



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF  
BIO/19 - Microbiologia Generale

Profili di espressione genica associati al  
metabolismo primario e secondario nel  
ceppo 166 *bldF* di *Streptomyces coelicolor*

IL DOTTORE

**Francesco Ardizzone**

IL COORDINATORE

**Prof.ssa Patrizia Diana**

IL TUTOR

**Prof.ssa Anna Maria Puglia**

CICLO XXXI

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2019

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Caratteristiche generali degli streptomiceti	5
1.2 Ciclo vitale di <i>Streptomyces coelicolor</i>	7
1.3 Curva di Crescita di <i>Streptomyces coelicolor</i>	11
1.4 Genoma di <i>Streptomyces coelicolor</i>	13
1.5 Differenziamento morfologico di <i>Streptomyces coelicolor</i>	16
1.5.1 Geni <i>bld</i>	17
1.5.2 Cluster dei geni <i>ram</i>	21
1.5.3 Geni <i>rodmins</i> e <i>chaplins</i>	23
1.5.4 Geni <i>why</i>	26
1.6 Antibiotici prodotti da <i>Streptomyces coelicolor</i>	28
1.7 Prodigiosine	29
1.7.1 Cluster <i>red</i>	31
2. SCOPO DELL' ATTIVITÀ DI RICERCA	34
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	37
3.1 Analisi di Microscopia Elettronica delle ife del ceppo 166 di <i>Streptomyces coelicolor</i>	38
3.2 Saggio dell'attività proteasica delle proteine secrete dal ceppo 166 di <i>Streptomyces coelicolor</i>	41
3.3 Analisi proteomica differenziale del ceppo 166 di <i>Streptomyces coelicolor</i>	44
3.3.1 Analisi proteomica del ceppo 166 <i>bldF</i> dopo 24 ore di crescita	45
3.3.2 Analisi proteomica del ceppo 166 dopo 32 ore di crescita	47
3.4 Identificazione e analisi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti	49
3.4.1 Analisi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 24 ore di crescita	62
3.4.2 Analisi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 32 ore di crescita	63
3.5 Analisi delle abbondanze relative all'interno delle diverse classi funzionali	64
3.5.1 Analisi delle abbondanze relative dopo 24 ore di crescita	64
3.5.2 Analisi delle abbondanze relative dopo 32 ore di crescita	66
3.6 Proteine differenzialmente espresse nel ceppo 166 <i>bldF</i>	68
3.6.1 Classe funzionale del metabolismo del carbonio	68
3.6.2 Classe funzionale del metabolismo delle macromolecole	70
3.6.3 Classe funzionale dei regolatori	71
3.7 Analisi dell'espressione di geni dell'operone <i>gylCABX</i>	73
3.7.1 Analisi qRT-PCR dei geni <i>gylC</i> , <i>gylA</i> e <i>gylB</i>	74

3.8	Analisi dell'espressione di geni del cluster <i>red</i>	77
3.8.1	Analisi qRT-PCR dei geni <i>redD</i> , <i>redZ</i> e <i>redH</i>	78
3.9	Produzione di prodigiosine nel ceppo 166 <i>bldF</i>	81
3.10	Produzione di acidi grassi nel ceppo 166 <i>bldF</i>	84
4.	CONCLUSIONI	86
5.	MATERIALI E METODI	89
5.1	Ceppi di <i>Streptomyces coelicolor</i> utilizzati	89
5.2	Terreni di coltura	89
5.2.1	Terreno liquido e solido R2YED	89
5.2.2	Terreno liquido FERM II	90
5.3	Condizioni di crescita	90
5.3.1	In terreno liquido R2YED	90
5.3.2	Su terreno solido R2YED	91
5.3.3	In terreno liquido FERM II	91
5.4.	Primer utilizzati	91
5.5	Preparazioni generali	92
5.5.1	Preparazione di una sospensione di spore del ceppo M145 di <i>Streptomyces coelicolor</i>	92
5.5.2	Preparazione di una sospensione di micelio dei ceppi 166 e 165 di <i>Streptomyces coelicolor</i>	93
5.6	Preparazione dei campioni per l'osservazione mediante Microscopio a Scansione Elettronica (SEM)	93
5.7	Analisi zimografiche	94
5.7.1	Estrazione delle proteine dallo spenti medium per analisi zimografiche	94
5.7.2	Determinazione della concentrazione delle proteine presenti nello spent medium mediante Saggio Bradford (Bradford 1976)	94
5.7.3	SDS-PAGE nativa (Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis)	94
5.7.4	Analisi zimografica per la rivelazione di attività proteiche secrete	95
5.7.5	Saggio degli inibitori delle proteasi	96
5.8	Preparazione dei campioni per le analisi di proteomica differenziale	98
5.8.1	Estrazione delle proteine totali	98
5.8.2	Preparazione dei campioni proteici per analisi di proteomica differenziale	98
5.8.3	Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976)	99
5.8.4	Elettroforesi di proteine: SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis)	99

5.8.5 Marcature delle proteine con le canine Cy2, Cy3 e Cy5 con l'approccio minimal labeling	100
5.9 Elettroforesi bidimensionale (2D-DIGE)	101
5.9.1 Isoelettrofocalizzazione (IEF): I dimensione	101
5.9.2 Equilibratura delle strip	102
5.9.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE): II dimensione	102
5.10 Acquisizione delle immagini mediante DIGE IMAGER (GE Healthcare Life Sciences)	103
5.11 Analisi degli elettroferogrammi bidimensionali DIGE	103
5.12 Colorazione dei gel con nitrato di argento	104
5.13 Identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa MALDI-TOF	105
5.14 Analisi bioinformatiche	105
5.15 Preparazione dei campioni per le analisi di qRT-PCR	106
5.15.1 Estrazione dell'RNA	106
5.15.2 Trattamento con DNAsi	106
5.15.3 Controllo della presenza di DNA residuo	106
5.15.4 RT-PCR per controllo presenza e qualità RNA	107
5.15.5 Conversione dell'RNA in cDNA	108
5.16 Real-time PCR quantitativa - relativa	108
5.17 Preparazione dei campioni per analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF	109
5.18 Analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF	109
5.19 Analisi GS/MS	109
6. BIBLIOGRAFIA	110

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Caratteristiche generali degli streptomiceti

Gli Streptomiceti sono batteri del suolo, Gram-positivi, a crescita filamentosa appartenenti al phylum degli Actinobacteria e facenti parte dell'ordine Actinomycetales (Garrity 2002).

