



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL
GEN *lipA* DE LA LIPASA
EXTRACELULAR DE *Streptomyces*
exfoliatus M11

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**ZAHAED EVANGELISTA
MARTINEZ**

Tutor: DR. LUIS SERVIN GONZALEZ



MÉXICO, D. F.

MARZO DE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *lipA* DE LA LIPASA EXTRACELULAR DE *Streptomyces exfoliatus* M11

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Servín González en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de *Streptomyces*, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Laura Rosa Camarena Mejía	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M en C Gabriela González Cerón.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (32558N) y parcialmente por PAEP-UNAM (203318). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (138467).

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente Dra. Carmen Gómez Eichelmann.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal Dra. Laura Camarena Mejía.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal Dr. Sergio Sánchez Esquivel.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal Dra. Gloria Soberón Chávez.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario Dra. Amelia Farrés González-Saravia.	Facultad de Química, UNAM
Suplente Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Angélica

Gracias por todo el apoyo que me brindaste en cada una de las etapas de ésta aventura.

A ti, con todo mi amor.

Liam y Naima

Una sonrisa suya vale más que todo.

Todo mi amor para ustedes.

A mis padres

Gracias por todo su apoyo; su constancia, dedicación y amor, el mejor ejemplo a seguir.

A Bety y Moy

Les agradezco todo el apoyo que me brindaron para lograr el objetivo.

A mis hermanos Elí y Saraí

A mis sobrinos Luis y Stephanie

A toda mi familia

A mis amigos y compañeros de laboratorio

Gabriela González, Julio Alberto Carrasco y Bernardo
Franco

Al Dr. Luis Servín González, gracias por su apoyo y
confianza

ÍNDICE

	PÁGINA
I. Abstract.....	1
II. Resumen.....	2
III. Introducción	
A. Características generales de <i>Streptomyces</i>	3
B. Lipasas de <i>Streptomyces</i>	7
C. Familia LipR/TchG de activadores transcripcionales.....	12
i) Malt.....	15
ii) LuxR.....	18
IV. Planteamiento del problema.....	21
V. Objetivos.....	23
VI. Material y Métodos	
A. Bacterias, plásmidos y procedimientos microbiológicos...	24
B. Mutagénesis y construcción de los plásmidos mutantes en la región promotora de <i>lipA</i>	25
C. Expresión <i>in vivo</i> de la lipasa extracelular.....	29
D. Experimentos de protección contra nucleasa S1.....	31
E. Sobreexpresión de LipR.....	33
F. Purificación de LipR.....	35
G. Renaturalización de LipR.....	36

H. Movilidad Electroforética en geles nativos.....	37
I. Transcripción <i>in vitro</i> (Runoff).....	38
VII. Resultados.....	40
VIII. Discusión de resultados.....	61
IX. Conclusiones.....	67
X. Referencias bibliográficas.....	69
XI. Anexo:	
A. Artículo publicado.	

Zahaed Evangelista-Martínez, Gabriela González-Cerón and Luis Servín-González. 2006. A Conserved Inverted Repeat, the LipR Box, Mediates Transcriptional Activation of the *Streptomyces exfoliatus* Lipase Gene by LipR, a Member of the STAND Class of P-Loop Nucleoside Triphosphatases. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 188:7082-7089.

ABSTRACT

Expression of the *Streptomyces exfoliatus lipA* gene, which encodes an extracellular lipase, depends on LipR, a transcriptional activator that belongs to the STAND class of P-loop NTPases. LipR is closely related to activators present in some antibiotic biosynthesis clusters of actinomycetes, forming the LipR/TchG family of regulators. In this work we show that purified LipR protein is essential for activation of *lipA* transcription *in vitro*, and that this transcription depends on the presence of a conserved inverted repeat, the LipR box, located upstream of the *lipA* promoter. Mutagenesis of the *lipA* promoter region indicates that most transcription depends on LipR binding to the proximal half site of the LipR box in close proximity to the -35 region of the promoter. These experiments also indicate that LipR establishes contacts with the RNA polymerase on both sides of the LipR box, since some activation is observed when only the distal half site is present, or when the entire LipR box is moved further upstream. We also show that the LipR proteins of *S. exfoliatus* and *S. coelicolor* are functionally interchangeable both *in vitro* and *in vivo*, revealing the functional conservation of the regulatory elements in these two species.

RESUMEN

La expresión del gen *lipA* de *Streptomyces exfoliatus*, el cual codifica para una lipasa extracelular, depende del activador transcripcional LipR que pertenece a las proteínas nucleósido trifosfatasa P-loop de la clase STAND. LipR está muy relacionado a los activadores presentes en varios clusters biosintéticos de antibióticos de actinomicetos, los cuales forman la familia LipR/TchG. En el presente trabajo se mostró que la proteína LipR purificada es fundamental para la activación transcripcional de *lipA in vitro*, activación que es dependiente de la presencia de una secuencia invertida repetida conservada, la caja LipR, localizada río arriba del promotor *lipA*. La mutagénesis de la región promotora de *lipA* indicó que la unión de LipR a la repetición proximal de la caja LipR cercana a la región -35 del promotor es fundamental para observar activación transcripcional. Los experimentos también indicaron que LipR establece contacto con la RNA polimerasa en ambos lados de la caja LipR, dado que se observó algo de activación en presencia de la repetición distal o cuando la caja LipR completa se movió más arriba de su posición original. También los resultados muestran que las proteínas LipR de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* son funcionalmente intercambiables *in vitro* e *in vivo*, lo que revela la conservación funcional de los elementos en estas dos especies.

INTRODUCCIÓN

A. Características generales.

El nombre *Streptomyces* deriva del latín "*streptos*" que significa "torcido" o "curvo" y de "*myces*" que significa "hongo", nombre que se le da a un género agrupado dentro del grupo de las actinobacterias, del orden Actinomycetales, familia Streptomycetaceae. Las bacterias pertenecientes a éste género se caracterizan por ser organismos aerobios estrictos, gram positivos, que habitan la mayoría de los ecosistemas del suelo en donde su principal papel es el de ser saprófitos, hidrolizando polímeros como almidón y celulosa mediante la expresión de un gran número de enzimas extracelulares (McCarthy y Williams, 1992); esto hace que las bacterias de éste género sean organismos que juegan un papel central en el reciclamiento del carbono (Bentley *et al*, 2002).

En contraste con otros géneros de bacterias, las bacterias del género *Streptomyces* presentan un ciclo de vida complejo en el cual únicamente el estadio de espora es unigenómico (McVittie, 1974; Leblond *et al*, 1993). El ciclo de vida (Fig. 1) inicia con la germinación de las esporas de la que sobresalen los tubos germinales que se ramifican para formar el micelio vegetativo, el cual invade el sustrato de manera que va incrementando el área en la cual puede degradar la materia orgánica del suelo y tomar de ella los nutrientes necesarios para su crecimiento. Después de una pequeña pausa en el crecimiento, llamada fase de transición (Granozzi *et al*, 1998),

surge el micelio aéreo a partir del micelio vegetativo (Kelemen y Buttner, 1998). Éste se diferencia del micelio vegetativo por presentar una capa externa muy hidrofóbica. El crecimiento de las hifas aéreas y el desarrollo de algunas partes del micelio vegetativo es soportado en parte porque en ésta etapa comienza la muerte celular de parte del micelio vegetativo (Miguelé et al, 1999) cuyos compuestos son aprovechados para la diferenciación celular por un proceso de canibalismo (Chater, 1993). Posteriormente el micelio aéreo se diferencia en cadenas de esporas. Éste proceso va acompañado por una segregación ordenada de los cromosomas dentro de las futuras esporas, cada una conteniendo al final un solo cromosoma (McVittie, 1974). Bajo condiciones favorables son liberadas de las cadenas de esporas y diseminadas comenzando con otro ciclo de vida del organismo.

El complejo ciclo de vida del género se ve reflejado en el gran genoma que presentan, de más de 8 Mpb en comparación a las 4.6 Mpb de *Escherichia coli*, y en comparación del genoma de *Sacharomyces cerevisiae* (13 Mpb). Éstas 8 Mpb de información genética están codificadas en un cromosoma lineal; adicionalmente presentan información genética en algunos plásmidos circulares y lineales. En dicho cromosoma se encuentran tanto genes esenciales como no esenciales, tales como los que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios y exoenzimas hidrolíticas. Los genes esenciales y el origen de replicación del cromosoma (*oriC*), se localizan principalmente en el centro del cromosoma, mientras que los genes

no esenciales se localizan mayoritariamente en las orillas del cromosoma (Bentley *et al*, 2002). Los plásmidos, que varían de 9 Kb (pSNA1 en *S. natalensis*) (Mendes *et al*, 2000) a 350 Kb (pSCP1 en *S. coelicolor*) (Redenbach *et al*, 1998), llevan genes que les confieren fenotipos ventajosos, como por ejemplo para la biosíntesis de antibióticos, degradación de xenobióticos y resistencia a metales pesados (Meinhardt *et al*, 1997). El DNA, tanto del cromosoma como de los plásmidos, tiene un alto contenido de G+C (70 al 74 %). Tanto el cromosoma como algunos plásmidos lineales comparten hacia los extremos, una región llamada Repeticiones Invertidas Terminales (TIR), las cuales llevan unidas, de manera covalente, proteínas que mantienen estable al DNA lineal (Goshi *et al*, 2002).

El genoma del género *Streptomyces* también incluye genes para la síntesis de metabolitos secundarios, que generalmente son sintetizados durante la formación del micelio aéreo o cuando cesa el crecimiento de cultivos que crecen en medios líquidos. Además de los antibióticos, los metabolitos secundarios incluyen sideróforos (coeliquelina), pigmentos (tetrahidroxinaftaleno), lípidos (hopanoides) y otras moléculas como butirolactonas o geosmina, responsables del típico olor a tierra mojada (Bentley *et al*, 2002).

La producción de antibióticos es típica del género, lo que convierte a éstas bacterias en un grupo industrialmente importante debido a que ellas producen aproximadamente el 75 % de los antibióticos comerciales, de los cuales los más usados son la estreptomicina (producida por *S. griseus*),

tetraciclina (producida por *S. rimosus*) y el cloranfenicol (producida por *S. venezuelae*) (Prescott, 1996). Además de que muchas especies de éste género producen diversas enzimas extracelulares industrialmente importantes, como son proteasas, fosfatasas, xilanasas, celulasas, amilasas, lipasas, nucleasas, entre otras.

Ciclo de vida de *Streptomyces*

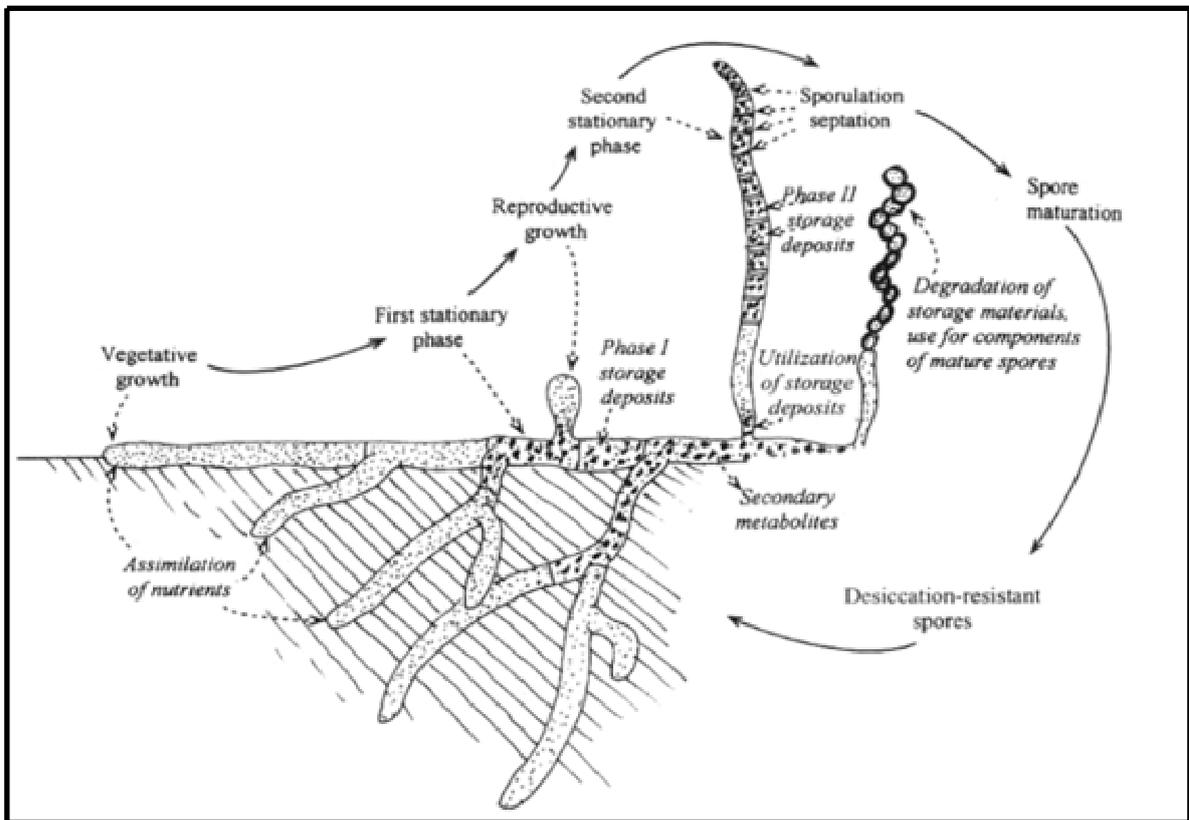


Figura 1. Representación de una colonia de *Streptomyces*, en la que se indican las diferentes etapas fisiológicas de las hifas. Tomado de K.F. Chater (1998).

B. Lipasas de *Streptomyces*.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas [EC 3.1.1.3]) son un grupo importante de enzimas que hidrolizan triacilgliceroles de cadena larga (TAGs), que tienen variadas aplicaciones en la biotecnología. Por ejemplo, en el área de los detergentes se producen más de 1000 toneladas de lipasas cada año. En el área de los alimentos las lipasas son empleadas en la producción de diversos ingredientes adicionados a los alimentos y en el desarrollo de sabores para bebidas, además de emplearse en la industria del papel (Jaeger *et al*, 1999).

Un gran número de lipasas provenientes de bacterias han sido clonadas, tanto de organismos gram positivos como gram negativos. Éstas se agrupan en seis familias, de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos (Jaeger *et al*, 1999). De éstas lipasas, sobresalen las lipasas extracelulares pertenecientes al género *Pseudomonas* (aplicaciones en biotecnología) distribuidas en varias familias; también destacan las pertenecientes al género *Staphylococcus*, porque se piensa que en las especies patógenas tienen influencia en procesos de patogénesis (Rosenstein y Götz, 2000) y las del género *Streptomyces*.

En *Streptomyces* se ha pensado que la importancia de las lipasas extracelulares radica en el hecho de que muchos de los miembros del género almacenan triacilgliceroles (TAGs) como compuestos de reserva y fuente de carbono para la producción de antibióticos (Olukoshi y Packter,

1994). Estos TAGs son acumulados intracelularmente en estructuras membranales durante la fase exponencial de crecimiento (Packter y Olukoshi, 1995), siendo evidente que para que puedan ser utilizados se requieren de enzimas lipolíticas. El hecho de que las lipasas de *Streptomyces* sean extracelulares, no significa que los TAGs acumulados intracelularmente no estén disponibles para ser utilizados, dado que la lisis y canibalismo de una parte del micelio vegetativo es un evento que provee de nutrientes para la diferenciación y la producción de antibióticos (Chater, 1993).

Actualmente se ha descrito la presencia de TAGs en otros géneros de bacterias como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*, géneros que, al igual que *Streptomyces*, están ampliamente distribuidos en ambientes naturales (principalmente en suelos), en donde estos organismos están expuestos a muchas condiciones ambientales fluctuantes. Esto ha ocasionado que desarrollen diversas estrategias para sobrevivir a éstas condiciones, como pueden ser la formación de esporas o la acumulación de compuestos de almacén que posteriormente les sirvan como fuente de carbono y energía durante los periodos drásticos que generalmente predominan en el ambiente (Alvarez y Steinbüchel, 2002).

Nuestro grupo de investigación previamente clonó los genes responsables de la actividad lipolítica de *Streptomyces exfoliatus* M11, *Streptomyces albus* G y *Streptomyces coelicolor*.

El gen *lipA* de *S. exfoliatus*, codifica una lipasa de 30 kDa que presenta el sitio catalítico Gly-X-Ser-X-Gly altamente conservado en todas las lipasas

reportadas, y un péptido señal constituido por los primeros 48 aminoácidos, gracias al cual la enzima se secreta y acumula en el medio de cultivo en grandes cantidades (Pérez *et al*, 1993).

El análisis más detallado de la expresión de la lipasa reveló que su expresión era dependiente de la fase de crecimiento (figura 2), acumulándose una gran cantidad de la enzima en el medio de cultivo una vez que el cultivo entra en la fase estacionaria de crecimiento (48 hrs).

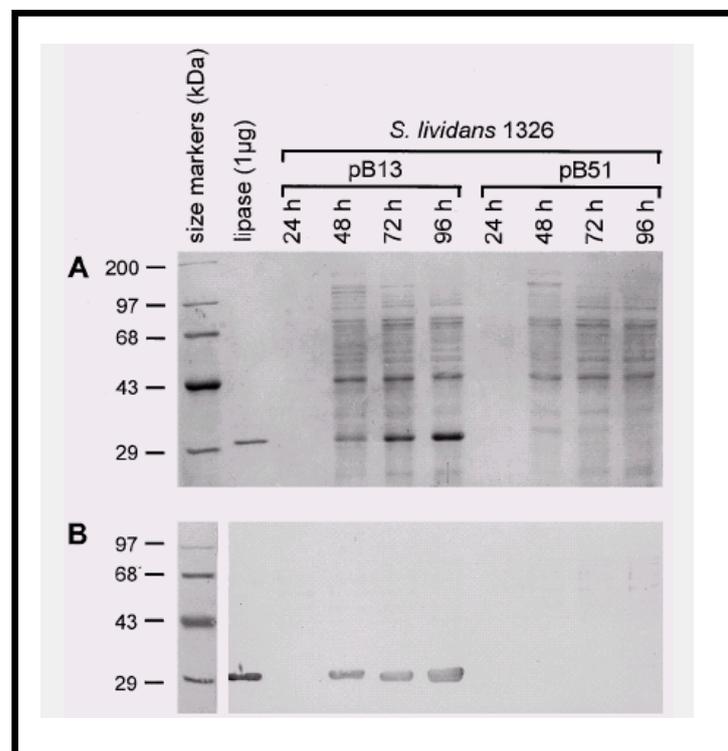


Figura 2. Análisis de las proteínas extracelulares de *S. lividans* transformada con diferentes plásmidos. El plásmido pB13 contiene un inserto de 6.1 Kb que incluye el gen *lipA* con su promotor y el DNA río abajo del gen; pB51 solamente contiene *lipA* y su promotor, sin el DNA río abajo del gen. (A) SDS-PAGE de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo teñidas con Azul de Coomassie brillante R-250. Los tiempos en los que se tomaron las muestras, así como los cultivos de los que provienen se indican arriba de cada carril. (B) Western blot de un gel idéntico al del panel A revelado con anticuerpos policlonales antilipasa de conejo. Tomado de Servín-González *et al* (1997).

