

03081

11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

UNIDAD DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL CCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CLONACION Y CARACTERIZACION DEL OPERON  
*lipAR* DE *Streptomyces coelicolor* A3(2)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
ACADEMICO DE DOCTOR EN  
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A :  
M en IBB SABINA FABIOLA VALDEZ ORTEGA

ASESOR: DR. LUIS SERVIN GONZALEZ

ABRIL DEL 2000

277314



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN	1
Ia. ABSTRACT	3
II. INTRODUCCION	4
Características principales de la diferenciación morfológica de <i>Streptomyces</i>	4
Organización genética	10
Replicación del DNA	14
Inestabilidad genética del cromosoma	16
Aspectos relevantes del metabolismo secundario	19
Características moleculares y genéticas de la diferenciación morfológica	22
Regulación de la diferenciación por los genes <i>bld</i>	24
Proteínas asociadas a las esporas (Sap)	35
Los genes <i>bld</i> y la represión catabólica	42
Mutantes <i>bld</i> de <i>Streptomyces griseus</i>	44
El papel del glucógeno en la diferenciación celular	47
Mutantes que no esporulan: los genes <i>whi</i>	50
i) Los genes de la esporulación temprana	52
ii) Los genes de la esporulación tardía	58
Factores sigma alternos como un mecanismo de regulación	64
III. ANTECEDENTES	73
IV. JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL TRABAJO	94
V. TRABAJO DE INVESTIGACION	96
The <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <i>lipAR</i> operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator.	
VI. RESULTADOS ADICIONALES	97
VII. DISCUSION GENERAL	126
VIII. CONCLUSIONES	140
IX. REFERENCIAS	144

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	PAGINA
<b>Figura 1.</b> Esquema de una colonia de <i>Streptomyces</i> .	7
<b>Figura 2.</b> Replicación del cromosoma.	16
<b>Figura 3.</b> Los codones UUA y la regulación.	29
<b>Figura 4.</b> El papel de los genes <i>bld</i> .	39
<b>Figura 5.</b> El papel de los genes <i>whi</i> .	51
<b>Figura 6.</b> El papel del gen <i>whiH</i> .	57
<b>Figura 7.</b> Síntesis de los triacilgliceroles.	73
<b>Figura 8.</b> Activación interfásica de las lipasas.	76
<b>Figura 9.</b> Plegado $\alpha/\beta$ de las hidrolasas.	78
<b>Figura 10.</b> Ejemplos de estructuras de lipasas.	80
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de lipólisis.	83
<b>Tabla I.</b> Familias de enzimas lipolíticas.	84
<b>Figura 12.</b> Vía de secreción de lipasa.	87
<b>Figura 13.</b> Estructura tridimensional de la lipasa de <i>Streptomyces exfoliatus</i> M11.	93
<b>Figura 14.</b> Clonación del operón <i>lipAR</i> .	97
<b>Figura 15.</b> Análisis de FRAME.	98
<b>Figura 16.</b> Arreglo genético del operón <i>lipAR</i> .	99
<b>Figura 17.</b> Secuencia nucleotídica del operón <i>lipAR</i>	100
<b>Figura 18.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de las lipasas de <i>Streptomyces</i> .	106
<b>Figura 19.</b> Análisis por DOTPLOT de los activadores transcripcionales <i>LipR</i> de <i>Streptomyces</i> .	107
<b>Tabla II.</b> Composición de aminoácidos de las lipasas de <i>Streptomyces</i> .	108
<b>Tabla III.</b> Grupos R presentes en las lipasas de <i>Streptomyces</i> .	108
<b>Figura 20.</b> Plásmido pB108.	109
<b>Figura 21.</b> Plásmido pB110.	110
<b>Figura 22.</b> Western blot de la lipasa de <i>S. coelicolor</i> .	111
<b>Figura 23.</b> Actividad lipolítica en medio LB.	111
<b>Figura 24.</b> Actividad lipolítica en medio R2.	112
<b>Figura 25.</b> Actividad lipolítica por inducción de tiostreptona.	114
<b>Figura 26.</b> Plásmido pIB5.	115
<b>Figura 27.</b> Obtención de la cepa IB5 de <i>S. coelicolor</i> .	116
<b>Figura 28.</b> Obtención de la cepa IB5 de <i>S. coelicolor</i> .	116
<b>Figura 29.</b> Producción de actinorrodina.	117
<b>Figura 30.</b> Producción de actinorrodina.	117
<b>Figura 31.</b> Actividad lipolítica de la cepa modelo.	118
<b>Figura 32.</b> Localización cromosomal del operón <i>lipAR</i> de <i>S. coelicolor</i> A3(2).	119
<b>Figura 33.</b> Modelo de la lipasa de <i>S. coelicolor</i>	123
<b>Figura 34.</b> Distribución de cargas en la superficie de las lipasas de <i>Streptomyces</i> .	124
<b>Figura 35.</b> Potencial electrostático de la superficie de las lipasas de <i>Streptomyces</i> .	125

## ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Act	Actinorrodina
GTP	Gua
h	Horas
LB	Medio Luria-Bertani
kDa	Kilodaltons
kB	Kilobases
MG	Megabases
µg	Microgramos
ml	Mililitros
MM	Medio mínimo
nm	Nanometros
ORF	Marco de lectura abierta
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
RBS	Sitio de unión del ribosoma
Red	Undecilprodigiosina
R2	Medio para regeneración de protoplastos
TAG	Triacilgliceroles
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TRI	Repetidos invertidos terminales
tsp	Sitio de inicio de la transcripción

## **JURADO EXAMINADOR**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>Dr. Sergio Sánchez Esquivel</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Dra. Alicia González Manjarrez</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Dr. Luis Servín González</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Dra. Amelia Farrés González -Sarabia</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Dra. Guadalupe Espin Ocampo</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Dra. Maria Elena Flores Carrasco Ocampo</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Dra. Gloria Soberón Chávez</b>

**Las investigaciones materia de esta tesis fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Luis Servín González, Depto. de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Luis Servín González por su tiempo y apoyo, así como por su paciente dedicación y constante esfuerzo para realizar este proyecto.**

**Agradezco a la MIBB Clementina Castro, a la QFB Aurora Osorio y a la MC Gabriela González su incondicional ayuda técnica durante la realización de este trabajo.**

**A lo largo de toda mi formación académica he tenido la fortuna de contar con la incondicional e invaluable atención y ayuda de los Doctores Jorge Calderón<sup>†</sup>, Carlos Larralde, Carlos Huitrón y Juan Pedro Laclette, a quienes agradezco su orientación, aliento y apoyo durante mi estancia en el IIB.**

**Agradezco de manera especial a los miembros del jurado examinador por su amable y amistosa disposición para la revisión de esta tesis, así como sus comentarios y crítica discusión.**

**La edición del presente trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de Gabriela González, Ma. Luisa Haces, Roberto Risco y Daniel Hernández.**

## DEDICATORIAS

A mis padres y mi hermanita

*Carmen Ortega A. y Heriberto Valdez R.*

*Ma. Talia Valdez Ortega*

Con todo mi amor para ustedes que siempre están a mi lado, por su apoyo, confianza y amor incondicionales; porque ustedes son mi motivo y mejor aliento para seguir adelante. Este sueño realizado les pertenece a ustedes totalmente ya que está basado en sus sacrificios y esfuerzos para hacer de mi todo lo que soy. Los amo eternamente.

*Soy parte del sol,  
como mi ojo es parte de mi.  
Mi pie sabe que soy parte de la tierra,  
y mi sangre es parte del mar.  
Mi alma sabe que soy parte de la raza humana,  
y mi espíritu es parte de mi nación.  
Y en mi propio ser, soy parte de mi familia.*

David H. Lawrence

A toda mi familia, especialmente a mis abuelitos

*Sabina Alvarado, Leovigildo Ortega, Trinidad Ramirez y Salvador Valdez.*

A mis tias Casillas Ramirez.



A la persona más importante y especial de mi vida

*Alejandro Flores Ceballos*

Porque tu presencia y ejemplo de entrega, dedicación y perseverancia me dieron la energía y fuerza necesarias para concretar este sueño. Pero sobretodo por la enorme dicha de poder estar a tu lado; con mi admiración, respeto y eterno amor por ti.

*¿Cómo te amo? Déjame contar las maneras.*

*Te amo con toda la profundidad y extensión y altura  
que mi alma puede alcanzar cuando corre detrás  
del Ser y la Gracia ideales.*

*Te amo con la intensidad de la necesidad  
cotidiana, a la luz del sol y a la de las velas.*

*Te amo libremente, como luchan los hombres por la justicia.*

*Te amo puramente, como cuando se termina una plegaria.*

*Te amo con la pasión que pongo  
en mis viejos dolores y con la fe de mi infancia.*

*Te amo con un amor que creí perder  
al perder a mis santos; con el aliento, sonrisas, lágrimas, de toda mi vida;  
y si pluguiera a Dios, te amaría mejor después de muerta.*

E.B. Browning.

Al mejor y más sincero amigo y confidente

*Raúl Flores Leyva*

Por todo su tiempo y paciente atención; porque conocerlo me ha ayudado a crecer y mejorar como persona. Con todo mi cariño y deseando que nuestra amistad sea eterna.

A mis eternos amigos

Mamá Aurora, mamá Clementina y Marisol, por su ayuda, apoyo, porras, jalones de orejas, regaños, consejos y todo lo que compartimos en los buenos y malos momentos.

Alex Padilla, Mónica Viveros, Ignacio Terrazas, Tzipe Govezensky, Daniel Menéndez y Lilia Galván.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio

Gabriela González, Ma. Luisa Haces, Paula Licon, Karla Téllez, Socorro Salazar, Miguel Serrano, Gerardo González, Daniel Hernández, Héctor, Erick, Julio y Zahaed.

Y recuerden:

Trabajen bien, como yo.

Ante la duda, tírenlo y repítanlo.

Ante la misma duda, acudan a quien sabe.

Pórtense mal, pero cuídense.

Y sobretodo, siempre sonrían.

*In memoriam*

**Dr. Jorge Calderón Jiménez**

## I. RESUMEN

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas habitantes del suelo que crecen formando largas hifas multinucleadas, las cuales se ramifican repetidamente conforme se elongan para formar primero un micelio vegetativo que crece profundamente dentro del substrato y que, por una serie de señales no del todo conocidas, sufre una diferenciación morfológica y fisiológica. La diferenciación morfológica involucra la formación de un micelio aéreo que se desarrolla a expensas del micelio vegetativo, y que finalmente da origen a las cadenas de esporas. El estudio de estas bacterias es de gran interés por su complejo ciclo de diferenciación morfológica, y su extraordinaria habilidad para producir antibióticos y numerosas enzimas extracelulares de gran aplicación en la medicina y la industria. La mayoría de las investigaciones sobre la regulación metabólica se ha centrado en la regulación de síntesis de antibióticos, en tanto que la regulación de las fuentes de carbono para el metabolismo secundario ha recibido poca atención. El estudio de los factores que influyen en la síntesis del antibiótico actinorrodina de *Streptomyces coelicolor* está facilitado por su fenotipo coloreado, lo cual permite una simple y rápida inspección visual.

En este trabajo reportamos la clonación y caracterización del operón *lipAR* de *S. coelicolor* A3(2), el cual está contenido en un fragmento NotI-MluI de 6293 kb que incluye a otros dos genes. El gen *lipA* codifica para una lipasa extracelular de 29 kDa y su expresión es dependiente de la fase del crecimiento de la bacteria. La proteína codificada por *lipR* es un activador transcripcional requerido para la expresión de *lipA*, con quien está acoplado transcripcionalmente. Cuando células que contienen al operón *lipAR* completo,

clonado en un plásmido múlticopia, se cultivan en medio LB líquido, se detecta una actividad lipolítica máxima durante el inicio de la fase estacionaria, la cual decae progresivamente. Cuando las mismas células son cultivadas en medio R2, la actividad lipolítica se detecta también a partir de la fase estacionaria y no decae. En ambos tipos de medio de cultivo no hay secreción de lipasa ni actividad lipolítica cuando el gen *lipR* está ausente. Cuando el gen *lipA* está bajo el control transcripcional y traduccional del promotor del gen *tipA*, el cual es inducible por tioestreptona, se detecta actividad lipolítica durante la fase exponencial temprana, justo cuando se da la inducción por el antibiótico. A fin de evaluar si el operón *lipAR* influye en la síntesis de la actinorrodina, un antibiótico policétido, se obtuvo una cepa de *S. coelicolor* con el operón cromosomal interrumpido; la producción de la actinorrodina de esta mutante está disminuida en relación a la cepa silvestre. Así, la lipasa extracelular clonada influye en la biosíntesis este antibiótico a través del aporte de las unidades de carbono provistas por los triacilgliceroles. En base a la estructura terciaria obtenida por cristalografía de rayos X de la lipasa de *Streptomyces exfoliatus* M11, y tomando en cuenta que presenta una alta homología en su estructura primaria con la lipasa de *S. coelicolor*, se realizó un modelo de la topología y estructura de esta última, encontrándose que presentan características compartidas muy particulares, las que las distingue como una nueva familia de lipasas bacteriales.

## Ia. ABSTRACT

In this work we report the cloning and characterization of the *lipAR* operon from *S. coelicolor* A(2), which is contained in a 6.293 kb NotI-MluI fragment that included other two genes. Gene *lipA* encodes for a extracellular lipase of >30 kDa that is expressed in a growth phase depend-manner, and that required the presence of the contiguous gene *lipR*, which is transcriptional coupled with *lipA*. The protein encoded by *lipR* has characteristics of a transcriptional activator. When cells harbouring the complete operon were cultivated in LB-Sac liquid medium, maximum lipase activity was detected when the culture reached stationary phase, but this activity progressively failed. By the other hand, when the same cells were cultivated in R2 liquid medium, the lipolytic activity increased along the time. In both type of medium there was not neither lipases secretion nor lipolytic activity when the *lipA* gene and their promoter was subcloned alone in the same vector. When the *lipA* gene was under the transcriptional and translational control of the thio-inducible *tipA* promoter, lipolytic activity was detected in the early exponential phase, as soon as the antibiotic was added. Lipolytic activity was observed without induction, but only after achieved the stationary phase of growth. In order to investigated if the *lipAR* operon influenced the actinorhodin biosynthesis, we obtained a clone of *S. coelicolor* with the chromosomal genes disrupted by the insertion of the *tsr* gene. When the actinorhodin production from this mutated clone was evaluated in SMM medium, it was showed that the antibiotic production is lower than the production from the wildtype strain. Thus, the extracellular lipase cloned regulate the actinorhodin biosynthesis through the supplied of units of carbons from TAG. Using the crystal structure of the *S. exfoliatus* M11 lipase as a template, it was possible to

model the structure of the *S. coelicolor* A3(2) enzyme. The model revealed that most of the differences were in the exposed part of the structure.

## II. INTRODUCCION

### PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LA DIFERENCIACIÓN

#### MORFOLÓGICA

El ciclo de vida de *Streptomyces* comienza con la germinación de las esporas, en cada una de las cuales se desarrolla uno o más tubos germinales que dan lugar a las hifas altamente ramificadas que constituyen al **micelio vegetativo** (Fig. 1). Este micelio vegetativo está firmemente adherido al substrato [1-3]. La división celular ocurre muy raramente en este micelio cuyas hifas contienen varias copias del cromosoma (micelio sincicial). Durante esta fase se da un rápido crecimiento celular caracterizado por un metabolismo de asimilación [4]. Pocas horas después de la germinación la colonia empieza a transformarse, dando lugar a la formación del **micelio aéreo** (Fig. 1) que está constituido por nuevas hifas que se desarrollan a expensas del micelio vegetativo y que emergen del substrato. En esta fase se da una intensa división celular en las hifas aéreas, en donde se forman septos uniformemente espaciados, lo cual da como resultado la formación de cadenas de esporas. Las esporas son uninucleadas y de un color gris característico y altamente resistentes a la desecación. Durante esta fase de diferenciación morfológica se da también la diferenciación fisiológica o metabolismo secundario, produciéndose una extraordinaria gama de antibióticos, enzimas extracelulares, herbicidas, agente tumorales y varias moléculas más de gran uso en la industria. La asociación temporal entre la formación del micelio aéreo y la producción de antibióticos no parece ser casual ya que se han identificado mecanismos de control genético para ambos procesos que presentan interconexión [1-4].



Durante el ciclo de vida se distingue una fase de transición que corresponde al período durante el cual el micelio vegetativo es lisado para obtener nutrientes que son usados para construir el micelio aéreo y las esporas [4]. Durante esta fase de transición cesa momentáneamente el crecimiento de la colonia y se da una importante disminución en las síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, las cuales se incrementan nuevamente al inicio de la diferenciación morfológica sin que se note una importante depleción de los nutrientes presentes en el medio ya que al transferir micelio vegetativo a medio de cultivo fresco no se retarda ni se anula la formación del micelio aéreo. Sin embargo, dado que al aumentar la masa celular durante el desarrollo de la colonia, el transporte de los nutrientes puede estar afectado, y por lo tanto podría generar cierta tensión (stress) que puede ser tomada como una señal para iniciar la formación del micelio aéreo [4]. Durante esta fase de transición estos organismos son altamente vulnerables a la competencia con otros microorganismos presentes en su entorno biológico. Esta vulnerabilidad, actuando como una presión de selección, les pudo llevar a desarrollar su alta capacidad de producción de antibióticos y enzimas extracelulares, muchos de los cuales inhiben específicamente diversas bacterias y hongos. Conforme la colonia va creciendo se empiezan a detectar diversos compuestos de almacenamiento y diversos metabolitos secundarios en las partes más alejadas de los ápices. [5]. Estas partes de la colonia crecen más lentamente ya sea por limitación de los nutrientes o porque las condiciones del medio inhiben el crecimiento. La formación del micelio aéreo se da después de un corto período de síntesis macromolecular y parece involucrar el reuso del material asimilado por el micelio vegetativo [4]. En *Streptomyces griseus* se ha observado que una disminución en la poza intracelular de GTP y una acumulación del ppGpp se asocian con el inicio de la diferenciación morfológica [6].

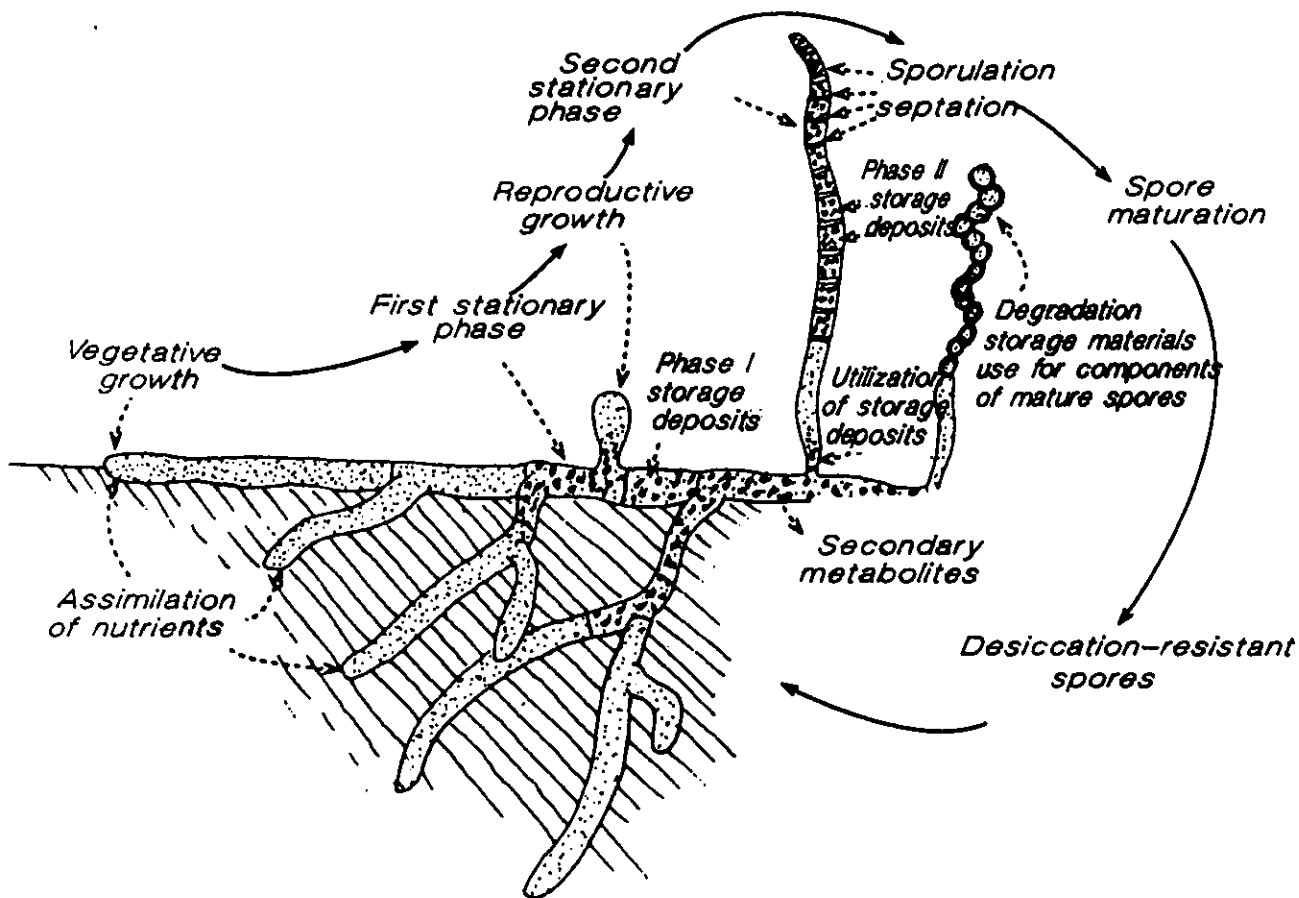


Figura 1. Representación esquemática de una colonia de *Streptomyces*, indicando las diferentes fases fisiológicas de las hifas. Los depósitos de almacén hacen referencia principalmente al glucógeno [194].

Las hifas de ambos micelios son estructural y fisiológicamente diferentes; las del micelio vegetativo son cenocíticas con septos infrecuentes, que cuando se forman se localizan en la parte más vieja del micelio, y las hifas aéreas se originan como ramificaciones de las hifas del substrato presumiblemente por depleción nutricional [1-3]. Dada la similitud con el tipo de crecimiento que presentan los hongos filamentosos se sugirió que las hifas de los *Streptomyces* crecerían también por extensión ápical, es decir, por la depositación de los polímeros que constituyen la pared celular en la parte más puntual de la hifa. Se comprobó con *S. coelicolor* A3(2) que efectivamente el crecimiento se da principalmente por la extensión de la pared celular de los ápices de las hifas [7]. La pared celular está formada por péptidoglucano (mureína) que es un polímero constituido por cadenas polisacáridas paralelas unidas covalentemente por medio de cadenas peptídicas transversales. La unidad básica es un disacárido constituido por N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico con enlaces  $\beta(1-4)$ , y al resto carboxilo de este último se unen cadenas laterales tetrapeptídicas, cada una de las cuales contiene L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico o D-glutamina. El péptidoglucano forma una estructura covalente continua alrededor de la célula [8]. Aún cuando no se conoce a detalle el mecanismo de incorporación del nuevo material de la pared celular, se sabe que en este género bacteriano no existe recambio del peptidoglucano y que la elongación se da conforme se va depositando el material recién sintetizado. Se piensa que el nuevo material es transportado a la zona de extensión por difusión, a diferencia de lo que ocurre en los hongos existe un sistema de transporte específico que incluye vesículas unidas a la membrana y estructuras del citoesqueleto. Conforme se aleja del ápice la incorporación del peptidoglucano disminuye notablemente. Se han observado algunas pequeñas zonas de depósito en

regiones alejadas del ápice, que pueden corresponder a material nuevo en tránsito a su destino final, o bien a material que ha quedado varado una vez que la pared se ha elongado [7,9]. En cuanto a la morfología de las hifas, éstas tiene un diámetro promedio menor a 1  $\mu\text{m}$  con un tipo de crecimiento isotrópico donde la forma de la punta, semi-elipsoidea, resulta de una interacción entre la presión hidrostática interna dada por el crecimiento, y las propiedades elásticas de la pared del ápice. La forma que se obtiene es aquella que minimiza la energía de superficie dentro de la pared. Se supone que la elasticidad de la pared celular decrece conforme se está más alejado del ápice, encontrándose una completa rigidez en las regiones más basales de la zona de extensión, originada por la disminución en la incorporación del nuevo material, y con lo cual se obtienen hifas de un diámetro constante [10]. En cuanto a la erección de las hifas aéreas, se han identificado proteínas que son secretadas por la misma colonia y que cubren la superficie de estas hifas y las esporas (proteínas Sap), las cuales se cree que ayudan a que las hifas puedan romper la tensión superficial para escapar del ambiente acuoso del substrato y permitiendo así su crecimiento hacia el espacio aéreo, en tanto que estas mismas proteínas contribuirían a formar en las esporas una superficie hidrofóbica que les ayudaría a evadir el medio acuoso circundante y su posterior dispersión [11]. Cuando las hifas aéreas dejan de crecer se detecta una intensa división celular que da como resultado la aparición de septos que están regularmente espaciados y son formados sincrónicamente a lo largo de estas hifas, separando así los compartimentos que darán origen a las esporas, quienes contienen una sola copia del cromosoma. Las hifas aéreas esporulantes presentan dos zonas claramente distintas: la zona más basal, cercana al punto de ramificación, constituye un tallo que no presenta septos, en tanto que la zona más distal es la que sufre septación y se

enrolla sobre sí misma, formando cadenas que pueden contener cientos de esporas. No se sabe que señal determina la división y longitud de estas zonas. Los septos se forman por el crecimiento hacia dentro de la hifa de un doble anillo de la membrana y la pared celular, el cual se une en el centro para formar un travesaño doble. Esta distribución de la pared celular permite la separación de las esporas adyacentes. Después de que el septo se ha formado se deposita nuevo peptidoglucano tanto en el septo como en la cara interna de la pared de la hifa parental, lo cual hace que la pared de la spora se engrose significativamente [11]. Conforme se van redondeando las esporas, su pared se engrosa y se deposita en ella un pigmento gris característico del género, el glucógeno desaparece y aumenta el porcentaje de trealosa [5]. En las cadenas maduras de esporas, éstas son mantenidas juntas por una frágil envoltura constituida por restos de la pared celular de la hifa parental y una capa externa hidrofóbica conocida como la vaina fibrosa que está ausente de las hifas vegetativas [11].

Durante la diferenciación se acumula glucógeno en dos fases temporal y espacialmente diferentes. La fase I de depósito ocurre en la zona central del micelio, aproximadamente en la interfase de tiempo entre la presencia del micelio vegetativo y la aparición de las hifas aéreas. La fase II de depósito se da en las cadenas de esporas en desarrollo, coincidiendo en tiempo con la formación de los septos de esporulación [5]. El glucógeno no se detecta en el micelio vegetativo joven, en los soportes de las cadenas de esporas ni en las esporas maduras, lo cual sugiere que este compuesto de almacenamiento tiene un importante papel en la diferenciación morfológica. Así, el glucógeno detectado en la fase I podría actuar como fuente de nutrientes para el crecimiento de las hifas aéreas, en tanto que sus productos de degradación se depositarían en los ápices de las hifas para su

reuso en la maduración de las esporas. La ciclización metabólica del glucógeno podría además ayudar a crear la turgencia celular necesaria para la erección de las hifas del micelio aéreo (fase I), en tanto que la condensación del glucógeno que se observa durante la fase II provocaría un decremento del turgor que podría estar involucrado en el cese del crecimiento de las hifas aéreas y la formación de los septos de esporulación [5].

## ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El DNA de *Streptomyces* tiene un alto contenido de G+C que en promedio es del 74%, si bien en los genes individuales puede variar del 61% al 79.7%, encontrándose que la tercera posición de los codones es quien presenta el mayor contenido, del 76.4 %- 98.3%, en tanto que la primera posición tiene un contenido medio y la segunda posición es donde se presenta el menor porcentaje de G+C [12,13]. Estas bacterias son de las pocas que tienen un cromosoma lineal, cuyo tamaño es de cerca de 8 Mb en todas las especies estudiadas. Cada molécula cromosomal tiene proteínas unidas covalentemente a sus extremos 5' libres. La secuencia de DNA de un extremo del cromosoma está inversamente repetida en el otro extremo, al igual que en algunos de sus plásmidos lineales. Estos repetidos invertidos terminales (TRIs) o telómeros varían en tamaño, desde 24 kb como en *S. griseus* a 550 kb en *Streptomyces rimosus*, y dentro de ellos se encuentran algunos pequeños repetidos palindrómicos involucrados en la replicación del DNA [14-17]. El cromosoma puede ser circularizado espontánea o artificialmente por recombinación homóloga entre los telómeros, con pérdida total o parcial de los TIRs; las mutantes con cromosoma circular crecen mucho más lento y presentan una esporulación reducida además de una mayor inestabilidad genética [17]. El código genético de estas bacterias ha sido influenciado por presiones mutacionales direccionales sobre la composición de bases, desviando así el contenido de

G+C. Estas presiones mutacionales llevaron a cambios en el uso de codones, estableciendo un empleo especie específico, que a su vez influye en la expresión de los genes. La mayoría de la variación que se observa en la composición de bases está dada por cambios en la tercera posición de los codones, aún cuando no hay que despreciar la significativa contribución dada por la primera y segunda posición. El análisis de 64 genes reportados de *Streptomyces* permitió avanzar en el conocimiento del patrón de uso de codones de esta bacteria [12], donde el mayor contenido de G+C se presenta en la tercera posición de los codones (76.4%-98.3%), en tanto que la primera y la segunda posición tienen un contenido medio y bajo respectivamente. En *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* los genes altamente expresados presentan una fuerte desviación en el uso de codones, y utilizan aquellos que son reconocidos por especies de tRNA abundantes [18-19]. La selección de los codones así reconocidos aparentemente se dio para mejorar la eficiencia y precisión de la traducción, es decir por una presión de selección traduccional. Los estreptomicetos son capaces de traducir todos los 61 codones posibles y por lo tanto deben presumiblemente poseer todos los tRNA requeridos. El gen *EF-Tu* de *S. coelicolor A3(2)* es el único gen conocido que se sabe que es altamente expresado, su contenido de G+C en la tercera posición es del 92.7 % y presenta un patrón de uso de codones similar al de 16 genes altamente expresados de *Micrococcus luteus*, otra bacteria Gram positiva que tiene también un genoma de alto contenido de G+C; dos de estos 16 genes tienen un alto contenido de G+C en la tercera posición y sin embargo son débilmente expresados. La similitud del patrón de uso de codones de estas dos bacterias indica que la selección traduccional puede estar influyendo en el uso de codones en *Streptomyces* solo cuando se trata de genes altamente expresados [12].

No se sabe cómo se originó la marcada desviación que existe en el patrón de uso de codones de *Streptomyces*. Si se toma en cuenta que el contenido de G+C de sus genes de RNA ribosomales son del 59 % para la subunidad 16S, 57 % para la 23S y 60 % para la 5S, los cuales son muy cercanos a los de otras eubacterias y significativamente menores que los del genoma total, lo que indicaría una fuerte presión selectiva sobre estos componentes estructurales del cromosoma, lo cual hace pensar que el contenido de G+C de estas bacterias no fue inicialmente alto, sino que éste derivó de uno más moderado que sufrió mutaciones acompañadas o no de selección. Sin selección, el cambio genético pudo ser fijado por la adaptación de las maquinarias de replicación del DNA o de la traducción. Quizás una deficiencia parcial en la habilidad para sintetizar bases A o T durante la evolución de este grupo pudo dar una ventaja selectiva suficiente para la aparición de una maquinaria de replicación del DNA y un sistema de reparación con preferencia por G+C sobre T+A [12]. Singer y Ames [20] proponen que el alto contenido de G+C de *Streptomyces*, las mixobacterias y algunos hongos filamentosos son una estrategia adoptada para reducir los efectos de la radiación UV, esto basándose en el hecho de que los residuos de T adyacentes constituyen el blanco principal de mutaciones causadas por este agente, minimizando de esta manera los letales efectos causados por este tipo de radiación.

Por otra parte, mientras que en *E. coli* y en especies relacionadas la identificación en su DNA de secuencias codificadoras de proteínas es un proceso simple, dada la gran cantidad de genes descritos que permiten hacer comparaciones, la identificación de estas regiones en *Streptomyces* es muy complicada ya que las regiones codificadoras y no codificadoras presentan un contenido de G+C muy similar. A lo anterior se suma la presencia de extensos marcos de lectura abierta (ORFs) que frecuentemente ocurren en



varios de los seis posibles ORFs, presumiblemente por la insuficiencia de residuos A+T, que tiene como consecuencia una ocurrencia de codones de paro traduccional infrecuente, además del poco conocimiento sobre las señales de inicio de la traducción y el uso de codones de sus genes. Sin embargo la pronunciada distribución asimétrica del contenido de G+C en la tercera posición de los codones permitió desarrollar un análisis computacional que permite identificar fácilmente regiones codificadoras en la secuencia de DNA de *Streptomyces* [13].

Actualmente se cuenta con mapas físicos detallados de los cromosomas de *Streptomyces lividans* y *S. coelicolor* A3(2) quienes están estrechamente relacionados y que presentan una organización genética estructuralmente similar. Los genes codificadores para funciones involucradas en la transcripción, traducción, y replicación del DNA están localizados considerablemente más dispersos que en otras bacterias, en tanto que los genes codificadores de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de carbohidratos presentan una distribución en el mapa no azarosa, observándose que de las 12 posiciones identificadas para estos genes, 6 están localizadas dentro de una zona de aproximadamente 700 kb de uno u otro de los extremos del cromosoma, otros 3 están en la mitad derecha del mapa y los 3 restantes se localizan fuera de estos dos sitios. Una de las características más importantes de estos mapas es la ausencia casi total de genes identificados en una región de 1.2 Mb en ambos extremos (casi un tercio del cromosoma). En estas regiones genéticamente silenciosas del cromosoma no hay ningún gen involucrado en la síntesis macromolecular ni genes involucrados en las vías metabólicas principales, salvo por el gen *argG* cuya frecuencia de delección es una causa bien conocida de auxotrofia de arginina en *S. coelicolor* [21-22].

## REPLICACION DEL DNA

El origen de replicación (*oriC*) se localiza en el centro del cromosoma [23], y la replicación se da bidireccionalmente hacia los telómeros, generando en la cadena líder (leading strand) extremos 3' sobresalientes. Los extremos 5' recesivos de la cadena rezagada (lagging strand) que son producidos por la unión de los fragmentos de Okasaki adyacentes, son extendidos para obtener moléculas duplex completas por un mecanismo no conocido que puede involucrar a las proteínas terminales (TP) y/o a las regiones palindrómicas presentes en los telómeros [16, 24].

La síntesis del DNA en los replicones lineales como el fago  $\phi 29$  y los adenovirus se da de manera continua a partir de los telómeros por un mecanismo que desplaza la cadena correspondiente del duplex parental, y donde las proteínas unidas a los extremos 5' sirven de primer para iniciar la síntesis de la cadena líder sin que se formen los extremos recesivos 5' que se dan cuando la replicación parte del centro del cromosoma. La formación de estos extremos implica la necesaria presencia de un mecanismo de extensión de los telómeros que permita la obtención de cadenas dobles de DNA completas. La presencia de 7 secuencias palindrómicas altamente conservadas en varias especies de *Streptomyces* y en los plásmidos lineales pSLA2, pSCL1 y SLP2 [16], indican su posible participación en el mecanismo de obtención de cadenas completas de DNA. En el modelo más aceptado para este mecanismo, el palíndromo I del extremo 3' sobresaliente se aparea con la secuencia complementaria presente en el palíndromo IV formando un duplex de DNA con forma de "Y" con un tallo de 13 bp, en tanto que los palíndromos II y III se doblan sobre sí mismos y ayudan a mantener juntos y estables a I y IV. Tres lazos adicionales se forman con los palíndromos V, VI y VII. La formación del duplex formado por los palíndromos I y IV

proporciona un sitio de reconocimiento para la TP, la cual entonces sirve de primer para la síntesis de la cadena rezagada, usando como templado al extremo de cadena sencilla 3' sobresaliente (Fig. 2). El extremo de DNA naciente es entonces ligada al fragmento de Okazaki adyacente (que es el más distal en relación al sitio de inicio de la replicación), completándose así la extensión de los telómeros [17, 24-25].

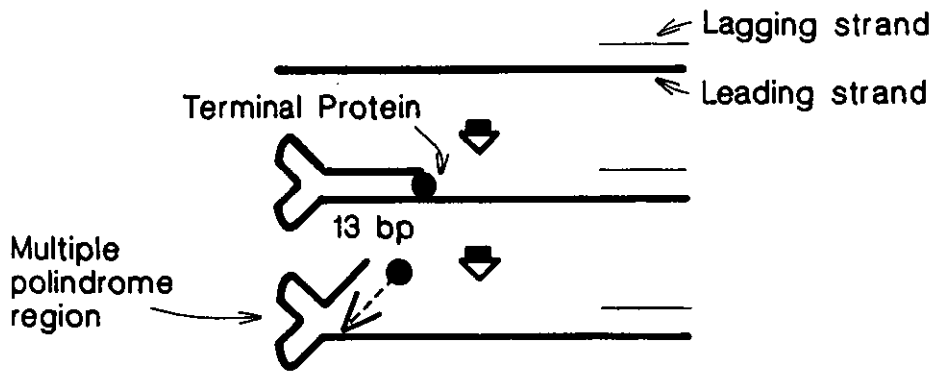


Figura 2. Posible mecanismo de relleno de los extremos 5' recesivos del cromosoma lineal de *Streptomyces*. Las cadenas líder (leading) y rezagada (lagging) están indicadas por las líneas gruesa y delgada respectivamente; el círculo corresponde a las proteínas terminales (TP); la parte superior representa un intermediario replicativo con un extremo 3' protuberante en la cadena líder. En este modelo, el extremo 3' sobresaliente de la cadena líder se dobla sobre sí mismo, asistido por la presencia de múltiples palíndromos. El segmento de DNA duplex resultante está formado por una extremidad de 13 pares de bases, correspondiente al palíndromo distal del telómero. Una secuencia complementaria localizada cerca de la base de la parte sobresaliente es reconocida por la TP, la cual sirve entonces como un primer a partir del cual se puede dar la síntesis de DNA, obteniéndose de esta manera un cromosoma con los extremos completos [17].

## INESTABILIDAD GENÉTICA DEL CROMOSOMA

Los extremos cromosomales y sus regiones adyacentes son altamente inestables ya que tienden a presentar frecuentes eventos de amplificaciones, deleciones y recircularización.

Las deleciones tienen como consecuencia la aparición de mutantes afectados en genes no esenciales como en el caso del gen *argG* de *S. coelicolor*; en *S. lividans* los fenotipos  $Cml^s$

y Arg<sup>-</sup> resultan por la delección del marcador de resistencia a cloranfenicol (*cmlR*) y el gen de la arginina succinato sintetasa (*argG*); en *S. griseus* el gen *afsA*, que es esencial para la formación del factor A está deletado en algunas mutantes. En la mayoría de los casos las delecciones incluyen uno o ambos telómeros, y también se han observado delecciones internas que no producen la pérdida de los extremos [14-15, 26-29]. Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismos de estas delecciones, el más simple de los cuales implica la ausencia de las proteínas terminales (TP) de los extremos 5' lo que permitiría el fácil acceso de exonucleasas a los extremos del cromosoma, pero hasta el momento no se han encontrado cromosomas sin estas proteínas que permitan validar a este modelo. Otra opción involucra la transposición intramolecular de un transposón como el Tn4811 que está presente en la región media de uno de los TIRs de *S. lividans*, el cual al moverse de este TIR a una región cualquiera en el otro extremo del cromosoma puede ocasionar la delección de ambos telómeros y la circularización del cromosoma. La transposición intermolecular entre cromosomas puede también causar un intercambio de los TIRs y generar delecciones y duplicaciones de DNA internas; la presencia de un TIR de *S. lividans* en el plásmido lineal SLP2 se dio probablemente por un evento de transposición de este tipo [30]. En otro modelo, cuando una horquilla de replicación procedente del centro del cromosoma llega a un punto de cadena sencilla (generado por algún agente mutagénico como la radiación UV y la mitomicina C) se colapsaría. La horquilla colapsada se repararía por recombinación homóloga, lo cual permitiría que la replicación continuara, sin embargo una recombinación ilegítima entre un extremo libre y una secuencia del otro extremo del cromosoma provocaría la delección de ambos telómeros y la circularización del cromosoma. Del mismo modo, la recombinación del extremo libre con una secuencia hacia arriba o

hacia abajo del punto del colapso de la horquilla de replicación, daría origen a un cromosoma que conservaría sus telómeros pero presentaría deleciones o amplificaciones internas como ocurre en *Streptomyces ambofaciens* [29]. Este modelo implica que si la frecuencia de recombinación es baja, también decrece la posibilidad de reparaciones y por lo tanto se elevaría la frecuencia de deleciones. En *S. lividans*, cuando la proteína RecA está truncada y su actividad de recombinación por lo tanto es baja, se obtienen 70 veces más mutantes Cml<sup>r</sup> [30].

Las regiones del DNA que pueden sufrir amplificación se designan AUD (unidades de DNA amplificables) y las secuencias amplificadas como ADS (secuencia de DNA amplificada). Las AUD se localizan principalmente en las regiones inestables del cromosoma y pueden también ser deletadas total o parcialmente. Los fragmentos amplificados pueden ser retenidos en grupos de varios cientos de copias por cromosoma, y estas amplificaciones parecen ocurrir sin una aparente presión de selección y usualmente van acompañadas de grandes deleciones, sin que se sepa hasta el momento como es la interdependencia de ambos eventos [15-17, 31]. Las amplificaciones del cromosoma pueden ser de Tipo I donde las ADS en mutantes independientes son diferentes pero involucran a la misma región del cromosoma, y en las amplificaciones del Tipo II las ADS son las mismas en diferentes mutantes pero varían en su tamaño y puntos finales [15-17, 31]. Las amplificaciones del tipo I se han observado en *Streptomyces glaucescens*, *S. lividans* y *S. ambofaciens* y no se conoce el mecanismo por el que se dan. Las amplificaciones de tipo II se han observado principalmente en *S. lividans*, donde una AUD1 de 5.7 kb es amplificada en tanto que una región vecina que incluye al gen *argG* es deletada. La AUD1 tiene tres secuencias repetidas de 1 kb y dos de 4.7 kb alternadas en la

misma dirección (1→4.7→1→4.7→1), los repetidos de 4.7 codifican un producto que presenta cierta homología con la quitinasa y los de 1 kb codifican para proteínas de unión al DNA de la familia de represores LacI/GalR; esta especie presenta otra AUD a 600 kb de un extremo del cromosoma y en el extremo contrario a 300 kb se localiza una tercera AUD. Las deleciones que se dan durante la amplificación incluyen las secuencias localizadas entre las AUD y los extremos cromosomales, y las secuencias repetidas directas presentes en las AUD son importantes para la amplificación. Se cree que las ADS ayudan a estabilizar al cromosoma después de la pérdida de sus extremos, protegiéndolos contra la pérdida de genes esenciales. Se propone un modelo de amplificación donde, como primer paso, se debe generar una estructura precursora constituido por una copia circularizada del DNA que se va a amplificar unida a un extremo del cromosoma por una horquilla de replicación. A partir de esta AUD se generarían múltiples copias por una replicación de tipo círculo rodante. Este modelo, para el caso de un cromosoma lineal, llevaría a la pérdida de todas las secuencias localizadas distalmente a la región amplificada, incluyendo a los telómeros, lo cual permitiría que la región terminal sea reemplazada por la estructura amplificada. Esto llevaría a una situación dinámica en la que existe un balance entre los mecanismos de amplificación y los de deleción [32].

## **ASPECTOS RELEVANTES DEL METABOLISMO SECUNDARIO**

*Streptomyces* spp es conocido por su capacidad para sintetizar una gran variedad de moléculas que tienen aplicaciones en la medicina y la agricultura, incluyendo drogas antiparasitarias como la avermectina, agentes fungicidas como la polioxina, drogas antitumorales como la adriamicina, inmunosupresores como la rapamicina; además de diversas enzimas extracelulares que incluyen proteasas, fosfatasas, xilanasas, celulasas,

amilasas, lipasas y nucleasas, e importante y característicamente sintetizan la mayoría (70% ) de los antibióticos conocidos. En cultivos sólidos de *Streptomyces* la secreción de las enzimas extracelulares coincide temporalmente con el inicio de la diferenciación morfológica y la biosíntesis de antibióticos. Todos estos procesos son reprimidos por las condiciones nutricionales que favorecen altos grados de crecimiento [1-3, 33-34]. Se han clonado varios genes que codifican para diferentes enzimas extracelulares, así como los genes estructurales y de resistencia de varios antibióticos. Los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de estos genes son virtualmente desconocidos, y además de la inducción de amilasa por dextrinas y la regulación por represión catabólica de los genes de la amilasa y la agarasa, deben existir otros mecanismos para regular la producción simultánea de varias enzimas extracelulares. El aislamiento de mutaciones simples (*bld*) que bloquean el inicio de la esporulación y la producción de antibióticos fue la evidencia genética de que ambos procesos están sujetos a mecanismos de control comunes [1-3].

*S. coelicolor* A3(2) produce cuatro antibióticos biosintética y genéticamente diferentes, dos de éstos son pigmentados, la actinorrodina (Act) es de color azul en pH básico y rojo en pH ácido, y la undecilprodigiosina (Red) es de color rojo en pH básico y amarillo en pH ácido, y los otros son la metilenomicina (Mmy) y el antibiótico dependiente de calcio (CDA). Los cuatro loci biosintéticos están genéticamente definidos y clonados [35-40].

La síntesis de los antibióticos pigmentados es dependiente de la fase del crecimiento de la colonia; en medio sólido generalmente coincide con la diferenciación morfológica, y en medios líquidos su producción se detecta hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria, después de la activación transcripcional de los genes regulatorios específicos

[41, 42]. La actinorrodina es un policétido aromático, donde una cadena de 16 carbonos forma el esqueleto de cada mitad de la molécula, cada unidad monomérica es sintetizada a partir de una molécula de acetil coenzima A que funciona como la unidad de inicio, y siete moléculas de malonil coenzima A (unidades de extensión). Estas unidades son condensadas, con la pérdida de CO<sub>2</sub>, de una manera secuencial por la policétido sintasa (PKS) de la actinorrodina, en un proceso similar al mecanismo de la biosíntesis de los ácidos grasos [43, 44]. El intermediario lineal sufre posteriormente ciclizaciones y modificaciones que producen la molécula final. El grupo de 22 genes involucrados en la síntesis de este antibiótico, genes *act*, se encuentra en una región continua de 22 kb, e incluye a los genes estructurales de la PKS, los genes encargados de las modificaciones del producto de la PKS, así como los genes regulatorios de su expresión y los de la exportación del antibiótico [39-49]. La PKS de la actinorrodina consiste de una serie de ORFs que codifican para proteínas que presentan similitudes con los componentes de la ácido graso sintasa de *E. coli* [44]; Las proteínas que conforman a la PKS son una cetosintasa (KS), que cataliza la condensación de las unidades acilos; una proteína acarreadora de acilos (ACP), la cual tiene una doble función recibiendo las unidades malonil de extensión y manteniendo anclada la cadena policétida en crecimiento; la proteína determinante del largo de la cadena (CLF); y una cetoreductasa que está involucrada en reducir la cadena intermediaria. En adición a los genes *actII-ORF4*, *redD* y *redZ* que regulan específicamente la expresión de los genes biosintéticos, los cuales se discutirán en una sección más adelante, existen otros genes que influyen en la producción de los antibióticos de *S. coelicolor*; las mutaciones en los genes *absA* y *absB* inhiben la producción de los cuatro antibióticos[50-54]; las mutaciones en el gen *afsB* bloquean la producción de Act y Red, y solo reduce la



producción de CDA y Mmy [55]; y las mutaciones en *afsR* provocan la pérdida de la producción de Act y Red, y con una marcada reducción en la síntesis de CDA [56].