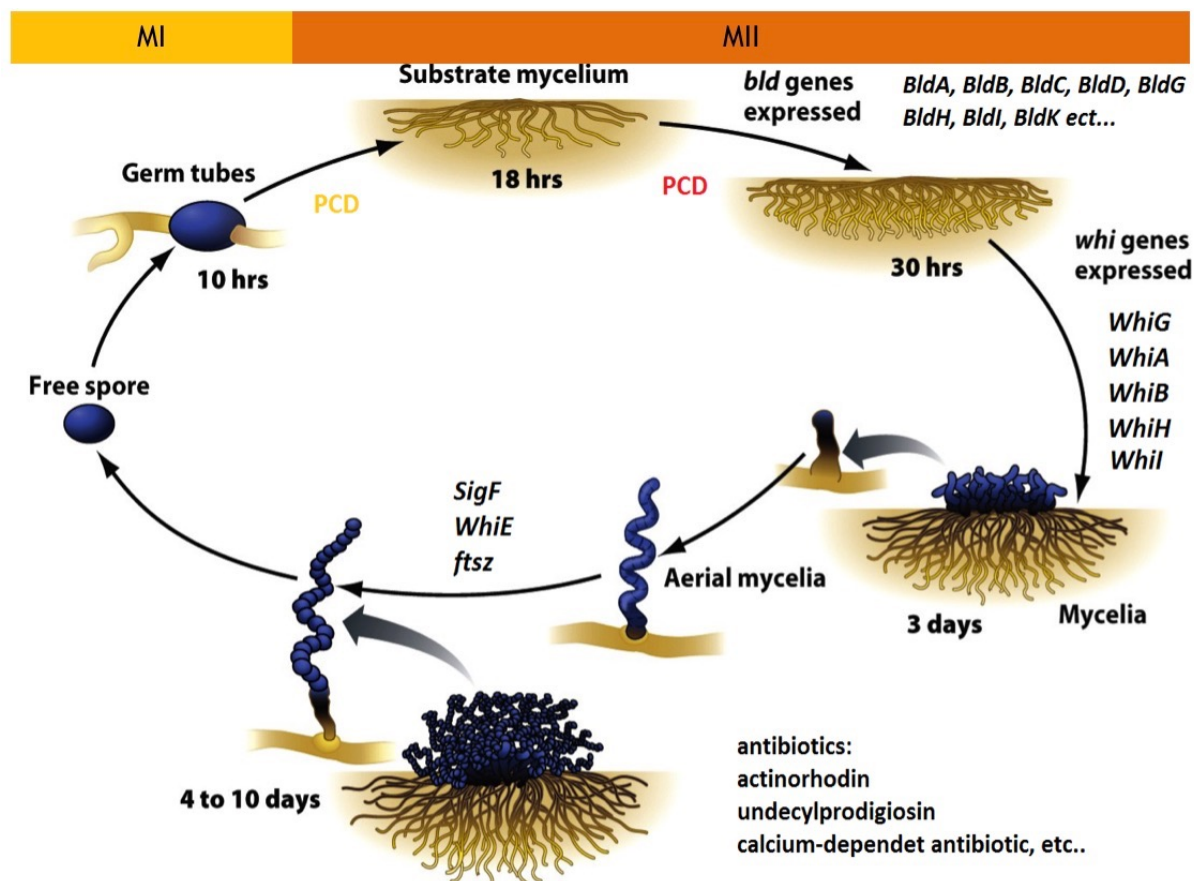
Nonostante gli actinomiceti siano microorganismi di grande interesse industriale per le loro possibili applicazioni biotecnologiche, ancora oggi si hanno poche informazioni sulla loro fisiologia e genetica, ad eccezione degli streptomiceti. Questi, infatti, sono stati studiati maggiormente per la loro capacità di produrre più di metà delle molecole bioattive che trovano largo impiego sia nel campo medico che agricolo: antibiotici, antitumorali, immunosoppressori, antifungini ed antiparassiti (Champness 2000; Hopwood 2007). Gli Streptomiceti hanno un notevole impatto ambientale grazie alla varietà di processi metabolici e di biotrasformazione che sono in grado di mettere in atto. A tal proposito, giocano un ruolo fondamentale nel riciclo della materia organica e nella formazione dell'humus mediante la secrezione di una grande varietà di enzimi extracellulari necessari per la decomposizione di tessuti animali e vegetali (Bentley *et al.*, 2002; Chater *et al.*, 2010). Gli enzimi maggiormente prodotti da questa classe di batteri, commercialmente rilevanti, sono: cellulasi, proteasi, pectinasi, xilanasi, chitinasi e amilasi. Questi vengono utilizzati ampiamente nell'industria dei detersivi, della carta ed in quella alimentare (Divya Prakash *et al.*, 2013). In natura, inoltre, è stata osservata una simbiosi tra streptomiceti e piante. Gli streptomiceti, mediante la produzione di antibiotici, garantiscono protezione alle piante dagli agenti patogeni; l'exudato delle piante rappresenta, invece, un'ottima fonte di nutrimento per lo sviluppo degli streptomiceti (Bosso *et al.*, 2010).

Il genere a cui appartengono gli streptomiceti è costituito da un notevole numero di specie diverse, ma poche fra cui *Streptomyces coelicolor* e, in misura minore, *Streptomyces griseus* sono stati oggetto di studi approfonditi. In particolare *Streptomyces coelicolor*, il cui genoma è stato sequenziato nel 2002 (Bentley *et al.*, 2002), viene considerato un organismo modello per lo studio della biologia e della biochimica degli streptomiceti (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016). Insolitamente per i batteri, gli streptomiceti presentano un complesso sviluppo multicellulare, con differenziazione dell'organismo in "elementi" distinti

(Flårdh and Buttner, 2009; Jani *et al.*, 2014), comunicazione intercellulare, meccanismi di morte cellulare programmata (PCD) ed infine, anche produzione di metaboliti secondari e spore (Miguélez *et al.*, 2000; Chater, 2001; Challins and Hopwood, 2003). Questa complessità permette di classificare gli streptomiceti come organismi modello per lo studio del differenziamento dei procarioti.

## 1.2. Ciclo vitale di *Streptomyces coelicolor*

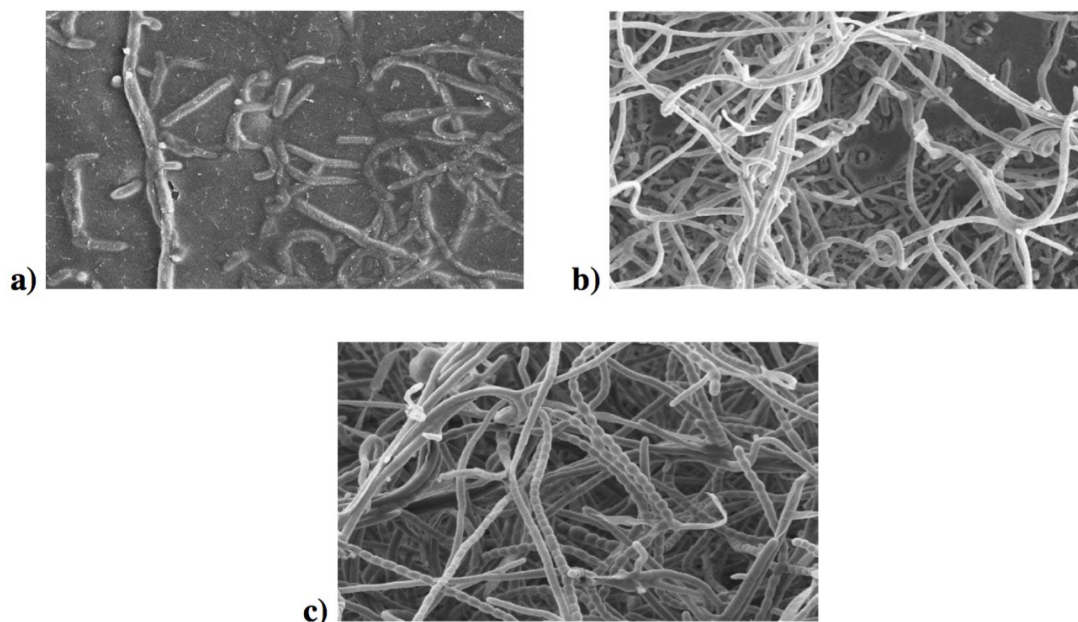
Su terreno solido, il ciclo vitale di *Streptomyces* comincia con la germinazione di una spora che si ramifica per generare il micelio substrato. Questo micelio, rispondendo a determinati stimoli ambientali e cellulari genera il micelio aereo, che è deputato alla produzione di spore. Gli antibiotici invece sono prodotti dalle ife vegetative (Fig. 1 e 2a-c) (Chater, 1984).



**Figura 1. Ciclo vitale di *S. coelicolor*.** In arancione e rosso è indicata la nomenclatura proposta da Manteca *et al.*, 2006a. (MI, micelio primario compartimentalizzato; MII, micelio secondario multinucleato; PCD, morte cellulare programmata). La transizione micelio substrato/aereo è sotto il controllo dei geni *bld*.

Entrando più nel dettaglio, il micelio, subito dopo la germinazione, è formato da un giovane micelio primario compartimentalizzato (MI): parte di questo va incontro ad un primo ciclo di morte cellulare programmata (PCD). La porzione di micelio primario (MI) che rimane vitale dopo il primo round di PCD formerà il micelio secondario multinucleato (MII) (Fig. 3), micelio substrato idrofilo che cresce sulla superficie e all'interno dell'agar e che subirà un secondo round di PCD (Mendez *et al.*, 1985; Miguelez *et al.*, 1999; Manteca

*et al.*, 2006a). Infine, il micelio substrato ancora vitale inizia a formare le ife del micelio aereo. L'attivazione della cascata dei geni *bld* controlla questo processo, (Fig. 1) e permette la formazione di uno strato idrofobico sulla superficie delle ife grazie alla produzione e secrezione della proteina SapB (Spore Associated Protein B) (Guijarro *et al.*, 1988), e delle proteine chaplins e rodmins (Elliot *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2004).