El gen *lipA* presenta un promotor con una secuencia similar a la de promotores vegetativos de éste género (Strohl, 1992) y su transcripción está regulada por el producto del gen *lipR*, que codifica una proteína de 934 aminoácidos. Una característica importante que presenta *lipR* es la presencia de un codón TTA, que hace que su traducción sea dependiente del producto del gen *bldA*, que codifica para el tRNA que traduce de manera eficiente dicho codón. Cuando el codón TTA fue sustituido por el codón sinónimo CTC, la expresión de *lipA* se volvió independiente de *bldA*, pero se mantuvo dependiente de la fase de crecimiento (figura 3). Lo anterior sugiere que, como en el caso de algunos activadores transcripcionales de síntesis de antibióticos, la expresión durante el inicio de la fase estacionaria de crecimiento se da en respuesta a señales del desarrollo poco conocidas (Servín-González *et al*, 1997).

En cuanto al gen *lipA* de *S. albus* G, éste codifica una lipasa que es homóloga a la de *S. exfoliatus* (82 % de identidad). Además inmediatamente río abajo del gen *lipA* existe un gen homólogo al gen *lipR* de *S. exfoliatus* (Cruz *et al*, 1994).

En relación al gen *lipA* *S. coelicolor*, codifica para una proteína de 311 aminoácidos, en la cual los primeros 42 corresponden a un péptido señal y el resto de la proteína presenta una elevada identidad con la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* M11 (82 %) y de *S. albus* (85 %). Al igual que para *S. exfoliatus* y *S. albus*, río abajo del gen *lipA* se encuentra el gen *lipR*, que

codifica una proteína de 941 aminoácidos, la cual es 47 % idéntica al producto del gen *lipR* de *S. exfoliatus*. Una diferencia importante de la organización genética de los genes *lipA-lipR* en *S. coelicolor* respecto a *S. exfoliatus* es que, en la primera, los genes están organizados como un operón (Váldez *et al*, 1999) y en la segunda los genes están separados por una región intercistronica de 400 pb que contiene una secuencia invertida repetida repetida capaz de actuar como un terminador transcripcional. En el caso de *S. exfoliatus*, *lipR* se transcribe a partir de un promotor propio (Servín-González, comunicación personal).

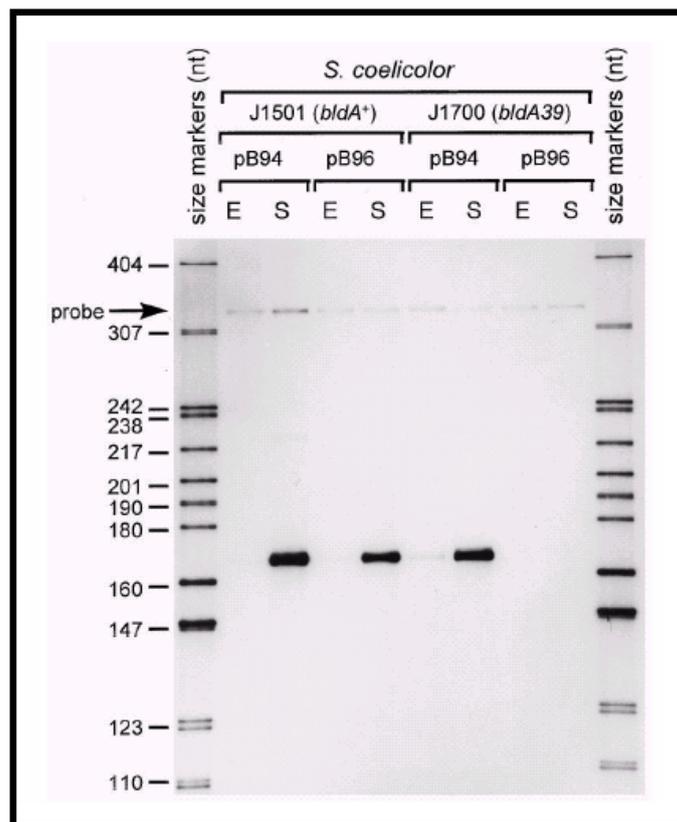


Figura 3. Detección de los mensajeros de *lipA* por mapeo S1 provenientes de *S. coelicolor* J1501 (*bldA*⁺) y J1700 *bldA39* que llevan diferentes plásmidos. Los plásmidos pB94 y pB96 contienen *lipA* y *lipR*, en pB94 el codón TTA en *lipR* fue reemplazado por el codón CTC, mientras que en pB96 se mantiene el codón TTA. El RNA total se purificó durante la fase exponencial (E) o después de la entrada a la fase estacionaria (S). Tomado de Servín-González *et al* (1997)

Por otra parte, estas lipasas presentan una elevada similitud con la lipasa 1 de *Moraxella* sp. TA144 (Feller *et al*, 1990) y la acetilhidrolasa II del factor activador de plaquetas de humano (Wei *et al*, 1998). Recientemente, se reportaron dos hidrolasas, una perteneciente a *Acidovorax delafieldii* y la otra a *Thermobifida fusca*, capaces de degradar poliésteres sintéticos. Estas enzimas presentan altos niveles de similitud a las lipasas de *Streptomyces* (Kleeberg *et al*, 2005; Uchida *et al*, 2002). De acuerdo a la clasificación de Jaeger *et al* (1999) estas lipasas se clasificarían dentro de la familia III de lipasas bacterianas.

Otros genes que codifican para lipasas provenientes de *Streptomyces* han sido clonados; lipasas que difieren de las anteriormente mencionadas incluyen la de *Streptomyces cinnamomeus* relacionada a las lipasas de *Pseudomonas* (Sommer *et al*, 1997), y la de *Streptomyces rimosus* que codifica para una enzima que se ubica en una tercera familia de lipasas no reportada anteriormente para el género (Vujaklija *et al*, 2002).

C. Familia de activadores transcripcionales LipR/ThcG.

Las proteínas de la clase STAND (signal transduction ATPases with numerous domains) se caracterizan básicamente por presentar un dominio N-terminal con actividad de NTPasa (P-loop nucleótido trifosfatasa) y por contener adicionalmente tres o más dominios que pueden ser de unión a DNA, de unión a proteína, repeticiones formadoras de superestructuras y/o

dominios enzimáticos implicados en la transducción de señales; todas estas funciones pueden estar combinadas en un solo polipéptido, siendo la presencia de motivos Walker A y Walker B fuertemente conservados su rasgo característico principal (Leipe *et al*, 2004). Estos motivos unen el residuo de fosfato β y γ , respectivamente, del NTP unido y un cation de Mg^{2+} . El motivo Walker A tiene la secuencia GxxxxGK(T)xxxxx-I/V (x significa cualquier aminoácido) y el motivo Walker B la secuencia R/K-xxxGxxxL-hidrofóbico-hidrofóbico-hidrofóbico-hidrofóbico seguido de un residuo de ácido aspártico (Walker *et al.*, 1982).

Anteriormente, se había propuesto una familia de reguladores bacterianos agrupados en la familia Malt o LAL (De Schrijver y De Mot, 1999; Valdéz *et al*, 1999), cuyos miembros presentan características que agrupan a los activadores LipR de *S. coelicolor* y *S. albus* junto a otros reguladores transcripcionales bacterianos. Éstas características son el gran tamaño de los reguladores (alrededor de 900 aminoácidos), la presencia en la región N-terminal de los motivos Walker A y Walker B y la presencia en la región C-terminal de un dominio de unión a DNA del tipo LuxR (De Schrijver y De Mot, 1999).

Actualmente, las proteínas LipR de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces albus*, están clasificadas como miembros de la clase STAND de proteínas, dentro del clado SWACOS (STAND with adenylyl cyclase or Ser/Thr protein kinase domains), familia LipR/ThcG. Los miembros de esta pequeña familia de proteínas de actinobacterias consiste de un dominio NTPasa N-

terminal y un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH) C-terminal del tipo LuxR. Entre los miembros de esta familia se encuentran NysRI (regulador de los genes biosintéticos de nistatina en *S. avermitilis*), PikD (regulador positivo de la biosíntesis de pikromicina en *S. venezuelae*), GdmRI (probable regulador de los genes de biosíntesis de geldanamicina en *S. hygroscopicus*) y ThcG (Leipe *et al*, 2004; figura 4).

Considerando que anterior a la nueva clasificación de LipR como miembro de la familia LipR/ThcG, solamente se conocían algunos activadores que compartían algunas características con LipR, se analizaron los mecanismos por los cuales algunos de ellos, especialmente MaltI y LuxR, activan la transcripción de los genes sobre los que tienen influencia, a pesar de que éstos no pertenecen a la familia LipR/ThcG.

Las razones por las cuales se tomó en cuenta a MaltI y LuxR como modelos de activación se relacionan al hecho de que comparten algunas características estructurales con los activadores LipR de *Streptomyces*. En el caso de MaltI, presentan homología en el dominio de unión a DNA C-terminal tipo LuxR y presentan los motivos de unión de nucleótido Walker A y B. En el caso de LuxR por la homología en el dominio de unión a DNA y porque los elementos regulatorios de la región promotora del operón *lux* están arreglados de manera similar a los elementos regulatorios presentes en la región promotora del gen *lipA* de *S. coelicolor*, *S. albus* y *S. exfoliatus*.

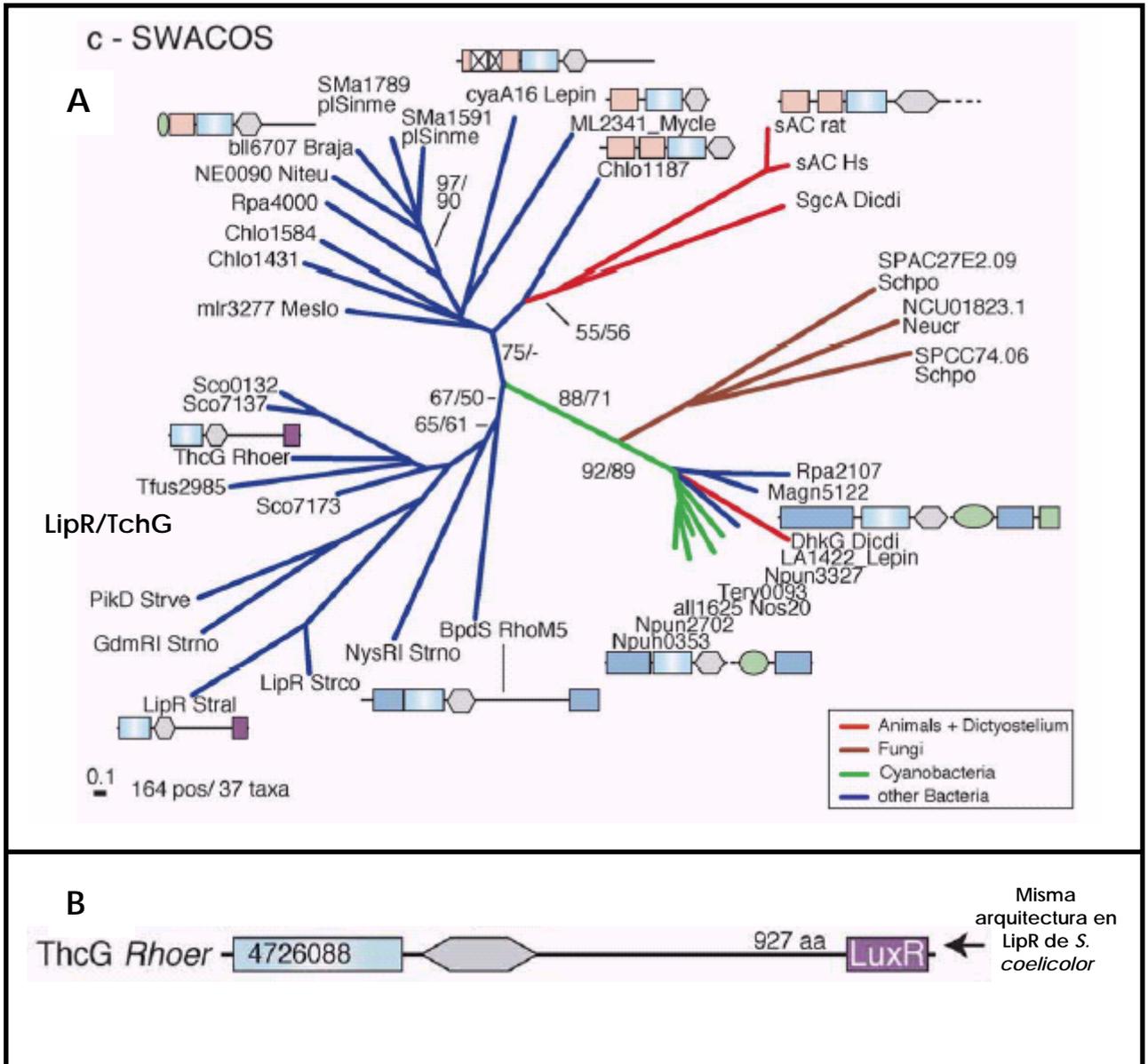


Figura 4. Proteínas reguladoras pertenecientes al clado SWACOS. (A) Árbol filogenético en el que sobresalen tres subdivisiones principales de familias de activadores; familia sAC/Chlo 1187 de proteínas de bacterias-eucariotas, familia de proteínas de ThcG/BpdS de actinobacterias y la gran familia de proteínas DhkG/Npun0353 de cianobacterias. (B) Arreglo estructural de la proteína ThcG homólogo a LipR de *S. albus* y *S. coelicolor*; el rectángulo en azul representa el dominio de ATPasa, el hexágono en gris muestra el dominio HETHS (helical third domain of STAND proteins) y el rectángulo en violeta representa el motivo HTH tipo LuxR. Tomado de Leipe *et al* (2004).

i) Malt

El activador transcripcional Malt de *Escherichia coli* es el regulador central del regulón de utilización de maltosa, que en términos generales

consiste de 10 genes, agrupados en la región *malA* en la que se localiza el operón *malPQ* orientado divergentemente del gen *malT*, la región *malB* en la que se encuentran dos operones organizados divergentemente (*malEFG* y *malKlamB*), y los genes *malS* y *malZ*, localizados en otras regiones del cromosoma (Boos y Suman, 1998).

Malt es una proteína, que al igual que el activador LipR, pertenece a la clase STAND, clado Malt (Leipe *et al*, 2004). El activador consiste de 901 aminoácidos con un peso molecular de 103 kDa (Richet y Raibaud, 1987), que requiere de ATP y maltotriosa para activar la transcripción (Richet y Raibaud, 1989). Su sitio de unión es una secuencia hexanucleótida asimétrica (5'-GGA(G/T)GA-3') localizada a 37.5 o a 38.5 pb río arriba del inicio de la transcripción del promotor, en el que además pueden estar presentes dos cajas adicionales en repetición directa río arriba de la primera caja. Una condición importante para que el promotor sea activado es que la primera caja debe estar orientada 5' a 3' en la dirección de la transcripción (Boos y Suman, 1998; Danot y Raibaud, 1993). Adicionalmente, algunos de los operones del sistema están controlados por represión catabólica, siendo transcritos solamente en presencia de un complejo formado por AMPc y CRP, formando una estructura nucleoproteica compleja que está implicada en activar la transcripción de los promotores divergentes del regulón de maltosa (Raibaud *et al*, 1989), en la que CRP tiene la función de reposicionar a Malt a sus cajas (Richet y Sogaard-Andersen, 1994; Richet *et al*, 1991). Sin embargo, en aquellos promotores que dependen exclusivamente de Malt

para transcribirse, MalT se ensambla en una estructura homo-oligomérica que está influenciada por los sitios de unión de MalT presentes en el promotor (Larquet *et al*, 2004).

Estructuralmente MalT está formada por módulos complejos (figura 5); hacia la región N-terminal está presente el dominio STAND ATPasa que contiene los motivos Walker A y Walker B, seguido de un dominio HETHS (helical third domain of STAND proteins), cercano a péptidos superhelicoidales repetidos (SUPR; superhelical peptide repeats) y muy cercano a la región C-terminal, el dominio de unión a DNA (Leipe *et al*, 2004; De Schrijver y De Mot, 1999), dominio que por cierto presenta las mismas propiedades que el activador MalT completo al unirse *in vivo* e *in vitro* (Vidal-Ingigliardi *et al*, 1993). Estos módulos se encargan de recibir e integrar múltiples señales regulatorias que incluyen maltotriosa como inductor (Raibaud y Richet, 1987) y de captar señales regulatorias de proteínas que actúan como efectores alostéricos negativos como la cistationasa MalY (Schlegel *et al*, 2002), Aes que compite con la maltotriosa (Joly *et al*, 2002) y el transportador de maltosa MalK (Joly *et al*, 2004).

