin embargo, en el caso de la lipoproteína *MXAN_5262* se desconoce el motivo por el que presenta el mutante un fenotipo opuesto al del mutante para el factor sigma *CorE2*, aunque sí está claro que esta lipoproteína no funciona como antisigma de *CorE2* (Figura 4.40).

En cuanto al gen *MXAN_5264*, el análisis bioinformático ha revelado que codifica una proteína de eflujo de cationes (Figura 4.19). Los sistemas de eflujo de tipo CDF actúan utilizando como sustrato principal zinc, aunque también pueden transportar cadmio, cobalto, níquel o hierro, mediante un sistema antiporte con K^+ o H^+ (Goswami *et al.*, 2012). Estas proteínas están en su mayoría involucradas en la resistencia a metales pesados, aunque en ocasiones se les ha

atribuido el rol de proteínas reguladoras, ya que son las encargadas de proporcionar los metales requeridos a las proteínas extracitoplasmáticas (Jirakulaporn y Muslin, 2005). El sistema CzcD de *C. metallidurans* actúa como transportador de Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} , otorgándole a la bacteria una resistencia muy leve a dichos metales, y suministrando dichos metales a las metaloproteínas del espacio periplásmico, lo que en ocasiones conlleva la regulación de la actividad de estas proteínas (Nies *et al.*, 1989; Anton *et al.*, 1999). En esta bacteria, el sistema CzcD se encuentra codificado en un plásmido de resistencia a metales pesados, formando parte de la intrincada red de regulación del sistema de expulsión de cationes CzcCBA. Estos sistemas CzcCBA, al tener una elevada eficiencia y poder expulsar los metales desde el citoplasma y/o desde el espacio periplásmico, requieren de una compleja regulación que comprende a varias proteínas reguladoras para evitar que un exceso de eflujo de metales genere una escasez de Zn^{2+} y Co^{2+} en estos compartimentos celulares (Nies, 1992). Además, un funcionamiento excesivo de los sistemas CzcCBA puede disminuir o incluso impedir la expresión de otros sistemas de resistencia más específicos, como ocurre con las ATPasas de tipo P_{IB} CadA y ZntA de *C. metallidurans*, que expulsan específicamente cadmio y zinc, respectivamente (Legatzki *et al.*, 2003). Probablemente para evitar desequilibrios, el sistema CzcCBA de dicha bacteria se encuentra regulado por el sistema de dos componentes CzcSR, los reguladores CzcN y CzcI, la proteína CzcE y el facilitador de la difusión de cationes CzcD (Große *et al.*, 2004). Se ha sugerido que CzcD podría funcionar cuando el sistema CzcCBA está activo y, por tanto, ha reducido rápidamente la concentración intracelular de cationes, suministrando metales a sus proteínas reguladoras cuando los niveles de metales son insuficientes para inducir dichos sistemas (Nies, 1992). Algunas proteínas de tipo CzcD se encuentran genéticamente asociadas a oxidasas que contribuyen a la tolerancia a metales conjunta o independientemente, como es el caso del operón formado por CzcD y CzcO de *B. subtilis*, donde se ha comprobado que CzcO incrementa la eficiencia de eflujo de zinc de CzcD, aunque no se ha observado que independientemente CzcO pueda conferir resistencia al zinc (Guffanti *et al.*, 2002). Algo similar podría ocurrir con la bomba de eflujo de cationes codificada por el gen *MXAN_5264*, la cual se expresa conjuntamente con una glioxal oxidasa en *M. xanthus*.

Al analizar *MXAN_5264* vemos que como la mayoría de los CDFs posee seis hélices transmembrana, de manera que formaría parte del grupo de CDF-2e, perteneciendo al subgrupo de CDFs del zinc de proteobacterias y

cianobacterias (Nies, 2003). Su posible implicación en la homeostasis del zinc es avalada también por la clasificación propuesta por Montanini *et al.* (2007), en la cual, aunque no aparecen todos los motivos conservados de cada subgrupo, podemos establecer por similitud de secuencia que la bomba de eflujo de cationes de *M. xanthus* es una Zn-CDF. La similitud entre la proteína MXAN_5264 con CzcD de *C. metallidurans* (31,72% de identidad), sugiere que ésta proteína podría tener un papel, al igual que CzcD, tanto en la respuesta a metales como en la regulación de otros sistemas. La región rica en histidinas y serinas del extremo amino de MXAN_5264 parece ser citoplasmática, como se ha deducido del análisis de su secuencia, por lo que podría estar involucrada en captar en el citoplasma los metales que van a ser expulsados actuando como región de unión a metales. Esto sugiere que, al igual que sucede en *C. metallidurans*, la proteína MXAN_5264 podría estar contribuyendo a la regulación de otros sistemas de expulsión de metales pesados como los sistemas Cus1, Czc1 y Czc2 de expulsión de Cd^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2010a).

La proteína hipotética MXAN_5265 posee tres dominios con PFAM conocido. Un dominio del extremo amino de la glioxal oxidasa (PF07250), un motivo kelch a continuación (PF01344) y un dominio de función desconocida DUF1929 (PF09118). Estos tres dominios abarcan prácticamente la mitad de la proteína, ocupando uno de los dos lóbulos presentes en la estructura tridimensional deducida, y quedando la porción restante (el lóbulo C-terminal) como una región sin dominios descritos. Analizando la secuencia de dicho lóbulo podemos encontrar una secuencia repetida conservada en varias proteínas de mixobacterias con función catalítica, cuya estructura deducida podría asemejarse a la de algunas regiones de unión a azúcares y de unión a la galactosa.

La enzima glioxal oxidasa se encarga de la degradación de compuestos como el glioxal, metilglioxal y el gliceraldehido con producción de peróxido de hidrógeno. Esta enzima fue descubierta tras una búsqueda de enzimas implicadas en la producción de H_2O_2 en el hongo lignolítico *Phanerochaete chrysosporium* que proveyeran de dicho peróxido a la lignina peroxidasa (Kersten y Kirk, 1987; Kersten y Cullen, 2014). Estas enzimas tienen un centro activo que utiliza cobre para catalizar la reacción de oxidación del sustrato y la reducción del O_2 a H_2O_2 . La primera glioxal oxidasa descrita en procariotas fue la oxidasa SCO2837p de la bacteria *S. coelicolor* (Whittaker y Whittaker, 2006), ya

que muchas de estas oxidasas eran descritas como galactosa oxidasas debido a su similitud en secuencia. Este es el caso del ortólogo de MXAN_5265, FbfB (*fruiting bodies formation B*) de *S. aurantiaca*, que fue descrito como galactosa oxidasa, a pesar de observarse que no presentaba este tipo de actividad (Vinogradov *et al.*, 2003). Tanto la glioxal oxidasa como la galactosa oxidasa poseen una serie de motivos característicos llamados motivos Kelch, los cuales también están presentes en la proteína MXAN_5265, confirmando que se trata de una oxidasa de este tipo. Debido a su amplia distribución en distintos tipos de proteínas, los motivos Kelch están más relacionados con una estructura terciaria que con una función concreta, y esta estructura ha sido bien estudiada en la enzima galactosa oxidasa, donde cada uno de estos motivos adopta la forma de cuatro láminas beta, los cuales constituyen una de las siete estructuras laminares que la componen (Adams *et al.*, 2000).

Como hemos comentado en la sección de Resultados, el gen MXAN_5265 se coexpresa con el CDF MXAN_5264 en presencia de cadmio y zinc, y dicha expresión está regulada por CorE2. Sin embargo, existe otra pauta de expresión para este gen, ya que también se expresa durante el desarrollo en ausencia de metales. Esto podría implicar la importancia de este gen tanto para la resistencia a metales como para el correcto ciclo de desarrollo, pudiendo tener un papel clave para la formación de cuerpos fructíferos en presencia de metales pesados. La importancia de este gen durante el ciclo de desarrollo ha sido previamente analizada en la mixobacteria *S. aurantiaca*, donde un ortólogo de MXAN_5265, el mencionado anteriormente *fbfB* resultó ser responsable de la producción de una señal extracelular imprescindible para la correcta morfología del cuerpo fructífero (Silakowski *et al.*, 1998) y de la síntesis de la hormona estigmolona, una molécula de función similar a la señal A en *M. xanthus* (Ronning y Nierman, 2008). Es por tanto probable que este gen sea el responsable del fenotipo observado en el mutante $\Delta 5265$ durante el ciclo de desarrollo, sobre todo en presencia de metales. Hay varias teorías sobre cómo puede contribuir esta glioxal oxidasa a la resistencia a metales y al correcto desarrollo de los cuerpos fructíferos. Uno de los principales efectos del exceso de metales pesados es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la creación de un ambiente altamente oxidante (Bertin y Averbeck, 2006). Se ha observado que en presencia de metales como el hierro, el cobre y el cadmio, o de agentes oxidantes como el H₂O₂, se pueden generar glioxal y metilglioxal como productos de la degradación de azúcares o de la peroxidación de lípidos (Thornalley *et al.*, 1999; Manini *et al.*, 2006; Gómez-Ojeda *et al.*, 2013). Estos

subproductos son altamente tóxicos, por lo que podría ser necesario que *M. xanthus* los degradara en fases tan delicadas de su ciclo de vida como es la formación de cuerpos fructíferos. De no hacerlo, el desarrollo sería retrasado o incluso bloqueado. En este sentido, la glioxal oxidasa del hongo patógeno *Ustilago maydis* se ha sugerido que podría actuar evitando los daños celulares producidos por el metilglioxal, que es producido normalmente a una baja concentración durante el catabolismo de aminoácidos y la glucólisis. Este producto, sin embargo, es degradado eficientemente por la enzima glioxalasa (Kalapos, 1999; Martins *et al.*, 2001; Leuthner *et al.*, 2005). La relación entre la degradación del metilglioxal y la resistencia a metales ha sido descrita en *Nicotiana tabacum*, donde se ha visto que una cepa que sobreexpresa la enzima glioxalasa resulta ser mucho más resistente al zinc y al cadmio que la cepa silvestre (Singla-Pareek *et al.*, 2006). De ser este el mecanismo de acción de MXAN_5265, parece contradictorio que para remediar una situación provocada por unas condiciones fuertemente oxidantes se emplee una enzima que produce H₂O₂. No obstante, es preciso llevar a cabo una mayor caracterización de la proteína de *M. xanthus*, puesto que no todas las enzimas llevan a cabo el mismo tipo de reacción. Por ejemplo, la ferritina eucariota reduce el O₂ a H₂O₂ al oxidar el Fe²⁺ a Fe³⁺, mientras que en algunos procariontes como *E. coli* y en *Listeria innocua* esta reacción puede llevarse a cabo reduciendo el H₂O₂ (Yang *et al.*, 2000; Chiancone y Ceci, 2010).

Otra posible función del gen MXAN_5265, más relacionada con el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* sería favorecer la diferenciación a mixósporas, más concretamente participando en el engrosamiento de la pared celular y fortaleciéndola. En el hongo *U. maydis* se han observado defectos en la maduración de la pared celular al eliminar el gen que codifica la glioxal oxidasa (Leuthner *et al.*, 2005), mientras que en la planta del algodón, *Gossypium*, se ha relacionado esta enzima con el metabolismo de la pared celular (Suzuki *et al.*, 2013). En la planta del pimiento, *Capsicum annuum*, el gen *Camf1*, que codifica una proteína que posee los dominios glioxal oxidasa y DUF1929 que también aparecen en MXAN_5265, se considera que esta enzima es esencial para la fertilidad en las anteras, relacionándola con la síntesis de exina, la cual es necesaria para la formación de la capa más externa del polen (Chen *et al.*, 2012). Uno de los principales componentes de la exina es la esporopolenina, una sustancia que se origina a partir de los ácidos grasos y derivados fenólicos, donde también podrían estar implicados otros componentes como los carotenoides (Wang *et al.*, 2013; Avalos y Limón, 2014) y que protege a las

esporas y al polen de la radiación UV, de la desecación, las altas temperaturas y el ataque por parte de microorganismos (Ariizumi y Toriyama, 2011). Además, posee un gran interés biotecnológico por su capacidad para acomplejar metales pesados como cobre, zinc, cobalto, cadmio, plomo y cromo (Unlü y Ersoz, 2006; Gode y Pehlivan, 2007; Gubbuk, 2011). En algunas especies del género *Myxococcus* se ha descrito la presencia de esporopoleninas, aunque su papel biológico en estas bacterias no ha sido determinado (Strohl *et al.*, 1977).

Por último, las enzimas productoras de H₂O₂ se han relacionado en numerosas ocasiones con el crecimiento polarizado y los procesos morfológicos complejos. En *U. maydis* se ha relacionado con el crecimiento filamentosos del hongo y con su patogenicidad (Leuthner *et al.*, 2005). También se ha descrito que en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* todos los procesos morfogenéticos durante la conidiación tienen lugar tras un proceso hiperoxidante (Toledo *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1996). Además, en algunas plantas se ha descrito que el crecimiento polarizado de la raíz se basa en la utilización de especies reactivas del oxígeno que afectan al funcionamiento de los canales de calcio (Foreman *et al.*, 2003). Esta implicación en los procesos morfológicos estaría acorde con el patrón de expresión del gen *MXAN_5265* al inicio del ciclo de desarrollo, lo que indica que podría estar implicado en la correcta formación del cuerpo fructífero, como se observó para su ortólogo *fbfB* en *S. aurantiaca* (Silakowski *et al.*, 1998). De ser así, el H₂O₂ liberado podría funcionar como una señal, ya que en algunos organismos se ha descrito la utilización de especies reactivas del oxígeno como señales de comunicación célula-célula que se transmiten por oleadas (Paulsen y Carroll, 2009; Mittler *et al.*, 2011).

5.4. Estudio del mecanismo de acción de los factores sigma de tipo CorE

Haciendo un estudio comparativo de los dos factores sigma descritos hasta el momento (CorE y CorE2) se han podido encontrar ciertas características comunes que podrían ser compartidas por todos los factores sigma del grupo ECF44. Asimismo, se han encontrado otros rasgos que son específicos de CorE o de CorE2.

Una de las características compartidas por CorE y CorE2 es que ninguno de los dos regula por completo su propia expresión, justo al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los factores sigma de tipo ECF, en los que se ha descrito que ellos mismos inducen su propia expresión tras ser activados (Muñoz-Dorado *et al.*, 2014). En el caso de *corE2*, su expresión no depende de metales, sino que está completamente bajo el control de un regulador distinto. Además, debido a los bajos niveles de expresión que presenta y a que sólo se ha encontrado un patrón de inducción, es probable que su expresión dependa de un único regulador. En el caso de CorE, por el contrario, la inducción que presentaba dependiente de cobre dependía del propio CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011). Sin embargo, en el mutante $\Delta corE$ existían unos niveles de expresión que no dependían del propio factor sigma, indicando que ninguno de estos dos factores sigma regula por completo su propia expresión. La información obtenida tras el análisis de los posibles promotores reconocidos por otros factores sigma de este grupo encontrados en otras especies parece confirmar que dicho promotor, en general, no regula la expresión del propio factor sigma, ya que se encuentra situado aguas abajo del mismo. Por otro lado está el hecho de que tanto *corE* como *corE2* muestran expresión constitutiva en ausencia de metales, *corE* tanto durante el ciclo vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, y *corE2* únicamente durante el ciclo de desarrollo. Esta expresión constitutiva tampoco es el resultado de autorregulación.

Otra característica común en los factores sigma de tipo CorE es que no están regulados por un factor antisigma. En el caso de CorE se llevaron a cabo unos experimentos que demostraban claramente que este factor sigma no estaba regulado por un antisigma típico (Gómez-Santos *et al.*, 2011). En el caso de CorE2 no se ha llevado a cabo un estudio tan exhaustivo. Sin embargo, y ya que la mayoría de los factores sigma típicos se coexpresan con sus factores

antisigma, *corE2* se cotranscribe con el gen que codifica la lipoproteína MXAN_5262, y esta lipoproteína se ha sugerido que podría funcionar como el antisigma de CorE2 (Abellón-Ruiz *et al.*, 2014), en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo experimentos que demuestran que esta lipoproteína no lleva a cabo este papel regulador de CorE2. De cualquier manera, y tal como se ha demostrado en la sección de Resultados, la activación de este tipo de factores sigma depende de la extensión rica en cisteínas presente en el extremo carboxilo de estas proteínas, y que se discutirá también más adelante.

El dominio rico en cisteínas es esencial para la actividad de los factores sigma de tipo CorE. Como en CorE, el CRD de CorE2 es esencial para que la proteína adopte su forma activa. Aunque CorE y CorE2 poseen los dominios σ_2 y σ_4 presentes en cualquier factor sigma de tipo ECF (Wilson y Lamont, 2006), a diferencia de éstos los factores sigma del grupo ECF44 requieren la presencia del CRD para poder ser activados y promover la transcripción (Gómez-Santos *et al.*, 2011; **Figura 4.47**). Pero aunque todos los ECF44 caracterizados necesitan el CRD, la distribución de cisteínas difiere de unos a otros, y por este motivo la mayoría de las cisteínas juega un papel distinto y específico en cada factor sigma. Como ya se ha discutido anteriormente, la cisteína en posición 16, presente en todos los factores sigma de mixobacterias y acidobacterias, parece ser necesaria para la activación de todos los factores sigma de este grupo (Gómez-Santos *et al.*, 2011; **Figura 4.54**). Por el contrario, mientras que la cisteína 169 de CorE2 es también esencial para la respuesta al cadmio de este factor sigma, la cisteína que ocupa es misma posición en CorE (Cys181), no juega un papel relevante en la respuesta de este factor sigma al cobre. Asimismo, mientras que la cisteína 194 de CorE participa tanto en la activación como en la inactivación de este regulador, la cisteína homóloga de CorE2 (Cys183) no juega un papel significativo en el funcionamiento de esta proteína. Por último, las otras cisteínas del CRD de CorE2 (Cys173, Cys174 y Cys181) se ha demostrado que contribuyen en distinta medida a la activación/inactivación por cadmio de este factor sigma. Sin embargo, la cisteína 184 de CorE (equivalente a la Cys173 de CorE2), está involucrada en la inactivación del factor sigma en lugar de en su activación, como ocurre en CorE2 (Gómez-Santos *et al.*, 2011; **Figura 4.51**); la Cys174, implicada en la activación e inactivación de CorE2, aparece solamente en este factor sigma, pero no en CorE; y por último, la Cys192 de CorE, equivalente a la Cys181 de CorE2, participa en la activación e inactivación del factor sigma, mientras que en CorE2, esta cisteína parece participar sólo en su activación (**Figura 4.51**). A modo de resumen, pese a que el CRD es esencial para

el funcionamiento de los factores sigma de tipo ECF, sólo la cisteína que ocupa la posición 16 parece tener una función común en todos los CRDs de mixobacterias y acidobacterias, mientras que el resto de residuos desempeñan una función específica en cada tipo de regulador (Figura 5.2).

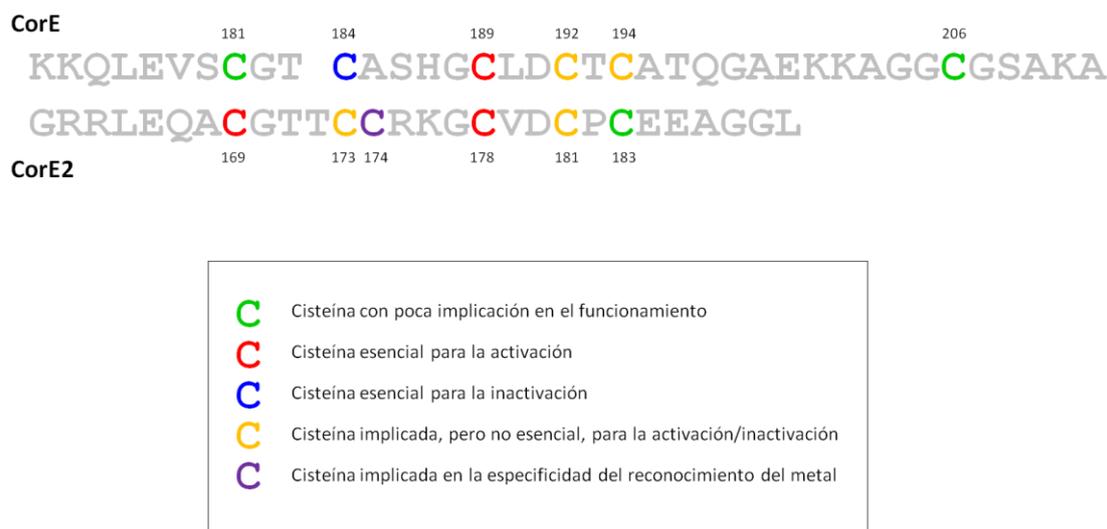


Figura 5.2. Secuencia de aminoácidos del CRD de CorE y CorE2, resumiendo el rol de cada una de las cisteínas mutadas en las mutaciones puntuales de cada factor sigma. El código de coloración utilizado se encuentra descrito en la figura.