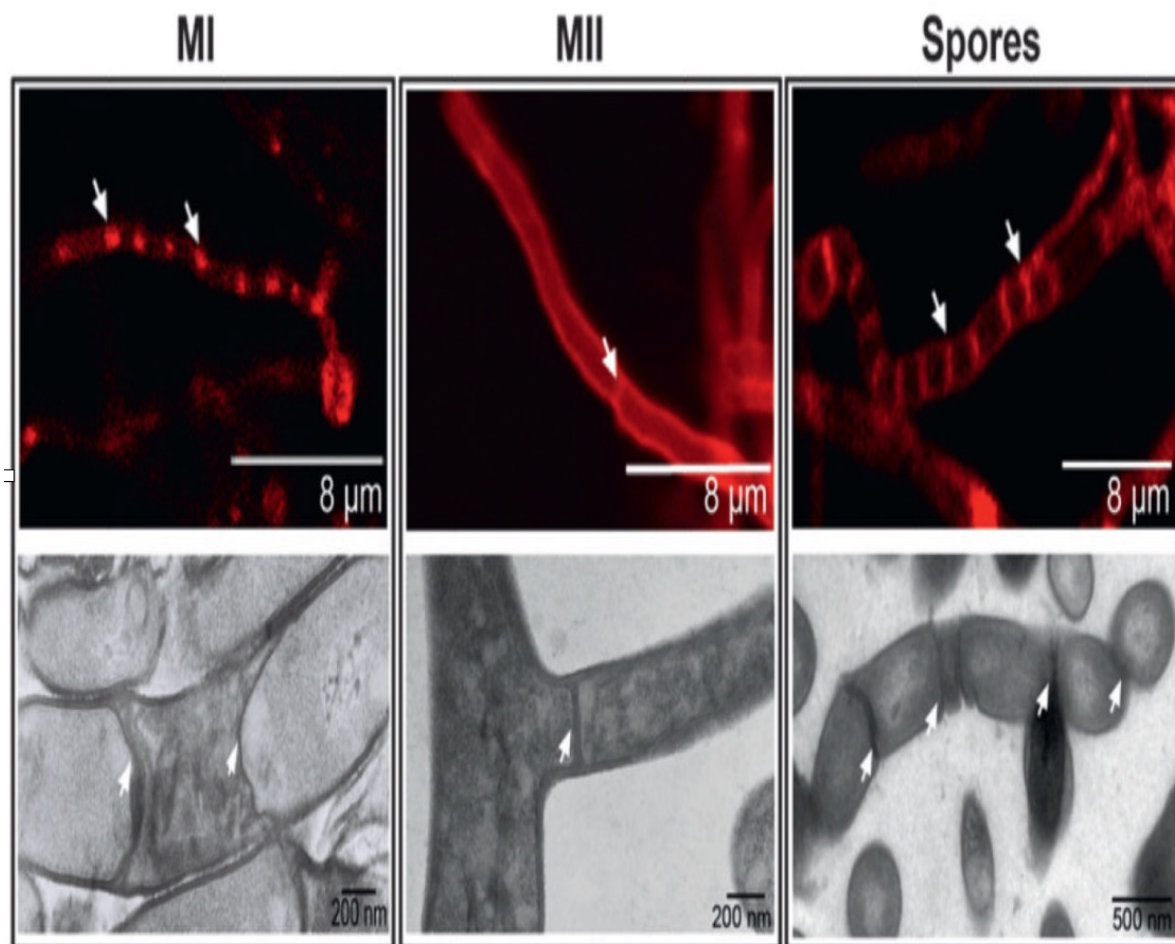
**Figura 2.** a) Micelio Substrato; b) Micelio aereo; c) Spore.

L'ultimo stadio dello sviluppo degli streptomiceti in colture solide è sotto il controllo dei geni *whi* e consiste nella formazioni di setti nelle cellule apicali sporogeniche del micelio aereo, per generare catene di compartimenti unigenomici, da cui si formano le spore mature (Fig. 1, 2 e 3). Una colonia di streptomiceti quindi è costituita da tessuti diversi: il micelio substrato o vegetativo che ha la funzione di produrre le ife aeree e il micelio aereo che ha la funzione di produrre spore che rappresentano la fase propagativa (Chater, 1984).

Il micelio primario compartimentalizzato (MI), formatosi in seguito alla germinazione della spora, come detto in precedenza, mostra delle caratteristiche diverse dal micelio multinucleato (MII) e dal micelio aereo, con differenze strutturali evidenti fra i setti. I primi, infatti, sono molto sottili e la loro funzione non è del tutto chiara, ma probabilmente possono facilitare la comunicazione intercellulare all'interno delle ife (Manteca *et al.*, 2005; Manteca e Sánchez, 2009). In MI i meccanismi che regolano la formazione dei setti non sono del tutto chiari. Tuttavia FtsZ, proteina coinvolta nella divisione dei batteri, partecipa nella formazione dei setti nel micelio multinucleato e in quello aereo e dei setti necessari per



la formazione delle spore, infatti ceppi mutanti in questa proteina generano miceli sinciziali non sporulanti incapaci di formare setti, caratterizzati da una grande resistenza meccanica probabilmente dovuta alla presenza di setti simili a quelli presenti in MI (McCormick *et al.*, 1994).



**Figura 3. Differenti tipi di miceli osservati al microscopio confocale (sopra) ed elettronico (sotto).** MI, micelio primario compartimentalizzato e la spora da cui si origina. Le membrane, indicate dalle frecce, sono colorate con FM-4-64. MII, il micelio secondario multinucleato con la parete colorata con WGA. Ultima colonna, ifa sporulante colorata con WGA. I setti sono indicati dalle frecce (Yague *et al.*, 2013a).

I meccanismi di morte programmata (PCD) del micelio primario (MI), durante la fase di crescita, implicano l'attivazione di specifici enzimi degradativi (Migueluez *et al.*, 1999; Manteca *et al.*, 2006a). Un esempio di questi enzimi è la nucleasi sequenza-specifica (endoG) che produce bande cromosomali simili a quelle ottenute dalle cellule eucariotiche morte per apoptosi (Cale *et al.*, 1996; Samejima e Earnshaw 2005). Questa fase di morte programmata potrebbe essere coinvolta nella generazione di nutrienti essenziali per la crescita del micelio, ed è quindi considerata una forma di cannibalismo (Mendez *et al.*,

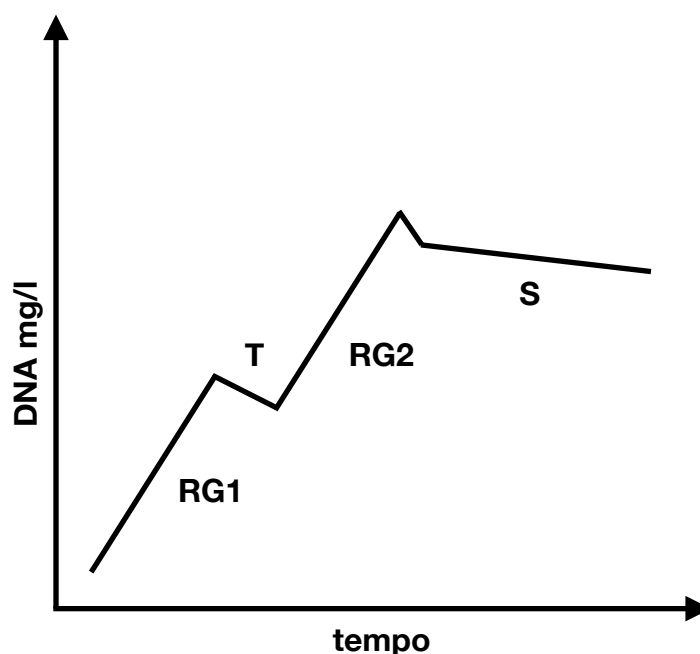
1985; Miguelez *et al.*, 1999). Di conseguenza, la grande produzione di antibiotici durante questa fase dello sviluppo da parte di *S. coelicolor*, potrebbe avere lo scopo di proteggere queste risorse nutritive endogene dalla competizione con altri microorganismi (Chater, 2011).

La germinazione di una spora viene suddivisa in tre fasi: darkening, swelling e germ tube emergence (Hardisson *et al.*, 1978). Il primo passaggio richiede la presenza di cationi bivalenti, come  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  o  $\text{Fe}^{+2}$  e fonti energetiche, che sono accumulate all'interno della spora che germina (Eaton and Ensign, 1980). All'interno delle spore è presente anche una serie di proteine che, in seguito alla germinazione, viene degradata, permettendo, probabilmente, la regolazione di questo processo (Guijarro *et al.*, 1983). La seconda fase necessita di una fonte di carbonio esogena. L'ultima parte della germinazione consiste nel reperire ulteriori fonti di azoto e di carbonio. Vari studi dimostrano che questo processo è finemente regolato, ed è necessaria la presenza di idrolasi sia durante la formazione, che per la germinazione della spora (Haiser *et al.*, 2009) e la presenza di inibitori della germinazione che vengono riversati all'esterno della spora durante il processo germinativo (Grund and Ensign, 1985; Song *et al.* 2006). Anche il cAMP (Süsstrunk *et al.* 1998) e il recettore del cAMP (crp) sono direttamente coinvolti nel processo germinativo (Piette *et al.*, 2005).