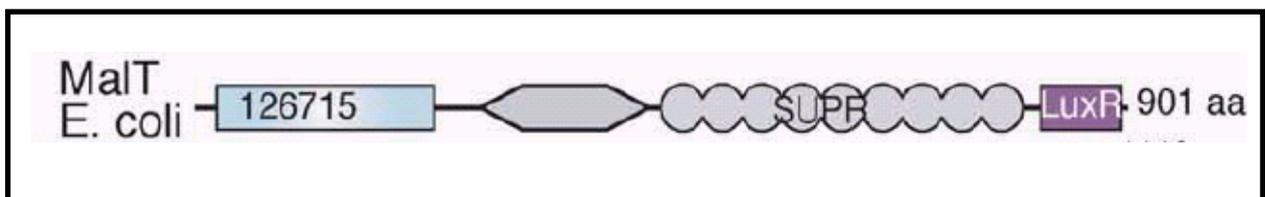


Figura 5. Arreglo estructural del activador MalT de *Escherichia coli*; el rectángulo en azul representa el dominio de ATPasa, el hexágono en gris muestra el dominio HETHS (helical third domain of STAND proteins), SUPR corresponde a péptidos superhelicoidales repetidos y el rectángulo en violeta representa el motivo HTH tipo LuxR. Tomado de Leipe *et al* (2004).

ii) LuxR

El modelo de regulación genética mejor estudiado que depende de la densidad celular "quorum sensing" mediado por acil-homoserina lactona, es la activación por LuxR del operón de luminiscencia de *Vibrio fischeri*. Los genes de luminiscencia están organizados en dos unidades que se transcriben de manera divergente, una de las cuales contiene el gen *luxR*, y la otra unidad es un operón formado por los genes *luxICDABEG*, operón que es activado por LuxR en presencia del inductor 3-oxo-N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanil)hexanamida, comúnmente conocido como N-3-(oxohexanoil)homoserina lactona (Fuqua *et al*, 1994).

LuxR es un polipéptido de 250 aminoácidos que consiste de dos dominios, hacia la región C-terminal se localiza un dominio de unión a DNA que se une a la región regulatoria del operón *lux* y hacia la región N-terminal se encuentra el dominio de unión del inductor, dominio que modula la actividad del dominio C-terminal (Hanzelka y Greenberg, 1995; Choi y Greenberg, 1991).

La activación del operón *lux* depende de la unión de LuxR a una secuencia invertida repetida de 20 pb (la caja *lux*) localizada en la región promotora de *luxI* centrada a -42.5 pb a partir del inicio transcripcional. La presencia de ambas repeticiones es requerida para activar la transcripción, además de que la localización de la caja *lux* centrada a -42.5 es crítica para la activación del promotor, por lo que seguramente LuxR contacta

directamente a la RNA polimerasa (RNAP) a ambos lados de la caja *lux* (England y Greenberg, 1999). Esto sugirió que LuxR actúa como un activador ambidiestro (figura 6).

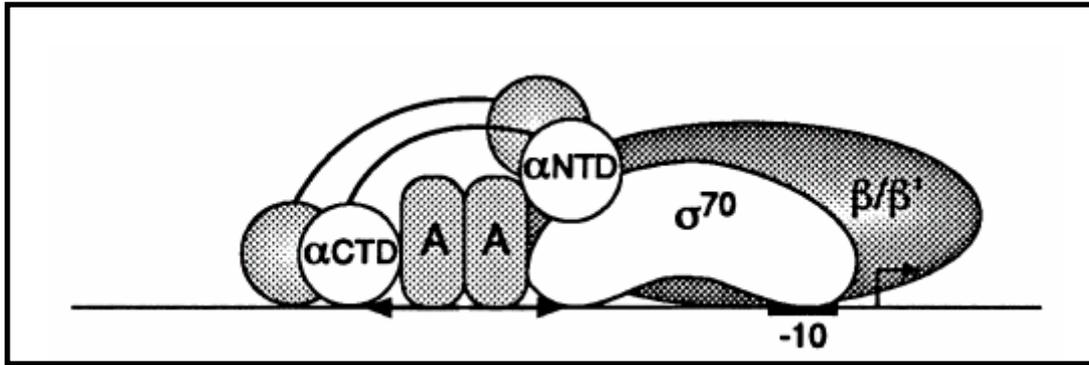


Figura 6. Esquema de un activador ambidiestro que requiere tener contacto con la región C-terminal de la subunidad alfa de la RNAP y otros contactos río abajo del sitio de unión del activador (A). Tomado de Rhodius y Busby (1998).

La evidencia que confirmó la interacción de LuxR con la RNAP en ambos lados de la caja *lux* se obtuvo en primer lugar estudiando la participación de la subunidad alfa de la RNAP en la transcripción y en segundo lugar determinando la región de la subunidad sigma que establece contacto con LuxR. En lo que respecta a la subunidad alfa, esta evidencia se obtuvo mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* empleando formas truncadas de la subunidad alfa, en particular formas que carecen de la región C-terminal de dicha subunidad, demostrando que la activación de la transcripción por LuxR requiere que interaccione con la región C-terminal de la subunidad alfa, permitiendo el reclutamiento de la RNAP al promotor *luxI* (Stevens *et al*, 1999). Mutaciones puntuales en la región C-terminal de la subunidad alfa permitieron identificar dos determinantes en la subunidad,

cruciales para la activación del operón, una de las cuales es importante en el reconocimiento del DNA y la otra para interactuar con LuxR (Finney *et al*, 2002).

En relación a la interacción con la subunidad sigma de la RNAP, la evidencia se obtuvo al realizar experimentos *in vitro* empleando una variante del factor sigma de *E. coli*, que está truncada en su región C-terminal careciendo por tanto de la región 4. Estos resultados determinaron que esta región es esencial para la activación del operón; asimismo, subsecuentes sustituciones en la región 4.2 de sigma permitieron identificar residuos de aminoácidos importantes para el mecanismo de activación por LuxR (Johnson *et al*, 2003).

Un dato importante es que todos los estudios *in vitro* y algunos *in vivo* realizados previamente habían utilizado una forma trunca de LuxR, es decir, empleando el fragmento C-terminal del activador debido a la dificultad de purificar la forma completa de la proteína. Recientemente, se reportó la purificación del activador completo; experimentos *in vitro* llevados a cabo con la proteína completa permitieron determinar que LuxR se une a la misma región de DNA a la que se une la forma trunca del activador, aunque a menores concentraciones, siendo capaz de estabilizar la unión de la RNA polimerasa al promotor *luxI* y estimular la transcripción del promotor (Urbanowski *et al*, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación mostraron que la transcripción del gen *lipA* de la lipasa extracelular de *S. exfoliatus* se lleva a cabo a partir de un único promotor, precedido por una secuencia invertida repetida (Pérez *et al*, 1993) y que la transcripción es completamente dependiente del producto del gen *lipR*, que codifica para un activador transcripcional (Servín-González *et al*, 1997). El presente estudio está enfocado a determinar si la secuencia invertida repetida funciona como el sitio de unión de LipR, tomando en cuenta que la organización de los elementos regulatorios importantes se encuentran conservados en las regiones promotoras no sólo del gen *lipA* de *S. exfoliatus*, sino también en las regiones promotoras *lipA* de *S. coelicolor* y *S. albus* (Figura 7).

Adicionalmente, se pretende contribuir a entender el mecanismo molecular por el que se lleva a cabo la activación del gen *lipA* por parte del activador LipR.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la secuencia invertida repetida en el promotor de *lipA* constituye el sitio de unión del activador LipR, así como las características de esta unión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar *in vivo* la importancia de los elementos invertidos en la expresión de *lipA*.
- Determinar *in vitro* si LipR se une específicamente a la secuencia invertida repetida.
- Determinar *in vitro* si LipR requiere únicamente de la secuencia invertida repetida para transcribir a *lipA*.
- Analizar *in vitro* e *in vivo* si los activadores LipR de *S. coelicolor* y *S. exfoliatus* son funcionalmente intercambiables.

METODOS.

A. Bacterias, plásmidos y procedimientos microbiológicos.

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente estudio fueron JM101, XL1-Blue y BL21(DE3)Roseta 2 (Novagen). El crecimiento y transformación con DNA de plásmido de éstas cepas se realizó bajo procedimientos estándar, utilizando los medios de cultivo Luria-Bertani y YT2X (Sambrook et al, 2001). Cuando se requirió se añadió carbenicilina a una concentración final de 200 µg/ml, kanamicina a 60 µg/ml y cloranfenicol a 50 µg/ml. Para transformar dichas cepas de *E. coli* con los plásmidos, se empleó el método descrito por Inoue et al (1990).

La cepa silvestre de *Streptomyces lividans* 66 (1326) proporcionada por el Centro John Innes se empleó a lo largo del presente estudio. La transformación de *Streptomyces* con DNA de plásmido se realizó de acuerdo al método de Kieser *et al* (2000), excepto que la regeneración de los protoplastos se llevó a cabo cubriéndolos con una capa de agar suave hipertónico (Matsushima y Maltz, 1986). Los medios y condiciones de crecimiento de las cepas de *Streptomyces* se describen en Kieser *et al* (2000). Cuando se requirió se añadió tioestreptón a los medios a una concentración de 50 µg/ml para la selección de los plásmidos en medio sólido y a una concentración de 20 µg/ml para mantener los plásmidos en medio líquido. Los plásmidos empleados en el presente estudio se muestran en la Tabla 1.

B. Mutagénesis y construcción de los plásmidos mutantes de la región promotora de *lipA*.

La mutagénesis realizada en la región promotora del gen *lipA* se realizó mediante el procedimiento que a continuación se describe, empleando el plásmido pB92 como molde.

Los oligonucleótidos mutagénicos enlistados en la tabla 2 fueron empleados como iniciadores para generar las diferentes construcciones mutantes, siguiendo el método descrito para el kit "Quik-Change Site-Directed Mutagénesis" (Stratagene), empleando la enzima DNA polimerasa Pfu Turbo.

Para obtener los plásmidos mutantes con las deleciones de los elementos de la región promotora de *lipA* (pBZ619, pBZ621 y pBZ623), se diseñaron oligonucleótidos que introducen el sitio de restricción XbaI en diferentes lugares del promotor, y se obtuvieron los fragmentos XbaI-BstXI, para clonarlos en el plásmido pB94 digerido con las mismas enzimas, de manera que se elimina el DNA río arriba del nuevo sitio XbaI introducido.

Para obtener los plásmidos que contienen las inserciones de 5 pb (pBZ687), 10 (pBZ688) y 11 (pBZ667) entre la región promotora -35 y la secuencia invertida repetida, así como reemplazar la repetición invertida repetida proximal al -35 (pBZ662), la estrategia fue similar a la descrita anteriormente, empleando el plásmido pB92 como molde y los oligonucleótidos mencionados en la Tabla 2, transfiriendo los fragmentos

mutantes al plásmido pB94. El plásmido pBZ663, que contiene una inserción de 5 pb entre las dos repeticiones de la secuencia invertida repetida, se construyó igual que los anteriores, excepto que el plásmido pBZ619 fue usado como molde y el fragmento mutante se transfirió como HindIII-BstXI a pB94 digerido con las mismas enzimas.

Tabla 1. Plásmidos construidos y empleados en el presente estudio.

Plásmido	Descripción y secuencia	Referencia
pB13	Clona original que lleva los genes <i>lipA</i> y <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i> en pIJ486	Pérez <i>et al</i> , 1993
pB48	Vector de clonación derivado de pJV1, Hyg ^R	Kieser <i>et al</i> , 2000
pB92	Fragmento HindIII-NcoI proveniente de pB13 clonado en pUCBM21 (Boehringer). Lleva <i>lipA</i> y la mitad N-terminal de <i>lipR</i>	Este trabajo
pB94	Derivado de pIJ486 que lleva los genes <i>lipA</i> y <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i>	Servín-González <i>et al</i> , 1997
pB99	pIJ6021 que lleva <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i> modificado por introducir un sitio NdeI en el codon de inicio	Servín-González <i>et al</i> , 1997
pB100	Gen <i>lipA</i> de <i>S. exfoliaus</i> y su región promotora clonado en el vector Hyg ^R pJV1	Servín-González <i>et al</i> , 1997
pB150	pIJ6021 que contiene el gen <i>lipR</i> de <i>S. coelicolor</i> modificado por introducción del sitio NdeI en el codón de inicio	Este trabajo
pB151	Gen <i>lipA</i> de <i>S. coelicolor</i> y su región promotora clonado en el vector Hyg ^R pJV1	Este trabajo
pBZ606	Gen <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i> de pB99 clonado en el vector de expresión pET28a (Novagen)	Este trabajo
PBZ608	Fragmento C-terminal de <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i> clonado en el vector pIJ6021	Este trabajo
pBZ619	Derivado de pB94 con delección de DNA río arriba de -83. Contiene la secuencia invertida repetida de la región promotora de <i>lipA</i>	Este trabajo
pBZ621	Derivado de pB94 con delección de DNA río arriba de -52. Contiene sólo la repetición proximal de la secuencia invertida repetida de la región promotora de <i>lipA</i>	Este trabajo
pBZ623	Derivado de pB94 con delección de DNA río arriba de la región -35. Carece de la secuencia repetida de la región promotora de <i>lipA</i>	Este trabajo
pBZ662	Derivado de pB94 en el cual la secuencia de la repetición proximal ha sido modificada	Este trabajo
pBZ663	Derivado de pBZ619 con inserción de 5 pb entre ambas repeticiones de la secuencia repetida	Este trabajo
pBZ667	Derivado de pB94 con inserción de 11 pb entre la región -35 del promotor <i>lipA</i> y la secuencia repetida	Este trabajo
pBZ670	Gen <i>lipR</i> de <i>S. coelicolor</i> de pB150 clonado en el vector de expresión pET28a (Novagen)	Este trabajo
pBZ687	Derivado de pB94 con inserción de 5 pb entre la región -35 del promotor <i>lipA</i> y la secuencia repetida	Este trabajo
pBZ688	Derivado de pB94 con inserción de 10 pb entre la región -35 del promotor <i>lipA</i> y la secuencia repetida	Este trabajo
pIJ6021	Derivado de pIJ101, vector de expresión Kan ^R que contiene el promotor inducible de <i>tipA</i>	Takano <i>et al</i> , 1995
pQE-8CTLipR	Fragmento C-terminal de <i>lipR</i> de <i>S. exfoliatus</i> clonado en el vector de expresión pQE-8 (Qiagen)	

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en el estudio. ^a Las bases subrayadas indican las bases mutadas en comparación a la secuencia silvestre. ^b Las bases en paréntesis indican las bases insertadas en la secuencia silvestre.

Oligonucleótido	Descripción y secuencia	Referencia
DUA1050PLIPA	CCGGTCCGCTGAGGAT <u>CTAGAT</u> CCCTTTTCGGCG. Usado para la construcción de pBZ619 ^a	Este trabajo
DUB2050PLIPA	CGCCGAAAGGGAT <u>CTAGAT</u> TCCTCAGCGGACCGG. Usado para la construcción de pBZ619	Este trabajo
DPDA1090PLIPA	CGCCGGTCCGTC <u>TAGAC</u> CGGTGATACCGC. Usado para la construcción de pBZ621	Este trabajo
DPDB2090PLIPA	GCGGTATCACCGGTCT <u>AGAC</u> GGACCGGCG. Usado para la construcción de pBZ621	Este trabajo
DP1A137PLIPA	GACCGGTGATACT <u>CTAGAT</u> GCGCGTCCACGGG. Usado para la construcción de pBZ623	Este trabajo
DP2B137PLIPA	CCCGTGGACGCGCATCT <u>AGAGT</u> ATCACCGGTC. Usado para la construcción de pBZ623	Este trabajo
MUTREPEDER1	CCGGTCCGTCAAGGAATTC <u>CGTACTCTAGAT</u> GCG. Usado para la construcción de pBZ662	Este trabajo
MUTREPEDER2	CGCATCTAGAGTAC <u>GGAATTC</u> CTTGACGGACCGG. Usado para la construcción de pBZ662	Este trabajo
INSER5BLIP1	GGTATCGCCGGT(CATAT)CGTCAAGACCGGTGATAC. Usado para la construcción de pBZ663 ^b	Este trabajo
INSER5BLIP2	GTATCACCGGTCTTGACG(ATATC)GACCGGCGATACC. Usado para la construcción de pBZ663	Este trabajo
INS5PBRI35A	GGTGATACCGCCGA(TATCC)TGCGCGTCCACGGG. Usado para la construcción de pBZ687	Este trabajo
INS5PBRI35B	CCCGTGGACGCGCA(GGATA)TCGGCGGTATCACC. Usado para la construcción de pBZ687	Este trabajo
INS10PBRI35A	GGTGATACCGCCGA(ACGATATCCT)TGCGCGTCCACGGG. Usado para la construcción de pBZ688	Este trabajo
INS10PBRI35B	CCCGTGGACGCGCA(AGGATATCGT)TCGGCGGTATCACC. Usado para la construcción de pBZ688	Este trabajo
INS11pbPLIPA1a	CGGTGATACCGCCGA(ATCGATATCCT)TGCGCGTCCACGGGC. Usado para la construcción de pBZ667	Este trabajo
INS11pbPLIPA2b	GCCCGTGGACGCGCA(AGGATATCGAT)TCGGCGGTATCACCG. Usado para la construcción de pBZ667	Este trabajo
PCRS1PLIPSE	GGTCAAGGGCGCGCTGC	Este trabajo
PCRS1PLIPA2SE	CCCGTCAGCGTACGGGGG	Este trabajo
LIPAP1EX	TCAAGGGCGCGCTGC	Este trabajo
LIPAP2EX	TCGGCGGTCCGCACT	Este trabajo

Todas las mutaciones generadas fueron verificadas determinando su secuencia nucleotídica. En la figura 8 se muestra el procedimiento de mutagénesis y clonación para la construcción del plásmido pBZ619; el

procedimiento para construir el resto de los plásmidos mutantes fue similar al que se muestra.