La configuración de las cisteínas del CRD determina la especificidad de metales de los factores sigma de tipo CorE. Como hemos deducido del estudio comparativo de la función de cada cisteína del CRD de CorE y CorE2, la función de la mayoría de los residuos del CRD viene determinada por el metal al que responde el factor sigma. Dado que el CRD presente en los factores sigma de tipo ECF44 parece funcionar a modo de sensor que reconoce el metal activador, es esta porción de la proteína la que debe determinar la especificidad por el metal de cada regulador. Las diferencias entre los CRDs de CorE y CorE2 son pocas. Sin embargo, pueden observarse diferencias en cuatro aspectos. Una diferencia radica en la longitud del CRD de cada proteína, ya que mientras que el de CorE posee 38 residuos, el de CorE2 es más corto, de tan solo 28 aminoácidos (Figura 5.2); una segunda diferencia se observa en la presencia de una treonina adicional en CorE2, la cual no solamente no aparece en CorE, sino que está también ausente en el resto de factores sigma de este tipo encontrados hasta la fecha mediante análisis bioinformáticos (Figura 4.1); una tercera

diferencia está en la presencia de la Cys174 en CorE2 en lugar de la Ala185 de CorE (Figura 5.2); y por último, CorE presenta una histidina en la posición 187 que no se encuentra en CorE2 (Figura 5.2). De estas cuatro diferencias, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en analizar el papel que ejercen la Cys174 y la Thr172 de CorE2 en la detección de metales.

Los estudios realizados nos han permitido demostrar que la Cys174 es responsable de que CorE2 no sea capaz de responder al cobre, y, simultáneamente, aumente la sensibilidad de esta proteína al cadmio, ya que la sustitución de esta cisteína por una alanina hace que este regulador pase de ser activado por cadmio a serlo por cobre (Figura 4.57). Sin embargo, otros residuos deben también contribuir a esta especificidad, ya que al sustituir en CorE la alanina que presenta en esta posición por una cisteína no se obtiene el mismo cambio de especificidad observado en el caso de la mutación en CorE2. Esta diferencia entre la detección de cobre de los mutantes puntuales de CorE y CorE2 probablemente se deba a la His187 de CorE, ya que las histidinas también son residuos que participan en la coordinación de cobre, especialmente de Cu^{2+} (Frausto da Silva y Williams, 1991; Vila y Fernández, 2001; Davis y O'Halloran, 2008). Por ello, es posible que este residuo permita la unión de CorE al cobre aun cuando se ha introducido una cisteína que antes no aparecía en la posición 185. Sin embargo, y aunque esta proteína mutante siga respondiendo al cobre, también se observa que aumenta considerablemente que presenta en presencia de cadmio, lo que confirma la importancia de esta cisteína en la especificidad del metalorregulador.

Los factores sigma de tipo CorE poseen un motivo CxC esencial para su actividad. El motivo CxC de los factores sigma de tipo ECF44 fue observado por primera vez durante la caracterización de CorE (Gómez-Santos, 2009), pero no ha sido la realización de esta Tesis Doctoral cuando se ha estudiado este motivo en profundidad. Este motivo CxC está localizado entre los dominios σ_2 y σ_4 , y se ha demostrado que es imprescindible para el correcto funcionamiento de los factores sigma de este grupo. Por tanto, representan la segunda región distintiva de este grupo de factores sigma, la cual también se caracterizaría por presentar cisteínas. Se han descrito numerosos motivos CxC o CxC implicados en la unión a metales, ya que las cisteínas son unos residuos de gran importancia para la coordinación de metales (Frausto da Silva y Williams, 1991; Waldron *et al.*, 2009). Aparecen en proteínas tales como las metalotioneínas, unas pequeñas proteínas que presentan una elevada proporción de cisteínas e

histidinas con una gran capacidad de unirse a metales como cobre, zinc o cadmio. Este tipo de proteínas, han cobrado gran interés en los últimos años en las bacterias, ya que previamente se consideraban únicamente eucariotas (Capdevila *et al.*, 1997; Peroza *et al.*, 2009; Blindauer, 2011; Espart *et al.*, 2015). Este tipo de motivos también aparecen en los denominados motivos HCC de los dominios ZAS típicos de los factores antisigma que se unen a zinc (Jung *et al.*, 2011; Abellón-Ruiz *et al.*, 2014). Por todo ello, es probable que la región CxC y el CRD estén funcionando conjuntamente en el reconocimiento y unión del metal, provocando que el factor sigma sufra los cambios conformacionales necesarios para su activación e inactivación. Además, cabe señalar que la localización de dicho motivo es muy importante en la regulación de los factores sigma, ya que ocuparía la región correspondiente al dominio $\sigma 4.1$, encargada de unirse a las proteínas activadoras, o a represores del tipo de los factores antisigma (Wösten, 1998).

Los factores sigma de tipo CorE unen metales y sufren un cambio estructural al unirse a ellos. Pese a que el dominio rico en cisteínas de este tipo de factores sigma posee una secuencia adecuada como para ser considerado un excelente candidato para unir el metal activador, la capacidad de unir cobre por parte de CorE o de cadmio por parte de CorE2 no se había demostrado hasta ahora. Incluso la capacidad de CorE para unir metales ha estado sometida a controversia ya que, según los resultados obtenidos, este factor sigma citoplasmático es activado por Cu^{2+} (Gómez-Santos *et al.*, 2011), y dicho estado de oxidación de este metal se ha descrito por varios autores que no existe en el citoplasma debido a su ambiente fuertemente reductor (Davis y O'Halloran, 2008; Waldron y Robinson, 2009). Para resolver esta controversia tanto CorE como CorE2 han sido expresadas en ausencia y presencia de varios metales y se ha determinado la cantidad de átomos de metal que unen las proteínas producidas en las diferentes condiciones de cultivo.

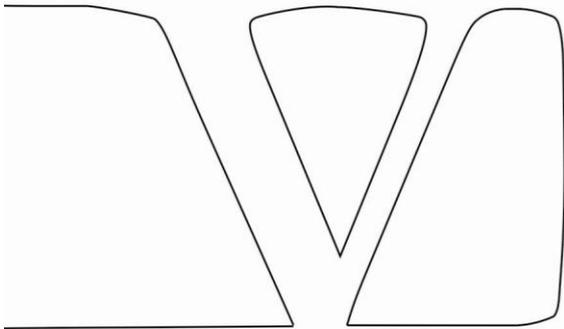
Los resultados obtenidos han revelado que cuando CorE se produce en ausencia del metal, es decir, cuando este factor sigma se encuentra en estado inactivo (Gómez-Santos *et al.*, 2011), aunque aparecen proteínas que unen de uno a cuatro átomos de zinc, mayoritariamente aparecen unidas a un único átomo de zinc (**Figura 4.62**). La unión de un átomo de zinc en estado inactivo es habitual en el caso de muchas metaloproteínas, las cuales requieren coordinar un átomo de este metal para conseguir un correcto plegamiento (Berg y Shi, 1996; Bofill *et al.*, 2001; Namuswe y Berg, 2012). Ya que la adición de zinc al

medio activa CorE (Gómez-Santos *et al.*, 2011), cuando este factor sigma es producido en presencia de zinc se observa que mayoritariamente son dos átomos de metal, en lugar de uno, el que aparece unido a la proteína. Además, se observa que la unión de un mayor número de átomos de zinc provoca una reestructuración de las hélices alfa de la proteína (Figura 4.63). Esta reestructuración probablemente sea la responsable de la activación del factor sigma. Estos resultados sugieren que la forma inactiva de CorE se origina unida a un átomo de zinc, y la activa cuando está unida a dos. Algo similar se observa cuando la proteína es producida en presencia de cadmio, otro metal que activa a CorE. En este caso la proteína se obtiene mayoritariamente unida a tres átomos de cadmio. Además, también se observa que la unión a este metal también provoca una estructuración de las hélices alfa (Figura 4.64). Como ya se ha mencionado en repetidas ocasiones, Cu^{2+} es el metal que provoca una mayor activación de CorE. Los resultados obtenidos cuando CorE es producido en presencia de cobre demuestran que en este caso se unen mayoritariamente cuatro átomos de metal por proteína. Además, se observa un cambio conformacional en las hélices alfa en presencia de este metal mayor que el provocado por los otros dos metales activadores (Figura 4.65). Sin embargo, teniendo en cuenta que esta metodología no permite diferenciar entre las dos formas de cobre, Cu^{2+} y Cu^+ , y que mientras que el primero activa la proteína, el segundo la inactiva, es posible que los resultados que aparecen sea una mezcla de proteína activa e inactiva, sin que conozcamos la proporción que existe realmente de cada una de ellas. No obstante, esta fuerte reestructuración de las hélices alfa sugiere que sea provocada por el cambio del factor sigma de su forma inactiva a la activa.

En cuanto a CorE2, la proteína no resultó ser estable al producirla en *E. coli*, apareciendo fraccionada por la secuencia consenso QARTIRIP descrita previamente para otros factores sigma (Campbell *et al.*, 2002). Sin embargo, ya que varios de los fragmentos conservan tanto el dominio CxC como el CRD se ha podido analizar la capacidad de unión a metales de los mismos. Cuando la proteína era producida en ausencia de metales se obtuvo una pequeña proporción de proteína unida a un átomo de zinc, y una mayoría sin unir a metales (Figura 4.66), lo que sugiere que en este caso la presencia del zinc estructural no es tan importante como para el caso de CorE. Al añadir cobre al medio, un metal que no activa la proteína, se obtuvieron resultados similares, una porción minoritaria unida a metal, y una mayoritaria de proteína sin unir a metales (Figura 4.69). Por el contrario, al producir la proteína en presencia de

zinc, el cual es un metal activador, se obtuvo que una mayoría de la proteína aparecía unida a tres átomos de zinc (Figura 4.67). Además, se observaba una elevada proporción de hélices alfa, lo que confirmaría que la proteína unida a este metal es estable, lo que probablemente contribuya a provocar la activación del regulador. Por último, cuando CorE2 es producida en presencia de cadmio, que es el metal que provoca la mayor activación del factor sigma, se observa una fuerte reestructuración de las hélices alfa, similar a la que se obtenía cuando CorE era producido con cobre, lo que confirmaría que es esta reestructuración de las hélices alfa es la responsable de que la proteína cambie del estado inactivo al activo. Además, la mayoría de CorE2 aparece unido a tres átomos de cadmio, al igual que sucedía con CorE cuando era producido con este metal (Figura 4.67).

El trabajo llevado a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral ha permitido caracterizar en profundidad el segundo miembro de los factores sigma de tipo ECF44, CorE2, el cual es activado por cadmio. Además, el realizar un estudio comparativo entre los dos factores sigma de este grupo presentes en el genoma de *M. xanthus*, CorE y CorE2, ha permitido ampliar los conocimientos que se tenían sobre el mecanismo de acción de estos factores sigma, determinar las regiones que son esenciales para su funcionamiento y las secuencias del promotor que reconocen. Asimismo, se ha logrado cambiar la especificidad de una proteína por el metal que la activa, modificando tan solo uno de sus aminoácidos, lo que aporta información novedosa sobre cómo las metaloproteínas reconocen su metal específico. Un estudio sobre otros tipos de factores sigma de tipo CorE en otras bacterias sin duda ayudará profundizar en el conocimiento que se tiene sobre estos reguladores dependientes de metales y de las metaloproteínas en general.

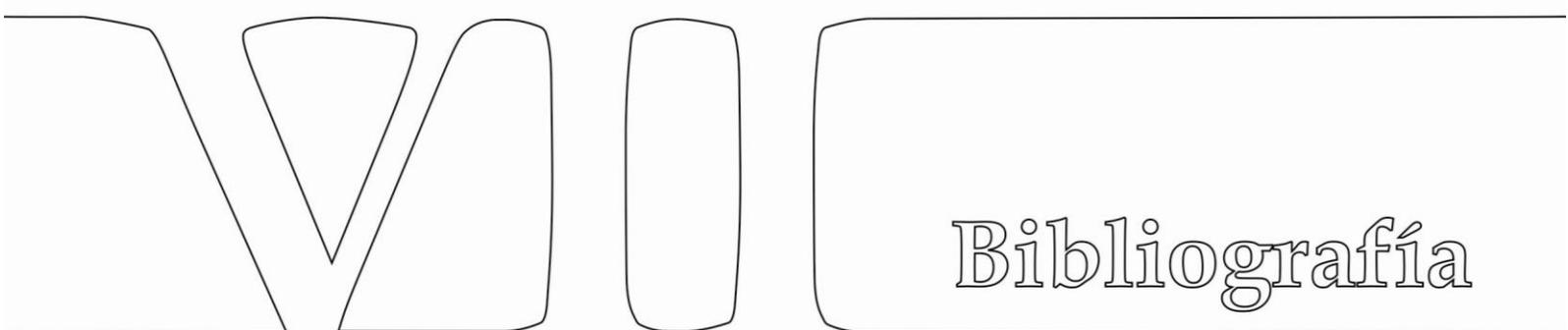


Conclusiones

VI. Conclusiones

1. La búsqueda bioinformática de factores sigma del grupo ECF44 en los genomas depositados en las bases de datos ha permitido la identificación de 67 reguladores de este tipo, la mayoría de los cuales se localizan en un ambiente genético en el que abundan los genes de resistencia a metales.
2. El gen *corE2* de *M. xanthus*, correspondiente al locus *MXAN_5263*, se localiza en el genoma junto a otros tres genes. El gen *MXAN_5262* codifica una lipoproteína de función desconocida, el gen *MXAN_5264*, una proteína de eflujo de cationes, y el gen *MXAN_5265*, una proteína cuya porción N-terminal se asemeja a la región catalítica de la enzima glioxal oxidasa.
3. El análisis de la expresión de los genes de esta región ha revelado que los cuatro se inducen durante el ciclo de desarrollo. Además, los genes *MXAN_5264* y *MXAN_5265* forman un operón inducible por cadmio y zinc. La expresión dependiente de metales de estos dos genes está regulada por CorE2.
4. CorE2 es importante para una completa resistencia al cadmio y al zinc durante ambas fases del ciclo de vida de *M. xanthus*. Además, parece jugar un papel importante durante el ciclo de desarrollo en ausencia de metales.
5. CorE2, a diferencia de la mayoría de los factores sigma de tipo ECF, no regula su propia expresión.
6. La lipoproteína codificada por el gen *MXAN_5262* no funciona como el factor antisigma de CorE2.
7. El dominio CRD es también esencial para la actividad de CorE2. Además, las mutaciones puntuales realizadas en diferentes residuos del CRD de CorE2 han demostrado que las cisteínas 169 y 178 son las más importantes para la activación de este factor sigma.
8. El cambio de la cisteína 174 de CorE2 por una alanina hace que en este factor sigma se altere la especificidad por el metal de cadmio a cobre.

9. Los factores sigma de tipo CorE poseen un motivo CxC entre los dominios σ_2 y σ_4 que es esencial para su actividad.
10. Los factores sigma de tipo CorE unen metales, y la unión del metal activador provoca un cambio estructural en la proteína que debe ser el responsable de su activación.



Bibliografía

VII. Bibliografía

- Abellón-Ruiz, J., Bernal-Bernal, D., Abellán, M., Fontes, M., Padmanabhan, S., Murillo, F.J. y Elías-Arnanz, M. (2014) The CarD/CarG regulatory complex is required for the action of several members of the large set of *Myxococcus xanthus* extracytoplasmic function s factors. *Environ Microbiol* 16: 2475-2490.
- Adams, J., Kelso, R. y Cooley, L. (2000) The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 10: 17-24.
- Anton, A., Große, C., Reißmann, J., Pribyl, T. y Nies, D.H. (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 181: 6876-6881.
- Apelian, D. e Inouye, S. (1990) Development-specific σ -factor essential for late-stage differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* 4: 1396-1403.
- Argüello, J.M., Eren, E. y González-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals* 20: 233-248.
- Argüello, J.M., Raimunda, D. y González-Guerrero, M. (2012) Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry. *J Biol Chem* 287: 13510-13517.
- Argüello, J.M., Raimunda, D. y Padilla-Benavides, T. (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 73.
- Ariizumi, T. y Toriyama, K. (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* 62: 437-460.
- Avalos, J. y Limón, M.C. (2014) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr Genet* 61: 309-324.
- Beebe, J.M. (1941) The morphology and cytology of *Myxococcus xanthus*, N. SP. *J Bacteriol* 42: 193-223.

- Bendtsen, J.D., Kiemer, L., Fausbøll A. y Brunak S. (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* 5: 58.
- Berleman, J.E., Chumley, T., Cheung, P. y Kirby, J.R. (2006) Rippling is a predatory behavior in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 188: 5888-5895.
- Berleman, J.E. y Kirby, J.R. (2009) Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol Rev* 33: 942-957.
- Bertin, G. y Averbeck, D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88: 1549-1559.
- Bhat, S., Zhu, X., Patel, R.P., Orlando, R. y Shimkets, L.J. (2011) Identification and localization of *Myxococcus xanthus* porins and lipoproteins. *PLoS ONE* 6: e27475.
- Blindauer, C.A. (2011) Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J Biol Inorg Chem* 16: 1011-1024.
- Bofill, R., Capdevila, M., Cols, N., Atrian, S. y González-Duarte, P. (2011) Zinc(II) is required for the in vivo and in vitro folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J Biol Inorg Chem* 6: 405-417.
- Bondarczuk, K. y Piotrowska-Seget, Z. (2013) Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol Toxicol* 29: 397-405.
- Bose, D., Pape, T., Burrows, P.C., Rappas, M., Wigneshweraraj, S.R., Buck, M. y Zhang X. (2008) Organization of an activator-bound RNA polymerase holoenzyme. *Mol Cell* 32: 337-346.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brinkhoff, T., Fischer, D., Vollmers, J., Voget, S., Beardsley, C., Thole, S., Musmann, M., Kunze, B., Wagner-Döbler, I., Daniel, R. y Simon, M. (2012) Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine myxobacteria. *ISME J* 6: 1260-1272.

- Brooks, B.E. y Buchanan, S.K. (2008) Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1930-1945.
- Brown, K.L. y Hughes, K.T. (1995) The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol Microbiol* 16: 397-404.
- Burrows, P.C., Severinov, K., Buck, M. y Wigneshweraraj, S.R. (2004) Reorganisation of an RNA polymerase-promoter DNA complex for DNA melting. *EMBO J* 23: 4253-4263.
- Bush, M. y Dixon, R. (2012) The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 497-529.
- Campagne, S., Dambergerb, F.F., Kaczmarczyka, A., Francez-Charlota, A., Allainb, F.H.T. y Vorholt, J.A. (2012) Structural basis for sigma factor mimicry in the general stress response of Alphaproteobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E1405-E1414.
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L. y Darst, S.A. (2002) Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9: 527-539.
- Cannon, W., Claverie-Martin, F., Austin, S. y Buck, M. (1994) Identification of a DNA-contacting surface in the transcription factor sigma-54. *Mol Microbiol* 11: 227-236.
- Capdevila, M., Cols, N., Romero-Isart, N., González-Duarte, R., Atrian, S. y González-Duarte, P. (1997) Recombinant synthesis of mouse Zn3-beta and Zn4-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cell Mol Life Sci* 53: 681-688.
- Chaba, R., Albab, B.M., Guob, M.S., Sohnc, J., Ahujaa, N., Sauerc, R.T. y Gross, C.A. (2011) Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2106-2111.
- Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A. y Gross, C.A. (2007) Design principles of the proteolytic cascade governing the σ^E -mediated envelope

- stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev* 21: 124-136.
- Chao, Y. y Fu, D. (2004) Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YjiP. *J Biol Chem* 279: 17173-17180.
- Chen, C.M., Hao, X.F., Chen, G.J., Cao, B.H., Chen, Q.H., Liu, S.Q. y Lei, J.J. (2012) Characterization of a new male sterility-related gene Camf1 in *Capsicum annum* L. *Mol Biol Rep* 39: 737-744.
- Cheng, C.Y., Shieh, S.Y., Hsu, C.C. y Yang, M.T. (2008) Characterization and transcriptional analysis of an ECF sigma factor from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS Microbiol Lett* 289: 250-257.
- Chiancone, E. y Ceci, P. (2010) The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim Biophys Acta* 1800: 798-805.
- Cho, K. y Zusman, D.R. (1999) AsgD, a new two-component regulator required for A signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 34: 268-281.
- Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Søgaard-Andersen, L. y van Wezel, G.P. (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol* 12: 115-124.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., y Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25: 147-150.
- Cortes, L., Wedd, A.G. y Xiao, Z. (2015) The functional roles of the three copper sites associated with the methionine-rich insert in the multicopper oxidase CueO from *E. coli*. *Metallomics* 7: 776-785.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. y Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188-1190.
- Davis, A.V. y O'Halloran, T.V. (2008) A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol* 4: 148-151.
- Dawid, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* 24: 403-427.