Nel 2007 viene identificata la proteina che etichetta il sito della parete cellulare dove ha inizio la germinazione, SsgA (Noens *et al.*, 2007). Infine NepA è stata descritta come una proteina strutturale della parete coinvolta nel mantenimento della dormienza delle spore in *S. coelicolor* (de Jong *et al.*, 2009).

### 1.3. Curva di crescita di *Streptomyces coelicolor*

La curva di crescita degli streptomiceti è ben diversa da quella che caratterizza batteri come *E.coli* e può essere suddivisa in quattro fasi (Puglia *et al.*, 1995): la prima fase di crescita rapida (RG1) corrisponde ad un metabolismo primario ed alla formazione del micelio vegetativo; la seconda fase, detta di transizione (T), è caratterizzato da un'arresto transitorio della crescita dove si instaurano gli eventi di regolazione genica che determinano la formazione del micelio aereo e la produzione di antibiotici (Granozzi *et al.*, 1990); dopo la fase di transizione, segue la seconda fase di crescita rapida (RG2), che equivale al metabolismo secondario e alla crescita e produzione del micelio aereo; l'ultima fase è quella stazionaria (S), durante la quale si assiste ad una elevata produzione di antibiotici ed altri metaboliti secondari e alla sporulazione (Fig. 4).

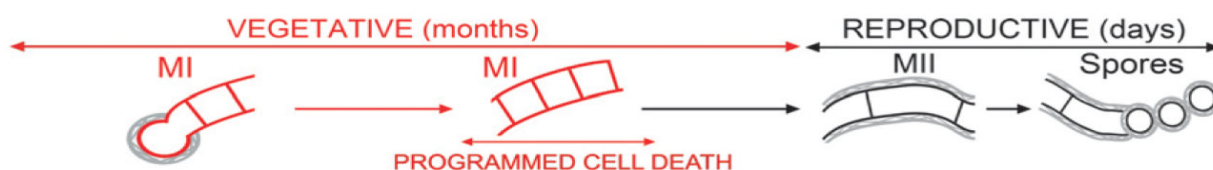


**Figura 4.** Curva di crescita di *S. coelicolor* (Puglia *et al.*, 1995)

Quando vengono coltivati in un terreno liquido, invece, gli streptomiceti non subiscono un evidente differenziamento morfologico e normalmente non sono in grado di sporulare (Manteca *et al.*, 2008; Yagüe *et al.*, 2014). Nonostante ciò, in alcuni streptomiceti come *Streptomyces venezuelae* (Glazebrook *et al.*, 1990), *Streptomyces griseus* (Kendrick & Ensign, 1983), *Streptomyces chrysomallus* (Kuimova & Soina, 1981), *Streptomyces antibioticus ETHZ7451* (Novella *et al.*, 1992), *Streptomyces albidoflavus SMF301* (Rho & Lee, 1994), e *Streptomyces brasiliensis* (Rueda *et al.*, 2001) è stato possibile osservare spore anche in colture liquide.

Anche nelle colture liquide è possibile identificare un micelio primario compartimentalizzato (MI), uno secondario multinucleato (MII), che però, in questo caso, non produce lo strato idrofobico tipico del micelio secondario delle colture su terreno solido. Così come su solido, nel terreno liquido si ha un processo di morte cellulare programmata (PCD) che consente la transizione da micelio primario a secondario, con un rallentamento della crescita. Inoltre, in liquido, si può riscontrare un aumento della vita media del micelio primario (48h vs 17h) (Manteca *et al.*, 2007, 2008). Attraverso analisi di trascrittomiche e proteomiche, è stato dimostrato sia nelle colture liquide che solide, come i trascritti e le proteine coinvolti nel metabolismo primario siano up-regolati in MI; viceversa proteine e geni coinvolti nella sintesi dei metaboliti secondari sono up-regolati in MII. Le principali differenze in MII tra colture liquide e solide riguardano proteine coinvolte nella formazione dello strato idrofobico e nella sporulazione (Manteca *et al.*, 2008; 2010b; Yague *et al.*, 2013a).

Studi effettuati sullo sviluppo degli streptomiceti in condizioni molto simili a quelle presenti in natura hanno evidenziato una crescita differente rispetto a quella osservata in condizioni di laboratorio (Fig. 5), dove, il micelio primario MI ha una vita media estremamente breve di pochi giorni. Questo potrebbe essere dovuto all'alta densità cellulare, ottenuta in laboratorio, che provoca una massiva morte cellulare, differenziamento e sporulazione (Manteca *et al.*, 2005; 2008).



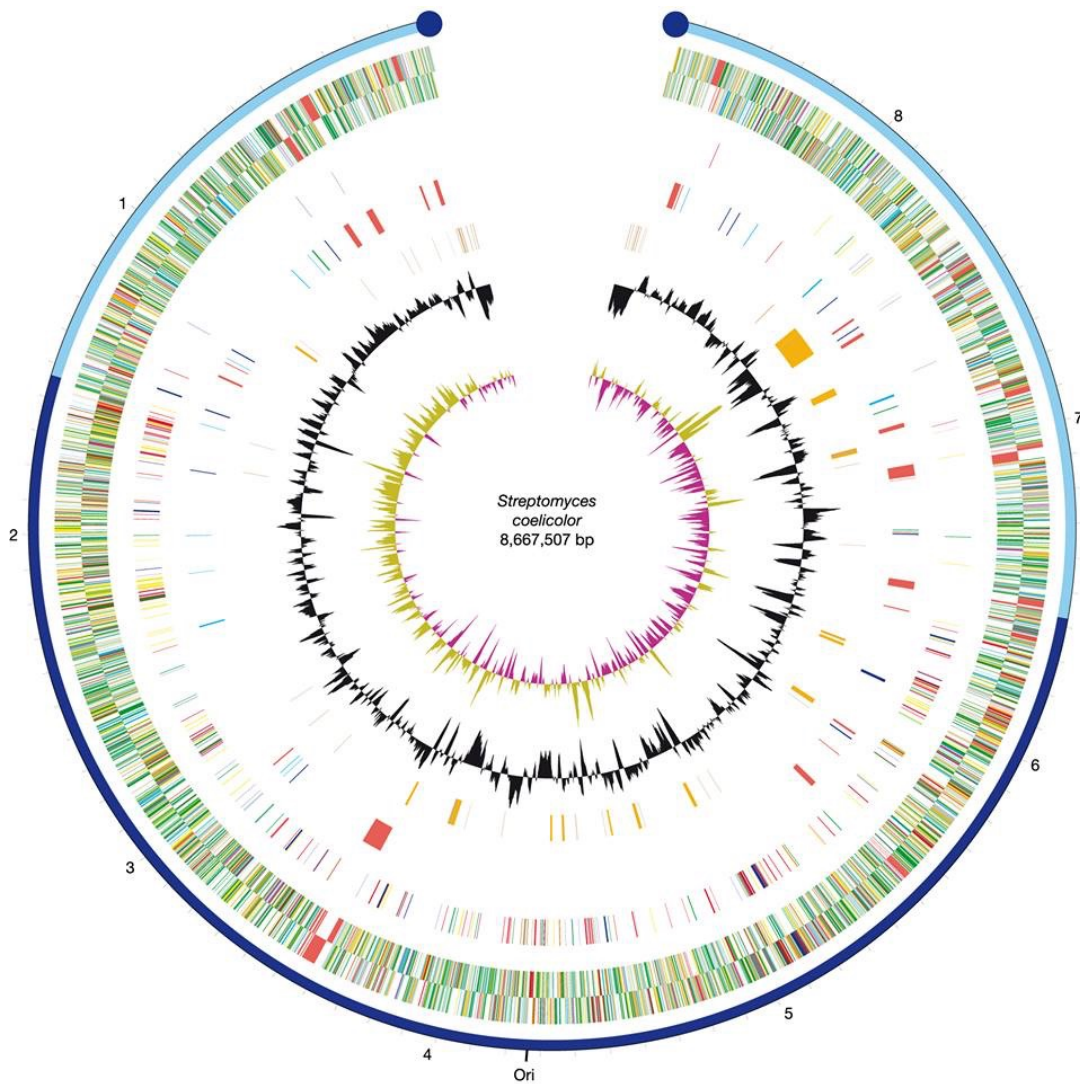
**Figura 5. Modello di sviluppo di *Streptomyces* in natura.** In natura la fase vegetativa è predominante, la fase riproduttiva invece si conclude in pochi giorni (Yague *et al.*, 2013a).