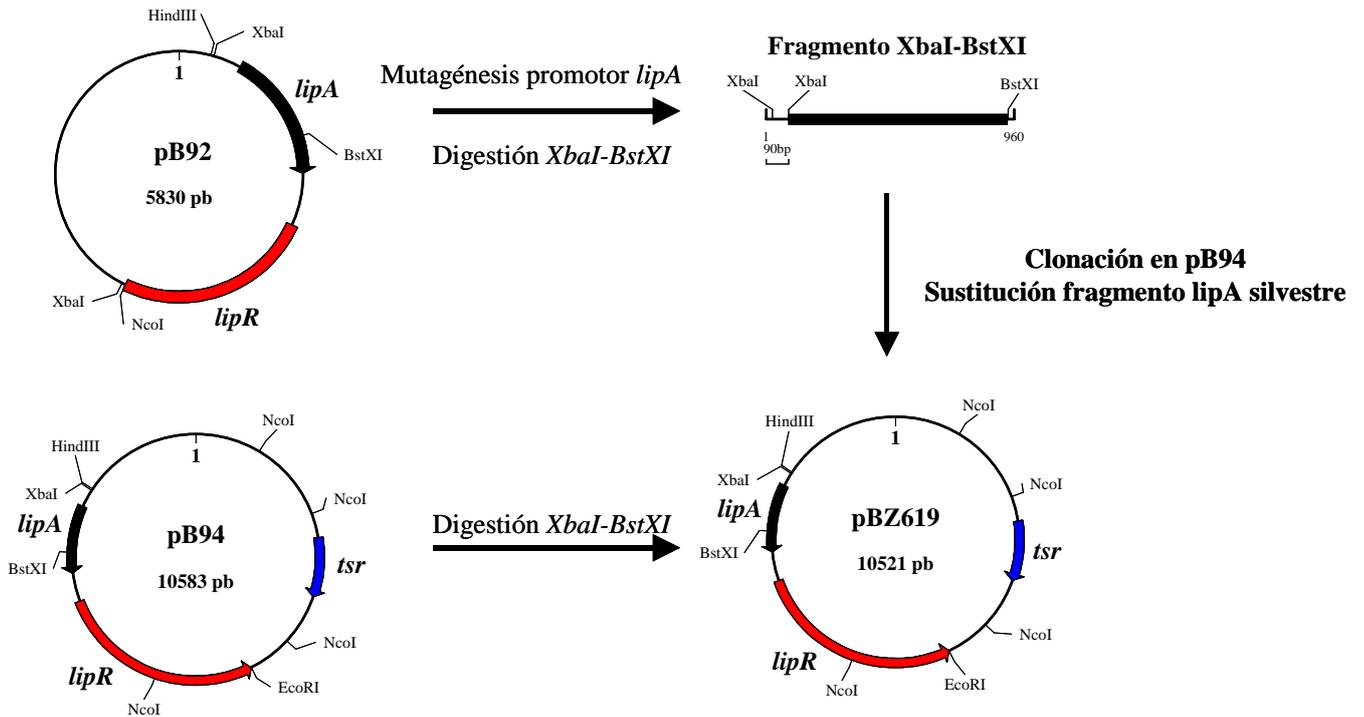


Figura 8. Procedimiento de mutagénesis y clonación para construir los plásmidos mutantes. La mutagénesis en la región promotora de *lipA* se realizó en el plásmido pB92; una vez obtenida la mutación, el fragmento XbaI-BstXI se sustituyó por el mismo fragmento en el plásmido pB94.

C. Determinación de los niveles de expresión del gen de la lipasa extracelular.

Para determinar los niveles de expresión del gen de la lipasa mediante la medición de la actividad enzimática, los plásmidos mutantes se transformaron en *Streptomyces lividans* 66 (cepa 1326) como se describió previamente; cada una de las cepas obtenidas se cultivaron en el medio Luria-Bertani suplementado con sacarosa al 34 % y antiespumante A (Sigma) a 50 ppm, a 29 °C en matraces de 250 ml que contenían un resorte de acero inoxidable dentro de ellos (evita la formación de agregados de micelio favoreciendo que los cultivos sean homogéneos) y agitados a 250 rpm en un agitador orbital. El antibiótico tioestreptón se añadió a una concentración de 20 µg/ml para seleccionar la presencia de los plásmidos en los cultivos.

Para cada matraz las esporas fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril e inoculadas a una D.O. inicial de 0.1 a 450 nm. El crecimiento de los cultivos fue monitoreado siguiendo la D.O. a 450 nm. Para determinar la actividad enzimática de lipasa de cada cultivo, se tomaron muestras de 1 ml de cada uno de ellos a diferentes tiempos (0 a 96 horas). Dichas muestras se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga y el sobrenadante fue cuidadosamente transferido a un tubo limpio almacenándolo a 4° C hasta que la actividad fuera determinada.

La actividad de lipasa se determinó colorimétricamente empleando p-nitrofenil laurato como sustrato de la reacción como se describe en Pérez et

al (1993), considerando que una unidad de lipasa está definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, con un coeficiente de extinción del sustrato de 14,775 (Quinn et al, 1982).

D. Experimentos de protección contra nucleasa S1.

La sonda de 309 pb empleada para realizar los experimentos de protección contra la nucleasa S1 se obtuvo mediante amplificación por PCR con la DNA polimerasa Taq Platinum (Invitrogen) y los oligonucleótidos PCRS1PLIPSE y PCRS1PLIP2SE. El oligonucleótido PCRS1PLIP2SE se marcó con [γ - 32 P]ATP usando la polinucleótido cinasa de T4 (Invitrogen), obteniendo un producto de PCR marcado únicamente en un extremo, el cual fue purificado por gel de agarosa de bajo punto de fusión. Las condiciones para realizar el PCR fueron las siguientes: 95 °C, 2 minutos; 55 °C, 45 segundos; 68 °C, 1 minuto.

Para cada experimento de protección contra nucleasa S1, se hibridaron 10^5 c.p.m Cerenkov de la sonda con 50 μ g de RNA total obtenido y purificado por procedimientos estándares (Kieser *et al*, 2000) en 20 μ l de buffer de tricloroacetato de sodio (Murray, 1986) por 5 hr. a 45° C posteriormente a una breve desnaturalización a 65° C por 10 minutos. La digestión con la nucleasa S1 se llevó a cabo a 37 °C por 45 minutos. El procesamiento de las muestras y las condiciones de la electroforesis de los fragmentos protegidos en gel desnaturalizante de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 29:1), se realizó como se describe en Servín-González *et al* (1994). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos del plásmido pBR322 digeridos con HpaI, marcados

radiactivamente. El tamaño esperado para los fragmentos correspondientes a los transcritos de *lipA* es de 177 nucleótidos.

E. Sobreexpresión de LipR.

Para sobreexpresar los activadores transcripcionales LipR de *S. exfoliatus* y de *S. coelicolor*, ambos genes *lipR* fueron clonados en el plásmido de sobreexpresión pET28-a (Novagen), con los sitios de restricción NdeI-EcoRI generando los plásmidos pBZ606 y pBZ670 respectivamente. La cepa de *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2, transformada con los plásmidos mencionados anteriormente, se creció por 18 horas en medio LB suplementado con 60 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de cloranfenicol. Con 2 ml de este cultivo se inocularon 250 ml del mismo medio. Una vez que la DO_{600 nm} llegó a 0.6, se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM para inducir la síntesis de LipR; después de 4 horas de inducción las células se colectaron y se resuspendieron en 20 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.4 M, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM), lisándolas por presión en prensa de French. El extracto celular obtenido se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos/4 °C, y el pellet, que contiene los cuerpos de inclusión (IBs), se resuspendió en buffer de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, Urea 2 M, EDTA 2 mM y Tritón X-100 al 0.1%); posteriormente esta solución se centrifugó con las condiciones anteriormente mencionadas, repitiendo este proceso de lavado dos veces. Los IBs obtenidos que contenían la proteína LipR se lavaron un par de veces con el buffer anterior pero sin contener urea y se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización.

La solubilización de la proteína LipR se realizó en condiciones desnaturizantes en el buffer A (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM y urea 6 M pH 8.0). Una vez solubilizada la proteína, esta solución se clarificó mediante centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos a 4 °C y se retuvo el sobrenadante que contenía aproximadamente un 85-90% de la proteína recombinante LipR.

F. Purificación de LipR por cromatografía de afinidad y de intercambio catiónico.

La proteína recombinante desnaturalizada se purificó por cromatografía de afinidad usando la columna para FPLC Hi-Trap Chelating (Amersham) cargada con Ni⁺ y equilibrada en el buffer A, realizando eluciones paso a paso con un gradiente de imidazol de 40 a 500 mM. El activador LipR purificado se dializó contra el buffer B (NaH₂PO₄ 50 mM pH 7.0, Urea 6 M y NaCl 10 mM). Aproximadamente 2 mg de la proteína se utilizaron para realizar una segunda cromatografía en una columna para FPLC de intercambio catiónico Hi-Trap SP (Amersham), equilibrada en el buffer B. La proteína se eluyó paso a paso en un gradiente de NaCl de 0.1M a 1 M.

Los procedimientos anteriormente descritos fueron también realizados para purificar el activador LipR de *S. coelicolor*.

G. Renaturalización de LipR.

La renaturalización de los activadores transcripcionales se realizó considerando las sugerencias de De Bernardez Clark (1998). La proteína obtenida de la cromatografía de intercambio catiónico se diluyó a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ con el buffer B anteriormente mencionado, removiendo la urea mediante diálisis contra el buffer de renaturalización (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 5 mM, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM y glicerol 5 %), paso a paso disminuyendo la concentración de urea de 6 M a 0 M a intervalos de 0.5 M, a una temperatura de 4° C durante 2 horas entre cada cambio del buffer de renaturalización. Posteriormente la solución que contiene la proteína renaturalizada se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 μm para remover las formas agregadas de la misma. Esta solución se concentró por centrifugación utilizando concentradores Centriprep 10 (Amicon). Finalmente, la proteína concentrada fue dializada en buffer de almacenamiento (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 5 mM, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM y glicerol 50 %) y preservada a -20 °C.

H. Experimentos de retardo de la movilidad electroforética en geles nativos de poliacrilamida.

Los experimentos de retardo de corrimiento en gel se realizaron utilizando el fragmento de DNA de 309 pb empleado para el mapeo por nucleasa S1 descrito anteriormente, el fragmento de 526 pb de la región promotora del gen *lipA* de *S. coelicolor* (Valdéz et al, 1999) o una sonda de 140 pb que va de la posición -133 a la posición +7 relativa al sitio de inicio de la transcripción del gen *lipA* de *S. exfoliatus*. Para detectar la unión del fragmento de DNA con el activador transcripcional, se preparó una reacción de 20 µl que contenía 1000 c.p.m Cerenkov del fragmento de DNA marcado, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 1 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, 1 µg de poli(dI-dC) y glicerol al 5 %. La proteína se añadió a diferentes concentraciones y la mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente; los complejos formados se resolvieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5 % (acrilamida:bisacrilamida, 29:1), en el buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y glicina 190 mM) por 2 horas a 100 V. Los geles para la sonda pequeña se corrieron en una cámara de electroforesis Hoefer Mighty Small II, mientras que los geles para las sondas de tamaño mayor se corrieron en una cámara Hoefer Sturdier SE400. Después de la electroforesis los geles fueron secados y sujetos a autoradiografía para su posterior análisis.

I. Transcripción *in vitro* (Runoff).

Para los experimentos de transcripción *in vitro* se utilizó la holoenzima RNA polimerasa de *S. coelicolor* M145 facilitada por el Dr. Mark Buttner del Centro John Innes.

Las reacciones de transcripción se realizaron de acuerdo al protocolo de Kieser *et al* (2000), que consistieron en preparar una mezcla de reacción que contenía 7 μ l de agua, 25 μ l de buffer de reacción [115 μ l de Master mix 2X (Master mix: 1.21 gr. Tris base, 9.3 mg Na₂EDTA, 487.2 gr. MgCl₂.6H₂O, ajustado a 35 ml con ddH₂O estéril, ajustar pH a 7.9 con HCl y añadir fosfato de potasio 4mM pH 7.5, ajustar a pH 7.9 y agregar ddH₂O hasta 70 ml), 6 μ l de BSA (libre de RNasa, 50 mg/ml), 6 μ l DTT 100 mM, 2 μ l EDTA 100 mM, 80 μ l de glicerol estéril y 41 μ l ddH₂O; volumen para 10 reacciones] y 5 μ l de fragmento de DNA a una concentración aproximada de 0.1 μ g/ μ l. La mezcla se incubó a 30° C por 5 min antes de añadir 1 μ l de RNA polimerasa (aproximadamente 0.1 unidades) y se incubó a 30° C por 5 min; enseguida se añadieron 1 μ l (=10 μ Ci) de [α ³²P]CTP y 1 μ l de una mezcla de ribonucleósidos trifosfatos (rATP, rGTP y rUTP, 30 mg/ml c/u); la reacción se incubó a 30° C por 2 min e inmediatamente después se le añadió 1 μ l de heparina (5 mg/ml), se mezcló y se incubó a 30° C por 5 min. Después de este tiempo se le añadieron a la reacción 2 μ l de CTP (15 mg/ml), se mezcló y se mantuvo la reacción a 30° C por 10 min, deteniendo la reacción con 10 μ l de solución de precipitación (10 μ l de tRNA 10 mg/ml, 53 μ l acetato de

sodio 4M pH 4.0 y 17 μ l de agua) y 60 μ l de isopropanol. Después de precipitar en hielo al menos 10 minutos, la reacción se centrifugó a 13000 rpm. El precipitado se resuspendió en 180 μ l de agua, y se volvió a precipitar con 20 μ l de acetato de sodio 3 M pH 6.0 y 200 μ l de isopropanol. El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 80% y se disolvió en 10 μ l de buffer de corrida (formamida 80%, EDTA 1mM, xilen cianol al 0.1% (p/v), y azul de bromofenol al 0.1% (p/v)). Los transcritos obtenidos de las reacciones se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% desnaturizante, empleando un marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen) marcado con 32 P.

Cuando se requirió los fragmentos utilizados como moldes se incubaron con el activador LipR antes de agregar la RNA polimerasa.

RESULTADOS

EL DOMINIO DE UNIÓN A DNA DE LipR ES INCAPAZ DE ACTIVAR EL GEN *lipA*

Tomando en cuenta la evidencia experimental reportada para MaltI y LuxR previamente mencionada, la primera estrategia empleada para determinar si el elemento invertido repetido cercano a la región -35 del promotor de *lipA* era el sitio de unión del activador LipR, consistió en sobreexpresar y purificar un polipéptido de 103 aminoácidos que corresponde al fragmento C-terminal de LipR. Este fragmento contiene el dominio de unión a DNA, y mediante experimentos *in vitro* (retardo de corrimiento en gel y protección contra la Dnasa I) e *in vivo* se intentó determinar si el elemento invertido es el sitio específico de unión del activador.

Para los experimentos *in vitro* se clonó el fragmento C-terminal de *lipR* de *S. exfoliatus* en el vector de expresión pQE-8 (Qiagen), obteniendo el plásmido pQE8CTLipR y se introdujo en células de *Escherichia coli* BL21 para sobreexpresarse. La proteína 6XHis-CTLipR se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones nativas; el perfil de expresión se muestra en la figura 9.

Una vez purificada la proteína, se realizaron experimentos de retardo de corrimiento en gel incubando diferentes concentraciones de la proteína con un fragmento de 140 pb de la región promotora de *lipA* (figura 10). Los

resultados muestran que la proteína era capaz de unirse al DNA de la región promotora de *lipA*.

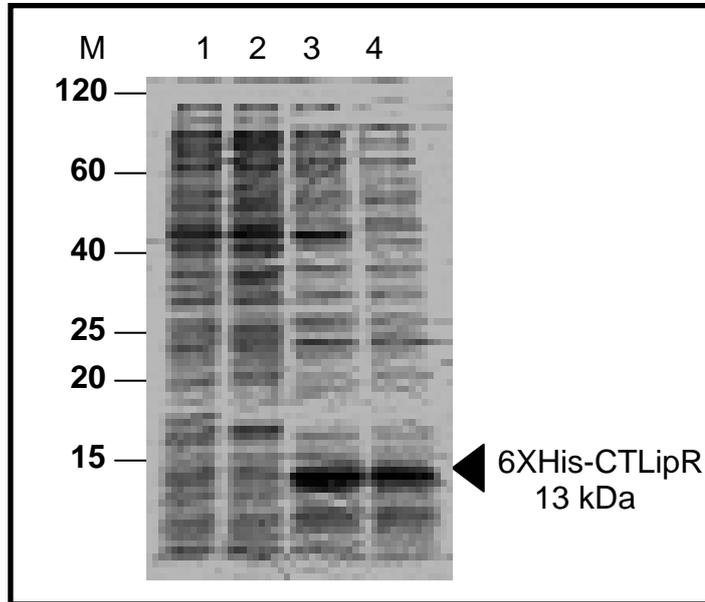


Figura 9. Sobreexpresión del dominio de unión a DNA de la proteína LipR (CTLipR). Las muestras (30 μg) se separaron en gel desnaturante de poliacrilamida al 12.5 % y se tiñó con Azul de Coomasie brillante R250. Carril 1, fracción soluble del lisado de células *E. coli* BL21/pQE-8 inducidas (3 hr); carril 2, fracción soluble de células de *E. coli* BL21/pQE-8CTLipR inducidas (2hr); carril 3, fracción soluble de células de *E. coli* BL21/pQE-8CTLipR inducidas (3hr).

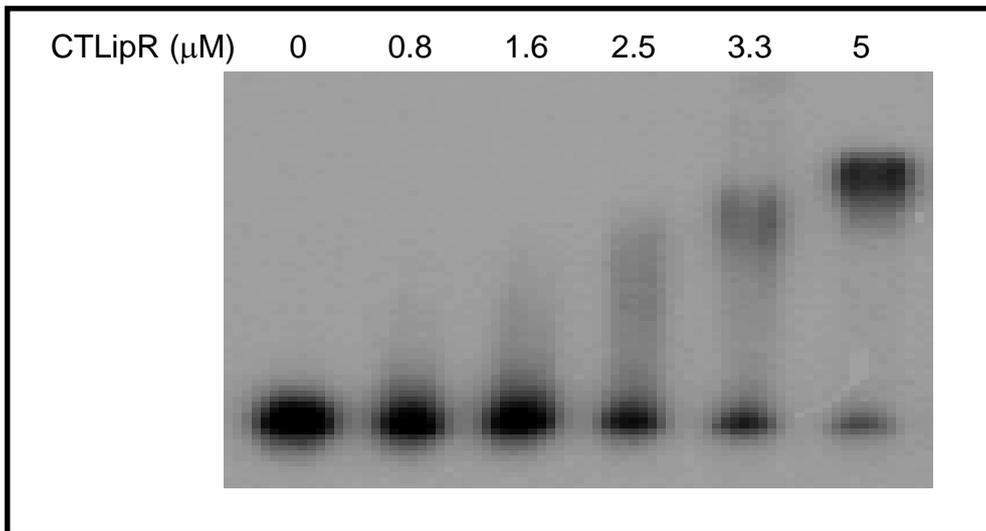


Figura 10. Unión de la proteína CTLipR de *S. exfoliatus* a la región promotora de *lipA*. Retardo de corrimiento en gel se realizó usando un fragmento de 140 pb que contiene el promotor *lipA* y la secuencia invertida repetida que se extiende de la posición -133 a la posición 7 en relación al sitio de inicio de la transcripción de *lipA*. Las concentraciones de la proteína 6XHis-CTLipR se indican arriba de cada carril.