## CARACTERISTICAS MOLECULARES Y GENETICAS DE LA

### DIFERENCIACION MORFOLOGICA

#### EL FACTOR A

Una de las más interesantes características de *Streptomyces* es la producción de moléculas señales endógenas y exógenas, designadas autorreguladores. El más estudiado de estos es el 2-(6-metilheptanoil)-3R-hidroximetil-4-butanólido o Factor A. Cuando esta molécula extracelular se agregaba en pequeñas cantidades (nmoles) a una mutante *blt* de *S. griseus* se observó que estimulaba la formación de estreptomicina, la resistencia a este mismo antibiótico y la esporulación [57]. El factor A realiza su función regulatoria a través de su unión a una proteína receptora específica citoplásmica, con quien presenta una relación molar de 1:1 y una constante de afinidad de 0.7 nM, la cual presenta una especificidad de ligando estricta ya que no une butanólidos con estructuras similares, y se estima que existen de 30-40 copias de esta proteína por genoma [58]. La proteína receptora (PR-AF) actúa como un regulador tipo represor, cuando el factor A está ausente o en bajo nivel, al inicio del crecimiento, la PR-AF se une a una región específica de uno o varios genes, probablemente un promotor, y reprime su expresión. Cuando el factor A alcanza cierta concentración se une a PR-AF, con lo cual ésta deja libre la región del DNA donde estaba unida, y el gen deja de estar reprimido y puede iniciar su transcripción. El factor A es producido un poco antes de que se inicien la producción de la estreptomicina y la

esporulación, y las mutantes que no tienen a la PR-AF presentan estos eventos de la diferenciación a los dos días de cultivo, produciendo 10 veces más del antibiótico, lo cual se atribuye a que la transcripción de algunos de los genes biosintéticos está aumentada por la falta de represión por la PR-AF. Esto implica que la concentración intracelular del factor A determina el momento en que los genes del metabolismo secundario dejan de estar reprimidos por la PR-AF [59]. La producción del factor A en *S. griseus* es inestable, y su determinante genético, *afsA*, se localiza en un plásmido en tanto que en *S. coelicolor* A3(2) es un gen cromosomal, su producción es estable y no hay una PR-AF, y en esta especie no parece funcionar como un autorregulador, función que parece estar restringida a las cepas productoras de estreptomicina [58, 60]. Al examinar la expresión de los genes biosintéticos de la estreptomicina se observó que la transcripción de *aphD* (determinante de la resistencia), *strR* (activador transcripcional) y *strB* (gen biosintético) se detecta solamente cuando hay producción del factor A. Posteriormente se estableció que el blanco directo del factor A es el gen *strR*, cuya transcripción se puede incrementar hasta 10 veces cuando éste se agrega exógenamente. Ya que el gen que confiere resistencia, *aphD*, se transcribe a partir del promotor del gen *strR*, entonces la adquisición de esta barrera de protección se da rápidamente un poco antes de la inducción de la biosíntesis del antibiótico [61]. La proteína que responde al factor A es una proteína activadora de la transcripción que se une en la región de -288 a -191 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen *strR*; esta proteína solo está presente en las cepas silvestres, y en las mutantes *afsA* se produce cuando el factor A es agregado exógenamente [62]. Con estos datos se propuso un modelo para la regulación por el factor A de la biosíntesis de estreptomicina, el cual propone que durante las primeras fases del crecimiento, cuando la concentración

intracelular de este regulador es baja, la PR-AF reprime la expresión de un gen X no identificado; cuando se alcanzan ciertos niveles del factor A, éste se une a la PR-AF y se permite la expresión del gen X, el cual influye sobre la diferenciación morfológica y fisiológica; la proteína X reduce la expresión del gen que codifica para la proteína activadora dependiente del factor A, la cual a su vez se une y activa al promotor del gen *strR*. Dada la transcripción conjunta de *atrR* y *aphD*, en este momento se da la inducción de resistencia y la proteína StrR activa la transcripción de los genes biosintéticos de la estreptomicina. La proteína activadora dependiente del factor A no interviene en la formación del micelio aéreo ya que existen mutantes *afsA* que no producen estreptomicina y si esporulan [62-63].

#### **REGULACION DE LA DIFERENCIACION POR LOS GENES *bld***

Las mutantes de *S. coelicolor* que presentan micelio vegetativo pero no desarrollan micelio aéreo son denominadas **mutantes *bld*** (de bald, calvo) por el fenotipo de sus colonias vegetativas. Todas las mutantes *bld* identificadas hasta el momento en diferentes laboratorios se han agrupado en seis clases en base a las características fisiológicas que presentan, y de éstas solo las mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldG* y *bldH* están representadas por más de un alelo, en tanto que de *bldD* solo se conoce un alelo. Las mutaciones de este tipo tienen un importante efecto pleiotrópico sobre el metabolismo secundario ya que afectan la producción de los cuatro antibióticos de *S. coelicolor* en diferente medida; undecilprodigiosina puede ser sintetizada por mutantes *bldA* cuando se crecen en medio de cultivo con bajo fosfato; la actinorrodina es producida por mutantes *bldB* bajo tiempos largos de incubación; la metilenomicina y otro de los antibióticos pigmentados son producidos por *bldC*. El fenotipo de estas mutantes depende de la fuente de carbono

presente en el medio de cultivo, cuando se crecen en medio mínimo (MM) con glucosa o celobiosa las colonias son calvas, y cuando se usa MM con manitol, maltosa o galactosa las colonias forman micelio aéreo y esporulan, sin embargo la producción de antibióticos no es restaurada en estas condiciones [64-65]. Fue este efecto pleiotrópico lo que llevó a pensar en la existencia de mecanismos de control genético compartidos entre los eventos de la diferenciaciones morfológica y fisiológica. Así, los genes *bld* influyen sobre el metabolismo secundario (producción de antibióticos y enzimas extracelulares), metabolismo de almacén (glucógeno) y el desarrollo morfológico (formación del micelio aéreo y Saps). A continuación se revisarán las características sobresalientes de los genes *bld* y su participación en la diferenciación.

#### **EL GEN *bldA***

El primer gen *bld* clonado fue el *bldA* y su identificación fue a partir de un fragmento PstI de DNA de 5.6 kb proveniente de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145, presente en un vector derivado del bacteriofago  $\phi$ C31, que restauraba la formación del micelio aéreo y la esporulación en cinco mutantes independientes *bldA39*, *bldA35*, *bldA16*, *bldA1* y *bldA62* [66]. Un fragmento de 870 bp derivado del fragmento de 5.7 kb originalmente clonado, también complementaba todas las mutantes *bld* usadas, y el análisis de su secuencia nucleotídica reveló la presencia de un gen codificador para un RNA de transferencia [67-68]. Este tRNA presenta todas las características generales de los tRNA conocidos involucrados en la síntesis de proteínas, salvo que no presenta el par GG de los nucleótidos 18-19 del loop D, que es altamente conservado. Su anticodón reconoce el codón UUA que es específico de leucina y que en *Streptomyces* presenta una muy baja frecuencia de uso [12]. La transcripción del gen *bldA* se detecta en etapas tardías del

crecimiento, coincidiendo con la formación del micelio aéreo y la diferenciación fisiológica [67-68]. Cuando se conoció la secuencia nucleotídica de los alelos mutados de este gen se encontró que la mutante *bldA39* presenta cambiado el anticodón UUA por UGA que es para serina, en tanto que las mutantes *bldA1*, *bldA16* y *bldA62* difieren solamente en una base que ocasiona apareamientos erróneos en el tallo D o en tallo del anticodón y en la mutación *bldA33* en el loop del anticodón [68]. Analizando la expresión fenotípica de genes con diferente contenido de codones TTA en cepas de *S. coelicolor* y *S. lividans bldA<sup>+</sup>* y *bldA<sup>-</sup>*, fue posible establecer que el producto del gen *bldA* es el principal medio por el cual se traducen los codones UUA en *Streptomyces* spp. De esta manera se identificaron genes cuya expresión depende grandemente de la presencia del gen *bldA*, como los genes de *E. coli ampC* (7 codones TTA) y *lacZ* (7 codones), y el gen *carB* (2 codones) de *Streptomyces thermotolerans*; en tanto que los genes *hyg* (1 codon TTA) de *Streptomyces hygroscopicus* y *aad* (3 codones) del plásmido pR5381, dependen solo parcialmente de *bldA* para su expresión, y cuando al gen *carB* se le cambian los dos codones TTA su expresión se convierte en *bldA* independiente [69]. Aún cuando la presencia de codones UUA reduce marcadamente el nivel de traducción de ciertos mRNA en *S. coelicolor*, en la ausencia de un gen *bldA* funcional existen ciertos genes (*hyg* y *aad*) que siguen confiriendo cierto nivel de resistencia a las mutantes *bldA* ante los antibióticos correspondientes (higromicina y espectinomomicina, respectivamente). En el caso del gen *hyg*, esto se atribuye a un bajo nivel de traducción dado por una interacción codón-anticodón imperfecta, pero lo suficientemente importante como para producir una cantidad adecuada de la higromicina fosfotransferasa responsable de la resistencia [69].

Al analizar las secuencias disponibles de diferentes genes de *Streptomyces* se observó que la presencia del codón UUA es muy rara y su ocurrencia no es azarosa con respecto a la clase de genes en la que se ubican en diferentes especies. Este codón está ausente en los genes conocidos involucrados en los pasos enzimáticos de la síntesis de antibióticos, en tanto que casi todos los genes que contienen este codón están involucrados en la resistencia a antibióticos y en la exportación de éstos, así como en el desarrollo del micelio aéreo; sin embargo no todos los genes involucrados en la diferenciación morfológica y fisiológica presentan codones TTA [70]. Estos hallazgos llevaron a la hipótesis de que los codones TTA son exclusivos de genes del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, y que están ausentes en los genes necesarios para el crecimiento vegetativo, lo cual convertiría al gen *bldA* en un mecanismo de regulación del desarrollo, limitando la traducción de los mRNA con codones UUA a las fases tardías del crecimiento, cuando su producto funcional está predominantemente presente [66-70]. La función regulatoria de *bldA* sobre la diferenciación fue reforzada por la observación de que la expresión de los genes estructurales de la actinorrodina y la undecilprodigiosina están transcripcionalmente bloqueados en las mutantes *bldA* [71]; a esto se sumó la observación de que en cultivos en medio sólido (R2YE) y líquido (YEME) el transcrito primario de *bldA* es relativamente abundante en las fases iniciales del crecimiento, en tanto que el transcrito correspondiente al tRNA maduro se acumula marcadamente solo en los tiempos tardíos [72].

La influencia de *bldA* sobre la diferenciación fisiológica de *S. coelicolor* está bien establecida en el caso de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina. En el caso de la actinorrodina, cuya producción es fase dependiente, existe un gen activador de la

transcripción, *actII-ORF4*, que actúa sobre los genes estructurales de la biosíntesis. Este gen activador contiene un codón TTA, que cuando es cambiado por el codón sinónimo TTG provoca que la producción de actinorrodina se vuelva *bldA* independiente [46]. Que este codón TTA es el blanco directo para el control traduccional por *bldA* fue evidente, pero que éste mecanismo sea el control maestro de la diferenciación fisiológica quedo en entredicho cuando se observó que (i) la transcripción del gen *actII-ORF4* es dependiente de la fase del crecimiento, alcanzando en cultivos líquidos una expresión máxima durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria; la transcripción de los genes estructurales *actIII* y *actVI-ORF1* se da después de que se acumulan los máximos niveles del transcrito del gen activador y su abundancia se incrementa conforme el cultivo entra a la fase estacionaria. Cuando *actII-ORF4* está presente en múlticopia, su transcripción presenta un incremento considerable, detectándose desde la fase exponencial en niveles bajos que van aumentando para permanecer constantes en la fase estacionaria, en tanto que en las mismas condiciones de cultivo, el perfil de la transcripción del gen *actIII* no es alterada, provocando así que la producción de actinorrodina se presente desde etapas tempranas del crecimiento exponencial, lo que indica que la síntesis de este antibiótico está solamente limitada por la disponibilidad de la proteína ActII-ORF4 [41]; (ii) en relación a la transcripción de *bldA* también en medio líquido se observa un perfil de expresión diferente ya que, si bien el transcrito maduro se detecta desde tiempos tempranos del crecimiento exponencial en niveles significativos, éstos solo sufren un muy ligero incremento durante esta misma fase para después permanecer constantes a todo lo largo del crecimiento Este transcrito maduro es total e igualmente funcional durante todo el tiempo del desarrollo, es decir su actividad traduccional presenta la misma eficiencia durante todas

las fases del crecimiento [72]; (iii) al sustituir el codón TTA por TTG del gen *actII-ORF4*, la producción de actinorrodina no se para sino que se convierte en *bldA* independiente [46]. Esto demuestra que si bien *bldA* ejerce cierto control sobre la diferenciación fisiológica de *S. coelicolor*, no constituye el mecanismo principal de regulación como se había propuesto (Fig. 3).

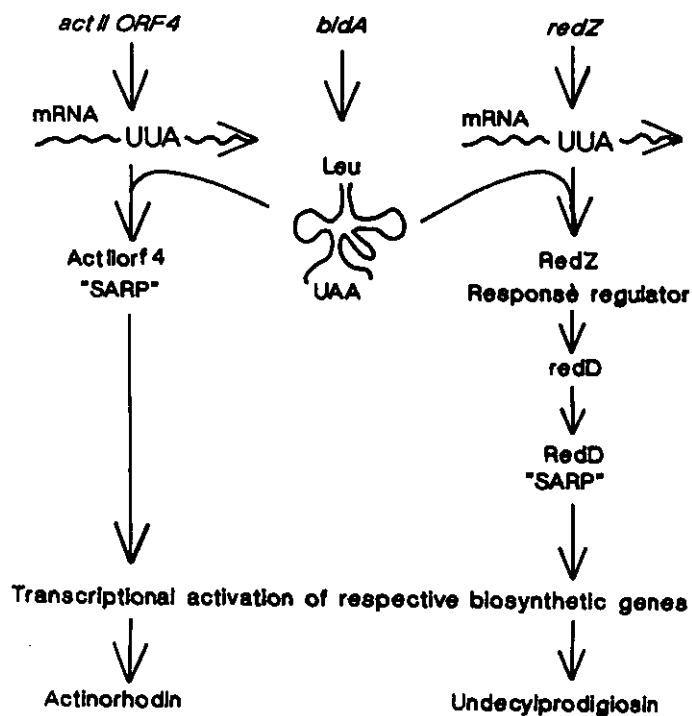


Figura 3 . Los codones UUA, presentes en los transcritos de los genes reguladores de la producción de antibióticos, son el blanco del tRNA codificado por el gen *bldA* [194].

En el caso de la undecilprodigiosina, cuya producción es también fase dependiente, igualmente existe un gen activador de la transcripción que actúa sobre los genes biosintéticos (Fig. 3)[73-74]. El producto de este gen activador, *redD*, codifica para una proteína que presenta alta homología con la proteína codificada por *actII-ORF4* [46, 74]. Ni



los genes estructurales ni *redD* presentan codones TTA [74], y a pesar de ello no hay producción de antibiótico en las mutantes *bldA* [71]. Posteriormente se identificó un gen, *redZ*, en mutantes *bldA* donde la producción de undecilprodigiosina, pero no de actinorrodina, está afectada. Al analizar la secuencia nucleotídica de *redZ* se identificó un codón TTA, y cuando este gen está en múltiplo se restaura la producción del antibiótico en mutantes donde se ha eliminado la copia de *redZ* del cromosoma, al igual que en *S. lividans* que normalmente no la produce a pesar de contar con todos los genes biosintéticos intactos. La transcripción de *redZ* se detecta desde el crecimiento exponencial y su nivel se incrementa marcadamente durante la transición a la fase estacionaria, en tanto que la transcripción de *redD* se detecta solo en las fases de transición y estacionaria. Si se elimina la copia cromosomal de *redZ* no hay transcripción de *redD*, y al eliminar a este último del cromosoma, la transcripción de *redZ* no se afecta. La presencia de *redZ*, pero no *redD*, en múltiplo restablece la producción del antibiótico de mutantes *bldA* en medio rico pero no en medio mínimo [75]. También *actIII-ORF4* en múltiplo restablece la producción de actinorrodina en las mutantes *bldA* en los mismos medios de cultivo [76]. Para ambos antibióticos esta respuesta dependiente del medio de cultivo se explica por un bajo nivel de traducción *bldA* independiente, pero que, dado el incremento en la cantidad de los mRNA correspondientes, se alcanzan niveles suficientes de los correspondientes activadores como para obtener cierta transcripción de los genes biosintéticos. Importantemente hay transcripción de *redZ* durante todo el crecimiento en mutantes *bldA*, lo cual indica que se autoregula negativamente. Así, la proteína RedZ es un activador transcripcional de *redD*, y aunque la transcripción de *redZ* no depende de *bldA*, la traducción de su mRNA sí, siendo en este punto donde la producción del antibiótico está regulada por *bldA*. Así, al igual que

en la producción de actinorrodina, *bldA* es importante para la biosíntesis de undecilprodigiosina a través de un gen activador aunque en diferente forma y tampoco constituye el control maestro [75]. La influencia de *bldA* sobre la diferenciación morfológica no es clara ya que no se han identificado codones TTA en ningún gen involucrado en la formación del micelio aéreo o esporas, aún cuando es evidente su participación en este proceso como se verá más adelante en relación a las proteínas Sap.

### **EL GEN *bldB***

Las mutantes *bldB* son las más afectadas de todas las mutantes calvas, ya que tienen defectos en la producción de los antibióticos, el desarrollo del micelio aéreo, y el control por represión catabólica. Se identificó un fragmento PstI de 4 kb de DNA cromosomal de *S. coelicolor* que complementa algunas mutantes *bldB* [77], y a partir de este fragmento se subclonó una región de 573 pb, en donde se había previamente identificado un ORF cuyo producto es un péptido de 99 aa. Al estar presente este fragmento en multicopia se observa complementación total de 3 de los 7 alelos del gen *bldB*, cuando se crecen en medio de cultivo con glucosa, manitol, galactosa y glicerol. Este mismo fragmento en un plásmido unicopia complementa otras 2 mutantes *bldB* diferentes. Al analizar la secuencia de este ORF en cada mutante se identificaron dos mutaciones en la región -10 del promotor, otra que consiste en el cambio de una base en el sitio de unión del ribosoma (RBS), otra que introduce un codón de paro que origina una proteína de 71 aa, una de cambio de marco que da lugar a una proteína de 134 aa, y dos que provocan el cambio de la tirosina 21 a una cisteína y una leucina. Al medir la expresión del promotor del gen *bldB* a través de su fusión al gen reportero *xylE* presente en un plásmido de bajo número de copias, se observó

que ésta es baja durante el crecimiento vegetativo y que se incrementa conforme las células entran a la fase estacionaria, con niveles de expresión más altos cuando crecen en glucosa que con manitol. En la mutante *bldB15* la expresión de esta fusión es mucho mayor y está desregulada ya que se expresa desde el crecimiento vegetativo en medio con glucosa o manitol, ésto llevo a sugerir que la expresión temporal del gen *bldB* está controlada por su propio producto. Al analizar la proteína codificada por *ORF99* se identificó un motivo hélice-vuelta-hélice en el extremo carboxilo, lo cual la hace una proteína de unión al DNA. Las mutantes que presentan el cambio de la tirosina 21 señalan la importancia de este residuo para la estructura y función de la proteína. Las mutantes *bldB* no presentan represión catabólica por glucosa sobre los operones de la galactosa, el glicerol ni de la agarasa, y la complementación con el alelo silvestre restaura todos los defectos observados en estas mutantes [78]. Cuando la proteína glucosa cinasa (GlkA) se sobreexpresa causa la aparición de un fenotipo igual al de las mutantes *glkA<sup>-</sup>*, lo que sugiere que la sobreproducción de la glucosa cinasa titula a otra proteína que interactúa con ella, y es esta interacción la que provoca que se pierda la represión por glucosa. Ya que las mutantes *bldB* tienen el mismo fenotipo que las mutantes *glkA<sup>-</sup>* en cuanto a la pérdida de la represión por glucosa, se propone una posible asociación entre las proteínas BldB y GlkA para la adecuada regulación por catabolitos, quienes formarían un complejo que interactuaría directamente con regiones regulatorias en el DNA (a través del dominio de unión al DNA presente en BldB), y alterando, por lo tanto, los niveles de transcripción de los promotores controlados por catabolitos o la transcripción de genes requeridos para el control catabólico [79]. Ya que las mutantes *bldB* son las más afectadas pleiotrópicamente en su fenotipo, se

propone que el producto de este gen ocupa el primer lugar en el proceso de inicio de la diferenciación.

## EL GEN *bldD*

Hasta el momento solo se ha identificado un alelo de *bldD* (*bldD53*), quien causa un fenotipo igual al de *bldA*, es decir, en MM con glucosa no producen ninguno de los 4 antibióticos típicos de *S. coelicolor* y no desarrollan micelio aéreo, aún cuando se han observado en sus colonias hifas aéreas malformadas y postradas sobre el micelio vegetativo. Todas estas alteraciones se corrigen cuando son crecidas en presencia de manitol. El gen *bldD* se identificó a partir de una biblioteca de DNA de la cepa silvestre de *S. coelicolor*, de donde un fragmento Sau3A1 de 3.5 kb presentaba capacidad para complementar los defectos en la producción de antibióticos y micelio aéreo de la mutante *bldD*. Dentro de este fragmento se identificaron dos ORF incompletos y tres completos, subclonándose uno de estos últimos, el ORF3, en un plásmido de alto número de copias, el cual se utilizó para transformar protoplastos de tres cepas diferentes de la mutante *bldD53* (que son diferentes en el fondo genético). Todas recuperaron el fenotipo silvestre. Este ORF3 corresponde al gen *bldD*, el cual codifica para una proteína de 167 aa con un Mr de 18167, y presenta abundantes aa cargados (22 básicos y 21 ácidos), con una región rica en prolina/glicina cerca del centro izquierdo lo que la hace una posible proteína citoplasmática con dos dominios separables. Presenta también un motivo hélice-vuelta-hélice con homología con la secuencia clásica de la familia LysR de reguladores transcripcionales. En análisis tipo Northern blot y mapeo por S1 se observó que los transcritos de *bldD* son más abundantes durante la fase de transición y que después de 24 horas de crecimiento su expresión decrece dramáticamente. Interesantemente, en la mutante *bldD* (cepa HU66)

también se detectan transcritos del gen *bldD* en niveles altos durante todo el tiempo de cultivo; esta sobreexpresión de los transcritos en la mutante que no tiene una proteína BldD indica que el producto funcional regula negativamente su propia expresión, y ejerce un efecto positivo global en la transcripción de genes involucrados en el inicio de la diferenciación morfológica y fisiológica [80]. La mutación *bldD53* causa el cambio de la tirosina de la posición 62, por una cisteína, que es crítica para la función o estabilidad de la proteína ya que este cambio anula la actividad de BldD y causa la sobreexpresión de su transcrito. Este trabajo descarta a *bldD* como el gen estructural de la péptido sintetasa involucrada en la síntesis de SapB ( que es sintetizada de manera no ribosomal) como se había propuesto, apoyando más la idea alternativa de que constituye un gen regulador necesario para la expresión de dicha péptido sintetasa, si bien no parece ser esta su única función.

#### **EL GEN *bldI***

Al examinar la capacidad de traducción de los codones UUA de las diferentes mutantes *bld* usando al gen reportero *ampC* que presenta 7 de estos codones, se observó que las mutantes *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldF*, *bldG* y *bldH* sí presentaban actividad de  $\beta$ -lactamasa pero las mutantes *bldI* no, a pesar de la presencia de abundantes transcritos del gen *ampC*. Todas las mutantes contenían transcritos de la forma madura del tRNA codificado por *bldA* en niveles comparables a los de la cepa silvestre, pero en la cepa usada de la mutante *bldI* la expresión de *bldA* era mínima, aún cuando estaba presente en un plásmido de alto número de copias. La replicación de este plásmido se da en niveles similares en la cepa silvestre y en la cepa mutada *bldI*, y su perfil de expresión con relación al tiempo es igual en ambas cepas, lo que descarta un posible efecto atribuido al número de copias. El fenotipo de *bldI*

no es afectado por la fuente de carbono presente [77]; así, parece que estas mutantes carecen de un activador transcripcional positivo que se requiere para la máxima expresión de *bldA*, que puede estar interactuando directamente con el promotor de *bldA* o bien en otro gen no identificado cuyo producto sea también un gen activador. Alternativamente, dado los bajos niveles del transcrito maduro presentes en esta mutante, tal vez está afectada en el procesamiento del transcrito primario; sin embargo no se identificaron mRNA del tamaño correspondiente a este tipo de transcrito que apoyen este enfoque, lo cual podría sugerir entonces que tal vez que su RNA mensajero es muy inestable en esta cepa [81].

### **PROTEINAS ASOCIADAS A LAS ESPORAS (Sap)**

El grupo de R. Losick ha contribuido sobresalientemente en el conocimiento de las señales involucradas en el proceso de la diferenciación morfológica en *S. coelicolor*, donde identificó y caracterizó a unas pequeñas moléculas hidrofóbicas asociadas a las esporas, las proteínas Sap. Estas proteínas son secretadas por las colonias al inicio de la diferenciación, y se localizan en la superficie de las hifas aéreas y en la de las esporas maduras. A partir del lavado de las esporas se logró extraer a las proteínas SapA de 13 kDa, SapB de 3 kDa, SapC de 16 kDa, SapD de 41 kDa y SapE de 19 kDa [82]. Las tres últimas son codificadas por el plásmido SCPI que no es indispensable para los procesos de formación del micelio aéreo ni la esporulación [83]. La más estudiada de estas proteínas, SapB, contiene 18 aminoácidos de 8 tipos diferentes y tiene un peso molecular de 2027 Daltons (aún cuando en SDS-PAGE se estimó inicialmente en 3 kDa) y contiene residuos de azúcar o algún otro tipo de motivo en grupos carboxilo vecinos, lo cual influye en la diferencia observada entre la masa molecular y el tamaño. Utilizando la proteína purificada por la elución de la banda correspondiente de geles de acrilamida, se pudo obtener anticuerpos policlonales anti-SapB.

Con estos anticuerpos fue posible determinar que el tiempo de aparición de la proteína en cultivos sólidos coincide con el inicio de la formación del micelio aéreo, y se pudo observar que se difunde varios mm alrededor de las colonias. Utilizando este mismo enfoque no se detectó a la proteína SapB en cultivos de mutantes *bldA-D*, pero sí en las colonias de la mutante *whiG* (por white colony) lo cual indicó que su producción dependía de la presencia de los genes requeridos para la formación del micelio aéreo pero no requieren que éste se transforme en esporas. Se observó además que cepas con formación de abundante micelio aéreo producen más SapB que aquellas cepas que desarrollan un micelio aéreo moderado, en tanto que en medio líquido no se produce, lo cual llevó a definir a SapB como una proteína morfogenética [82]. A partir de esporas de *S. coelicolor* A3(2) mutagenizadas con nitrosoguanidina se obtuvieron dos cepas mutantes, JW17 y JW21, que no producen SapB, ni antibióticos, ni forman micelio aéreo. Cuando estas mutantes crecen cerca de colonias de la cepa silvestre o ciertas mutantes *bld* recuperan la capacidad para formar micelio aéreo [84]. Así, existe complementación extracelular entre cepas que no producen SapB como la mutante *bld217* (cepa JW17) y la mutante *bldC* (cepa J660), pero cuando crecen cerca una de la otra la primera forma micelio aéreo y produce a la proteína. Esto llevó a sugerir que la mutante *bldC* secreta una sustancia difusible que restaura la capacidad para diferenciarse morfológicamente en la mutante *bld217*, quien retiene al o a los genes involucrados en la producción de SapB pero está afectada en la producción de la señal molecular que dispara su síntesis y que corresponde a la sustancia presente en *bldC*. Con la mutante *bld221* (cepa JW21) también hay complementación extracelular ya que al crecerla cerca de colonias de la cepa silvestre o la mutante *whiF99* desarrolla micelio aéreo y es capaz de esporular, pero cuando la misma cepa JW21 crece cerca de mutantes *bldA*,

*bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG* y *bldH* no presenta diferenciación. Dado que la cepa silvestre y la mutante *whiF99* sí producen SapB (incluso esta última en mayor cantidad que la silvestre), y las cepas de mutantes *bld* usadas no la producen, la complementación extracelular dada por las dos primeras se debe a la presencia de SapB. Cuando se agrega SapB purificada a las colonias de JW21, éstas forman micelio aéreo de manera transitoria, y en las colonias de mucho tiempo de cultivo (7 a 10 días) las hifas aéreas que se desarrollan por la aplicación de SapB pura, se colapsan y yacen postradas sobre el micelio. Esto indica que es necesaria la presencia continua de SapB para que la colonia mantenga la integridad de su micelio aéreo. Las mutantes *bld* son capaces de formar micelio aéreo cuando se crecen en MM con manitol; en este mismo medio la mutante *bld221*, que en MM con glucosa no produce SapB ni forma micelio aéreo, también se diferencia morfológicamente aún cuando no se detecta producción de SapB en estas condiciones. Así, parece que la formación del micelio aéreo puede darse por dos vías, una en medio rico que es dependiente de la producción de SapB, y otra independiente de esta proteína que actúa cuando se utilizan medios de cultivos con fuentes de carbono pobres [84]. La biosíntesis de SapB es resistente a la presencia de cloranfenicol, lo cual sugiere que su síntesis está determinada por un péptido sintetasa no identificada aún y que inicialmente se pensó que podría estar codificada por el gen *bldD* ya que es el último en la cascada de señales, pero como se verá más adelante el producto *bldD* es un activador transcripcional, el cual posiblemente regule la expresión del gen estructural de la péptido sintetasa.

Ahora bien, cuando se crecen colonias de las mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG* y *bld261* cerca de la mutante *whiF99*, las primeras producen micelio aéreo en diferente medida y todas presentan esporulación, destacando la respuesta de la mutante *bld261* quien



desarrolla el micelio más abundantemente. Si se les agrega a estas mismas mutantes SapB pura directamente sobre la colonia también hay complementación, pero de manera transitoria. De esto resulta entonces que la incapacidad de las mutantes *bld* para diferenciarse morfológicamente se debe principalmente a un defecto en la producción de SapB, y dado que las mutantes de este tipo tienen un efecto pleiotrópico sobre la producción de antibióticos, y la adición de SapB restaura la formación del micelio aéreo pero no la producción de estos metabolitos secundarios, entonces algunos genes *bld* tienen una función separada de la producción de antibióticos. Otro resultado sobresaliente de estos estudios es la existencia de complementación extracelular unidireccional entre ciertos pares de mutantes *bld* [67], ya que al crecer una cerca de la otra por un período de 7 a 10 días en medio de cultivo rico (R2YE) una de ellas forma micelio aéreo, si bien no de manera abundante. De esta manera *bld261* es complementada por todas las otras mutantes, pero a su vez ella no complementa a ninguna; *bldA* y *bldH* no se complementan entre sí pero ambas son complementadas por todas las otras excepto por *bld261*, *bldG* es complementada sólo por *bldC* y *bldD*; y *bldC* es complementada sólo por *bldD*. Estos resultados muestran un patrón jerárquico de señales moleculares involucradas en la diferenciación de *Streptomyces* (Fig. 4), donde el orden de los genes en esta cascada de señales quedaría con *bld261* < *bldA*, *bldH* < *bldG* < *bldC* < *bldD*. La posición de *bldB* sería la misma que para *bldC* pero no complementa a *bldA* ni *bldH*, en tanto que *bldI* parece ser miembro del grupo *bldA/bldH* pero no es complementada por *bldC* y por lo tanto estas dos mutantes no fueron asignadas a algún grupo. La complementación extracelular también permite la producción de SapB en las mutantes *bld*, lo cual confirma su participación esencial en el proceso de diferenciación [85]. Cuando se transplantan colonias de *bld261* a un medio de cultivo

complementado por *bldD* se observa formación del micelio aéreo, lo que indica que *bldD* produce y libera una substancia, resistente al calor y la acción de proteasas, que interviene de alguna manera en la diferenciación. Tenemos entonces que los productos de los genes *bld* están involucrados directa o indirectamente en la síntesis o en la respuesta a estas señales. En el modelo más simple, si a cada grupo de complementación extracelular le corresponde solo una señal, existen entonces al menos 4 diferentes moléculas, o 4 diferentes modificaciones de la misma molécula, y cada señal dirige la síntesis y liberación de la siguiente, dando como resultado final la producción de SapB (Fig. 4). Así *bldD* presenta las 4 señales, *bldC* produce las tres primeras, *bldG* sólo tiene las dos primeras, *bldA* y *bldH* sólo la primera y *bld261* ninguna [84-85].

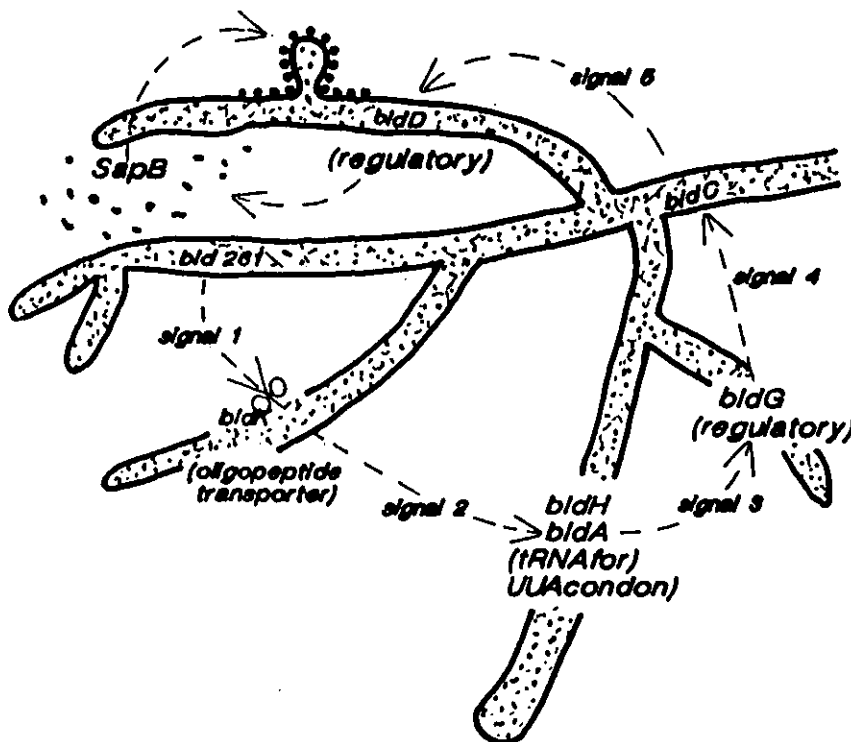


Figura 4. El papel de los genes *bld* en la señalización extracelular de *Streptomyces coelicolor*. El esquema está basado en el patrón de interacciones entre diferentes mutantes *bld*, algunas de las cuales tienen la habilidad para restaurar el crecimiento del micelio aéreo [194].

Posteriormente se identificó y caracterizó un locus *bld* nuevo que permitió definir un paso adicional en esta cascada de señales [86]. Este nuevo locus, designado *bldK* es requerido para la producción del micelio aéreo en *S. coelicolor* y no corresponde a ninguno de los loci *bld* previamente reportados; *bldK* es un operón constituido por 5 ORFs que codifican para polipéptidos homólogos a los componentes de la familia de transportadores transmembranales ABC, específicamente presenta homología con los transportadores ABC que importan oligopéptidos. Experimentos de complementación extracelular mostraron que *bldK* corrige el defecto de *bld261*, pero que esta mutante a su vez no logra complementar la mutación *bldK*. Cada una de las otras mutantes *bld* pueden complementar a *bldK* y ésta a su vez las complementa a ellas. De esta manera *bldK* se coloca entre *bld261* y *bldA/bldH* en la casada de señales mencionada antes. Dado que los polipéptidos producto del operón *bldK* constituyen un sistema de importación de señales peptídicas, las mutantes *bldK* están bloqueadas en la recepción y respuesta a la señal, pero son capaces de producirla y secretarla, en tanto que la mutación *bld261* bloquea la síntesis o secreción de la señal 1, pero como mantiene la permeasa BldK intacta pueden responder a dicha señal. De esta manera las colonias con fenotipo silvestre (*bld+*) producen y exportan la señal 1 de manera constitutiva y después de un periodo, durante el cual ésta se acumula extracelularmente, la importan a través de la permeasa oligopéptida BldK, desatándose entonces la síntesis de la señal 2, en una forma parecida a lo que ocurre en *Bacillus subtilis* y su sistema de oligopéptido permeasa SpoOK [87-88]. Cuando la mutante *bld261* se creció en medios de cultivo condicionados por mutantes *bldK*, *bldA*, *bldH*, *bldG*, *bldC* y *bldD* (es decir, medios de cultivo donde crecieron colonias de la cepa pertinente, y que son posteriormente

recuperados sin dichas colonias, las cuales actúan como donadoras de las moléculas señal), se observó que *bld261* desarrollaba un micelio aéreo muy abundante cuando se trataba del medio condicionado por la mutante *bldK*. Esto se explicó en base a la presencia de la permeasa BldK intacta en *bld261*, lo que indicaría que la molécula señal que induce la formación del micelio aéreo es producida por todas las mutantes pero la mayoría es importada a la misma colonia donadora por medio de la permeasa. Por el contrario, ya que esta permeasa está ausente en las mutantes *bldK*, la molécula señal producida por ella se acumula en grandes cantidades en el medio de cultivo donde crecieron sus colonias, de tal manera que las colonias receptoras (*bld261*) disponen grandemente de dicha señal y la importan por la permeasa. Esta idea es apoyada por el hecho de que mutantes dobles *bld261/bldK* no producen micelio aéreo cuando se crecen en medio condicionado por la mutante *bldK* [89].

Ahora bien, no todos los genes *bld* involucrados en la cascada de señales constituyen los genes estructurales de las moléculas señal que intervienen en la diferenciación. De hecho como ya se mencionó, el producto del gen *bldA* es un tRNA para leucina y *bldD* codifica para un activador transcripcional. Esto indica que la influencia de estos genes se da de alguna manera sobre el proceso de secreción o en la respuesta a las señales específicas. Tampoco hay que dejar de lado el hecho de que los defectos en el metabolismo secundario de las mutantes *bld* no son corregidos por la complementación extracelular, lo cual implicaría que las señales y los defectos morfológicos son una consecuencia indirecta de fallas del metabolismo secundario.

Por otra parte el gen de la proteína SapA ya está secuenciado y su sitio de inicio de la transcripción (*tsp*) ha sido determinado. Este gen se transcribe durante la formación del micelio aéreo, y también se da su expresión en cultivos líquidos donde no se da la diferenciación en tiempos tardíos. Su transcripción no está afectada en las mutantes *bldA-C*, *whiB*, *whiG*, *whiE* ni en *whiH*. Su región del promotor no presenta similitud con los promotores conocidos del género, y requiere para su actividad máxima secuencias localizadas entre las posiciones -178 a -72 y entre +40 a +120 con respecto al *tsp*. Si estas secuencias están ausentes no se afecta la regulación temporal de la transcripción, al igual que si se mantiene una región de solo 18 bp (posiciones -8 a -10). Sin embargo, mutaciones en la base de la posición +2 o cambios dobles de las posiciones +1 y +2 o +2 y +3 tienen un efecto dramático en la expresión temporal de SapA, detectándose actividad después de solo dos días de incubación. La ausencia de una región consenso en su promotor implica la participación de un factor sigma específico para su transcripción [90].

### **LOS GENES *bld* Y LA REPRESION CATABOLICA**

Cuando las mutantes *bld* crecen en MM con glucosa como fuente de carbono, no producen hifas aéreas ni antibióticos, y cuando se emplea MM con manitol estos procesos son parcialmente restablecidos de una manera característica en cada tipo de mutante. La más afectada de estas mutantes es *bldB* que no esporula ni produce antibióticos con ninguna de las diferentes fuentes de carbono que revierten los fenotipos de las otras mutantes *bld*, lo cual implica que existe una conexión entre la regulación de la utilización de la fuente de carbono y estos procesos morfológicos y fisiológicos. Al examinar las mutantes *bld* conocidas se encontró que están afectadas en la regulación de la expresión del promotor *galP1*, el cual dirige la transcripción del operón de la galactosa y que es glucosa sensible,

galactosa dependiente. La expresión de *galP1* en la cepa silvestre *bldB*<sup>+</sup> es muy pobre cuando se crece en presencia de glucosa o glicerol, y por el contrario, se detecta en niveles adecuados cuando se utiliza galactosa; la expresión de este mismo promotor en la mutante *bldB* es galactosa independiente y glucosa insensible, y esta expresión se detecta en niveles elevados cuando se crece en presencia de glicerol. Cuando la mutante *bldB* es complementada con el alelo silvestre, la expresión de *galP1* es igual a la que presenta la cepa silvestre. Por otro lado, la expresión de este mismo promotor en las mutante *bldA* es también elevada y desregulada cuando se crece en medios con glucosa o galactosa; este defecto es glucosa específico ya que la expresión de este promotor no se afecta cuando se usa glicerol o manitol como fuente de carbono; y al igual que con *bldB*, una copia del alelo silvestre permite restablecer la expresión de *galP1* a sus niveles normales. La expresión de *galP1* en ambos tipos de mutantes es a partir del mismo sitio de inicio de la transcripción que la cepa silvestre. El hecho de que una copia del alelo silvestre permita la expresión regulada de *galP1* indica que la misma lesión que causa el defecto morfológico en *bldA* y *bldB* también es la responsable del defecto en la regulación de este promotor, y esto da otro enfoque al papel de los genes *bld* sobre el desarrollo de *Streptomyces*. Las mutantes *bldB* están además afectadas en otros dos genes regulados por catabolitos. La producción en estas mutantes de la agarasa extracelular, que es reprimida por la presencia de glucosa, se convierte en glucosa insensible, y la expresión del operón del glicerol, que es glicerol dependiente y glucosa sensible, se detecta en células crecidas en presencia de glucosa, glicerol y glicerol más glucosa [78]. Como ya se demostró la formación del micelio aéreo en medios de cultivo ricos requiere una comunicación bioquímica entre las células [84-85], y las mutantes *bld* están afectadas en su habilidad para enviar y recibir las señales

moleculares involucradas en esta comunicación. Willey *et. al* [84-85] propusieron que los genes *bld* estaban involucrados en la generación de las señales extracelulares que son requeridas para la producción de SapB, la proteína morfogénica involucrada en la formación del micelio aéreo. Estos últimos resultados, aunados a la identificación de los productos de *bldA*, *bldK*, y *bldD*, indican que los genes *bld* no están involucrados en la producción de SapB, siendo más probable que estos genes intervengan en una etapa muy temprana de la morfogénesis y que el gen *sapB* sea uno de los genes que responden a los productos codificados por los genes *bld*. Así, más que estar explícitamente involucrados en la diferenciación morfológica, los diferentes genes *bld* están de alguna manera asociados a la generación o detección de las señales requeridas para evaluar el ambiente nutricional de la colonia, y donde la incapacidad para diferenciarse es una consecuencia secundaria de sus defectos en la represión catabólica [78].

#### **MUTANTES *bld* DE *Streptomyces griseus***

En la mayoría de las especies de *Streptomyces* la esporulación ocurre solo cuando se crecen en medios sólidos, sin embargo *S. griseus* puede ser inducida a esporular abundante y rápidamente en cultivos líquidos por ayuno de nitrógeno o fosfato y por limitación de nutrientes [91]; el estudio de esta especie ha permitido identificar algunos de los eventos fisiológicos asociados al inicio de la esporulación. Algunas cepas de *S. griseus* que no producen estreptomicina pierden simultáneamente la habilidad para producir al factor A y para esporular [57]. A partir de esporas mutagenizadas con nitrosoguanidina o etilmetano sulfonato se obtuvieron 22 mutantes calvas (*bld*) de *S. griseus*, las cuales fueron clasificadas en 4 clases en base a su habilidad para esporular en MM con glucosa en sólido y en cultivos líquidos por ayuno de fosfato. Las mutantes de la clase I pueden esporular

bajo ciertas condiciones y parecen estar afectadas en una etapa temprana del desarrollo, no presentan complementación con la cepa silvestre, y no producen estreptomicina ni undecilprodigiosina. Los miembros de la clase II esporulan solo cuando crecen cerca de la cepa silvestre o mutantes de las clases III o IV, y presentan cierto parecido a las mutantes *afsA* aunque siguen conservando la resistencia a estreptomicina. Las mutantes de la clase III presentan una esporulación condicionada ya que producen esporas, en menor nivel que la cepa silvestre, en MM con glucosa en sólido y en líquido pero no en medio complejo, y no producen estreptomicina ni undecilprodigiosina. Las mutantes clase IV solo se distinguen de la anterior por la producción de los dos antibióticos. Las mutantes de la clase III están divididas a su vez en tres grupos de complementación genética: las de la clase IIIA esporulan cuando son transformadas con el gen *orf1590*, las clase IIIB esporulan en presencia del gen *bldA*, y las clase IIIC no esporulan con ninguno de estos genes [92-93]. Al mismo tiempo que se obtuvieron estas mutantes se identificó un fragmento de DNA de *S. griseus*, el cual al estar presente en un plásmido múlticopia restauraba la esporulación de las mutantes clase IIIA. Este fragmento también está presente en *S. coelicolor*, *S. lividans* y *Streptomyces viridochromogenes* [92]. Al analizar la secuencia de este fragmento se identificó un ORF de 1590 nucleótidos, *orf1590*, y que contiene un codón TTA. La proteína deducida del gen *orf1590* presenta un motivo hélice-vuelta-hélice en su extremo amino. Al analizar su transcripción, con un gen reportero y por mapeo con S1, se identificaron dos transcritos de diferente tamaño, P1 y P2, que presentaban niveles casi iguales durante el crecimiento vegetativo, el transcrito de P2 decrece significativamente después del inicio de la esporulación. El transcrito P1 inicia 125 nucleótidos hacia arriba de la región codificadora, y P2 se localiza dentro de esta región a 134 nucleótidos hacia abajo del sitio



de inicio de la traducción, separado por 34 nucleótidos de un potencial segundo sitio de inicio de la traducción que está precedido a su vez por un posible RBS. Así, el gen *orf1590* parece codificar para dos proteínas relacionadas, una de 56 kDa (P56) que se origina a partir de la transcripción del promotor P1, y otra de 49.5 kDa que no contiene al extremo amino donde se localiza el motivo hélice-vuelta-hélice de unión al DNA y que se transcribe a partir de P2 [94]. Estas observaciones llevaron a proponer un modelo para la función *in vivo* del gen *orf1590* en el cual estas proteínas se asociarían a través de su región carboxilo para formar un heterodímero, el cual estaría presente de manera preponderante durante el crecimiento vegetativo y que no podría unirse al DNA; durante la esporulación, y después de que la concentración de la proteína P49.5 decrece, se produce proporcionalmente mayor cantidad de la P56, quien entonces forma homodímeros que pueden unirse al DNA y activar subsecuentes eventos de la esporulación [93]. La presencia del codón TTA en la región común de P56 y P49.5 sugiere que la traducción de ambas proteínas requiere al producto del gen *bldA*. Los genes homólogos a *orf1590* de las otras especies de *Streptomyces* conservan las características principales [92]. Cuando se impide la síntesis de P56 pero no la de P49.5, se elimina la función de *orf1590* al igual que cuando se sustituyen aminoácidos en su dominio de unión al DNA. Cuando se analizó la actividad de una proteína quimérica obtenida a través de la fusión de los supuestos sitios de inicio de la traducción de P56 y P49.5 con el gen reportero *neo*, que confiere resistencia a neomicina, se detectó actividad solo cuando la fusión incluía regiones del extremo amino de P56. Esto implicaría que existe solamente un promotor funcional y que el transcrito de menor tamaño, atribuido a la proteína P49.5 es un artefacto resultante de la degradación del RNA [95], estos resultados van en contra del modelo mencionado antes en cuanto a la formación de los hetero y

homodimeros, pero no de su función general. No se han podido obtener mutantes afectadas en este gen, lo que llevó a McCue [95] a postular que su función es vital, y que actúa reprimiendo la esporulación durante el crecimiento vegetativo y que su disrupción provocaría que este proceso fuera constitutivo, lo cual impediría el crecimiento de la colonia. Cuando el gen *orf1590* está presente en múltiple copia se suprime el defecto morfológico, es decir, se restaura la esporulación de las mutantes clase IIIA [95]. Cuando se induce la esporulación por ayuno de fosfato en mutantes de *S. griseus*, en las de la clase IIIB la segregación de los nucleoides se da antes que se sintetizan los septos de esporulación y ambos procesos se adelantan temporalmente, al igual que el engrosamiento de sus esporas. Las clase IIIA y IIIC forman las hifas esporogénicas en el micelio vegetativo y la segregación del material cromosomal también es anticipada [96], siendo evidente que, al igual que en *S. coelicolor*, las mutantes *bld* no están bloqueadas en el inicio de la esporulación, lo que llevó a sugerir que el fenotipo Bld se debe a que la erección de las hifas esporogénicas, y no su formación, está afectada, lo cual establecería una relación directa con SapB.

## **EL PAPEL DEL GLUCOGENO EN LA DIFERENCIACION CELULAR**

La síntesis del glucógeno presenta un ciclo metabólico que se ha asociado a la diferenciación morfológica; la conversión de la glucosa-1-fosfato a glucógeno reduciría la presión osmótica, lo cual contribuiría al cese del crecimiento de las hifas que está asociado con la esporulación. Cuando el glucógeno es degradado, la presión osmótica se incrementaría y eso influiría en el cambio de forma que se da al pasar de las cadenas de esporas con compartimentos cilíndricos a esporas individuales de forma elipsoidal [5]. La localización del glucógeno en dos fases temporal y espacialmente distintas deja claro que su

metabolismo está regulado de acuerdo al desarrollo [5]. Existe una importante reducción de los depósitos de glucógeno típicos de la fase I en mutantes *bld*, en tanto que se detecta su síntesis durante la esporulación ectópica inducida por cantidades excesivas del factor sigma codificado por el gen *whiG*, que es necesario para la esporulación normal de *Streptomyces* como se vio anteriormente. En *S. coelicolor* A3(2) se han identificado dos genes del metabolismo del glucógeno, *glgBI* y *glgBII* que codifican para dos isoformas de su enzima ramificante que cataliza la condensación de cadenas de glucógeno a la cadena principal por medio de enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Las mutantes *glgBI* presentan hifas aéreas sin los gránulos de glucógeno que se observan normalmente durante la fase I de depósito, en su lugar se observan conspicuos grupos irregulares de glucógeno con una morfología característica de moléculas de glucógeno con enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , es decir, no ramificado. En las hifas esporulantes de estas mismas mutantes sí se detectan los depósitos normales de glucógeno de la fase II, lo que indica que el gen *glgBI* es necesario únicamente para la fase I de la síntesis de este compuesto y codifica para la enzima ramificadora. Por otra parte, en las mutantes *glgBII* se observan muy pocos granulos de glucógeno en las hifas esporulantes, y su morfología también corresponde a la de glucógeno no ramificado; sin embargo estas mismas mutantes muestran abundantes gránulos de glucógeno normalmente ramificado en las hifas aéreas, lo cual indica que la enzima ramificante que actúa en la fase I de depósito no está afectada por la mutación en *glgBII*, y no es activa durante la esporulación, en tanto que el producto de *glgBII* es otra enzima ramificante que actúa específicamente en esta última etapa del desarrollo. Ambos tipos de mutantes no están afectadas en el crecimiento, ni en la producción de antibióticos pigmentados, ni en la formación del micelio aéreo ni en la esporulación [97]. Estos genes están localizados en diferentes regiones del cromosoma,

*glgBI* a 2500 kb y *glgBII* a 450 kb de su extremo derecho, y se han encontrado homólogos en varias especies de *Streptomyces* que se consideran el resultado de una duplicación temprana (*glgBII* se localiza de hecho en la región inestable del cromosoma). Esta duplicación de genes expresados en diferentes etapas del desarrollo parece incluir a otros componentes de la biosíntesis del glucógeno, ya que en *S. coelicolor* A3(2) existe un gen codificador para una ADP-glucosa pirofosforilasa específica de la fase I de depósito. El determinante genético de esta enzima, *glgCI*, se localiza aproximadamente a 1000 kb del extremo izquierdo del cromosoma y su interrupción da como resultado mutantes que pierden la actividad de la enzima responsable de suministrar al precursor activado (ADP-D-glucosa) para la síntesis del glucógeno. Esta actividad enzimática se pierde solo durante el inicio de la formación del micelio, estando presente durante el inicio de la esporulación. Análisis citológicos de las mutantes *glgCI* muestran que no hay depósito de glucógeno del tipo I pero si hay gránulos normales en las cadenas inmaduras de esporas que corresponden a la fase II de depósito [98]. Así, la enzima codificada por el gen *glgCI* es esencial para la fase I pero no para la fase II, lo cual indica entonces que debe existir otra enzima específica para esta fase. Al usar el gen *glgCI* como sonda en análisis tipo Southern blot contra DNA genómico de *S. coelicolor* A3(2) no se detectó ninguna otra señal diferente en condiciones de baja severidad, lo que sugiere que las secuencias de estos genes deben tener una considerable divergencia [98]. El fenotipo de las mutantes *glgCI* que están afectadas en la síntesis de glucógeno de fase I hicieron evidente que este compuesto de almacenamiento no es necesario para obtener un micelio aéreo normal, lo cual descarta su participación en la erección de las hifas como se había propuesto [2-3], pero no la hipótesis general de que otros compuestos de almacén, como lípidos o fosfolípidos, puedan estar

involucrados en la generación de la presión osmótica necesaria para la erección de las hifas y que puedan ser utilizados cuando falta el glucógeno o en combinación con este.