## 1.4 Genoma di *Streptomyces coelicolor*

*S. coelicolor* possiede un cromosoma lineare di 8,7 Mb, con un alto contenuto in G+C pari al 72,12% (Fig. 6) (Bentley *et al.*, 2002), e nonostante sia lineare, possiede una sola origine di replicazione (*oriC*) localizzata nella regione centrale del cromosoma, vicina al gene *dnaA* che codifica per la proteina di inizio della replicazione (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2000). La replicazione procede in maniera bidirezionale verso i telomeri, che contengono sequenze ripetute invertite (TIR), legate covalentemente da proteine dette proteine terminali (TP) la cui funzione è quella di colmare i gap alle estremità telomeriche, agendo probabilmente da primer per la replicazione del DNA delle estremità. Inoltre, le TP servono per l'ancoraggio del DNA alla membrana durante la replicazione del cromosoma e la divisione cellulare e sono responsabili delle interazioni tra telomeri di uno stesso cromosoma per la formazione di strutture circolari (Bao *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002).

Nel cromosoma si distinguono una regione centrale, chiamata core, di circa 5 Mb, dove si trovano i geni correlati alle funzioni primarie della cellula, come divisione cellulare, replicazione del DNA, trascrizione, traduzione, catabolismo dei carboidrati, sintesi degli amminoacidi e dei nucleotidi. Inoltre, nel core sono presenti i cluster per la sintesi degli antibiotici actinorodina, undecilprodigiosina e CDA (antibiotico calcio-dipendente). Oltre il core sono presenti due braccia di 1,5 e 2,3 Mb. che contengono i cosiddetti geni della contingenza, codificanti per proteine non strettamente necessarie alla sopravvivenza della cellula, come enzimi per la sintesi di metaboliti secondari, enzimi idrolitici e sequenze mobili come trasposoni.

Il genoma di *S. coelicolor* contiene ben 7825 ORF e ha quindi un enorme potenziale codificante. Molte famiglie di proteine in *S. coelicolor* sono significativamente rappresentate e sono coinvolte nella regolazione, nel trasporto e nella degradazione dei nutrienti extracellulari. Infatti sono stati identificati 965 geni (12,3% del proteoma teorico) che codificano per proteine coinvolte in processi di regolazione genica, come 65 fattori sigma, 45 dei quali sono detti ECF (Extra Cytoplasmic Function). Quest'ultimi in seguito a stimoli esterni attivano geni coinvolti nella risposta a vari stress, nell'omeostasi della parete cellulare e nello sviluppo del micelio aereo (Paget *et al.*, 2002). In *S. coelicolor* è stato identificato inoltre un grande numero di geni che codificano per sistemi regolatori a due componenti e proteine serina/treonina chinasi, queste ultime tipiche dei sistemi di regolazione eucariotici. Inoltre è stato identificato un gruppo di 25 proteine putative leganti



**Figura 6. Cromosoma di *Streptomyces coelicolor*.** La regione core è rappresentata in blu, mentre la regione delle braccia è colorata in celeste. Procedendo dall'esterno verso l'interno i cerchi 1 e 2 rappresentano, rispettivamente, tutti i geni presenti sul filamento reverse e forward. I colori indicano le varie funzioni dei geni: nero, metabolismo energetico; rosso, informazioni sul trasporto e metabolismo secondario; verde scuro, proteine di superficie; ciano, degradazione di grandi molecole; magenta, degradazioni di piccole molecole; giallo, metabolismo centrale o intermedio; blu chiaro, regolatori; arancione, proteine ipotetiche conservate; marrone, pseudogeni; verde chiaro, geni sconosciuti. Il cerchio 3 rappresenta i geni essenziali per la divisione cellulare, replicazione del DNA, trascrizione, traduzione, biosintesi degli amminoacidi. La funzione è indicata dai colori come per i cerchi 1 e 2. Il cerchio 4 rappresenta i geni della contingenza: rosso, metabolismo secondario; blu chiaro, esoenzimi; blu scuro, conversione; verde, proteine delle vescicole gassose. Il cerchio 5 indica gli elementi mobili: marrone, transposasi; arancione, putativi geni acquisiti lateralmente. Il cerchio 6 indica il contenuto in G+C. Il cerchio 7 riporta i valori del rapporto G-C/G+C. Infine origine di replicazione (Ori) e le proteine terminali (cerchi blu) sono anche indicati (Bentley *et al.*, 2002).

il DNA che sembrano esclusive di *S. coelicolor* e possono costituire una nuova famiglia di regolatori specifici degli streptomiceti. Ancora *S. coelicolor* è in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali e questo probabilmente dipende da una grande varietà di proteine con funzione di trasporto e dalla capacità di secernere numerose proteine. Infatti possiede 614 proteine (7,8%) che sono principalmente rappresentate da trasportatori ABC per diversi substrati quali zuccheri, amminoacidi, peptidi, metalli e altri ioni. *S. coelicolor* grazie alla presenza di numerose proteine secrete (10,5%), la maggior parte delle quali sono enzimi idrolitici, come proteasi, peptidasi,  $\alpha$ -amilasi, agarasi, cellulasi, xilanasi, nucleasi e lipasi, riesce a sfruttare i nutrienti presenti nel suolo. *S. coelicolor* contiene inoltre molti geni paraloghi che codificano per isoenzimi che potrebbero funzionare in momenti diversi dello sviluppo. Un esempio sono i due cluster di geni per la sintesi del glicogeno, di cui uno si esprime durante la produzione del micelio vegetativo e l'altro durante la crescita del micelio aereo.

*Streptomyces* possiede anche un plasmide lineare gigante di 380 Kb (SCP1) ed un plasmide circolare di 31 Kb (SCP2), che sembrano costituire una caratteristica peculiare di questo genere. Infatti, i plasmidi lineari sono stati identificati raramente in organismi procariotici, mentre sono tipici di diverse specie eucariotiche. I plasmidi lineari finora identificati presentano sequenze terminali ripetute invertite (TIR) con proteine terminali legate ad entrambe le estremità, essenziali per la replicazione e il trasferimento durante la coniugazione. SCP1 è il plasmide lineare gigante più studiato (Hopwood *et al.*, 1973; Kinashi *et al.*, 1991; Bao *et al.*, 2001) e porta geni per fattori sigma con funzioni extracitoplasmatiche, geni per la biosintesi di antibiotici come la metilenomicina e per proteine associate alle spore (Saps) (Bentley *et al.*, 2004). SCP2 è invece un esempio di plasmide circolare ed è stato il primo plasmide ad essere isolato in *S. coelicolor* A3(2) (Schrempf *et al.*, 1975).

## 1.5 Differenziamento morfologico di *Streptomyces coelicolor*

*Streptomyces coelicolor* è caratterizzato da un complesso ciclo vitale che coinvolge tipi cellulari differenti, meccanismi di morte cellulare programmata e produzione di numerosi metaboliti secondari. Per questo motivo è utilizzato come sistema modello per lo studio del differenziamento morfologico e fisiologico dei procarioti.