El siguiente paso consistió en determinar si esta unión dependía solamente de la presencia de la secuencia invertida repetida, mediante un experimento de retardo de corrimiento en gel empleando tres diferentes fragmentos del promotor, dos de los cuales carecían de la secuencia invertida repetida (figura 11). Los resultados mostraron unión de la proteína con todos los fragmentos de DNA, lo que indicó que el dominio de unión a DNA por si solo pierde la especificidad de unión a su secuencia blanco, muy probablemente porque en la proteína estaban ausentes determinantes importantes para conferirle la mencionada especificidad.

A pesar de que *in vitro* el dominio de unión a DNA de LipR es incapaz de unirse específicamente a la secuencia invertida de la región promotora de *lipA*, se realizaron experimentos para determinar si *in vivo* el dominio de unión a DNA de LipR era capaz de activar la transcripción de *lipA*, de manera similar a como el dominio de unión a DNA de MalT activa. Para ello, el fragmento C-terminal de *lipR* se clonó en el vector pJ6021, obteniendo el plásmido pBZ608, y se introdujo en *S. lividans* (especie que carece de lipasa extracelular) que contenía el plásmido pB100 que tiene clonado el gen *lipA* de *S. exfoliatus* (figura 12). Los resultados de actividad de lipasa indicaron que a diferencia de lo que ocurre con MalT, el fragmento C-terminal activa *in trans* la transcripción de *lipA* a niveles muy bajos (0.08 unidades/ml de sobrenadante), tomando en cuenta que la actividad de lipasa empleando el activador completo está por encima de 5.7 unidades/ml de sobrenadante.

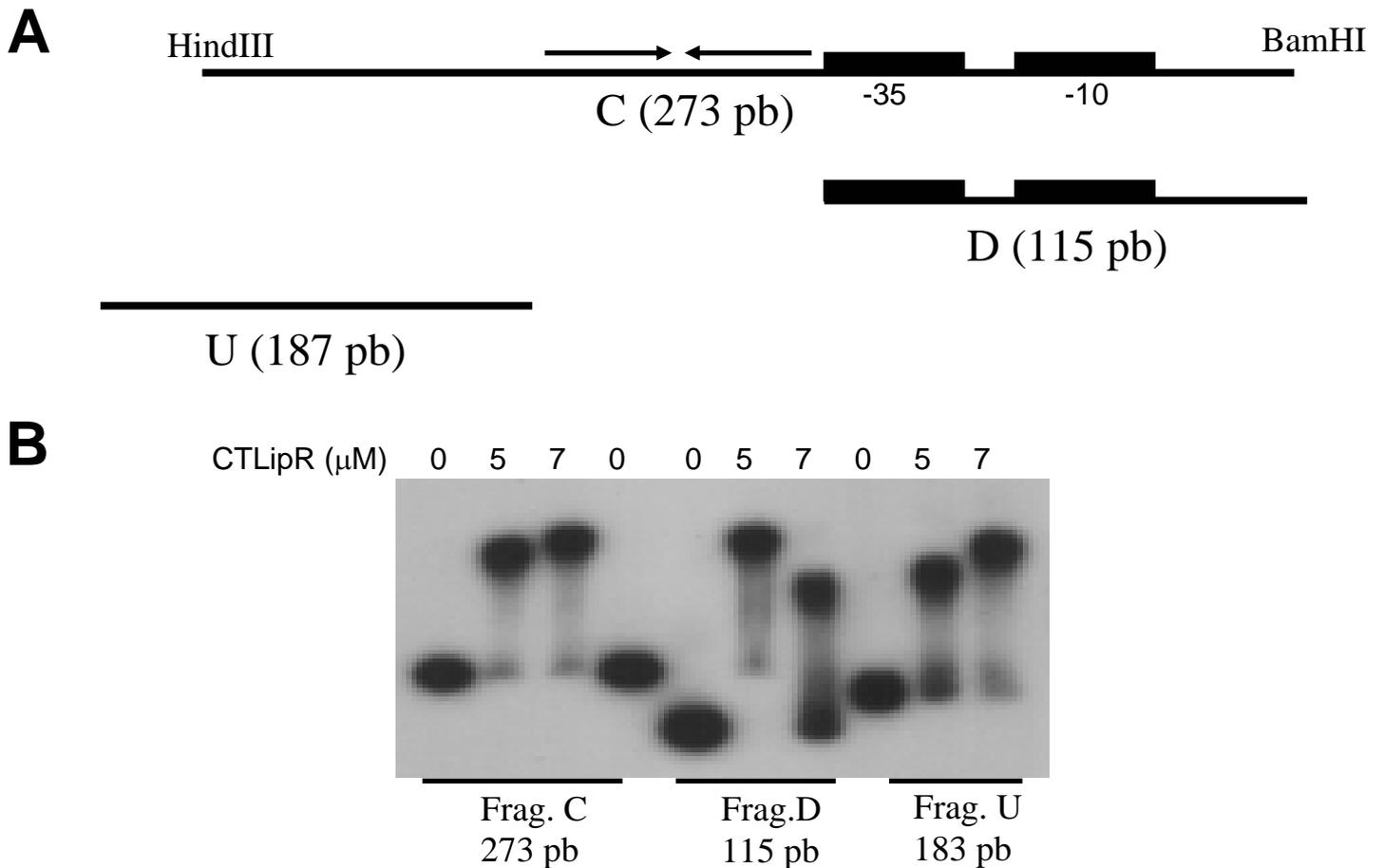


Figura 11. Unión de la proteína purificada CTLipR a diferentes fragmentos de la región promotora de *lipA* de *Streptomyces exfoliatus*. A) Representación esquemática de los fragmentos de la región promotora de *lipA*; C, fragmento de 273 pb que contiene el promotor y la secuencia invertida repetida; D, fragmento de 115 pb que contiene solamente las regiones -35 y -10 del promotor; U, fragmento de 183 pb que carece de la región promotora y de la secuencia invertida repetida. B) Retardo de corrimiento en gel usando los fragmentos C, D y U marcados con 32 P marcados en un extremo del DNA. La concentración de la proteína CTLipR en las muestras se indica arriba de cada carril.

En conjunto, los resultados mostrados indican que el dominio de unión a DNA por si solo es incapaz de activar la transcripción de *lipA*, muy probablemente porque están ausentes determinantes o regiones importantes en el resto de la proteína que le confieren la especificidad requerida para que LipR active el promotor.

Por lo anterior, se requirió plantear otra estrategia encaminada a determinar si la secuencia invertida repetida es el sitio de unión del activador, estrategia que se llevó a cabo empleando mutagénesis de la región promotora de *lipA*, de la manera en que se detalla a continuación.

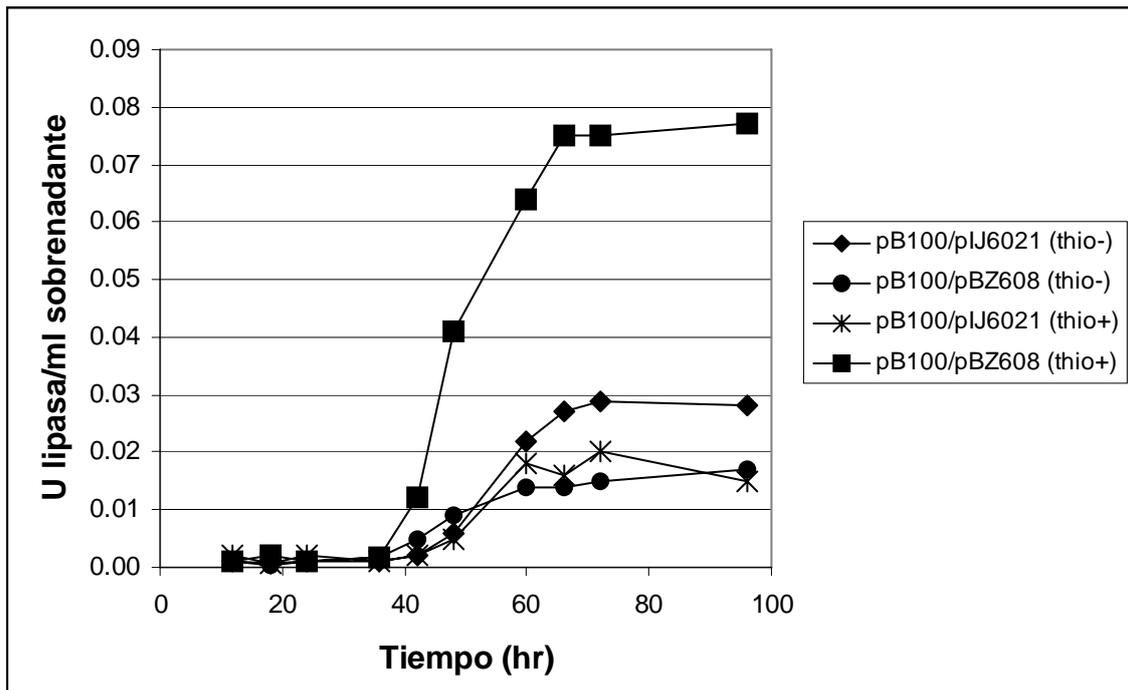


Figura 12. Actividad de lipasa de *S. lividans* transformada con los plásmidos pB100 que contiene el gen *lipA* de *S. exfoliatus* y con pBZ608 que contiene el C-terminal de *lipR*. Para inducir la expresión de pBZ608 se añadió tiostreptón (5 μ g/ml) a las 12 hr de crecimiento para inducir al promotor *tipA*. Los resultados corresponden al promedio de tres cultivos independientes. Los cultivos pB100/pIJ6021 corresponden a los controles. La actividad de lipasa en cultivos en los que se usa el activador completo es de 5.7 U lipasa/ml de sobrenadante.

MUTAGÉNESIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *lipA*.

Para determinar el papel en la transcripción de la secuencia invertida repetida río arriba del promotor del gen *lipA* de *Streptomyces exfoliatus* M11, se construyeron diferentes mutantes en las que se removieron diferentes

partes de la región promotora del gen. Estas construcciones (plásmidos), que tienen clonados los genes *lipA* y *lipR*, se transformaron en *S. lividans*, determinando *in vivo* la actividad de lipasa en el sobrenadante del medio de cultivo. Dichas actividades se cuantificaron durante 96 horas del crecimiento de los diferentes cultivos por triplicado. Las actividades enzimáticas determinadas a los diferentes tiempos se presentan en las figuras 13 y 14. Las regiones de DNA clonados en cada uno de los plásmidos, se encuentran esquematizados en la figura 15.

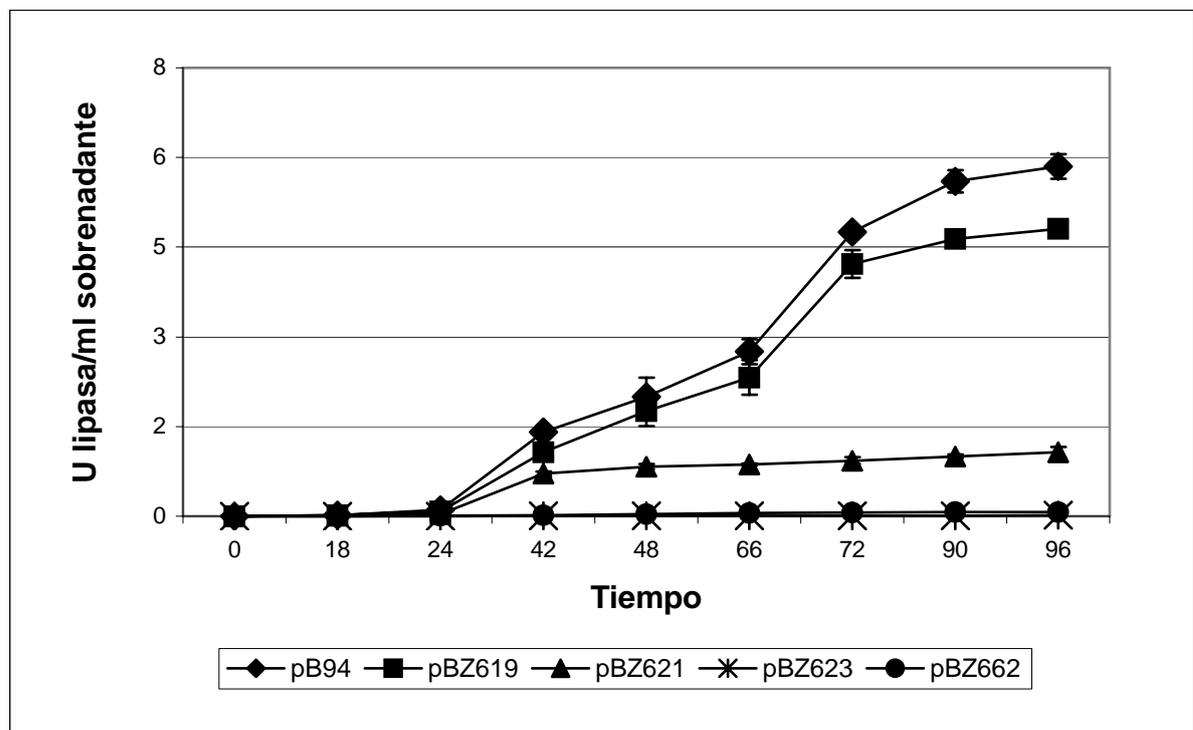


Figura 13. Efecto de deleciones sobre la actividad de lipasa; determinación durante 96 horas de crecimiento. Los resultados corresponden al promedio de tres cultivos independientes.

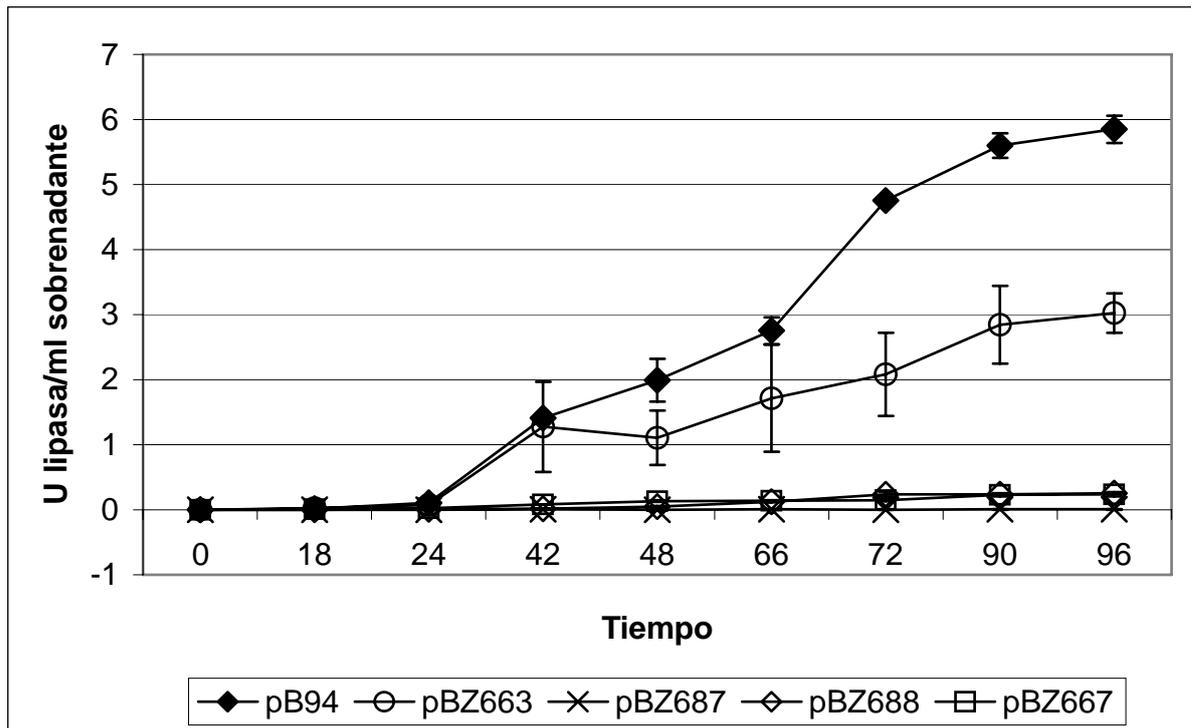


Figura 14. Efecto de inserciones sobre la actividad de lipasa; determinación durante 96 horas de crecimiento. Los resultados corresponden al promedio de tres cultivos independientes.

Considerando únicamente las actividades enzimáticas determinadas a las 72 horas de crecimiento, que es una etapa en la que la expresión del gen es máxima y el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento, se puede observar que los cultivos que contenían la construcción mutante que carece de la secuencia río arriba de la posición -85, pero que retiene la secuencia invertida repetida (pBZ619), presentó actividad de lipasa (88.8 %) similar a la de la actividad silvestre (pB94). Sin embargo, los cultivos que contenían las construcciones con la delección que carecía de la repetición distal (en la posición -55; pBZ621) y de la secuencia invertida completa (en la posición -35; pBZ623), presentaron actividades de lipasa de 19% y 1% respectivamente respecto a la actividad silvestre (Figura 15). Asimismo, se obtuvo una disminución casi total de la actividad de lipasa (1.4% respecto a

la actividad silvestre) al reemplazar la secuencia de la repetición proximal del probable sitio de unión de LipR con una secuencia no homóloga (pBZ662), manteniendo íntegra la repetición distal.