### MUTANTES QUE NO ESPORULAN: LOS GENES *whi*.

A partir del micelio vegetativo de *Streptomyces* se forman las hifas aéreas, adquiriendo la colonia en crecimiento una superficie de aspecto veloso de color blanco. Esta superficie de hifas aéreas va cambiando de color conforme el micelio se transforma para dar origen a las cadenas de esporas, las cuales son de color gris cuando ya están maduras. Existen mutantes de este microorganismo cuyo micelio aéreo conserva el fenotipo de color blanco bajo largos periodos de incubación, identificándose como **mutantes *whi*** (por white colony) en las cuales no se forman esporas maduras pigmentadas (Fig. 5). Cada clase de mutante presentan hifas aéreas con una morfología típica, por ejemplo en *whiG* son largas y rectas, en *whiH* hay hifas de enrollado laxo, y en *whiA* y *whiB* son de enrollado compacto y las hifas de *whiI* son enrolladas y con cierta fragmentación. Los fenotipos morfológicos de dobles mutantes construidos con alelos representativos de los 5 primeros loci de *whi* identificados permitió establecer las relaciones epistáticas entre ellos [99-100]. Se han identificado al menos 10 loci cromosomales necesarios para que las hifas aéreas se diferencien, los cuales están divididos en dos clases generales de genes *whi*: los genes de la esporulación temprana que son necesarios para la formación de los septos, y que están representados por *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* y *whiJ=whiC*; y en la otra clase de genes, los de la esporulación tardía, se encuentra *sigF*, el cual es el responsable de la maduración de los compartimentos pre-espora. Las mutantes afectadas en la biosíntesis del pigmento gris están definidas por el conjunto de genes *whiE* que especifica la producción de una policétido sintasa tipo II. El tercer grupo de genes que actúan en las fases finales de la

esporulación está representado por *fstZ* y *fstQ*, quienes codifican para proteínas involucradas en la formación de los septos.

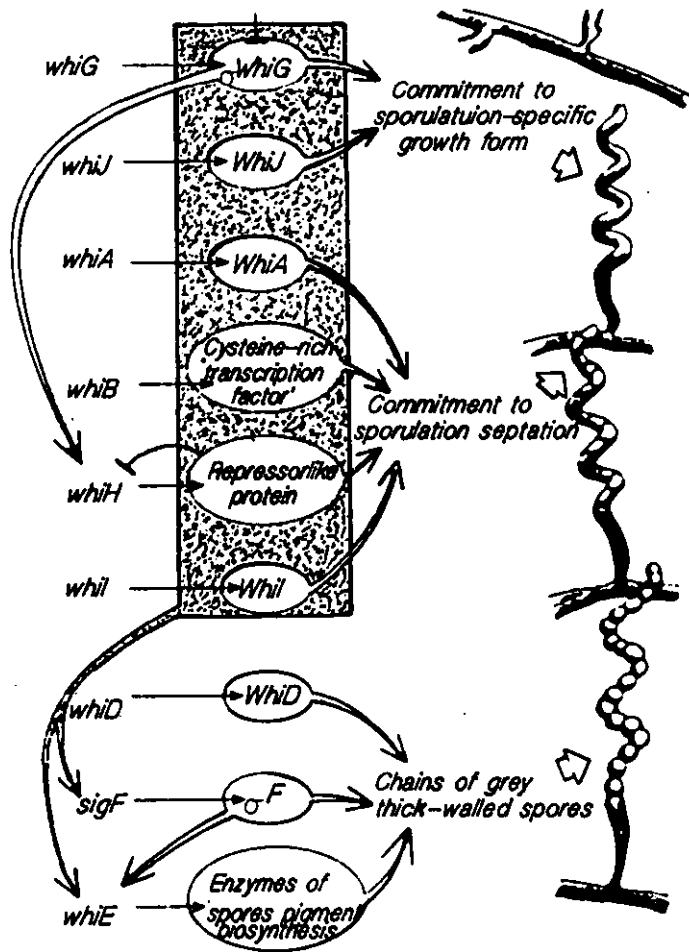


Figura 5. El papel de los genes *whi* durante la esporulación de *S. coelicolor* el esquema está basado en el patrón de interacciones observado entre diferentes mutantes *whi* [194].

## LOS GENES DE LA ESPORULACIÓN TEMPRANA

### EL GEN *whiG*

Las mutantes *whiG* producen hifas aéreas largas y rectas que no se diferencian a esporas. Por el fenotipo de sus colonias y por las observaciones hechas con dobles mutantes *whi*, se propone que este gen es el primero en actuar en la vía de la esporulación, siendo epistático sobre *whiA*, *whiB*, *whiH* y *whiI* [99-100]. A partir de una biblioteca de DNA de *S. coelicolor* M145 construida con el vector KC516 (derivado del fago  $\phi$ C31) se logró clonar al gen *whiG* [101], el cual causa hiperesporulación en mutantes *whiG* cuando está presente en un plásmido multicopia, inhibiendo el crecimiento y la producción de actinorrodina. El gen *whiG* codifica para un factor sigma ( $\sigma^{\text{WhiG}}$ ), el cual presenta alta homología con el factor  $\sigma^{28}$  de *B. subtilis* y el factor  $\sigma^{\text{Fl}}$  de *Salmonella typhimurium*, los cuales están relacionados en la transcripción de genes involucrados en movilidad y quimiotaxis. La homología se da principalmente en las regiones de la proteínas 2.4 y 4.2 que son las que interactúan con las regiones -10 y -35 de los promotores [102]. Cuando la copia cromosomal del gen *whiG* se interrumpe, se producen colonias con crecimiento vegetativo normal pero que no esporulan, y cuando está en multicopia provoca que el micelio vegetativo, tanto de cultivos líquidos como sólidos, se diferencie a cadenas de esporas, es decir, provoca esporulación ectópica [102], además de inhibir la producción de actinorrodina. Cuando se transforman protoplastos de *S. lividans* 66 y *S. coelicolor* J1501 con un plásmido multicopia que contiene un promotor de *B. subtilis* reconocido por  $\sigma^{28}$  ( $P_{28}$ ) se nota una reducción en la esporulación de estas especies, con colonias de color gris pálido. Esto se da por el reconocimiento y unión de la holoenzima que contiene a  $\sigma^{\text{WhiG}}$

( $E\sigma^{whiG}$ ) al promotor heterólogo, lo que provoca una reducción en la transcripción de sus blancos normales, los promotores de los genes involucrados en la esporulación. Por lo tanto, la cantidad del producto de *whiG* es un factor determinante para el inicio de la esporulación. Existe una copia de *whiG* en el cromosoma de la mayoría de las especies de *Streptomyces* [102].

Se identificaron dos promotores dependientes de  $\sigma^{whiG}$ , cuya transcripción coincide con la formación del micelio aéreo. Estos promotores,  $P_{TH4}$  y  $P_{TH270}$ , se localizan en diferentes regiones del cromosoma y conservan 6 de las 8 bases de la región -10 que está altamente conservada en los promotores de *B. subtilis* dependientes de  $\sigma^{28}$  y en los promotores de *E. coli* y *S. typhimurium* que dependen del sigma principal de estas bacterias ( $\sigma^{70}$  y  $\sigma^F$ ); en su región -35 también presentan similitud con los promotores de estas bacterias, conservando 2 de las 4 bases consenso, y ambos presentan un alto contenido de G+C, aún para ser promotores de *Streptomyces*. El transcripto de  $P_{TH4}$  se detecta desde las 18 horas de cultivos, aumentando marcadamente su abundancia de las 36 a las 48 horas y declinando a partir de las 60 horas, en tanto que la transcripción de  $P_{TH270}$  se detecta desde las 24 horas y declina a partir de las 60 horas de cultivo, y sus mayores niveles también se detectan cuando empieza la formación del micelio aéreo y hay poca esporulación [103].

Mutantes de *S. coelicolor* con deleciones cromosomales cercanas al gen *glkA* (glucosa cinasa) presentan esporulación ectópica. El fenotipo de estas mutantes depende de un gen *whiG* funcional, ya que mutantes dobles *esp/whiG* no presentan esporulación ni en hifas vegetativas ni en hifas aéreas. El fenotipo Esp (mutantes afectadas en la esporulación) se da por la expresión espacialmente inapropiada de la vía de esporulación normal a través de su supresión [104].



Sorprendentemente se encontró que la transcripción de *whiG* de *S. coelicolor* A3(2) en medio sólido se detecta durante todas las fases del crecimiento, en niveles mayores durante las 36-48 horas (como se vio con la transcripción de los promotores dependientes de  $\sigma^{\text{WhiG}}$ ). La transcripción de *whiG* no depende de ninguno de los otros genes *whi* tempranos ni de su propio producto, ya que en las mutantes de este tipo y en la cepa silvestre su transcrito se detecta en todas las fases del desarrollo y sus niveles varían poco [105]. Cuando se analizó la transcripción de *whiG* en medio de cultivo líquido por mapeo por S1 y transcripción *in vitro*, utilizando muestras de RNA polimerasa holoenzima total extraídas de la fase exponencial tardía, se detectaron transcritos de este gen aún cuando en estas condiciones de cultivo *S. coelicolor* no esporula, indicando así que *whiG* se transcribe en células vegetativas y que probablemente presenta regulación postranscripcional [105].

#### **EL GEN *whiB*.**

El gen *whiB* de *S. coelicolor* fue clonado a partir de la identificación de un fragmento BclI de 5.7 kb que restablece la esporulación de las mutantes *whiB* (este gen presenta solo dos alelos mutantes conocidos). Cuando este fragmento fue interrumpido por la inserción en su extremo izquierdo del transposón Tn4560, se perdía la complementación observada sobre la mutante *whiB218*. Al analizar la región afectada por la transposición, se identificó un ORF completo precedido por una región promotora con secuencias -10 y -35 parecidas a las observadas en los promotores de genes vegetativos de *Streptomyces* [106]. El producto deducido de es ORF contiene 87 aa (Mr de 9878), de los cuales el 35 % son cargados, dominando los residuos ácidos. El extremo amino está cargado negativamente y el carboxilo esta fuertemente cargado positivamente, y su región central contiene cuatro residuos de cisteína. Dentro de estas tres regiones existen motivos de  $\alpha$ -hélices. Utilizando

al fragmento BclI de 5.7 kb como sonda en análisis tipo Southern blot se identificó una banda hibridizante en el DNA de *whiB70*, y ninguna en el caso de la mutante *whiB218* indicando así que esta última mutación es una delección y que este gen no es necesario para el crecimiento vegetativo. Las regiones homólogas a *whiB* de la mutante *whiB70* y de *S. lividans* fueron obtenidas por PCR, y en caso de la mutante se identificó el cambio de una base (T por C) que causa la sustitución de una leucina por una prolina en la posición 74 de la proteína. El fenotipo de ambas mutantes *whiB* es igual, por lo que este aminoácido es esencial para la función de WhiB ya que su cambio provoca la pérdida total de su actividad. El gen *whiB* de *S. lividans* también presenta el cambio de una base (G por A) que origina la formación de un sitio de restricción para XhoI, causando así polimorfismo entre ambas especies. Las características de la proteína WhiB la colocan como un posible activador transcripcional, donde su región ácida podría estar involucrada en interacciones proteína-proteína, y la presencia de un par de glicinas antes de su extremo carboxilo le permitirían girar libremente para poder adquirir la conformación necesaria para su función. En la mutante *whiB218* a este par de glicinas le sigue el cambio de la leucina por la prolina, y este residuo podría estar alterando las interacciones del motivo  $\alpha$ -hélice del extremo carboxilo con las regiones localizadas hacia arriba del punto de giro. Su región central presenta dos prolinas (residuos 30 y 35) y un par de glicinas (residuos 43 y 44) que potencialmente permitirían giros importantes para la conformación estructural, además de 4 cisteínas que si bien no presentan un arreglo típico de dedos de zinc, pueden estar involucrados en la adopción de diferentes configuraciones que permitan interacciones intramoleculares o entre subunidades [106].

En cuanto a la transcripción del gen *whiB*, en análisis de mapeo por S1, donde se usaron muestras de RNA polimerasa extraído de medio de cultivo sólido, se identificaron dos sitios de inicio de la transcripción. El promotor P2 se localiza a 67 pb del inicio de la región codificadora deducida, y la transcripción a partir de este promotor se detecta a muy bajos niveles en todas las fases del crecimiento. El segundo promotor, P1, se localiza a 232 pb hacia arriba de la región codificadora y sus regiones -10 y -35 presentan alta homología (5 de 6 pb cada una) con las regiones consenso de promotores reconocidos por el factor  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. La transcripción a partir de P1 se observa desde etapas tempranas del crecimiento, y su nivel se incrementa marcadamente cuando el micelio aéreo es visible, y posteriormente decae. Cuando se analizó la actividad de estos promotores *in vivo* a través de su fusión al gen reportero *xylE*, no se detectó actividad de catecol dioxigenasa en ninguna fase del crecimiento en ninguno de los medio de cultivo usados, lo cual pudo deberse a una actividad transitoria no detectable o al tipo de plásmido usado. En cultivos en medio líquido también hay transcripción en todas las fases del crecimiento, y otra vez los niveles de P1 son muy bajos y los de P2 se incrementan particularmente durante la fase exponencial. Ambos promotores son activos en las mutantes *bldA*, *bldB*, *whiA*, *whiB*, *whiG* y *whiH*. Tomando en cuenta estos resultados es claro que la formación del micelio aéreo no es necesaria para la transcripción de *whiB* y que los genes *bldA* y *bldB* no influyen en ésta; el hecho de que en las mutantes *whiG* haya transcripción de *whiB* indica que  $\sigma^{WhiG}$  no influye en ésta, lo cual hace que el efecto epistático observado inicialmente entre estas mutantes no sea real [107]. Se clonaron los genes *whiB* y *whiH* de *Streptovercillium griseocarneum*, otro actinomiceto relacionado cercanamente con *Streptomyces*. La proteína WhiB-Stv contiene 87 aminoácidos y presenta tres residuos sustituidos en relación a la

proteína de *S. coelicolor*, y su región del promotor tiene alta homología con el P2 de *whiB-Sco*. El gen *whiG-Stv* presenta una identidad del 85.4 % con el homólogo de *S. coelicolor* y sus proteínas tienen un 90 % de identidad. Los genes de *S. griseocarneum* clonados en un plásmido multicopia presentan complementación parcial de las mutantes *whiB70* y *whiG71* de *Streptomyces*, en tanto que en la cepa silvestre *whiB-Stv* no tiene ningún efecto y *whiG-Stv*, al igual que *whiG-Sco*, causa hiperesporulación ectópica [108].

### EL GEN *whiH*

El gen *whiH* fue recientemente clonado [109], y se localiza inmediatamente hacia arriba del gen *hrdB*, que codifica para el factor  $\sigma$  principal de *S. coelicolor* (el cual se discutirá más adelante). Cuando el alelo silvestre de *whiH* se integra al cromosoma, por recombinación homóloga, de las mutantes *whiH* éstas recuperan el fenotipo silvestre. El producto de *whiH* (de 295 aminoácidos), tiene un motivo de unión al DNA en su región amino y presenta homología con las proteínas represoras de la familia GntR. La transcripción de *whiH* se da a partir de un único promotor (*PwhiH*) y está regulada en base al desarrollo, ya que sus transcritos se empiezan a detectar cuando inicia la formación del micelio aéreo y alcanzan los máximos niveles durante la esporulación; por otra parte, sus niveles de transcripción están marcadamente elevados en una mutante *whiH*, lo cual indica que la proteína WhiH posiblemente está involucrada la regulación negativa de su propia expresión (fig. 6).

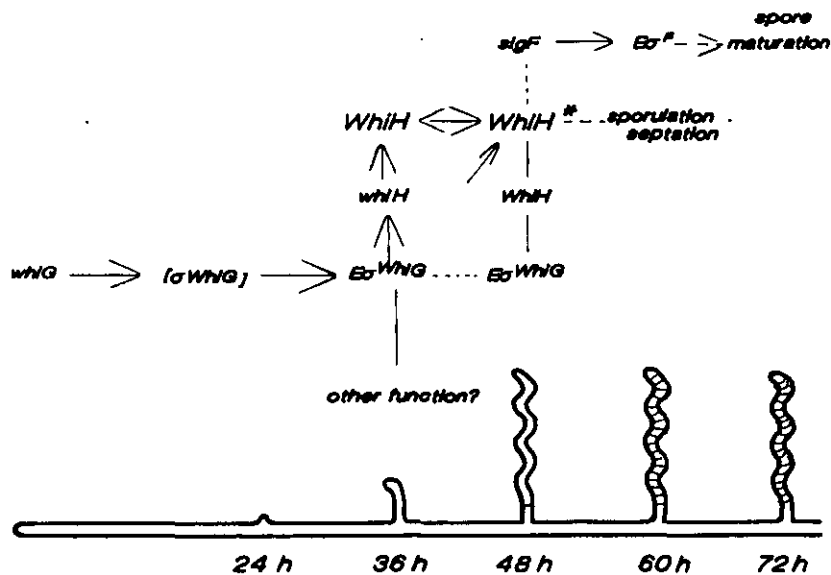


Figura 6. El papel del gen *whiH* en la regulación del desarrollo del micelio aéreo. La parte baja del dibujo se muestra esquemáticamente el desarrollo de las hifas en relación al tiempo. Los eventos en la cascada regulatoria mostrados en la parte superior coinciden supuestamente con los estados morfológicos indicados en la parte inferior. EL área punteada indica la parte del modelo basada en los datos obtenidos por Ryding *et al.* [109]. El paréntesis que encierra a  $\sigma^{WhiG}$  indica que se encuentra en la forma inactivada. El asterisco hace referencia a un supuesto inductor que se propone elimina la actividad autorrepresiva de *WhiG*, convirtiéndolo en un activador positivo que, directa ó indirectamente, estimula la transcripción de *sigF* y la formación de los septos de la esporulación.

En relación al factor  $\sigma^{WhiG}$ , la transcripción de *whiH* se da varias horas después de la del primero y varias horas antes que la del factor  $\sigma^{SigF}$ , un factor sigma que actúa durante la esporulación (siguiente sección); y su transcripción tanto *in vivo* como *in vitro* depende directamente del factor  $\sigma^{WhiG}$  [109].

## GENES DE LA ESPORULACIÓN TARDIA

### EL GEN *sigF*

El gen *sigF* codifica para un factor sigma,  $\sigma^F$ , que está involucrado en la regulación de las últimas fases de la esporulación. Este gen fue identificado y clonado a partir de una biblioteca de DNA cromosomal de *S. coelicolor* construida en el plásmido pBR322 de *E. coli*. Se identificaron regiones homólogas a este gen en el DNA de *S. lividans*, *S. griseus*,

*Streptomyces antibioticus* y *Streptomyces aureofaciens*. Los factores  $\sigma^F$  de esta última y de *S. coelicolor* presentan una identidad del 87 %, y a su vez tienen similitud con los factores  $\sigma^B$  y  $\sigma^F$  de *B. subtilis*, especialmente en las regiones 2.4 y 4.2 (que reconocen las regiones -10 y -35 de los promotores). Los genes de la regulación postranscripcional de los factores  $\sigma^B$  y  $\sigma^F$  de *B. subtilis* se localizan dentro de los operones de cada uno, pero en el caso de *Streptomyces* no se identificaron homólogos a éstos en las regiones vecinas de *sigF*, lo que probablemente sugiere que su regulación es diferente. Las colonias de una mutante *sigF*, obtenida por la interrupción del gen cromosomal, desarrollan micelios vegetativo y aéreo normal, pero sus esporas son de menor tamaño, deformes, con pared delgada, DNA no condensado y no son pigmentadas. Este fenotipo no está condicionado por el medio de cultivo ya que es el mismo en R5 (medio rico) y MM con manitol [110].

La transcripción de *sigF* no se detecta durante el crecimiento vegetativo, durante la formación del micelio ni en los tiempos finales de esporulación. Solo se detectan transcritos de este gen cuando se da la formación de los septos de esporulación, aproximadamente a las 72 horas de incubación, y la transcripción de *whiG* persiste después de que la de *sigF* ha desaparecido. La transcripción de *sigF* solo se detecta a niveles muy reducidos en mutantes *whiH* y *whiJ* y está totalmente ausente en las mutantes *whiA*, *whiB*, *whiG* y *whiI*. En *B. subtilis* los factores  $\sigma^G$  (pre-espora) y  $\sigma^K$  (específico de la célula madre) presentan autoregulación, es decir, mantienen y amplifican su expresión dirigiendo la transcripción de sus propios genes estructurales [111]. La transcripción de *sigF* en una mutante *sigF* nula y su cepa parental congénita se presenta en niveles similares y con el mismo patrón de regulación dependiente de la fase del desarrollo. Cuando se analizó la transcripción de *sigF* *in vitro* usando la  $E\sigma^{whiG}$  y con RNA polimerasa holoenzima total, extraídas ambas de

medio de cultivo líquido, no se detectaron sus transcritos, lo que indica que su holoenzima específica no está presente en este tipo de cultivo, y que depende indirectamente de *whiG* [105]. Su transcripción dependiente de todos los genes *whi* lo colocan en el último lugar de la jerarquía de los genes responsables de la esporulación. Los posibles blancos de  $\sigma^F$  podrían ser, por un lado los genes del locus *whiE* ya que sus esporas no son pigmentadas, o bien, dado que sus esporas pequeñas pueden ser originadas por la formación de septos de esporulación más cercanos entre sí, tal vez  $\sigma^F$  está involucrado en la ubicación correcta de dichos septos más que en su formación *per se* [110]. Tomando en cuenta que la transcripción del gen *whiH* y de este factor  $\sigma^{SigF}$  dependen de *whiG*, así como los perfiles de expresión que presentan durante el desarrollo, se plantea la existencia de una cascada regulatoria de la esporulación de al menos tres pasos, en un modelo muy simplificado donde se propone que *whiG* actúa directamente sobre *whiH*, y la proteína WhiH debe eliminar su actividad autorepresora (a través de un supuesto inductor), a fin de poder actuar como un factor que estimule la transcripción de *sigF* y la formación de los septos de la esporulación [109].

### **EL GEN *whiE***

Se identificó un fragmento presente en un plásmido conjugativo de bajo número de copias que permitía que una mutante *whiE* desarrollara esporas grises, incluso de una tonalidad más oscura que el de las esporas de la cepa silvestre. Al analizar la secuencia de este fragmento se encontraron 7 ORFs diferentes, todos con la misma orientación y que presentan homología con genes involucrados en la síntesis de antibióticos policétidos y la síntesis de ácidos grasos. Así tenemos que los componentes de la policétido sintasa mínima (PKS) que son las proteínas necesarias para el ensamble de la cadena de carbono del

pigmento, están codificados por el ORFIII (KS, cetosintasa), el ORFIV (CLF, proteína determinante del largo de la cadena), y el ORFV (ACP, proteína acarreadora de acilos), en tanto que los productos de los ORFII, ORFVI y ORFVII están involucrados en la ciclización de la cadena de carbono naciente, y el producto de ORFI parece ser necesario para el depósito correcto del pigmento o para su retención en el compartimento celular apropiado [112-114]. Posteriormente se identificó otro gen, *whiE-ORFVIII*, localizado hacia arriba de *whiE-ORFI* y que es divergente con respecto a éste y que controla un paso final de la vía biosintética, probablemente una hidroxilación, ya que las *mutantes whiE-ORFVIII* desarrollan esporas de color verdoso [114]. Por otro lado, en *Streptomyces halstedii* existe un fragmento BamHI de 5.2 kb que al ser interrumpido en su forma cromosomal provoca la formación de esporas sin su color verde característico. Este fragmento complementa a las *mutantes whiE107* que producen esporas de un gris más oscuro que las de la cepa silvestre, y en la *mutante whiE124* no causa ningún efecto [113]. Los genes *whiE-ORFIII*, *whiE-ORFIV* y *whiE-ORFV* complementan a tres *mutantes* afectadas en los genes *actI-ORF1*, *actI-ORF2* y *actI-ORF3* que codifican para los componentes de la PKS de la síntesis de la actinorrodina. Todas las posibles combinaciones de los genes *whiE* forman una PKS híbrida funcional que permite que todas las cepas *mutantes actI* produzcan un pigmento difusible de diferente color. Esta complementación es recíproca ya que cada uno de los genes de la PKS de la actinorrodina permiten la producción de las esporas pigmentadas (gris pálido) en las *mutantes* afectadas en los genes de la PKS de *whiE*. Esta complementación recíproca es posible gracias a una comunicación bioquímica cruzada entre las subunidades de las dos PKS, quienes probablemente se originaron a partir de un ancestro común [115]. La existencia de esta comunicación



cruzada podría causar interferencias mutuas de graves consecuencias, y ésto probablemente se evita por la expresión de cada grupo de genes en diferentes espacios dentro de la colonia. La expresión ectópica de los genes de la PKS de *whiE* causa inhibición del crecimiento temprano por una posible interferencia con la síntesis de ácidos grasos, a través de otra comunicación cruzada con la sintasa de esta vía metabólica, lo cual hace necesaria la presencia de otro mecanismo de control, espacial o temporal, para evitar efectos adversos [114].

Se han identificado dos promotores diferentes en la región intergénica que separa a *whiE-ORFVIII* y *whiE-ORFI*. El promotor P1 se localiza a 85 pb del codón de inicio de *whiE-ORFI* y P2 a 152 pb hacia arriba del codón de inicio de *whiE-ORFVIII*. Ambos promotores están regulados en base a la fase del desarrollo, apareciendo sus transcritos a las 72 horas de cultivo, justo cuando se detecta el inicio de la esporulación, permaneciendo su expresión en niveles similares por 24 horas más. No hay transcritos durante el crecimiento vegetativo, la formación del micelio aéreo, ni en las colonias maduras. Mutaciones en los genes *whiA*, *whiB*, *whiG* y *whiI* bloquean totalmente la transcripción de ambos promotores, y ésta es de aproximadamente el 10 % en mutantes *whiH* y *whiJ*, ocurriendo exactamente igual que con la transcripción de *sigF* [105]. Estos datos indican que existe cierta dependencia fuerte entre ambos promotores. Por otra parte, una mutante de *sigF* nula desarrolla esporas blancas, lo que sugiere que la expresión de alguno de los genes del locus *whiE* dependen, directa o indirectamente, del factor  $\sigma^F$ . La transcripción dependiente de promotor P1 del locus *whiE* no está afectada en esta misma mutante, en tanto que no hay expresión de P2. Mutaciones en *sigF* del mismo tipo en cepas con diferente fondo genético causan la formación de esporas de color verdoso, lo que demuestra que la interrupción de

*sigF* solo altera la naturaleza del pigmento y no bloquea su síntesis. En base a estos resultados tenemos entonces que *sigF* controla al promotor P2 del locus *whiE*, el cual es específico del gen *whiE-ORFVIII*, que cuando está mutado da esporas verdes, en tanto que el promotor P1 depende de los otros seis genes *whi* pero no de *sigF* [116]. El factor  $\sigma^F$  de *S. coelicolor* presenta homología con el factor  $\sigma^B$  de *B. subtilis*, y sin embargo la  $E\sigma^F$  no es suficiente para obtener transcripción de *whiE-P2 in vitro*, a pesar de que su región -10 es casi idéntica a la que reconoce  $\sigma^B$ , pero ya que no hay homología entre las regiones -35 es posible que su transcripción requiera la presencia de un activador transcripcional [116].

### LOS GENES *ftsZ* y *ftsQ*.

En las bacterias que se dividen por fisión binaria, la proteína FtsZ tienen un papel importante en el inicio de la formación del septo de separación. La acción de las proteínas de división y las proteínas unidoras de penicilina específicas del septo, permite la síntesis interna del péptidoglucano y de nuevo material de la membrana celular, procesos que son guiados por el ensamblaje de polímeros de FtsZ en estructuras anulares en el sitio donde se formará el septo y una vez formado éste, el anillo de FtsZ se desensambla [117]. En Western blots, realizados usando un anticuerpo policlonal anti-FtsZ de *E. coli* y extractos de proteínas del micelio vegetativo y micelio esporulante de *S. griseus*, se identificó una banda única de aproximadamente 45 kDa. Posteriormente se pudo clonar al gen *ftsZ* de *S. griseus* que estaba presente en un fragmento donde existían otros dos ORF, el que le precede presenta homología con el gen *ftsQ*, que codifica para otra proteína de división celular. Solo hay una copia de cada uno de estos genes en el cromosoma de *S. griseus*, y su arreglo difiere del presentado por los genes de división celular de otras bacterias donde *ftsZ* es precedido por *ftsA* y éste por *ftsQ*. La transcripción de *ftsZ* se puede detectar en el

micelio vegetativo y durante la esporulación [118]. En *S. coelicolor* también hay un gen *ftsQ* y uno *ftsZ*, los cuales se localizan en la misma región cromosomal donde están *glkA*, *hisA* y *trpB*. La proteína FtsZ de esta especie es de aproximadamente 41 kDa, y presenta una homología del 91% con la proteína de *S. griseus*. El arreglo de estos genes es igual en ambas especies, sin que se detecte un homólogo de *ftsA*. Una mutante *fstZ* nula forma colonias de menor tamaño y desarrolla micelio aéreo pero no esporas, independientemente del medio de cultivo usado, pero cuando se crece en MM con manitol produce cantidades elevadas de actinorrodina. Las células de esta mutante permanecen viables cuando se mantienen en cultivo por un mes (a partir del trasplante de micelio macerado), pero cuando son almacenadas a 4°C por una semana se baja drásticamente su viabilidad. El micelio aéreo que se forma es de color gris, lo cual indica que en esta mutante la producción del pigmento está separada del proceso de formación de esporas [119]. No hay formación de septos en el micelio aéreo de la mutante *fstZ*, en tanto que en una mutante *fstQ* solo se forman un 10 % de éstos en relación a la cepa silvestre. Las hifas aéreas de esta última mutante presentan fenotipos aberrantes, incluso se observan hifas con diferentes grados de lisis y algunas que se diferencian a cadenas de esporas [120]. El gen *fstQ*, clonado individualmente o junto con *fstZ* en un plásmido de bajo número de copias, complementa a las mutante *fstQ* y *fstZ*. Así, ambos genes no son indispensables para el crecimiento y la viabilidad, pero son necesarios para la eficiente conversión de las hifas aéreas multinucleoides en esporas uninucleoides [120].

## **FACTORES SIGMA ALTERNOS COMO UN MECANISMO DE REGULACION**

La mayoría de los genes bacterianos están regulados a nivel de la transcripción, generalmente por la expresión controlada de diferentes holoenzimas de RNA polimerasas,

las cuales reconocen diferentes clases de promotores. Típicamente las bacterias tienen un factor sigma principal, que es el responsable del reconocimiento de la mayoría de los promotores, en tanto que otros factores sigma menores tienen funciones limitadas y especializadas. Cada una de estas holoenzimas está constituida por un centro o “core” que incluye a las subunidades  $\alpha_2/\beta\beta'$ , al que se une una de las especies de factores sigma  $\sigma$ . El factor  $\sigma$  es el responsable del reconocimiento específico de la secuencia de DNA a la cual la holoenzima se une y confiere a la forma “core” la capacidad para reconocer y responder a las señales de inicio de la transcripción [121]. Además de los dos factores sigma mencionados anteriormente ( $\sigma^{\text{wliG}}$  y  $\sigma^{\text{E}}$ ), se han identificado otros en *Streptomyces*, y la presencia de todos ellos da una gran flexibilidad en la modulación de la expresión de genes.

Otro grupo de bacterias Gram positivas que presentan un tipo de vida con diferenciación morfológica está constituida por los miembros del género *Bacillus*. Una de las características importantes de la maquinaria de transcripción de estas bacterias está relacionada con la expresión de los genes del desarrollo, donde existen múltiples formas de holoenzimas de RNA polimerasa, cada una con la capacidad para reconocer una clase especial de promotor. La formación de las esporas en *B. subtilis* involucra a 4 factores sigma diferentes, los específicos de la célula madre ( $\sigma^{\text{E}}$  y  $\sigma^{\text{K}}$ ), y los específicos de la pre-espora ( $\sigma^{\text{F}}$  y  $\sigma^{\text{G}}$ ). Los cambios temporales y espaciales en la expresión de genes que se dan durante la esporulación están controlados por la aparición sucesiva de estos cuatro factores sigma, cuyas actividades son coordinadas por medio de una comunicación cruzada entre los dos compartimentos celulares [111]. Dadas las analogías en su ciclo de vida se pensó que tal vez *Streptomyces* también podría presentar diferentes formas de holoenzimas de RNA polimerasa como un mecanismo de regulación en la expresión de genes asociados con

diferentes etapas del desarrollo celular. Los primeros estudios sobre la especificidad del reconocimiento de promotores por factores sigma alternativos en *S. coelicolor* se realizaron utilizando dos promotores bien caracterizados de *B. subtilis*: el promotor *veg* que es reconocido por la RNA polimerasa predominante en el crecimiento vegetativo,  $E\sigma^{55}$ , quien reconoce promotores que presentan fuerte homología con los promotores de *E. coli* considerados como prototípicos de las eubacterias; el promotor *ctc* no es reconocido por la  $E\sigma^{55}$  y es utilizado por holoenzimas menores, especialmente por la forma  $E\sigma^{37}$ . En análisis de transcripción *in vitro* tipo runoff utilizando a estos dos promotores como templado y un extracto crudo de RNA polimerasa de *S. coelicolor*, se identificaron transcritos iguales a los generados con las enzimas  $E\sigma^{55}$  y  $E\sigma^{37}$ . Las actividades de transcripción observadas con estos promotores heterólogos están separadas ya que se identificaron en fracciones diferentes del extracto crudo. Al analizar las subunidades presentes en la enzima que reconoció al promotor *ctc*, se identificaron dos polipéptidos de aproximadamente 49 y 37 kDa. Estos polipéptidos se usaron para reconstituir la forma core de una RNA polimerasa de *B. subtilis*, la cual reconoció fuertemente al promotor *ctc* cuando estaba asociada a la proteína de 49 kDa. y solo un poco cuando se trataba de la proteína de 37 kDa. Estas proteínas fueron designadas como los factores  $\sigma^{37}$  y  $\sigma^{49}$  de *S. coelicolor*. Se identificó además una proteína de 35 kDa que estimulaba fuertemente la síntesis de RNA mensajero a partir del promotor *veg* y que es diferente a la proteína de 37 kDa, constituyendo por lo tanto a otro factor sigma, el  $\sigma^{35}$  [122].

Por otra parte, el gen de la agarasa extracelular de *S. coelicolor*, *dagA*, tiene cuatro promotores con secuencias diferentes que permiten la transcripción a partir de 32 pb (P1), 77 pb (P2), 125 pb (P3) y 220 pb (P4) hacia arriba de la secuencia codificadora [123]. La

expresión de *dagA* se induce por productos de degradación del agar y está reprimida por glucosa, y estos dos efectos son regulados a nivel del inicio de la transcripción [124]. En experimentos de transcripción *in vitro* donde se utilizó como templado la región del DNA que contiene a estos 4 promotores y muestras de RNA polimerasa total, se identificaron actividades de transcripción parcialmente separadas para cada promotor [125].

Purificaciones subsecuentes de las fracciones donde se identificaron estas actividades permitieron obtener la transcripción por separado de *dagA* p2, *dagA* p3, y *dagA* p4, en tanto que la transcripción específica para *dagA* p1 no se pudo recuperar. Estas actividades de transcripción no se debieron a diferencias en la concentración de la RNA polimerasa, sino que realmente correspondían a diferentes holoenzimas. La holoenzima que permite la transcripción de *dagA* p4 reconocía además solo al promotor *veg*, la que reconoce a *dagA* p3 solo al promotor *ctc*, y la específica de *dagA* p2 a ninguno de estos dos. Por lo tanto, los factores sigma responsables de la transcripción de *dagA* p3 y *dagA* p4 corresponden a  $\sigma^{49}$  y  $\sigma^{35}$  respectivamente, en tanto que el reconocimiento del promotor *dagA* p3 se da por un factor sigma de una especie diferente. La identidad de este nuevo factor sigma se conoció a partir de experimentos de reconstitución de holoenzimas, donde la porción core la constituyó la fracción altamente purificada que contenía actividad de transcripción específica para *dagA*, y como posibles factores sigma se probaron las proteínas localizadas en el rango de 20-90 kDa obtenidas a partir de un extracto crudo de RNA, resueltas y separadas por SDS-PAGE. Las holoenzimas así obtenidas fueron utilizadas en ensayos de transcripción *in vitro*, a partir de los cuales se identificó una proteína de 28 kDa que reconocía a *dagA* y al promotor *ctc* no, y que se designó factor  $\sigma^{28}$  [125]. El gen *sigE* que codifica para  $\sigma^{28}$  ( $\sigma^E$ ) fue identificado en análisis tipo Southern blot, usando como sonda un

oligonucleotido degenerado diseñado a partir de la secuencia de los primeros 27 aa del extremo amino de la proteína SigE. El gen estructural, designado *sigE*, codifica para una proteína que presenta una alta similitud con proteínas reguladoras positivas, incluyendo al factor  $\sigma^E$  de *E. coli*. Estas proteínas constituyen una subfamilia de factores sigma que funcionan como moléculas efectoras que sensan señales generadas en o fuera de la membrana; cada uno de ellos transcriben genes cuyos productos estan involucrados en funciones extracitoplasmáticas, por lo que se denominó la subfamilia de factores sigma  $\sigma^{ECF}$  [126].

Los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis* son codificados por el gen *rpoD*. Los factores sigma presentan dos dominios diferentes, uno de unión a la RNA polimerasa core y el otro de unión al DNA, y éste a su vez presenta un subdominio A que está directamente involucrado en la unión a la polimerasa, en tanto que el subdominio B modula dicha unión. El dominio B está conservado en los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis*, pero no en los factores sigma menores. Basándose en una secuencia de 10 aa, que está totalmente conservada del subdominio B de estas dos bacterias, se diseñó un oligo de 29 bases para tratar de identificar genes homólogos a *rpoD* en otras bacterias. El DNA de *S. coelicolor* dió señal positiva con esta sonda en cuatro regiones diferentes, las cuales fueron clonadas y secuenciadas. La secuencia de aa deducida de cada una de estas regiones cromosomales muestra un segmento de 13 residuos idénticos que también está presente en los factores  $\sigma^{70}$  de *E. coli* y  $\sigma^A$  de *B. Subtilis*, y que corresponden al subdominio B. Esta región común fue denominada caja *rpoD*, y los 4 ORFs identificados en *S. coelicolor* constituyen los genes *hrdA*, *hrdB*, *hrdC* y *hrdD* [127]. Experimentos independientes realizados usando el gen *rpoD* de *Myxococcus xanthus* como sonda,

permitieron la clonación y posterior interrupción de los genes *hrdB*, *hrdC* y *hrdD* de *S. coelicolor* [128]. Cuando se interrumpieron los genes *hrdA*, *hrdC* y *hrdD* se obtuvieron mutantes de *S. coelicolor* que no presentan defectos en la morfología de las colonias, la diferenciación ni en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina. En contraste, no se pudieron obtener mutantes para el gen *hrdB* usando la misma estrategia de interrupción genética, lo cual indica que este gen es esencial para el crecimiento y su eliminación es letal, por lo que constituye el factor sigma principal de *S. coelicolor* [128-130]. En la región 4.2 de los factores  $\sigma^{\text{poD}}$  de *E. coli*, *B. subtilis* y *M. xanthus* existen 4 residuos involucrados en el contacto específico con 4 pb de la región -35; estos residuos están también presentes en los cuatro factores  $\sigma^{\text{hrd}}$  de *Streptomyces*. Por otra parte, en la región 2.4 que reconoce al hexámero -10 también hay residuos conservados entre estas bacterias, si bien la treonina que hace contacto con la primera base de la región -10 esta cambiada en  $\sigma^{\text{hrdA}}$  por una serina y por una glutamina en  $\sigma^{\text{hrdC}}$ . Lo anterior indica que los factores  $\sigma^{\text{hrd}}$  deben reconocer promotores con diferencias sutiles en sus secuencias, y ésto permitirá, una vez identificados, obtener información sobre las interacciones de aa específicos con las bases individuales del correspondiente promotor [130]. Al analizar la transcripción de los genes *hrdB*, *hrdC* y *hrdD* con RNA obtenido de cultivos líquidos, en experimentos de mapeo por S1 de alta resolución, se identificaron una región promotora de *hrdB* y dos de *hrdD*, pero ninguna para *hrdC*. El promotor *hrdD*-P1 se localiza dentro del gen *ORFX*, cuya cadena codificadora es la opuesta al del gen *hrdD* [128]. Dada la gran similitud que presentan cada una de las cuatro proteínas  $\sigma^{\text{Hrd}}$  con el factor  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, especialmente en las regiones que reconocen las secuencias -10 y -35 de los promotores, es muy probable que las RNA polimerasas a las que se unen actúen sobre promotores con una fuerte



homología con las secuencias consenso de *E. coli*. En relación a los factores sigma identificados anteriormente [122], ya que  $\sigma^{35}$  transcribe al promotor *veg*, el cual presenta una secuencia con alta homología con la secuencia consenso dependientes del  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, tal vez este  $\sigma^{35}$  sea el producto de alguno de los genes *hrd*. A partir de una muestra de RNA polimerasa total de *S. coelicolor* se obtuvo la fracción que presenta actividad transcripcional específica para *dagA p4*, la cual fue sometida a SDS-PAGE a fin de identificar su posible factor sigma. De todos los polipéptidos probados, solo uno de 66 kDa permitía la transcripción *in vitro* de este promotor. Este polipéptido fue purificado por elución del SDS-PAGE y renaturalizado en presencia de la proteína chaperonina GroEl de *E. coli*, y fue usada para reconstituir una holoenzima la cual pudo transcribir *in vitro* a los promotores *dagA p4* y *veg*, lo cual confirmó que es un factor sigma y se designó como  $\sigma^{\text{hrdB}}$ . Esta asignación está además basada en (i) los promotores *veg* y *dagA p4* tienen secuencias en las regiones -10 y -35 similares a las de los promotores que son reconocidos por la holoenzima principal de *E. coli* y *B. subtilis*; (ii) la secuencia de aminoácidos de  $\sigma^{\text{hrdB}}$  presenta una marcada similitud con las secuencias de aminoácidos de los factores principales de *E. coli* y *B. subtilis*,  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^A$  respectivamente [129].

A partir de mutantes nulas estables de *hrdA*, *hrdC* y *hrdD* se construyeron mutantes dobles *hrdAC*, *hrdAD* y *hrdCD* y una mutante triple *hrdACD*, ninguna de las cuales presenta alteración en su crecimiento, ni en su diferenciación ni en la producción de antibióticos pigmentados. Ya que los genes *hrd* pueden ser inactivados simultáneamente sin que se produzca ningún cambio fenotípico aparente, sus productos deben de transcribirse a partir de distintos promotores [130]. Los genes regulatorios requeridos para la síntesis de la actinorrodina y la undecilprodigiosina, *actII-ORF4* y *redD*, pueden ser transcriptos *in vitro*

por la  $E\sigma^{hrdD}$ , e *in vivo* en una cepa mutante *hrdD*, diferente a las usadas anteriormente [131], tampoco se afecta la producción de estos antibióticos; todo esto indica que estos genes pueden ser transcritos *in vivo* por  $E\sigma^{hrdD}$  y otra holoenzima, probablemente  $E\sigma^{hrdB}$  [130].

En *S. aureofaciens* también hay cuatro genes *hrd*, tres de ellos son análogos a *hrdA*, *hrdB* y *hrdD* de *S. coelicolor*, y el cuarto *hrdE* parece ser un factor sigma nuevo. Solo *hrdB* y *hrdA* son expresados en medio líquido. Por mapeo por S1 y transcripción *in vivo* se estableció que los cuatro genes tienen dos promotores separados, los cuales presentan una regulación dependiente de la fase del crecimiento y del medio de cultivo. En el caso del gen principal *hrdB* se detecta la transcripción a partir de ambos promotores a lo largo de todo el crecimiento, en tanto que los dos promotores de *hrdD* solo son activos durante el crecimiento vegetativo. El gen *hrdA* es expresado solo en medio sólido durante la fase tardía del micelio aéreo [132]. La región promotora de *hrdB*-P1, *hrdD*-P1 y *hrdD*-P2 presentan alta homología con los genes *hrd* correspondientes de *S. coelicolor* [132].

El operón *gal* de *S. coelicolor* A3(2), que está sujeto a la inducción por galactosa y represión por glucosa, presenta dos promotores: *galP1*, que se localiza en el extremo 5' del operón y produce un único transcrito que incluye los productos de los genes *galT*, *galE* y *galK*, en tanto que el promotor *galP2* se localiza entre los genes *galT* y *galE* y produce un transcrito que contiene a *galE* y *galK*. El promotor *galP1* es quien está influenciado por galactosa y glucosa, y *galP2* es un promotor constitutivo de bajo nivel. No existen homologías entre *galP1* y *galP2* en las posiciones donde la RNA polimerasa hace contacto. En ensayos de transcripción *in vitro* tipo runoff usando una RNA polimerasa parcialmente purificada se encontraron actividades separadas para cada promotor [133]. Cuando las bases

de las posiciones -34, -36 y -11 del promotor *galP1* son cambiadas, se pierde su actividad. A partir de la muestra que presentaba actividad para *galP1* se identificó un polipéptido de 45 kDa; esta proteína fue usada para reconstituir una holoenzima que reconoce a *galP1* pero no a *galP2*. Este nuevo factor sigma,  $\sigma^{45}$ , es diferente a  $\sigma^{hrdD}$  ya que el operón *gal* es expresado en las mutantes *hrdD*, y una RNA polimerasa extraída de esta misma mutante permite la transcripción *in vitro* de *galP1* [115].

De los genes de *Streptomyces* reportados hasta hoy, solo 29 se han podido agrupar en base a que sus secuencias -10 y -35 presentan relativa similitud con la secuencia consenso de los promotores de *E. coli* reconocidos por su factor  $\sigma^{70}$ , además de que las regiones -10 y -35 están separadas por 16-18 nucleótidos [134]. Conforme aumente la lista de genes conocidos, este grupo de promotores puede hacerse mayor, y de igual manera se podrán identificar otras características que permitan reconocer nuevos grupos de promotores. La existencia en *S. coelicolor* de diferentes factores sigma es un fuerte indicio de que la actividad de diferentes grupos de genes puede estar determinada en parte por una variedad de holoenzimas, cada una con la capacidad para usar selectivamente a una clase característica de promotor y en donde los factores sigma determinarían la expresión diferencial de los diferentes grupos de genes durante el curso del ciclo de vida. Estos grupos de genes pueden incluir, pero no estar limitados, a los involucrados en la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario. De esta manera, los factores sigma tienen un importante papel en la regulación y coordinación de la expresión de genes en *Streptomyces*.

### III. ANTECEDENTES

Las grasas y aceites son los lípidos más abundantes de procedencia natural. Dentro de estos los triacilgliceroles (TAGs) son ésteres que se componen de tres ácidos grasos unidos al glicerol, un alcohol trihidroxilado. Cada molécula de glicerol contiene dos grupos hidroxilo primarios, localizados en la periferia, y uno secundario que se localiza en el centro de la molécula (Fig. 7). Si los tres grupos hidroxilo del glicerol están esterificados con el mismo ácido graso se habla de un TAG simple, pero generalmente contienen dos o tres ácidos grasos distintos y se denominan TAG mixtos. La hidrólisis de los triacilglicéridos, catalizada por enzimas lipolíticas, libera como productos ácidos grasos, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y glicerol [135]

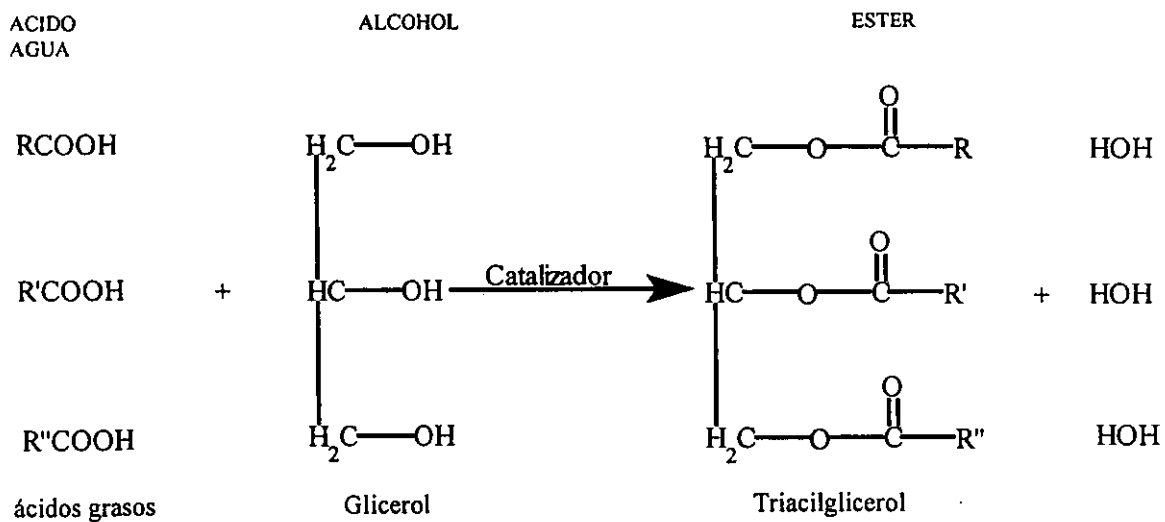


Figura 7. Síntesis de los triacilgliceroles.