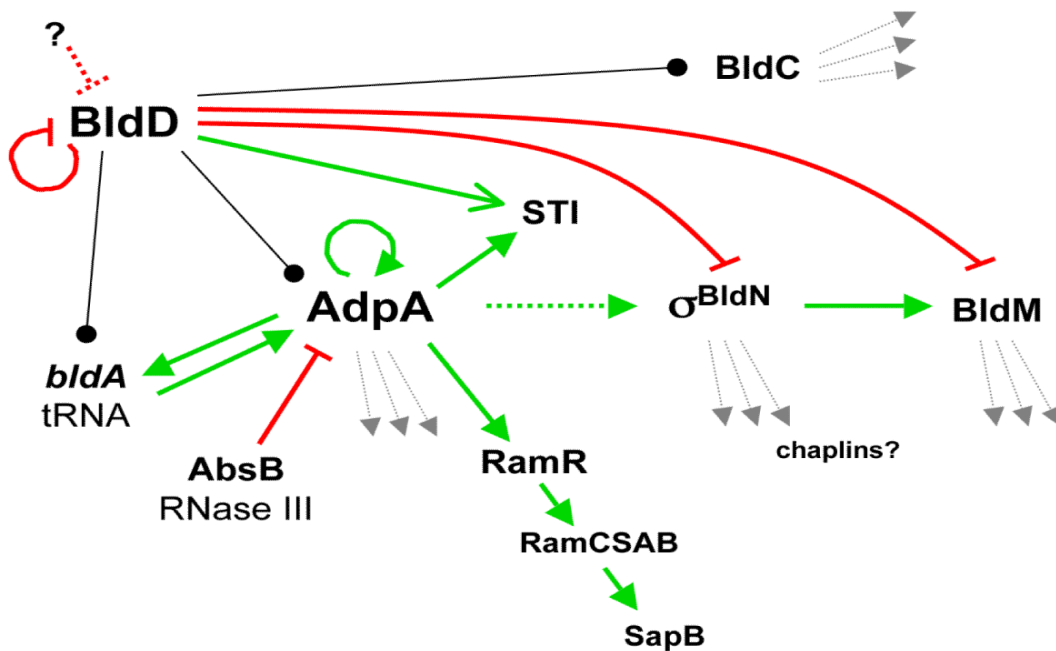
Gli stadi dello sviluppo che sono stati maggiormente studiati sono la transizione da micelio substrato a micelio aereo e la formazione delle spore. In particolare, la formazione del micelio aereo richiede l'attivazione dei geni *bld* (dall'inglese bald = calvo), dell'operone *ram* (*rapid aerial mycelium*), dei geni codificanti per le proteine chaplins e rodmins e del pathway regolatorio "*sky*" (Claessen *et al.*, 2006). Mutazioni in questi geni determinano la mancanza del micelio aereo o un ritardo nella formazione dello stesso, e conferiscono un aspetto liscio e traslucido alla colonia. I geni *whi* invece sono necessari per la maturazione delle spore. Il termine *whi* (dall'inglese white = bianco) si riferisce proprio al fenotipo dei mutanti caratterizzati da un micelio aereo bianco per l'incapacità di formare le spore tipicamente grigie (Hopwood *et al.*, 1970; Chater, 1972; Kelemen e Buttner, 1998.).



### 1.5.1. Geni *bld*

La cascata *bld* ha un ruolo centrale nella formazione del micelio aereo perché permette di integrare i segnali intracellulari, quali il bilancio energetico e la densità cellulare, con quelli ambientali, come la disponibilità di nutrienti e condizioni di stress particolari (Pope *et al.*, 1996), realizzando così un vero e proprio checkpoint dello sviluppo.

I principali mutanti *bld* che sono stati caratterizzati sono: *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldG*, *bldK*, *bldM* e *bldN*. *BldA* codifica per l'unico tRNA in grado di tradurre il codone UUA per la leucina. Solo pochi geni del metabolismo secondario contengono la tripletta TTA. Un gene chiave che contiene la tripletta TTA è *adpA* (*A factor dependent protein*) che codifica per un attivatore trascrizionale necessario per l'espressione di geni del metabolismo secondario e del differenziamento morfologico (Fig. 7).



**Figura 7. Schematizzazione del pathway regolatorio nelle fasi precoci dello sviluppo del micelio aereo di *S. coelicolor* centrato sul regolatore AdpA.** Le frecce indicano un effetto positivo. Le linee perpendicolari alla fine della linea intera indicano un controllo negativo o di repressione. Le linee tratteggiate indicano interazioni ipotetiche. Le linee che finiscono con un pallino indicano una interazione diretta, ma l'effetto sull'espressione del gene non è chiaro (den Henst *et al.*, 2010).

*adpA* a livello trascrizionale è direttamente controllato da *bldD* (den Henst *et al.*, 2010) ed il suo trascritto è substrato della RNasi III codificata dal gene *absB* (Xu *et al.*, 2009). *adpA* ha un ruolo cruciale nella formazione del micelio aereo perché attiva la produzione della proteina SapB attraverso *ramR*, la produzione delle chaplins attraverso

*bldN* e una cascata proteolitica extracellulare tramite la via STI. Inoltre è stato dimostrato un loop a feedback positivo tra *adpA* e *bldA* sia in *S. griseus* che in *S. coelicolor*. In entrambi gli organismi il prodotto di *adpA* attiva la trascrizione di *bldA*, il prodotto di *bldA* (tRNA per la leucina) è invece necessario per la traduzione del codone UUA presente sul trascritto di *adpA* (Higo *et al.*, 2011). Mutazioni del gene *bldA* influenzano la produzione di actinorodina e undecilprodigiosina (Lawlor *et al.*, 1987) e l'espressione dei geni *ramR* e *bldN*, entrambi necessari per la formazione del micelio aereo (Wolanski *et al.*, 2011; Bibb *et al.*, 2000).

*bldB*, codifica per una proteina legante il DNA contenente un motivo helix-turn-helix (HTH) (Pope *et al.*, 1998). *bldC*, codifica per un putativo attivatore trascrizionale della famiglia merR necessario per la formazione del micelio aereo (Hunt *et al.*, 2005).

*bldD*, è il principale regolatore dei geni coinvolti nello sviluppo (Elliot *et al.*, 2001). In particolare, *bldD*, codifica per un repressore che si lega ai geni dello sviluppo durante la fase di crescita vegetativa. Infatti, reprime l'espressione dei geni *bldN* e *whiG* che codificano per fattori sigma che sono coinvolti, rispettivamente, nella formazione del micelio aereo (Bibb *et al.*, 2000) e nell'inizio del processo di sporulazione (Chater, 1989).

Tale repressione è rimossa durante la fase di crescita aerea. La regolazione trascrizionale di *bldD* non è nota, ad eccezione del fatto che è in grado di auto regolarsi negativamente (Elliot *et al.*, 1998). È noto però che è espresso ad alti livelli durante la fase iniziale dello sviluppo e che tale espressione si riduce lungo le fasi dello sviluppo (den Hengst *et al.*, 2010). La riduzione dei livelli potrebbe essere causata dall'azione di proteasi, in quanto il prodotto del gene *bldD* risulta maggiormente degradato in cellule estratte da ife sporulanti, piuttosto che da cellule estratte dalle ife vegetative (Lee *et al.*, 2007). A conferma di ciò, mutazioni inattivanti di 2 dei 4 geni *clpP*, che codificano per le subunità proteolitiche della proteasi ClpXP, producono un fenotipo *bld* in *S. lividans* (de Crècy-Lagard *et al.*, 1999), suggerendo che se il repressore codificato da *bldD* non viene degradato, non si ha la possibilità di formare il micelio aereo. È interessante notare che uno di questi geni, *clpP1*, è direttamente controllato da *adpA* in *S. coelicolor* (Wolanski *et al.*, 2011).

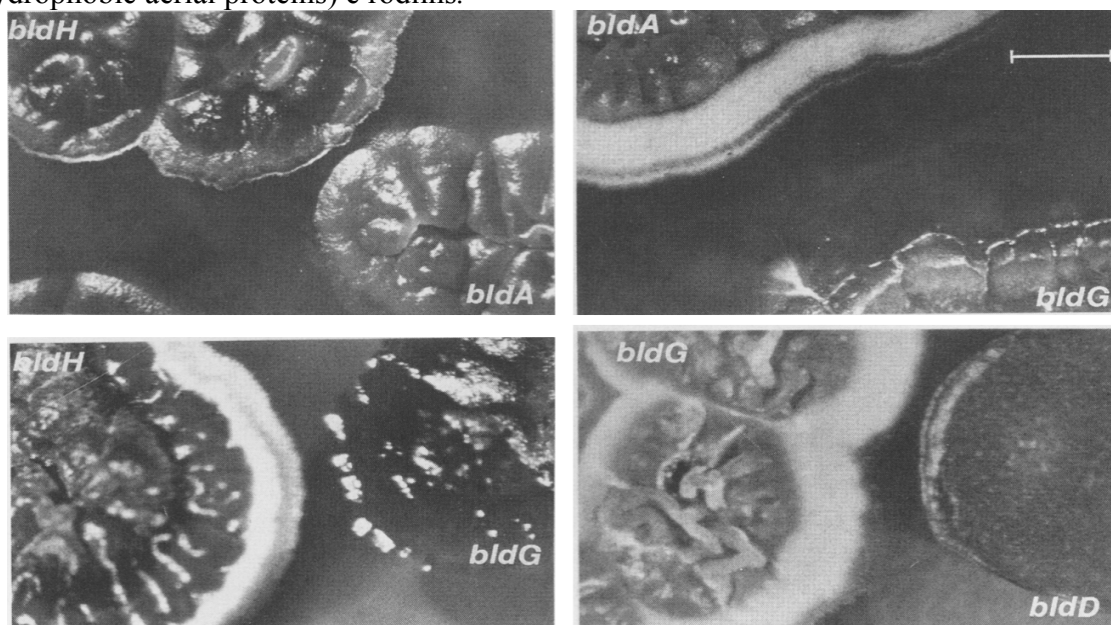
Recenti studi identificano *bldG* come il regolatore della risposta allo stress e del fattore sigH ( $\sigma$ H), sia in *S. coelicolor* che *S. griseus*. *bldG* codifica infatti per un fattore anti-anti sigma (Bignell *et al.*, 2000) che è il diretto antagonista del fattore anti-sigma (UshX/