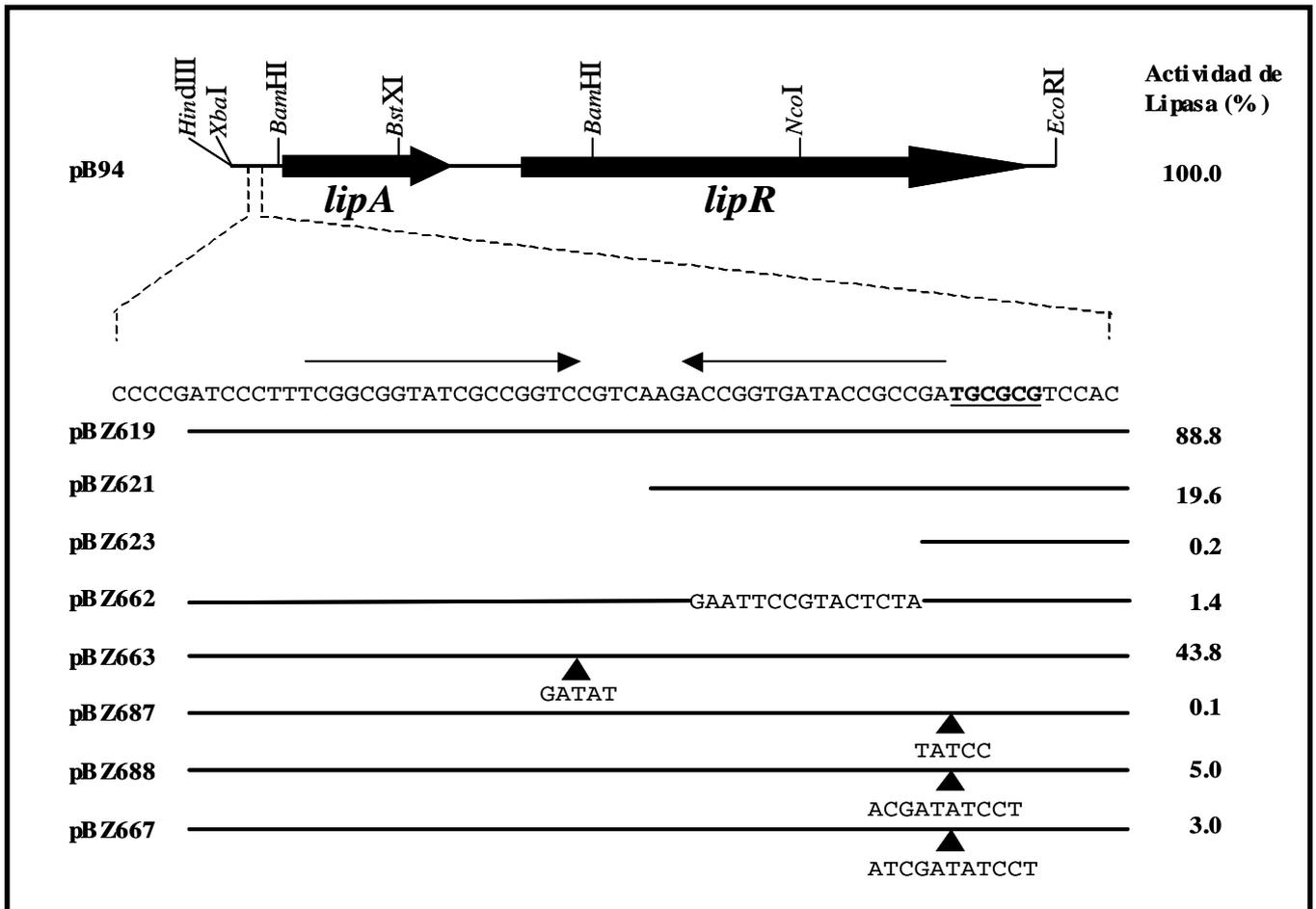


Figura 15. Efecto de las mutaciones en la región promotora de *lipA* sobre la actividad de lipasa. Se muestra el inserto contenido en el plásmido pB94 que incluye los sitios de restricción relevantes usados para la construcción de los plásmidos. La región -35 del promotor de *lipA* está remarcada y subrayada; las dos flechas arriba de la secuencia indican la secuencia invertida repetida que constituye la caja LipR. Los plásmidos pB94 y pBZ662 contienen 55 pb adicionales río arriba de la secuencia mostrada; para los otros plásmidos las líneas horizontales indican la cantidad de DNA que contienen las diferentes mutantes; asimismo se muestran los cambios en la secuencia de pBZ662. Los triángulos en negro indican la posición en donde las bases señaladas debajo de ellas se insertaron. Los valores a la derecha indican las actividades de lipasa obtenidas de los cultivos de *S. lividans* conteniendo los plásmidos, expresadas como porcentajes de la actividad obtenida con pB94, la cual fue de 4.751 unidades de lipasa por ml de sobrenadante.

Para determinar los niveles de los transcritos de las construcciones y para confirmar que la expresión observada de *lipA* se debió a la transcripción proveniente del sitio único de inicio de la transcripción del promotor de *lipA*, se llevaron a cabo experimentos de protección contra la nucleasa S1 (Fig. 16) con RNA total de los diferentes cultivos que contenían estos plásmidos. Estos experimentos confirmaron que la disminución de la actividad de lipasa se debe a una baja en la transcripción del gen *lipA*.

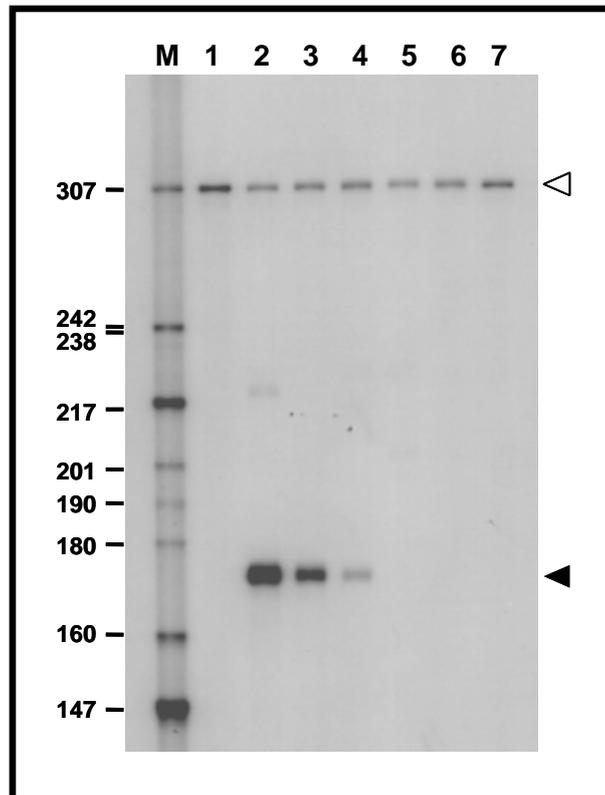


Figura 16. Mapeo por nucleasa S1 de los transcritos de *lipA* de *S. lividans* obtenido de cultivos que contienen los diferentes plásmidos. El marcador usado (línea M) se obtuvo de digerir con *Hpa*II el plásmido pBR322 marcado en sus extremos con 32 P, su tamaño (en nucleótidos) se indica a la izquierda. Los triángulos en negro indican la banda que corresponde a los transcritos de *lipA*, mientras que los triángulos en blanco indican la posición de la sonda no digerida. Carril 1 sin RNA; carril 2, pB94; carril 3, pBZ619; carril 4, pBZ621; carril 5, pBZ662; carril 6, pBZ623; carril 7, pIJ486.

En conjunto estos resultados muestran que la secuencia invertida repetida localizada río arriba del promotor *lipA*, ahora señalada como “**caja LipR**” es esencial para la activación de la transcripción de *lipA* por LipR.

IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN DE LA “CAJA LipR” PARA LA ACTIVACIÓN.

Un aspecto importante para poder determinar el papel que desempeñan cada una de las repeticiones de la secuencia invertida repetida en la transcripción de *lipA*, fue examinar los efectos de alterar el espacio entre los elementos del promotor. Para esto, se construyeron cuatro derivados, en el primero de los cuales las dos repeticiones de la caja LipR se separaron en media vuelta de la hélice de DNA (5 pb), manteniendo normal el espacio entre la repetición proximal y la región -35, obteniendo una actividad de lipasa de aproximadamente 43% respecto a la actividad silvestre (pBZ663) (Fig. 15). Por otra parte, cuando la caja LipR completa se separó de la región -35 insertando 5 pb, situándola en la cara opuesta de la hélice de DNA, no se detectó actividad de lipasa (pBZ687) (Fig. 15), indicando que no hubo transcripción a partir del promotor de *lipA*. Los otros dos derivados fueron construidos para cambiar el espacio entre la caja LipR y la región -35 aproximadamente una vuelta completa de la hélice de DNA (+10pb, pBZ688; +11 pb, pBZ667), situando la caja LipR en la misma cara de la molécula de DNA, pero más arriba respecto a la región silvestre; la actividad

de lipasa de ambos cultivos fue de 5% y 3% respectivamente, respecto a la actividad silvestre.

Los experimentos de protección a la nucleasa S1 (Fig. 17) de RNA aislado de los cultivos que contenían estos plásmidos confirmaron que las actividades de lipasa correspondían a los niveles de transcritos observados. Es decir, esta serie de experimentos mostraron que el espacio entre el promotor y la caja LipR y el espacio entre las dos repeticiones de la caja LipR son cruciales para la activación de la transcripción.

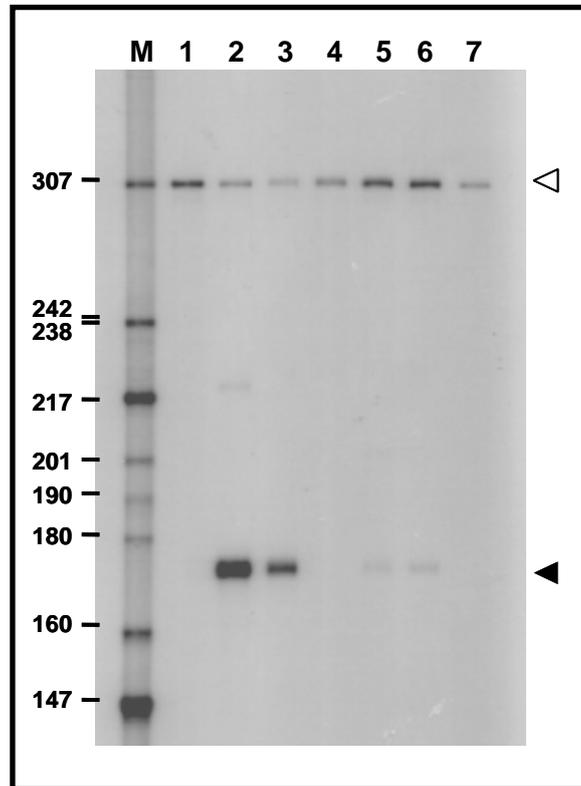


Figura 17. Mapeo por nucleasa S1 de los transcritos de *lipA* de *S. lividans* obtenido de cultivos que contienen los diferentes plásmidos. El marcador usado (línea M) se obtuvo de digerir con *Hpa*II el plásmido pBR322 marcado en sus extremos con ³²P, su tamaño (en nucleótidos) se indica a la izquierda. Los triángulos en negro indican la banda que corresponde a los transcritos de *lipA*, mientras que los triángulos en blanco indican la posición de la sonda no digerida. Carril 1 sin RNA; carril 2, pB94; carril 3, pBZ663; carril 4, pBZ687; carril 5, pBZ688; carril 6, pBZ667; carril 7, pIJ486.

SOBREEXPRESION Y PURIFICACIÓN DE LipR.

Para sobreexpresar el activador transcripcional LipR, el gen *lipR* de *S. exfoliatus* se clonó en el vector de expresión pET28-a (Novagen) resultando el plásmido pBZ606 que se transformó en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 (Novagen), para sobreexpresar y purificar la proteína 6His-LipR. En la figura 18 se puede observar que la inducción de la expresión de la construcción resultó en una alta acumulación de un polipéptido de 97 kDa en la fracción insoluble del lisado celular (carril 3), es decir agregada en cuerpos de inclusión, que no se observa en el extracto soluble de células inducidas (carril 2) y no inducidas (carril 1). De tal manera, la proteína 6His-LipR expresada en estas condiciones se encontró únicamente formando cuerpos de inclusión.

Por lo tanto, el siguiente paso consistió en purificar la proteína a partir de los cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes y renaturalizar el activador de acuerdo a como se describió en materiales y métodos. Es importante mencionar que a pesar de la alta expresión de la proteína recombinante, sólo una proporción muy pequeña de la proteína purificada se recuperó después del proceso de renaturalización, obteniendo una concentración baja de la proteína plegada correctamente (Fig. 18, carril 4).

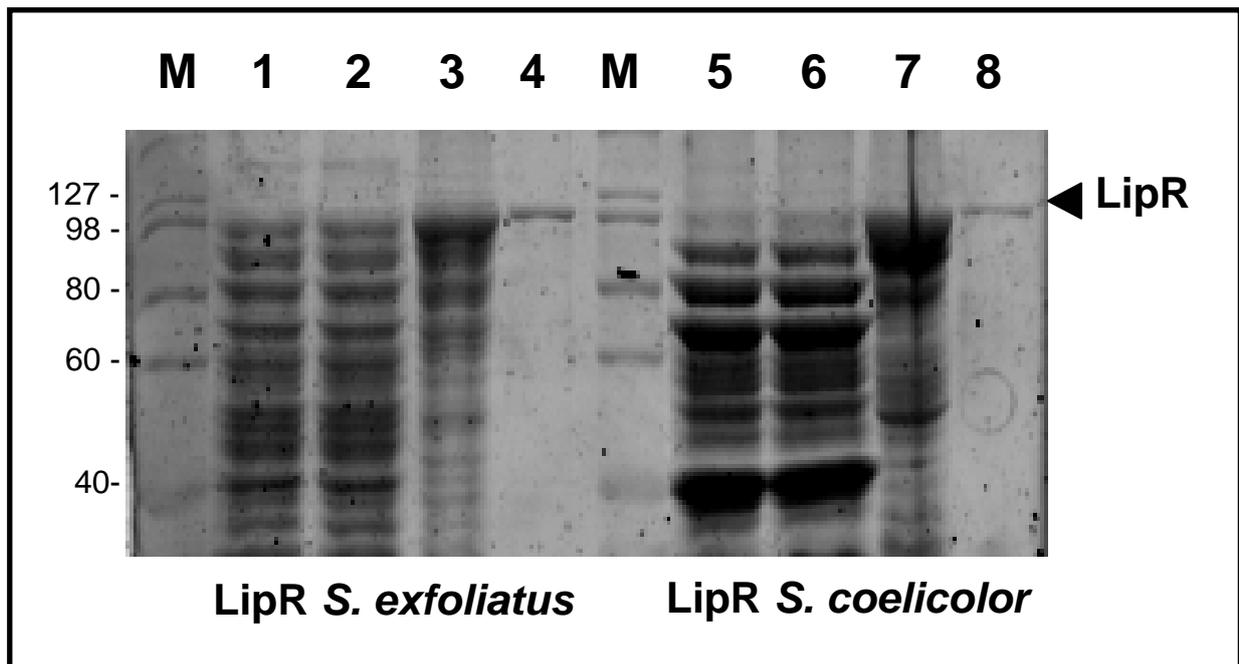


Figura 18. Sobreexpresión y purificación de las proteínas LipR de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor*. Las muestras (30 μ g) se separaron en gel desnaturante de poliacrilamida al 8 % y teñido con Azul de Coomassie brillante R250. Carriles 1 a 4 corresponden a la purificación de la proteína 6Xhis-LipR de *S. exfoliatus* a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosseta 2 que contienen el plásmido pBZ606, mientras que los carriles 5 a 8 corresponden a la purificación de la proteína 6Xhis-LipR de *S. coelicolor* a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosseta 2 que contiene el plásmido pBZ670. Carril 1, fracción soluble de lisado en French press de células sin inducir; carril 2, fracción soluble de lisado en French press de células inducidas; carril 3, fracción insoluble de células inducidas; carril 4, proteína LipR de *S. exfoliatus* purificada; carril 5, fracción soluble de lisado en French press de células sin inducir; carril 6, fracción soluble de lisado en French press de células inducidas; carril 7, fracción insoluble de células inducidas; carril 8, proteína LipR de *S. coelicolor* purificada.

Para confirmar que el polipéptido sobreexpresado, purificado y renaturalizado correspondía a la proteína 6XHis-LipR, la proteína se tiñó *in situ* con el colorante "InVision His-tag In-gel" (Invitrogen) (Figura 19, carriles 1-4), confirmándose que esta proteína corresponde al activador LipR. Es importante señalar que la concentración de proteína cargada en ambos geles son iguales. Este dato resulta importante porque sólo en los carriles 3 y

4, que corresponden a los IBs y LipR renaturalizada, respectivamente, se detecta una señal clara y evidente que corresponde a la proteína LipR. Las proteínas de menor tamaño que se visualizan en la fracción de IBs (carril 3) probablemente corresponden a proteínas LipR incompletas.

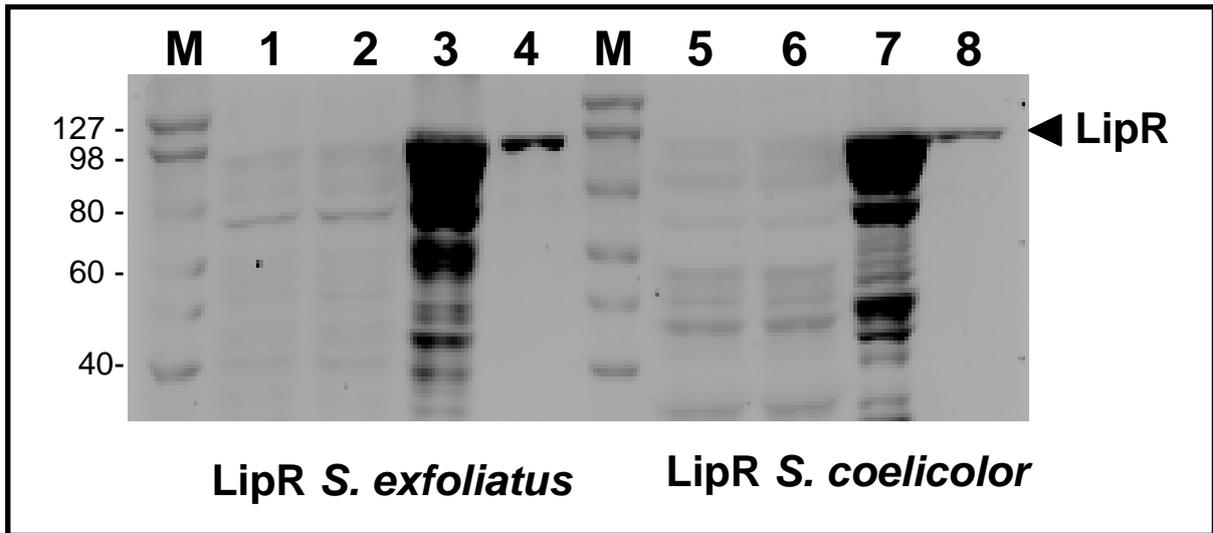


Figura 19. Tinción con InVision His-tag In-gel de las proteínas LipR de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor*. Las muestras (30 μ g) se separaron en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8 % y se tiñeron por 5 horas con el colorante, posteriormente analizándolo con luz UV en FX. Carriles 1 a 4 corresponden a la purificación de la proteína 6Xhis-LipR de *S. exfoliatus* a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosseta 2 que contienen el plásmido pBZ606, mientras que los carriles 5 a 8 corresponden a la purificación de la proteína 6Xhis-LipR de *S. coelicolor* a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) Rosseta 2 que contiene el plásmido pBZ670. Carril 1, fracción soluble de lisado en French press de células sin inducir; carril 2, fracción soluble de lisado en French press de células inducidas; carril 3, fracción insoluble de células inducidas; carril 4, proteína LipR de *S. exfoliatus* purificada; carril, fracción soluble de lisado en French press de células sin inducir; carril 6, fracción soluble de lisado en French press de células inducidas; carril 7, fracción insoluble de células inducidas; carril 8, proteína LipR de *S. coelicolor* purificada.