- Dittmer, N.T. y Kanost, M.R. (2010) Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 179-188.
- Dufour, Y.S., Landick, R. y Donohue, T.J. (2008) Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress. *J Mol Biol* 383: 713-730.
- Dupuy, B. y Matamouros, S. (2006) Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in *Clostridium* species by a new subgroup of RNA polymerase σ -factors. *Res Microbiol* 157: 201-205.
- Dworkin, J. (2015) Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 24: 47-52.
- Dworkin, J., Jovanovic, G. y Model, P. (1997) Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF. *J Mol Biol* 273: 377-388.
- Dziewanowska, K., Settles, M., Hunter, S., Linguist, I., Schilkey, F. y Hartzell, P. L. (2014). Phase variation in *Myxococcus xanthus* yields cells specialized for iron sequestration. *PLoS One* 9: e95189.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G. y Nies, D.H. (2005) Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 2297-2307.
- Elías-Arnanz, M., Fontes, M. y Padmanabhan, S. (2008) Carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: a complex regulatory network. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Whitworth D.E. (Ed.) ASM Press 2008; 211-225.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S. y Murillo, F.J. (2011) Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14: 128-135.
- El-Samad, H., Kurata, H., Doyle, J.C., Gross, C.A. y Khammash, M. (2005) Surviving heat shock: Control strategies for robustness and performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2736-2741.
- Espart, A., Marín, M., Gil-Moreno, S., Palacios, Ò., Amaro, F., Martín-González, A., Gutiérrez, J.C., Capdevila, M. y Atrian, S. (2015) Hints for metal-preference protein sequence determinants: different metal binding features

- of the five tetrahymena thermophila metallothioneins. *Int J Biol Sci* 11: 456-471.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J. y Punta, M. (2013) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42: D222-D230.
- Fleta-Soriano, E., Martinez, J.P., Hinkelmann, B., Gerth, K., Washausen, P., Diez, J., Frank, R., Sasse, F. y Meyerhans, A. (2014) The myxobacterial metabolite ratjadone A inhibits HIV infection by blocking the Rev/CRM1-mediated nuclear export pathway. *Microb Cell Fact* 13: 17-26.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M. y Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Foreman, R., Fiebig, A. y Crosson, S. (2012) The LovK-LovR two-component system is a regulator of the general stress pathway in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 194: 3038-3049.
- Frausto da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P. (1991) *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Oxford University Press, New York, NY.
- Fujii, T., Gramajo, H.C., Takano, E. y Bibb M.J. (1996) *redD* and *actII-ORF4*, pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed in vitro by an RNA polymerase holoenzyme containing σ^{hrdD} . *J Bacteriol* 178: 3402-3405.
- Galbis-Martínez, M., Padmanabhan, S., Murillo, F.J. y Elías-Arnanz, M. (2012) CarF mediates signaling by singlet oxygen, generated via photoexcited protoporphyrin IX, in *Myxococcus xanthus* light-induced carotenogenesis. *J Bacteriol* 194: 1427-1436.
- Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.S., Schirra, C., Bujard, H. y Bukau, B. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J* 15: 607-617.

- García-Bravo, E. (2015) Estudio sobre genes parálogos que codifican proteínas quinasa de tipo eucariota en *Myxococcus xanthus*. Tesis Doctoral. Editorial de la Universidad de Granada. Granada.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. y Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En: *The Proteomics Protocols Handbook*. Walker, J.M. (ed.) Humana Press; 571-607.
- Gene Ontology Consortium (2015) Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 43: D1049-D1056.
- Ghosh, T., Bose, D. y Zhang, X. (2010) Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol Rev* 34: 611-627.
- Gode, F. y Pehlivan, E. (2007) Sorption of Cr(III) onto chelating b-DAEG-sporopollenin and CEP-sporopollenin resins. *Bioresour Technol* 98: 904-911.
- Gómez-Ojeda, A., Corrales-Escobosa, A.R., Wrobel, K., Yanez-Barrientos, E. y Wrobel, K. (2013) Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in *Lepidium sativum*. *Metallomics* 5: 1254-1261.
- Gómez-Santos, N. (2009) Análisis de la respuesta al cobre en *Myxococcus xanthus* mediada por CuoB y CuoC. Caracterización del factor sigma de tipo ECF CorE. Tesis Doctoral. Editorial de la Universidad de Granada. Granada.
- Gómez-Santos, N., Pérez, J., Sánchez-Sutil, M.C., Moraleda-Muñoz, A. y Muñoz-Dorado, J. (2011) CorE from *Myxococcus xanthus* is a copper-dependent RNA polymerase sigma factor. *PLoS Genet* 7: e1002106.
- Gómez-Santos, N., Treuner-Lange, A., Moraleda-Muñoz, A., García-Bravo, E., García-Hernández, R., Martínez-Cayuela, 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*. *Appl Environ Microbiol* 78: 2515-2521.
- Goswami, D., Kaur, J., Surade, S., Grell, E. y Michel, H. (2012) Heterologous production and functional and thermodynamic characterization of cation diffusion facilitator (CDF) transporters of mesophilic and hyperthermophilic origin. *Biol Chem* 393: 617-629.

- Grosse, C., Anton, A., Hoffmann, T., Franke, S., Schleuder, G. y Nies, D.H. (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch Microbiol* 182: 109-118.
- Gruber, T.M. y Bryant, D.A. (1996) Molecular systematic studies of eubacteria, using σ^{70} -type sigma factors of group 1 and group 2. *J Bacteriol* 179: 1734-1747.
- Gruber, T.M. y Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57: 441-66.
- Gubbuk, I.H. (2011) Isotherms and thermodynamics for the sorption of heavy metal ions onto functionalized sporopollenin. *J Hazard Mater* 186: 416-242.
- Guffanti, A.A., Wei, Y., Rood, S.V. y Krulwich T.A. (2002) An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K^+ and H^+ . *Mol Microbiol* 45: 145-153.
- Guo D., Wu Y. y Kaplan H.B. (2000) Identification and characterization of genes required for early *Myxococcus xanthus* developmental gene expression. *J Bacteriol* 182: 4564-4571.
- Gupta, S., Chai, J., Cheng, J., D'Mello, R., Chance, M.R. y Fu, D. (2014) Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport. *Nature* 512: 101-104.
- Hagen, D.C., Bretscher, A.P. y Kaiser, D. (1978) Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* 64: 284-296.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harris, B.Z., Kaiser, D. y Singer, M. (1998) The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* 12: 1022-1035.
- Haugen, S.P., Ross, W., Manrique, M. y Gourse R.L. (2008) Fine structure of the promoter-s region 1.2 interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3292-3297.
- Hecker, M., Schumann, W. y Völker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19: 417-428.

- Helmann, J.D. (1991) Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol* 5: 2875-2882.
- Helmann, J.D. (2002) The Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factors. *Adv Microb Physiol* 46: 47-110.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 373-395.
- Herroua, J., Rotskoffa, G., Luo, Y., Rouxa, B. y Crosson, S. (2012) Structural basis of a protein partner switch that regulates the general stress response of α -proteobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E1415-E1423.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. y Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Ho, T.D. y Ellermeier, C.D. (2012) Extra cytoplasmic function σ factor activation. *Curr Opin Microbiol* 15: 182-188.
- Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2938-2942.
- de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P. y Vitkup, D. (2010) Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol* 20: R735-R745.
- Hutchings, M.I., Hong, H.J., Leibovitz, E., Sutcliffe, I.C. y Buttner, M.J. (2006) The σ^E cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *J Bacteriol* 188: 7222-7229.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, J.W. y Yamanaka, S. (2003) *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 189-195.
- Inouye, S., Hsu, M.Y., Eagle, S. e Inouye, M. (1989) Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell* 56: 709-717.

- Inouye, S., Nariya, H. y Muñoz-Dorado, J. (2008) Protein Ser/Thr kinases and phosphatases in *Myxococcus xanthus*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Whitworth D.E. (Ed.) ASM Press; 191-210.
- Jirakulaporn, T. y Muslin, A.J. (2004) Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. *J Biol Chem* 279: 27807-27815.
- Jogler, C., Waldmann, J., Huang, X., Jogler, M., Glöckner, F.O., Mascher, T. y Kolter, R. (2012) Identification of proteins likely to be involved in morphogenesis, cell division, and signal transduction in *Planctomycetes* by comparative genomics. *J Bacteriol* 194: 6419-6430.
- Jost, M., Fernández-Zapata, J., Polanco, M.C., Ortiz-Guerrero, J.M., Chen, P.Y., Kang, G., Padmanabhan, S., Elías-Arnanz, M. y Drennan, C.L. (2015) Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor. *Nature* doi: 10.1038/nature14950.
- Jovanovic, M., Lawton, E., Schumacher, J. y Buck, M. (2014) Interplay among *Pseudomonas syringae* HrpR, HrpS and HrpV proteins for regulation of the type III secretion system. *FEMS Microbiol Lett* 356: 201-211.
- Julien, B., Kaiser, A.D. y Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9098-9103.
- Juncker, A.S., Willenbrock, H., von Heijne, G., Nielsen, H., Brunak, S. y Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12: 1652-1662.
- Jung, K., Fried, L., Behr, S. y Heermann, R. (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol* 15: 118-124.
- Jung, Y.G., Cho, Y.B., Kim, M.S., Yoo, J.S., Hong, S.H. y Roe, J.H. (2011) Determinants of redox sensitivity in RsrA, a zinc-containing anti-sigma factor for regulating thiol oxidative stress response. *Nucleic Acids Res* 39: 7586-7597.
- Kalapos, M.P. (1999) Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 110: 145-175.

- 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 Res* 42: D199-D205.
- Kashefi, K. y Hartzell, P.L. (1995) Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF* defect. *Mol Microbiol* 15: 483-494.
- Kersten, P. y Cullen, D. (2014) Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decay *Agaricomycetes*. *Fungal Genet Biol* 72: 124-130.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 169: 2195-2201.
- Keseler, I.M. y Kaiser, D. (1997) σ^{54} , a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1979-1984.
- Kirazov, L.P., Venkiv, L.G. y Kirazov, E.P. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation. *Anal Biochem* 208: 44-48.
- Konstantinidis, K.T. y Tiedje, J.M. (2004) Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3160-3165.
- Koo, B., Rhodius, V.A. Campbell, E.A. y Gross, C.A. (2009) Mutational analysis of *Escherichia coli* σ^{28} and its target promoters reveals recognition of a composite -10 region, comprised of an 'extended -10' motif and a core -10 element. *Mol Microbiol* 72: 830-843.
- Koo, B., Rhodius, V.A., Campbell, E.A. y Gross C.A. (2009) Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ^{32} suggests a composite -10 region with an 'extended -10' motif and a core -10 element. *Mol Microbiol* 72: 815-829.
- Kroos, L. e Inouye, S. (2008) Transcriptional regulatory mechanisms during *Myxococcus xanthus* development. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Whitworth D.E. (Ed.) ASM Press; 149-168.
- Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1986) A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* 117: 252-266.

- Kroos, L., Piggot, P.J. y Moran, C.P. Jr. (2008) *Bacillus subtilis* sporulation and other multicellular behaviors En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Whitworth D.E. (Ed.) ASM Press; 363-383.
- Kumar, A., Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A. y Hayward, R.S. (1993) The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* Sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol* 232: 406-418.
- Kutta, R.J., Hardman, S.J., Johannissen, L.O., Bellina, B., Messiha, H.L., Ortiz-Guerrero, J.M., Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., Barran, P., Scrutton, N.S. y Jones, A.R. (2015) The photochemical mechanism of a B12-dependent photoreceptor protein. *Nat Commun* doi:10.1038/ncomms8907.
- Lane, W.J. y Darst, S.A. (2006) The structural basis for promoter -35 element recognition by the group IV sigma factors. *PLoS Biol* 4:e269.
- Lee, B., Holkenbrink, C., Treuner-Lange, A. y Higgs, P.I. (2012a) *Myxococcus xanthus* developmental cell fate production: heterogeneous accumulation of developmental regulatory proteins and reexamination of the role of MazF in developmental lysis. *J Bacteriol* 194: 3058-3068.
- Lee, D.J., Minchin, S.D. y Busby S.J.W. (2012b) Activating Transcription in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 66: 125-52.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C. y Nies, D.H. (2003) Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol* 185: 4354-4361.
- Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Müller, O., Müller, P., Kahmann, R., Bölker, M. y Schreier, P.H. (2005) A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 272: 639-650.
- Link, H.F. (1809) Observations in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos. Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde 3, 3-42+2 plates (in Latin; on *Polyangium*: p. 42 and Fig. 65).

- Lonetto, M., Gribskov, M. y Gross, C.A. (1992) The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174: 3843-3849.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E. y Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase σ factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7573-7577.
- Lu, M., Chai, J. y Fu, D. (2009) structural basis for auto-regulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1063-1067.
- Lu, M. y Fu, D. (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* 317: 1746-1748.
- Maillard, A.P., Künnemann, S., Große, C., Volbeda, A., Schleuder, G., Petit-Härtlein, I., de Rosny, E., Nies, D.E. y Covès, J. (2015) Response of CnrX from *Cupriavidus metallidurans* CH34 to nickel binding. *Metallomics* 7: 622-631.
- Manini, P., La Pietra, P., Panzella, L., Napolitano, A. y d'Ischia, M. (2006) Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds. *Carbohydr Res* 341: 1828-1833.
- Martins, A.M., Cordeiro, C.A. y Ponces-Freire, A.M. (2001) In situ analysis of glyoxalase I and glyoxalase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 499: 41-44.
- Mascher, T. (2013) Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) σ factors. *Curr Opin Microbiol* 16:148-155.
- Masloboeva, N., Reutimann, L., Stiefel, P., Follador, R., Leimer, N., Hennecke, H., Mesa, S. y Fischer H.M. (2012) Reactive oxygen species-inducible ECF σ factors of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 7: e43421.
- McKenney, P.T., Driks, A. y Eichenberger, P. (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol* 11: 33-44.
- Meinzel, T., Mechulam, Y. y Blanquet, S. (1993) Methionine as translation start signal: A review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie* 75: 1061-1075.

- Merrick, M.J. (1993) In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol Microbiol* 10: 903-909.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Missiakas, D. y Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 28: 1059-1066.
- Mitchell, A., Chang, H.Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamain, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T.K., Sigrist, C.J.A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D.A., Wu, C.H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P.D. y Finn R.D. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* 43: D213-D221.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. y van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300-309.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S. y Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 50: 1683-1701.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. y Chalot, M. (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8:107.
- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Extremera, A.L. y Muñoz-Dorado, J. (2010a) Differential regulation of six heavy metal efflux systems in the response of *Myxococcus xanthus* to copper. *Appl Environ Microbiol* 76: 6069-6076.
- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Extremera, A.L. y Muñoz-Dorado, J. (2010b) Expression and physiological role of three *Myxococcus xanthus* copper-dependent P1B-type ATPases during bacterial growth and development. *Appl Environ Microbiol* 76: 6077-6084.

- Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F.J. y Muñoz-Dorado, J. (2005) Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 56: 1159-1168.
- Morrison, C.E. y Zusman, D.R. (1979) *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive stage-specific defects: evidence for independent pathways in development. *J Bacteriol* 155: 317-329.
- Moulis, J.M. (2010) Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals* 23: 877-896.
- 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: 63-67.
- Muñoz-Dorado, J., Higgs, P.I. y Elías-Arnanz, M. (2014) Abundance and complexity of signalling mechanisms in myxobacteria. En: *Myxobacteria: genomics, cellular and molecular biology*. Yang, Z. y Higgs, P.I. (Eds.) Caister Academic Press; 127-150.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. e Inouye, M. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* 67: 995-1006.
- Namuswe, F. y Berg, J.M. (2012) Secondary interactions involving zinc-bound ligands: roles in structural stabilization and macromolecular interactions. *J Inorg Biochem* 111: 146-149.
- Napolitano, M., Rubio, M.A., Santamaría-Gómez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N.J. y Luque, I. (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 194: 2426-2436.
- Nariya, H. e Inouye, M. (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 132: 55-66.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E. y Aguirre, J. (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29: 352-359.

- Nies, D.H. (1992) CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 174: 8102-8110.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 313-339.
- Nies, D.H. (2012) Zinc starvation response in a cyanobacterium revealed. *J Bacteriol* 194: 2407-2412.
- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L. y Silver, S. (1989) Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7351-7355.
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1991) Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 173: 3342-3355.
- Okamoto, R., Takegawa, K. y Kimura, Y. (2014) Regulation of eukaryotic-like protein kinase activity of DspA from *Myxococcus xanthus* by autophosphorylation. *J Biochem* 155: 99-106.
- Ortiz-Guerrero, J.M., Polanco, M.C., Murillo, F.J., Padmanabhan, S. y Elías-Arnanz M. (2011) Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7565-7570.
- Österberg, S., del Peso-Santos, T. y Shingler, V. (2011) Regulation of alternative sigma factor use. *Annu Rev Microbiol* 65: 37-55.
- Otani, M., Inouye, M. e Inouye, S. (1995) Germination of myxospores from the fruiting bodies of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 177: 4261-4265.
- Parandhaman, D.K., Sharma, P., Bisht, D. y Narayanan, S. (2014) Proteome and phosphoproteome analysis of the serine/threonine protein kinase E mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Life Sci* 109: 116-126.
- Paulsen, C.E. y Carroll, K.S. (2009) Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem Biol* 16: 217-225.
- Pellegrini, O., Mathy, N., Gogos, A., Shapiro, L y Condon, C. (2005) The *Bacillus subtilis ydcDE* operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. *Mol Microbiol* 56: 1139-1148.

- Pereira, S.F., Goss, L. y Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15950-15955.
- Pérez, J., Jiménez-Zurdo, J.I., Martínez-Abarca, F., Millán, V., Shimkets, L.J. y Muñoz-Dorado, J. (2014) Rhizobial galactoglucan determines the predatory pattern of *Myxococcus xanthus* and protects *Sinorhizobium meliloti* from predation. *Environ Microbiol* 16: 2341-2350.
- Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J. y Muñoz-Dorado, J. (2015) Bacterial predation: 75 years and counting! *Environ Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.13171.
- Peroza, E.A., Kaabi, A.A., Meyer-Klaucke, W., Wellenreuther, G. y Freisinger, E. (2009) The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1. *J Inorg Biochem* 103: 342-353.
- Perry, J., Koteva, K. y Wright, G. (2011) Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol BioSyst* 7: 1388-1398.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P. y Battistoni, A. (2010) The Zur regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J Bacteriol* 192: 1553-1564.
- Rademacher, C. y Masepohl, B. (2012) Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology* 158: 2451-2464.
- Rensing, C., Pribyl, T. y Nies, D.H. (1997) New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* 179: 6871-6879.
- Rhodijs, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J. y Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* 4:e2.

- Robert, X. y Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new END script server. *Nucleic Acids Res* 42: W320-W324.
- Ronning, C.M. y Nierman, W.C. (2008) The genomes of *Myxococcus xanthus* and *Stigmatella aurantiaca*, En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. Whitworth D.E. (Ed.) ASM Press; 285-298.
- Roy, A., Kucukural, A. y Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725-738.
- Rückert, G. (1978) Myxobakterien in Substraten aus ariden Gebieten unter besonderer Berücksichtigung Südwestafrikas. Gesellschaft f. Wissenschaft Entwicklung Museum Swakopmund, Südwestafrika/Namibia. *Namib and Meer* 8: 53-66.
- Rückert, H. y Heym, G. (1977) Bakteriotrophe Myxobakterien (Myxobacterales) in ariden Substraten (Ein Beitrag zur Verbreitung von Myxobakterien am Beispiel mitteltunesischer Proben). *Karlsru Geogr Hefte* 8: 101-111.
- Rudd, K.E. y Zusman, D.R. (1982) RNA polymerase of *Myxococcus xanthus*: purification and selective transcription in vitro with bacteriophage templates. *J Bacteriol* 151: 89-105.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. y Barrel, B. (2000) Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-945.
- Safi, R., Nelson, E.R., Chitneni, S.K., Franz, K.J., George, D.J., Zalutsky, M.R. y McDonnell, D.P. (2014) Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. *Cancer Res* 74: 5819-5931.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Eirlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels, D.J., Frye, J.G., Porwollik, S., McClelland, M., Mrázek, J., Hoover, T.R. y Karls A.C. (2013) Use of a promiscuous, constitutively-active bacterial enhancer-binding protein to define the s⁵⁴ (RpoN) regulon of *Salmonella Typhimurium* LT2. *BMC Genomics* 14: 602-619.