Las esterasas y las lipasas son hidrolasas que pertenecen a la clase general de carboxilesterasas (EC 3.1.1). Las esterasas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) hidrolizan

ésteres carboxílicos de ácidos grasos de cadenas relativamente cortas y solubles en agua. Por otra parte, ya que los substratos naturales de las lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3) son TAG de cadena larga que son insolubles en soluciones acuosas, las lipasas son definidas como glicerol éster hidrolasas que actúan específicamente sobre substratos insolubles y que requieren la formación de una interfase lípido-agua para activarse. Las lipasas y las esterasas, junto con las serina proteasas, contienen una triada catalítica compuesta por un residuo de serina nucleofílico que actúa en conjunto con un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico ó ácido glutámico [136-140]. Estas enzimas presentan una estereoespecificidad característica, prefiriendo los enlaces éster periféricos o bien los enlaces éster centrales de la molécula de TAG. Las lipasas pueden ser clasificadas en tres grupos de acuerdo con su especificidad de substrato; el primer grupo incluye a las lipasas que no muestran preferencia con respecto a la estructura química de los ácidos grasos presentes en la molécula de TAG ni muestran preferencia por enlaces éster primarios o secundarios; las enzimas del segundo grupo hidrolizan solamente los enlaces éster primarios; y en el tercer grupo se encuentran las lipasas que presentan una pronunciada preferencia por ácidos grasos con ciertas características particulares (no hay lipasas de origen bacteriano en este grupo). La estereoespecificidad depende estrictamente de la presión de superficie del substrato, y en ciertos casos puede estar además influenciada por la longitud de la cadena de los ácidos grasos presentes [141]. Las lipasas bacterianas son de considerable importancia por sus potenciales aplicaciones en biotecnología, ya que estas enzimas pueden permanecer activas en una variedad de solventes orgánicos donde pueden catalizar una variedad de reacciones, aparte de su habilidad para hidrolizar enlaces éster; estas reacciones les permiten transesterificar triacilgliceroles, resolver mezclas racémicas,

así como sintetizar enlaces ésteres y peptídicos. Las lipasas extracelulares normalmente aparecen en el medio de cultivo cuando las bacterias alcanzan el final de la fase logarítmica del crecimiento; la producción de lipasas puede ser determinada cualitativamente por la formación de halos claros alrededor de las colonias crecidas en placas de agar con emulsiones de tributirina o trioleína, y cuando se agrega rodamina B se forman halos fluorescentes de color naranja-rojo visibles con luz UV [142]. La actividad lipolítica en sobrenadantes de cultivos bacterianos se puede determinar por la titulación de los ácidos grasos liberados a partir de un substrato lipídico, o bien por la cuantificación espectrofotométrica de aniones cromogénicos liberados de ésteres sintéticos (*p*-nitrofenilos) con cadenas de ácidos grasos de diferentes tamaños, sin embargo estos compuestos presentan la desventaja de ser hidrolizados también por las esterases [143]. Las variaciones en el pH y la temperatura alteran no sólo las propiedades cinéticas de las lipasas, sino las propiedades fisicoquímicas del substrato insoluble, por lo tanto el tipo de ensayo utilizado para determinar la actividad de estas enzimas debe ser considerado al interpretar los resultados. Todos los estudios realizados hasta el momento han permitido definir ciertas condiciones para la óptima producción de las lipasas de diferentes bacterias, pero aún no ha sido posible elucidar los mecanismos generales de regulación de su producción y secreción.

### **Activación interfásica de las lipasas.**

Aún cuando los ácidos grasos de cadena corta son ligeramente solubles en agua, los componentes con ácidos grasos de cadena larga esterificados con el glicerol son insolubles. Cuando las moléculas de TAG alcanzan el estado emulsionado, dan origen a la formación de una interfase lípido-agua. La lipólisis ocurre exclusivamente en la interfase lípido-agua.

La diferencia principal entre las esterasas y las lipasas está basada en su habilidad para ser activadas por la presencia de interfases lípido-agua. La actividad de las esterasas es una función que depende de la concentración del sustrato, alcanzándose la velocidad máxima de la reacción mucho antes de que la solución llegue al punto de saturación del sustrato; la formación de una emulsión sustrato-agua no cambia la velocidad de la reacción (Fig. 8); en contraste, las lipasas no muestran actividad mientras el sustrato está en estado monomérico; sin embargo, cuando la solubilidad límite del sustrato es excedida, se empieza a detectar actividad enzimática, y conforme el sustrato forma una emulsión y el área de la interfase aumenta, la actividad enzimática se incrementa de manera pronunciada (Fig. 8). Este mecanismo de acción se denomina activación interfásica, y esta propiedad llevó a la definición de las lipasas como carboxilesterasas que actúan específicamente sobre sustratos emulsificados [144-146].

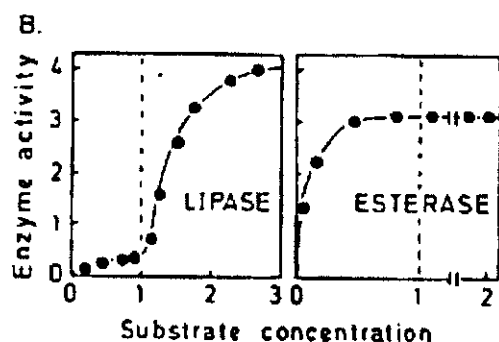


Figura 8. Activación interfásica de las lipasas. Perfil típico de la actividad enzimática de la lipasa pancreática humana y la esterasa de hígado de caballo a diferentes concentraciones de sustrato. La línea punteada indica el punto de saturación del sustrato [143].

Las bases moleculares de este mecanismo de activación enzimática fueron descifradas principalmente a partir de estudios cristalográficos realizados con las lipasas de *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum* y la lipasa pancreática humana. Así, cuando una

lipasa se une a una interfase lípido-agua se da un cambio conformacional en la proteína que provoca el desplazamiento de la tapa que cubre al sitio activo y que lo mantiene totalmente inaccesible; como resultado de este cambio el lado hidrofóbico de la tapa es expuesto a la fase lipídica, reforzando así las interacciones hidrofóbicas entre la enzima y la superficie lipídica, permitiendo que el sustrato llegue al sitio activo y se realice la hidrólisis [136-137, 140, 147]. La cinética enzimática de una lipasa no puede describirse con el modelo de Michaelis-Menten ya que este es válido sólo en el caso de una fase homogénea (sustrato y enzima solubles). El modelo que describe la cinética de catálisis para enzimas lipolíticas presenta dos pasos; primero, la adsorción física de la enzima en la interfase, que incluye la activación interfásica de la enzima (apertura del sitio activo) y segundo, la formación del complejo enzima-sustrato, la hidrólisis de éste para dar el producto y la regeneración de la enzima adsorbida [137, 140, 148].

### **Estructura tridimensional de las lipasas.**

Las lipasas bacterianas varían en tamaño, desde la de *Bacillus* de 19 kDa hasta la de *Staphylococcus carnosus* de 86 kDa, y presentan poca homología en su estructura primaria, limitándose ésta a la región donde se localiza la cavidad oxianiónica, y la región catalítica que contiene al pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly, donde se localiza el residuo de serina nucleofílico y que está altamente conservado en las lipasas de diferentes orígenes. Se han purificado y cristalizado las lipasas de los hongos *Rhizomucor miehei* [136], *G. candidum* [149], *Candida rugosa* [150], *Fusarium solani* [151], de las bacterias *Pseudomonas glumae* [152], *Pseudomonas fluorescens* [153], *Pseudomonas cepacia* [154], y la lipasa pancreática humana [147]; en base a estudios de difracción de rayos X fue posible conocer su estructura tridimensional (Fig. 9). Se encontró que a pesar de la amplia diversidad en sus



secuencias de aminoácidos, todas las lipasas tienen una estructura terciaria similar denominada plegado  $\alpha/\beta$  de las hidrolasas (Fig. 9), la cual está formada por un dominio central constituido por una serie de hojas  $\beta$  paralelas alternadas con hélices  $\alpha$ , las cuales se localizan o proyectan hacia ambos lados de la región central (estructura canónica de las lipasas). El número y la posición espacial de estas estructuras varía considerablemente, así como las conexiones entre los elementos estructurales conservados. Se puede distinguir una región de reconocimiento de la interfase lípido-agua, la cual incluye a la hélice  $\alpha$  que constituye la tapa peptídica involucrada en la activación interfásica [155].

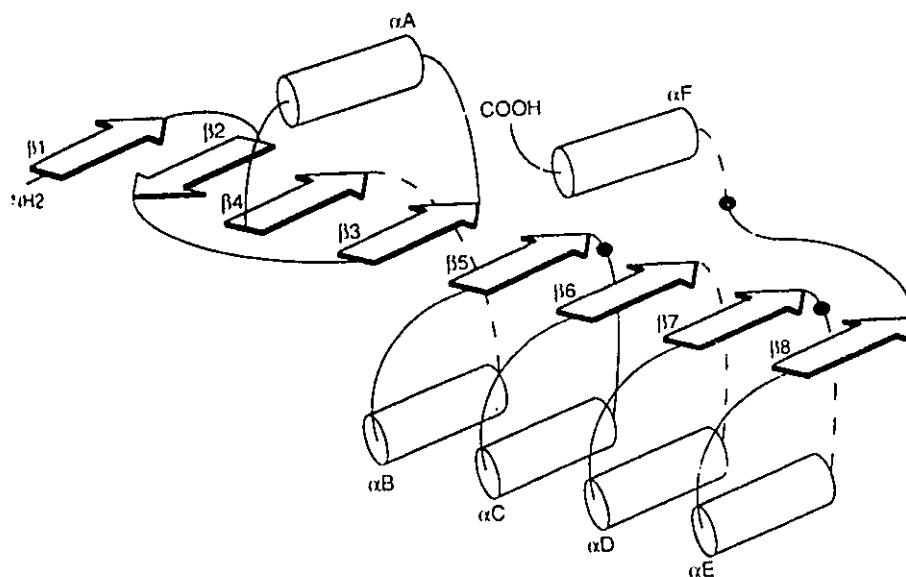


Figura 9. Plegado  $\alpha/\beta$  consenso de las hidrolasas. Las hélices  $\alpha$  están indicadas por cilindros y las hojas  $\beta$  por flechas. La posición topológica de los residuos de la triada catalítica se muestra con círculos sólidos; la serina nucleofílica está localizada justo después de la hoja  $\beta$  número cinco, el ácido aspártico/glutámico después de la hoja  $\beta$  número siete, y la histidina se encuentra en el doblamiento formado entre la hoja  $\beta$  número ocho y la hélice  $\alpha F$  [155].

El sitio activo se encuentra localizado en el interior de la proteína, cubierto por una cadena polipeptídica anfipática que actúa como una tapa que lo mantiene inaccesible a las moléculas del sustrato (Fig. 10). Esta tapa está arreglada como una hélice  $\alpha$  en las lipasas de *Pseudomonas* [153, 154, 150], de *R. miehei* [136] y la lipasa pancreática humana [147],

en tanto que el sitio activo de *G. candidum* está cubierto por dos hélices  $\alpha$  paralelas [149]. Entre el sitio activo y la superficie interna de la tapa predominan las interacciones hidrofóbicas, en tanto que el lado polar de la cadena se localiza hacia la porción acuosa. Cuando la enzima se encuentra en una interfase lípido-agua se da un cambio conformacional en la región de la tapa, haciendo que ésta se desplace y el sitio activo quede expuesto y totalmente accesible al sustrato. Este cambio conformacional provoca que la cara hidrofílica de la tapa, que previamente estaba en contacto con la solución acuosa, se mueva hacia una cavidad polar preformada; en tanto que la porción hidrofóbica, que previamente estaba en contacto con el sitio activo, queda ahora expuesta a la porción lipídica de la interfase y esto provoca que se incremente la superficie no polar alrededor del sitio activo, lo que a su vez permite la unión del sustrato. La profundidad a la cual se localiza el sitio activo dentro de la proteína parece ser un factor determinante para la especificidad de estas enzimas por ácidos grasos de cadena larga [137, 140, 156-157]. La rotación de la tapa es acompañado por otro cambio estructural que permite que la cavidad oxianiónica quede en la posición correcta. La estereoquímica de la cavidad oxi-aniónica no se conoce, sin embargo se ha identificado un motivo His (Arg)-Gly-X-X-Gly localizado en el extremo amino de las lipasas maduras, el cual presumiblemente está involucrado en la formación de esta estructura [158].

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

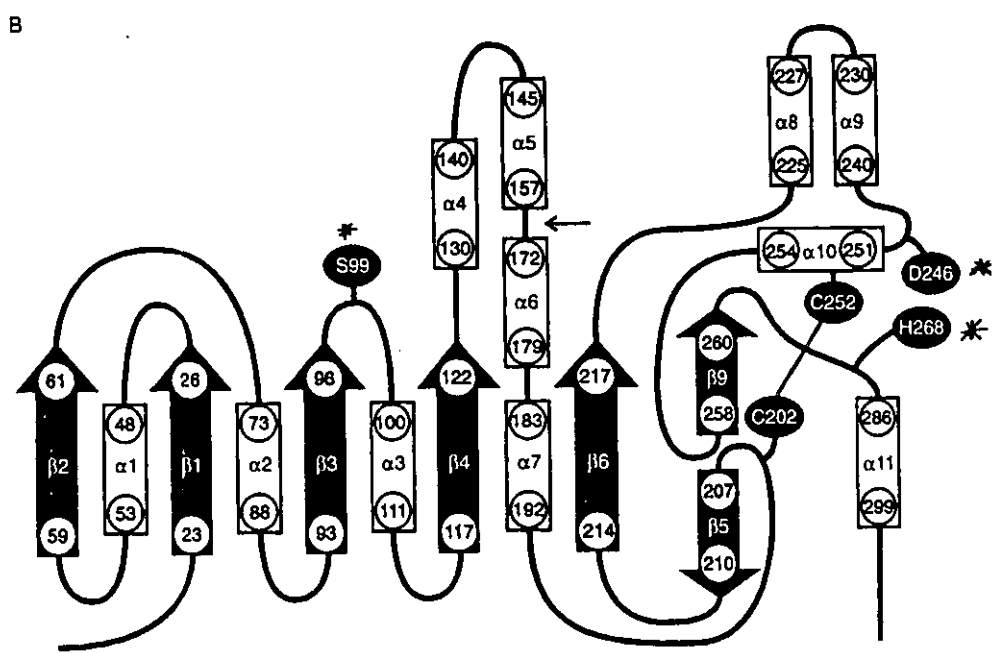
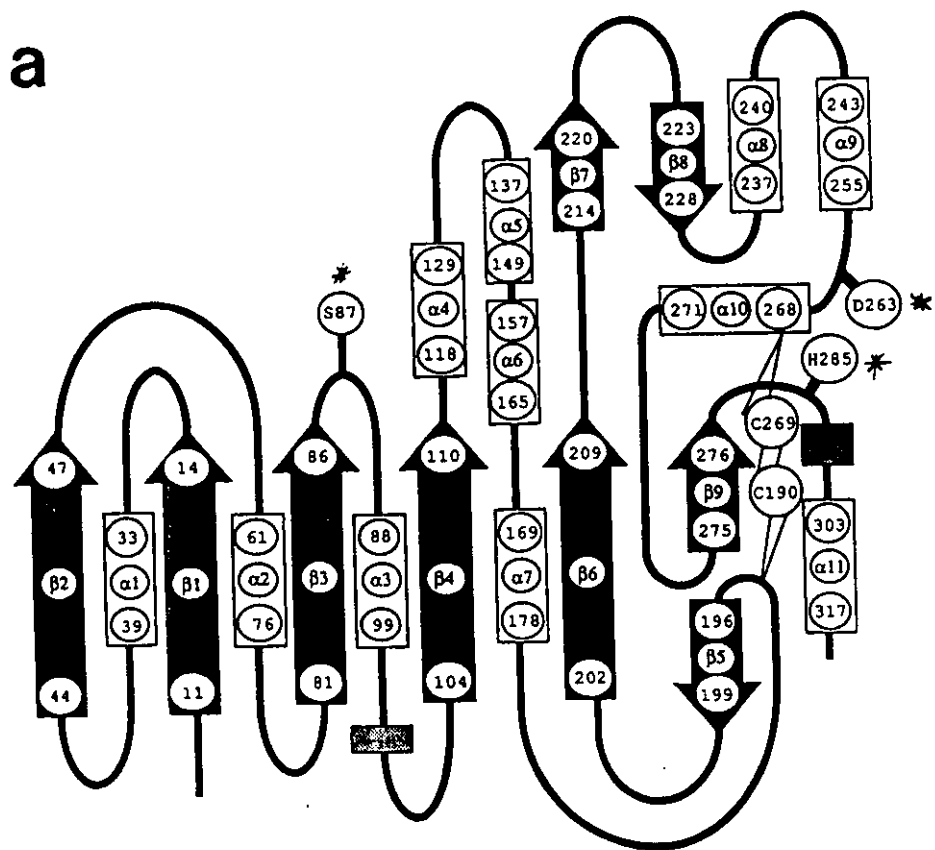


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de la lipasa de *P. glumae* determinada por cristalografía de rayos X (a), y en el caso de la lipasa de *Acinetobacter calcoaceticus* deducida a partir de la anterior (b). Las flechas representan las hojas  $\beta$  y las barras las hélices  $\alpha$ ; los residuos de la triada catalítica están indicados con \*. En ambos casos la hélice 5 corresponde a la tapa que cubre al sitio activo [152, 179].

### **Características de la triada catalítica.**

El sitio activo contiene una triada catalítica formada por una serina, la que constituye al residuo nucleofílico y que está unida por un enlace de hidrógeno a un residuo de histidina al cual se une además un residuo de ácido aspártico, también por un enlace de hidrógeno (en *G. candidum* el tercer residuo es el ácido glutámico). Cada uno de estos residuos se localiza en un elemento estructural secundario diferente de la proteína (Figs. 9 y 10), la serina nucleofílica se encuentra en el segmento curvo que se forma entre la hoja  $\beta_5$  y la hélice  $\alpha_C$  del dominio central de la estructura canónica (Fig. 9); el siguiente residuo es el aspartato y generalmente se localiza en el segmento curvo formado después de la segunda hoja  $\beta$  (contando a partir de la que contiene a la serina), en tanto que el residuo de histidina se localiza en la curva formada después de la tercera hoja  $\beta$  [136, 138, 146-147, 152]. La posición y conformación de los aminoácidos que forman la triada catalítica no son significativamente diferentes en las estructuras abiertas y cerrada de la lipasa; el cambio conformacional de la tapa provoca un cambio importante en el ambiente de este sitio, la serina se vuelve totalmente accesible al solvente y se localiza en el fondo de un cañón hidrofóbico que está perfectamente adaptado para la unión del substrato lipídico. La funcionalidad de la triada catalítica está asistida por la presencia de una cavidad oxianiónica, que es una región electrofílica que estabiliza la carga negativa generada durante el ataque nucleofílico por el oxígeno de la serina sobre el carbono carbonilo del enlace éster del substrato. La arquitectura de la cavidad oxianiónica y su contribución a la estabilización de la catálisis no es muy conocida en el caso de las lipasas y las esterasas; en el caso de la lipasa pancreática humana se forma por los nitrógenos de las cadenas principales de la Leu 153 y la Phe 77 [140].

## Mecanismo de lipólisis.

La hidrólisis de un enlace éster por una lipasa inicia con el ataque nucleofílico del oxígeno de la serina sobre el átomo de carbono carbonilo del sustrato (Fig. 11), lo cual lleva a la formación de un intermediario tetraédrico (reacción 1), el cual presenta una carga negativa en el átomo de oxígeno carbonilo del enlace éster escindido; el intermediario es estabilizado por la hélice  $\alpha$  formada inmediatamente después de la serina nucleofílica (hélice  $\alpha_C$  de la figura 10), y a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre el oxígeno carbonilo (el oxianión) y la porción amida de al menos dos residuos de la cavidad oxianiónica, uno de los cuales corresponde al residuo siguiente de la serina nucleofílica, y el otro proviene del residuo localizado al final de la hoja  $\beta_3$ . La función del residuo de histidina de la triada catalítica es incrementar la nucleofilicidad del grupo hidroxilo de la serina. El anillo de imidazol de la histidina es protonado y cargado positivamente, esta carga positiva es estabilizada por la carga negativa del residuo del ácido aspártico (reacción 2). El intermediario da paso a la formación del complejo acilo-enzima, en el cual el componente ácido del sustrato es esterificado a la serina, mientras el alcohol es liberado (reacción 3); en el siguiente paso una molécula de agua hidroliza el intermediario acilo-enzima, la histidina activa esta molécula de agua donándole un protón, el ión  $\text{OH}^-$  resultante ataca el átomo de carbono carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. Se forma nuevamente un intermediario tetraédrico negativamente cargado, el cual también es estabilizado por interacciones con la cavidad oxianiónica. La histidina dona un protón al oxígeno de la serina, lo cual permite que la serina libere al ácido graso y se regenere la enzima (reacción 4), quedando lista para otro ciclo de catálisis [143, 155].

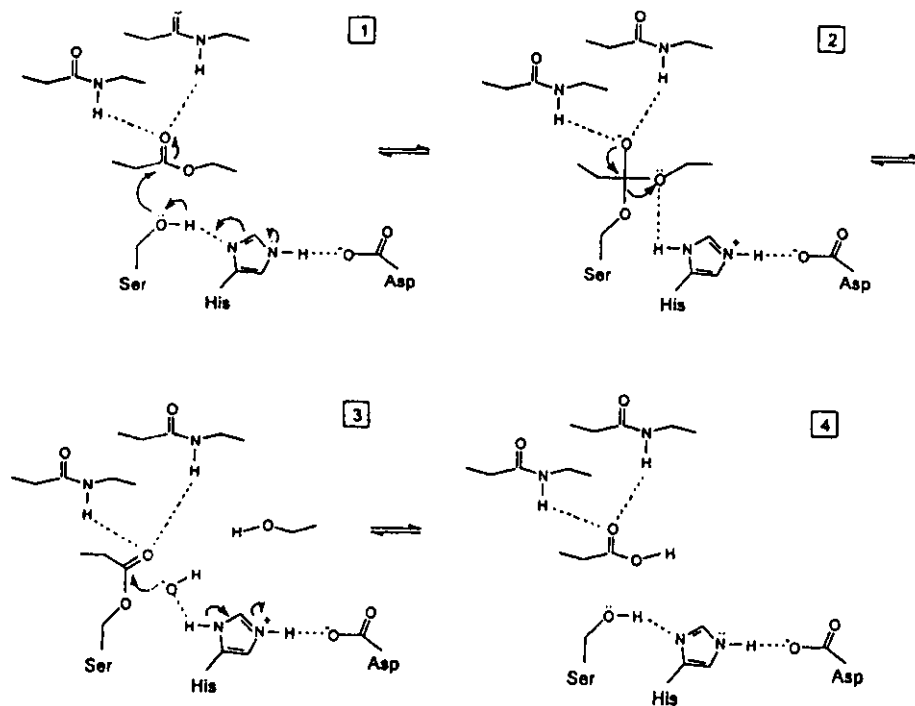


Figura 11. Mecanismo de lipólisis. La catálisis inicia con la unión del sustrato, activación de la serina nucleofílica por la histidina, y el ataque nucleofílico por el O<sup>-</sup> de la serina sobre el átomo de carbono carbonilo del sustrato (reacción 1). Formación del intermediario tetraédrico, con el O<sup>-</sup> estabilizado por interacciones con los grupos amida de la cavidad oxianiónica. La histidina dona un protón al alcohol del sustrato (reacción 2). Formación del complejo acilo-enzima, en el cual el ácido graso del sustrato está esterificado al residuo de serina de la enzima; la molécula de agua entrante es activada por la histidina, y el ión hidroxilo resultante ataca nucleofílicamente al átomo de carbono carbonilo del complejo acilo-enzima (reacción 3). La histidina dona un protón al átomo de oxígeno de la serina, se rompe el enlace éster entre la serina y el ácido graso, y éste último es liberado (reacción 4) [155].

### Lipasas bacterianas.

Se han clonado y secuenciado los genes de lipasas tanto de bacterias Gram positivas como de bacterias Gram negativas, y de este último grupo destacan las pertenecientes al género *Pseudomonas* quien tiene al menos siete especies productoras de lipasa, y una sola especie (*P. aeruginosa*) produce cinco lipasas diferentes [143, 159]. Las lipasas extracelulares normalmente aparecen en el medio de cultivo cuando las bacterias alcanzan el final de la fase logarítmica del crecimiento. Todos los estudios realizados hasta el momento han permitido definir ciertas condiciones para la óptima producción de las lipasas de diferentes bacterias, pero aún no ha sido posible dilucidar los mecanismos generales de regulación de su producción y secreción. Las lipasas bacterianas conocidas actualmente

están clasificadas en seis familias en base a la homología de sus secuencias de aminoácidos

(Tabla I), de estas familias la número I está a su vez subdividida en seis grupos [155].

TABLE I Families of lipolytic enzymes

Family	Sub-family	Enzyme-producing species	Accession no.	Similarity <sup>b</sup> (%)	Properties	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	D50587	100	True lipases	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumae</i> <sup>a</sup>	X70354	35		
		<i>Chromobacterium viscosum</i> <sup>a</sup>	Q05489	35		
		<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>a</sup>	M58494	33		
	3	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33		
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14		
	4	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15		
		<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16		
	5	4	<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	Phospholipase
			<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	
		<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	X95309	14		
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14		
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13		
		<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14		
6	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	U80063	14			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100			
II	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31	o.m.-bound esterase		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17			
	<i>Photobacterium luminescens</i>	P40601	17			
	<i>Streptomyces scabies</i> <sup>a</sup>	M57297	15			
	<i>Streptomyces exfoliatus</i> <sup>a</sup>	M86351	100			
III	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82	Extracellular lipase		
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33			

(continued)

Family	Sub-family	Enzyme-producing species	Accession no.	Similarity <sup>b</sup> (%)	Properties	
IV		<i>Moraxella</i> sp.	X53868	100	Lipase 2	
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28	Carboxylesterase	
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25		
		<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	24		
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24		
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	Esterase	
		V	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	100	Lipase 3
			<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88	
			<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34	
		VI		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233			25	Putative esterase	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096			15	Esterase	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>a</sup>	S79600			100	Esterases	
<i>Synechocystis</i> sp.	D90904			24		
<i>Spirulina platensis</i>	S70419			22		
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778			16		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	15				

<sup>a</sup>Lipolytic enzymes with known 3-D structure.

<sup>b</sup>Similarities of amino acid sequences were determined with the program Megalign (DNASTar), with the first member of each family arbitrarily set at 100%.

En cuanto a las bacterias Gram positivas, *Bacillus subtilis* secreta una lipasa de 19.4 kDa la cual prefiere ácidos grasos con cadenas de 8 carbonos, y los enlaces éster de los grupos periféricos (posiciones 1,3). El primer residuo de glicina del pentapéptido que contiene la serina nucleofílica está sustituido por alanina; presenta una gran estabilidad y actividad en un pH extremadamente alcalino [160]. Por otra parte, las lipasas de

*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus hyicus* presentan un amplio espectro en su especificidad de substrato, la última exhibe actividad de fosfolipasa y lisofosfolipasa incluso [161-162]; la lipasa de *S. aureus* es sintetizada como un prepropéptido del cual se elimina un péptido señal de 46 aa para formar una prolipasa de 82 kDa, una segunda ruptura proteolítica en el extremo carboxilo da como resultado la forma madura de la lipasa de 46 kDa. El proceso proteolítico está mediado por una metalocistein proteasa que actúa sobre los extremos amino y carboxilo [162-165]. La lipasa de *S. hyicus* también está organizada como una preproenzima que es procesada de igual manera por una proteasa para dar la forma madura de 46 kDa. En estos casos el propéptido es esencial para la secreción eficiente. En *Staphylococcus carnosus*, que no posee la proteasa equivalente, se produce una proteína activa de 86 kDa [162, 166-168].

Una característica importante de las lipasas de *Pseudomonas* es que requieren la presencia de proteínas accesorias para adquirir su conformación estructural correcta y para su eficiente secreción [169-170]. Estas foldasas, denominadas proteínas Lif, presentan gran homología entre sí (75%) y son codificadas por genes que se localizan inmediatamente hacia abajo de los correspondientes genes estructurales de las lipasas [171-174]. *P. cepacia* y *P. glumae* tienen una de estas proteínas ayudadoras (LimA y LipB respectivamente), en tanto que *P. aeruginosa* presenta cuatro (Act, LipH, LipB y LimL). La más estudiada de estas proteínas, LipB de *P. glumae*, está anclada a la membrana interna por medio de una hélice transmembranal presente en su extremo amino; la lipasa, que es secretada por una vía de dos pasos, permanece anclada a la membrana citoplasmática por medio de su péptido señal y adquiere su estructura correcta en el periplasma asistida por LipB, y finalmente es secretada a través de la membrana externa [172-173, 175]. En *P. aeruginosa* se han



identificado otras proteínas necesarias para la estabilización de la lipasa durante su secreción. Estas proteínas DsbA (tiol-disulfuro oxidoreductasa) y DsbC (tiol-disulfuro isomerasa) están involucradas en la formación de enlaces disulfuro en las lipasas durante su paso por el periplasma; en mutantes *dsbA* y *dsbC* la producción de la lipasa extracelular está fuertemente reducida y solo se detectan niveles de actividad lipolítica residuales [155]. En bacterias Gram positivas no se han identificado homólogos a las proteínas Lif ni Dsb. Las lipasas de *Pseudomonas* presentan un amplio espectro de especificidad y se dividen en tres grupo generales; el primero está formado por enzimas de 285 aminoácidos, las cuales requieren la presencia de las proteínas Lif para adquirir su conformación enzimáticamente activa y para su secreción (por ejemplo *P. aeruginosa*); el grupo II incluye lipasas de 320 aminoácidos, requieren también de las foldasas (p. ej. *P. glumae*); en el grupo III quedan las lipasas de 475 aminoácidos, las cuales no tienen péptido señal y no requieren de las proteínas Lif (p. ej. *P. fluorescens*) [159].

### **Mecanismos de secreción de lipasas.**

No existe un mecanismo de secreción generalizado para estas enzimas, la mayoría de las cuales poseen un péptido señal en su extremo amino que les permite su secreción a través de la membrana interna. Las lipasas de *Pseudomonas* son secretadas usando al menos dos vías diferentes. Las lipasas de *P. aeruginosa* y *P. glumae*, que tienen péptidos señales de 26 y 39 aminoácidos respectivamente, utilizan una vía de dos pasos (Fig. 12), en donde se requieren maquinarias de exportación formadas por varias proteínas (productos de los genes *sec* y *xcp*), y donde existen intermediarios periplasmáticos, los cuales adquieren la conformación enzimáticamente activa con la ayuda de las proteínas Lif, en tanto que las proteínas Dsb ayudan a su estabilización [155, 175]. Después de la translocación de la

preproteína a través de la membrana citoplasmática por el sistema formado por las proteínas Sec, y la subsecuente ruptura del péptido señal, el transporte a través de la membrana externa está mediado por un segundo complejo proteico de translocación formado por las proteínas Xcp, que reconoce elementos estructurales en la enzima [175]. Por contraste, la lipasa de *P. fluorescens*, quien no tiene péptido señal, contiene como señales de secreción una hélice anfifílica y una caja de aspartato en su extremo carboxilo, esta enzima es secretada a través de una vía de un solo paso donde la proteína es secretada a través de un poro formado por tres proteínas, que constituyen el sistema de transportadores ABC [176].

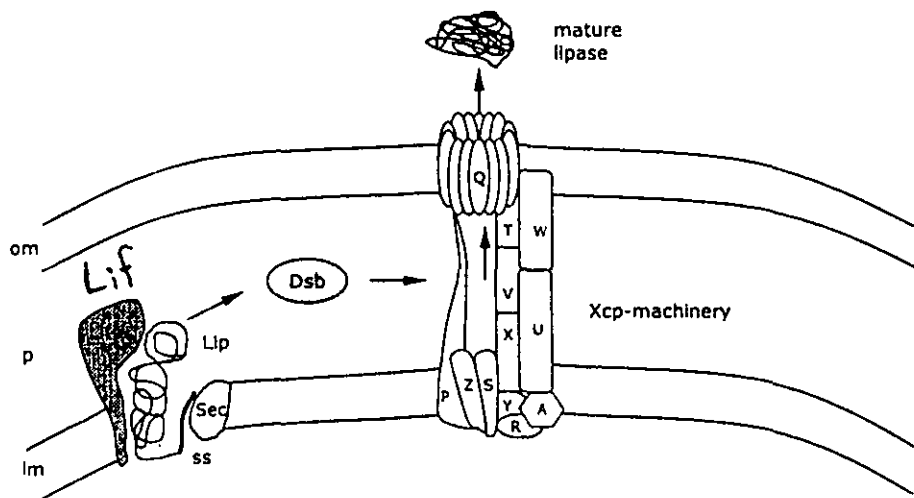


Figura 12. Modelo para la secreción en dos pasos para la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*. La lipasa (Lip) es secretada a través de la membrana interna (im) en su forma de preproteína utilizando la maquinaria de exportación formada por las proteínas Sec. Las interacciones con la foldasa específica de la lipasa (Lif) y con las proteínas Dsb permiten que la lipasa adquiera su conformación enzimáticamente activa y se estabilice durante su paso por el espacio periplasmático (p). La secreción final a través de la membrana externa (om) se realiza utilizando la maquinaria de exportación formada por las proteínas Xcp [155].

### Regulación de la expresión de genes de lipasas.

Aún cuando en los últimos años se ha incrementado significativamente la cantidad de genes de lipasas clonados, los mecanismos moleculares que regulan su expresión son poco conocidos. En *S. aureus* existe un mecanismo de regulación global que controla de

manera coordinada la transcripción de genes involucrados en patogénesis. Los loci *agr* y *sar* activan la transcripción de genes codificadores de proteínas extracelulares cuando se alcanza la fase de crecimiento estacionario; la expresión del gen de la lipasa parece estar regulada por el locus *agr*, el cual codifica para un sistema regulatorio de dos componentes y dependiente de la densidad celular. En este sistema, *agrC* es el transductor de la señal y *agrA* es el regulador de respuesta [177-178]. Por otra parte, la bacteria Gram negativa *Acinetobacter calcoaceticus* que produce una lipasa extracelular de 32.1 kDa, los ácidos grasos producidos por la hidrólisis de la trioleína reprimen fuertemente la expresión del gen estructural, lo que llevó a proponer que existe una proteína reguladora no identificada que reprime la transcripción y que es activada por la unión de los ácidos grasos [179-180]. La expresión de la lipasa de *P. aeruginosa* está regulada a través de dos sistemas de dos componentes dependientes de la densidad celular, uno de estos es el sistema RhIR-RhIL, el cual regula además la expresión de otras enzimas extracelulares [181-182], y el segundo sistema depende del regulador global GacA, cuya sobre-expresión causa un incremento en la actividad lipolítica extracelular, probablemente por la activación del sistema *rhIR-rhIL*. Además de estos sistemas dependientes de la densidad celular, se ha propuesto otro que sería específico para esta lipasa, compuesto por los genes adyacentes *lipQ* y *lipR*, que codifican para una supuesta proteína transductora de señales y para un activador transcripcional respectivamente [155].

### **Actividad lipolítica en *Streptomyces***

En *S. coelicolor* se conoce bastante acerca de la producción de antibióticos a nivel genético, caso contrario al metabolismo de lípidos donde se desconocen aún varios aspectos, así como la influencia que puedan tener en la diferenciación y en la formación de

los metabolitos secundarios, incluyendo a los antibióticos. Además de los fosfolípidos de membrana típicos, *Streptomyces* almacena triacilgliceroles (TAG), lípidos neutros que no son comúnmente encontrados en las bacterias donde el glucógeno y el polihidroxitirato constituyen los polímeros de almacén comunes [183-184]. Estos TAGs se empiezan a acumular al inicio de la fase estacionaria del crecimiento, etapa en la cual constituyen casi el 20% del total de lípidos, y a las 60 horas de cultivo su proporción es del 60%. El inicio en la producción de actinorrodina coincide temporalmente con el abatimiento de la glucosa presente en el medio del cultivo, e importantemente cuando se detecta un descenso en los niveles de los TAGs [185]. Estas observaciones llevaron a sugerir que los TAGs podrían estar funcionando como una fuente de carbono, aportando a éstos en la forma de acetyl-CoA, para la síntesis de antibióticos derivados de acetatos, justamente como la actinorrodina. Si esto fuera cierto, entonces es necesaria la presencia de una lipasa capaz de hidrolizar a los TAG a fin de garantizar el aporte eficiente de estas unidades de carbono. Se ha identificado actividad lipolítica en algunos *Streptomyces* [186], si bien no se conoce mucho acerca de las lipasas responsables de tal función. Nuestro grupo de investigación fue el primero en clonar los genes responsables de la actividad lipolítica observada en *Streptomyces exfoliatus* M11 y *Streptomyces albus* G. El gen *lipA* de *S. exfoliatus* [187] tiene un promotor con características correspondientes a los promotores vegetativos de esta bacteria, y codifica para una lipasa de 28 kDa que presenta el sitio catalítico, Gly-X-Ser-X-Gly, altamente conservado en todas las lipasas reportadas, y con un péptido señal constituido por los 42 primeros aminoácidos. La expresión de esta lipasa depende de la fase del crecimiento, siendo secretada principalmente durante la fase estacionaria. La transcripción de *lipA* esta regulada por el producto de un gen localizado hacia abajo, *lipR*,

que codifica para un activador transcripcional de 934 aminoácidos. En la secuencia nucleotídica de *lipR* hay un codón TTA, que hace su traducción dependiente del gen *bldA*; cuando este codón TTA es sustituido por el codón sinónimo CTC, la transcripción de *lipA* se vuelve independiente de *bldA*; sin embargo la expresión fase dependiente de *lipA* no se afecta, siendo posible que, como en el caso de los activadores transcripcionales de la síntesis de la actinorrodina y la undecilprodigiosina, esta característica se deba principalmente al momento en que se transcriben los correspondientes activadores [188]. La secuencia de la proteína codificada por el gen *lipA* de *S. albus G* presenta una homología del 82 % con la proteína codificada por el gen *lipA* de *S. exfoliatus*, y un gen localizado inmediatamente hacia abajo de este gen es a su vez homólogo al gen del activador transcripcional [189]. Estas lipasas presentan además similitud con la lipasa 1 de *Moraxella* sp TA144 [190], así como con la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas bovino [191].

En *Streptomyces cinnamomeus* se identificó al gen *lipA* que codifica para una preproteína con actividad lipolítica de 275 aa, donde los primeros 30 residuos constituyen al péptido señal, su peso es de 29.2 kDa y contiene seis residuos de cisteína. Esta lipasa no presenta homología con las lipasas de *S. exfoliatus* o la de *S. albus G*, en tanto que exhibe una identidad del 29% y una similitud del 60% con las lipasas del grupo II de *Pseudomonas* [159]. Cuando el gen *lipA* de *S. cinnamomeus* se expresa en *E. coli* se obtiene actividad lipolítica en la fracción insoluble del cultivo celular, y se reconocieron una proteína de 27 kDa que representa a la lipasa madura, y una de 50 kDa sin actividad enzimática la cual parece ser un dímero de la primera con una conformación errónea. Sorprendentemente cuando el mismo gen se expresa en *S. lividans* se secreta una proteína activa de 50 kDa,

que es igual en tamaño a la que secreta la cepa silvestre de *S. cinnamomeus*. No se ha podido obtener la secuencia del amino terminal de esta proteína de 50 kDa la cual se cree que representa un dímero de la proteína de 29 kDa codificada por *lipA* y la cual no adquiere el arreglo estructural apropiado cuando se expresa en *E. coli*. En cuanto a la especificidad de sustrato de LipA, presenta una gran actividad con triacilglicerolos de 4, 6, 8 y 18 carbonos, muy poca con los de 10 y 12 carbonos y la menor con los de 14 y 16 carbonos, además de actuar también con Tween 20. Esta amplia especificidad se atribuye en parte a que *S. cinnamomeus* secreta además una esterasa de 30 kDa, sin descartar la posible participación de otras enzimas hidrolíticas. Una observación importante es el hecho de que la actividad lipolítica se pierde cuando el gen se expresa en *S. lividans* y se cultiva en presencia de aceite de oliva y rodamina B, pero no cuando se utiliza tributirina o tributirato, o sin sustrato lipídico. Esto se atribuye a la formación de mono o diacilglicerolos tóxicos derivados del aceite de oliva los cuales ejercen una presión selectiva sobre las variantes lipasas negativas, de manera análoga a lo observado con *A. calcoaceticus* [180]. No se conoce nada sobre la regulación genética en la expresión y/o secreción de esta lipasa, salvo que el gen *orfA* localizado inmediatamente hacia arriba de *lipA*, parece ejercer un efecto negativo en su producción, aparentemente por un efecto de dosis génica deletérea sobre el crecimiento celular [192]. Las lipasas de *S. exfoliatus*, *S. albus G* y *Moraxella* sp constituyen la Familia III de enzimas lipolíticas según la clasificación de Jaeger *et al.* [155]; dado que la estructura primaria de la lipasa de *S. cinnamomeus* difiere de las de *S. exfoliatus* y *S. albus G*, se espera que sus propiedades bioquímicas sean también diferentes y forme una nueva familia de enzimas lipolíticas del género *Streptomyces*, lo cual aumenta la variedad de esta clase de enzimas.

La lipasa de *S. exfoliatus* fue purificada a partir de sobrenadantes de cultivos en LB [187], utilizando una combinación de filtración a través de una columna de DEAE celulosa seguida de una columna de Carboximetil (CM) celulosa. La lipasa pura recuperada de esta última columna fue cristalizada y usada para determinar su estructura tridimensional por difracción de rayos X. La forma madura de LipA es una enzima de una cadena polipeptídica simple de 262 aminoácidos. La porción "core" de la molécula tiene el arreglo terciario de plegado  $\alpha/\beta$  típico de las hidrolasas (Figs. 12 y 13). La serina nucleofílica (S131) se localiza en la curva formada entre la hoja  $\beta$  número cinco y la hélice  $\alpha$  número tres. Los otros residuos que conforman la triada catalítica son el aspartato de la posición 177 y la histidina de la posición 209, que se localizan en los loops número 6 y 7 respectivamente. En cuanto a los aminoácidos involucrados en la formación de la cavidad oxi-aniónica se identificaron, por extrapolación a lo observado con *R. miehei*, a los residuos Met132 y Phe63 como responsables de la formación de esta estructura. Un aspecto relevante con relación a esta cavidad es el hecho de que en la lipasa de *R. miehei* ésta se forma como una de las consecuencias de la activación interfacial, en tanto que en la lipasa de *S. exfoliatus* parece estar preformada, lo cual sugiere que esta enzima puede ser activa en solución. En cuanto a los residuos involucrados en la unión del substrato, se identificaron varios con cadenas laterales hidrofóbicas como Met132, Trp156 y Val179. Un hecho de gran importancia es la ausencia de una estructura equivalente a la tapa que mantiene encerrado al sitio activo y que se ha identificado en las lipasas mencionadas anteriormente. Sin embargo, la predicción de la estructura secundaria de la región donde se esperaría la presencia de dicha tapa (loop número tres de la figura 13) indica que esta región tiene una alta propensión helicoidal a todo lo largo de su extensión [193].

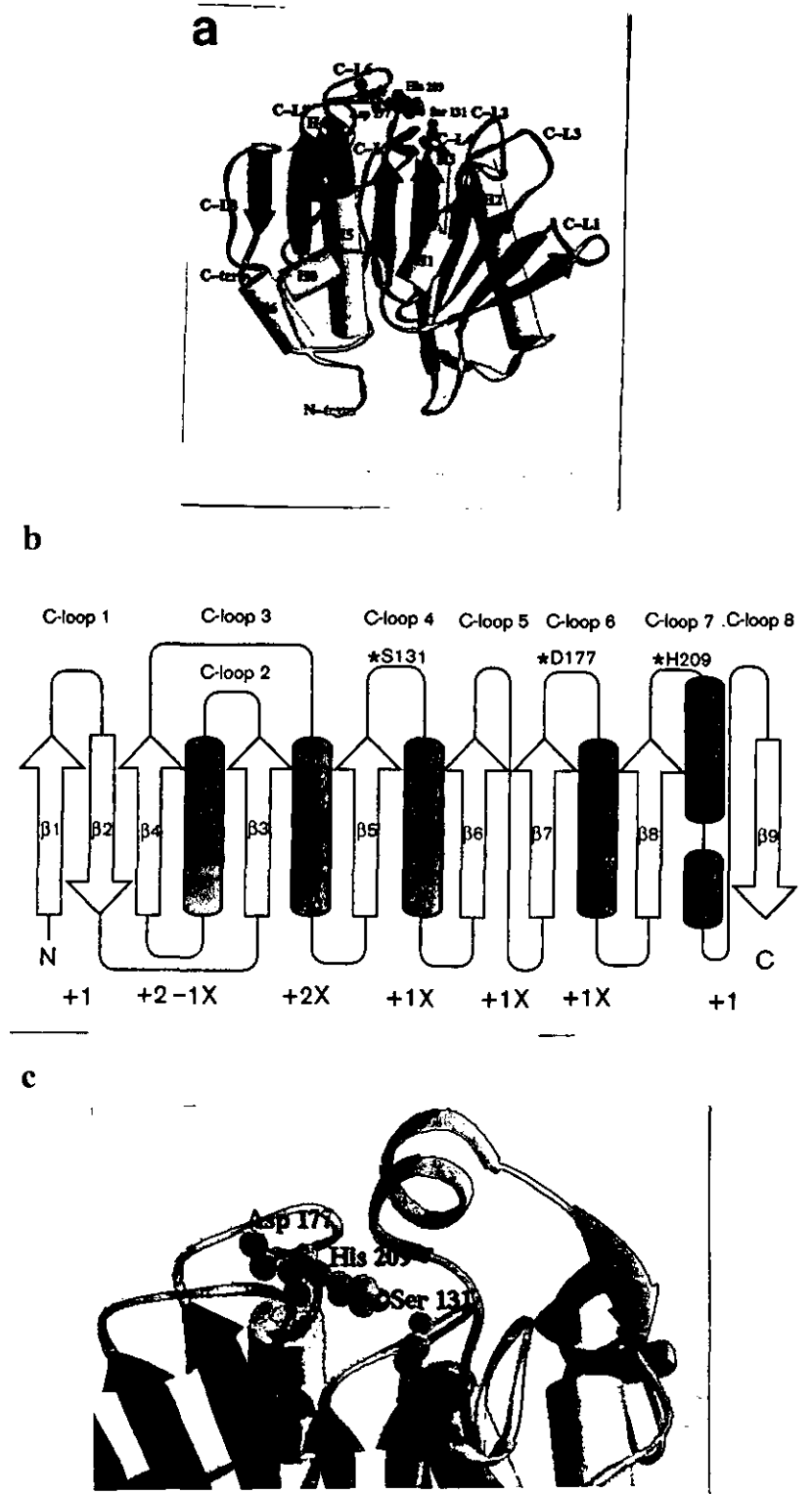


Figura 13. La estructura tridimensional de la lipasa de *S. exfoliatus* M11 fue obtenida por difracción de rayos X a una resolución de 1.9 Å. (a y b) representación esquemática de la estructura terciaria mostrando el arreglo de los elementos de la estructura secundaria de la lipasa, las flechas indican las hojas  $\beta$ , y las barras sólidas las hélices  $\alpha$ ; su arquitectura corresponde a la de las hidrolasas  $\alpha/\beta$ , y se indican los residuos de la triada catalítica (Ser131, Asp177 e Hist209), así como otros residuos importantes. (c) acercamiento a la región del sitio activo donde claramente se observa la ausencia de una estructura correspondiente a la tapa típica identificada en la mayoría de las lipasas [193].



#### IV. JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL TRABAJO

*S. coelicolor* A3(2) es la especie más estudiada genéticamente, por lo que es considerada la cepa modelo del género. La producción de enzimas, ácidos orgánicos y antibióticos ha estimulado la aplicación de *Streptomyces* como sistema genético. Su uso como hospedero para la expresión de genes es favorecido por que no causa enfermedades ni es parásito del hombre o animales (salvo dos especies), e importantemente por su alta capacidad de secreción de proteínas. Gracias a las técnicas de DNA recombinante se han podido realizar estudios de producción de metabolitos secundarios, así como el análisis del control genético de la diferenciación y su correlación con la producción de antibióticos, lo que ha permitido conocer con más detalle la arquitectura de diversos segmentos del cromosoma que contienen grupos de genes de interés. El estudio de la regulación genética de la producción de antibióticos en *Streptomyces* es un tema de gran relevancia, tanto para el entendimiento de la genética del desarrollo como para su aplicación desde el punto de vista biotecnológico.

*Streptomyces coelicolor* A3(2) es una cepa particularmente apropiada para estudiar el control de la síntesis de antibióticos ya que dos de sus antibióticos son pigmentados y fácilmente visibles; de éstos, la actinorrodina, el antibiótico policétido pigmentado de azul ha recibido la mayor atención como un modelo de producción y secreción de antibióticos.