ANÁLISIS *In vitro* DE LA ACTIVIDAD DE LipR.

Para determinar si el activador transcripcional LipR de *S. exfoliatus* purificado y renaturalizado era funcional y capaz de unirse a la región promotora de *lipA*, se llevaron a cabo experimentos de movilidad

electroforética con esta proteína y un fragmento de 140 pb que contiene la región promotora. La figura 20 muestra un complejo estable a una concentración de 1 μ M de LipR, complejo específicamente inhibido al adicionar el fragmento de DNA no marcado radioactivamente (200 ng).

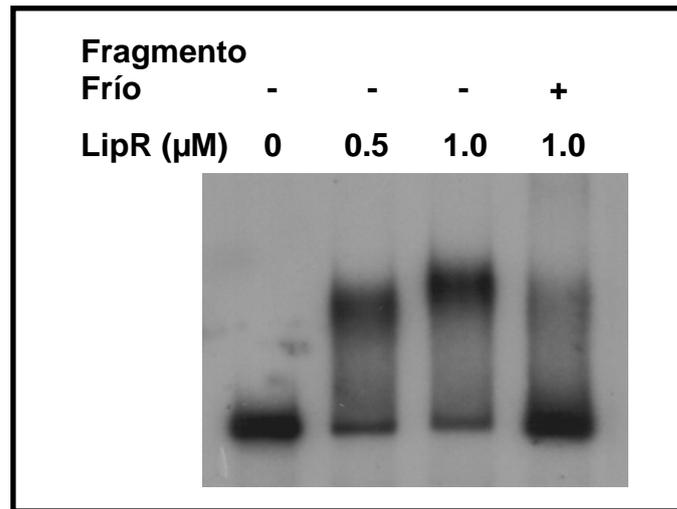


Figura 20. Unión de la proteína LipR de *S. exfoliatus* purificada a la región promotora de *lipA*. El experimento de movilidad electroforética en geles nativos de poliacrilamida se llevó a cabo usando un fragmento marcado con 32 P en un extremo que contiene el promotor de *lipA* y la secuencia invertida repetida, que va de la posición -133 a la posición +7 respecto al sitio de inicio de la transcripción, en la ausencia (-) o presencia (+) de 200 ng del mismo fragmento sin marcaje radiactivo. La concentración de la proteína LipR en las muestras se indican arriba de cada línea.

A partir de estos resultados se llevaron a cabo experimentos de huella (fooprinting), para determinar si LipR se unía específicamente a la "caja LipR". Éstos se realizaron mediante la técnica de protección contra la Dnasal así como la de protección contra radicales OH \cdot . Los resultados de estos experimentos no mostraron claramente una huella en el DNA que demostrara la unión sitio específica de LipR a la secuencia invertida repetida (datos no mostrados).

Por lo anterior, se buscó evidencia que demostrara que la proteína purificada LipR puede activar la transcripción del promotor *lipA* uniéndose a la caja LipR. Esta evidencia se obtuvo a partir de experimentos de transcripción *in vitro* realizados con la RNA polimerasa de *S. coelicolor*, cuya integridad fue verificada al realizar reacciones de control con dos fragmentos de DNA, uno de los cuales corresponde al promotor *veg* (v) y el otro al promotor *ctc* (c) (Westpheling *et al*, 1985). La figura 21 muestra los resultados de los experimentos de transcripción "runoff", en los que se observa que al usar un fragmento de DNA que contiene la región promotora silvestre de *lipA* (obtenida del plásmido pB94) la RNA polimerasa es incapaz de sintetizar un transcrito del tamaño esperado (carril 1). Por otro lado, en presencia del activador LipR (carril 2) se observa una banda que corresponde al tamaño del transcrito esperado originado en el promotor de *lipA* (104 nucleótidos). En este sentido, al poner un fragmento de DNA (proveniente del plásmido pBZ623) que carece de DNA río arriba de la región -35 y por lo tanto que carece de la caja LipR, la RNA polimerasa fue incapaz de sintetizar un transcrito, incluso en presencia del activador LipR (carriles 3 y 4). Este experimento demostró que la proteína LipR es funcional y que es capaz de activar la transcripción del promotor *lipA* en presencia de la caja LipR y de la RNA polimerasa.

Para determinar que la caja LipR es el sitio de unión del activador se llevó a cabo un experimento de transcripción en el cual se usó un fragmento de DNA más corto proveniente del plásmido pBZ619, fragmento que carece

de DNA río arriba de la secuencia invertida, pero que contiene íntegra la caja LipR (Fig. 22, carril 3), observándose una banda de 104 nt que corresponde al transcrito originado a partir del fragmento de DNA silvestre (carril 2), banda que sólo se observa cuando esta presente la secuencia invertida repetida (caja LipR).

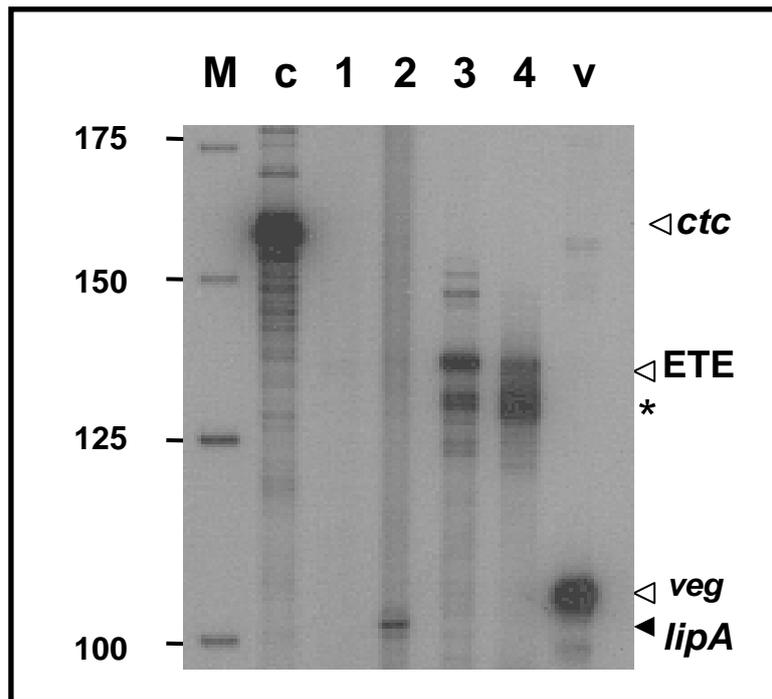


Figura 21. Transcripción *in vitro* (Runoff) de fragmentos del promotor de *lipA*. Carril 1, transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 249 pb de pB94 en ausencia de la proteína LipR; carril 2 transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 249 pb de pB94 en presencia de 1 μ M de la proteína LipR; carril 3, transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 139 pb de pBZ623 en ausencia de la proteína LipR; carril 4 transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 139 pb de pBZ623 en presencia de 1 μ M de la proteína LipR, c y v, transcripción del fragmento de los promotores *ctc* y *veg* respectivamente. El tamaño esperado del transcrito fue de 105 nucleótidos. ETE indica la posición de las bandas que corresponden a la transcripción completa del fragmento, el asterisco indica la posición de un transcrito originado en la cadena opuesta al promotor *lipA*.

Los resultados anteriores confirman que la RNA polimerasa puede iniciar la transcripción a partir del promotor *lipA in vitro* solamente cuando la caja LipR está presente en los fragmentos de DNA empleados, siendo la

transcripción dependiente de la presencia del activador LipR y confirmando que la caja LipR es su sitio de unión.

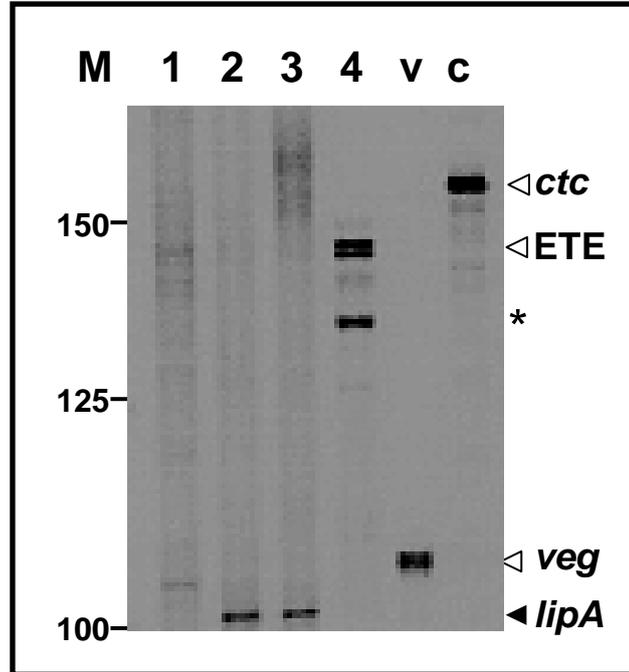


Figura 22. Transcripción *in vitro* (Runoff) de fragmentos del promotor de *lipA*. Carril 1, transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 249 pb de pB94 en ausencia de la proteína LipR; carril 2 transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 249 pb de pB94 en presencia de 1 μ M de la proteína LipR; carril 3, transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 187 pb de pBZ619 en presencia de 1 μ M de la proteína LipR; carril 4 transcripción del fragmento *XbaI-BamHI* de 139 pb de pBZ623 en presencia de 1 μ M de la proteína LipR, c y v, transcripción del fragmento de los promotores *ctc* y *veg* respectivamente. El tamaño esperado del transcrito fue de 105 nucleótidos. ETE indica la posición de las bandas que corresponden a la transcripción completa del fragmento, y el asterisco indica la posición de un transcrito originado en la cadena opuesta al promotor *lipA*.

Con la finalidad de clarificar las bandas extras que se observan en la figura 21 (carriles 4 y 5) y figura 22 (carril 4), es importante mencionar que estas bandas corresponden a transcritos generados por la transcripción de los fragmentos completos lineales usados. Asimismo, se observan transcritos de aproximadamente 10 nucleótidos más cortos que no tienen relación con

los transcritos que se obtienen a partir de *lipA*, pero que son generados a partir de la cadena de DNA complementaria de los fragmentos empleados.

LAS PROTEÍNAS LipR DE *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* SON FUNCIONALMENTE INTERCAMBIABLES.

Considerando que las regiones promotoras de los genes *lipA* de *S. exfoliatus* y de *S. coelicolor* muestran una alta conservación en el promotor y en las cajas LipR, y que los respectivos activadores LipR presentan una identidad del 47 % (Váldez et al, 1999), un punto interesante de evaluar era si estos activadores son funcionalmente intercambiables, es decir, si el activador de una de estas especies activa la transcripción del gen *lipA* de la otra especie. Para esto se purificó la proteína LipR de *S. coelicolor* empleando el mismo sistema de expresión usado para la proteína de *S. exfoliatus*. La figura 18 (carriles 5-8) y 19 (carriles 5-8) muestran el perfil de expresión del activador de *S. coelicolor*.

Para analizar la unión de LipR de *S. coelicolor* a la región promotora de *lipA* de *S. exfoliatus* y viceversa se llevaron a cabo experimentos de retardo de corrimiento en gel. En la figura 23, carriles 4 a 6, se observa que la proteína de *S. exfoliatus* fue capaz de unirse a un fragmento de DNA que contiene la región promotora de *lipA* de *S. coelicolor* a la misma concentración (1 μ M) con la que se unió a su propia región promotora (carriles 1 a 3). Asimismo, complejos estables DNA-proteína se observan a una concentración de 1 μ M de proteína LipR de *S. coelicolor* al usar fragmentos

de DNA que llevan la región promotora de *lipA* de cualquiera de las especies (carriles 7 a 12). La adición del mismo fragmento de DNA no marcado (200 ng) inhibió específicamente la formación del complejo DNA-proteína, mostrando que ambas proteínas LipR son capaces de unirse a la secuencia promotora de cualquiera de las dos especies.

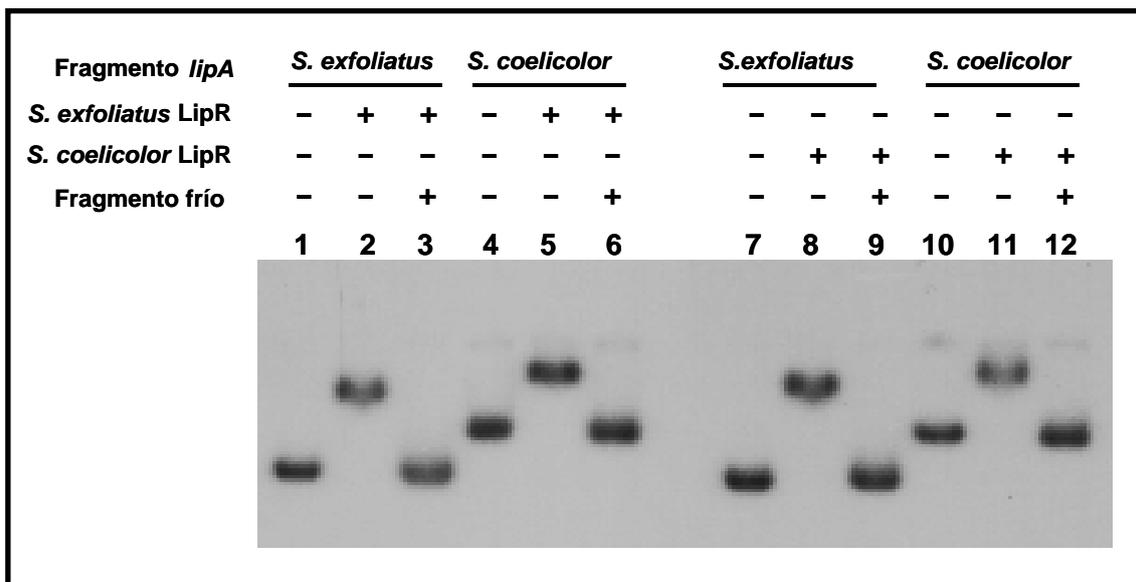


Figura 23. Retardo de corrimiento en gel de las regiones promotoras de *lipA* de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* unidas a las proteínas LipR. El experimento se realizó con un fragmento de 309 pb que contenía la región promotora de *lipA* de *S. exfoliatus* o con un fragmento de 526 pb que contenía la región promotora de *lipA* de *S. coelicolor*, con o sin 200 ng del fragmento sin marcaje. Las proteínas LipR de *S. exfoliatus* y *S. coelicolor* se adicionaron a una concentración de 1 μ M.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se analizó si los activadores LipR eran también funcionalmente intercambiables *in vivo*. Para esto, se construyó el plásmido pB150, en el cual el gen *lipR* de *S. coelicolor* se clonó bajo el control del promotor *tipA* en el vector pIJ602, después de introducir un sitio *NdeI* en el codón de inicio de *lipR* (Tabla 1). Este plásmido es equivalente al plásmido pB99 (Tabla 1) que tiene el gen *lipR* de *S.*

exfoliatus bajo el control de *tipAp* en el mismo vector y que previamente había sido descrito (Servín-González et al, 1997). Ambos plásmidos y pIJ6021 se introdujeron en *S. lividans* que tiene el gen *lipA* de *S. exfoliatus* clonado en un vector derivado del plásmido pJV1 (pB100, Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 3, la actividad de lipasa obtenida en ausencia de cualquier gen *lipR* fue muy baja. Por otra parte, se obtuvieron altos niveles de actividad en presencia de cualquiera de los dos genes *lipR*. Estos resultados indican que ambos activadores son funcionalmente intercambiables *in vivo*.

Se realizó un experimento similar para analizar la activación del gen *lipA* de *S. coelicolor*, clonado en pB151 (Tabla 1) por los productos de ambos *lipR*. Al igual que en el caso anterior, la actividad de lipasa fue dependiente de la presencia de *lipR*, sin importar cual gen *lipR* fue usado para activar la transcripción del gen *lipA* de *S. coelicolor*. En este caso, sin embargo, la actividad varió mucho entre los cultivos, la cual puede ser atribuida a la alta inestabilidad de la lipasa de *S. coelicolor* (datos no mostrados).

Tabla 3. Actividad de lipasa de cultivos de *S. lividans* que contienen pB110 con *lipR* en *trans*.

	Origen <i>lipR</i> ^a		
	(pIJ6021)	<i>S. exfoliatus</i> (pB99)	<i>S. coelicolor</i> (pB150)
Actividad de Lipasa (Unidades por ml de sobrenadante)	0.019+/-0.003 ^b	5.782+/-1.562	3.911+/-1.515

^a Tioestreptón (5 µg/ml) se añadió a las 12 hr de crecimiento para inducir al promotor *tipA*.

^b Los resultados corresponden al promedio de tres cultivos independientes +/- la desviación estándar.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la activación del gen de la lipasa, *lipA*, de *S. exfoliatus* por su activador transcripcional LipR. Este activador anteriormente estaba clasificado como miembro de la familia de activadores MalT (Valdéz et al, 1999) o LAL (De Schrijver and De Mot, 1999), y recientemente fue reclasificado dentro de la familia LipR/TchG de proteínas de actinobacterias que forman parte de la denominada clase STAND de Nucleósido Trifosfatasa de P-Loop. Lo anterior revela una relación muy cercana de las proteínas LipR a los activadores de clusters de antibióticos policétidos (Leipe et al, 2004). Los rasgos característicos de las proteínas de esta familia LipR/TchG son su gran tamaño (típicamente de alrededor de 900 aminoácidos), un dominio de unión a DNA en la región C-terminal del tipo LuxR y la presencia de motivos en la región N-terminal del tipo Walker A y Walker B (De Schrijver y De Mot, 1999; Leipe et al, 2004).