- Sánchez-Sutil, M.C. (2009) Caracterización molecular de la oxidasa multicobre CuoA de *M. xanthus*. Tesis Doctoral. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.
- Sánchez-Sutil, M.C., Gómez-Santos, N., Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J. (2007) Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 189: 4887-4898.
- Sánchez-Sutil, M.C., Pérez, J., Gómez-Santos, N., Shimkets, L.J., Moraleda-Muñoz, A. y Muñoz-Dorado, J. (2013) The *Myxococcus xanthus* two-component system CorSR regulates expression of a gene cluster involved in maintaining copper tolerance during growth and development. *PLoS One* 8: e68240.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulsson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminators inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Schäberle, T.F., Lohr, F., Schmitz, A. y König, G.M. (2014) Antibiotics from myxobacteria. *Nat Prod Rep* 31: 953-972.
- Sharma, U.K. y Chatterji, D. (2006) Both regions 4.1 and 4.2 of *E. coli* *s*⁷⁰ are together required for binding to bacteriophage T4 AsiA in vivo. *Gene* 376: 133-143.
- Shi, Y. y Berg, J.M. (1996) DNA unwinding induced by zinc finger protein binding. *Biochemistry* 35: 3845-3848.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. y Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539.
- Silakowski, B., Ehret, H. y Schairer, H.U. (1998) *fbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J Bacteriol* 180: 1241-1247.
- Singla-Pareek, S.L., Yadav, S.K., Pareek, A., Reddy, M.K. y Sopory, S.K. (2006) Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiol* 140: 613-623.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.

- Sreerama, N. y Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287: 252-260.
- Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H. y Mascher, T. (2009) The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. *Mol Microbiol* 74: 557-581.
- Strausak, D., Mercer, J.F.B., Dieter, H.H., Stremmel, W. y Multhaup, G. (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* 55: 175-185.
- Strohl, W.R., Larkin, J.M., Good, B.H. y Chapman, R.L. (1977) Isolation of sporopollenin from four myxobacteria. *Can J Microbiol* 23: 1080-1083.
- Suzuki, H., Rodriguez-Urbe, L., Xu, J. y Zhang, J. (2013) Transcriptome analysis of cytoplasmic male sterility and restoration in CMS-D8 cotton. *Plant Cell Rep* 32: 1531-1542.
- Tanaka, S.Y., Narita, S. y Tokuda, H. (2007) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. *J Biol Chem* 282: 13379-13384.
- Taylor, M., Butler, R., Chambers, S., Casimiro, M., Badii, F. y Merrick, M. (1996) The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor σ^N plays a role in promoter recognition. *Mol Microbiol* 22: 1045-1054.
- Taylor, J.S. y Raes, J. (2004) Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet* 38: 615-643.
- Thaxter, R. (1892) On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot Gaz* 17: 389-406.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. y Minhas, H.S. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344: 109-116.
- Toledo, I., Rangel, P. y Hansberg, W. (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch Biochem Biophys* 319: 519-524.

- Trepreau, J., Girard, E., Maillard, A.P., de Rosny, E., Petit-Haertlein, I., Kahn, R. y Covès, J. (2011) Structural basis for metal sensing by CnrX. *J Mol Biol* 408: 766-779.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A. y Saier, M.H. Jr. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 107-125.
- Typas, A. y Hengge, R. (2006) Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ^s promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59: 1037-1051.
- Ueki, T. e Inouye, S. (1998) A new sigma factor, SigD, essential for stationary phase is also required for multicellular differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Genes Cells* 3: 371-385.
- Ueki, T. e Inouye, S. (2001) SigB, SigC, and SigE from *Myxococcus xanthus* homologous to sigma32 are not required for heat shock response but for multicellular differentiation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 287-293.
- Ueki, T., Xu, C.Y. e Inouye, S. (2005) SigF, a new sigma factor required for a motility system of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 187: 8537-8541.
- Ulrich L.E., Koonin, E.V. y Zhulin I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13: 52-56.
- Unlü, N. y Ersoz, M. (2006) Adsorption characteristics of heavy metal ions onto a low cost biopolymeric sorbent from aqueous solutions. *J Hazard Mater* 136: 272-280.
- Velicer, G.J. y Vos, M. (2009). Sociobiology of the myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 599-623.
- Velicer, G.J., Mendes-Soares, H. y Wielgoss, S. (2014) Whence comes Social Diversity? Ecological and Evolutionary Analysis of the Myxobacteria. En: *Myxobacteria: genomics, cellular and molecular biology*. Yang, Z. y Higgs, P.I. (Eds.) Caister Academic Press; 127-150.
- Vila, A.J. y Fernández, C.O. (2001) Copper in electron transfer proteins. En: *Handbook on Metalloproteins*. Bertni, I., Sigel, A., y Sigel, H. (Eds.) CRC Press; 813-855.

- Vinogradov, A.A., Kudryashova, E.V., Levashov, A.V. y van Dongen, W.M. (2003) Solubilization and refolding of inclusion body proteins in reverse micelles. *Anal Biochem* 320: 234-238.
- Viswanathan, P., Singer, M. y Kroos, L. (2006) Role of σ^D in regulating genes and signals during *Myxococcus xanthus* Development. *J Bacteriol* 188: 3246-3256.
- Voloudakis, A.V., Reignier, T.M. y Cooksey, D.A. (2005) Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria. *Appl Environ Microbiol* 71: 782-789.
- Waldron, K.J. y Robinson, N.J. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* 7: 25-35.
- Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D. y Robinson, N.J. (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460: 823-30.
- Wang, Y., Lin, Y.C., So, J., Du, Y. y Lo, C. (2013) Conserved metabolic steps for sporopollenin precursor formation in tobacco and rice. *Physiol Plant* 149: 13-24.
- Ward, M.J., Lew, H., Treuner-Lange, A. y Zusman, D.R. (1998) Regulation of motility behavior in *Myxococcus xanthus* may require an extracytoplasmic-function sigma factor. *J Bacteriol* 180: 5668-5675.
- Wecke, T., Halang, P., Staron, A., Dufour, Y.S., Donohue, T.J. y Mascher, T. (2012) Extracytoplasmic function σ factors of the widely distributed group ECF41 contain a fused regulatory domain. *Microbiologyopen* 1: 194-213.
- Whittaker, M.M. y Whittaker, J.W. (2006) *Streptomyces coelicolor* oxidase (SCO2837p): A new free radical metalloenzyme secreted by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Biochem Biophys* 452: 108-118.
- Whitworth, D.E. (2008) *Myxobacteria. Multicellularity and differentiation*, ASM Press, Washington DC.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K. y Buck, M. (2008) Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ^{54} promoter-specificity factor. *Mol Microbiol* 68: 538-546.

- Wilson, M.J. y Lamont I.L. **(2006)** Mutational analysis of an extracytoplasmic-function sigma factor to investigate its interactions with RNA polymerase and DNA. *J Bacteriol* 188: 1935-1942.
- Wösten, M.M. **(1998)** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* 22: 127-150.
- Yamaguchi, Y. e Inouye, M. **(2011)** Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* 9: 779-790.
- Yang, X., Chiancone, E., Stefanini, S., Ilari, A. y Chasteen, N.D. **(2000)** Iron oxidation and hydrolysis reactions of a novel ferritin from *Listeria innocua*. *Biochem J* 3: 783-786.
- Zhang, B., Georgiev, O., Hagmann, M., Günes, C., Cramer, M., Faller, P., Vasák, M. y Schaffner, W. **(2003)** Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol* 23: 8471-8485.

Apéndice

Apéndice 1

Cepas derivadas de *M. xanthus* DZF1 utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Cepa	Descripción ¹
JM52IF2	Δ 5262, Gal ^R , Kan ^S
JM52IF3	Δ corE2, Gal ^R , Kan ^S
JM52IF4	Δ 5264, Gal ^R , Kan ^S
JM52IF5	Δ 5265, Gal ^R , Kan ^S
JM52IF3DCRD	Δ corE2 _{CRD} , Gal ^R , Kan ^S
JM52ZY2	5262-lacZ, Kan ^R
JM52ZY3	corE2-lacZ, Kan ^R
JM52ZY4	5264-lacZ, Kan ^R
JM52ZY5	5265-lacZ, Kan ^R
JM52IF2ZY5	Δ 5262, 5265-lacZ, Kan ^R
JM52IF3ZY3	Δ corE2, corE2-lacZ, Kan ^R
JM52IF3ZY5	Δ corE2, 5265-lacZ, Kan ^R
JM52IF3DCRDZY5	Δ CorE2 _{CRD} , 5265-lacZ, Kan ^R
JM52SDM00	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2, Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM08	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C108A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM10	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C110A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM69	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C169A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM72	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{AT172} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM73	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C173A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM74	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C174A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM78	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C178A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM80	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{D180A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM81	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C181A} , Kan ^R , Tet ^R
JM52SDM83	Δ corE2, 5265-lacZ, corE2 ^{C183A} , Kan ^R , Tet ^R
JM00BZY	Δ corE, cuoB-lacZ, corE, Kan ^R , Tet ^R
JM51EBZY	Δ corE, cuoB-lacZ, Kan ^R , Tet ^R
JM51SDM85	Δ corE, cuoB-lacZ, corE ^{A185C} , Kan ^R , Tet ^R

¹Gal^R, Kan^R, y Tet^R indican resistencia a la galactosa, kanamicina y tetraciclina, respectivamente. Kan^S indica sensibilidad a la kanamicina.

Apéndice 2

Plásmidos construidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

Plásmido	Características ¹
pBJ113 Δ 5262	Δ 5262, Gal ^S , Kan ^R
pBJ113 Δ 5264	Δ corE2, Gal ^S , Kan ^R
pBJ113 Δ 5265	Δ 5264, Gal ^S , Kan ^R
pBJ113 Δ CorE2 _{CRD}	Δ 5265, Gal ^S , Kan ^R
pBJ113 Δ r2corE2	Δ corE2 _{CRD} , Gal ^S , Kan ^R
pKY481-5262	5262-lacZ, Kan ^R
pKY481-5263	corE2-lacZ, Kan ^R
pKY481-5264	5264-lacZ, Kan ^R
pKY481-5265	5265-lacZ, Kan ^R
pMT00	corE2, Tet ^R
pMT08	corE2 ^{C108A} , Tet ^R
pMT10	corE2 ^{C110A} , Tet ^R
pMT69	corE2 ^{C169A} , Tet ^R
pMT72	corE2 ^{ΔT172} , Tet ^R
pMT73	corE2 ^{C173A} , Tet ^R
pMT74	corE2 ^{C174A} , Tet ^R
pMT78	corE2 ^{C178A} , Tet ^R
pMT80	corE2 ^{D180A} , Tet ^R
pMT81	corE2 ^{C181A} , Tet ^R
pMT83	corE2 ^{C183A} , Tet ^R
pMTCorE85	corE ^{A185C} , Tet ^R
pGEX-CorE	corE-GST, Amp ^R
pGEX-CorE2	corE2-GST, Amp ^R

¹Kan^R, Tet^R y Amp^R indican resistencia a la kanamicina, tetraciclina y ampicilina, respectivamente. Gal^S indica sensibilidad a la galactosa

Apéndice 3

Listado de factores sigma de tipo ECF44:

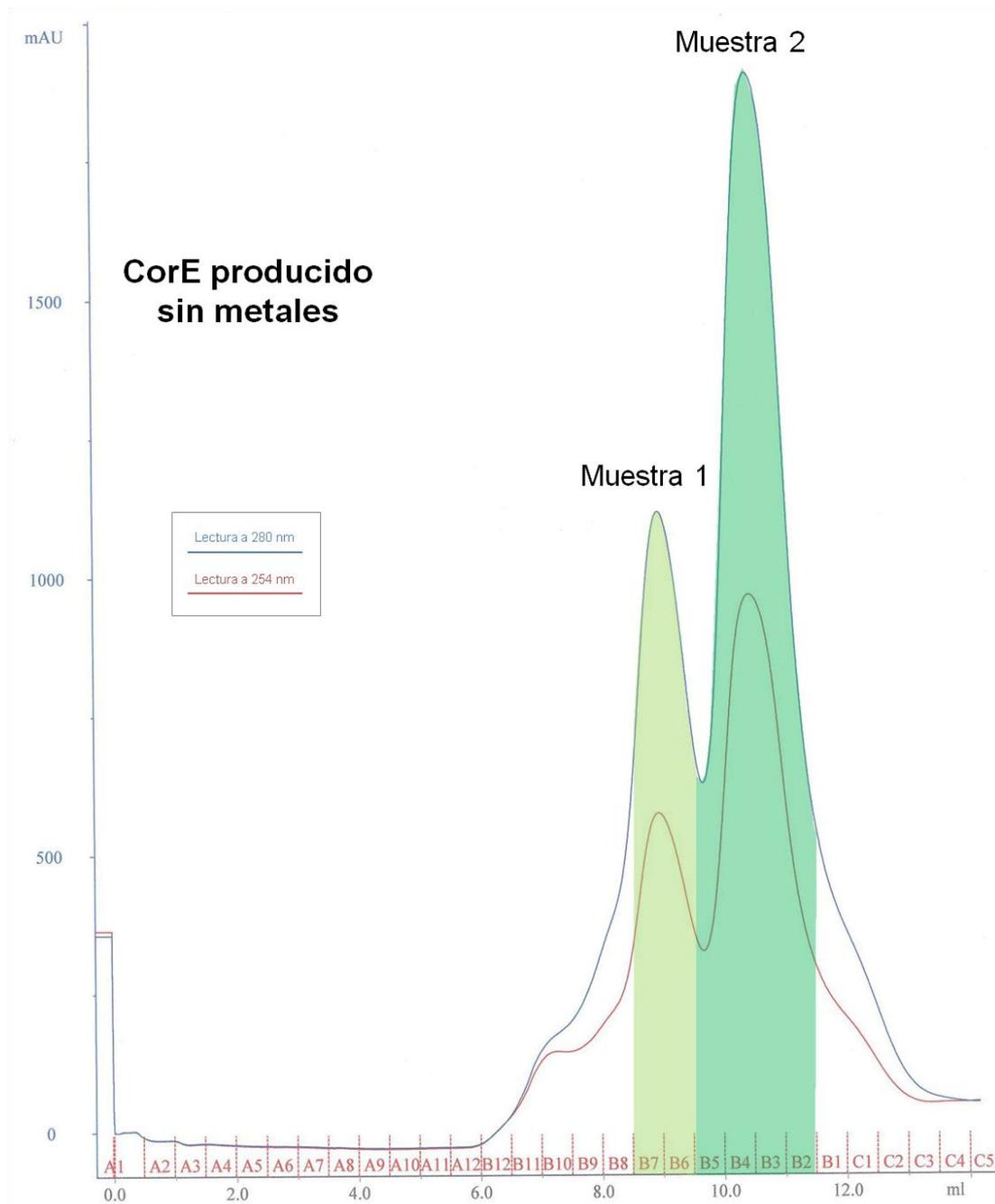
Especie	Identificador del gen	Número de acceso
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	MXAN_3426	WP_011553459
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	MXAN_5263	WP_011555230
<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675	MYSTI_01033	WP_015346645
<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675	MYSTI_07858	WP_044282606
<i>Myxococcus stipitatus</i> DSM 14675	MYSTI_07104	WP_015352630
<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1	LILAB_03820	WP_043712370
<i>Myxococcus</i> sp. (contaminant ex DSM 436)	A176_03329	WP_002635730
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	COCOR_00923	WP_014393774
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	COCOR_04357	WP_014397166
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	Anae109_4099	WP_012098916
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	STAU_6867	WP_037583520
<i>Cystobacter fuscus</i> DSM 2262	D187_000432	WP_043428130
<i>Hyalangium minutum</i> DSM 14724	DB31_3484	WP_044183235
<i>Sorangium cellulosum</i> SO0157-2	SCE1572_31115	WP_044988949
<i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2	SCE1572_48160	WP_020741466
<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	sce8251	WP_012240860
<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	CAP_5638	WP_044246290
<i>Candidatus nitrospira defluvi</i>	NIDE1902	WP_013248452
<i>Turneriella parva</i> DSM 21527	TURPA_2305	WP_014803455
<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM4136	VSP_RS34895	WP_009960598
<i>Opitutus terrae</i> PB90-1	Oter_1731	WP_012374552
<i>Acidobacteriaceae bacterium</i> TAA166	H979_RS30825	WP_043521005
<i>Acidobacteriaceae bacterium</i> TAA166	H979_RS0107950	WP_043520194
<i>Acidobacteria bacterium</i> KBS 146	M015_RS0102205	WP_035176216
<i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC51196	ACP_1212	WP_015896362
<i>Terriglobus saanensis</i> SP1PR4	AciPR4_0777	WP_013567343
<i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8	AciX8_3385	WP_044176947
<i>Granulicella tundricola</i> MP5ACTX9	AciX9_1733	WP_041597573
<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1	PHZ_P0174	WP_012520417
<i>alpha proteobacterium</i> Mf 1.05b.01	SYAP_RS09390	WP_029640098
<i>Afipia</i> sp. P52-10	X566_00415	WP_034462667
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> SEMIA 5080	BJA5080_06986	WP_038967227
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 122	YUE_RS0108200	WP_028171794