A fin de avanzar en el conocimiento de la regulación de la diferenciación, la producción de lipasas y la influencia de éstas en la síntesis de antibióticos tipo policétido en la cepa modelo *S. coelicolor* A3(2), el presente trabajo se diseñó tomando en cuenta que (i) en estudios de hibridización entre el DNA de *S. coelicolor* y una región interna del gen

*lipA* de *S. exfoliatus* M11 se encontró una región de alta homología; (ii) estas bacterias acumulan triacilgliceroles y se sugiere que estos lípidos pueden estar funcionando como una fuente de carbono para el metabolismo secundario; y (iii) se propone que la actividad lipolítica pueda ser limitante para la síntesis de la actinorrodina a través de su acción sobre los triacilgliceroles almacenados.

#### OBJETIVO PRINCIPAL DEL PRESENTE TRABAJO

**EVALUAR LA PARTICIPACIÓN DE LA LIPASA EXTRACELULAR DE *Streptomyces coelicolor* A3(2) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA.**

Para lograr ésto se siguió la siguiente estrategia general:

1. Clonar y caracterizar la secuencia de *S. coelicolor* A3(2) homóloga al gen de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11.
2. Evaluar la actividad lipolítica de la lipasa de *S. coelicolor*, así como su regulación.
3. Obtener una cepa de *S. coelicolor* con las regiones genéticas asociadas a la actividad lipolítica deletadas.
4. Determinar la posición cromosomal de los genes identificados.
5. Evaluar en esta cepa mutante la producción de actinorrodina.

## V. TRABAJO DE INVESTIGACION

## The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator

Fabiola Valdez,<sup>1</sup> Gabriela González-Cerón,<sup>1</sup> Helen M. Kieser<sup>2</sup> and Luis Servín-González<sup>1</sup>

Author for correspondence: Luis Servín-González. Tel: +52 5 622 3817. Fax: +52 5 550 0048.  
e-mail: servinlq.servidor.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 DF, Mexico

<sup>2</sup> John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK

**A region of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome was identified and cloned by using as a probe the lipase gene from *Streptomyces exfoliatus* M11. The cloned region consisted of 6286 bp, and carried a complete lipase gene, *lipA*, as well as a gene encoding a transcriptional activator (*lipR*). The *S. coelicolor* A3(2) *lipA* gene encodes a functional extracellular lipase 82% identical to the *S. exfoliatus* M11 lipase; the partially purified *S. coelicolor* enzyme showed a preference for substrates of short to medium chain length. Transcription of *lipA* was completely dependent on the presence of *lipR*, and occurred from a single promoter similar to the *lipA* promoters of *S. exfoliatus* M11 and *Streptomyces albus* G. These three *Streptomyces lipA* promoters have well-conserved –10 and –35 regions, as well as additional conserved sequences upstream of the –35 region, which could function as targets for transcriptional activation by the cognate LipR regulators. The *Streptomyces* LipR activators are related to other bacterial regulators of a similar size, constituting a previously unidentified family of proteins that includes MalT, AcoK, AlkS, AfsR, five mycobacterial proteins of unknown function and some *Streptomyces* regulators in antibiotic synthesis clusters. A lipase-deficient strain of *S. coelicolor* was constructed and found to be slightly affected in production of the polyketide antibiotic actinorhodin.**

**Keywords:** extracellular lipase, MalT family of regulators, *Streptomyces coelicolor*, LipR transcriptional activator

### INTRODUCTION

The genus *Streptomyces* consists of sporulating Gram-positive soil bacteria with a mycelial growth habit and a life cycle with complex morphological and physiological differentiation. *Streptomyces* has recently been the focus of studies aimed at understanding the regulation of differentiation at the genetic level (Chater, 1993, 1998). *Streptomyces coelicolor* A3(2), in particular, has been intensively studied, and is a model system for understanding fundamental aspects of the molecular biology of this genus, making it the best known *Streptomyces* species at the genetic level (Redenbach *et al.*, 1996).

Many *Streptomyces* species are known to be lipolytic (Sztajer *et al.*, 1988) and two different types of lipase

genes have been cloned from this genus. We have previously described the lipase genes of *Streptomyces exfoliatus* M11 (Pérez *et al.*, 1993) and *Streptomyces albus* G (Cruz *et al.*, 1994), and shown that these highly similar lipases are related to a psychrophilic lipase from *Moraxella* sp. TA144 (Feller *et al.*, 1990). Several *Streptomyces* species harbour sequences homologous to this family in their genomes (Cruz *et al.*, 1994). The enzymes are related to a family of mammalian platelet activating factor acetylhydrolases (Hattori *et al.*, 1996). The *S. exfoliatus* M11 lipase is a typical  $\alpha/\beta$  hydrolase, lacking a structure similar to those in fungal lipases that are capable of functioning as a 'lid' (Wei *et al.*, 1998). A second type of lipase gene encoding a lipase related to group II *Pseudomonas* lipases has recently been cloned from *Streptomyces cinnamomeus* (Sommer *et al.*, 1997). While *Streptomyces* lipases might be involved in the utilization of oils present in the medium, they might also metabolize triacylglycerols accumulated during vegetat-

The GenBank accession numbers for the sequences described in this paper are AF009336 and U03114.

ive growth in several *Streptomyces* species, including *S. coelicolor* A3(2), and might serve as a carbon source for antibiotic synthesis (Olukoshi & Packter, 1994). The recent finding that *lipA* is regulated in *S. exfoliatus* M11 by a *blaA*-dependent transcriptional activator in a growth-phase-dependent manner suggests that it could be involved in using accumulated oil (Servín-González *et al.*, 1997). Because sequences in the genome of *S. coelicolor* A3(2) hybridize at high stringency to the cloned *lipA* from *S. exfoliatus* M11 (Cruz *et al.*, 1994), we initially set out to determine whether they encode a functional lipase related to the lipases from *S. exfoliatus* M11 and *S. albus* G.

## METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** We used the plasmid-less wild-type *S. coelicolor* A3(2) strain M145, and *Streptomyces lividans* 1326 (Hopwood *et al.*, 1985). The *Escherichia coli* K-12 strains used were JM101 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), CJ236 (*dut-1 ung-1 thi-1 relA1/pCJ105*) and GM272 (*fhuA2* or *fhuA31, lacY1* or *lacZ4, tsx-1* or *tsx-78, glnV44 galK2 dcm-6 dam-3 mtlA2 metB1 thi-1 hsdS21*), which was kindly provided by the *E. coli* Genetic Stock Center.

**Media and growth conditions.** Strains of *E. coli* were grown in Luria-Bertani or 2 × YT medium (Sambrook *et al.*, 1989). When needed, carbenicillin was added at a final concentration of 200 µg ml<sup>-1</sup>. Media and conditions for growth of *Streptomyces* strains were as described by Hopwood *et al.* (1985); liquid SMM medium was as described by Takano *et al.* (1992). To detect lipase activity on solid medium, olive oil/rhodamine B plates were prepared as described previously (Pérez *et al.*, 1993). For lipase specificity assays we used R2YE plates containing a 1% emulsion of the triglyceride being tested.

**Recombinant DNA techniques.** *Streptomyces* plasmids and chromosomal DNA were isolated as described by Hopwood *et al.* (1985) with slight modifications. Procedures cited in Hopwood *et al.* (1985) were also used to prepare and transform *Streptomyces* protoplasts. Manipulation of *E. coli* DNA was carried out as in Sambrook *et al.* (1989). Competent cells for transformation were prepared by the method of Inoue *et al.* (1990). In-phase cloning of the *S. coelicolor lipA* in expression vector pJ6021 (Takano *et al.*, 1995) was based on site-directed mutagenesis according to the protocol of Kunkel (1985), using an oligonucleotide with the sequence 5'-GGAC-ACCCCCATATGCAGCAGAACCC-3'. The PCR was carried out with AmpliTaq DNA polymerase from Perkin-Elmer according to the instructions of the manufacturer.

**Nucleotide sequencing and sequence analysis.** Sequencing of M13 clones obtained by random subcloning of sonicated DNA into the *Sma*I site of M13mp19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) used Sequenase or Thermosequenase kits (Amersham). Southern hybridizations were carried out using the PhotoGene system from Life Technologies; probes were labelled with a BioPrime kit, also from Life Technologies. Sequences were analysed with PC/GENE (version 6.85; IntelliGenetics), DNAMAN (Lynnon BioSoft) and PHYLIP (Felsenstein, 1988).

**SDS-PAGE and immunodetection of lipase.** For SDS-PAGE a 4% stacking gel and a 10% separating gel in a Mighty Small II electrophoresis unit (Hofer Scientific Instruments) were used. Proteins were transferred to Hybond nitrocellulose (Amersham) for Western blotting and immunodetection as previously described using rabbit polyclonal antibodies

directed against the purified *S. exfoliatus* M11 lipase (Servín-González *et al.*, 1997).

**Biochemical methods.** The *S. coelicolor* A3(2) lipase was partially purified from 1 l cultures of M145(pB108) grown in liquid R2YE medium. The cultures were centrifuged for 15 min at 14000 r.p.m. and the supernatant was recentrifuged for 30 min at the same speed. Ammonium sulphate was added to 70% saturation on ice, and the precipitated protein, collected by centrifugation, was resuspended in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7). The protein was dialysed against the same buffer, concentrated to a final volume of 3 ml in a Centriprep 10 concentrator (Amicon), and loaded on an Ultrogel Aca54 column (1.5 × 100 cm). Fractions containing lipase activity were pooled, concentrated as before and rerun in the same column. Those from the middle of the lipase peak were used immediately for the specificity studies and for Western blotting.

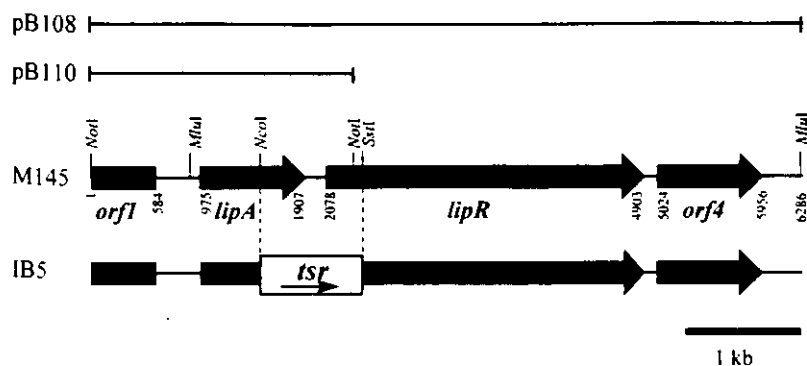
Lipase activity was assayed colorimetrically as described by Pérez *et al.* (1993), except that reactions were carried out in 50 mM TES (pH 7.2). Lipase units were as previously defined (Servín-González *et al.*, 1997).

**High-resolution nuclease S1 mapping.** Probes for S1 mapping were prepared by PCR amplification, after labelling the 5' end of the appropriate primers with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP using T4 polynucleotide kinase. For mapping the *lipA* transcriptional start site the labelled primer was 5'-CGTCACTGCGGCCAGCC-3', and the unlabelled primer was 5'-GCGTGCGCCATGTCCGC-3', generating a 526 nt probe. For mapping the *lipR* transcript the labelled primer was 5'-GCAGCGCGTCCAGCATC-3' and the unlabelled primer had the sequence 5'-GTGAGAATTCGGAGCGGATCGAGGAGTACCGG-3', generating a 316 nt probe; this last primer carried a 15 nt non-hybridizing extension (shown in italics) to distinguish full-length protection of the probe by upstream transcripts from reannealed probe. The PCR products uniquely labelled at one end were purified from low-melting-point agarose gels. For each S1 nuclease protection assay 10<sup>5</sup> Cerenkov c.p.m. of probe was hybridized to 50 µg total RNA obtained by the method of Hopwood *et al.* (1985). Hybridizations were performed in 20 µl sodium trichloroacetate buffer (Murray, 1986) for 5 h at 45 °C, after brief denaturation at 65 °C for 10 min. Further processing of the samples and gel electrophoresis of the protected fragments were as previously described (Servín-González *et al.*, 1997). The protected fragments were run parallel to sequence ladders obtained with the same labelled primer used for probe preparation.

## RESULTS

### Cloning and sequencing of the *S. coelicolor* A3(2) *lipA* and *lipR* homologues

Previous work in our laboratory showed that the *S. coelicolor* A3(2) genome contained sequences that hybridized at high stringency to a fragment internal to *S. exfoliatus* M11 *lipA* (Cruz *et al.*, 1994). To find whether these sequences represented a *lipA* homologue, we localized them by Southern hybridization using a fragment internal to *S. exfoliatus* M11 *lipA* as a probe (not shown). Total chromosomal DNA from *S. coelicolor* A3(2) strain M145 was cut with *Mlu*I and fragments in the 5 kb range, isolated from a low-melting-point agarose gel, were cloned in the single *Mlu*I site of pB72 (Servín-González *et al.*, 1995) and introduced into



**Fig. 1.** Map of the *S. coelicolor* A3(2) *lipA* region. Positions of the start and stop codons of ORFs are indicated; note that *orf1* is incomplete and is transcribed from right to left. The *BglII* fragments cloned in pJ702 are shown above the sequences for pB108 and pB110. The position of the *tsr* insertion in the chromosome of strain IB5 is shown below the map of the equivalent region in the wild-type M145 strain.

*E. coli*. Colony hybridization yielded eight positive clones with the same 5.3 kb insert; both orientations were represented. Further Southern hybridization experiments revealed that the 5.3 kb *MluI* fragment also carried a sequence that hybridized at lower stringency to a fragment internal to the *S. exfoliatus* M11 *lipR* gene (Servín-González *et al.*, 1997). The data suggested that the 5.3 kb *MluI* fragment carried both *lipA* and *lipR* homologues of these previously described genes of *S. exfoliatus* M11.

Initial sequencing at the ends of the fragment uncovered a *lipA* that probably lacked the promoter region, since the coding sequence started just 66 nt from the left-hand end of the fragment (Fig. 1). To clone additional DNA upstream of *lipA*, we took advantage of the single *NcoI* site located 0.6 kb from the left-hand *MluI* site inside *lipA*. Southern hybridization of M145 chromosomal DNA with the 0.6 kb *MluI*–*NcoI* fragment as a probe identified a hybridizing 1.5 kb *NotI*–*NcoI* fragment; a library of *NotI*–*NcoI* fragments in this size range was constructed in pB72 and a positive clone was identified. The fragments were then joined at the single *NcoI* site, generating a cloned fragment of 6.2 kb with the additional 0.9 kb of DNA upstream of the left-hand *MluI* site now expected to include the *lipA* promoter region. The cloned DNA was sequenced and analysed for protein coding regions.

#### Sequence analysis of the *S. coelicolor* A3(2) *lipA* region

The cloned DNA sequence consisted of 6286 bp, within which four ORFs could be identified. One of them (*orf1*) is incomplete and would be transcribed from right to left (see Fig. 1); it encodes a protein with limited similarity to some bacterial oxidoreductases (data not shown). The second ORF is oriented oppositely to *orf1* and is separated from it by 390 bp. Its translation product consists of 311 amino acids; the 42 at the N-terminus have the characteristics of a signal peptide. After the single putative processing site there is strong sequence identity to the extracellular lipases from *S. exfoliatus* M11 (82%) and *S. albus* G (85%); therefore, this ORF is the *S. coelicolor* A3(2) *lipA* homologue. Downstream of *lipA* there is a third ORF, designated *lipR* since it encodes a protein of 941 amino acids with 47% identity

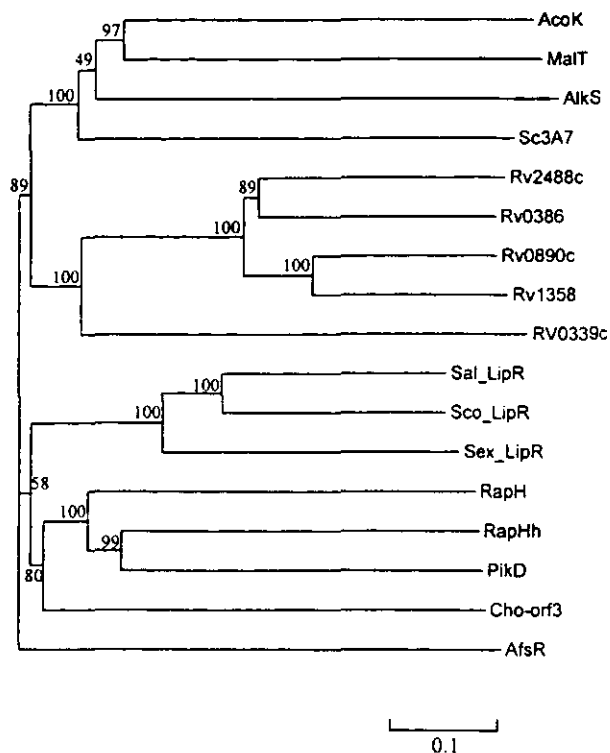
to the product of *S. exfoliatus* M11 *lipR*, which encodes a transcriptional activator of *lipA*; the similarity is particularly strong at the C-terminal, DNA-binding domain. While the gene organization of *lipA* and *lipR* in the two species is similar in that *lipA* precedes *lipR*, one significant difference is that in *S. exfoliatus* M11 the genes are separated by a 400 bp intergenic region containing a large inverted repeat (Pérez *et al.*, 1993), whereas in *S. coelicolor* the intergenic region consists of only 170 bp and does not show an inverted repeat capable of acting as a transcriptional terminator. An additional difference is the absence of a TTA codon in the *S. coelicolor* *lipR* sequence.

The last ORF (*orf4*) encodes a putative protein of 310 amino acids. It shows no significant similarity to proteins of known function, and is 45% identical to the product of an ORF located downstream of *lipR* in *S. exfoliatus* M11. This ORF has been shown to play no part in lipase expression (Servín-González *et al.*, 1997).

#### LipR homologues are members of a novel family of bacterial regulators

Similarity between LipR of *S. exfoliatus* M11 (and therefore of its *S. coelicolor* homologue) and the product of a partially sequenced ORF downstream of the *S. albus* G *lipA* gene had been previously noted (Servín-González *et al.*, 1997). Sequencing the remainder of this ORF (GenBank accession no. U03114) revealed a complete *S. albus* G *lipR* gene encoding a protein of 890 amino acids with 60% identity to *S. coelicolor* LipR and 47% identity to *S. exfoliatus* LipR; again, the similarity is higher in the C-terminal region where the DNA-binding domain is located. The *S. albus* G *lipR* gene, like that of *S. coelicolor*, lacks a TFA codon.

Because LipR of *S. exfoliatus* showed some similarity to the transcriptional activators MalT of *E. coli* and AcoK of *Klebsiella pneumoniae* (Servín-González *et al.*, 1997), we searched databases to identify any additional protein sequences that might be related. Since the similarity to MalT and AcoK was limited, we carried out PSI-BLAST searches (Altschul *et al.*, 1997) to identify additional proteins related to MalT and LipR. These searches revealed sequences of a similar size (most of them around 900 amino acids), having a homologous DNA-binding helix–turn–helix motif at the C-terminus. Cross-



**Fig. 2.** Unrooted tree showing sequence relationships between regulatory proteins similar to *Streptomyces* LipR. The branch lengths are proportional to the evolutionary distance, and the numbers at the base of each branch are the confidence values obtained by bootstrap analysis. The accession numbers for the sequences are: AcoK (U10553), MalT (AE000418), AlkS (X52935), Sc3A7 (AL031155), Rv2488c (AL021246), Rv0386 (AL021931), Rv0890c (Z73101), Rv1358 (Z75555), Rv0339c (Z97991), Sal\_LipR (U03114), Sco\_LipR (AF009336), Sex\_LipR (M86351), RapH (X86780), RapHh (AF007101), PikD (AF079139), Cho-orf3 (D13457) and AfsR (P25941).

searches and pairwise alignments showed that these sequences were indeed related (data not shown). Most came from either *Streptomyces* species or the related actinomycete *Mycobacterium tuberculosis*; only a few (MalT, AcoK and AlkS) came from Gram-negative bacteria. Therefore, these protein sequences appear to define a novel family of bacterial regulatory proteins. Of particular interest is the inclusion from the PSI-BLAST search of the AfsR protein as a member of this family, because the N-terminal portion of AfsR has demonstrated homology to the family of *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARPs; Wietzorrek & Bibb, 1997). A tree was constructed by the neighbour-joining method to reveal relationships between the different members of this protein family, which we call the MalT family of bacterial regulators (Fig. 2).

#### Chromosomal location of the cloned *S. coelicolor* A3(2) *lipA* gene

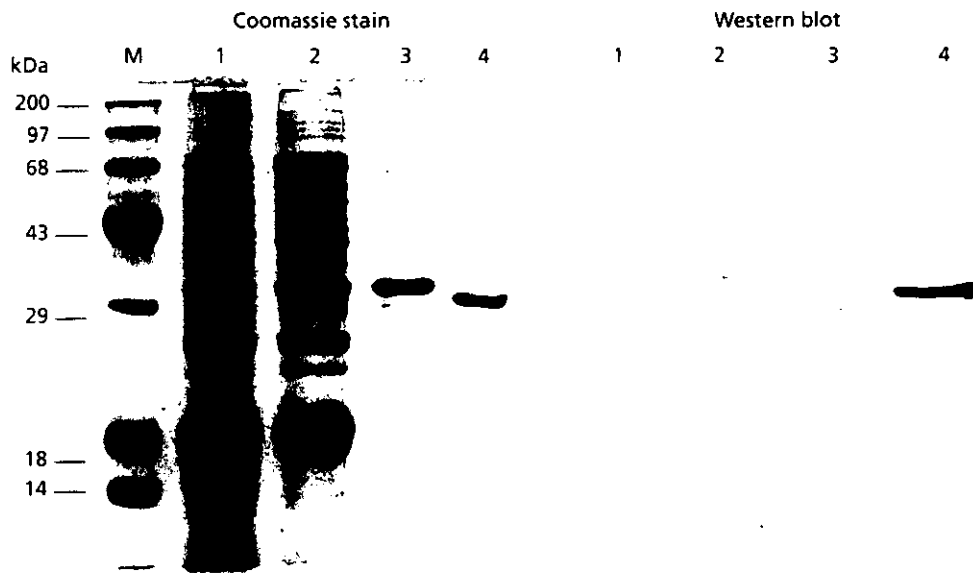
To locate the cloned region on the *S. coelicolor* A3(2) chromosome, the 5.3 kb *Mlu*I fragment containing *lipA* was used to probe the ordered cosmid library of

Redenbach *et al.* (1996). The fragment hybridized only to the F42 cosmid, belonging to the F fragment close to one of the ends of the linear chromosome; the *abaA* gene has also been mapped to this cosmid (Redenbach *et al.*, 1996).

#### Expression of the cloned *S. coelicolor* A3(2) lipase gene

The previous results demonstrated that *S. coelicolor* A3(2) carries homologues of the previously described *lipA* and *lipR* genes; therefore, we measured the enzyme activity in culture supernatants of *S. coelicolor* A3(2). Initial assays showed that lipase activity was relatively low; therefore, gene disruption was carried out to distinguish activity originating from the *lipA*-encoded lipase from activity due to other extracellular enzymes with esterase activity. This was done by first cloning a 1.1 kb *Bcl*I fragment from pIJ702 (Katz *et al.*, 1983) which contains the thiostrepton-resistance gene (*tsr*), between the single *Nco*I and *Sst*I sites of the 6.2 kb insert as shown in Fig. 1, thereby replacing a 0.9 kb fragment containing most of *lipA* and the N-terminal portion of *lipR* with the *tsr* gene. While a portion of the *lipA* gene remains in this construct, it would lack a functional catalytic triad (Wei *et al.*, 1998). This modified insert was cloned in the *E. coli* vector pB72 (a pUC derivative; Servin-González *et al.*, 1997), and introduced by transformation into *S. coelicolor* M145 after alkaline denaturation and renaturation (Oh & Chater, 1997). Southern hybridization with DNA isolated from 20 independent thiostrepton-resistant transformants revealed that in 19 a single-crossover event had led to integration of the entire plasmid into the *S. coelicolor* M145 chromosome (data not shown), whereas in the remaining transformant a double-crossover event had replaced the wild-type *lipAR* operon with the mutated version in one step. This strain was purified and named IB5 (Fig. 1). Culture supernatants of *S. coelicolor* M145 and IB5 strains showed very low lipase activity ( $<0.001$  units  $\text{ml}^{-1}$ ) and although IB5 cultures gave lower activity interference from other enzymes showing esterase activity was still significant (data not shown).

Lipase activity produced by the wild-type strain was too low to allow specific lipase detection using methods such as the production of lipolysis haloes on plates containing emulsified triacylglycerols or olive oil/rhodamine B plates (data not shown). Therefore, to identify the product of *lipA*, and determine whether it encoded a functional lipase, an attempt was made to overproduce the enzyme by cloning the entire 6.3 kb fragment shown in Fig. 1 in the *Bgl*II site of the high-copy-number vector pIJ702 (Katz *et al.*, 1983), resulting in plasmid pB108. In addition, we constructed a plasmid (pB110) that carried only the 2.3 kb *Not*I fragment containing *lipA* and its upstream promoter region, but not the *lipR* gene, in the same orientation as in pB108 (Fig. 1). Both plasmids were introduced into *S. lividans* by transformation and culture supernatants were assayed for lipase activity. Supernatants from cultures carrying pB108 showed high levels of lipase activity (up to 0.60 units  $\text{ml}^{-1}$  when



**Fig. 3.** Identification of the *S. coelicolor* A3(2) *lipA*-encoded lipase. Total protein in culture supernatants of *S. lividans* carrying pB110 (lane 1) or pB108 (lane 2) was precipitated as described by Servín-González *et al.* (1997). Lane 3 contained 1 µg of partially purified *S. coelicolor* lipase; lane 4 contained 1 µg *S. exfoliatus* lipase. Protein in one gel was stained with Coomassie blue, while in another identical gel it was electrotransferred to Hybond nitrocellulose and examined by Western blotting as described in Methods.

**Table 1.** Specificity of *S. coelicolor* A3(2) lipase with substrates of different fatty acid chain length

Fatty acid	Triglyceride	Size of halo (mm)*	<i>p</i> -Nitrophenyl ester	Esterase activity (%)†
C4:0	Tributyrin	8	Butyrate	100
C6:0	Tricaproin	15	—	ND
C8:0	Tricaprylin	14	Caprylate	104
C10:0	Tricaprin	6	—	ND
C12:0	Trilaurin	2	Laurate	55
C14:0	Trimyristin	<1	—	ND
C16:0	Tripalmitin	<1	Palmitate	42
C18:0	Tristearin	<1	Stearate	27

ND, Not determined.

\* Distance from the border of the colony to edge of halo. Representative results are shown.

† One hundred per cent activity with *p*-nitrophenyl butyrate corresponds to 67.6 µmol *p*-nitrophenol liberated min<sup>-1</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>. Representative results are shown.

grown in LB medium and up to 4.0 units ml<sup>-1</sup> when grown in liquid R2 medium), whereas supernatants from cultures carrying pB110 produced very low lipase levels (<0.001 units ml<sup>-1</sup> in either medium), indicating that, as in *S. exfoliatus* M11, *lipR* is necessary for expression of the *lipA* gene (Servín-González *et al.*, 1997).

When *lipA* was placed under the control of the strong and inducible *tipA* promoter in plasmid pJ6021 (Takano *et al.*, 1995), lipase activity could be clearly detected in the absence of a functional *lipR* gene (0.67 units per ml of supernatant obtained under inducing

conditions in LB medium), indicating that, as expected, the *lipR* product was required for *lipA* transcription, and not for lipase processing or secretion.

When total protein in supernatants of cultures carrying pB108 and pB110 was analysed by SDS-PAGE, a protein band in the predicted size range for the *lipA*-encoded lipase (around 29 kDa) was clearly visible in cultures carrying pB108, but absent from cultures carrying pB110 (Fig. 3). Western blot experiments using polyclonal antibodies directed against the purified *S. exfoliatus* M11 lipase (Servín-González *et al.*, 1997) confirmed that the 29 kDa protein corresponded to the *S. coelicolor*



A3(2) lipase. In addition to the protein band of the expected size, several smaller bands were detected by the anti-lipase antibodies (Fig. 3, lane 2); the relative amounts increased if the crude supernatant was stored refrigerated for a few days (data not shown), so they were probably degradation products. Since cultures carrying pB108 overproduced the *S. coelicolor* lipase, it could be substantially purified by gel filtration chromatography; the method used previously to purify the *S. exfoliatus* lipase in a single step (Wei *et al.*, 1998) could not be used, since the enzyme did not bind to CM-cellulose (data not shown). One major band in the fraction that contained most of the lipase activity cross-reacted with the anti-lipase antibodies (Fig. 3, lane 3).

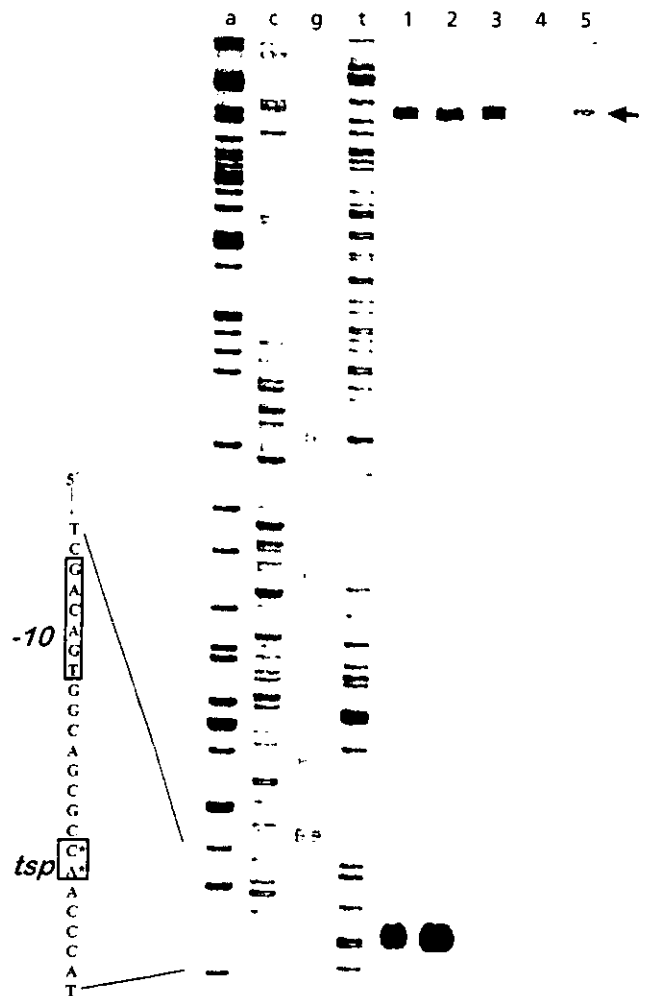
#### Substrate specificity of the *S. coelicolor* A3(2) lipase

Substrate specificity was determined with a series of plates containing agar medium emulsified with triacylglycerols varying in fatty acid chain length from four to 18 carbon atoms. *S. lividans* carrying pB108 produced lipolysis haloes on plates containing the emulsified substrates only when the triacylglycerols had acyl chains of 12 carbon atoms or less (Table 1); on substrates of longer chain length haloes were barely visible.

Colorimetric assays were also carried out with *p*-nitrophenyl ester derivatives of different chain lengths, using the partially purified lipase (Fig. 3, lane 3). Again, higher activities were obtained with the shorter-chain substrates; activities decreased with increasing carbon chain length.

#### Identification of the *lipA* promoter and similarity to other *Streptomyces lipA* promoter regions

High-resolution S1 mapping experiments using an end-labelled probe and total RNA purified from *S. lividans* carrying either pB108 or pB110 detected *lipA* transcripts only in cultures carrying pB108. These experiments confirmed that transcription of *lipA* required the *lipR* product, and occurred from a single transcriptional start point (Fig. 4). The most likely  $-10$  region for the *lipA* promoter is the sequence GACAGT, which matches five of six bases in the  $-10$  region of the *S. exfoliatus* M11 promoter (GAGAGT; Pérez *et al.*, 1993) and is consistent with the consensus sequence of *Streptomyces* promoters recognized by the major form of RNA polymerase holoenzyme (Strohl, 1992). It is separated by 17 nt from the sequence TCCCC, which shows a poor match to the consensus  $-35$  sequence for *Streptomyces* promoters but resembles the  $-35$  region of the *S. exfoliatus* M11 *lipA* promoter (TGCGCG). Therefore, the *S. coelicolor* and *S. exfoliatus* *lipA* promoters appear to be similar in having good  $-10$  but poor  $-35$  regions. While the *lipA* promoter from *S. albus* G has not been mapped, the nucleotide sequence upstream of *lipA* aligns conservatively to the foregoing  $-10$  and  $-35$  regions, with a 17 bp spacer. Given the conservation of the *lipA* promoters and the need for transcriptional activation, we looked for other sequences that might be involved in

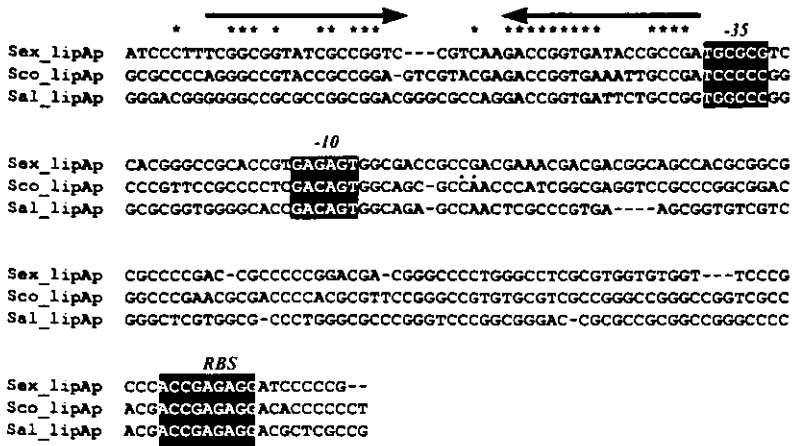


**Fig. 4.** High-resolution nuclease S1 mapping of the *lipA* transcriptional start point. RNAs were purified from cultures of *S. lividans*/pB108 grown in liquid R2 medium for 48 and 72 h (lanes 1 and 2) or from equivalent *S. lividans*/pB110 cultures (lanes 3 and 4). Lane 5 is a control with the same amount of tRNA. An arrow points to the position of the probe. Transcriptional start points are indicated by asterisks.

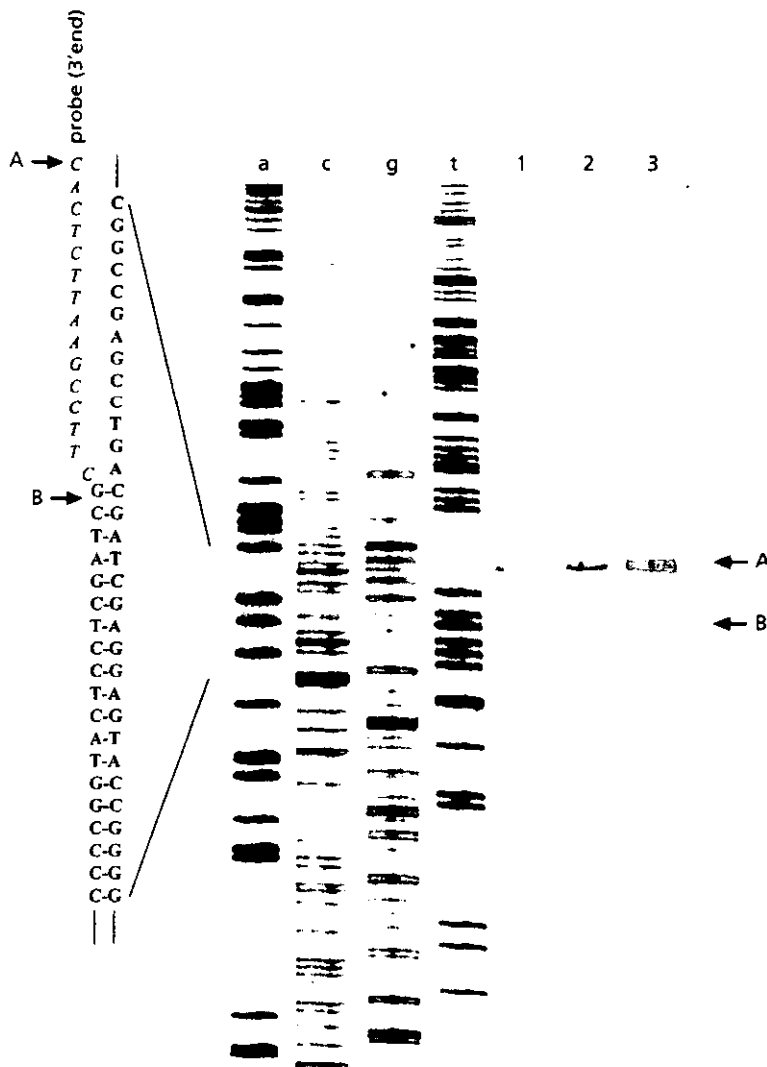
regulating *lipA*, and found several conserved bases just upstream of the  $-35$  regions of the promoters (Fig. 5). These are part of a stem-loop structure in *S. exfoliatus*, as previously noted (Pérez *et al.*, 1993); though many of the conserved bases upstream of the  $-35$  region overlap this stem-loop structure, there is significant divergence between the two arms in the *S. coelicolor* and *S. albus* equivalent regions, so that no stable secondary structure can be predicted. The location of the conserved bases just upstream of the  $-35$  regions is consistent with their involvement in transcriptional activation of the promoters (Gralla & Collado-Vides, 1996).

#### The *lipA* and *lipR* genes are organized as an operon

An important difference between the corresponding *lipA* and *lipR* genes in *S. exfoliatus* M11 and *S. coelicolor* A3(2) is the presence of a large intercistronic region



**Fig. 5.** Alignment of nucleotide sequences of the *lipA* promoter regions of *S. exfoliatus* M11 (Sex\_lipAp), *S. coelicolor* A3(2) (Sco\_lipAp) and *S. albus* G (Sal\_lipAp). The conserved RBS and the -10 and -35 regions of the promoters are highlighted. Asterisks indicate bases that are conserved in all three species upstream of the -35 region. The position of the stem-loop structure in the *S. exfoliatus* M11 promoter region is indicated by arrows. Two small dots above the *S. coelicolor* sequence mark the transcriptional start point.



**Fig. 6.** High-resolution S1 nuclease mapping of the *lipR* transcript. The sequence on the left shows the 15 bp extension at the 3' end of the probe (in italics) that allows discrimination between full-length protection of the probe (band labelled B) and reannealed probe (band labelled A). Total RNA used was from cultures of *S. lividans* grown in liquid R2 medium for 48 h; lane 1 from *S. lividans* spB108; lane 2 from *S. lividans* spB110; lane 3 is a control with the same amount of tRNA.

containing an apparent transcriptional terminator in the former. Since it appeared likely that the *S. coelicolor* *lipA* and *lipR* genes could be cotranscribed, thereby

constituting an operon, high-resolution S1 mapping of the *lipR* transcript was carried out with an end-labelled probe that contained in its 3' end a 15 bp non-

hybridizing extension to discriminate between complete protection of the probe by transcripts originating upstream and reannealed probe, a small amount of which is usually obtained in these experiments. No bands corresponding to transcripts originating inside the *lipA*–*lipR* intercistronic region could be detected, whereas a band corresponding to full-length protection of the probe by transcripts originating upstream was readily detected (Fig. 6). Therefore the *lipA* and *lipR* genes constitute an operon in *S. coelicolor* A3(2).

### Disruption of the chromosomal *lipAR* operon affects actinorhodin production

*Streptomyces* species accumulate neutral triacylglycerols during growth in glucose-containing medium, and Olukoshi & Packter (1994) speculated that these storage compounds might be a carbon source for synthesis of polyketide antibiotics. Utilization of triacylglycerols is initiated by a lipase releasing free fatty acids that can be degraded by the  $\beta$ -oxidation pathway, demonstrated to be constitutive in *S. coelicolor* (Banchio & Gramajo, 1997). We therefore measured production of actinorhodin (using the procedure of Strauch *et al.*, 1991) by the wild-type *S. coelicolor* strain M145 and its lipase-negative derivative IB5, to determine whether lipase deficiency affected the ability to synthesize actinorhodin. Growth of both strains, as well as the time at which actinorhodin production started, were very similar (cultures were grown for 96 h, data not shown); however, the lipase-deficient mutant IB5 consistently produced only about half as much actinorhodin as the M145 parent when grown in SMM medium ( $59.3 \pm 7.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  for IB5 against  $123.9 \pm 20.6 \mu\text{g ml}^{-1}$  for M145; six independent determinations), or after transfer from YEME medium during late-exponential phase (where there is significant accumulation of triacylglycerols; Olukoshi & Packter, 1994) to SMM lacking glucose ( $50.46 \pm 4.3 \mu\text{g ml}^{-1}$  for IB5 against  $112.47 \pm 25.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  for M145; six independent determinations).

### DISCUSSION

*S. coelicolor* A3(2) has in its genome a *lipA* gene similar to the lipase genes previously described from *S. exfoliatus* M11 and *S. albus* G. The *lipA* of *S. coelicolor* was localized to the F42 cosmid of the ordered cosmid library of Redenbach *et al.* (1996), adding to the number of genes encoding extracellular enzymes that are located near either end of the linear chromosome. Moreover, *lipA* was associated with a downstream gene homologous to the *S. exfoliatus* M11 *lipR*, which encodes a transcriptional activator of the *lipA* promoter. Additional sequence obtained from the cloned *S. albus* G *lipA* region also showed a complete *lipR* homologue downstream of the lipase gene. A third conserved gene downstream of *lipR* is present in both *S. exfoliatus* M11 and *S. coelicolor* A3(2); however, this gene is not essential for expression of *lipA* (Servin-González *et al.*, 1997) and is not present downstream of *lipR* in *S. albus* G. There is also no conservation upstream of *lipA*, since

in *S. albus* G there is an ORF (transcribed in the same orientation as *lipA* and *lipR*) that encodes a putative membrane protein of unknown function, whereas in *S. coelicolor* A3(2) there is a divergent ORF encoding a putative oxidoreductase. No additional sequence has been obtained upstream of *S. exfoliatus* M11 *lipA*, but it is known that the promoter region located in 250 bp of DNA upstream of *lipA* contains all the regulatory elements needed for high-level expression (Pérez *et al.*, 1993; Servin-González *et al.*, 1997). Therefore, *lipA* and its associated regulatory gene *lipR* appear to be the minimal unit for efficient lipase synthesis and secretion.

The *S. coelicolor* A3(2) *lipA* encodes a functional extracellular lipase that was secreted into the medium in significant amounts when *lipA* and *lipR* were cloned together in a high-copy-number plasmid. Appreciable degradation of the *S. coelicolor* A3(2) lipase in culture supernatants, even when overproduced, could explain the relatively low activities in the wild-type strain M145. The partially purified enzyme lost its activity quickly and underwent extensive degradation when stored at 4 °C for a few days (data not shown). In contrast the *S. exfoliatus* M11 enzyme was very stable, even in crude supernatants incubated at 37 °C for several days (Servin-González *et al.*, 1997). The crystal structure of the *S. exfoliatus* M11 lipase has been determined (Wei *et al.*, 1998) and because the enzyme from the two streptomycetes shows 82% sequence identity it was possible to model the structure of the *S. coelicolor* A3(2) enzyme using that of *S. exfoliatus* M11 as a template. The model (not shown) revealed that most of the differences, including several amino acids with charged side chains, were in the exposed part of the structure. This could explain some of the slightly different properties of the *S. coelicolor* lipase, such as its inability to bind to CM-cellulose, the small difference in electrophoretic mobility, and its instability.

The DNA-binding domain of *S. exfoliatus* LipR is homologous to the DNA-binding domain of a large family of bacterial regulatory proteins (Servin-González *et al.*, 1997). These proteins have a type 3 DNA-binding domain, as defined by Pao & Saier (1995), and range in size between 200 and 250 amino acids; most of them are response regulators of the UhpA family, but others (the LuxR subfamily; Fuqua *et al.*, 1994) are cell-density-responding regulators that use homoserine lactones as effectors. In addition, there are some that cannot be grouped with members of either subfamily. For example, GerE of *Bacillus subtilis* consists exclusively of the DNA-binding domain, and MalT, which is much larger, is a transcriptional activator of the maltose utilization regulon of *E. coli* (Schleif, 1996). Until the recent description of a MalT homologue, AcoK of *K. pneumoniae* (Peng *et al.*, 1997), MalT did not appear to resemble any other regulatory proteins outside its DNA-binding domain, and in fact was considered unusually large for a regulator (Pao & Saier, 1995; Schleif, 1996). The LipR protein of *S. exfoliatus* M11 has a homologous DNA-binding domain and is similar in size to MalT; in fact, limited similarity was observed between both

proteins and AcoK (Servín-González *et al.*, 1997). Use of the sensitive PSI-BLAST search (Altschul *et al.*, 1997) to detect additional related protein sequences identified other sequences with position-specific conservation outside the DNA-binding domains (see Fig. 2). The completely sequenced genome of *E. coli* has only one gene (MalT) in this protein family. The *M. tuberculosis* genome has five, whereas *S. coelicolor* (the genome of which has been only partially sequenced) has at least three (LipR, AfsR and Sc3A7; the latter is a deduced protein of unknown function). Two regulatory proteins, AcoK and AlkS, from Gram-negative organisms are involved, like MalT, in regulating catabolic functions (acetoin and alkane degradation, respectively; Peng *et al.*, 1997; Yuste *et al.*, 1998). Several members of this protein family come from streptomycetes; the LipR proteins are clearly involved in regulating a catabolic function, whereas others appear to be involved in regulating antibiotic synthesis, either as part of a cluster (PikD, RapH and its homologue RapHh; Xue *et al.*, 1998; Molnar *et al.*, 1996; Ruan *et al.*, 1997) or as pleiotropic regulators (AfsR; Floriano & Bibb, 1996). Analysis of sequence relationships revealed that the *Streptomyces* proteins group according to function, with those that are part of antibiotic biosynthesis clusters forming one sub-group, and LipR belonging to another. The mycobacterial proteins are also more closely related to one another than to other members of this protein family, and the Gram-negative proteins involved in catabolic functions are also separate, except for inclusion of the hypothetical *S. coelicolor* protein Sc3A7 of unknown function (see Fig. 2). The N-terminal portion of AfsR has already been shown to be related to a family of proteins involved in activating some antibiotic synthesis clusters (the SARP family; Wietzorrek & Bibb, 1997); however, it had not been previously recognized that the remainder of the AfsR sequence is related to the MalT family of activators, although it is of a similar size and the presence of a DNA-binding domain at the same C-terminal position had already been recognized (Horinouchi *et al.*, 1990). Therefore, AfsR appears to be a hybrid regulator, related to the SARP family of activators at its N-terminus and to the MalT family at its C-terminus; this explains why both ends of the protein can function independently in activating antibiotic production (Horinouchi *et al.*, 1990).

In summary, we have shown that *S. coelicolor* synthesizes a functional extracellular lipase that hydrolyses short-chain substrates preferentially. The structural *lipA* gene is part of an operon that also encodes a *lipA* activator that belongs to a new family of regulatory proteins. Disruption of *lipA* affects synthesis of the polyketide actinorhodin only slightly.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor Sir David Hopwood for allowing the mapping of the *lipAR* operon to be carried out in his laboratory. This work was supported, in part, by grants IN201794 from the DGAPA (National University of Mexico),

and 3156P-N9607 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México)

#### REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Banchio, C. & Gramajo, H. C. (1997). Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *Microbiology* 143, 2439–2447.
- Chater, K. F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 47, 685–713.
- Chater, K. F. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 144, 1465–1478.
- Cruz, H., Pérez, C., Wellington, E., Castro, C. & Servín-González, L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* 144, 141–142.
- Feller, G., Thiry, M. & Gerday, C. (1990). Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrophile *Moraxella* TA144. *Nucleic Acids Res* 18, 6431.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* 22, 521–565.
- Floriano, B. & Bibb, M. (1996). *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 21, 385–396.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269–275.
- Gralla, J. D. & Collado-Vides, J. (1996). Organization and function of transcription regulatory elements. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1232–1245. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Hattori, K., Adachi, H., Matsuzawa, A., Yamamoto, K., Tsujimoto, M., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H. & Inoue, K. (1996). cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 271, 33032–33038.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. & 7 other authors (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation.
- Horinouchi, S., Kito, M., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong, S. K., Miyake, K. & Beppu, T. (1990). Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 95, 49–56.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
- Katz, L., Thompson, C. J. & Hopwood, D. A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol* 129, 2703–2714.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 488–492.
- Molnar, I., Aparicio, J. F., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Schwecke, T., Konig, A., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1996). Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169, 1–7.