Por otra parte, en estudios previos se sugirió que la presencia de una secuencia invertida repetida río arriba de la región -35 del promotor *lipA* de *S. exfoliatus*, la cual está conservada en las regiones promotoras de *lipA* de *S. coelicolor* y *S. albus*, funciona como el sitio de unión de LipR y que por tanto es indispensable para activar el promotor (Valdéz et al, 1999). Esta idea es consistente con el hecho de que la mayoría de los activadores bacterianos se unen a secuencias invertidas repetidas (Huffman y Brennan, 2002), a pesar

de que esto no está bien documentado para las proteínas reguladoras en estreptomicetos.

Los resultados claramente muestran que la secuencia invertida repetida, ahora llamada "caja LipR", es el único elemento río arriba de la región -35 del promotor *lipA* necesario para activar la transcripción. Estas conclusiones se apoyan en los experimentos *in vivo* en los que se eliminó completamente la caja LipR que resultó en una falta de transcripción, e *in vitro* al mostrar que el inicio de la transcripción de *lipA* por la RNA polimerasa, depende de la presencia de la caja LipR. Asimismo, dicha transcripción es dependiente del activador LipR, confirmando que la secuencia invertida repetida es el sitio de unión de la proteína LipR.

Además, los resultados del presente estudio indican que LipR debe unirse a la repetición proximal de manera muy cercana a la región -35 del promotor para que se active de manera significativa la transcripción, lo que sugiere que LipR actúa como un activador transcripcional tipo II (Rhodius y Busby, 1998). Esta idea es apoyada además por el hecho de que al mover la caja LipR hacia arriba de la región -35 se obtienen niveles transcripcionales similares a los obtenidos cuando está ausente la repetición proximal, lo que sugiere que LipR al unirse a la repetición proximal establece contactos específicos con el factor sigma de la RNA polimerasa (Browning y Busby, 2004; Rhodius y Busby, 1998).

A pesar de que la interacción antes descrita es crítica para que LipR active, los resultados obtenidos mostraron que la repetición distal de la caja

LipR también juega un papel en la activación del promotor *lipA*. Esto es apoyado por el hecho de que una activación completa requiere la presencia de ambas repeticiones y por los niveles de transcripción obtenidos en la ausencia de la repetición proximal, niveles que sugieren que LipR unida a la repetición distal es capaz de hacer contacto con una región de la RNA polimerasa diferente de la que LipR contacta cuando está unida a la repetición proximal. Esta interacción muy probablemente sea con el dominio C-terminal de la subunidad alfa, subunidad que se sabe es capaz de interactuar con factores transcripcionales que se unen más arriba del promotor (Rhodius y Busby, 1998).

Lo anteriormente mencionado es consistente con los bajos niveles de transcripción observados cuando la caja LipR completa es movida más arriba del promotor sobre la misma cara de la hélice de DNA, dado que en este caso los contactos con la subunidad sigma hechos por LipR unida a la repetición proximal deberían perderse, mientras que los establecidos con la subunidad alfa podrían mantenerse debido a la bien conocida flexibilidad que presenta su dominio C-terminal, lo que permitiría que estos contactos se mantuvieran cuando el activador está unido más arriba del promotor (Browning y Busby, 2004; Rhodius y Busby, 1998).

Por lo tanto, los resultados sugieren que LipR actúa en forma parecida a LuxR, un activador ambidiestro que se une a una secuencia invertida repetida (caja *lux*) y establece contacto con la RNA polimerasa en ambos

lados para activar completamente a su promotor (Egland y Greenberg, 1999; Fuqua y Greenberg, 2002).

En contraste con lo anterior, el activador MalT, una proteína que también pertenece a la clase STAND, activa la transcripción por un mecanismo diferente que implica un ensamblaje homo-oligomérico de la proteína en unión cooperativa a varias copias del sitio de reconocimiento de la proteína en respuesta a maltotriosa y ATP (Larquet et al, 2004; Schreiber y Richet, 1999).

Esta diferencia entre los mecanismos de activación empleados por LipR y MalT es relevante, ya que previamente había sido sugerido que la comparación con MalT podría dar indicios acerca del mecanismo por el cual LipR y proteínas relacionadas activan la transcripción (Beckett, 2001; Wilson et al, 2001).

Por lo tanto, sería interesante explorar si activadores relacionados a LipR presentes en los clusters de genes biosintéticos de antibióticos de actinomicetos activan la transcripción por un mecanismo similar al descrito para LipR en el presente estudio, especialmente dado que estas proteínas son similares en su secuencia a las proteínas LipR de *Streptomyces* y están organizadas en dominios bien conservados (Leipe et al, 2004).

Un aspecto interesante de todas las proteínas incluidas en la clase STAND, es la presencia de un dominio de unión a nucleótido en la región N-terminal, que consiste de dos motivos bien conservados, denominados motivos Walker A y Walker B (Leipe et al, 2004). Este dominio tiene una

función importante para activar la transcripción de los genes que regula, ya que la mutación de estos motivos, como en el caso de PikD, genera una proteína incapaz de activar la transcripción del cluster de genes de pikromicina (Wilson et al, 2001).

En relación a lo anterior, el análisis de la secuencia de la proteína LipR de *S. exfoliatus* por De Schrijver y De Mot (1999), reveló que LipR carecía del motivo Walker A, lo que sugería la existencia de un error en la secuencia reportada por nuestro grupo de investigación. Esta duda en la secuencia reportada fue desechada al analizarse nuevamente en el laboratorio la secuencia del gen del activador, revelando que no existe la posibilidad de codificar un motivo Walker A claro en los otros dos marcos de lectura restantes, lo que indicó que la secuencia del activador fue reportada correctamente. Adicionalmente, un análisis realizado en la base de datos FRAME (http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frame_plot.pl) no mostró discontinuidad en la región donde el motivo Walker A debería estar presente. Sin embargo, con el objeto de descartar definitivamente la existencia de un error en la secuencia reportada, el gen *lipR* fue secuenciado nuevamente de la clona original, así como de una clona independiente (Pérez et al, 1999), obteniendo una secuencia idéntica a la secuencia previamente reportada, lo que confirmó la ausencia de un motivo Walker A en la proteína LipR de *S. exfoliatus*.

La ausencia del motivo Walker A podría implicar, por un lado, que la proteína LipR no requiere la unión del nucleótido para activar la

transcripción, y por otro que el motivo Walker B es capaz de coordinar la unión del nucleótido con algún otro dominio o motivo presente en LipR. Tomando en cuenta que las proteínas LipR de *S. coelicolor* y *S. albus* presentan claramente los motivos Walker A y Walker B, se podría especular que la proteína LipR de *S. exfoliatus* es el único miembro de la familia LipR/TchG que ha perdido la capacidad de unir nucleótidos, reteniendo su capacidad de activar la transcripción.

Es interesante que a pesar de que las proteínas LipR fueron completamente intercambiables *in vitro*, *in vivo* existe una pequeña diferencia en la capacidad de la proteína de *S. coelicolor* para reconocer el promotor *lipA* de *S. exfoliatus*, la que no es aparente en los experimentos *in vitro*, principalmente porque estos experimentos se realizaron a concentraciones saturantes de proteína. A pesar de estas pequeñas diferencias observadas entre las proteínas LipR, los resultados del presente estudio muestran que éstas son similares, incluso son funcionalmente intercambiables *in vivo* e *in vitro*. Esto muestra la conservación de los elementos regulatorios en estas dos especies, siendo evidente por la ubicación y conservación de la caja LipR. Es muy probable que esta conservación funcional se extienda a *S. albus*, la cual presente elementos regulatorios similares (Váldez et al, 1999).

CONCLUSIONES

- La secuencia invertida repetida (caja LipR) localizada en la región promotora del gen *lipA* de *Streptomyces exfoliatus* es el sitio de unión del activador transcripcional LipR y es el único elemento río arriba de la región -35 necesario para la activación transcripcional del promotor.
- La integridad de la secuencia invertida repetida es fundamental para la activación del gen *lipA*.
- La distancia entre la caja LipR y el promotor y la distancia entre las repeticiones son cruciales para la activación del promotor *lipA*.
- *In vitro*, el promotor *lipA* puede activarse solamente en presencia de la caja LipR, transcripción dependiente de la presencia de la proteína activadora LipR.
- LipR es un activador transcripcional de la familia LipR/TchG que parece actuar como un activador tipo II, estableciendo contacto directo con la subunidad sigma y la región C-terminal de la subunidad alfa de la RNA polimerasa.

- LipR de *Streptomyces exfoliatus* es la primera proteína reportada de la familia LipR/TchG que no tiene un dominio Walker A, lo que sugiere que no parece requerir de la unión de ATP para activar la transcripción del promotor *lipA*.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez, H.M. y Steinbüchel, A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:367-376.
2. Beckett, D. 2001. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J. Mol. Biol.* 314:335-352.
3. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. y Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417:141-147.
4. Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:208-215.
5. Boos, W. y Suman, H. 1998. Maltose/Maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62:204-229.

6. Browning, D.F. y S.J. Busby. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:57-65.
7. Chater, K.F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:685-713.
8. Chater, K.F. 1998. Taking a genetic scapel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology.* 47:2439-2447.
9. Chater, K.F. 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr. Opin. Microbiol.* 4:667-673.
10. Choi, S.H. y Greenberg, E.P. 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an autoinducer-independent *lux* gene activating domain. *PNAS.* 88:11115-11119.
11. Cruz, H., C. Pérez, E. Wellington, C. Castro, y L. Servín-González. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* 144:141-142.
12. Danot, O. y Raibaud, O. 1993. On the puzzling arrangement of the asymmetric MalT-binding sites in the MalT-dependent promoters. *PNAS.* 90:10999-11003.
13. De Bernardez Clark, E., F. Schwarz y R. Rudolph. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* 309:217-236.
14. De Schrijver, A., y De Mot, R. 1999. A subafamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 145:1287-1288.

15. Eglund, K. A., y E. P. Greenberg. 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol. Microbiol.* 31:1197-1204.
16. Feller, G., M. Thiry, y C. Gerday. 1990. Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrophile *Moraxella* TA144. *Nucleic Acids Res.* 18:6431.
17. Finney, A.H., Blick, R.J., Murakami, K., Ishihama, A. y Stevens, A.M. 2002. Role of the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in LuxR-dependent transcriptional activation of the *lux* operon during Quorum Sensing. *J. Bact.* 184:4520-4528.
18. Fuqua, W.C., Winans, S. Y Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bact.* 176:269-275.
19. Fuqua, C. Y E.P. Greenberg. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:685-695.
20. Goshi, K., Uchida, T., Lezhava, A., Yamasaki, M., Hiratsu, K., Shinkawa, H. y Kinashi, H. 2002. Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 184:3411-3415.
21. Granozzi, C., Billetta, R., Passantino, R., Sollazzo, M. y Puglia, A.M. 1990. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 136:713-716.
22. Hanzelka, B.L. y Greenberg, E.P. 1995. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an auto-inducer-binding domain. *J. Bact.* 177:815-817.

23. Huffman, J.L. y R. Brennan. 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:98-106.
24. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *GENE*. 96:23-28.
25. Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. y Hertz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351.
26. Johnson, D.C., Ishihama, A. y Stevens, A.M. 2003. Involvement of region 4 of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation of the *lux* operon during quorum sensing. *FEMS Microbiol. Letters*. 228:193-201.
27. Joly, N., Danot, O., Schlegel, A., Boos, W. y Richet, E. 2002. The Aes protein directly controls the activity of MaltT, the central transcriptional activator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *J. Biol. Chem.* 277:16606-16613.
28. Joly, N., Böhm, A., Boos, W. y Richet, E. 2004. MaltK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator MaltT by antagonizing inducer binding. *J. Biol. Chem.* 279:33123-33130. Joly, N., Danot, O., Schlegel, A., Boos, W. y Richet, E. 2002. The Aes protein directly controls the activity of MaltT, the central transcriptional activator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *J. Biol. Chem.* 277:16606-16613.

29. Joly, N., Böhm, A., Boos, W. y Richet, E. 2004. MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator MalT by antagonizing inducer binding. *J. Biol. Chem.* 279:33123-33130.
30. Kelemen, G.H. y Buttner, M.J. 1998. Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:656-662.
31. Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater y D.A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich.
32. Kleeberg, I., K. Welzel, J. VendenHeuvel, R.-J. Müller, y W.-D. Deckwer. 2005. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* 6: 262-270.
33. Larquet, E., V. Schreiber, N. Boisset, y E. Richet. 2004. Oligomeric assemblies of the *Escherichia coli* MalT transcriptional activator revealed by cryo-electron microscopy and image processing. *J. Mol. Biol.* 343:1159-1169.
34. Leblond, P., Redenbach, M. y 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.
35. Leipe, D.D., E.V. Koonin y L. Aravind. 2004. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* 343:1-28.

36. Matshushima, P., y R. H. Baltz. 1986. Protoplast fusion, p. 170-183. *In* A. L. Demain and N. A. Solomon (ed). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
37. McCarthy, A.J. y Williams, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment. A review. *Gene*. 115:189-92.
38. McVittie, A. 1974. Ultrastructural studies on sporulation in wild-type and white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 81:291-302.
39. Meinhardt, F., Schaffrath, R. y Larsen, M. 1997. Microbial linear plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47:329-336.
40. Mendes, M.V., Aparicio, J.F. y Martin, J.F. 2000. Complete nucleotide sequence and characterization of pSNA1 from pimaricin-producing *Streptomyces natalensis* that replicates by a rolling circle mechanism. *Plasmid.* 43:159-65.
41. Miguelez, E.M., Hardisson, C. y Manzanal, M.B. 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol.* 145:515-25.
42. 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.

43. Olukoshi, E.R. and Packter, N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. MICROBIOLOGY. 140:931-943.
44. Packter, N.M. y Olukoshi, E.R. 1995. Ultrastructural studies of neutral lipid localisation in *Streptomyces*. ARCH. MICROBIOL. 164:420-427.
45. Pérez, C., K. Juárez, E. García-Castells, G. Soberón, y L. Servín-González. 1993. Cloning, characterization and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. Gene 123:109-114.
46. Prescott, L.M. 1996. Macrolides, azalides, and streptogramins. J Int Assoc Physicians AIDS Care. 2:35-37.
47. Quinn, D.M., Shirai, K., Jackson, R.L. y Harmony, J.A.K. 1982. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble *p*-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. Biochemistry. 21:6872-6879.
48. Raibaud, O. y Richet, E. 1987. Maltotriose is the inducer of the Maltose regulon of *Escherichia coli*. J. Bact. 169:3059-3061.
49. Raibaud, O., Vidal-Ingigliardi, D. y Richet, E. 1989. A complex nucleoprotein structure involved in activation of transcript of two divergent *Escherichia coli* promoters. J. Mol. Biol. 205:471-485.
50. Redenbach, M., Ikeda, K., Yamasaki, M. y Kinashi, H. 1998. Cloning and physical mapping of the *EcoRI* fragments of the giant linear plasmid SCP1. J Bacteriol. 180:2796-2799.

51. Rhodius, V.A., y S.J.W. Busby. 1998. Positive activation of gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:152-159.
52. Richet, E. y Raibaud, O. 1987. Purification and properties of the Malt protein, the transcription activator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *J. Biol. Chem.* 262:12647-12653.
53. Richet, E., y O. Raibaud. 1989. Malt, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO J.* 8:981-987.
54. Richet, E., D. Vidal-Ingigliardi, y O. Raibaud. 1991. A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell* 66:1185-1195.
55. Richet, E. y Sogaard-Andersen, L. 1994. CRP induces the repositioning of Malt at the *Escherichia coli* *maltKp* promoter primarily through DNA bending. *EMBO J.* 13:4558-4567.
56. Rosestein, R. y Götz, F. 2000. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. *Biochimie.* 82:1005-1014.
57. Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
58. Schlegel, A., Danot, O., Richet, E., Ferenci, T. y Boos, W. 2002. The N terminus of the *Escherichia coli* transcription activator Malt is the domain of interaction with MalY. *J. Bact.* 184:3069-3077.

59. Schreiber, V. y E. Richet. 1999. Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *J. Biol. Chem.* 274:33220-33226.
60. Servín-González, L., C. Castro, C. Pérez, M. Rubio, y F. Valdez. 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.
61. Servín-González, L., M. R. Jensen, J. White, y M. Bibb. 1994. Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 140:2555-2565.
62. Sommer, P., C. Bormann, y F. Gotz. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamoneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3553-3560.
63. Stevens, A.M., Fujita, N., Ishihama, A. Y Greenberg, E.P. 1999. Involvement of the RNA polymerase σ -subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J. Bact.* 181:4704-4707.
64. Strohl, W.R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20:961-974.

65. Sztajer, H., I. Maliszewska, y J. Wieczorek. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 10:492-497.
66. Takano, E., J. White, C.J. Thompson y M.J. Bibb. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166:133-137.
67. Uchida, H., Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, T. Nakahara, T. y Nakajima-Kambe. 2002. Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* 93:245-247.
68. Urbanowski, M.L., Lostroh, C.P. y Greenberg, E.P. 2004. Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bact.* 186:631-637.
69. Valdez, F., G. González-Cerón, H. Kieser, y L. Servín-González. 1999. The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology* 145:2365-2374.
70. Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E., Danot, O. and Raibaud, O. 1993. A small C-terminal region of the *Escherichia coli* MalT protein contains the DNA-binding domain. *J. BIOL. CHEM.* 268:24527-24530.
71. Vujaklija, D., W. Schröder, M. Abramic, P. Zou, I. Lescic, P. Franke, y J. Pigac. 2002. A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and

- high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. Arch. Microbiol. 178:124-130.
72. Vulfson, E.N. 1994. Industrial applications of lipases, p. 271-288. In P. Wooley and S.B. Petersen (ed), Lipases-Their structure, biochemistry and application. Cambridge University press, Cambridge, England.
73. Walker, J.E, Saraste, M., Runswick, M.J. y Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1:945-951.
74. Wei, Y., L. Swenson, C. Castro, U. Derewenda, W. Minor, H. Arai, J. Aoki, K. Inoue, L. Servín-González y Z.S. Derewenda. 1998. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. Structure. 6:511-519.
75. Westpheling, J., M. Raney y R. Losick. 1985. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. Nature 313:22-27.
76. Wilson, D.J., Y. Xue, K.A. Reynolds y D.H. Sherman. 2001. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. J. Bacteriol. 183:3468-3475.