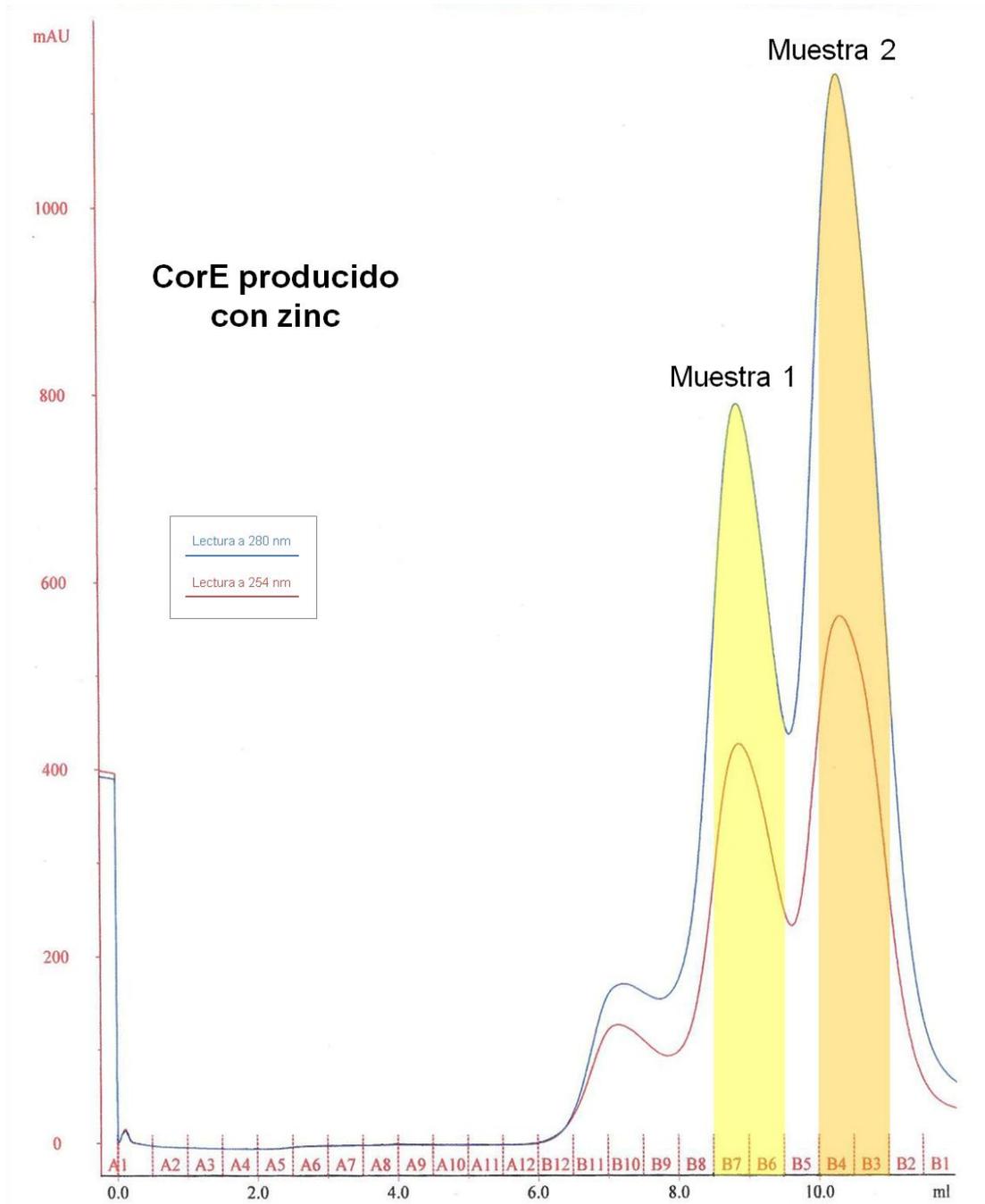
Apéndices

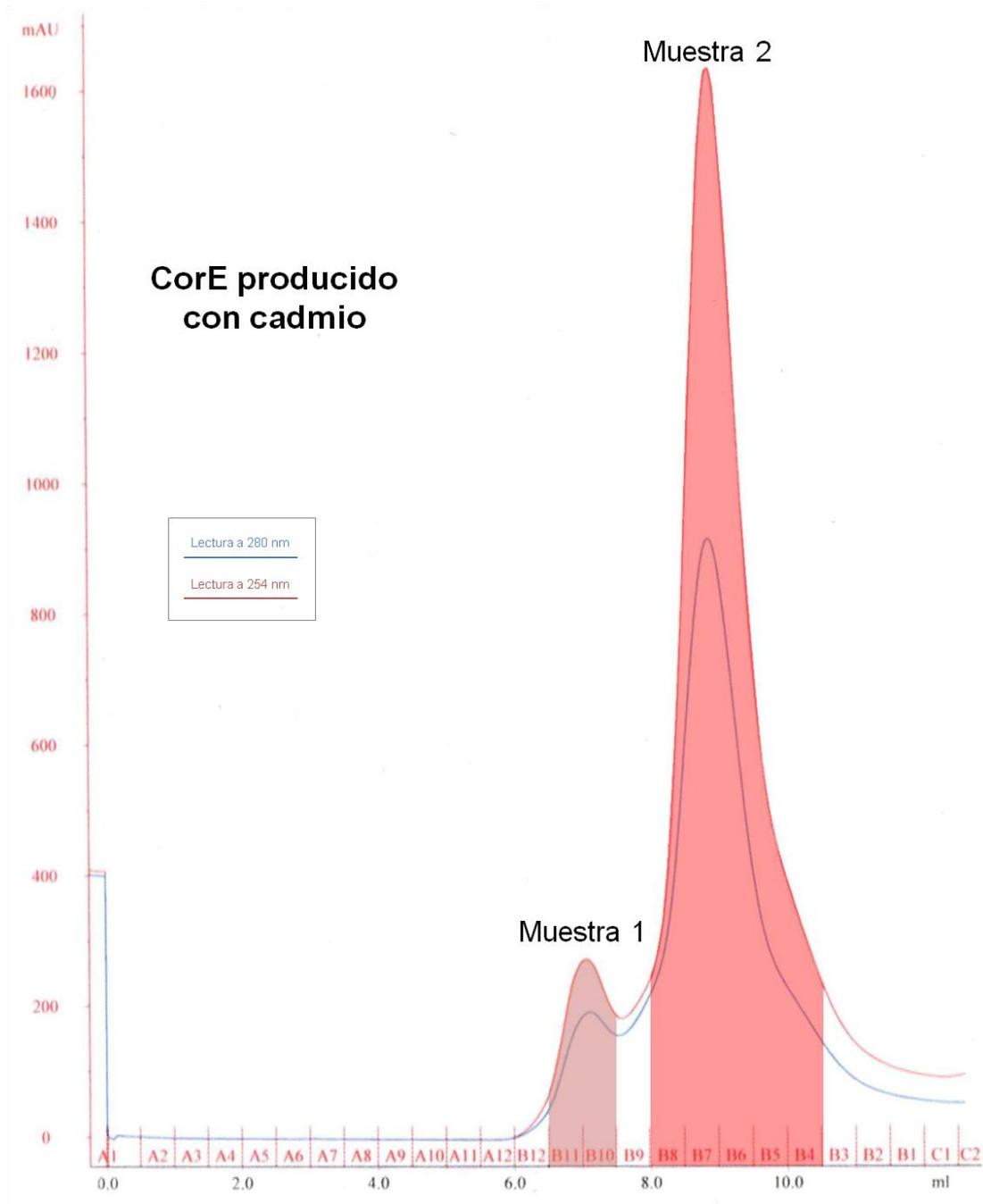
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 22	K410_RS0100190	WP_028132986
<i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	PMI42_04127	WP_035966081
<i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3843	BRAS3843_1470016	WP_008968261
<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	Meso_3863	WP_041545754
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1	Rpal_1094	WP_041810230
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> S2	BN949_05043	WP_035227408
<i>Defluviimonas indica</i> 20V17	U879_05540	WP_035839801
<i>Hyphomonas jannaschiana</i> VP2	HJA_03691	WP_034767304
<i>Hyphomonas oceanitis</i> SCH89	HOC_19861	WP_035541967
<i>Hyphomonas oceanitis</i> SCH89	HOC_19881	WP_035541979
<i>Hyphomonas</i> sp. 22II1-22F38	HY36_16245	WP_035550625
<i>Hyphomonas</i> sp. CY54-11-8	HY17_07615	WP_034767304
<i>Leisingera aquimarina</i> DSM 24565	AQUI_RS0101970	WP_027256024
<i>Paracoccus halophilus</i> JCM 14014	IT41_07730	WP_036740064
<i>Roseivivax atlanticus</i> . 22II-S10S	ATO8_20809	WP_043847479
<i>Roseivivax atlanticus</i> . 22II-S10S	ATO8_20939	WP_043847470
<i>Roseivivax atlanticus</i> . 22II-S10S	ATO8_20949	WP_043847447
<i>Roseobacter litoralis</i> Och149	RLO149_p830600	WP_013959899
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069	rosmuc_03986	WP_008282895
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069	rosmuc_03988	WP_008282897
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069	rosmuc_03998	WP_037275434
<i>Roseovarius</i> sp. 217	ROS217_03265	WP_009820168
<i>Roseovarius</i> sp. 218	ROS217_03275	WP_009820170
<i>Roseovarius</i> sp. 219	ROS217_03325	WP_009820180
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035	RTM1035_00365	WP_008282895
<i>Roseovarius</i> sp. TM1036	RTM1035_00375	WP_008282897
<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	TH2_19844	WP_008892261
<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	TH2_19889	WP_008892270
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1	JI59_04885	WP_007013932
<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	PP1Y_AT23500	WP_013833445
<i>Sphingobium lactosutens</i> DS20	RLDS_21590	WP_021227791
<i>Sphingobium</i> sp. C100	C100_18760	WP_024021275
<i>Marinobacter manganoxydans</i> MnI7-9	KYE_02413	WP_008170009
<i>Rhodothermus marinus</i> SG0.5JP17-172	Rhom172_1597	WP_014067163

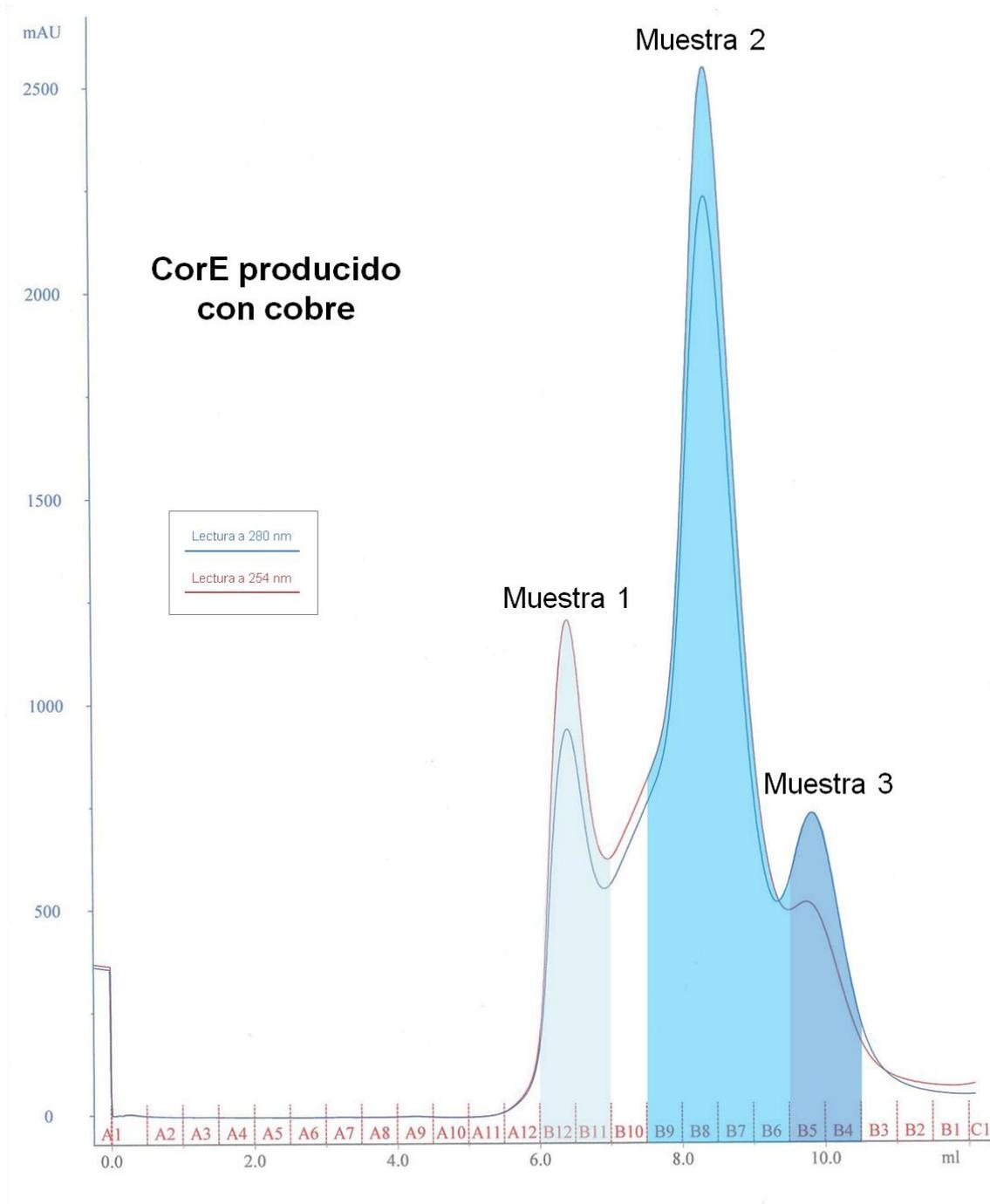
Apéndice 4

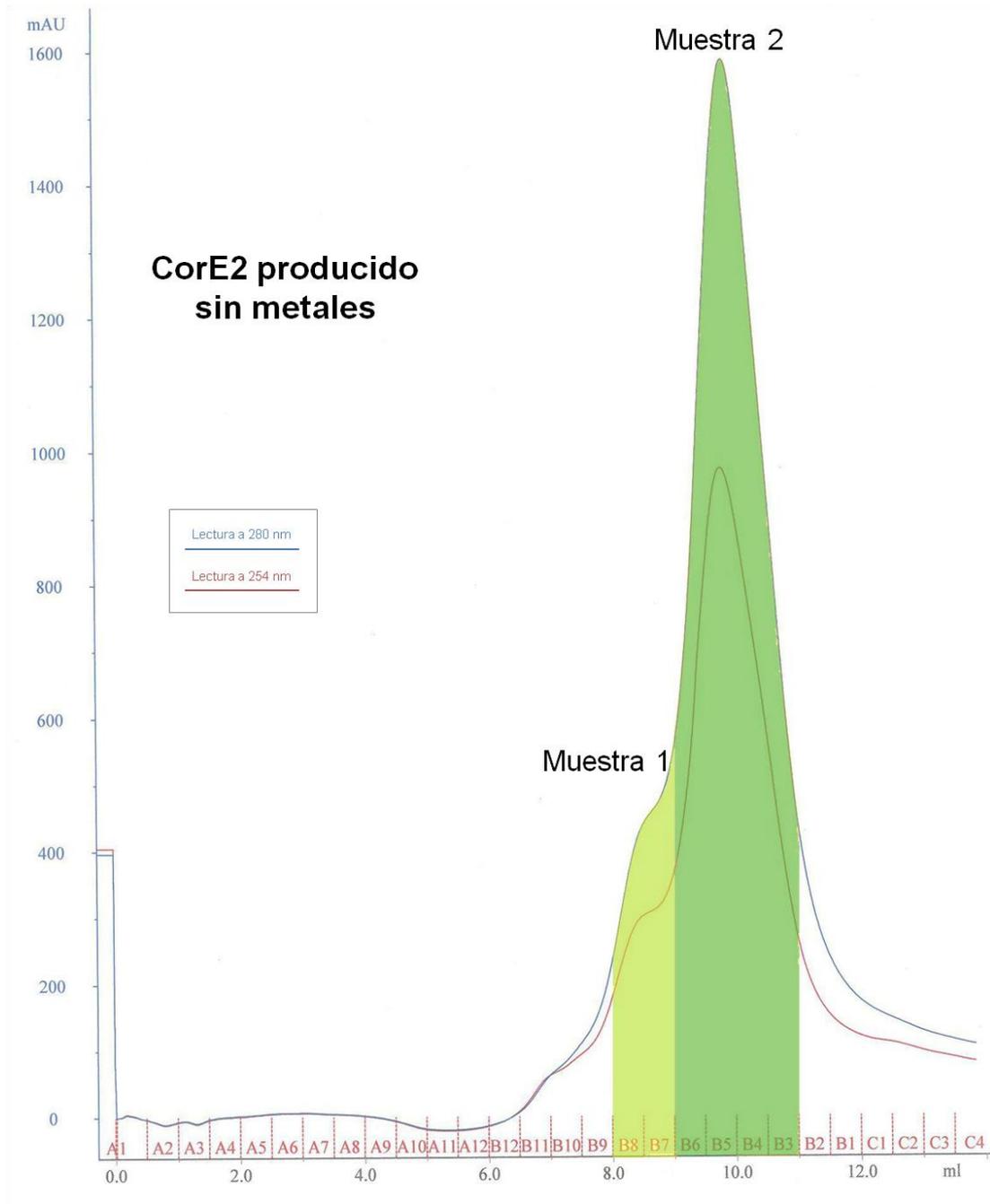
Producción de proteínas y fraccionamiento en varias muestras:

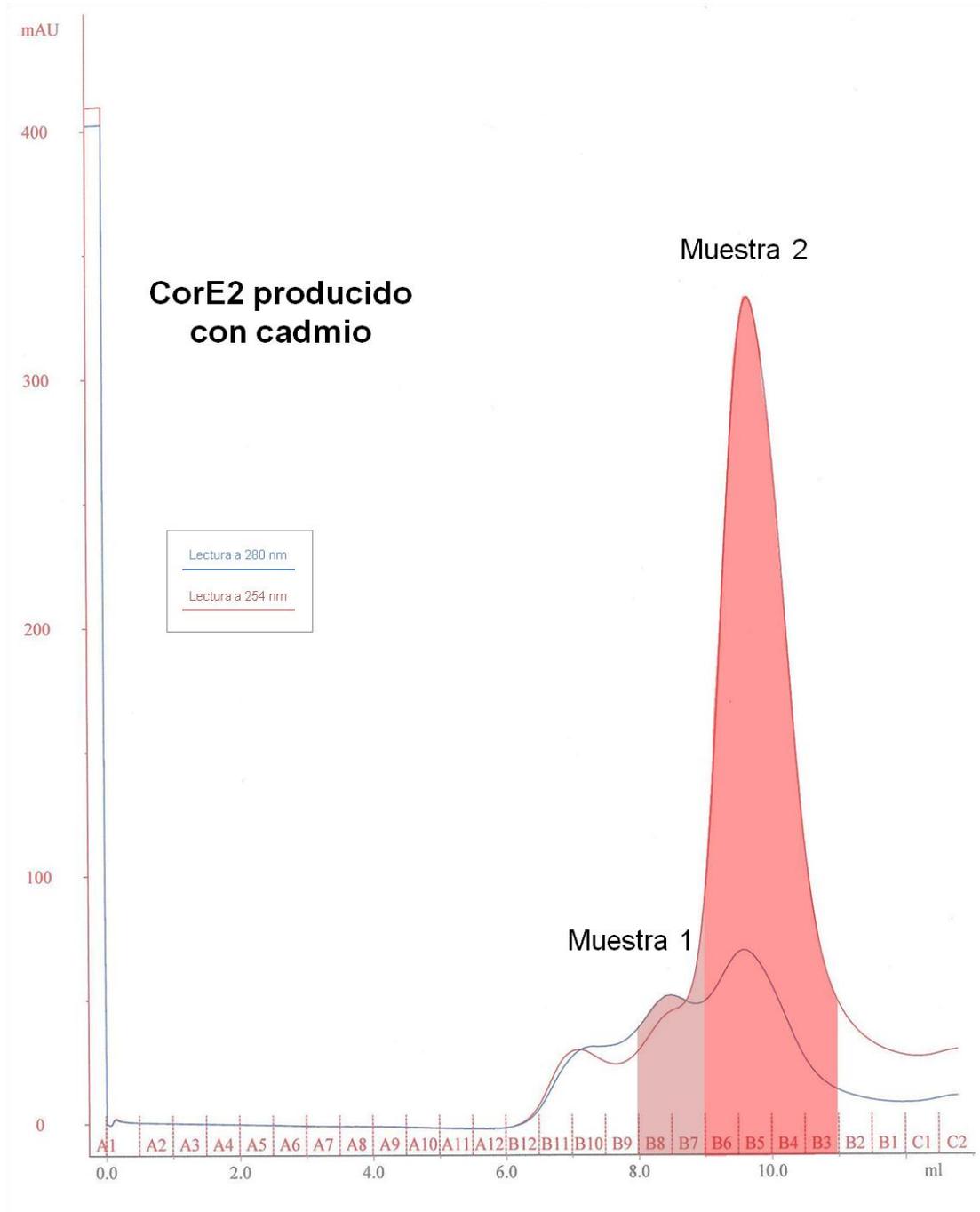


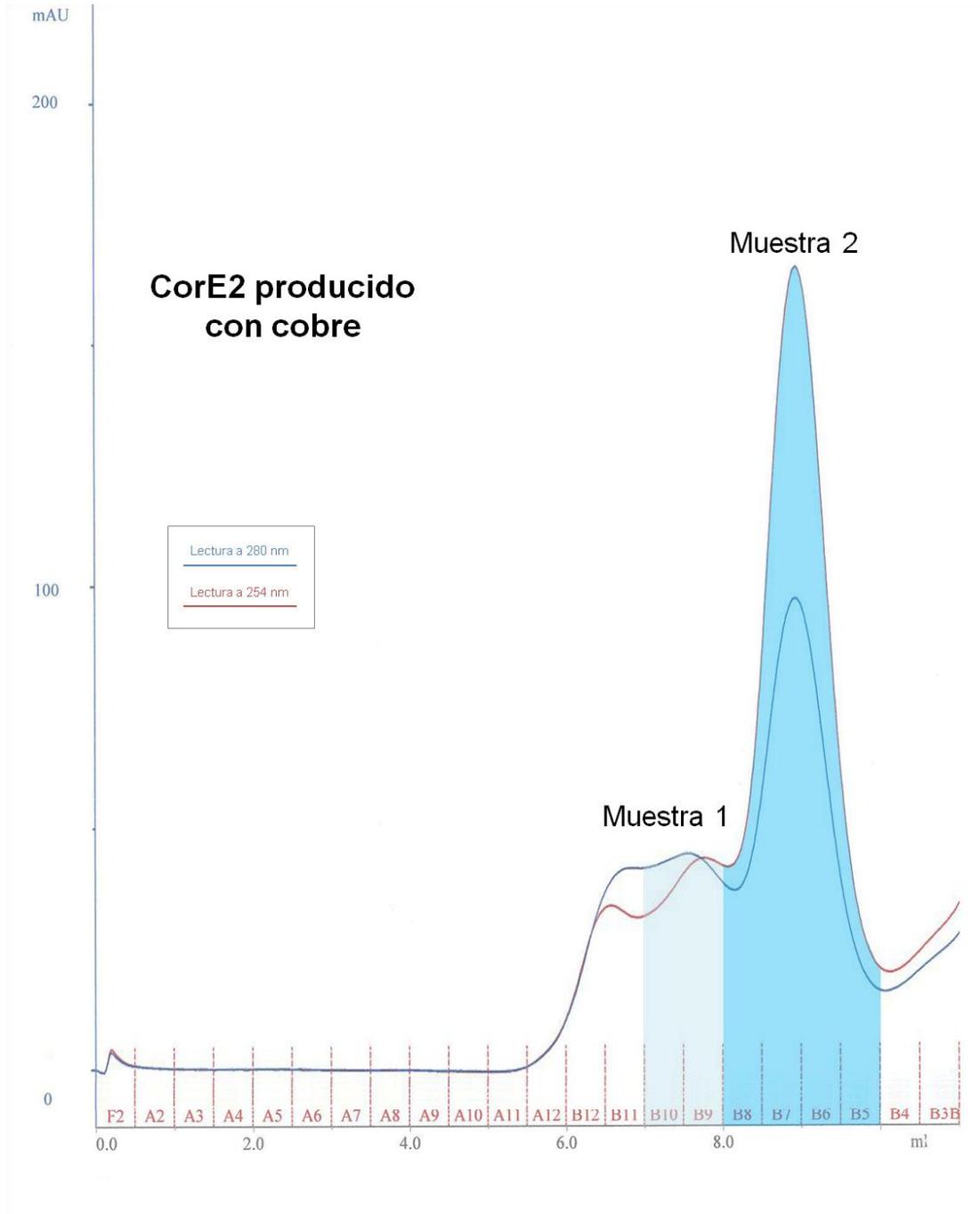










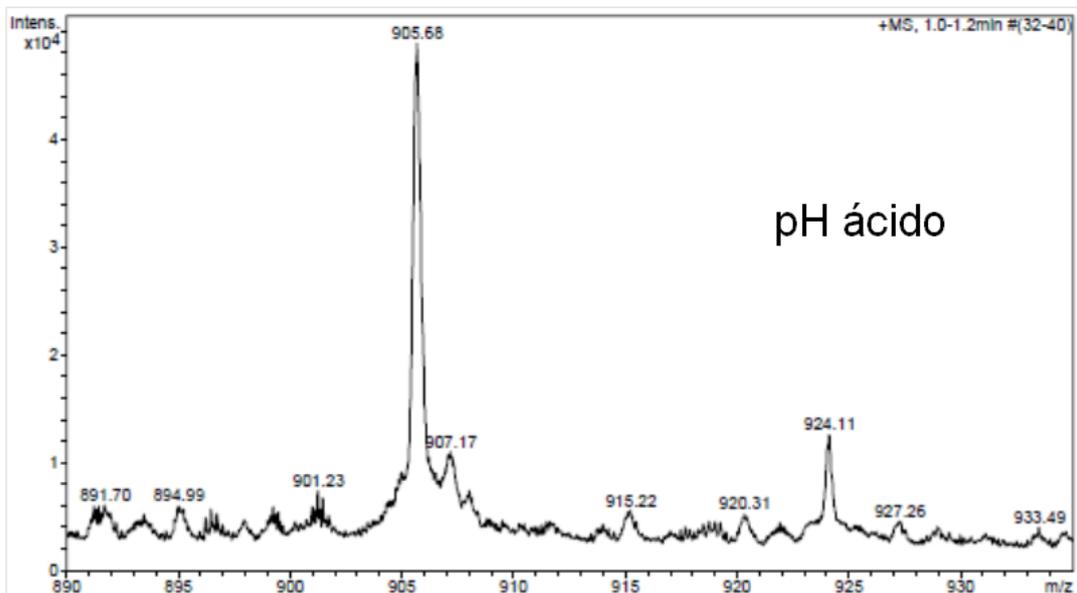
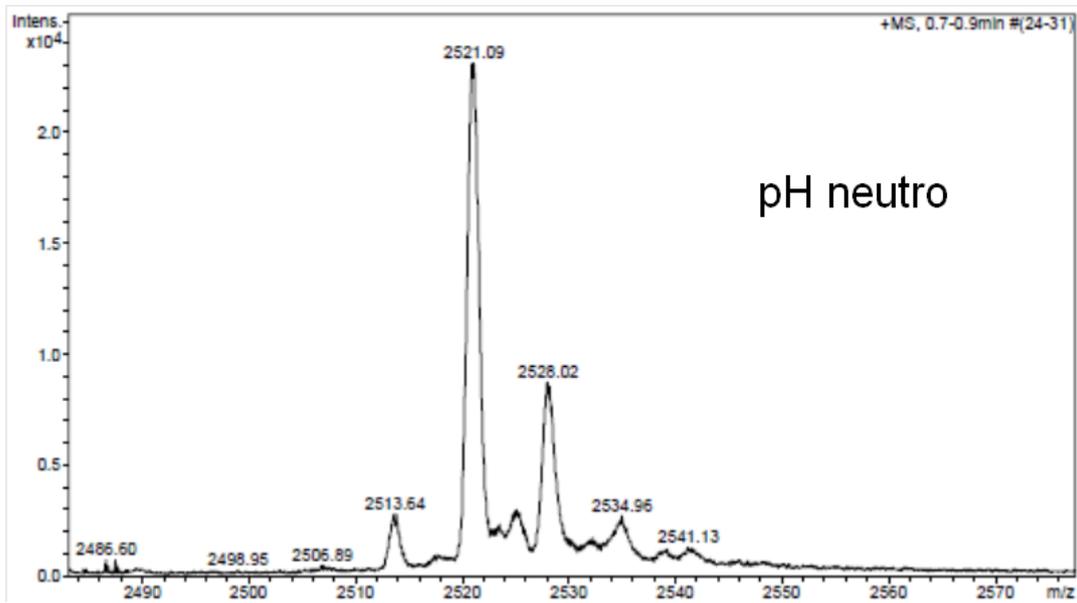


Apéndice 5

Gráficas obtenidas por espectrofotometría de masas de cada una de las muestras:

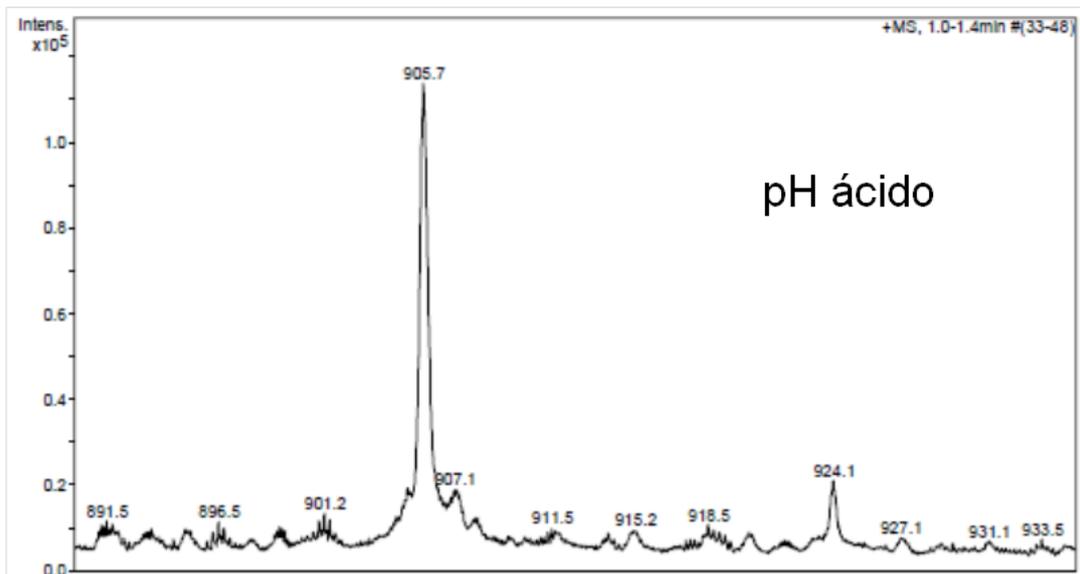
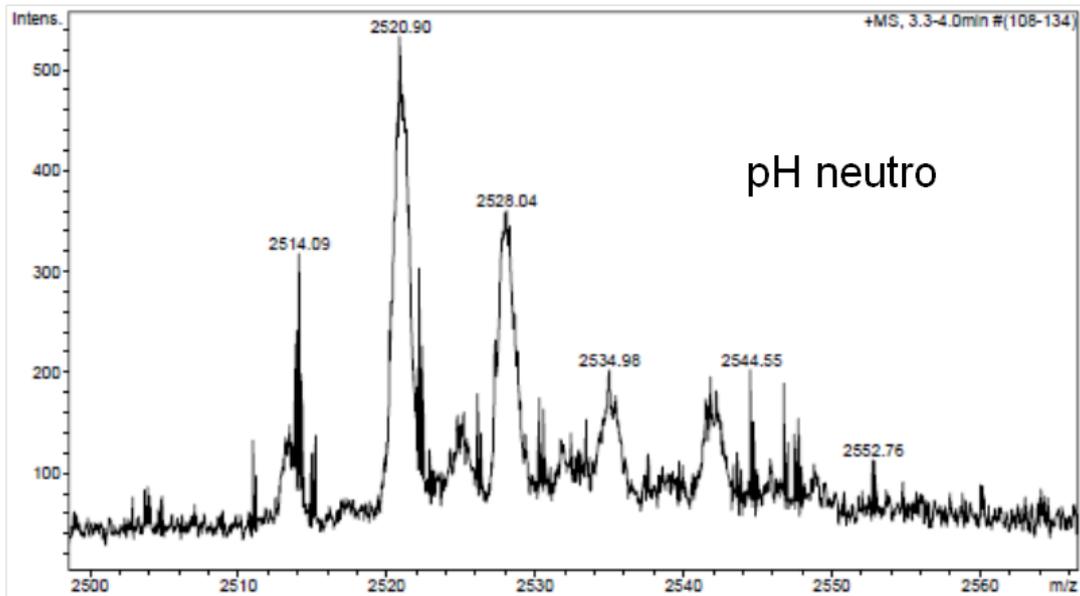
CorE producido sin metales

Muestra 1



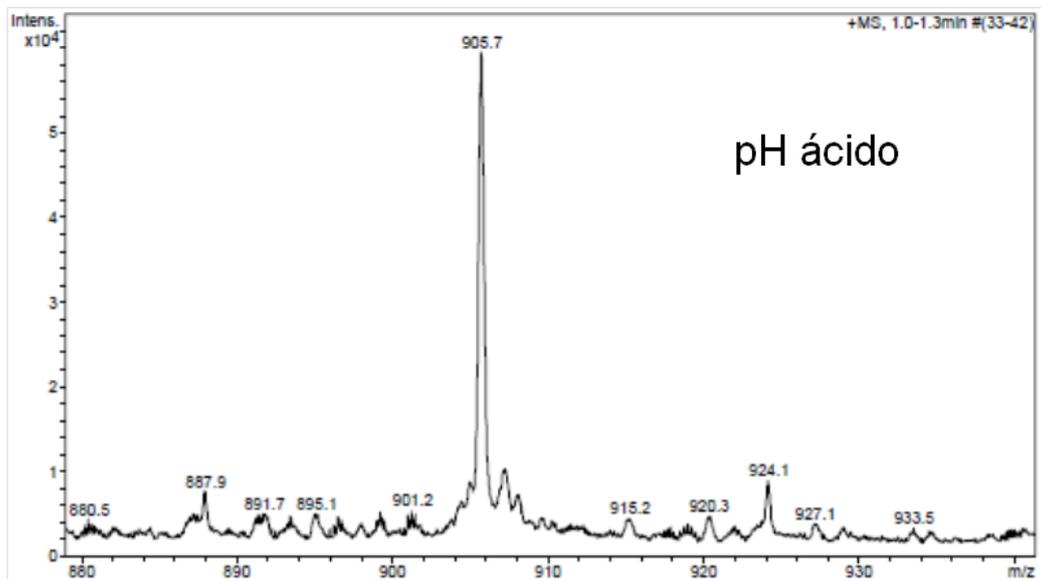
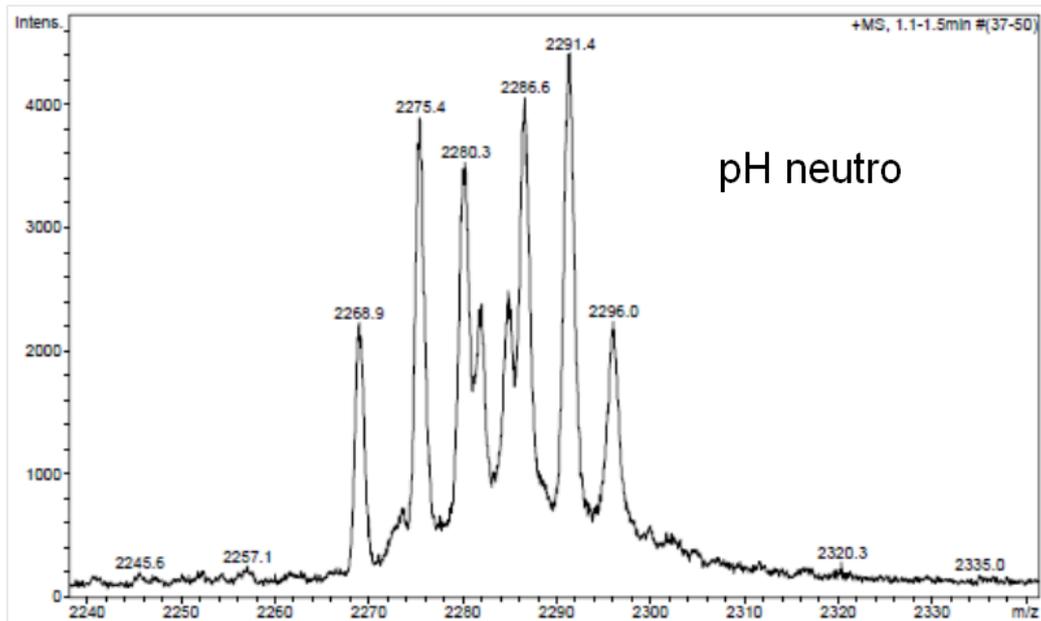
CorE producido sin metales

Muestra 2



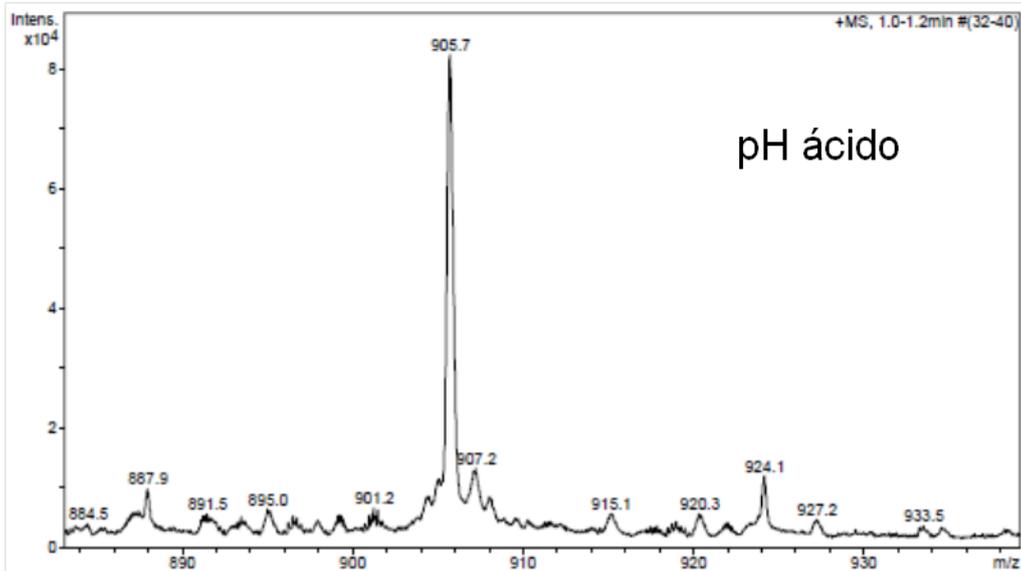
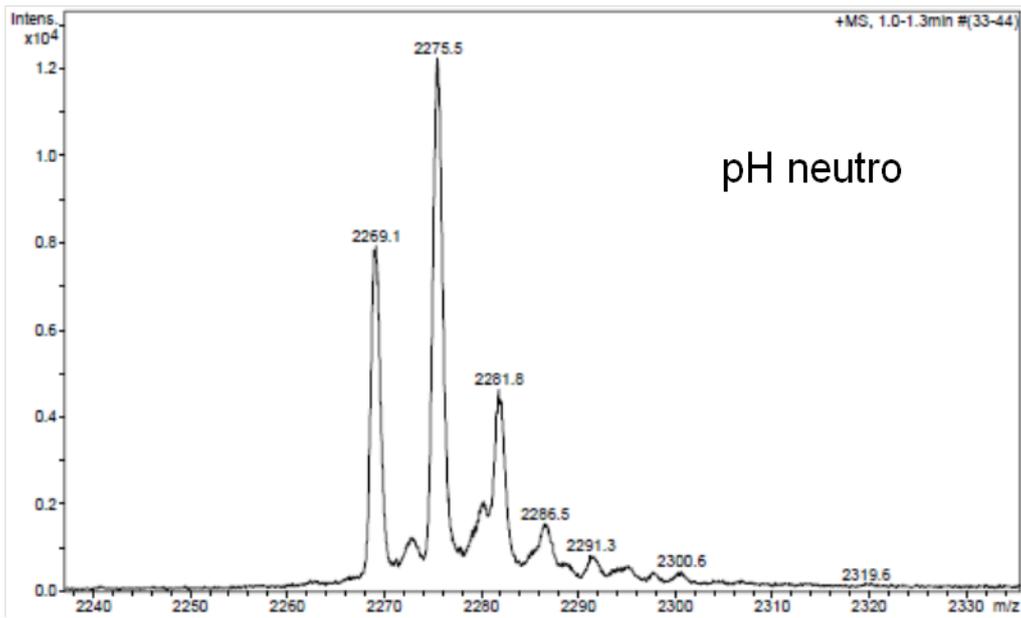
CorE producido con zinc

Muestra 1



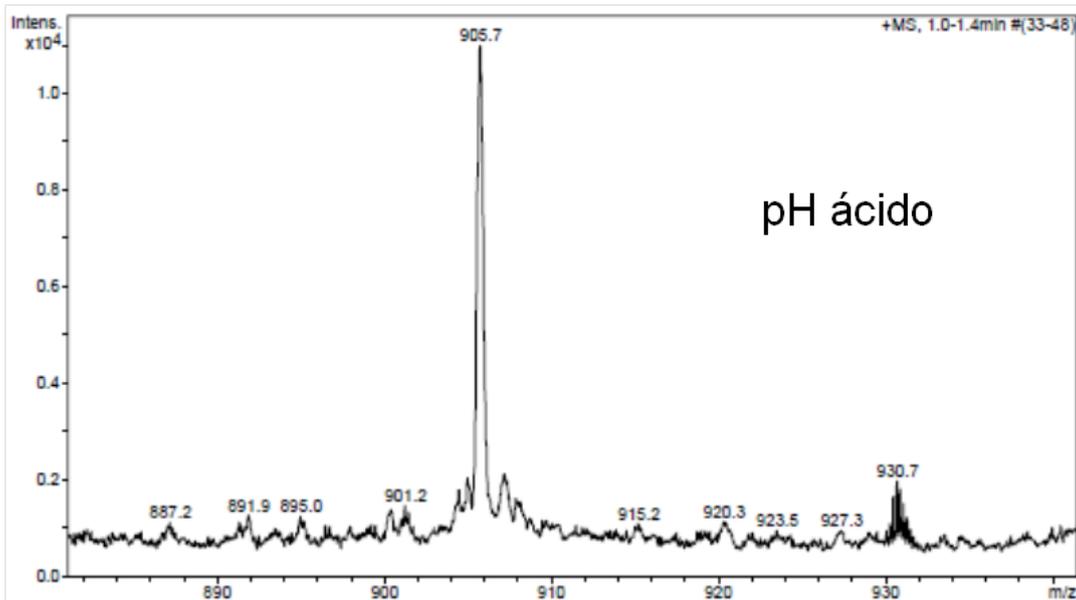
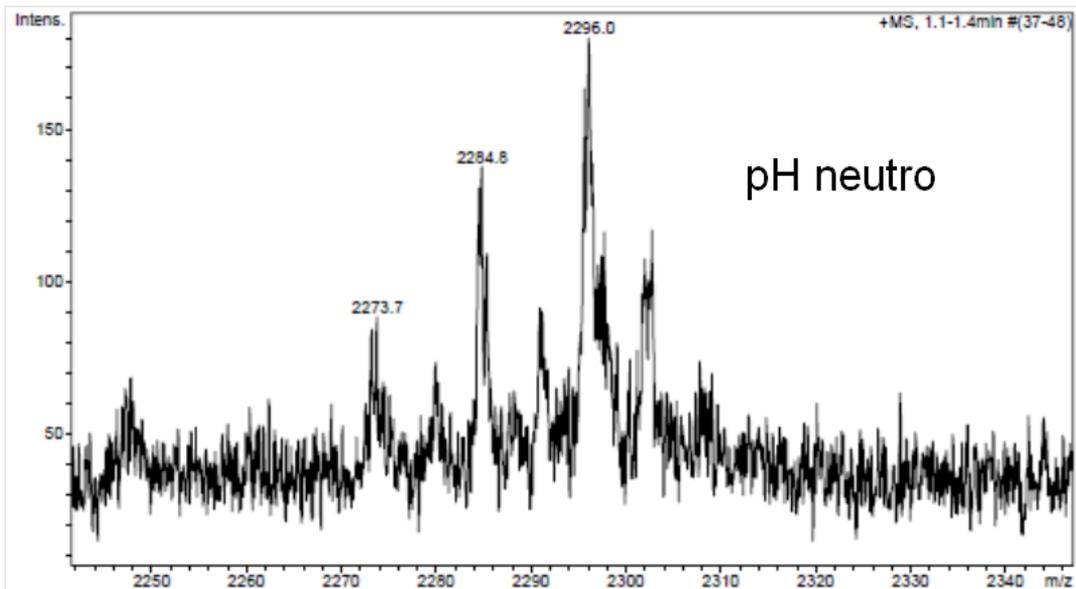
CorE producido con zinc