- Murray, M. G. (1986). Use of sodium trichloroacetate and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping. *Anal Biochem* 158, 165–170.
- Oh, S. H. & Chater, K. F. (1997). Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J Bacteriol* 179, 122–127.
- Olukoshi, E. R. & Packter, N. M. (1994). Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140, 931–943.
- Pao, G. M. & Saier, M. H., Jr (1995). Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J Mol Evol* 40, 136–154.
- Peng, H. L., Yang, Y. H., Deng, W. L. & Chang, H. Y. (1997). Identification and characterization of *acoK*, a regulatory gene of the *Klebsiella pneumoniae* *acoABCD* operon. *J Bacteriol* 179, 1497–1504.
- Pérez, C., Juárez, K., García-Castells, E., Soberón, G. & Servín-González, L. (1993). Cloning, characterization and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* 123, 109–114.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 21, 77–96.
- Ruan, X., Stassi, D., Lax, S. A. & Katz, L. (1997). A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* 203, 1–9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schleif, R. (1996). Two positively regulated systems, *ara* and *mal*. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1300–1309. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Servín-González, L., Sampieri, A., Cabello, J., Galván, L., Juárez, V. & Castro, C. (1995). Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology* 141, 2499–2510.
- Servín-González, L., Castro, C., Pérez, C., Rubio, M. & Valdez, F. (1997). *bldA*-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *J Bacteriol* 179, 7816–7826.
- Sommer, P., Bormann, C. & Gotz, F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol* 63, 3553–3560.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H. A. & Bibb, M. J. (1991). The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 5, 289–298.
- Strohl, W. R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* 20, 961–974.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. & Wieczorek, J. (1988). Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb Technol* 10, 492–497.
- Takano, E., Gramajo, H. C., Strauch, E., Andres, N., White, J. & Bibb, M. J. (1992). Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 6, 2797–2804.
- Takano, E., White, J., Thompson, C. J. & Bibb, M. J. (1995). Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166, 133–137.
- Wei, Y., Swenson, L., Castro, C. & 7 other authors (1998). Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure* 6, 511–519.
- Wietzorrek, A. & Bibb, M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25, 1181–1184.
- Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. W. & Sherman, D. H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12111–12116.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119.
- Yuste, L., Canosa, I. & Rojo, F. (1998). Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* 180, 5218–5226.

Received 15 March 1999; revised 10 May 1999; accepted 2 June 1999.

## VI. RESULTADOS ADICIONALES

### Clonación del operón *lipAR* de *S. coelicolor*.

A partir de DNA cromosomal de *S. coelicolor* digerido con diferentes enzimas se realizó un análisis por Southern blot usando como sonda un fragmento interno del gen *lipA* de *S. exfoliatus* a fin de identificar la región que presenta homología con dicho gen (Fig. 14a) Fragmentos MluI de aproximadamente 5.0 a 5.5 kb fueron purificados y clonados en el vector pB72 a fin de obtener un minibanco genómico en *E. coli* JM101. Se identificaron 8 clonas positivas con insertos del tamaño esperado, seis de las cuales presentaban el inserto en una orientación y las dos restantes con la orientación contraria con respecto al vector; se obtuvieron plásmidos de cada una de las orientaciones para someterlos a análisis posteriores. El fragmento clonado también contenía al homólogo del gen *lipR* de *S. exfoliatus* (Fig. 14b).

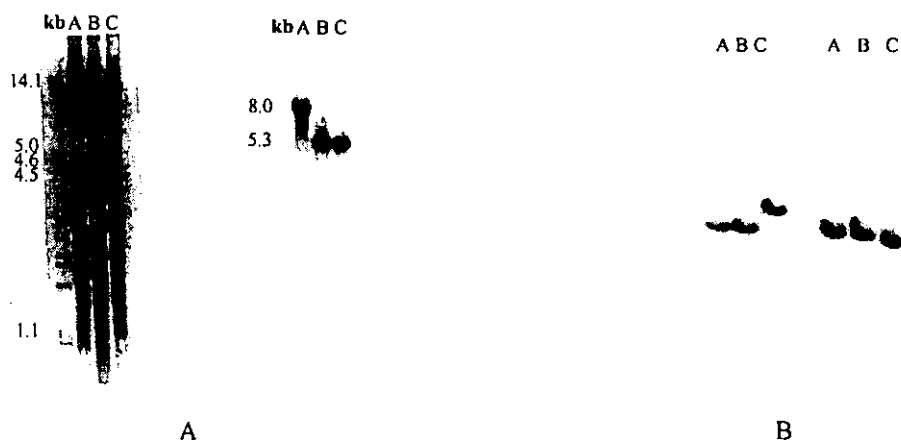


Figura 14. (A) Identificación de las regiones cromosomales de *S. coelicolor* homólogas a los genes *lipA* y *lipR* de *S. exfoliatus*. DNA cromosomal de *S. coelicolor* fue digerido con las enzimas PstI (A), MluI (B) y PstI-MluI (C), y analizado por Southern blot usando como sonda un fragmento interno del gen *lipA* de *S. exfoliatus*. (B) El fragmento MluI de 5.3 kb se clonó en el plásmido pB72, y la construcción obtenida se sometió otra vez a un análisis de Southern blot usando como sonda un fragmento interno del gen *lipR* de *S. exfoliatus* a fin de determinar la presencia de un homólogo, así como su posición con respecto al gen *lipA*, MluI (A), NcoI (B), y NotI (C). Los tres primeros carriles corresponden al plásmido con el inserto en una orientación, y los siguientes tres al plásmido con el inserto en la orientación contraria.

El fragmento de 5.3 kb fue subclonado en el plásmido de *Streptomyces* pIJ702, y la construcción resultante fue usada para transformar protoplastos de *S. lividans* 1326. Ninguna de las transformantes obtenidas presentaba actividad de lipasa en MM con aceite de oliva y rodamina B. El análisis de FRAME y los datos del análisis nucleotídico de la secuencia del fragmento indicaron la ausencia de la región promotora del gen *lipA*, lo cual explica la observación anterior (Fig. 15). La región promotora fue posteriormente identificada por ensayos de hibridación de DNA cromosomal de *S. coelicolor*, usando como sonda al fragmento MluI-NcoI de 0.6 kb del gen *lipA* inicialmente clonado en condiciones de alta severidad. De esta manera fue posible obtener un fragmento NotI-NcoI de 1.5 kb, el cual fue subclonado en uno de los plásmidos identificados en el minibanco, a fin de tener un inserto con la región del promotor que hacia falta, es decir, al gen *lipA* completo, obteniéndose así un fragmento de 6.286 kb, el cual está contenido en el plásmido pUCB108 (Fig. 16).

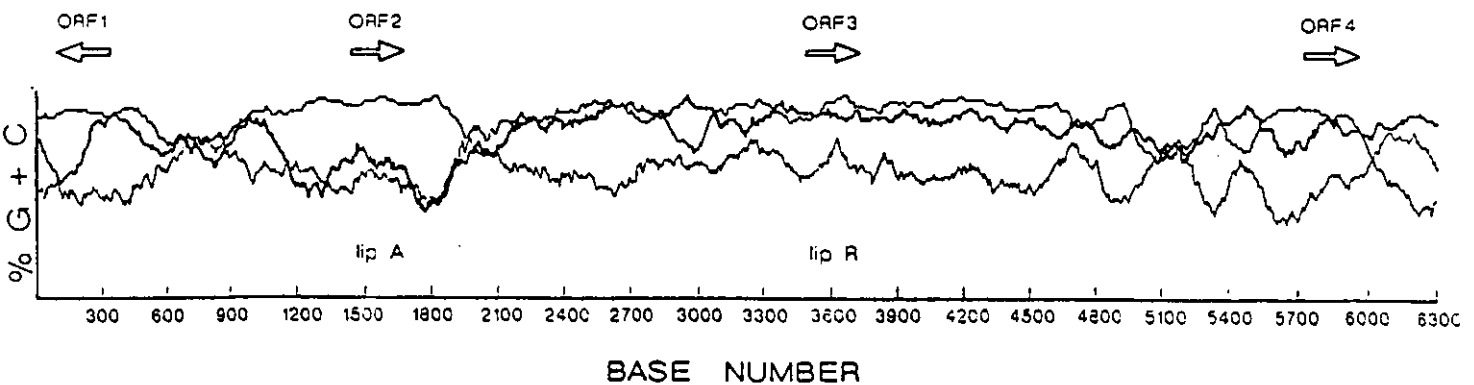


Figura 15. Análisis de FRAME del inserto de 6286 pb de *S. coelicolor*. Los ORFs identificados están indicados por las flechas superiores que muestran la dirección de la transcripción deducida a partir de la secuencia nucleotídica, y en el caso del operón *lipAR* confirmado por mapeo por S1 de alta resolución (el ORF 2 corresponde al gen estructural de la lipasa LipA, y el ORF 3 al gen *lipR* que codifica al gen activador de la transcripción).

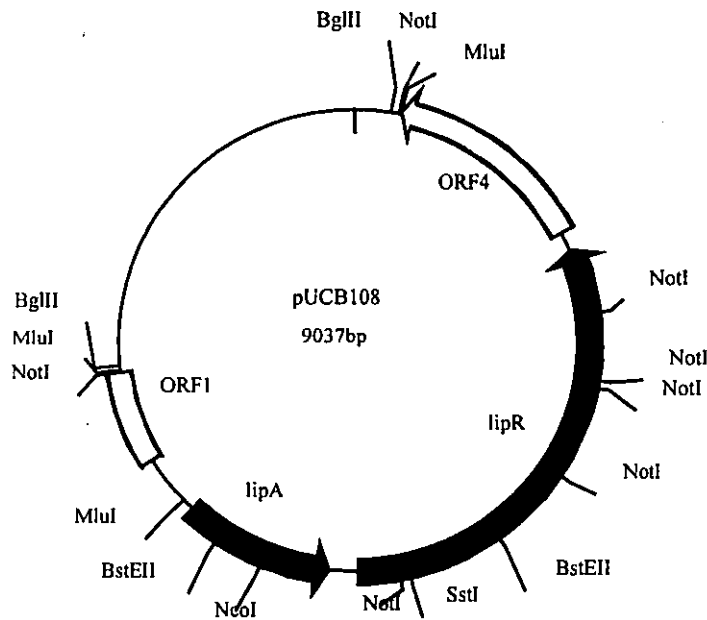


Figura 16. Arreglo genético del operón *lipAR* de *S. coelicolor* presente en el plásmido pUCB108. Se muestran algunos sitios de restricción del fragmento de 6286 pb y la localización de los ORFs deducidos por el análisis de FRAME. Los genes estructurales completos están indicados con flechas negras que indican la dirección de la transcripción. El ORF1 es divergente con respecto a los otros tres y está incompleto (barra blanca). El ORF2 corresponde al gen *lipA* y el ORF3 al gen *lipR*.

El fragmento completo de 6.2 kb fue secuenciado en doble cadena (Fig. 17), encontrándose que contiene, además de los genes *lipA* y *lipR*, un tercer gen completo que no presenta homología con algún gen conocido y que se localiza hacia abajo del gen *lipR*, en tanto que hacia arriba del gen *lipA* se identificó un gen incompleto divergente a los otros tres (Fig. 16). El análisis del operón *lipAR* y las características de las proteínas que codifican se mencionan en el artículo anexo.



NotI

1 GCGGCCGCCCACGCGCCGGGGCGTCACCGAGCACCGGCAGCAGCACGGACAGGGCGTGC  
194 A A A V R R A D G L V P L L V S L A H

61 GGCCCCAGTCCCACAGGGCACCCCTTCTCCCGCCGCCACGGCGAGTCGGCGAACGGACTG  
175 P G V D W L A G K E R R W P S D A F P S

121 TCCTCGCCGCCGAACACGGCGCCCAGCCACTGCGCCCGGGCCGTGAACCAGTCGTCCCAGG  
155 D E G G F V A G L W Q A R A T F W D D R

181 GACGACTGTTCCGGTGATCCACGCCTCGGTCTCGGGCTGGAACCGGGTGGTGAAGAAGACC  
135 S S Q E T I W A E T E P Q F R T T F F V

241 ACCGAGGCGAGCTCCGCCGTCCGCACCGCCTCCACCACCGCCCGCCCTGCGCCACCGTC  
115 V S A V D A T R V A E V V A R G Q A V T

301 GACGCGAGCGGCTTGTCGAGCAGATGGCACCCGGCCCGCGCCCGCCGACCGCCAGG  
95 S A L P K D L L L H C G A R A A R V A L

361 CCGGCCTGTACGGCCGGGGGCGAGCGCGACGGCCACGGCCTCCACGTCGGCCAGCAGGGCG  
75 G A Q V A P P L A V A V A E V D A L L A

421 TCGAGGTCGGCGTAGGCCCGTGTGCCGTGCCGCTGCGCCAGCTCCTCGCGGGCGTCCGGG  
55 D L D A Y A R T G H R Q A L E E A A D P

481 CGGCGGCCCCACACCCCGCGAAGTCCAGGTCGTGCGCCGGCCAGGGCGGGGGCGTGC  
35 R R G W V G A F D L D D H G A L A P A H

541 GCCATGTCCGCCAGGGGCGGGTGCCGAGCAGTCCGATGCGCATCCCGTCGCCTCTCCAC  
15 A M D A W P G T G L L G I R Mf RBS

← ORF1

601 GGTGCCGACCCGATGACGGGCGGCCGACGATCCTCCTTGACGACCGGCGTGCACAGCCC

661 GGCCGACGCCGAGCGTGTACACCTACGGGACGTGCGGACAGTGCAGGAGGGCACCAGCGGG

721 CCCGGCGCAACCGTGCCGGGCCACGCGCCCCCGCCGTCCCGGGCCCGGGCGTCCGCGCCCC  
SunI

781 AGGGCCGTACCGCCGAGTTCGTACGAGACCGGTGAAATTGCCGATCCCGCGGGCCCGTTCC  
-35

841 GCCCCTC GACAGT GGCAGCGCC CAA ACCCATCGGCGAGGTCCGCCGGCGGACGGCCCCGAAC  
-10 tsp

MluI

901 GCGACCCACGCGTTCCGGGCGGTGTGCGTCGCCGGGCGGGCCGGTCCGCCACG ACCGAG  
RBS

lipA →

961 AGGACACCCCCCTCGTGACAGAGAACCCCCACACCCACGCCGCCAGGCGCCGCGCGCC  
fv Q Q N P H T H A A P G A A R

1021 CCGTCTCCGGGGCGTCCGGCGGGCTGGCCGAGTGACGGCGGCGTGGCCCGGGTCC  
16 P V L R G V R R R L A A V T A A V A R V

SunI

1081 TCGTGCTCGGCACCCTCACCGGCCCGGGAGCCCAGGCCCGGACAACCCGTACGAGCGCG  
36 L V L G T L T G P G A Q A A D N P Y E R

↑

1141 GCCCGGCGCCACCGAGTCCAGCATCGAAGCCCTGCGCGGTCCCTACTCCGTGGCCGACA

56 G P A P T E S S I E A L R G P Y S V A D

BstEII

1201 CCAGCGTCTCCTCGCTCGCGGTACCCGGATTCCGGCGGGCGGCACCATCTACTACCCGACCA  
76 T S V S S L A V T G F G G G T I Y Y P T

1261 GCACCAGCGACGGCACGTTCCGGCGCCGTCGTCATCGCGCCC GGTTACCCGCGTACCAGT  
96 S T S D G T F G A V V I A P G F T A Y Q

1321 CGTCCATCGCCTGGCTCGGCCCGCGCCTGGCCTCCCAGGGCTTCGTGGTCTTCACCATCG  
116 S S I A W L G P R L A S Q G F V V F T I

1381 ACACCAACACCAGCTGGACCAGCCCGACTCCC CGGGCGGCAACTGCTGGCCGCCCTGG  
136 D T N T T L D Q P D S R G R Q L L A A L

1441 ACTACCTGACCGGGCGCAGCTCCGTCGGCGCCGGATCGACAGCGGCCGACTCGGCGTCA  
156 D Y L T G R S S V R G R I D S G R L G V

NcoI

1501 TGGGCCACTCCATGGGCGGGCGGGCACCCCTGGAGGCCGCCAAGTCCCGGCCGTCGCTCC  
176 M G H S M G G G G T L E A A K S R P S L

1561 AGCGGGCGATCCCCCTACCCCTGGAACCTGGACAAGAGCTGGCCGGAGGTCAGCACGC  
196 Q A A I P L T P W N L D K S W P E V S T

1621 CGACGCTGGTTCGTCGGGGCCGACGGCGACACGATCGCCCCCGTGGCCTCGCACGCCGAAC  
216 P T L V V G A D G D T I A P V A S H A E

1681 CGTTCTACTCCGGCCTGCCCTCGTCGACCGACCGGGCCTATCTGGAGCTGAACAACGCGA  
236 P F Y S G L P S S T D R A Y L E L N N A

1741 CCCACTTCTCGCCCAACACGTCCAACACGACGATCGCGAAGTACAGCATCTCCTGGCTCA  
256 T H F S P N T S N T T I A K Y S I S W L

1801 AGCGCTTCATCGACGACGACACCCGCTACGAGCAGTTCCTGTGCCCGCTGCCGCGGCCGA  
276 K R F I D D D T R Y E Q F L C P L P R P

1861 GCCTGACGATCGAGGAGTACCGGGGCAACTGCCCGCACGGTTCCTGACACCCTCCGCTGT  
296 S L T I E E Y R G N C P H G S \*

1921 GCCGGCGCACGACCGGGACCGGTGCCCGTTGGGCGCCGGCACAGTGCCCGTACCACCCAC

1981 CCGGGCGCACAAACCGCAGGTGACAGCGACGATGCCCGGGCGGGCGGGCGGGATCGACGC

lipR →

SunI

2041 CTTCGCGACCGGGTTACGCGCGGTAACCTCCC GGGAATGACCGGACAGACCGGTACG  
1 fM T G Q T T V R

2101 TACGGCCGTGCGGGTCCACGGCCGAGCGCGCAACGCAGGGCGCTGCGCGCGATGCTGGA  
9 T A V R V H G R S A Q R R A L R A M L D

2161 CGCGCTGCCCGCCCACGGCGCCGGCTCCTCCTGGCCGGCGAACCGGGACTCGGCCGGAC  
29 A L P A H G G R L L L A G E P G L G R T

2221 CACTCTGCTCCAGTGGGCCGCCCGTTCCTTCCGGGCGGGTCCCGTACTCCACCTCGGGCC  
49 T L L Q W A A R S F R A G P V L H L G P

NotI

2281 CGGCCCCGACCGAACGCGCACCTCACCGCCGGGCAACTGCTCGACACCCTGCGGGCGGC

69 G P D A N A H L T A G Q L L D T L R A A  
2341 CGCCGTCGCGGCGCCGGTACTGGTGTGTGGACGACGCCACCGGTGGGATGCGCCGGC  
89 A V A A P V L V C V D D A H R W D A P A

SacI

2401 CCGCACCGAGCTCGCCCCTGCGGCGCGGCTCCTGTCCACCGCCGACGGGTGCGCCTGCT  
109 R T E L A R A A R L L S T A D R V G L L

2461 GCTCTCCGTCGCCTCGGACCGTGCCGTGCGCCCGGAGTTCGCCCCTGCGCCGTGCGTGCA  
129 L S V A S D R A V G P E F A R L P V V H

2521 CCTGGACCCGCTGGCACCGGCGAGGGCCGCGCCCTGCTCGACGACCTGACCGACGGCGT  
149 L D P L A P A R A A A L L D D L T D G V

2581 CGCCGCACCGGCGGTCCGCGAGCAGCTCCTGGCCGAGGCGGAGGGGAACCCGGCCCTGCT  
169 A A P A V R E Q L L A E A E G N P A L L

2641 CGTCGCCCTTGTGCGCCGCTGTACCCGCGGAGCTGCGCGGACACCGGCCGCTGCCAG  
189 V A L V R R L S P A E L R G H R P L P S

2701 CCCGCTGGCCGAAGCGGGTGTCTCGCCGAGGCCGCGGGCGGTGTGCCGACCGGACCGTC  
209 P L A E A G V L A E A A G G V P T G P S

2761 CGCCATGCGCGGGACCTGCTGCTGACGGTGGCGGCGGCCGAGAGCCTCGGACGGGTC  
229 A H A R D L L L T V A A A G E A S D G S

2821 GGACGCCGACGCCGGCTGGTCCGCGACGCGCTACGGCGCCTGCGGCCGGCACCGGGTCA  
249 D A D A G L V R D A L R R L R P A P G H

2881 CGGTCCCCTGCTCGGTCCCCTGATCCGGGTCTCGGACCCGATCCGGGTGCGGAACCGTGCC  
269 G P G L G P D P G L G P D P G A E P L P

BstEII

2941 CGGGCAGCTCGTCTGGCCGGTGACCGGCTCCGTTTCCGCGAGCCCGCTCGTCCGTGCAAC  
289 G Q L V L A G D R L R F R S P L V R R T

3001 GGTGCACGCCACCGCCGCGCGGACCGGCTGCGCGGTTGCACCGCGGCTGGCCGACGC  
309 V H A T A A A D R R R A V H R A L A D A

3061 GCTGGACGGCGGCGCCACCGCTCACGGCGCTGTTGCACCGCTCGTGGTCCCTGGACGG  
329 L D G G G H R L T A L L H R S W S L D G

3121 TCCGGCACCCGACCGGCTGCGCGGACCGGCTGGCGGCGACGGCGGCCGACGGCGCGGT  
349 P A P A P A S A D R L A A T A A D G A V

SunI

3181 GCCCGCTCGCACCGGCTGCGCGCGACCGGTACGCCCGCGCCGCGAGCTGACGGCCGA  
369 P A S H R L R A T A Y A R A A E L T A D

3241 CGGGGCACGGCGGGCGGAGCGCTACACCGCCGCGGCCGAACAGGCCCTGCTCGCCGGGCG  
389 G A R R A E R Y T A A A E Q A L L A G R

SunI

3301 GCCCGAACGGGCGCGCCCTGCTCGCCGCGGCCGTTGACCGCGCCGCCCCGACGCCGT  
409 P E R A R P L L A A A R D R A A P D A V

3361 ACGCGGGCGGGCCGAGCTGCTGCGCGGTATGACGGAACGAGGGACGGTCCGGTCCGTGA  
429 R G R A E L L R G M T E L R D G P V G D

3421 CGCCCACCGTCCCTGCTGCTGGCCGCGTCCCTGCTCGCCGCGGACGATCCGGCCGAGGC

449 A H Q S L L L A A S L L A A D D P A E A

NotI

3481 CGCGGCCGCGCACTGGCCGCCGCCGACGCGGCTGGGCGGGGGCGACCTGCCGGCGTG

469 A A A A L A A A D A A W A A G D L P A C

3541 CCTGGCCACGCTCGCCCCGAGCCCCGCTCCGCGCCGAGCACCCGTCCCCCGGGTCCGA

489 L A T L A P E P P L R A E H P S P G S D

3601 CGGGCCCGCCGCGGCCCGCACGGCCGCCGTCTGTCACGACCACCGCGTCCGGGATGCGGGC

509 G P A A A R T A A V V H D H R V G M R A

3661 GCTGCTCGAAGGACGGCTCGACCGGGCCGGGGCACCGCTCGGGCAGGTGGTCCGGCGGAG

529 L L E G R L D R A G A P L G Q V V R R S

3721 CAGGACCGGGGACCGGCCGAGACACTGCTGCGGTGCGGCGGGCGGGCGCTGCTGCTCGG

549 R T G D R P E T L L R S A A A A L L L G

3781 GGACGTGGACGCAGCCCGCAGCGGGCGGGGCCCGGGCGCTGGCCGCGGCCCGGACGCTCGG

569 D V D A A R S G G A R A L A A A R Q L G

3841 GTCGGACGCGCTGGTCCCGCAGGCCCTGGAGTACCTCGCCTACGCCGAAGTGGCGCCGG

589 S D A L V P Q A L E Y L A Y A E L R A G

3901 GCGGCACCCGACAGGCCGTACCCACGCGGAGGAGGGCTGCGCACCCGCCCTGCGGGCCGG

609 R H P Q A R T H A E E G L R T A L R A G

3961 GCAGCGCAACACGGCGGCCACCACCGGGCGGTACTGGCGCTCGCCGCGTTCGATCGAGGA

629 Q R N T A A H H R A V L A L A A S I E E

NotI

4021 GGAGCCGACGCCGTCGCCAGGCACGTGCGGGCCGCCCTGGACACGGCCCCCGGGCACGG

649 E P D A V A R H V A A A L D T A R R H G

NotI

4081 GCTCGCCAGGCGGCCCTCGCCAGTGGGCGGGCCCGCGCCGACCTCGGGCGGGG

669 L A Q A A A L A Q W A A A R A D L G R G

4141 GCGCCCCTTCGACGCGGCCGACCGGCTCGGACTCCTGGTCCTGCCCGGGCCGGGGCGGGG

689 R P F D A A D R L G L L V L P G P G R G

4201 CCACCTCGCGGTGTGGCGGCTGGCCGTGCCCTGCTTCGTGGAGGCCCGGTGCTCGCCGG

709 H F A V W R L A V P C F V E A A V L A G

4261 ACGCGACGAGGACGCCCGCCGGTCTCACGACTTCGCCGACTGGGCGGCGTTCGGCGC

729 R D E D A R R V L T D F A D W A A F G A

4321 CGATCCGACGGCCCGCCCAACTCGCCCGCTGCCACGCCCTCCTCGCCCCCGGGAGCA

749 D P Q A A A Q L A R C H A L L A P A E H

4381 CGCCGACGCCCTTACCGCCATGCCCTCGACCGGCACGACGAGGCGGGCGGGGACTTCGA

769 A D A L Y R H A L D R H D E A G G D F E

4441 GCGGGCCCGCACCGCGCTGCTGTACGGCAAGTGGCTGCGCCGGCGGCGCAGACCCCGGA

789 R A R T A L L Y G K W L R R R R R P R E

NotI

4501 GGCCCCGCGCCCGCTCGGCACCGCGCTGGCCGGCTTCGAGCGCTGCGGGCCCGGCGTCTG

809 A R G R L G T A L A G F E R C G A G V W

4561 GGCCGCGCAGGCACGCGACGAACTCCGCGCCCTCGGGGCGGCCCCGCGGAGCCCCGGCGC  
 829 A A Q A R D E L R A L G A A P R S P G A  
 4621 CGGAGCCGGAACACCGGCCCGCCTCGGCCGCTGACCCCGCAGCAACTGCGCATCGCGCG  
 849 G A G T P A R L G R L T P Q Q L R I A R  
 4681 GCAGGTCGCCGAGGGCGCCACCAATCGCGAGGTCGCGCTGACCCTCGGGGTGAGCACCCG  
 869 Q V A E G A T **N R E V A L T L G V S T R**  
 4741 CACCGTCGACTACCACCTCCGCAAGGTCTTCGCCGCCCTCGGGCTGCGGTCCCGCCTGGA  
 889 **T V D Y H L** R K V F A A L G V R S R L E  
 4801 GCTGGCCCGCATGGTCGGGCAGGCCGAGCGGGCCAGGAGGCGCAGGGCCCGAGGACGC  
 909 L A R M V G Q A E R A Q E A Q A A Q D A  
 4861 GCGTCGAGCCGGACACCAGGAAAAGACCGGTGCACAACCCTAGGGACCGACCGGTA  
 929 R R A G H Q E K T G A Q P \*  
 4921 TGCCATCCTTCGGGGCAGGACGAGTCAGGGGGCAGGCCCGGCGGGGACGGCCCGTC  
  
 4981 GCGGAAGGCGCCTCCGCAAGCCCTGCCCGGGGAGGACCGCGATGCAGCACGCCGTACG  
 1 **RBS** **ORF4** → SunI fm Q H A V R  
 5041 GTCACGAGCAGCGATCCGCACCGGGCTGACGCCCCGTCCACGCCCCGCGGACACCCGGAGT  
 7 S R A A I R T G L T P V P R P R T P G V  
 5101 CACGTCGTTGATCGACGCCGACGCCCTGCGTGTCTGCACCGGGCCCGCCCGCCTGCT  
 27 T S L I D A D A L R V L H R A A R A L L  
 5161 CGACGACCTGCCCGACCTGACCGACCGGTGATGGCGCTGCTGCGGGAGCAGGAGCCCGC  
 47 D D L P D L T D R L M A L L R E Q E P A  
 5221 CTACCGGGCCGCCCTCACCAAGGACCCCCACCGCCACCTGGCAGGAGGCCACCGCTCCC  
 67 Y R A A L T K D P H R H L A G G P P L P  
 5281 TGCGGCACAGCGTGGCCTCGCTGCTCGACCCGCGCGGGCGCCCGGGACGCGGCCCGCGCT  
 87 A A Q R G L A A R P A R R P G R G P P L  
 5341 GCTCCTGGCGGATCGGCGCCCGCCGCGGGAGCAGGACTCCCGCTGGACGCCCTGCTGC  
 107 L L A D R R R P R G A G T P A G R P A A  
 5401 ACGCCTTCCGCCTGGGCGGCTCGCTGGTGTGGCAGCGGCTGGTCGAGGAGACCTCCAGGG  
 127 R L P P G R L A G V A A A G R G D L Q G  
 5461 CCGCACCGGAGGACGTGCGGCTCCTCGTGCACGTGGCCGCGGACGTGTGGAACCTCGTGC  
 147 R T G G R A A P R A R G R G R V E L R R  
 5521 ACGAGCACTGCACCCTCGTCGCGGACGCTACCGGCAGACCGAGTGGCAGCTCGGCCGGC  
 167 R A L H P R R G R L P A D R V A A R P A  
 5581 GCCGCGAGAACCAGGTCCGGCAGCTGGCCGCCGCCCTGCTCGACGGCACCGGTGCGATCG  
 187 P R E P G P A A G R R P A R R H R S H R  
 5641 CCGACCTGCCCGAGGCCGCCGGCCCTCGGCCCTCCCGGAGCACGGCCGCTACGTCGTCG  
 207 R P A R G R P G P R P P G A R P L R R R  
 5701 TCGCCGTCGCCGGCGGGCCACCGGCCCGGCCGACGCCCGCCCGCGCCCGTACCGCCCG  
 227 R R R R R A T G P A R R R P R R R T A R

```

5761   GGAGCCGGGTCCACTGGCAGCCGGGGCGGAGACCGACTACGGCATCGTCTCGCTCGGCG
247     E P G P L A R R G G D R L R H R L A R R

5821   ACCACGACGGGCTCCCGGAACCGCACCGGCCGGAGGCCCGCCGAGGACGCCCCCGTCCC
267     P R R A P G T A P A G G P P Q D A P V P

5881   CGGCCTCCGGGTCGGTGTCCGGCAGCCCGGTCCGACGGACTCGCCGCTGTCCGGGACGCCCG
287     G L R V G V G S P V D G L A A V G D A R

5941   TCGGCTCGCGGACACGGCCCTGACCATCTGCCCCCGGCCGGGGCACCGTGC GACTGGC
307     R L A D T A L T I C P P A G G T V R L A

6001   CGACCAGCTCCCCGCCGCCCTGGTTCGTCTCCAGCCCCGAGCTGGGCGGGGCCCTCGCCGA
327     D Q L P A A L V V S S P E L G R A L A E

6061   GAAGGTGCTCGGTCCCCTGCTCCGCCTGGAGTCCGCCGACCGCGACGTGCTCCTCGACAC
347     K V L G P L L R L E S A D R D V L L D T

6121   CCTCACCACCTGGCTCGACTGCGACGGTTCGGCCCAGCGCGCCGGCGAACGCCTCTACTG
367     L T T W L D C D G S A Q R A G E R L Y C

6181   CCACCGCAACACGGTCCCTCAACGCCTCCGGCGCTGCGAACAGCTCACCGGCCGCTCCCTG
387     H R N T V L N A S G A A N S S P A A P W

                                           MluI
6241   GCCCCCGGCCGACCTCGTCGAGTTCAGCCTGGCCCTGACGGCACGACGCGT
407     P A R P T S S S S A W P *

```

Figura 17. Secuencia nucleotídica del fragmento de 6286 pb que contiene al operón *lipAR* de *S. coelicolor*. Bajo la secuencia nucleotídica está indicada la secuencia de aminoácidos deducida para cada gen por el código de una letra. Se muestran las regiones -35 y -10; el sitio de inicio de la transcripción del operón *lipAR* (tsp, ●●); el sitio de unión del ribosoma (RBS); el sitio de hidrólisis del péptido señal está indicado con ↑; el pentapéptido altamente conservado que contiene a la serina nucleofílica del sitio activo de la lipasa LipA está enmarcado, así como el motivo hélice-vuelta-hélice del activador transcripcional LipR. Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción para cada gen.

En la Figura 18 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las lipasas extracelulares conocidas hasta el momento de *Streptomyces* y la lipasa 1 de *Moraxella sp.* En la Figura 19 se muestra el análisis de DOTPLOT realizado entre los genes *lipR* de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor*. Se han clonado dos genes de esterases, la de *Streptomyces escabies* y *Streptomyces diastatochromogenes*, las cuales no presentan homología con estas lipasas.

S-EXFOL	AANPYERGPAPTNASIEASRGPYATSQTSVSSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTF. GA	56
S-COELI	ADNPYERGPAPTESSIEALRGPYSVADTSVSSSLAVTGFGGGTIYYPTSTSDGTF. GA	56
S-ALBUS	ADNPYERGPAPTRASIEAPRGPYAVSQTSVSSSLVVSFGGGGTIYYPTSTGDGTF. GA	56
MORAX-SP	SØCIADSKITAVALSØDTRDNGPFSIRTKRISRQSAHFGGGGTIHYPTNASGCGLLGA	57
S-EXFOL	VVISPGFTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVFTEIDTNTTLDQPDSRGRQLLSALDYLTDQ	112
S-COELI	VVIAIPGFTAYQSSIAWLGPRLASQGFVVFTEIDTNTTLDQPDSRGRQLLAALDYLTDG	112
S-ALBUS	VVVTPGFTAYQSSMAWLGPRLASQGFVVFTEIDTNTTLDQPDSRGRQLLAALDYLTDG	112
MORAX-SP	IADVPGYVSYENSISKWGGPRLASWGFVVFTEIDTNTSIYDDPDSFAAQLNAALDNMIA	113
* ○		
S-EXFOL	RSSVTRTRVDATRLQVMGHSMGGGGSLAAKSRRTSLKAAIPLTGWNTDKTWPELRTF	167
S-COELI	RSSVTRGRIDSGRLQVMGHSMGGGGTLEAAKSRPSLQAAIPLTPWNLDRSWPEVSTF	167
S-ALBUS	RSSARTRIDGTRLCVIGHSMGGGGTLEAAKSRPSLQAAIPLTPWNLDRTWPEVSTF	167
MORAX-SP	DDTVGSMIDPKRLCAIGWSMGGGGALKLATERSTVR. AIMPLAPYHDKSYGEVKT	167
←--→		
S-EXFOL	TLVVGADGDTVAPVATHSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASHFETPNTSDTTIAKYSI	224
S-COELI	TLVVGADGDTIAPVASHAEPFYSGLSSTDRAYLELNNATHEPNTSNTTIAKYSI	224
S-ALBUS	TLVVGADGDTVAPVATHAKPFYSSLSSTDRAYLELNNATHEAPNLSNTTIAKYSV	224
MORAX-SP	TLVTACEDERIAETKKYANAFYKNAIGPKMKVEVNNGSHFCPSYRFNEILLSKPGI	224
S-EXFOL	SWLKRFIDS DTRYEQFLCPIPRPSLTIAEYRGTCPHTS	262
S-COELI	SWLKRFIDDDTRYEQFLCPLPRPSLTIEEYRGNCPHGS	262
S-ALBUS	SWLKRFIDDDTRYEQFLCPLPVØDRDIEEYRGTCPLGG	262
MORAX-SP	AWMQRYINNDTRFDKFLCANENYSKSPRISAYDYKDCP	262

Figuras 18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las lipasas extracelulares de *S. exfoliatus* M11 (S-EXFOL), *S. albus* G (S-ALBUS), *S. coelicolor* A3(2) (S-COELI) y *Moraxella sp* TA144 (MORAX-SP). Las regiones de mayor homología se encuentran sombreadas, la intensidad del sombreado corresponde al porcentaje de similitud entre las diferentes secuencias. Se muestran el pentapéptido consenso (←→); \* residuos de la triada catalítica (Ser131, Asp177, His209); ○ residuos de la cavidad axianiónica (Phe63, Met132); ▼ residuos de la región de unión de la porción acilo del sustrato (Met132, rp156, Val179).

La composición de aminoácidos de las lipasas de *Streptomyces* y de la lipasa 1 de *Moraxella sp* es muy semejante (Tabla II), y el porcentaje global de cada uno de los residuos también es muy similar en el caso de las lipasas de *Streptomyces*, en tanto que *Moraxella* presenta una distribución diferente, lo cual probablemente se relacione a su habitat y las bajas temperaturas a las que funciona. En base a las características fisicoquímicas de los grupos R de sus aminoácidos (Tabla III) es claro que estas lipasas son proteínas hidrofóbicas con una carga neta positiva.

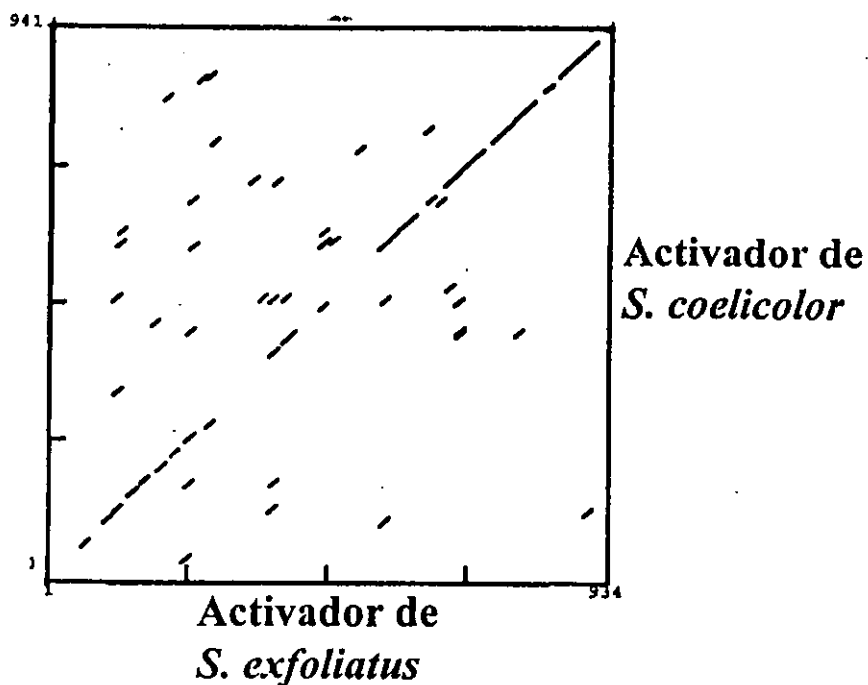


Figura 19. Alineamiento por DOTPLOT de las secuencias de aminoácidos de los activadores transcripcionales de los genes de lipasa de *S. exfoliatus* M11 y *S. coelicolor*. Se puede apreciar que el parecido es mayor hacia el extremo carboxilo donde se localiza el sitio de unión a DNA.



TABLA II

Composición de aminoácidos de las lipasas extracelulares de *Streptomyces*

aa	<i>Scoeli</i>	<i>Sexfo</i>	<i>SalbG</i>	<i>Albus</i>	aa	<i>Scoeli</i>	<i>Sexfo</i>	<i>SalbG</i>	<i>Morx</i>
Ala	34	40	34	33	Leu	27	30	26	19
%	10.9	12.9	11.2	10.3	%	8.7	9.7	8.6	6
Arg	21	21	19	14	Lys	4	7	6	23
%	6.7	6.8	6.3	4.4	%	1.2	2.3	2	7.2
Asn	9	5	6	16	Met	2	3	4	8
%	2.9	1.6	2	5	%	0.6	1	1.3	2.5
Asp	15	13	16	18	Phe	9	9	9	10
%	4.8	4.2	5.3	5.6	%	2.9	2.9	3	3.1
Cys	2	2	2	6	Pro	25	24	25	17
%	0.6	0.6	0.7	1.9	%	8	7.7	8.2	5.3
Gln	9	10	7	3	Ser	30	32	27	30
%	2.9	3.2	2.3	0.9	%	9.06	10.3	8.9	9.4
Glu	10	8	10	12	Thr	29	34	37	22
%	3.2	2.6	3.3	3.8	%	9.3	11	12.2	6.9
Gly	31	28	29	23	Trp	4	4	4	5
%	10	9	9.5	7.2	%	1.2	1.3	1.3	1.6
His	6	5	4	3	Tyr	11	11	10	13
%	1.9	1.6	1.3	0.9	%	3.5	3.5	3.3	4.1
Ile	12	11	9	27	Val	20	13	20	17
%	3.8	3.5	3	8.5	%	6.4	4.2	6.6	5.3

Origen de las lipasas: *S. coelicolor* (Scoeli), *S. exfoliatus* (Sexfo), *S. albus* G (SalbG), *Moraxella* sp TA144 (Morx).

TABLA III

Porcentaje global de cada tipo de grupo R presente en las lipasas de *Moraxella* y de *Streptomyces*

Grupo R presente	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. exfoliatus</i>	<i>S. albus</i> G	<i>Moraxella</i> sp TA144
Hidrofóbico	42.9	43.2	43.2	42.6
Polar sin carga	39.0	39.2	38.9	35.4
Carga negativa	8.06	6.8	8.6	9.4
Carga positiva	10.0	10.7	9.6	12.5

### Producción de LipA en diferentes medios de cultivo.

Para evaluar la actividad lipolítica de *S. coelicolor* su gen *lipA* fue sobre-expresado a través de su clonación en un plásmido multicopia. Así, el inserto de 6.286 kb del plásmido pUCB108 fue subclonado en el plásmido pIJ702 como un fragmento BglII, y la construcción resultante se utilizó para transformar protoplastos de *S. lividans* 1326. De las

clonas recombinantes resistentes a tiostreptona se eligieron las que presentaban actividad lipolítica en cajas de aceite de oliva con rodamina B. De las clonas que dieron fenotipo positivo se eligieron dos a fin de obtener su DNA plasmídico, ambas presentaban el inserto deseado en la misma orientación con respecto al vector, eligiéndose solo una para obtener el plásmido que portaba, al cual se denominó pB108 (Fig. 20). Por otro lado se evaluó la participación del gen *lipR* en la expresión y producción de la lipasa LipA, y para esto se subclonó el fragmento NotI de 2.7 kb del plásmido pUCB108 en el plásmido pIJ702. Siguiendo la misma estrategia que se utilizó para obtener al plásmido pB108, logramos obtener al plásmido pB110 (Fig. 21).

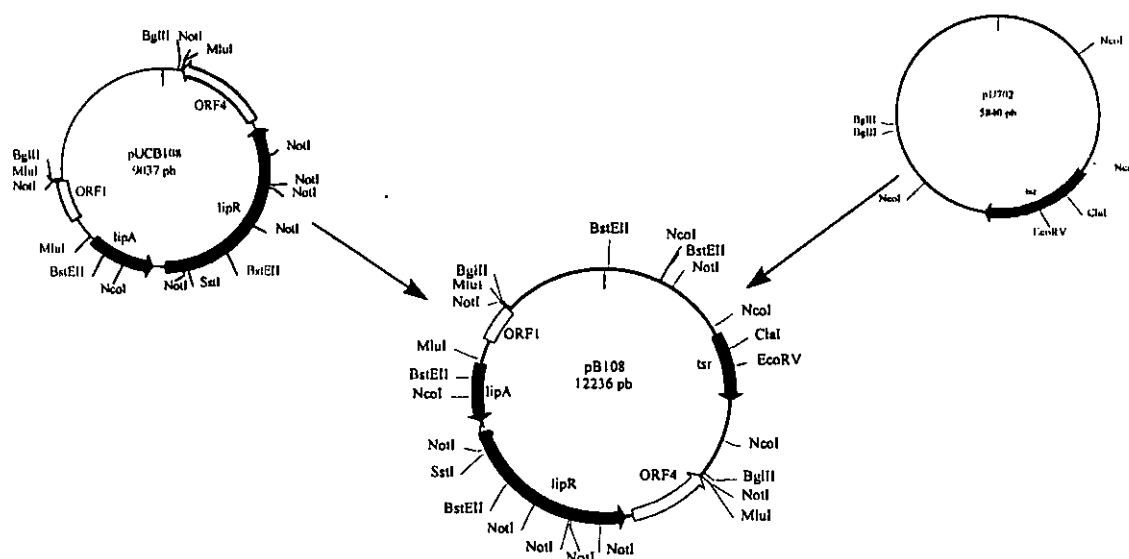


Figura 20. Obtención del plásmido pB108. A fin de evaluar la actividad lipolítica de la proteína codificada por el gen *lipA*, se subclonó el fragmento de 6286 pb que contiene al operón *lipAR* completo en el plásmido de alta número de copias de *Streptomyces* pIJ702, obteniéndose el plásmido pB108 con el cual se transformaron protoplastos de *S. lividans* 1326.

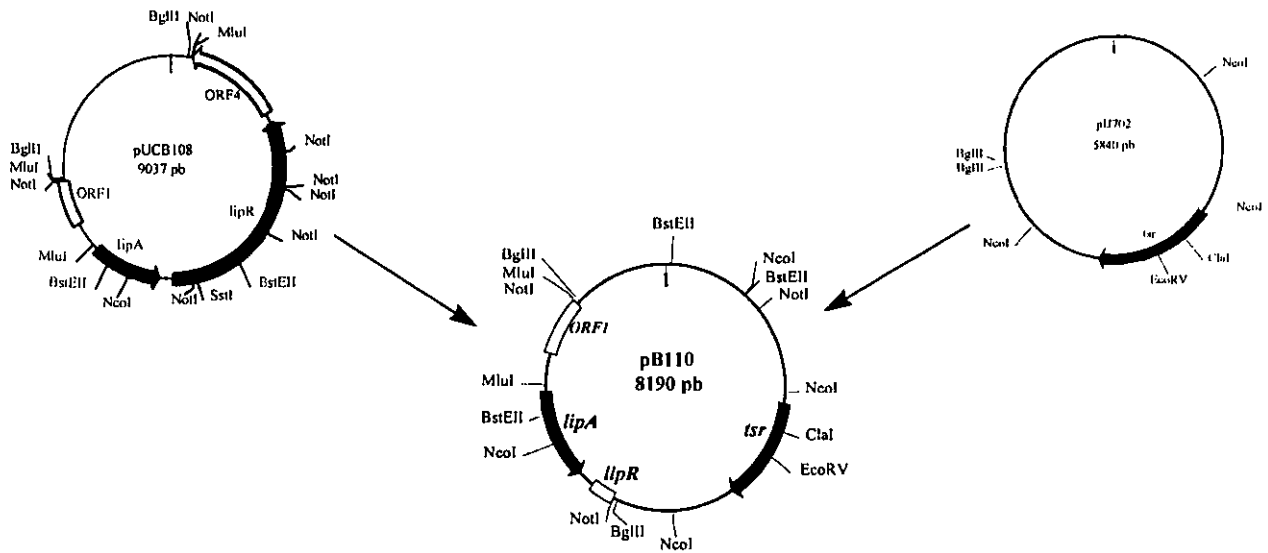


Figura 21. Obtención del plásmido pB110. A fin de evaluar la influencia del gen *lipR* sobre la expresión de la lipasa extracelular LipA, se subclonó el fragmento NotI de 2353 pb de pUCB108 en el plásmido de alto número de copias de *Streptomyces* pIJ702, obteniéndose el plásmido pB110 que contiene al ORF1, al gen *lipA* completo y el inicio del gen *lipR*. La clonación en pIJ702 es en el mismo sitio y orientación que en el caso del operón completo (pB108). Se transformaron protoplastos de *S. lividans* 1326 y se seleccionó una transformante tiostreptona resistente para estudios posteriores.

Se creció *S. lividans* 1326 conteniendo al plásmido pB108 o pB110 en medio de cultivo LB-sacarosa y R2 líquido. Las proteínas presentes en el sobrenadante fueron sometidas a un análisis de PAGE-SDS y Western blot usando un anticuerpo policlonal contra la lipasa de *S. exfoliatus*. Como se muestra en la Figura 22, el sobrenadante de *S. lividans* con el plásmido pB108 presenta una banda única de 29 kDa que está ausente en los cultivos obtenidos cuando se trata del plásmido pB110, observándose lo mismo en los dos medios de cultivo empleados. De esta manera tenemos que las células empiezan a secretar la lipasa durante la fase estacionaria temprana (48 horas), y continua secretándose a lo largo de esta fase. Aunque el patrón de secreción es similar en ambos medios de cultivo, en LB hay menos acumulación de la lipasa consistentemente. Así, la lipasa de *S. coelicolor* es secretada de una manera fase dependiente, detectándose cuando el crecimiento exponencial ha terminado, y su expresión requiere la presencia del gen *lipR*.

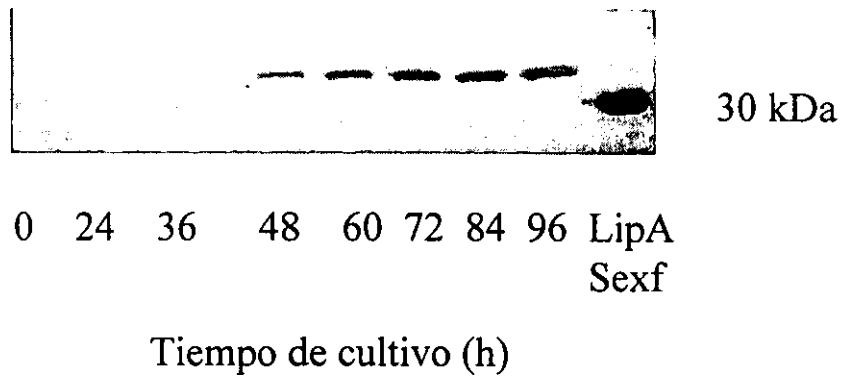


Figura 22. Identificación de la lipasa producida por *S. coelicolor* A3(2). Las proteínas totales presentes en el sobrenadante del medio de cultivo donde se creció *S. lividans* con el plásmido pB108 fueron separadas por PAGE-SDS y sometidas a western blot. Se obtuvieron los mismos resultados independientemente del medio de cultivo utilizado, y en el caso del plásmido pB110 no se detectó ninguna banda. LipA Sexf, 3  $\mu$ g de la lipasa de *S. exfoliatus* pura.