(Willey J *et al.*, 1993). In particolare, la complementazione dei ceppi mutanti da parte del ceppo wild-type è dovuta, almeno in parte, alla produzione e secrezione da parte di quest'ultimo, di SapB, una piccola proteina idrofobica. Infatti, con l'eccezione di *bldM* e *bldN*, tutti i mutanti *bld* sono incapaci di sintetizzare SapB (Willey *et al.*, 2006). Gli esperimenti di complementazione extracellulare, tra coppie di mutanti *bld*, hanno permesso, invece, di costruire una gerarchia dei mutanti *bld*, in base alla loro capacità o meno di complementazione. Nella gerarchia *bldD* è considerato un donatore universale per la capacità di complementare diversi ceppi mutanti, quindi il gene *bldD* svolge un ruolo chiave nella regolazione dello sviluppo di *S. coelicolor* (Fig. 9).

La capacità dei mutanti di sviluppare delle ife aeree viene ripristinata anche dalla somministrazione di SapB esogena. Tuttavia, analisi di microscopia elettronica hanno mostrato che in questo caso non si tratta di un vero differenziamento morfologico del micelio substrato in micelio aereo, ma di ife del micelio substrato che si dirigono verso l'alto (Willey *et al.*, 1993).

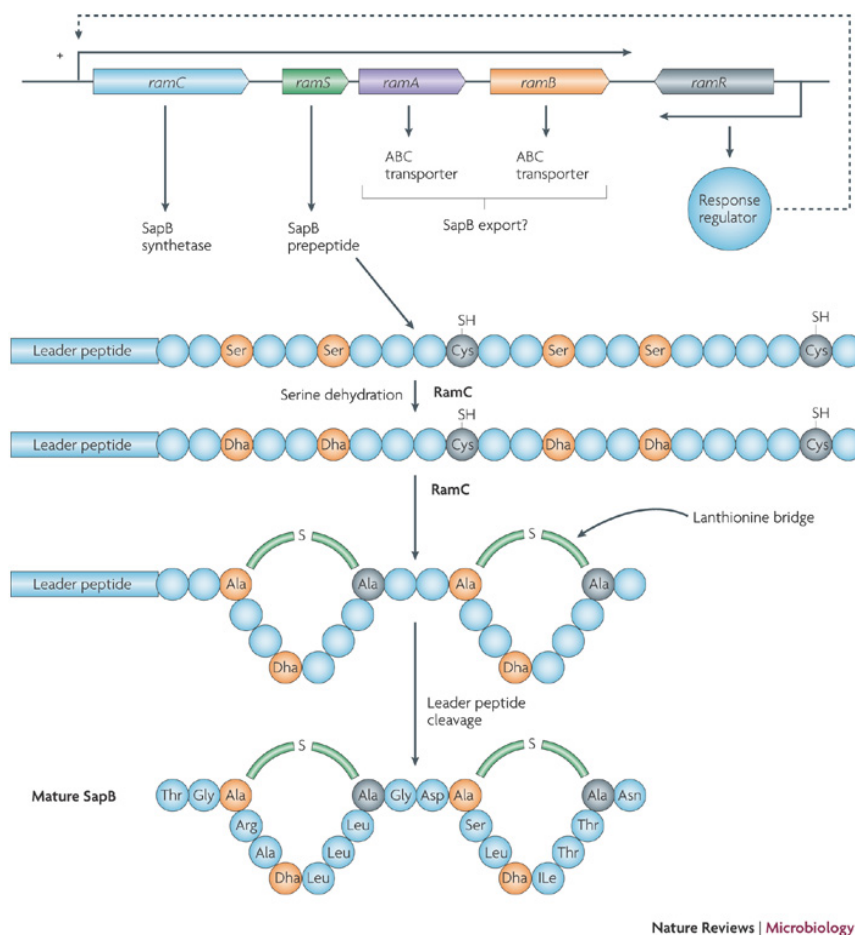
Sulla base di queste osservazioni, ciascun gene *bld* è implicato direttamente o indirettamente nel differenziamento morfologico e il punto finale di questa cascata è costituito dalla produzione e secrezione del peptide SapB, delle proteine chaplins (coelicolor hydrophobic aerial proteins) e rodlini.



**Figura 9. Complementazione extracellulare tra coppie di mutanti *bld*.** In alto a sinistra: i mutanti *bldA* e *bldH* non possono complementare tra di loro. In alto a destra: *bldG* è in grado di complementare *bldA*. In basso a sinistra: *bldG* è in grado di complementare *bldH*. In basso a destra: *bldD* è in grado di complementare *bldG*. Le diverse combinazioni tra coppie di mutanti hanno permesso di creare una gerarchia in cui *bldD* è il donatore universale:  $[bld261] < [bldA, bldH] < [bldG] < [bldC] < [bldD]$ . Il micelio aereo derivante dalla complementazione è evidente come un orlo bianco lungo il margine delle colonie (Willey J *et al.*, 1993).

## 1.5.2. Cluster dei geni *ram*

Il cluster dei geni *ram* (*rapid aerial mycelium*) rappresenta il legame diretto tra i geni *bld* e SapB. I geni di questo cluster sono organizzati in un operone che consiste dei geni *ramC*, *ramS*, *ramA* e *ramB* e, sul filamento opposto, del gene monocistronico *ramR* (Fig. 10).



**Figura 10. Cluster dei geni *ram* e pathway biosintetico del peptide lantibiotico-like, SapB.** SapB è prodotto dai geni del cluster *ram*. *ramR* codifica per un regolatore che attiva l'espressione dell'operone *ramCSAB*. *ramS* codifica per un pre-peptide di 42 amminoacidi che viene modificato post-traduzionalmente dal prodotto del gene *ramC* (Flardh e Buttener, 2009). Il dominio N-t di RamC è funzionalmente una serina deidratasi che converte quattro residui di serina, del precursore RamS, in deidroalanine (Dha). Questa tappa probabilmente è preceduta dalla formazione di un intermedio di fosfoserine che favorisce la successiva reazione di deidratazione. Il dominio N-t contiene infatti anche una attività serina/treonina chinasi. Il dominio C-t di RamC catalizza invece la formazione di un anello intramolecolare di lantionina mediante la formazione di un legame tioestere tra due residui di alanina (Kodani *et al.*, 2004). Infine, il peptide leader è rimosso da una proteasi sconosciuta per produrre il peptide maturo di 21 amminoacidi che può quindi essere secreto.

Il dominio C-t della proteina codificata da *ramC* è simile a quello degli enzimi necessari per la sintesi dei lantibiotici (Kodani *et al.*, 2004). I geni *ramAB* codificano per componenti di un trasportatore ABC (Ma *et al.*, 1994). *RamR* codifica per un regolatore e attiva l'operone *ramCSAB* legandosi alla regione del promotore (Ma *et al.*, 1994; Keijser *et*

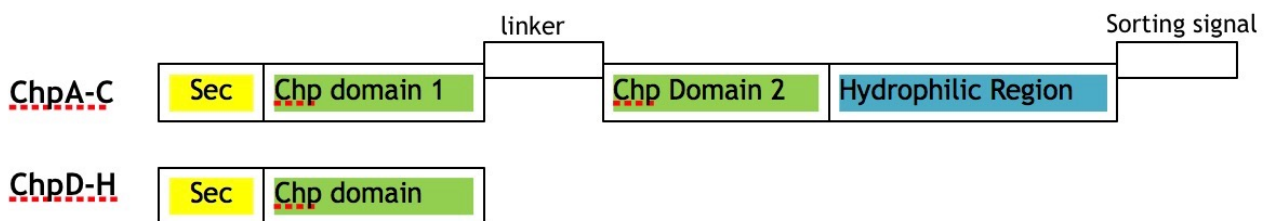
*al.*, 2002). Inoltre, *ramR* non è trascritto nei mutanti *bldA*, *bldB*, *bldH* e *bldD*, suggerendo che questo gene è attivato dalla cascata *bld* (Keijser *et al.*, 2002). Infine, *ramS* codifica per il precursore di SapB, un'oligopeptide di 42 amminoacidi, che viene processato, dal prodotto di *ramC*, nella forma matura di circa 21 amminoacidi.