Muestra 2



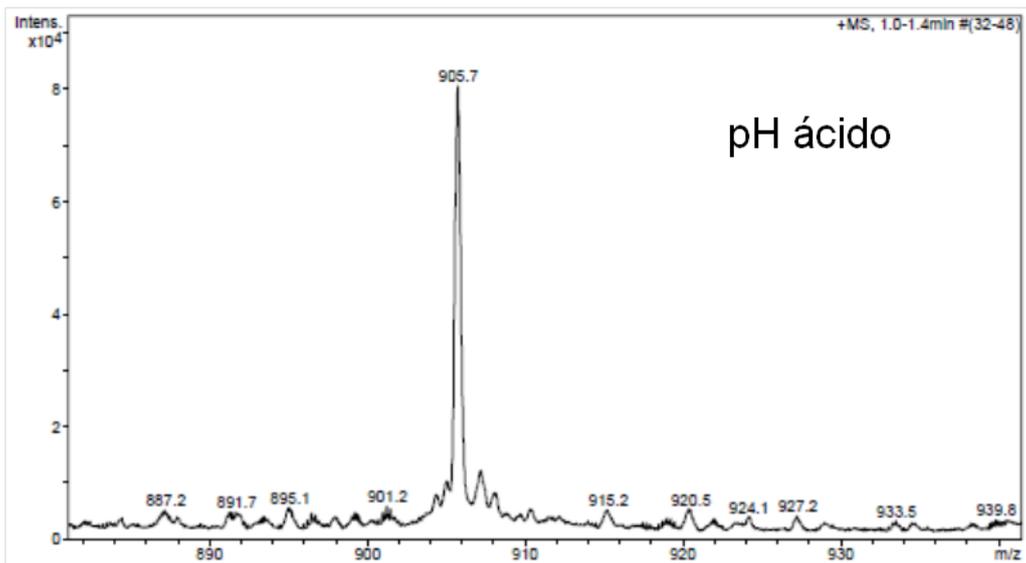
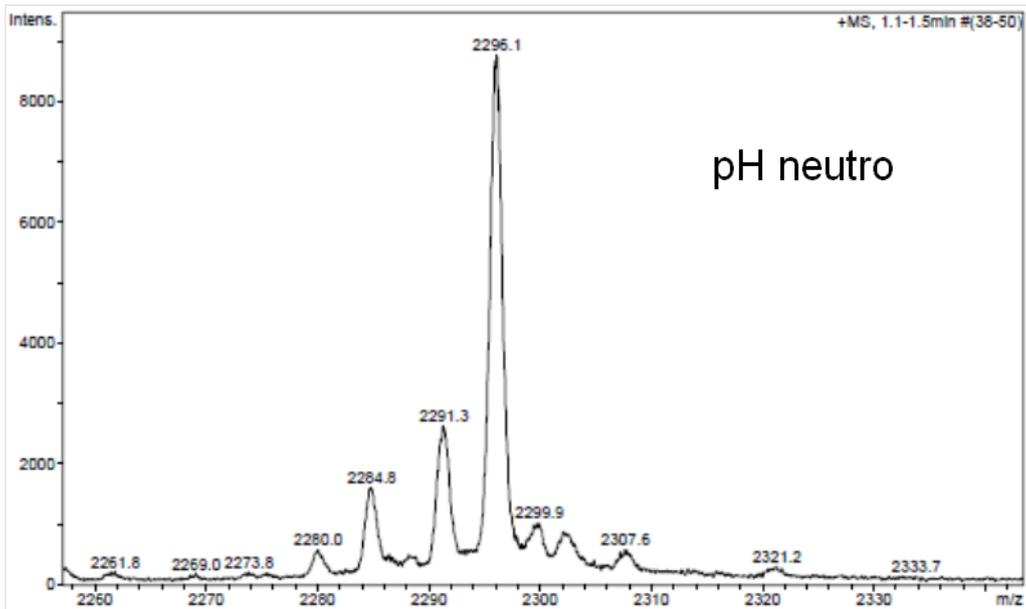
CorE producido con cadmio

Muestra 1



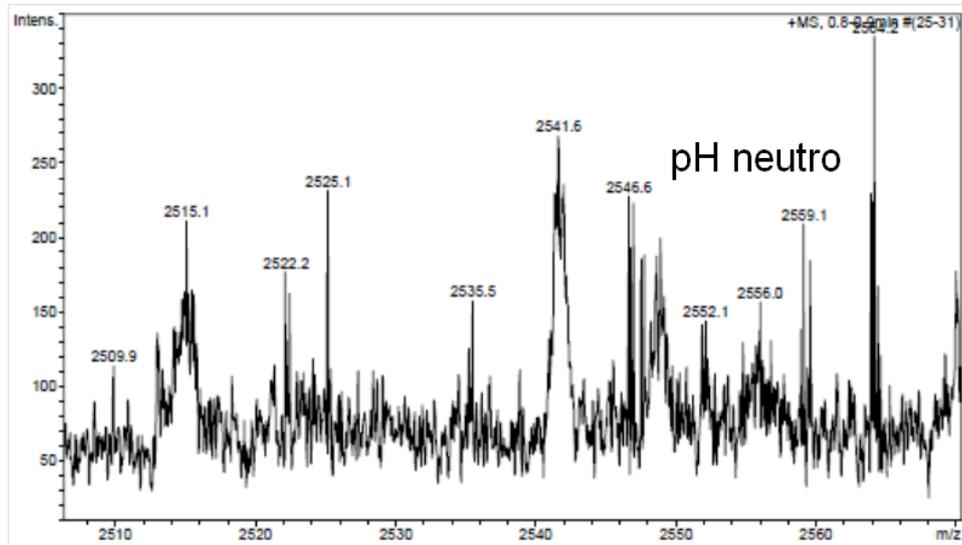
CorE producido con cadmio

Muestra 2



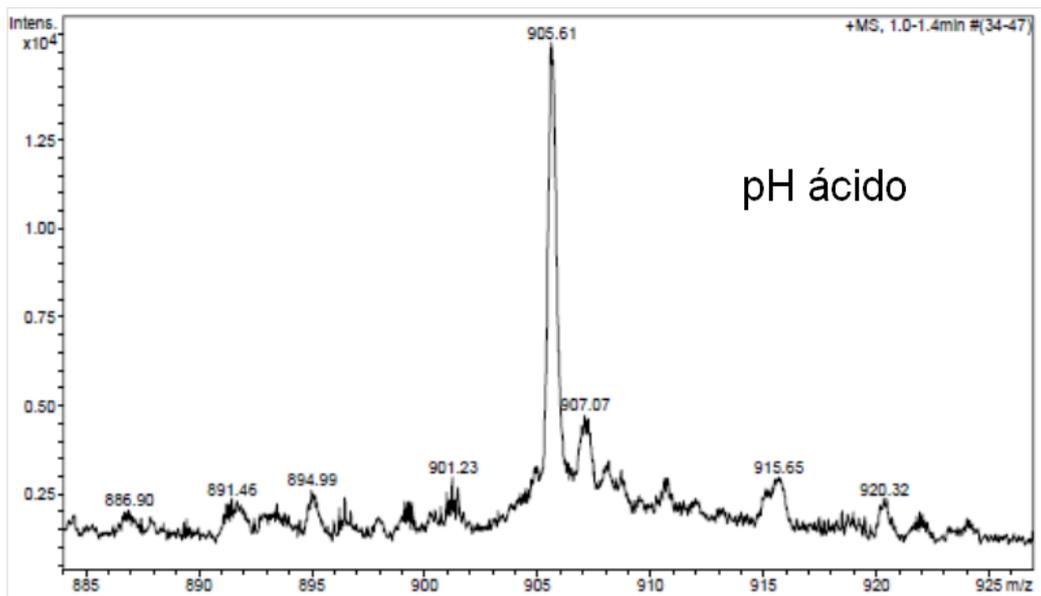
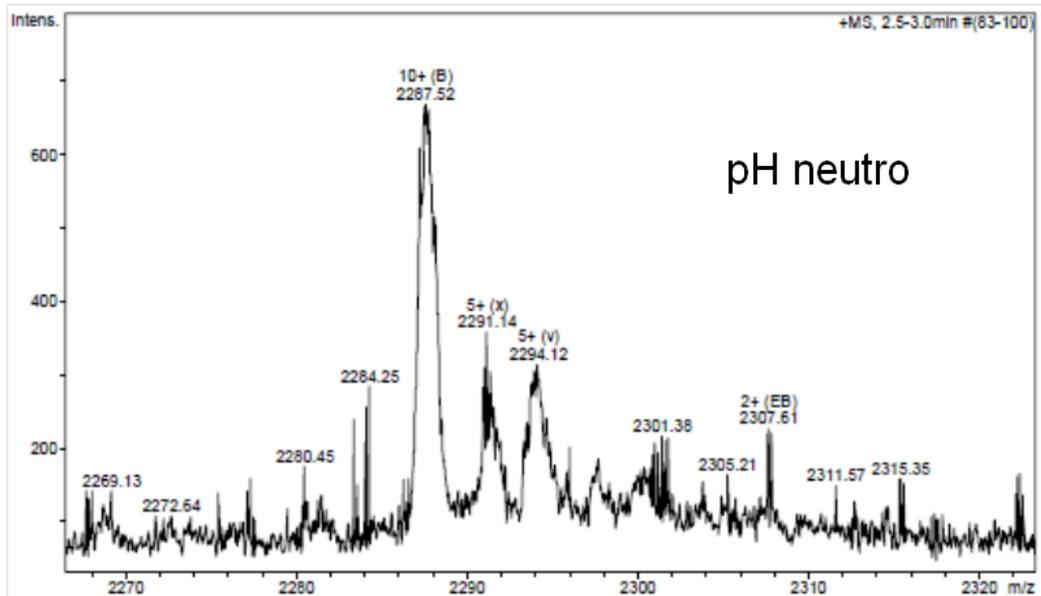
CorE producido con cobre

Muestra 1



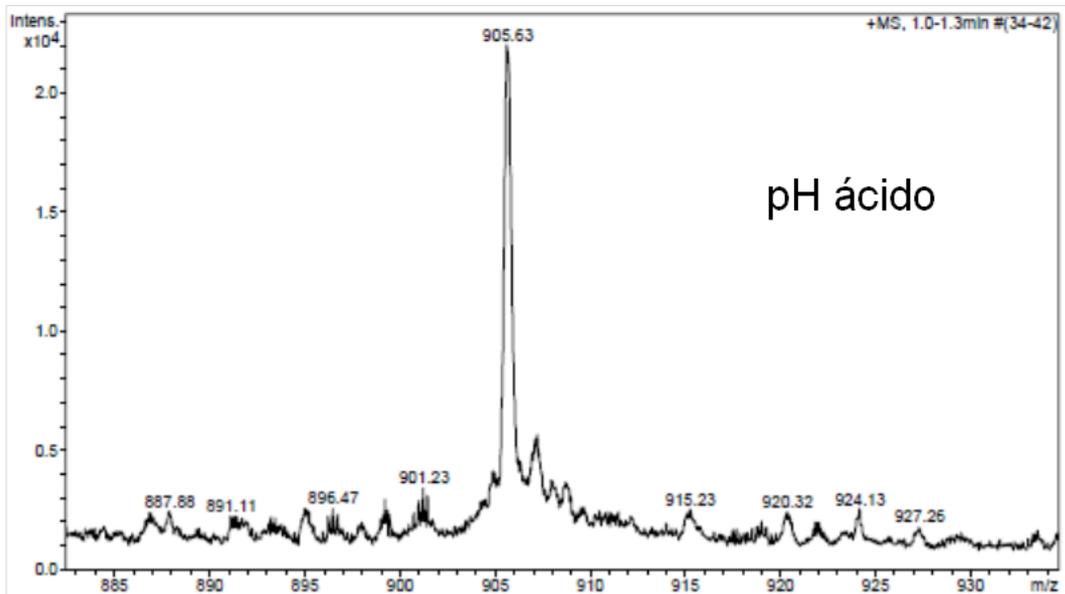
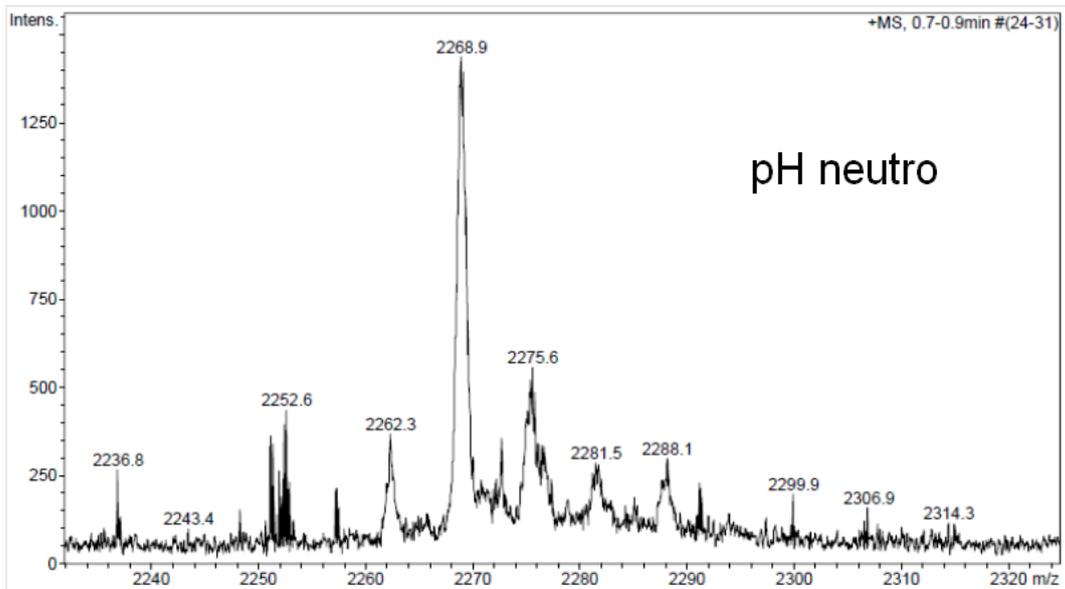
CorE producido con cobre

Muestra 2



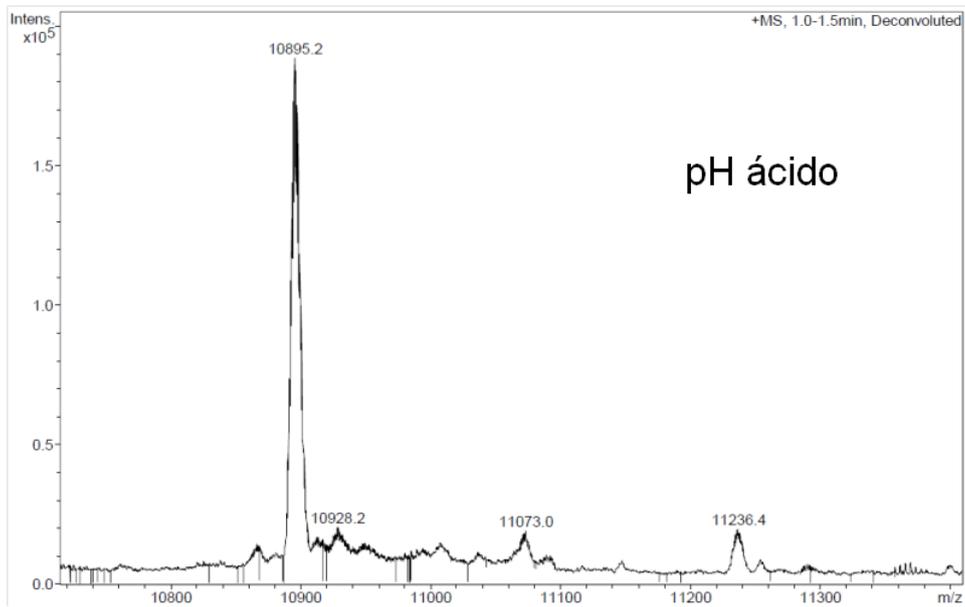
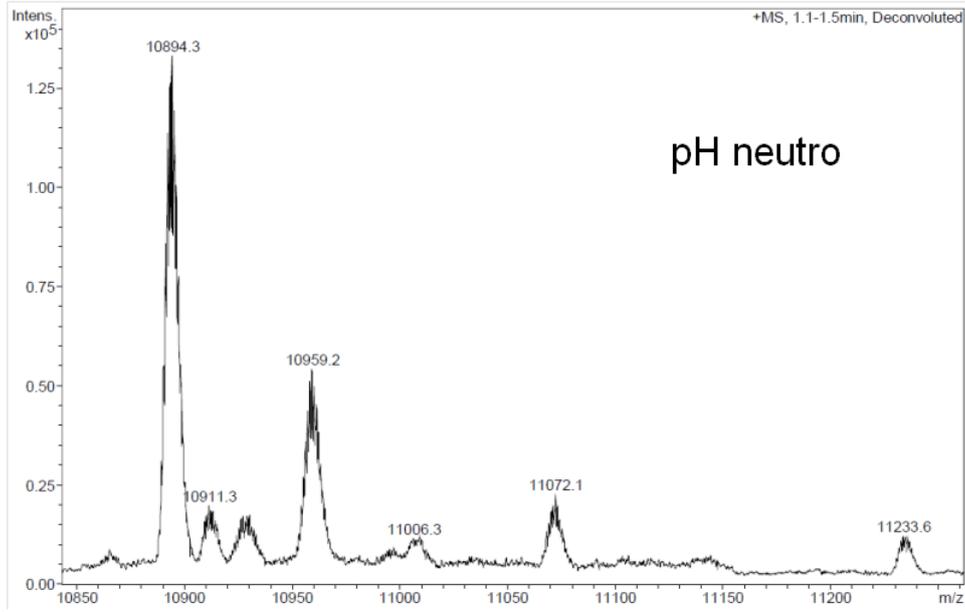
CorE producido con cobre