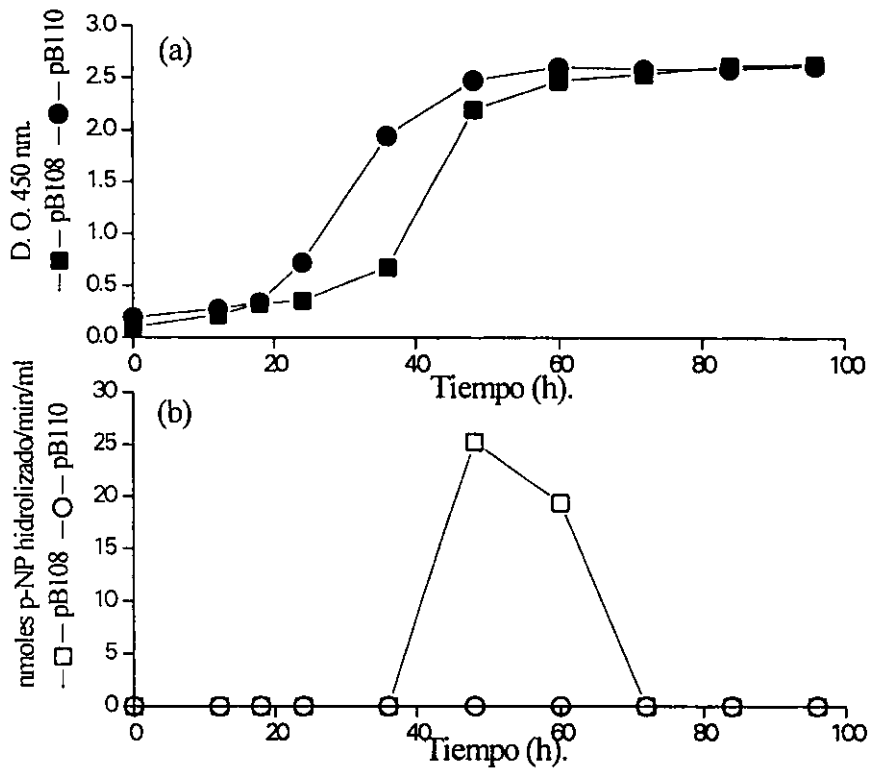


Figura 23. Actividad lipolítica de la lipasa extracelular de *S. coelicolor* A3(2). Los sobrenadantes de *S. lividans* 1326 conteniendo los plásmidos pB108 o pB110, crecidos en LB-sac (a), fueron analizados con un ensayo colorimétrico utilizando *p*-nitrofenil-laurato como sustrato (b)

En cuanto a la actividad lipolítica, se detectó una cinética diferente con respecto al medio de cultivo empleado. Cuando se crece *S. lividans* 1326 con el plásmido pB108 en LB-sacarosa se detecta actividad enzimática desde la etapa temprana de la fase estacionaria, alcanzando un máximo a las 48 horas, la cual decae posteriormente, llegando en algunos casos a ser nula (Fig. 23). Por otro lado, en medio R2 se detecta actividad a partir de la misma etapa del crecimiento, pero ésta va aumentando con el tiempo sin alcanzar un nivel constante o parar (Fig. 24); en este medio se llegaron a detectar los más altos niveles de actividad lipolítica en relación volumétrica siempre en la etapa tardía de la fase estacionaria.

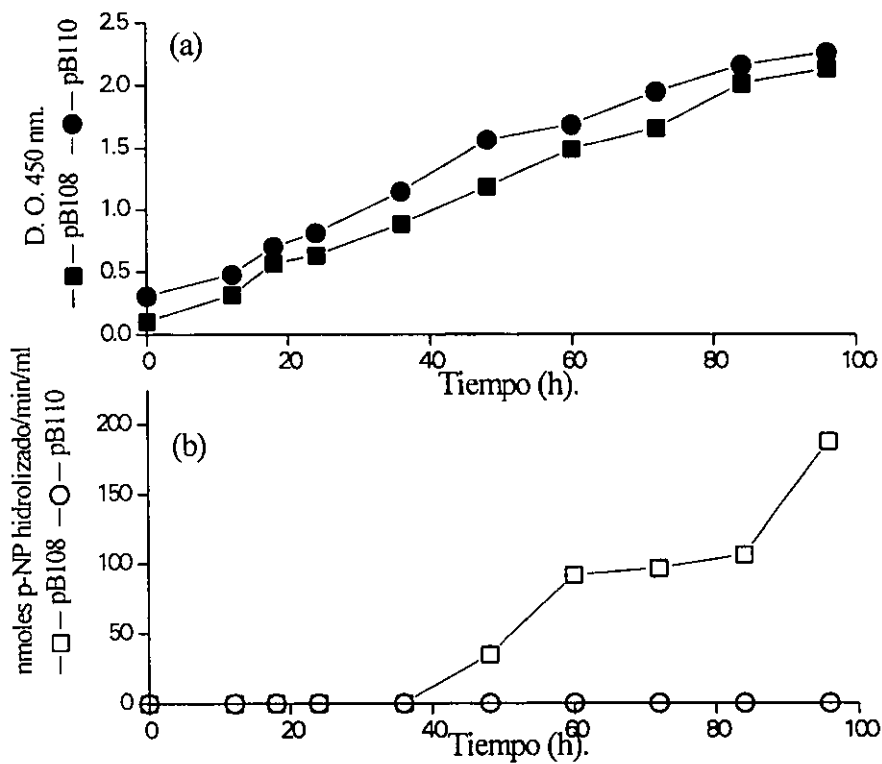


Figura 24. Actividad lipolítica de la lipasa extracelular de *S. coelicolor* A3(2). Los sobrenadantes de *S. lividans* 1326 conteniendo los plásmidos pB108 o pB110, crecidos en R2 líquido (a), fueron analizados con un ensayo colorimétrico utilizando *p*-nitrofenil-laurato como sustrato (b).

Por otro lado, buscando conocer más acerca de los requerimientos transcripcionales y traduccionales del gen *lipA*, se realizó una mutagénesis dirigida a fin de introducir un sitio de restricción NdeI en su codón de inicio. La presencia de este sitio nos permitió subclonar al gen *lipA*, sin alteraciones, en el vector de alto número de copias pIJ6021, el cual cuenta con el promotor *tipA* de *S. lividans* 66, el cual es inducible por tiosstreptona; el fragmento fusionado incluye todo el gen *lipA* y un fragmento inicial del gen *lipR*. El plásmido resultante (ptipA-lipA) fue introducido en *S. lividans* 1326, analizándose la secreción de la lipasa a lo largo del crecimiento. Cuando se induce la transcripción del gen *lipA* a partir del promotor *tipA* añadiendo al medio de cultivo 5 µg de tiosstreptona al inicio de la fase exponencial del crecimiento (12 horas), la lipasa es producida desde esta fase y se secretan grandes cantidades de la proteína, si bien su actividad alcanza un máximo y posteriormente decae (Fig. 25). Bajo estas condiciones de cultivo (LB-sacarosa) se alcanzan las máximas actividades detectadas para la lipasa. Esto demuestra que el micelio vegetativo es capaz de sintetizar y secretar a la lipasa en ausencia del gen *lipR*, de igual manera a lo observado con la lipasa de *S. exfoliatus*, siempre y cuando se encuentre bajo el control transcripcional de un promotor que se exprese durante la fase de crecimiento exponencial. Por otro lado, estos resultados indican que el fragmento de 6286 pb contiene todos los elementos genéticos necesarios para la transcripción y secreción de la lipasa LipA. En el caso de la lipasa de *S. coelicolor* también se produce la proteína en los cultivos sin inducción por tiosstreptona, ésto se debe al fuerte nivel de transcripción de escape que presenta el plásmido; sin embargo en éste caso el perfil de secreción de la proteína depende del tiempo de cultivo, detectándose solo durante la fase de crecimiento estacionario, y con una cinética de actividad igual a la que presenta el plásmido pB108 en medio de cultivo LB-sacarosa.

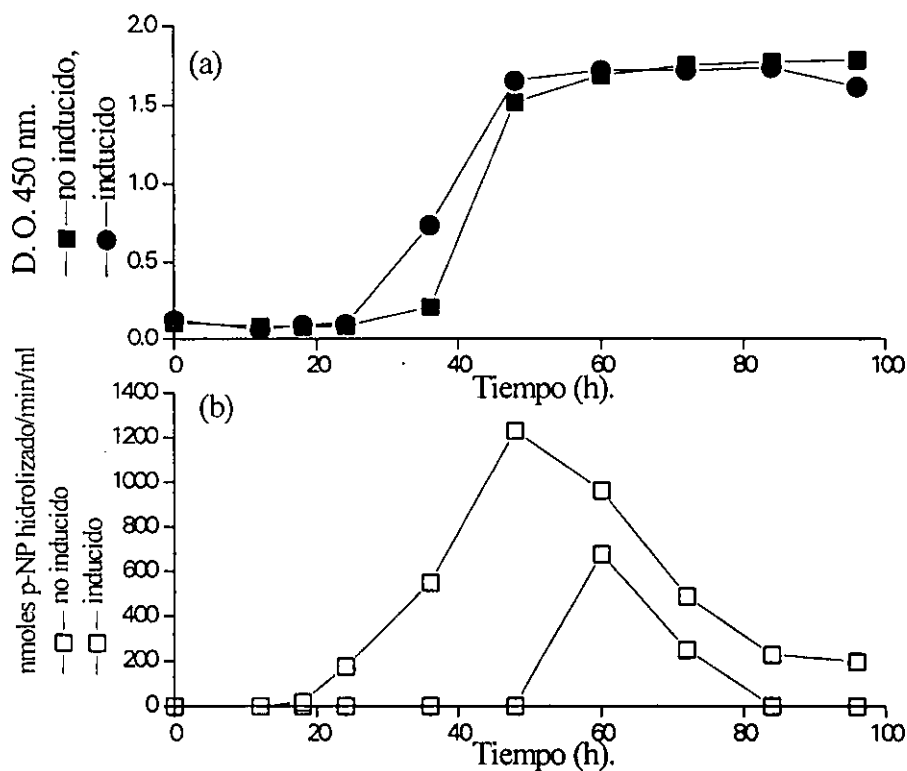


Figura 25. Crecimiento de *S. lividans* 1326 conteniendo al plásmido *tipA-lipA* (a); actividad lipolítica en el sobrenadante, la inducción del promotor *tipA* se dio por la adición de tiostreptona a las doce horas del crecimiento (b).

### Influencia de la lipasa LipA sobre la producción de actinorrodina.

A fin de evaluar la influencia de la lipasa extracelular codificada por el gen *lipA* en la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*, se hicieron construcciones genéticas para interrumpir dicho gen en el cromosoma. Para lograr esto se utilizó un vector suicida, el plásmido pIB5 (Fig. 26), el cual nos permitió obtener la cepa IB5 de *S. coelicolor* con el operón *lipAR* cromosomal interrumpido (Figs. 27 y 28). El crecimiento de la cepa IB5 no está afectada en relación a lo observado con la cepa silvestre, en tanto que la producción del antibiótico está disminuido aproximadamente a la mitad (Fig. 29). Cuando se realizó el mismo ensayo pero cuantificando el antibiótico sintetizado a partir de los TAG ya

almacenados (micelio transferido) se observa que en la cepa mutante también hay cierta disminución en la cantidad de actinorrodina producida (Fig. 30). Cuando analizamos los sobrenadantes de la cepa IB5 encontramos que aún presenta actividad hidrolítica, la cual probablemente se deba a la presencia de otra esterasa (Fig. 31). Por su parte, la cepa silvestre de *S. coelicolor* presenta una actividad lipolítica extremadamente baja, detectándose durante la fase de crecimiento estacionario (Fig. 31).

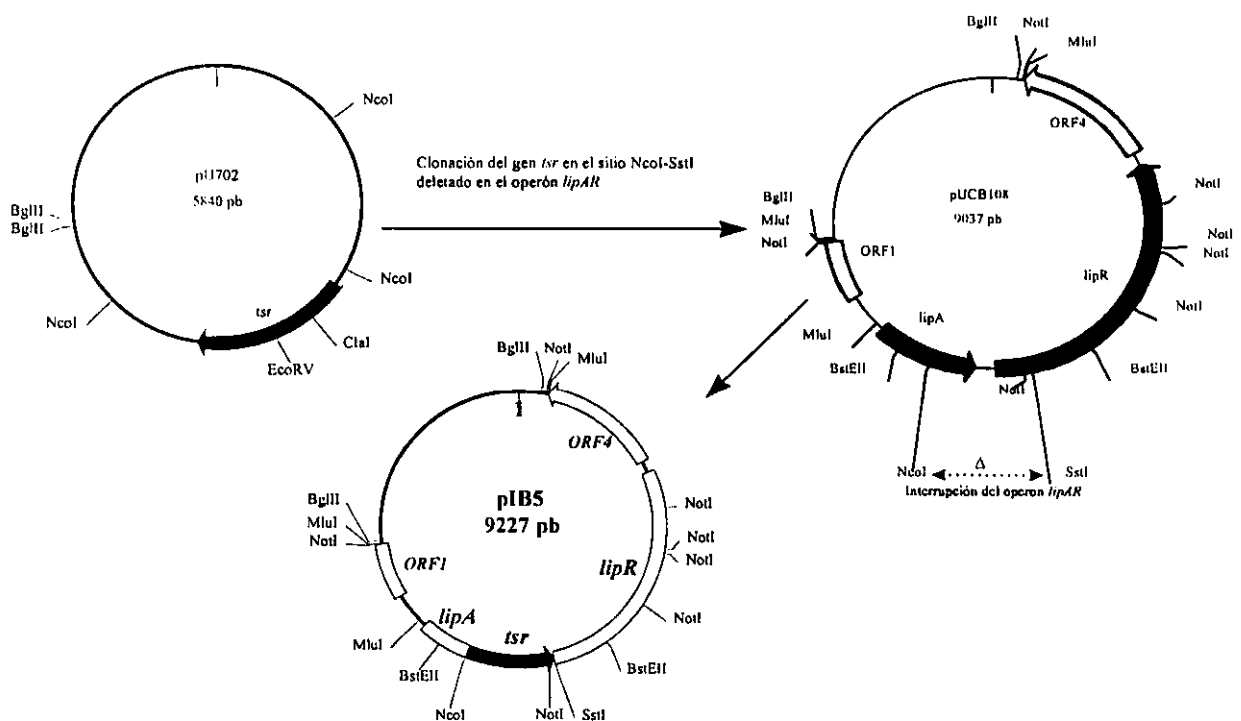


Figura 26. Obtención del plásmido pIB5 para su uso en la interrupción genética del operón *lipAR*. Al plásmido pUCB108 se le deletó la región *NcoI*-*SstI* de 905 pb, y en su lugar se clonó el gen de resistencia a tiosstreptona, *tsr*, proveniente del plásmido pIJ702. El plásmido resultante, pIB5, se utilizó para transformar *E. coli* JM101, seleccionándose una transformante que contenía el plásmido correcto, el cual a su vez fue purificado y utilizado para transformar células de *E. coli* GM272 a fin de obtener DNA plasmídico no metilado.



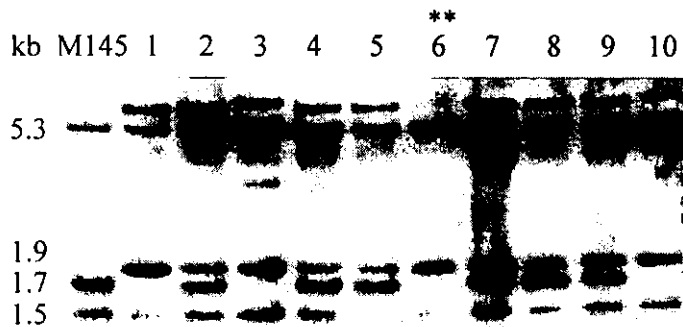


Figura 27. Obtención de una cepa de *S. coelicolor* con el operón *lipAR* interrumpido. El plásmido IB5 no metilado disuelto en TE pH=8 fue desnaturalizado con NaOH 1M, incubado 10 minutos a 37 °C y rápidamente enfriado, y posteriormente se ajustó la mezcla al pH inicial con HCl 1M. Se transformaron protoplastos de *S. coelicolor* M145 con 5 µg de la mezcla anterior y se seleccionaron transformantes tiostreptona resistentes, de las cuales se obtuvo DNA cromosomal que fue digerido con BstEII y sometido a análisis por Southern blot, usando como sonda el fragmento de MluI de 5.3 kb del plásmido pUCB108. La clona deseada debe presentar un fragmento de 1.9 kb que incluye la región del operón *lipAR* interrumpido con el gen *tsr*, en sustitución del fragmento de 1.7 kb que incluye la región NcoI-SstI del operón sin alteración alguna. De las transformantes seleccionadas, la #6 es la que presenta el arreglo genético deseado y se denominó cepa IB5 de *S. coelicolor*.

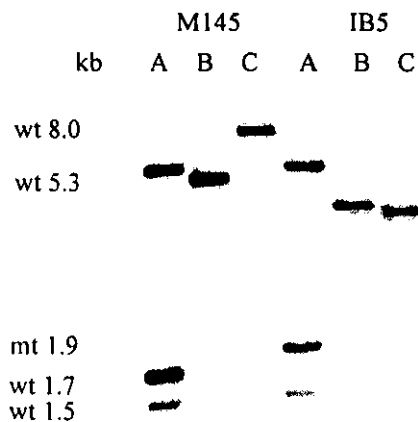


Figura 28. Confirmación de la sustitución del operón *lipAR* silvestre. La cepa IB5 fue propagada sin presión de selección durante cinco generaciones, encontrándose que es altamente estable. Se obtuvo DNA cromosomal que fue digerido con diferentes enzimas a fin de confirmar la sustitución del operón silvestre por su versión parcialmente deletada e interrumpida con el gen *tsr*, así como la ausencia de secuencias del vector integradas al cromosoma de la cepa IB5. DNA cromosomal de cada cepa digerido con (A) BstEII, (B) MluI-EcoRV y (C) PstI; wt: fragmentos derivados de la cepa silvestre, mt fragmentos derivados de la sustitución del operón silvestre.

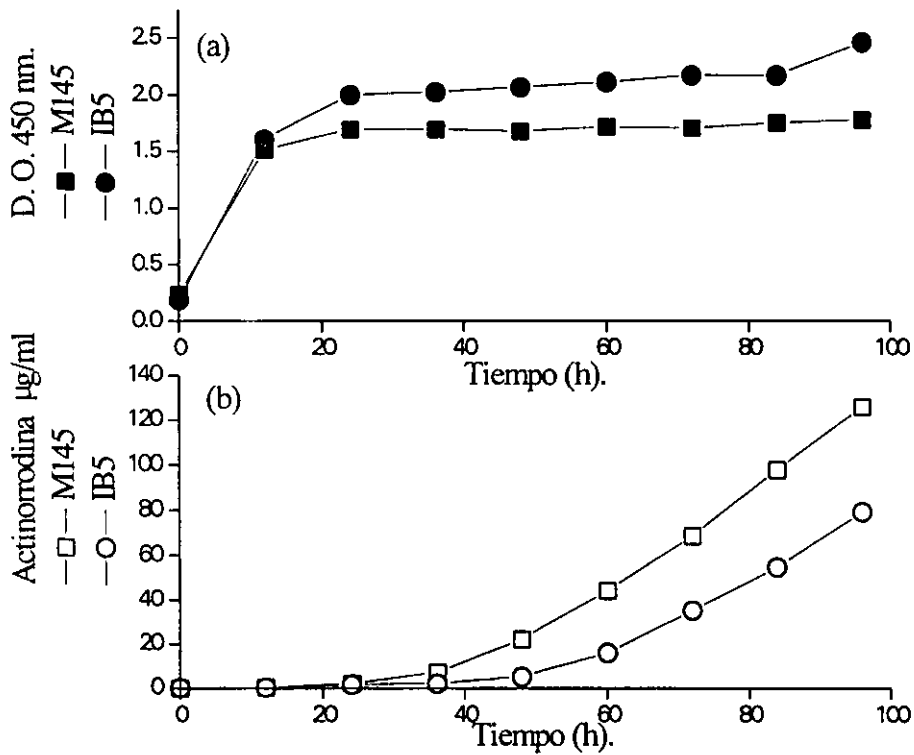


Figura 29. Evaluación de la participación de LipA en la producción de actinorrodina. Esporas de las cepas *S. coelicolor* M145 (*lipAR*<sup>+</sup>) y *S. coelicolor* IB5 (*lipAR*<sup>-</sup>) fueron pregerminadas 8.5 h en medio YT2x y homogenizadas previamente a ser transferidas a medio SMM, se tomaron muestras de 5 ml cada 12 horas, eliminándose el micelio por centrifugación. Los sobrenadantes se ajustaron a pH=12 y se dejaron una hora a temperatura ambiente para posteriormente ser centrifugados para eliminar las sales precipitadas, procediendo a su lectura a 608 nm. La concentración de antibiótico producido se calculó tomando en cuenta que en este medio de cultivo una D.O.<sub>608</sub> 0.5= 60 µg/ml. Se muestran los valores promedio de seis determinaciones independientes.

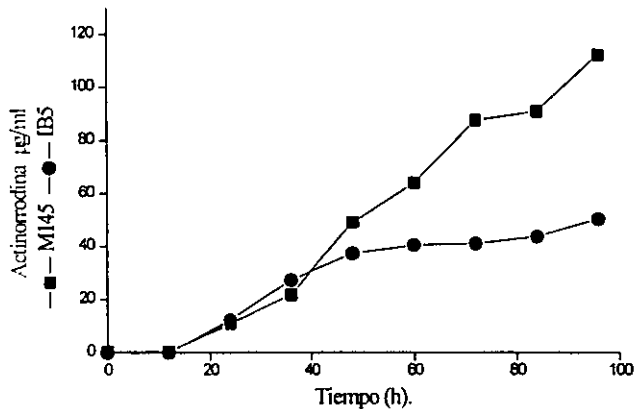


Figura 30. Determinación de la producción de actinorrodina a partir de micelio crecido 60 horas en medio YEME, condiciones en las cuales se acumulan TAG. El micelio fue transferido a medio SMM sin glucosa, la determinación se realizó igual que en el caso de cultivo de esporas pregerminadas. Se muestran los valores promedio de seis determinaciones independientes.

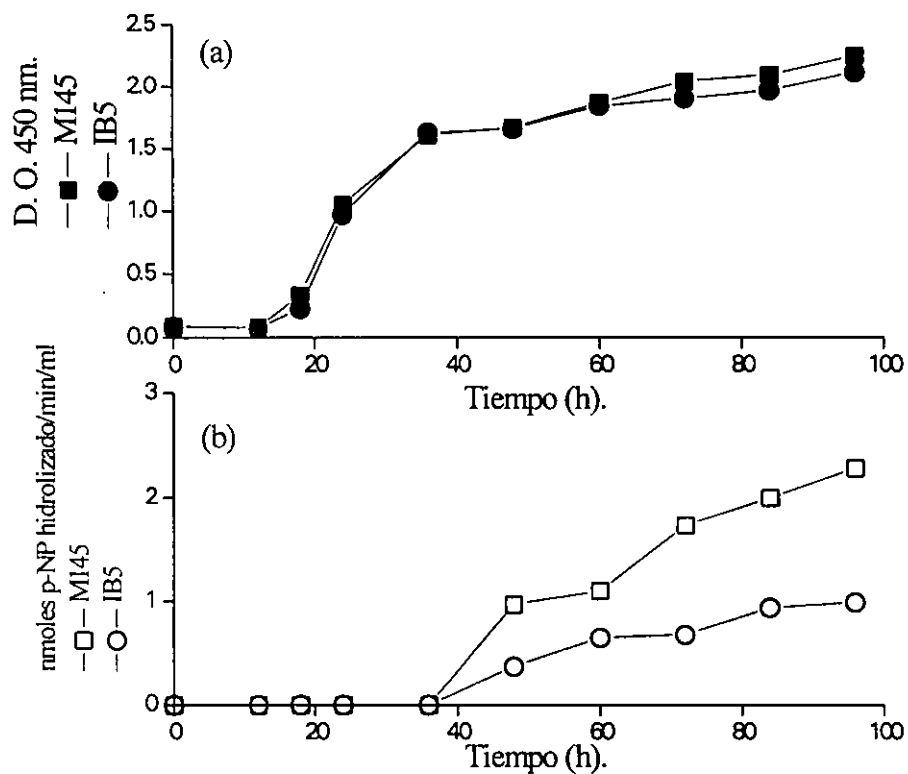


Figura 31. Evaluación de la actividad lipolítica de las cepas silvestre e IB5 de *S. coelicolor*. Ambas cepas fueron crecidas en medio LB-sacarosa obteniéndose muestras de sobrenadante a lo largo de la curva, y la actividad lipolítica se determinó con un ensayo colorimétrico utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-laurato.

### Localización cromosomal del operón *lipAR*.

A partir del plásmido pUCB108 se obtuvo el fragmento MluI de 5.3 kb, el cual fue utilizado como sonda para localizar la posición cromosomal del operón *lipAR*, lo cual fue posible gracias a la colaboración del Dr. D. Hopwood (John Innes Centre, UK). Este operón se localiza en el extremo izquierdo del cromosoma lineal, en la vecindad del gen *abaA* (Fig. 32).

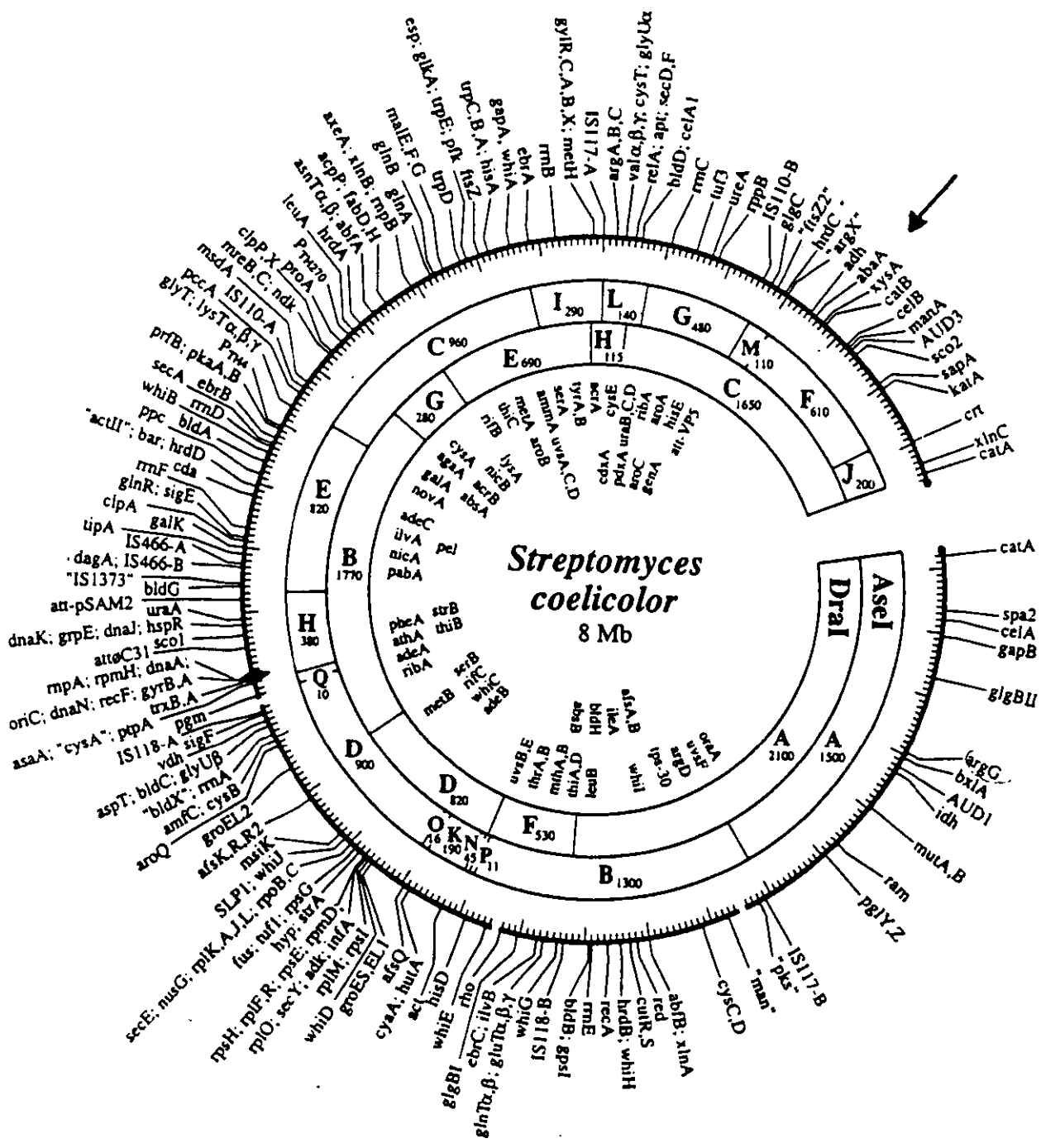


Figura 32. Mapa genético y físico del cromosoma de *S. coelicolor* M145 [21]. La flecha indica la posición del operón *lipAR* de *S. coelicolor* A3(2) caracterizado en este trabajo.

## Modelo computacional de la estructura tridimensional de la lipasa de *S. coelicolor*

### A3(2).

Tomando en cuenta la alta homología que presentan en su estructura primaria las lipasas de *S. exfoliatus* M11 y *S. coelicolor* A3(2) se realizó un modelo de la estructura tridimensional de esta última partiendo de la estructura terciaria de *S. exfoliatus* determinada por difracción de rayos X, a fin de identificar la topología y estructura de la lipasa de la cepa modelo, así como para conocer a los residuos críticos para su función. La alta resolución del modelo estructural de la lipasa de *S. exfoliatus* nos permitió extrapolar con alto grado de seguridad la identidad de las regiones críticas para la actividad lipolítica. El modelo por homología se obtuvo utilizando el programa Swiss-Pdb Viewer, y las imágenes se generaron con el programa Weblab Viewer lite 3.5. Como se esperaba, la estructura terciaria de la lipasa de *S. coelicolor* A3(2) mantiene el arreglo de plegado  $\alpha/\beta$  de las hidrolasas (Fig. 33). Los residuos de la triada catalítica de *S. coelicolor* corresponden, en la forma madura de la lipasa, a la serina 131, el aspartato 177 y la histidina 209, y conforman por lo tanto un sitio activo típico de enzimas hidrolíticas (Fig. 33). En cuanto a la localización de estos aminoácidos, su posición también es idéntica a lo encontrado en las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. La serina se localiza en un giro formado después de una hoja  $\beta$ , correspondiente al loop C-4 de *S. exfoliatus* (Fig. 13) la localización de la histidina también corresponde a lo esperado para las lipasas neutrales, encontrándose en la tercera hoja  $\beta$  después de la que contiene a la serina nucleofílica, en tanto que el aspartato se encuentra en el extremo carboxilo de la segunda hoja  $\beta$  (que corresponden a los loops C-7 y C-6 de *S. exfoliatus* respectivamente). En cuanto a los residuos que participan en la formación de la cavidad oxianiónica, en ambas cepas corresponden a la Met132 y la Phe63; en *Moraxella*

sp corresponderían a Met132 y Tyr64. Y con respecto a los residuos que se localizan en el surco donde supuestamente se une la porción acilo del sustrato, se incluyen el Trp156, la Met132 y la Val179, que en caso de *Moraxella* sp corresponden a Pro156, Met134, e Iso179. Es importante señalar que en el caso de la lipasa de *S. albus* G todos los residuos involucrados en la formación de las estructuras identificadas son exactamente los mismos, y dada la similitud entre las lipasas de *Streptomyces*, podemos decir con gran certeza que la configuración espacial de esta enzima también corresponde a la reportada como consenso para las hidrolasas. Las tres lipasas de *Streptomyces* contienen dos residuos de cisteína, Cys242 y Cys258, que se localizan en la superficie externa de la proteína.

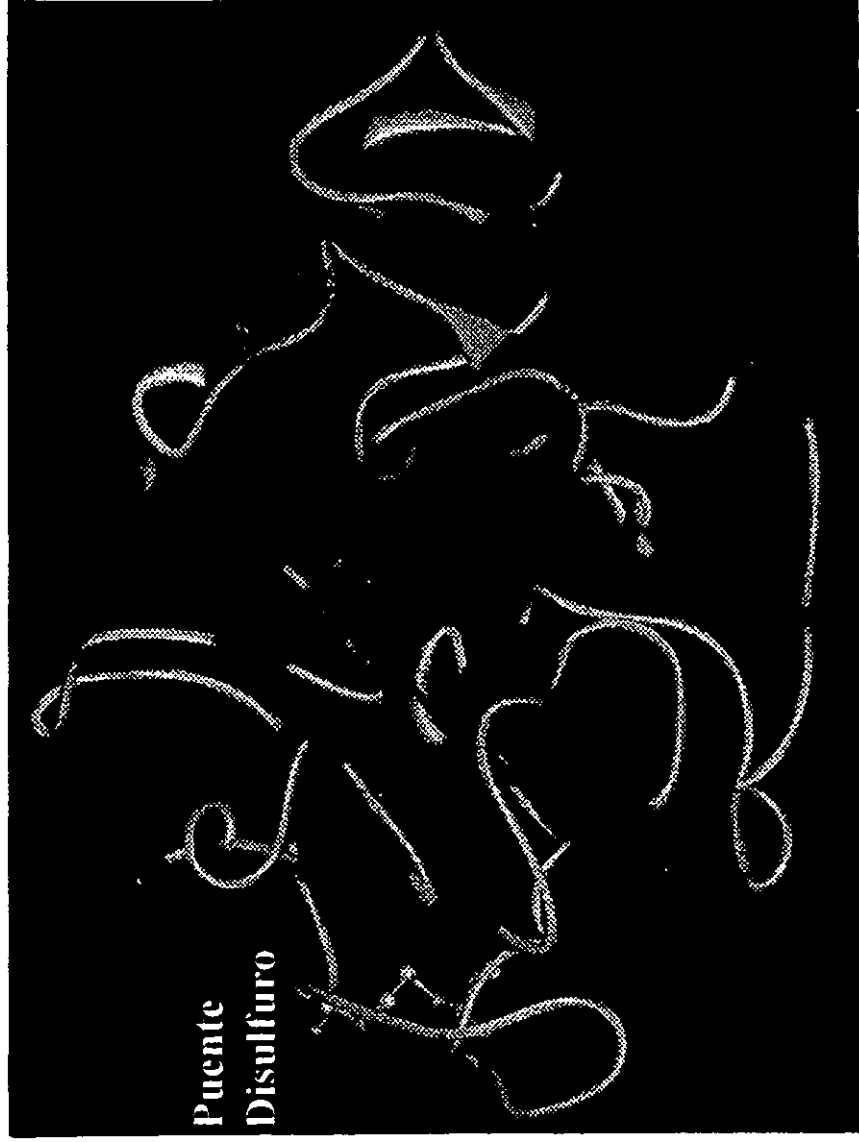
Si bien el análisis de sus residuos totales indican que ambas lipasas son proteínas básicas hidrofóbicas (Tablas II y III), ciertas observaciones realizadas durante los intentos de purificación de la lipasa de *S. coelicolor* indicaban que poseen características muy particulares y específicas que influían en la diferencia de migración observada durante su resolución en PAGE-SDS, lo que hace que parezca de mayor tamaño; además de esto, y a diferencia de la lipasa de *S. exfoliatus*, la lipasa de la cepa modelo no se pega a columnas de carboximetil celulosa, las cuales unen proteínas básicas. A fin de conocer más acerca de las propiedades fisicoquímicas de la lipasa en base a la naturaleza de sus residuos, se hizo un análisis de la distribución de cargas en la superficie de la proteína de *S. coelicolor* (Fig. 34), encontrándose que, aún cuando las cargas netas de ambas lipasas indican que son proteínas básicas, existen claras diferencias en la distribución de las cargas de los residuos individuales, las cuales no parecerían tener gran importancia o peso para explicar las diferencias observadas; sin embargo, al someter las lipasas a un análisis más fino, donde se toman en cuenta no solo las cargas individuales sino además las interacciones que se

establecen entre los residuos vecinos, se evidencio una gran diferencia en su potencial electrostático (Fig. 35). Así, en la lipasa de *S. coelicolor* predominan las zonas cargadas negativamente, en tanto que en la lipasa de *S. exfoliatus* predominan las zonas cargadas positivamente. La construcción de las superficies y sus potenciales electrostáticos se realizo con el programa Grasp.

Toda la sección de predicción y modelaje por computadora fue realizada gracias a la colaboración del Biol. Luis Rosales León, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Figura 33

Modelo de la lipasa LipA de *Streptomyces coelicolor*





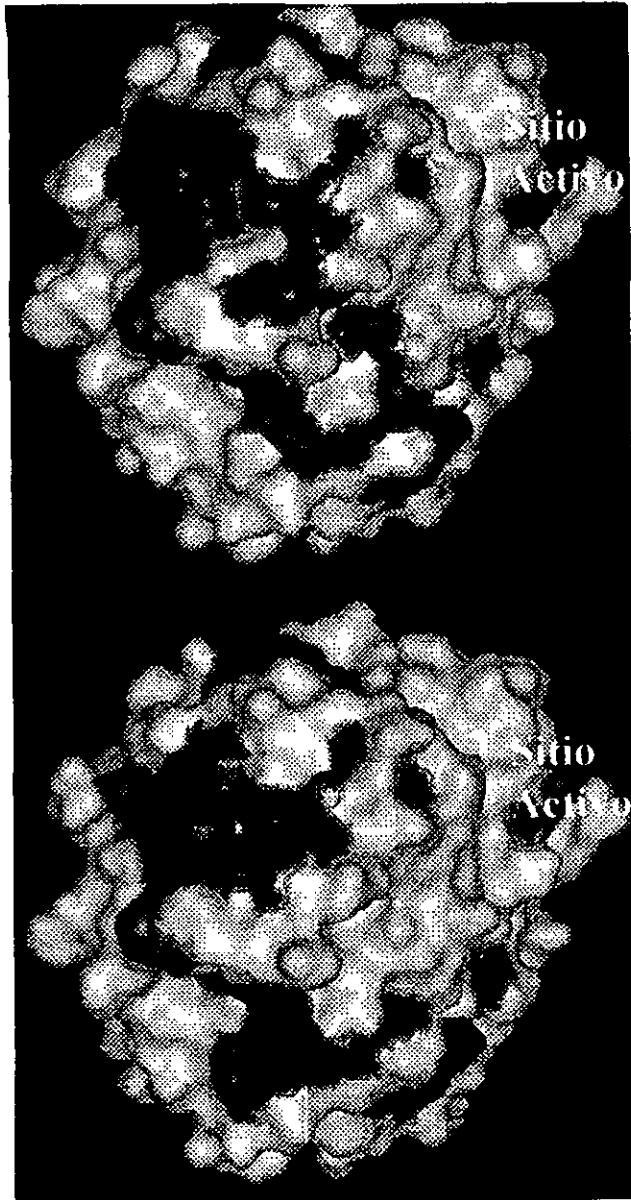


Figura 34

### **Cambios en la Distribución de cargas en la Superficie**

La imagen superior representa la superficie del cristal utilizado como molde para la construcción del modelo (*S. exfoliatus*). La imagen inferior representa la superficie del modelo construido para la lipasa de *S. coelicolor*.

Los residuos superficiales con carga negativa se encuentran en rojo, mientras que los residuos superficiales con carga positiva se encuentran coloreados en azul.

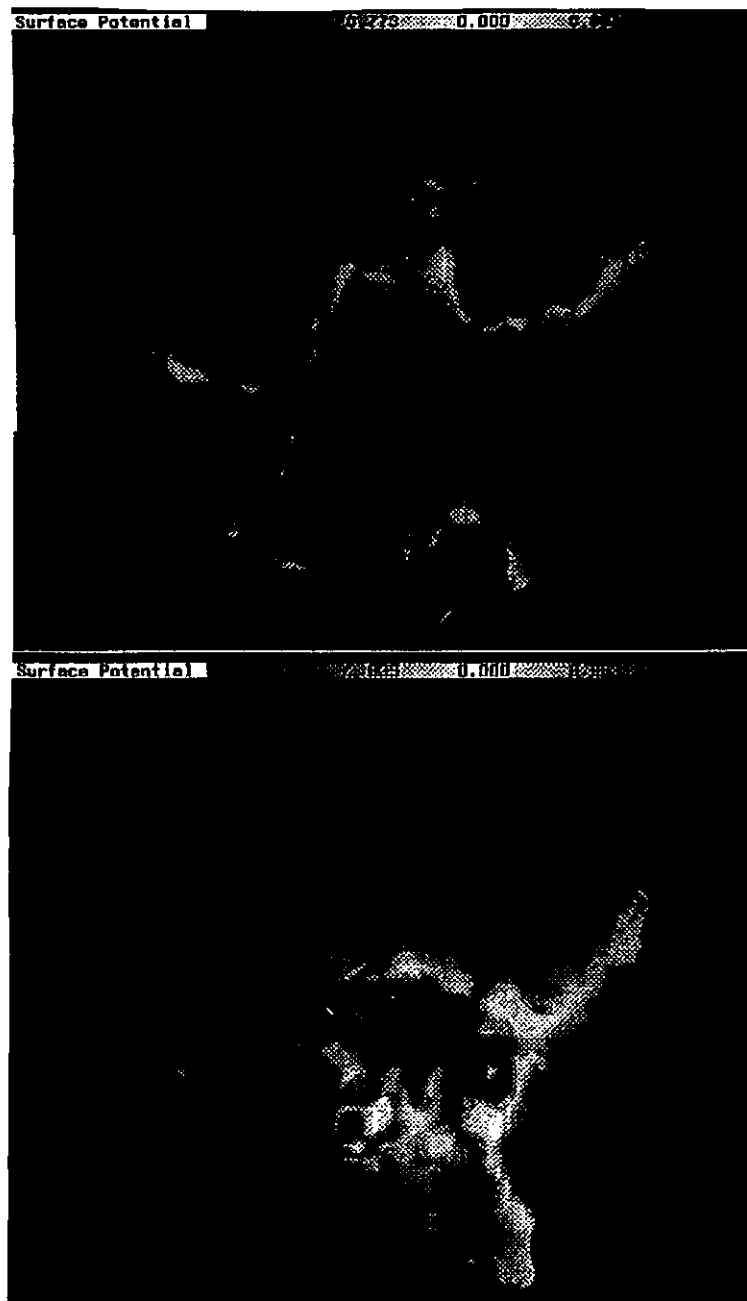


Figura 35

## Cambios en el Potencial

### Electrostático de Superficie

La imagen superior representa la superficie del cristal utilizado como molde para la construcción del modelo (*S. exfoliatus*). La imagen inferior representa la superficie del modelo construido para la lipasa de *S. coelicolor*. En ambos casos, el sitio correspondiente a la superficie del sitio activo se encuentra en la parte superior de la molécula. Las zonas con cargas negativas se encuentran en rojo, mientras que las zonas con carga positiva se encuentran coloreadas en azul.

## VII. DISCUSION GENERAL

En estudios previos se observó que varias especies de *Streptomyces* presentaban secuencias cromosomales de fuerte homología con el gen *lipA* de *S. exfoliatus* M11, que codifica para una lipasa extracelular. Esto nos llevó a la clonación de dicha región de la cepa modelo *S. coelicolor* A3(2), en la cual no se había detectado hasta ahora actividad lipolítica. La caracterización de esta enzima se hizo más importante a partir de que se sugirió que los triacilgliceroles (TAG), que son sintetizados y almacenados en *S. coelicolor* podrían ser utilizados durante la diferenciación como fuentes de carbono para el metabolismo secundario; el inicio en la producción de actinorrodina coincide temporalmente con el abatimiento de la glucosa presente en el medio de cultivo, e importantemente cuando se detecta un descenso en los niveles de TAG. Estas son las únicas bacterias conocidas en donde existe acumulación de este tipo de lípidos neutros, los cuales son el substrato natural de las lipasas.

Logramos clonar la región de *S. coelicolor* homóloga al gen *lipA* de *S. exfoliatus* M11, el cual está presente en un fragmento de 6.293 kb que incluye otros tres genes, uno de ellos incompleto y divergente con respecto a los otros. Así, el gen *lipA* de *S. coelicolor* codifica para una lipasa extracelular que tiene alta homología con las lipasas de *S. exfoliatus* y *S. albus* G, forman una familia de lipasas altamente conservada y distribuida en este género bacteriano, constituyen la familia II de lipasas bacterianas de acuerdo a la clasificación de Jaeger *et al.*[155]. Los péptidos señales de las lipasas de *Streptomyces* están constituidos por los primeros 42 residuos; de acuerdo a von Heijne [199], estas estructuras están formadas por una región en el extremo amino de residuos cargados positivamente,

seguidos por una larga región de residuos hidrofóbicos, y terminando con una porción carboxilo de residuos polares. En esta última región se localiza el sitio de reconocimiento de corte por una peptidasa señal periplasmática, y que está caracterizado por la secuencia Ala-X-Ala localizada en las posiciones -3 y -1 con respecto al primer residuo de la forma madura de la proteína. Tanto la secuencia señal de secreción como el sitio de procesamiento de las lipasas de *Streptomyces* cumplen con las condiciones mencionadas, si bien las características de la secuencia señal de *S. exfoliatus* se acerca más a la descripción consenso de estas regiones, lo cual permite que sea referido como un péptido señal "fuerte". Es importante resaltar el hecho de que los péptidos señales de *S. albus* G y *S. coelicolor* son más parecidos entre sí que con respecto al péptido señal de *S. exfoliatus*, sin embargo, el que los péptidos señales de *S. coelicolor* y *S. albus* G no sean aparentemente muy "fuertes" no significa que no sean igualmente eficaces en su función, las diferencias entre ellos solo refleja las características propias de cada enzima en relación a la fisiología de la cepa pertinente, lo cual a su vez explicaría las diferencias en cuanto al grado de actividad exhibida por cada especie silvestre.

Hacia abajo del gen *lipA* se localiza en la misma orientación el gen *lipR*, el cual codifica para una proteína de 941 aa que presenta alta homología con el activador transcripcional del gen de la lipasa de *S. exfoliatus* y con el gen localizado también hacia abajo del gen *lipA* de *S. albus* G. La región de mayor homología entre estas tres proteínas está en el extremo carboxilo, donde existe un claro dominio de unión al DNA. Los genes *lipA* y *lipR* de *S. coelicolor* constituyen un operón y son expresados a partir de la etapa estacionaria del crecimiento; en *S. exfoliatus* los genes *lipA* y *lipR* se transcriben independientemente, y a esto se suma el hecho de que, a diferencia del activador

transcripcional LipR de *S. exfoliatus*, no existe ningún codón TTA en el gen *lipR* de *S. coelicolor*, lo cual hace su traducción *bldA* independiente, lo cual indica que la regulación de la expresión de estos genes es diferente entre estas especies. De esta manera, los productos de los tres genes *lipR* son miembros de una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales pertenecientes a la superfamilia de reguladores UhpA/LuxR como se discute en el trabajo presentado anteriormente (artículo).

Se ha investigado el efecto de una gran variedad de condiciones ambientales en la producción de lipasas bacterianas y de hongos, sin embargo tales investigaciones han sido realizadas con el propósito de mejorar la producción de estas enzimas, sin buscar mucho qué mecanismos genéticos y fisiológicos afectan la formación y secreción de estas proteínas. De igual manera, a pesar de que en los últimos años se ha incrementado significativamente la cantidad de genes de lipasa clonados, se han realizado pocos estudios sobre la regulación de éstos. A pesar de la alta homología presente entre las lipasas de *Streptomyces*, existen importantes diferencias en la expresión de sus genes, detectada a partir de la clonación de los genes estructurales y activadores en el mismo plásmido multicopia y expresados en la misma cepa receptora. De esta manera tenemos que, aun cuando ambas proteínas son expresadas de manera dependiente de la fase del crecimiento y que necesitan al producto del gen *lipR*, la cinética de producción de la enzima detectada en sobrenadantes de cultivos en LB-sacarosa es diferente. Así, en tanto que la actividad de la lipasa de *S. exfoliatus* se incrementa con el tiempo hasta alcanzar un nivel constante, la lipasa de *S. coelicolor* alcanza un máximo de actividad (48-60 horas) y posteriormente decae. Por otra parte, la actividad de lipasa extracelular de *S. coelicolor* parece ser dependiente del tipo de medio de cultivo empleado, ya que observamos un patrón de

actividad diferente usando la misma cepa con el mismo plásmido en medio R2, detectándose también actividad a partir de la fase estacionaria, pero esta actividad aumenta gradualmente, sin que decaiga o alcance un nivel constante durante los mismos tiempos de cultivo; en este medio de cultivo el aumento en la actividad volumétrica de la lipasa es más pronunciado. Este comportamiento puede atribuirse (i) a que cese la transcripción del operón *lipAR*, o bien a que las condiciones de cultivo causen inestabilidad del mensajero; (ii) que su secreción esté afectada o bien (iii) que la proteína sea inestable. En relación a la primera posibilidad, los resultados con la fusión *tipA-lipA* demostraron que en el fragmento clonado se encuentran todos los elementos genéticos necesarios para la expresión y secreción de la lipasa, y hemos detectado transcripción del gen *lipA* en tiempos de cultivo en los cuales la actividad empieza a decaer (66 horas), y aún cuando la transcripción se detuviera totalmente o los mensajeros fueran inestables, la curva de actividad no tendría que bajar sino mantenerse al menos en un nivel constante ya que la proteína producida sigue presente, a menos que ocurra alguna de las otras posibilidades, es decir que la proteína deje de ser secretada ó esté afectada estructuralmente de tal manera que ya no funcione. Al analizar las mismas muestras de extracto crudo usadas para cuantificar la actividad lipolítica por Western blot, la proteína se detecta a todo lo largo de la curva de crecimiento sin indicios de degradación, e incluso se nota una notable acumulación de la proteína en las muestras correspondientes a los últimos tiempos de incubación, lo que indicaría que su secreción tampoco está afectada en ninguno de los medios de cultivo empleados. Estas observaciones sugieren que los componentes liberados durante el crecimiento en LB o R2 afectan la actividad de la lipasa extracelular, más que estar regulando su expresión y secreción. Esto nos lleva a considerar la posible existencia de factores extrínsecos y/o

intrínsecos a la proteína necesarios para su función. En cuanto a los factores extrínsecos, la gradual pérdida de la actividad enzimática la podríamos asociar a la titulación de algún componente adicional (que actuara positivamente sobre la actividad de la lipasa), debido a la sobre-expresión de la lipasa dada por el plásmido multicopia, esto explicaría la detección de la proteína intacta (revelado por western blot), pero no activa. Lo anterior queda descartado puesto que la proteína pura es activa. Por otro lado, puede ser que en LB algún metabolito de degradación reprima la actividad de la lipasa. Se sabe que los metabolitos producidos bajo ciertas condiciones de cultivo pueden estar regulando negativamente la actividad de lipasa extracelular; así, la producción de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* es reprimida por ácidos grasos de cadena larga, y en el caso de *Acinetobacter calcoaceticus* se reprime la producción de la enzima por la presencia de productos de degradación del hexadecano [180], en estos casos se propone que la represión de la transcripción de los genes *lipA* correspondientes se da a través de un regulador al que se unen los ácidos grasos. En el caso de las lipasas de *Streptomyces* no se afecta la expresión de los genes, y los resultados presentados apuntan más a que la lipasa extracelular se encuentra inactiva en el sobrenadante. En cuanto a lo que ocurre en medio R2, tal vez estos metabolitos secundarios no se produzcan o no alcancen un nivel crítico para afectar la actividad de la lipasa, a lo cual se puede sumar la sobreproducción de la enzima, y todo esto en conjunto podría explicar la presencia de los altos niveles de actividad observados. Estas diferencias observadas en la actividad enzimática las podemos considerar desde otro punto de vista. Así, los cambios en las condiciones fisicoquímicas que se dan durante la incubación en el medio de cultivo podrían estar provocando cambios en la estabilidad de la proteína; la inestabilidad resultante puede originarse a través de cambios en los residuos de la superficie

de la proteína, los que a su vez pueden provocar que otros residuos, incluso regiones completas, que normalmente no son expuestas lo sean ahora, convirtiéndose así en blancos accesibles. Si los residuos afectados están involucrados en la estabilización estructural y/o función, entonces la proteína es propensa a la degradación e inactivación enzimática. Uno de los principales factores que afectan la estabilidad y función de las enzimas es el pH, que es quien determina las interacciones iónicas de las proteínas; los mecanismos responsables de los efectos causados por cambios en él, pueden variar dependiendo de las particularidades de cada enzima y las condiciones ambientales específicas. Cuando se dan cambios de pH las interacciones electrostáticas son las principalmente afectadas, lo cual provoca una tendencia a la desnaturalización, y esto a su vez hace que los residuos no ionizados que están localizados en el interior de la proteína puedan ser ahora ionizables; los cambios conformacionales que esto ocasiona pueden llevar a la degradación de la proteína. Finalmente, los pH extremos o no adecuados pueden iniciar reacciones químicas que alteren los residuos presentes de tal manera que provoquen inactivación irreversible y degradación.

En lo que concierne a la lipasa parcialmente pura de *S. coelicolor*, observamos que pierde su actividad rápidamente y experimenta un alto grado de degradación cuando se almacena por cortos periodos de tiempo a 4°C; esto en contraste a lo observado con la lipasa de *S. exfoliatus* que es altamente estable ya que mantiene su actividad, tanto en los extractos crudos como en su forma totalmente pura, por largos periodos de tiempo (meses). La pérdida de actividad enzimática y la proteólisis *in vitro* de enzimas durante su manejo y/o almacenaje se da frecuentemente, y es causada por la hidrólisis de enlaces peptídicos naturalmente expuestos o que son accesibles como consecuencia de cambios en las



condiciones de manejo y almacenaje. Durante el proceso de congelamiento usado generalmente para almacenar muestras proteicas, los solutos presentes (las sales y las moléculas proteicas) son concentrados conforme se cristalizan las moléculas de agua, lo cual provoca cambios dramáticos en el pH y en la fuerza iónica del micro-ambiente de la enzima, todo lo cual provoca alteraciones en la proteína. El grado de alteración puede ir desde cambios conformacionales menores hasta la inactivación irreversible de la proteína dependiendo de las condiciones de incubación y/o almacenaje. Por ejemplo, un cambio en el pH puede causar la ionización de un grupo catalítico esencial que puede resultar en inactivación sin que se de un cambio severo en la estructura (en este caso, el reajuste del pH restaura la actividad). Aún cuando hasta el momento no conocemos sus respectivos papeles fisiológicos, es importante no dejar de considerar que las diferencias de regulación y estabilidad observadas entre las lipasas de *Streptomyces* obedecen finalmente a sus respectivas funciones específicas.

Aquí es pertinente mencionar que las lipasas no son las únicas proteínas de este género que a pesar de realizar la misma función general y exhibir alta homología entre sí, presentan características propias muy particulares en su fisiología y regulación. Así tenemos entonces que la mayoría de las lipasas y las esterases tienen un mecanismo de catálisis igual al de las serina proteasas, con una triada catalítica formada por una serina nucleofílica que actúa en conjunto con un aspartato y una histidina. Se han clonado y caracterizado dos esterases de *Streptomyces*, una de la especie fitopatógena *S. scabies* cuya forma madura es de 306 aminoácidos, y la de *S. diastatochromogenes* compuesta de 290 aminoácidos; estas enzimas presentan una homología del 31.4% entre sí y no se parecen a las lipasas de *Streptomyces*. Las dos esterases son resistentes a temperaturas mayores a

60°C y presentan propiedades bioquímicas muy similares. Ninguna de estas dos esterases presentan el pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly donde se localiza la serina de la triada catalítica. Para el caso de la esterasa de *S. diastatochromogenes* parece que la serina localizada en la secuencia G-D-Ser-Y-T corresponde a el residuo nucleofílico. El patrón de expresión de estas enzimas es muy diferente, ya que mientras en *S. diastatochromogenes* la esterasa se secreta durante la fase exponencial y alcanza un máximo en la fase estacionaria, la esterasa de *S. scabies* es secretada durante la fase tardía de la fase exponencial y la fase temprana de la fase estacionaria. El promotor del gen *estA* de *S. scabies* se parece al promotor *dagAp3* de *S. coelicolor* que es reconocido por la  $E\sigma^{49}$  y su transcripción requiere la presencia de zinc; el promotor del gen de la esterasa de *S. diastatochromogenes* se parece a los promotores reconocidos por  $E\sigma^{70}$  y su transcripción no es afectada por el zinc [196-198]. La esterasa de *S. scabies* se cristalizó recientemente, encontrándose que la estructura tridimensional de esta enzima es muy diferente del plegado consenso  $\alpha/\beta$  de las hidrolasas conocidas; su sitio catalítico está formado por solo dos residuos, la Ser14 y la His283; y su estructura tridimensional es estabilizada por la presencia de tres enlaces disulfuro, y cuando los residuos de cisteína que contribuyen a su formación son mutados, se altera la estructura conformacional de la enzima, lo que provoca que su secreción sea defectuosa y se induzca degradación proteolítica. Dado que los residuos del sitio activo y las seis cisteínas están conservados en *S. diastatochromogenes*, se sugiere que ambas esterases son hidrolasas con un plegado tridimensional inusual. De esta manera, además de las características genéticas y fisiológicas particulares de *Streptomyces*, se deben agregar las características tan singulares de las lipasas (ausencia de una tapa cubriendo al sitio activo y la presencia de la

cavidad oxianiónica preformada), y esterases (sin el plegado  $\alpha/\beta$  consenso) como un rasgo distintivo del género.

En cuanto a la identidad de la(s) proteína(s) responsable(s) de la actividad adicional de esterasa que detectamos en *S. coelicolor* A3(2), en la secuencia de su cromosoma se han identificados homólogos a las lipasas caracterizadas de otras especies de *Streptomyces* (Sommer P., comunicación personal), lo cual es un claro indicio de que puede coexistir más de una lipasa en estas bacterias. Esto hace más importante ahondar en el estudio de la regulación de estas enzimas a fin de poder determinar su intervención en la fisiología del metabolismo secundario.

Los resultados obtenidos con respecto a la configuración espacial y los residuos críticos para la estructura y función de las lipasas de *Streptomyces*, apoyan la observación acerca de que la estructura de las hidrolasas presenta un dominio central conservado y una periferia divergente. Aparentemente de manera general para las lipasas, la presencia de la estructura helicoidal (tapa) cubriendo al sitio activo es una de las estructuras periféricas que regulan la actividad de estas hidrolasas, sin embargo las lipasas de *Streptomyces* no presentan esta estructura, lo cual indica que la regulación de su actividad debe ser diferente a lo observado en las lipasas de otros grupos bacterianos. El hecho de que esta tapa no exista en estas enzimas lipolíticas hace posible pensar que el sitio activo sea un blanco susceptible no solo a los cambios fisicoquímicos que se dan durante la incubación o en el ambiente circundante, sino además puede ser un punto fácil de inhibición por la unión de algún metabolito presente en el medio de cultivo, sea éste un producto de degradación o no. Por otro lado, ya que las principales diferencias observadas entre las lipasas de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* se dan principalmente en la identidad de los residuos localizados en la parte

externa de las proteínas, es probable que las características fisicoquímicas de estos residuos hagan a la lipasa de *S. coelicolor* más propensa a la degradación proteolítica. La presencia en la periferia de los residuos de cisteína indican que probablemente no tengan un papel relevante en la estabilidad de las lipasas, ya que los enlaces disulfuro involucrados directamente en la estabilización de la conformación enzimáticamente activa de una proteína no se encuentran expuestas a la superficie, ya que esto los haría blanco fácil de agentes desnaturizantes. Existen diferencias importantes en el potencial electrostático de las lipasas, encontrándose que en la lipasa de *S. coelicolor* predominan las zonas cargadas negativamente, en tanto que en la lipasa de *S. exfoliatus* predominan las zonas cargadas positivamente. Esta distribución no azarosa de los residuos explicaría las diferencias observadas en las características fisicoquímicas de las lipasas (su unión o no a columnas de intercambio iónico como la carboximetil celulosa); así como su mayor inestabilidad bajo las mismas condiciones de cultivo y almacenaje. También es posible que los residuos externos presenten algún tipo de interacción con moléculas presentes en el medio, o bien que sean necesarias ciertas condiciones de cultivo a fin de que se puedan formar estructuras secundarias relevantes a fin de mantener la integridad de la enzima, esto podría explicar por que la proteína altamente purificada sea mucho más inestable y se degrada más rápidamente.

Un acercamiento al papel biológico de la lipasa identificada fue posible gracias a la obtención de una cepa mutante donde el operón *lipAR* se interrumpió de tal manera que no hay producción de ninguna de las dos proteínas, lo cual elimina la actividad lipolítica específica por *lipA*. El crecimiento de ambas cepas no se ve alterada, y los niveles de antibiótico producido son diferentes. Así, la cepa mutada rinde, en relación a la cepa

silvestre, aproximadamente la mitad de actinorrodina, un antibiótico derivado de acetato, en condiciones de crecimiento que permiten la acumulación de TAG. La biosíntesis de este antibiótico es a partir de acetyl-CoA, que funciona tanto como unidad de inicio (acetyl-CoA), como de unidad de extensión (malonyl-CoA). Estas moléculas son obtenidas principalmente a partir de la degradación de ácidos grasos, los cuales a su vez son el producto de la hidrólisis de los TAG. La síntesis y almacenamiento de estos lípidos es una importante y distintiva característica del género *Streptomyces*, en donde se detectan una vez que la glucosa ha sido consumida del medio, coincidiendo con la diferenciación morfológica y el inicio del metabolismo secundario. Esta disminución en la producción de actinorrodina es un fenómeno estable ya que siempre se da en la misma proporción, un medio de la producción normal, independientemente de las muestras usadas, del tamaño del inóculo inicial, o el tiempo de almacenaje de las esporas usadas, aún cuando los niveles de cada ensayo son diferentes ( lo cual podemos atribuir a la variabilidad biológica normal que se presenta en todos los sistemas de experimentación *in vivo*). Los resultados obtenidos con la cepa mutante donde el operón *lipAR* ha sido interrumpido, indican que la lipasa identificada interviene en la producción de actinorrodina, haciendo disponibles unidades de carbono necesarias para su biosíntesis; en la misma cepa mutante se detecta además una actividad de esterasa, la cual, si bien es muy baja, parece ser lo suficientemente importante como para que la producción de actinorrodina no sea totalmente nula, además de que otros procesos metabólicos pueden contribuir al aporte de unidades de acetyl-CoA. Así, este trabajo es el primero en demostrar una clara relación entre la presencia de enzimas lipolíticas y la función de los TAG como fuentes de carbono para el metabolismo secundario.

Se construyó un modelo de la estructura tridimensional de la lipasa de *S. coelicolor* tomando como referencia la de *S. exfoliatus* [193], asumiendo que las partes conservadas de la secuencia de aminoácidos de diferentes lipasas representan elementos estructurales conservados. Nuestro modelo estructural de *S. coelicolor* corresponde perfectamente al arreglo  $\alpha/\beta$  de las hidrolasas identificado para las enzimas lipolíticas. Basado en ésto y la alta homología presente en la secuencia de aminoácidos de las lipasas de *Streptomyces*, pudimos identificar la posición y conformación de la triada catalítica, los residuos que forman parte de la cavidad oxianiónica, y los residuos presentes en la región de unión del acilo del sustrato.

Una inusual e interesante característica de la estructura de las lipasas es el hecho de que el sitio activo está dentro de la proteína cubierto por una estructura que funciona como una tapa, formada por una o dos hélices  $\alpha$ . La interacción de esta tapa con el sustrato hidrofóbico es la responsable de la activación interfásica, la cual está representada por un marcado incremento en la actividad enzimática en presencia de una interfase lípido-agua. Este hecho llevó a proponer la hipótesis de que las verdaderas lipasas sufren un cambio conformacional en respuesta a su adsorción a una interfase lípido-agua. La rotación de la tapa permite que el sitio activo quede expuesto y libre para reaccionar con el sustrato. Esta hipótesis fue confirmada por los estudios de cristalografía de rayos X con las lipasa de *R. miehei* y la lipasa pancreática humana. Este cambio conformacional de la proteína parece estar asociado con otro movimiento involucrado en formación de la cavidad oxianiónica. Otro resultado del cambio conformacional es el incremento de la superficie hidrofóbica de la enzima, lo cual está involucrado en el reconocimiento de la superficie lipídica. El tamaño de esta tapa es muy variable, en la lipasa humana es de 25 residuos [140], la de *R. miehei* es

de 7 residuos [137], la de *P. glumae* de 13 residuos [152], y las de mayor tamaño corresponden a las de *P. aeruginosa* cuya cepa TE3285 tiene una tapa de 33 residuos, las cepas M1233, DSM3959 y KWI-56 es de 55 residuos y en IFO-12049 es 39 [195]. Un resultado sorprendente e importante lo constituye el hecho de que las lipasas de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* no presentan una estructura helicoidal cubriendo al sitio activo, lo cual implicaría que su actividad enzimática no requiere de activación interfásica. Con respecto a esto, un hecho sumamente interesante e importante es que en las lipasas pancreática del cerdo, y la de *B. subtilis*, además de la cutinasa de *F. solani* [146, 155], y la de *P. glumae* se ha comprobado que no presentan activación interfásica, lo cual se atribuye a que tampoco presentan la tapa que cubre al sitio activo. Sin embargo, la lipasa de *P. glumae* si contiene una tapa, lo cual indicaría que la presencia de esta estructura no está necesariamente asociada con la activación interfásica, lo cual entonces no deja claro cual sería su función, proponiéndose que en este caso la tapa podría estar funcionando solamente como un mecanismo para inhibir la actividad enzimática, es decir, como una estructura de autoprotección. En base a esto, y lo observado con las lipasas de *Streptomyces*, se hace necesario ampliar el número de lipasas con estructuras cristalizadas y realizar estudios de actividad lipolítica más precisos a fin de decidir si la definición de una lipasa verdadera debe ser cambiada con respecto a la propiedad de la activación interfásica, y por lo tanto la presencia de una tapa que cubra al sitio activo, como características preponderantes de las lipasas en general, o bien si corresponden solo a ciertas familias de enzimas hidrolíticas.

La identidad en el tipo de aminoácido y en la posición que ocupan los residuos de la cavidad oxianiónica de *S. coelicolor* hacen posible asumir que, al igual que en *S. exfoliatus*, esta estructura esté preformada, a diferencia de lo que se observa en otras lipasas donde esta

cavidad, que ayuda a la formación del intermediario catálico tetraédrico, se forma como consecuencia del cambio conformacional que sufre la enzima en respuesta a la presencia de una interfase lípido-agua (activación interfásica). Si la rotación de la tapa, en respuesta a la activación interfásica, es un requerimiento estrictamente necesario para la formación de la cavidad oxianiónica, entonces la falta de esta estructura tendría un efecto drástico sobre la actividad enzimática. Ya que las lipasas de *Streptomyces* carecen de esta tapa, entonces la presencia e integridad de la cavidad oxianiónica debe asegurarse de tal modo que no se vea comprometida su capacidad enzimática, es decir, debe ser independiente de la presencia o ausencia de la tapa, y la forma más fácil de lograr esto sería precisamente que dicha región exista como una estructura ya formada. Obviamente es necesario realizar estudios más precisos sobre su actividad y el tipo de interacciones que se dan entre las diferentes regiones de la lipasa involucradas en ella a fin de poder contestar lo anterior. El conocimiento de la estructura primaria de *S. coelicolor* y su estructura secundaria deducida puede proveer una base firme para el diseño de futuros experimentos con esta enzima.



## VIII. CONCLUSIONES

- **Clonación y características moleculares del operón *lipAR* de *S. coelicolor* A3(2).**
  - \* La cepa modelo *S. coelicolor* A3(2) sí posee actividad lipolítica, además de actividad de esterasa, si bien ambas son extremadamente bajas.
  - \* El operón *lipAR* de *S. coelicolor* A3(2) codifica para una lipasa extracelular (LipA) y para un activador transcripcional (LipR).
  - \* La expresión del gen *lipA* depende de la presencia del activador LipR.
  - \* El activador transcripcional es de 941 aminoácidos y presenta un claro dominio de unión a DNA en su extremo carboxilo terminal.
  - \* Todos los requerimientos genéticos necesarios para la expresión y secreción de la lipasa están contenidos en el fragmento de 6.2 kb clonado.
  - \* Las lipasas de *Streptomyces* constituyen una nueva familia de enzimas hidrolíticas.
  - \* El activador transcripcional del gene de la lipasa de *S. coelicolor* A3(2) pertenece a un nuevo grupo de reguladores transcripcionales.
  - \* Las lipasas de *Streptomyces* no presentan homología con las esterasas conocidas del mismo genero.

- **Regulación de la expresión, secreción y actividad de la lipasa.**

- \* La lipasa de *S. coelicolor* A3(2) es expresada y secretada de una manera fase dependiente, coincidiendo temporalmente con la producción de la actinorrodina, detectándose solo durante el crecimiento estacionario
- \* En *S. coelicolor* A3(2) no existe dependencia de la expresión del gen *lipA* mediada por el gen *bldA*, a diferencia de lo observado con la lipasa de *S. exfoliatus*.
- \* La lipasa de *S. coelicolor* es muy inestable y este factor podría estar influyendo en los patrones de actividad observados en los diferentes medios de cultivo empleados.
- \* La lipasa de *S. coelicolor* presenta un potencial electrostático de superficie predominantemente negativo, en contraste al de la lipasa de *S. exfoliatus* que es positivo.

- **Influencia del operón *lipAR* en la producción de actinorrodina.**

- \* La lipasa identificada está involucrada en la producción de actinorrodina, pero aparentemente no es la única enzima hidrolítica involucrada en el aporte de unidades de acetil-CoA para el metabolismo secundario.

- **La predicción de la estructura tridimensional de la lipasa de *S. coelicolor* indica que:**

- \* La lipasa de *S. coelicolor* tiene la misma triada catalítica presente en las lipasas conocidas, y los tres residuos aparecen en el mismo orden en la secuencia nucleotídica, tal como en la secuencias de otras enzimas lipolíticas.

- \* El sitio activo de las lipasas de *Streptomyces* se localiza en la parte externa de la proteína y no está cubierto por ninguna estructura, a diferencia de lo observado en otras lipasas bacterianas.
- \* La cavidad oxianiónica de las lipasas de *Streptomyces* parece ser una estructura preformada.
- \* La región de unión del componente acilo del sustrato de las lipasas de *Streptomyces* está conservado en relación al de otras lipasas.

En base a estas observaciones, podemos decir que este trabajo nos ha permitido avanzar en el conocimiento y caracterización de la cepa modelo *Streptomyces coelicolor* A3(2), ya que hemos podido demostrar que, a pesar de que hasta el momento era considerada una cepa no lipolítica, sí posee esta actividad enzimática además de la actividad de esterasa. La identificación y caracterización del operón *lipAR* constituye un importante avance en el conocimiento genético y molecular de los estreptomicetos. Las características de la regulación de la expresión y secreción de esta lipasa extracelular, así como los estudios futuros sobre este tema, nos permitirá conocer más sobre la fisiología de esta bacteria. El uso de la cepa modelo nos permitió además establecer una línea de unión entre el metabolismo primario y secundario, ya que pudimos establecer la existencia de una relación entre la acumulación de TAG y la producción de la actinorrodina. Tal vez uno de los resultados más sorprendentes de este trabajo lo constituye el hecho de que la producción de la actinorrodina no se inhibe completamente cuando la lipasa extracelular está ausente, lo cual seguramente se deba a que este antibiótico le sea esencial a la bacteria, y por lo tanto asegura su producción a través de diferentes vías metabólicas. Si bien los resultados

actuales no nos permiten proponer un modelo de cómo se da la relación entre la lipasa y la actinorrodina, sí constituyen un importante avance en el tema de las regulaciones específicas y pleiotrópicas que existen en la producción de antibióticos en esta bacteria. La existencia de esta nueva lipasa ofrece una alternativa biotecnológica en la producción y aplicación de este tipo de enzimas. Actualmente se profundiza en el estudio de la regulación de la expresión y secreción de la lipasa, para lo cual se trata de sobreproducir y purificar la proteína activadora de la transcripción (LipR), y por otro lado se trabaja en la fusión de la región promotora del gen *lipA* a un gen reportero.

## IX. REFERENCIAS

1. Hopwood, D.A. 1988. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc. R. Soc. Lond. B. 235:121-138.
2. Chater, K. F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. Trends. Genet. 5:372-376.
3. Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. Annu. Rev. Microbiol. 47:685-713.
4. Granozzi, C., Billea b., Passantino R., Sollazzo M. & Puglia, A.M. 1990. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 136:713-716.
5. Braña, A.F., Méndez C. Díaz L.A., Manzanal M.B. & Hardisson C. 1986. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. J. Gen. Microbiol. 132:13219-1326.
6. Ochi, K. 1987. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. J. Bacteriol. 169:3608-3616.
7. Gray, D.I., Gooday G.W. & Prosser J.I. 1990. Apical hyphal extension in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 136:1077-1084.
8. Koch, A. L. 1985. How bacteria grow and divide in spite of internal hydrostatic pressure. Can. J. Microbiol. 31:1071-1084.
9. Miguélez E.M., Hardisson C. & Manzanal M.B. 1993. Incorporation and afte of N-acetyl-D-glucosamine during hyphal growth in *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol. 139:1915:1920.
10. Chater, F.K. 1991. Saps, hydrophobins, and aerial wroght. Curr. Biol. 1:318.320.
11. Wildermuth, H. 1970. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor* . J. Gen. Microbiol. 60:43-50.
12. Wright, F. & Bibb, M. J. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. Gene 113:55-65.
13. Bibb, M. J., Findlay P.R. & Johnson M.W. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene 30:157-166.
14. Lin, Y-S., Kieser H.M., Hopwood D.A. & Chen C.W. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. Mol. Microbiol. 10:923-933.
15. Redenbach, M., Flett F., Piendl W., Glocker I., Rauland U, Wafzig O., kliem R., Leblond P. & Cullum J. 1993. The *Streptomyces lividans* 66chromosome contains a 1 MB deletogemic region flanked by two amplifiable regions. Mol. Gen. Genet. 241:255-262.
16. Huang, C-H., Lin Y-S., Yang Y-L., huang S-W & Chen C. W. 1998. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contains conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. Mol. Microbiol. 28:905-916.
17. Chen, C. W. 1996. Complications and implications of linear bacterial chromosome. Trends. Genet. 12:192-196.

18. Ikemura, T. 1981: Correlation between the abundance of *E. coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.* 146:1-21.
19. Ikemura, T. 1982: Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.* 158:573-597.
20. Singer, C.E. & Ames B.N. 1970. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science* 170:822-826.
21. Redenbach M., Kieser H.M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H. & Hopwood D.G. 1996. A set ordered cosmid and detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21:77-96.
22. Leblond P., Redenbach M. & Cullum J. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 175:3422-3429.
23. Musialowsky, M.S., Flett F., scott G.B. Hobbs G. Smith C. & Oliver G. 1994. Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* Chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J. Bacteriol.* 176:5123-5125.
24. Chang, P-C. & Cohen S. N. 1994. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science* 265:952-954.
25. Quin, Z. & Cohen S.N. 1998. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Mol. Microbiol.* 28:893-903.
26. Lezhava, A., Kameoka D., Sugino H., Goshi K., Shinkawa H., Nimi O., Horinouchi S., Beppu T. & Kinashi H. 1997. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* 253:478-483.
27. Betzler, M., Dyson P. & Schrepf H. 1987. Relationship of an unstable *argG* gene to a 5.7-kilobase amplifiable DNA sequence in *Streptomyces lividans* 66. *J. Bacteriol.* 169:4804-4810.
28. Dittrich, W., Betzler M. & Schrepf H. 1991. An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein. *Mol. Microbiol.* 5:2789-2797.
29. Fischer, G., Decaris B. & Leblond P. 1997. Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 179:4533-4558.
30. Volff J.N. & Altenbuchner J. 1998. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* 27:239-246.
31. Rauland, U., Glocker I., Redenbach M. & Cullum J. DNA amplifications and deletions in A *Streptomyces lividans* 66 and the loss of one end of the linear chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 246:37-44.
32. Young, M. & Cullum J. 1987. A plausible mechanism for the large-scale chromosomal DNA amplification in *Streptomyces*. *FEBS LETTERS* 212:10-14.
33. Martin, J.F. & Liras P. 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and others secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:173-206.
34. Omura, S. 1992. The expanded horizon for microbial metabolites- a review. *Gene* 115:141-149.
35. Hopwood, D.A. & Wright H.M. 1983. CDA is a new chromosomally-determined antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129:3575-3579.

36. Feitelson, J., Malpartida F. & Hopwood D.A. 1986. Genetic and biochemical characterization of the *red* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 131:2431-2441.
37. Rudd, B.A. & Hopwood D.A. 1980. A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. J. Gen. Microbiol. 119:333-340.
38. Wright H.M. & Hopwood, D.A. 1976. Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 95:96-106.
39. Malpartida, F. & Hopwood D.A. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. Nature 309: 456-464.
40. Malpartida, F. & Hopwood D.A. 1986. Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet. 205: 66-73.
41. Gramajo, H.C. Takano, E. & Bibb M.J. 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. Mol. Microbiol. 7:837-845.
42. Takano, E., Gramajo H. C., Strauch E., Andress N., White J. & Bibb M.J. 1992. Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. 6:2797-2804.
43. Hallam, S. E., Malpartida, F. & Hopwood D.A. 1988. Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. Gene 74: 305-320.
44. Hopwood, D.A & Sherman D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. Annu. Rev. Genet. 24: 37-66.
45. Caballero, J.L., Martinez E., Malpartida F. & Hopwood D.A. 1991. Organisation and functions of the *actVA* region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet. 230: 401-412.
46. Fernández-Moreno, M.A., Caballero J.L., Hopwood D.A. & Malpartida F. 1991. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bltA* tRNA gene of *Streptomyces*. Cell 66: 769-780.
47. Fernández-Moreno, M.A., Martinez E., Boto L., Hopwood D.A. & Malpartida F. 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. J. Biol. Chem. 267(27): 19278-19290.
48. Fernández-Moreno, M.A., Martinez E., Caballero J.L., Ichinose K., Hopwood D.A. & Malpartida F. 1994. DNA sequence and functions of the *actVI* region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Biol. Chem. 269(40): 24854-24863.
49. Revill, W. P., Bibb M.J. & Hopwood D. A. 1996. Purification of a malonyltransferase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and analysis of its genetic determinant. J. Bacteriol. 177(14): 3946-3952.
50. Adamidis T., Riggle P. & Champness W. 1990. Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. J. Bacteriol. 172:2962-2969.

51. Champness, W., Riggle P. & Adamidis T. & Vandervere P. 1992. Identification of *Streptomyces coelicolor* genes involved in regulation of antibiotic synthesis. *Gene* 115:55-60
52. Horinouchi, S., Hara O. & Beppu T. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 155:1238-1248.
53. Adamidis T. & Champness W. 1992. Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J. Bacteriol* 174:4622-4628.
54. Brian, P., Riggle P.J., Santos R.A. & Champness W. 1996. Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J. Bacteriol.* 178:3221-3231.
55. Horinouchi, S., Suzuki H. & Beppu t. 1986. Nucleotide sequence of *afsB*, a pleiotropic gene involved in secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 168:257-269.
56. Floriano, B. & Bibb M. 1996. *AfsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 21:385-396.
57. Hara, O & Beppu T. 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* -the role of A-factor. *J. Antibiotics.* 35:349-357.
58. Miyake, K., Horinouchi S., Yoshida M., Chiba N., Mori K., Nogawa N., Morikawa N. & Beppu T. 1989. Detection and properties of A-Factor-Binding protein from *Streptomyces griseus* . *J. Bacteriol.* 171:4298-4302.
59. Miyake, K., Kuzuyama T., Horinouchi S. & Beppu T. 1990. The A-Factor-Binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* 172:3003-3008.
60. Hara, O., Horinouchi S., Uozumi T. & Beppu T. 1983: Genetic analysis of A-factor in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2939-2944.
61. Vujaklija, D., Ueda K., Hong S-K, Beppu T. & Horinouchi S. 1991. Identification of A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* 229:119-128.
62. Horinouchi, S. & Beppu T. 1992. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces* : A-Factor as a microbial hormone and the AsfR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene.* 115:167-172.
63. Horinouchi, S. & Beppu T. 1994. A-Factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus* . *MicroReview.* :859-864.
64. Champness, W.C. 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol* 170:1168-174.
65. Merrick, M.J. 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 96:299-315.
66. Piret J. M. & Chater K. F. 1985. Phage-mediated cloning of *bldA*, a region involved in *S. coelicolor* Morphological development, and its analysis by genetic complementation. *J. Bacteriol.* 163(3):965-972.



67. Lawlor E. J., Baylis H. A. & Chater K. F. 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *S. coelicolor* A3(2). *Genes & Development*. 1:1305-1310.
68. Ueda Y., Kumagai I. & Miura K. 1992. The effects of a unique D-loop structure of a minor tRNA<sup>Leu</sup><sub>UUA</sub> from *Streptomyces* on its structural stability and amino acid accepting activity. *Nucleic Acids Research*. 20(1):3911-3917.
69. Leskiw B. K., Lawlor E. J., Fernandez-Abalos J. M. & Chater K. F. 1991. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2461-2465.
70. Leskiw B. K., Bibb M. J. & Chater K. F. 1991. The use of a rare codon specifically during development? *Mol. Microbiol.* 5(12):2861-2867.
71. Guthrie E. P. & Chater K. F. 1990. The level of a transcript required for production of a *S. coelicolor* antibiotic is conditionally dependent on a tRNA gene. *J. Bacteriol.* 172(11):6189-6193.
72. Leskiw B. K., Mah R., Lawlor E. J. & Chater K. F. 1993. Accumulation of bldA-Specified tRNA is temporally regulated in *S. coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 175(7):1995-2005.
73. Malpartida, F., Niemi J., Navarrete R. & Hopwood D.A. 1990. Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene* 93:91-99.
74. Narva, K.E. & Feitelson J.S. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol* 172:326-333.
75. Passantino, R., Puglia AM. & Chater K.F. 1991. Additional copies of the *actII* regulatory gene induce actinorhodin production in pleiotropic *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 137:2059-2064.
76. White J. & Bibb M. 1997. *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *S. coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 179(3):627-633.
77. Harasym, M., Zhang L. Chater K.F. & Piret J. 1990. The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *bldB* region contains at least two genes involved in morphological development. *J. Gen. Microbiol.* 136:1543-1550.
78. Pope M. K., Green B. D. & Westpheling J. 1996. The *bld* mutants of *S. coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol. Microbiol.* 19 :747-756.
79. Pope M. K., Green B. & Westpheling J. 1998. The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *S. coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180:1556-1562.
80. Elliot, M., Damji F., Passantino R., Chater K.F. & Leskiw B. 1998. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J. Bacteriol.* 180:1549-1555.
81. Leskiw B. K. & Mah R. 1995. The *bldA*-encoded tRNA is poorly expressed in the *bldI* mutant of *S. coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 141:1921-1926.
82. Guijarro, J., Santamaria R., Schauer A. & Losick R. 1988. Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J. Bacteriol.* 170:1895-1901.

83. Kinashi, H., Shimaji M. & Sakai A. 1987. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature* 328:454-456.
84. Willey J., Santamaria R., Guijarro J., Geistlich M. & Losick R. 1991. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell*. 65:641-650.
85. Willey J., Schwedock J. & Losick R. 1993. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Genes & Development*. 7:895-903.
86. Nodwell J. R., McGovern K. & Losick R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *S. coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 22:881-893.
87. Perego, M. & Hoch J.A. 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1549-1553.
88. Perego, M., Higgins C.F., Pearce S.R., Gallagher M.P. & Hoch J.A. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* 5:173-185.
89. Nodwell J. R. & Losick R. 1998. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *S. coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180(5):1334-1337.
90. Im H. 1995. The *sapA* promoter from *S. coelicolor* requires activation sites and initiator-like sequences but not -10 or -35 sequences. *J. Bacteriol.* 177(16):4601-4608.
91. Kendrick, K.E. & Ensign J.C. 1983. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol* 155:357-366.
92. Martin, J. B. & Kendrick K.E. 1988. Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170:2802-2808.
93. McCue, L.A., Kwak J., Babcock M. J. & Kendrick K. E. 1992. Molecular analysis of sporulation in *Streptomyces griseus*. *Gene*. 117:173-179.
94. Babcock M. J. & Kendrick K. E. 1990. Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene*. 95:57-63.
95. McCue L. A., Kwak J., Wang J. & Kendrick K. E. 1996. Analysis of a gene that suppresses the morphological defect of bald mutants of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 178(10):2867-2875.
96. Kwak J. & Kendrick K. E. 1996. Bald mutants of *Streptomyces griseus* that prematurely undergo key events of sporulation. *J. Bacteriol.* 178(15):4643-4650.
97. Bruton C. J., Plaskitt K. A. & Chater K. F. 1995. Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 18(1):89-99.
98. Martin M. C., Schneider D., Bruton C. J., Chater K. F. & Hardisson C. 1997. A *glgC* gene essential only for the first of two spatially distinct phases of glycogen synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 179(24):7784-7789.
99. Hopwood, D.A., Wildermuth H. & Palmer H.M. 1970. Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *J. Gen. Microbiol.* 61:397-408.
100. Chater, K. F. 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 72:9-28.

101. Méndez, C. & Chater K.F. 1987. Cloning of *whiG*, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 169:5715-5720.
102. Chater, K.F., Bruton C.J., Plastick K.A., Buttner M.J., Méndez C. & Helmann J.D. 1989. The development fate of *S. Coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility  $\sigma$  of *B. subtilis*. *Cell.* 59:133-143
103. Tan H. & Chater K. F. 1993. Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. *J. Bacteriol.* 175(4):933-940.
104. Kelemen G. H., Plaskitt K. A., Lewis C. G., Findlay K. C. & Buttner M. J. 1995. Deletion of DNA lying close to the *glkA* locus induces ectopic sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 17(2):221-230.
105. Kelemen G. H., Brown G. L., Kormanec J., Potúcková L., Chater K. F. & Buttner M. J. 1996. The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 21(3):593-603.
106. Davis N. K. & Chater K. F. 1992. The *Streptomyces coelicolor whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 232:351-358.
107. Soliveri J., Brown K. L., Buttner M. J. & Chater K. F. 1992. Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. *J. Bacteriol.* 174(19):6215-6220.
108. Soliveri J., Vijgenboom E., Granozzi C., Plaskitt K. A. & Chater K. F. 1993. Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes. *J. General Microbiol.* 139:2569-2578.
109. Ryding, N.J., Kelemen G. H. Whatling A. A., Flårdh K., Buttner M.J. & Chater K.F. 1998. A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 29 (1): 343-357.
110. Potúcková L., Kelemen G. H., Findlay K. C., Lonetto M. A., Buttner M. J. & Kormanec J. 1995. A new RNA polymerase sigma factor,  $\sigma^F$ , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Mol. Microbiol.* 17(1):37-48.
111. Kroos, L., Zhang B., Ichikawa H., Yu Y-T. 1999. Control of  $\sigma$  factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.* 31:1285-1294.
112. Davis N. K. & Chater K. F. 1990. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Microbiol.* 4(10):1679-1691.
113. Blanco G., Pereda A., Méndez C. & Salas J. A. 1992. Cloning and disruption of a fragment of *Streptomyces halstedii* DNA involved in the biosynthesis of a spore pigment. *Gene.* 112:59-65.
114. Yu T-W. & Hopwood D. A. 1995. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor whiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the *act* genes for actinorhodin biosynthesis. *Microbiol.* 141:2779-2791.
115. Blanco G., Brian P., Pereda A., Méndez C., Salas J. A. & Chater K. F. 1993. Hybridization and DNA sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of

- related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp. *Gene*. 130:107-116.
116. Kelemen G. H., Brian P., Flårdh K., Chamberlin L., Chater K. F. & Buttner M. J. 1998. Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *J. Bacteriol.* 180(9):2515-2521.
  117. Vicente M. & Errington J. 1996. Structure, function and controls in microbial division. *Mol. Microbiol.* 20(1):1-7.
  118. Dharmatilake A. J. & Kendrick K. E. 1994. Expression of the division-controlling gene *ftsZ* during growth and sporulation of the filamentous bacterium *Streptomyces griseus* . *Gene*. 147:21-28.
  119. McCormick J. R., Su E. P., Driks A. & Losick R. 1994. Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol. Microbiol.* 14(2):243-254.
  120. McCormick J. R. & Losick R. 1996. Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *J. Bacteriol.* 178(17):5295-5301.
  121. Lewin, B. 1997. Prokaryotic gene expression, pag 285-329. *En Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press, N.Y.
  122. Westpheling J., Ranes M. & Losick R. 1985. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* . *Nature*. 313(3):22-27.
  123. Buttner M. J., Smith A. M. & Bibb M. J. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the Agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *Cell*. 52:599-607.
  124. Tanaka K., Shiina T. & Takahashi H. 1988. Multiple principal sigma factor homologous in eubacteria: identification of the "rpoD Box". *Science*. 242:1040-1042.
  125. Lonetto M. A., Brown K. L., Rudd K. E. & Buttner M. J. 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase s factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7573-7577.
  126. Buttner M. J., Chater K. F. & Bibb M. J. 1990. Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *J. Bacteriol.* 172(6):3367-3378.
  127. Brown K. L., Wood S. & Buttner M. J. 1992. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) ; renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* 6(9):1133-1139.
  128. Buttner M. J. 1989. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *Mol. Microbiol.* 3(11):1653-1659.
  129. Buttner M. J. & Lewis C. G. 1992. Construction and characterization of *Streptomyces coelicolor* A3(2) mutants that are multiply deficient in the nonessential *hrd*-encoded RNA polymerase sigma factors. *J. Bacteriol.* 174(15):5165-5167.
  130. Kormanec J. & Farkasovský M. 1993. Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage. *Nucleic Acids Research*. 21(16):3647-3652.

131. Fuji T., Gramajo H.C., Takano E. & Bibb M.J. 1996. *RedD* and *actII-ORF4*, a pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2); are transcribed in vitro by an RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{\text{hrdD}}$ . J. Bacteriol. 178(11):3402-3405.
132. Westpheling J. & Brawner M. 1989. Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. J. Bacteriol. 171(3):1355-1361.
133. Brawner M. E., Mattern S. G., Babcock M. J. & Westpheling J. 1997. The *Streptomyces* galP1 promoter has a novel RNA polymerase recognition sequence and is transcribed by a new form of RNA polymerase in vitro. J. Bacteriol. 179(10):3222-3231.
- 134.- Strohl-W. R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucleic Acids Research. 20(5):961-974.
- 135.- Mathews, C.K. & Van Holde K.E. 1996. Biochemistry, Sec. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. C.A. USA.
- 136.- Brady, L., Brzozowski A. M., Derenwenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Tunkenburg J.P., Christiansen L., Høge-Jensen B., Norskov L., Thim L. & Menge u. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature 343:767-770.
- 137.- Brzozowski, A.M., Derenwenda U., Derenwenda Z.S., Dodson G., Lawson D.M., Tunkenburg J.P., Bjorkling F., Høge-Jensen B., Patkar S.A. & Thim L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex. Nature 351:491-494.
- 138.- Blow, A. 1991. Lipases reach the surface. Nature 351:444-445.
- 139.- Derenwenda, Z.S. & Sharp A.M. 1993. News from the interface: the molecular structures of triacylglycerol lipases. Trends. Biochem. Sc. 18:20-25.
- 140.- Van Tilbeurgh, H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N., Verger R., & Cambillau C. 1993. Interfacial activation of the lipase procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. Nature 362:814-820.
- 141.- Rogalska, E., Ransac S. & Verger R. 1993. Controlling lipase stereoselectivity via the surface pressure. J. Biol. Chem. 268:792-794.
- 142.- Kouker, G. & Jaeger K-E. 1987. Specific and sensitive assay for bacterial lipases. Appl. Environ Microbiol. 53:211-213.
- 143.- Jaeger, K-E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Van Heuvel M. & Misset O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 15:29-63.
- 144.- Sarda, L. & Desnuelle P. 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochim. Biophys. Acta 30:513-521.
- 145.- Desnuelle, P. 1961. Pancreatic lipase. Adv. Enzymol. 23:129-161.
- 146.- Jaeger, K-e., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F. & Dijkstra B.W. 1993. Topological characterization and modelling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. 332:143-149.
- 147.- Winkler, F.k., d'Arcy A. & Hunziker W. 1990. Structure of human pancreatic lipases. Nature 344:771-774.
- 148.- Verger, R. 1980. Enzyme kinetics of lipolysis. Methods Enzymol. 64:341-392.
- 149.- Schrag, J.D., Li Y., Wu S. & Cygler M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. Nature 351:761-764.

- 150.- Grochulski, P., Li Y., Schrag J.D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B. & Cygler M. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268:12843-12847.
- 151.- Martinez, C., de Geus P., Lauwereys M., Matthyssens G. & Cambillau C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356:615-618.
- 152.- Noble, M.E.M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R. & Frenken L.G.L. 1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* 331:123-128.
- 153.- Larsons, S., Day J., Greenwood A., Oliver J., Rubingh D. & McPherson A. 1991. Preliminary investigation of crystals of the neutral lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Mol. Biol.* 222:21-23.
- 154.- Kim, K.K., Hwang K.Y., Jean H.S., Kim S., Sweet R.M., Yang C.H. & Suh S.W. 1992. Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Mol Biol.* 227:1258-1262.
- 155.- Jaeger, K-E., Dijkstra B.W. & Reetz M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351
- 156.- Mingarro, I., González-Navarro H., Braco L. 1996. Trapping of different lipase conformers in water-restricted environments. *Biochemistry* 35:9935-9944.
- 157.- Derewenda, U., Brzozowski A.M., Lawson D.M. & Derewenda Z.S. 1992. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 31:1532-1541.
- 158.- Jaeger, K-E., Adrian F.J., Meyer H.E., Hancock E.W. & Winkler U.K. 1992. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1120:315-321.
- 159.- Gilbert, E.J. 1993. *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* 15:634-643.
160. Dartois, V., Baulard A., Schanck K. & Colson C. 1992. Cloning, nucleotide sequence and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta* 1131:253-260.
- 161.- Van Oort, M.G., Deveer A.M., Dijkman R., Tjeenk M.L., Verheij H.M., De Haas G.H, Wenzig E. & Götz F. 1976. Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* 28: 9278-9285.
- 162.- Nikoleit, K., Rosenstein R., Verheij H.M. & Götz F. 1995. Comparative biochemical and molecular analysis of the *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* and a hybrid lipase. *FEBS* 228:732-738.
- 163.- Jürgens, D., Huser H., Brunner H. & Fehrenbach F.J. 1981. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* 12:195-199.
- 164.- Wenzig, E., Lottspeich F., Verheij H.M., de Haas G.H., & Götz F. 1990. Extracellular processing of the *Staphylococcus aureus* lipase. *Biochemistry* 9:47-56.
- 165.- Smeltzer, M.S., Gill S.R. & Iandolo J.J. 1992. Localization of a chromosomal mutation affecting expression of extracellular lipase in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 174:4000-4006.

- 166.- Rollof, J. & Normark S. 1992. *In vivo* processing of *Staphylococcus aureus* lipase. J. Bacteriol 174:1844-1847.
- 167.- Jäger, S., Demleitner G. & Götz F. 1992. Lipase of *Staphylococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis. FEMS Microbiol. Lett. 100:249-254.
- 168.- Ayora, S., Lindgren P.E. & Götz F. 1994. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* involved in extracellular lipase processing. J. Bacteriol. 176:3218-3223.
- 169.- Hobson, A.H., Buckley C.M., Aamand J.L., Jorgensen S.T., Diderichsen B. & McConnell. 1993. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5682-5686.
- 170.- Shinde, U. & Inouye M. 1993. Intramolecular chaperones and protein folding. Trends. Biochem. Sci. 18:442-446.
- 171.- Jorgensen, S., Skov K.w. & Diderichsen B. 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. J. Bacteriol. 173: 559-567.
- 172.- Frenken, L.G.J., Bos J.W. Visser C., Müller W., Tommassen J. & Verrips C.T. 1993. An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. Mol. Microbiol. 9:579-589.
- 173.- Frenken, L.G.J., de Groot A., Tommassen J. & Verrips C.T. 1993. Role of *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. Mol. Microbiol. 9:591-599.
- 174.- Wohlfarth, S., Hoesche C., Strunk C. & Winkler U.K. 1992. Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Gen. Microbiol. 138:1325-1335.
- 175.- Tommassen, J., Folloux A., Bally M., Murgier M. & Lazdunski A. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 103:73-90.
- 176.- Duong, F., Soscia C., Lazdunski A. & Murgier M. 1994. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. Mol. Microbiol. 11:1117-1126.
- 177.- Heinrichs, J.H., Bayer M.G. & Cheung A.L. 1996. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 178:418-423.
- 178.- McNamara, P.J. & Iandolo J.J. 1998. Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KS19051. J. Bacteriol. 180:2609-2615.
- 179.- Kok, R.G., van Thor J.J., Nugteren-Roodzant I.M., Brouwer M.B., Egmond M.R., Nudel C.B., Vosman B. & Hellingwerf K.J. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gen. Mol. Microbiol. 15:803-818.
- 180.- Kok, R.G., Nudel C.B., Gonzalez R.H., Nugteren-Roodzant I.M., & Hellingwerf K.J. 1996. Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: fatty acid repression of *lipA* expression and degradation of LipA. J. Bacteriol. 177:6025-6035.
- 181.- Brint, J.M. & Ohman D.E. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhIL, another set of regulators in strain PAO1

- with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol* 177:7155-7163.
- 182.- Latifi, A., Winson M.K., Foglino M., Bycroft B.W., Stewart G.S. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 17:333-343.
- 183.- Packter, N.M., Flatman S. & Lucock A. J. 1985. Formation of storage lipids and actinorhodin, a phenolic antibiotic, in *Streptomyces coelicolor*. *Biochem. Soc. Trans.* 13:251-252.
- 184.- Olukoshi, E. R. & Packter N.M. 1992. Isolation of triacylglycerol synthase activity from *Streptomyces lividans*. *Biochem. Soc. Trans.* 20:99S.
- 185.- Olukoshi, R. & Packter N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140:931-943.
- 186.- Sztajer, H. & Maliszewska Y. Producción of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 10:492-497.
- 187.- Pérez, C., Juárez K., García-Castells E., Soberón G. & Servín-González L. 1993. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* 123:109-114.
- 188.- Servín-González, L., Castro C., Pérez C., Rubio M. & Valdez F. 1994. *bldA*-dependent expression of the *Streptomyces exfoliatus* M11 lipase gene (*lipA*) is mediated by the product of a contiguous gene, *lipR*, encoding a putative transcriptional activator. *J. Bacteriol.* 179:7816-7826.
- 189.- Cruz, H., Pérez C., Wellington E., Castro C. & Servín-González L. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipases family. *Gene* 144:141-142.
- 190.- Feller, G., Thiry M. and Gerday C. 1990. Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Nucleic. Acids Res.* 18:6431-6440.
- 191.- Hatori, K., Adachi H., Matsuzawa K., Yamamoto M., Tsujimoto J., Aoki M., Hattori H. Arai H. and Inoue K. 1996. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 271:33032-33038.
- 192.- Sommer, P., Bormann C. & Götz F. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3553-3560.
- 193.- Wei, Y., Swenson L., Castro C., Derewenda U., Minor W., Arai H., Aoki J., Inoue K., Servín-González L. & Derewenda Z.S. 1998. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure* 6:511-519.
- 194.- Chater, K.F. 1998. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiol.* 144:1465-1478.
- 195.- Chihara-Siomi, M., Yoshikawa K., Oshima-Hirayama N., Yamamoto K., Sogabe Y., Nakatani T., Nishioka T., Oda J. 1992. Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:505-513.



- 196.- Raymer, G., Willard J.M.A. & Schottel J.L. 1990. Cloning, sequencing, and regulation of the expression of an extracellular esterase gene from plant pathogenic *Streptomyces scabies*. J. Bacteriol. 172:7020-7026.
- 197.- Shottel, J.L., Hale V. & Babcock M.J. 1992. Regulation and secretion of an extracellular esterase from *Streptomyces scabies*. Gene 155:27-31.
- 198.- Tesch, C., Nikoleit K., Gnau V., Götz F. & Bormann C. 1996. Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. J. Bacteriol. 178:1858-1865.
- 199.- von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acids Res. 14:4683-4690.