Muestra 3



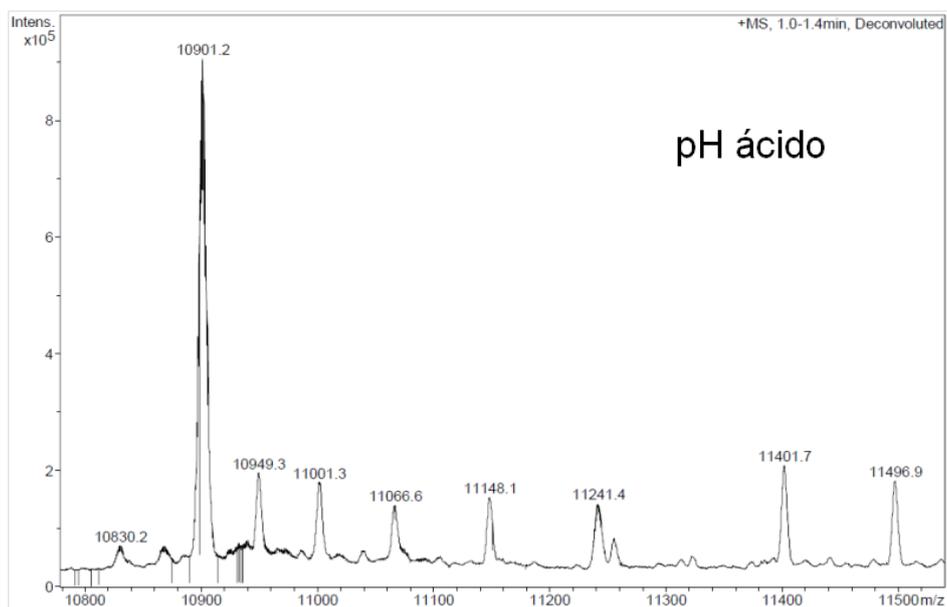
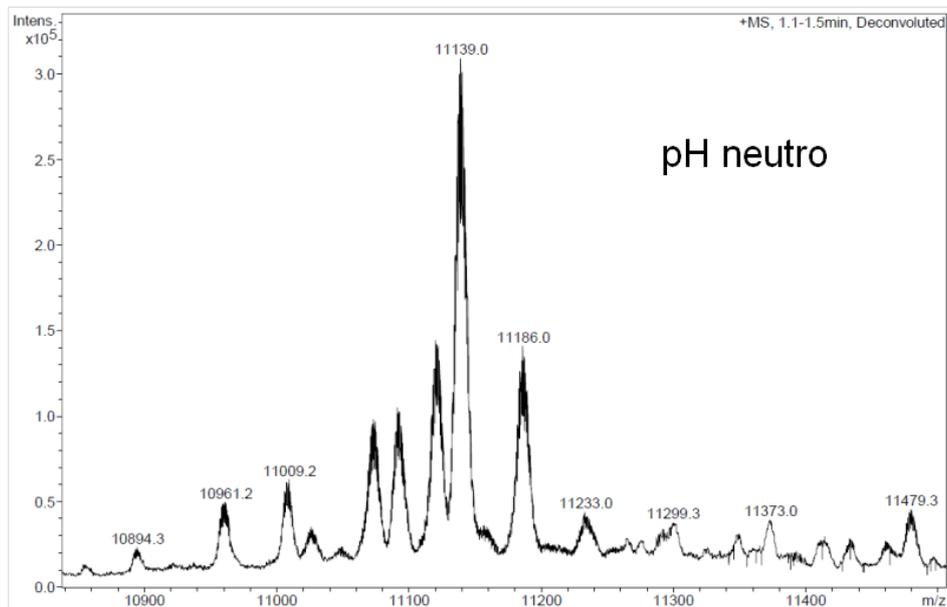
CorE2 producido sin metales

Muestra 2



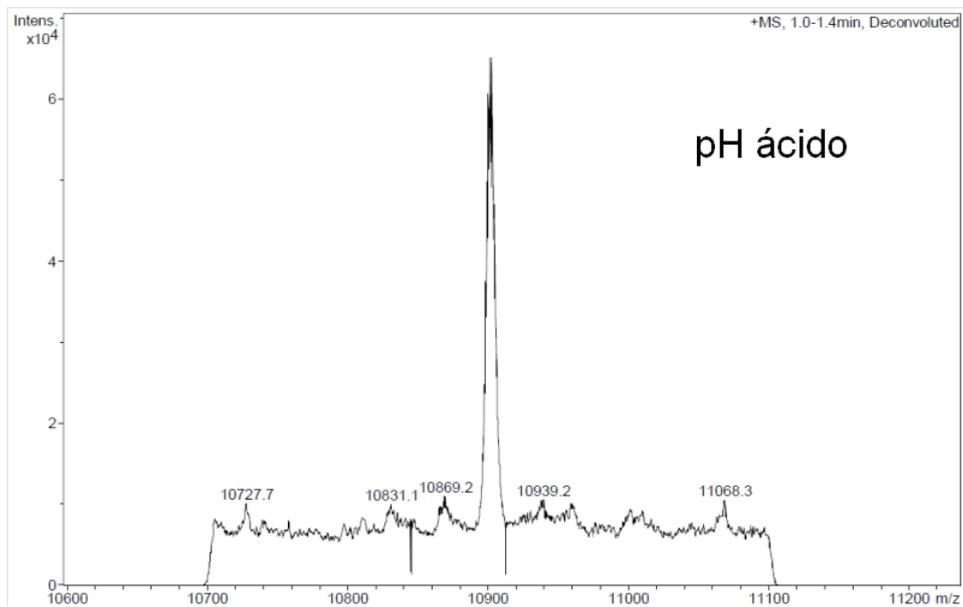
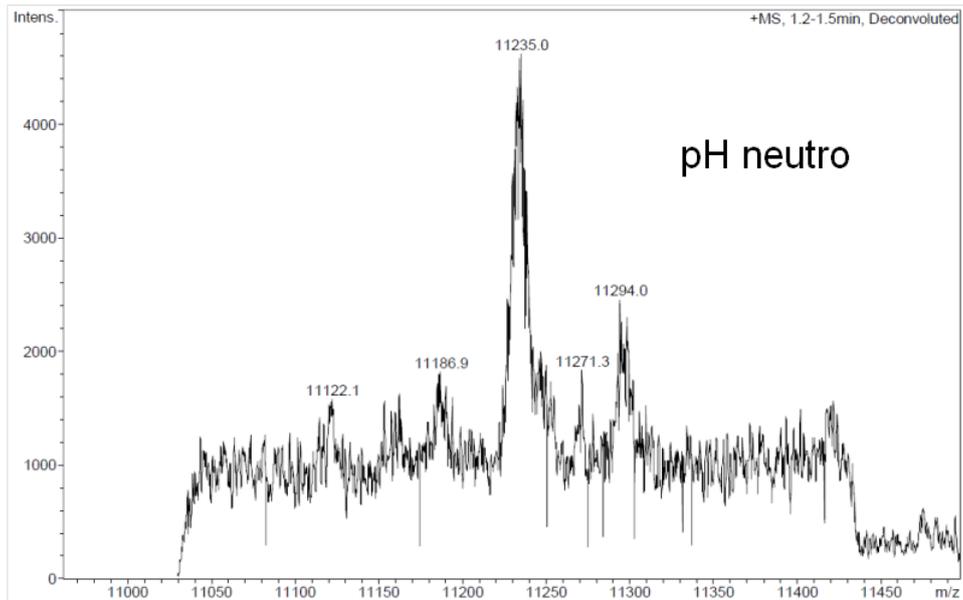
CorE2 producido con zinc

Muestra 2



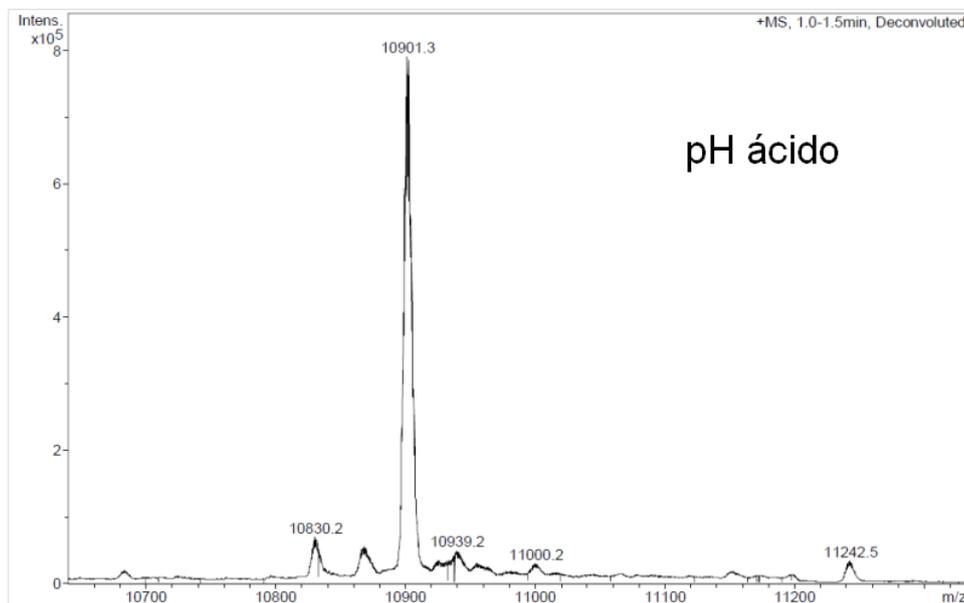
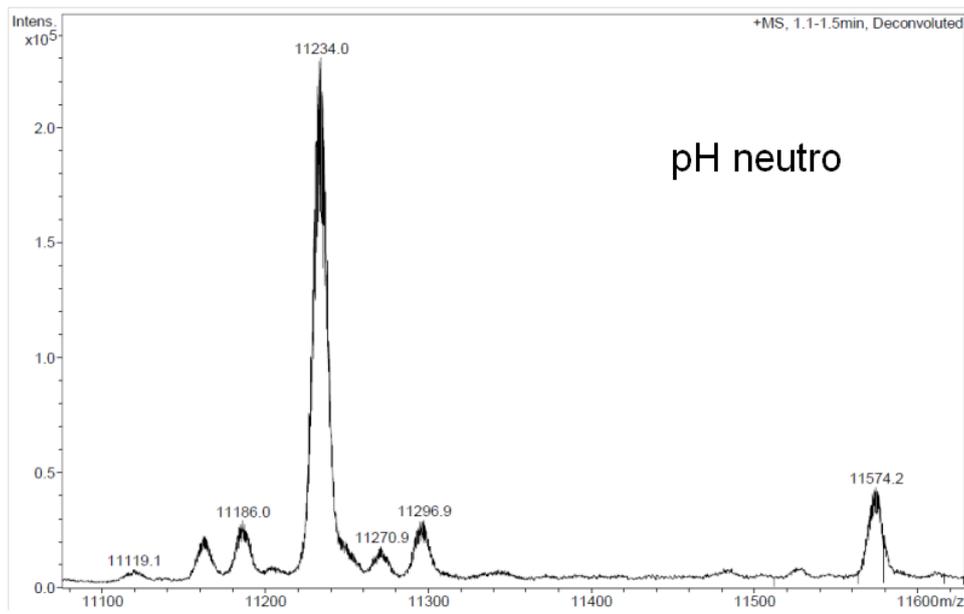
CorE2 producido con cadmio

Muestra 1



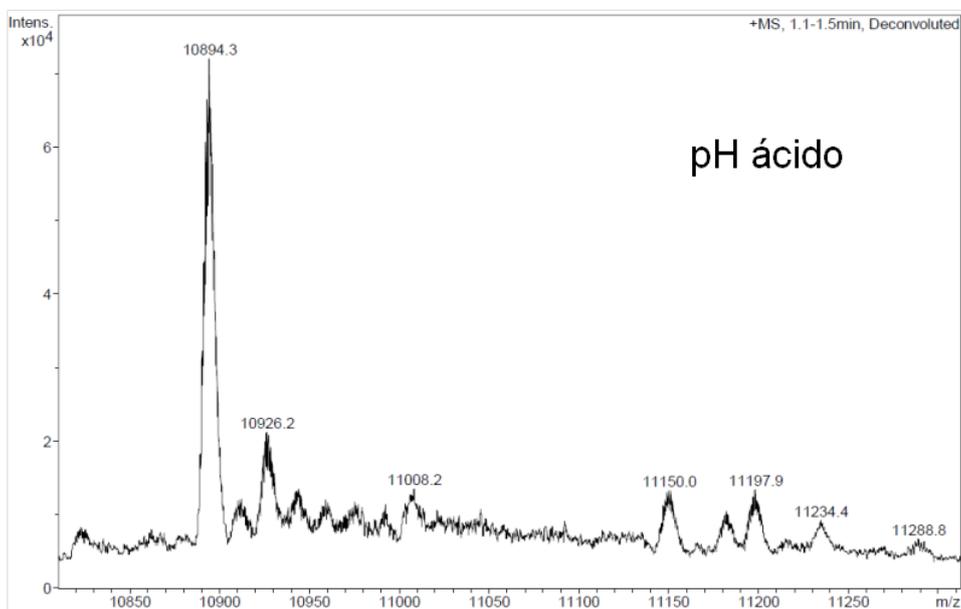
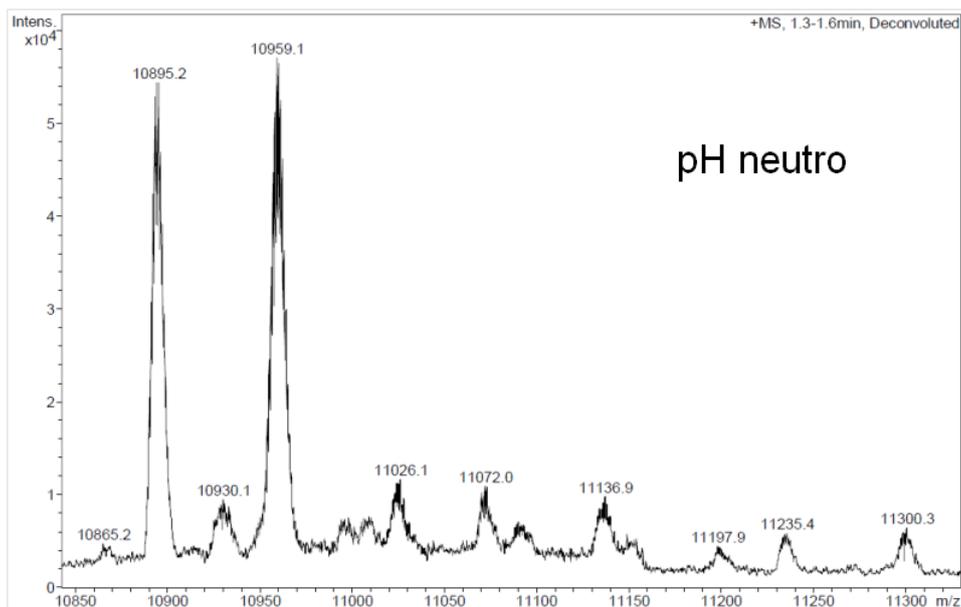
CorE2 producido con cadmio

Muestra 2



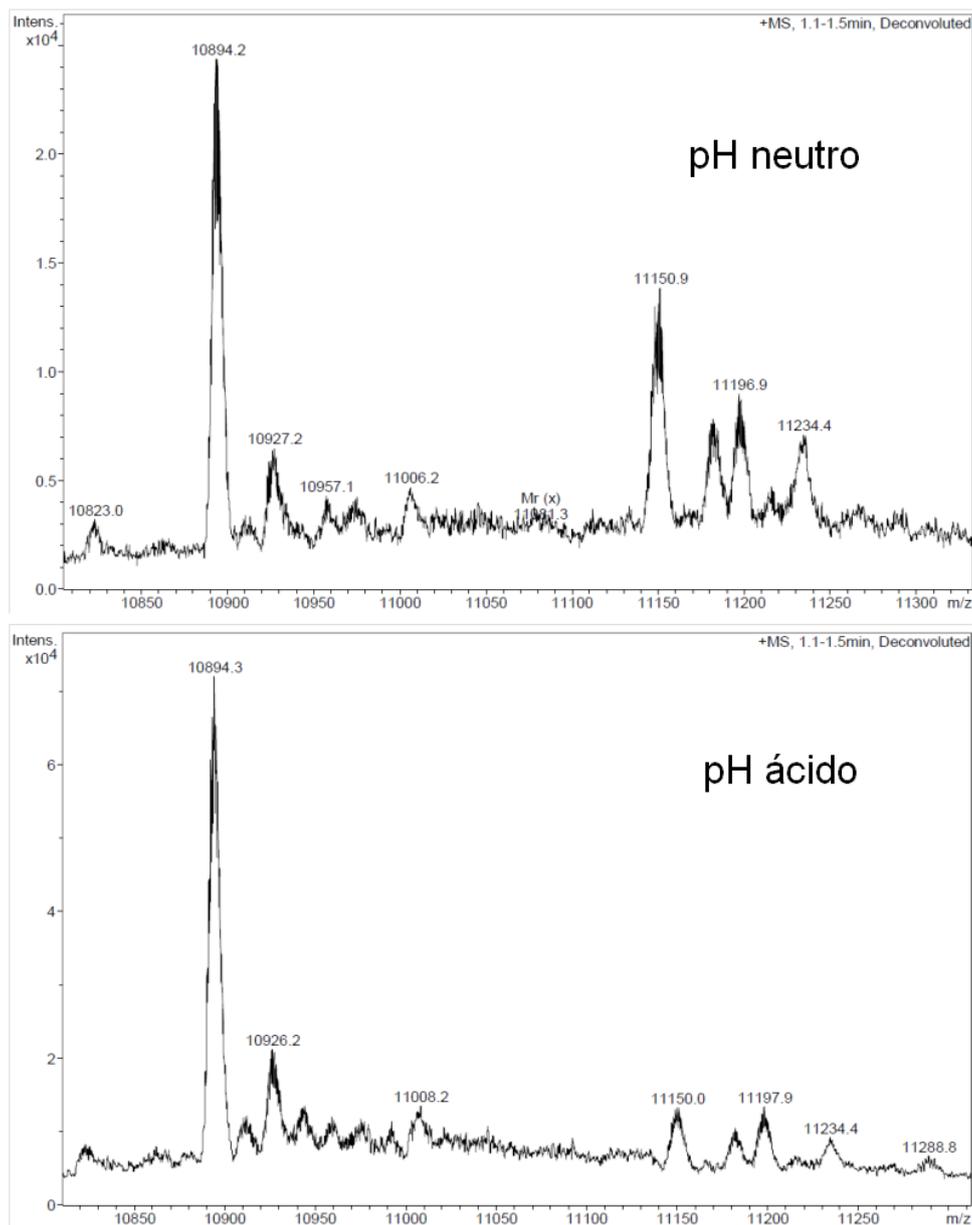
CorE2 producido con cobre

Muestra 1



CorE2 producido con cobre

Muestra 2



Apéndice 6

Recopilación de los resultados de metalación de todas las muestras de CorE y CorE2:

CorE

	Producido sin metal		Producido con Zn ²⁺		Producido con Cd ²⁺		Producido con Cu		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
ICP (Zn ²⁺)	1,96	1,14	2,58	1,34	Errónea	0,55	1,86	3,33	3,97
ICP (Cd ²⁺)	0	0	0	0	Errónea	2,47	0	0	0
ICP (Cu ⁺²⁺)	0,07	0,03	0,11	0,01	Errónea	0,05	1,5	4,86	1,75
Masas neutro	Zn ₁ (100)	Zn ₁ (100)	Zn ₅ (100)	Zn ₂ (100)	Cd ₃ (100)	Cd ₃ (100)	M ₄ (100)	M ₄ (100)	M ₁ (100)
	Zn ₂ (40)	Zn ₂ (50)	Zn ₄ (90)	Zn ₁ (60)	Cd ₂ (60)	Zn ₁ Cd ₂ (60)	M ₅ (70)	M ₅ (30)	M ₂ (30)
		Zn ₃ (30)	Zn ₂ (90)	Zn ₃ (30)	Cd ₁ (40)	Cd ₂ (60)	Apo (70)		
		Zn ₄ (30)	Zn ₃ (80)						
		Apo (20)	Zn ₁ (50)						
			Zn ₆ (50)						
Masas ácido	Apo	Apo	Apo	Apo	Apo	Apo	Errónea	Apo	Apo

CorE2

	Producido sin metal		Producido con Zn ²⁺		Producido con Cd ²⁺		Producido con Cu	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
ICP (Zn ²⁺)	1,53	1,94	1,8	2,88	1,13	0,52	0,71	0,69
ICP (Cd ²⁺)	0,11	0,11	0,41	0,04	1,75	2,33	0,09	0,01
ICP (Cu ⁺²⁺)	0,18	0,08	0,01	0,03	0,04	0,04	0,28	1,65
Masas neutro	Errónea	ApoA(100)	Errónea	AZn ₃ (100)	ACd ₃ (100)	ACd ₃ (100)	ApoA (100)	ApoA (100)
		AZn ₁ (40)		AZn ₂ (30)	AZn ₂ Cd ₃ (40)	AZn ₁ Cd ₃ (60)	AM ₁ (100)	AM ₄ (30)
			AZn ₁ (10)			AZn ₁ Cd ₂ (60)	Apo (70)	
Masas ácido	Errónea	ApoA (oxidada)	Errónea	ApoA (no oxidada)	ApoA	ApoA (no oxidada)	Apo (oxidada)	Apo (oxidada)