SapB, da un punto di vista strutturale è un lantibiotico. I lantibiotici sono oligopeptidi con attività antibiotica, sintetizzati per via ribosomale, da batteri Gram-positivi. Essi sono sintetizzati come pre-peptidi inattivi, che in seguito a modifiche post-traduzionali e processamento proteolitico vengono convertiti nella forma matura (Fig. 10). Sebbene SapB è strutturalmente e biosinteticamente un lantibiotico, esso non ha attività antibiotica, ma è importante per il differenziamento di *S. coelicolor* su un mezzo ricco (Kodani *et al.*, 2004; Willey *et al.*, 2006). La struttura dedotta indica, che SapB è una molecola anfipatica e capace di auto-assemblarsi, e una volta secreta forma uno strato idrofobico sulla superficie delle ife. La sua funzione, infatti, è quella di agire da surfattante biologico abbassando la tensione superficiale all'interfaccia aria/acqua per consentire alle ife aeree di crescere verso l'alto (Tillotson *et al.*, 1998). SapB non è prodotto su un mezzo minimo, nonostante ciò si osserva la formazione delle ife aeree. Queste osservazioni indicano, quindi, la presenza di un pathway alternativo, indipendente da *sapB*, che media la formazione del micelio aereo.

### 1.5.3. Geni *rodmins* e *chaplins*

La fuga dall'ambiente acquoso è garantita anche dalla formazione, sulla superficie delle ife, di uno strato idrofobico detto rodlet layer. Questo strato ha una struttura a mosaico e dipende dalle proteine rodmins e da alcune chaplins, che come SapB, abbassano la tensione superficiale (Fig. 13). Le rodmins RdlA e RdlB sono localizzate sulla superficie esterna delle ife aeree e delle spore, anche se i loro geni sono espressi esclusivamente solo durante la crescita delle ife aeree. Delezioni su uno o entrambi i geni *rdl*, non impediscono la formazione di uno strato idrofobico, ma inducono la formazione di un rodlet layer del tutto disorganizzato. La presenza di questo strato disorganizzato sulla superficie dei mutanti *rdl* è dovuta alla presenza delle chaplins, un'altra famiglia di proteine idrofobiche, la cui espressione è attivata prima che inizi la formazione del micelio aereo, sia su un mezzo ricco che povero (Claessen *et al.*, 2002; 2004).

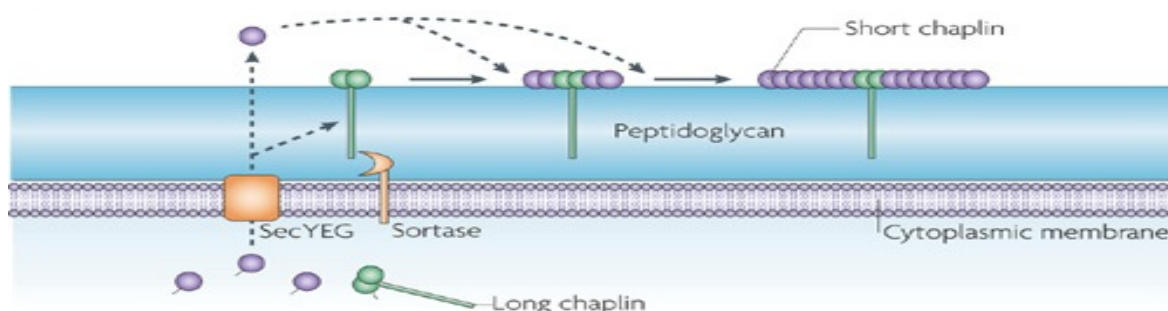
In *S. coelicolor* la famiglia delle chaplins consiste di otto proteine secrete (ChpA-H), caratterizzate da un dominio idrofobico altamente conservato di circa 50 amminoacidi, chiamato "chaplin domain". Le chaplins a loro volta sono divise in chaplins corte e lunghe (Fig. 11).



**Figura 11. Struttura delle Chaplins**

Le chaplins corte (ChpD-E-F-G-H) sono caratterizzate da un singolo "chaplin domain", preceduto da un peptide segnale di secrezione (Sec). Le chaplins lunghe (ChpA-B-C) sono, invece, caratterizzate da un peptide segnale di secrezione (Sec) nel dominio ammino-terminale, due "chaplin domain" separati da un linker flessibile nel dominio centrale, e da un segnale di sorting nel dominio carbossi-terminale che permette di legare covalentemente le chaplins nella parete delle ife aeree tramite l'enzima sortase (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003).

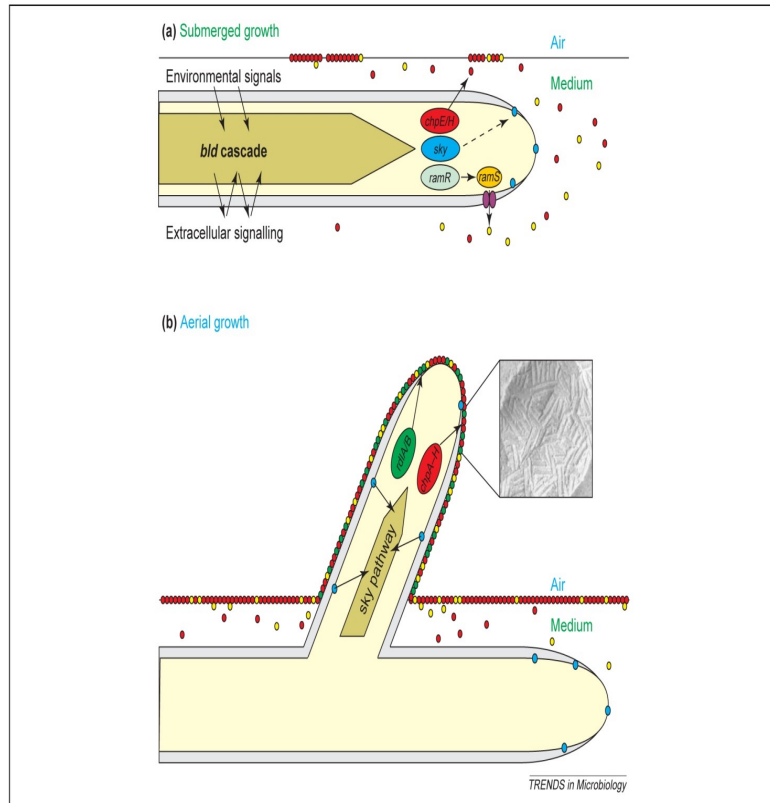
Una volta secrete le chaplins si auto-assemblano in piccole fibrille di 4-6 nm di diametro (Fig 12), e in presenza delle rodlins sono allineate in una struttura bastoncellare detta rodlet (Claessen *et al.*, 2004).



**Figura 12. Secrezione e auto-assemblaggio delle Chaplins** (Flardh e Buttener,2009).

Il rodlet layer che si forma previene il collasso delle ife, probabilmente incrementa la resistenza alle proteasi e favorisce una dispersione più efficiente delle spore tramite il vento e gli insetti (Claessen *et al.*, 2006). La corretta organizzazione del rodlet layer dipende quindi sia dalle rodlins che dalle chaplins (Fig 13). La delezione di cinque degli otto geni *chp* ( $\Delta chpABCDH$ ), ritarda notevolmente la morfogenesi, mentre la delezione di tutti e otto i geni *chp* ( $\Delta chpABCDEFGH$ ) abolisce completamente la formazione del micelio aereo. I pochi mutanti  $\Delta chp$  capaci di formare ife sono comunque in grado di formare spore (Claessen *et al.*, 2004).

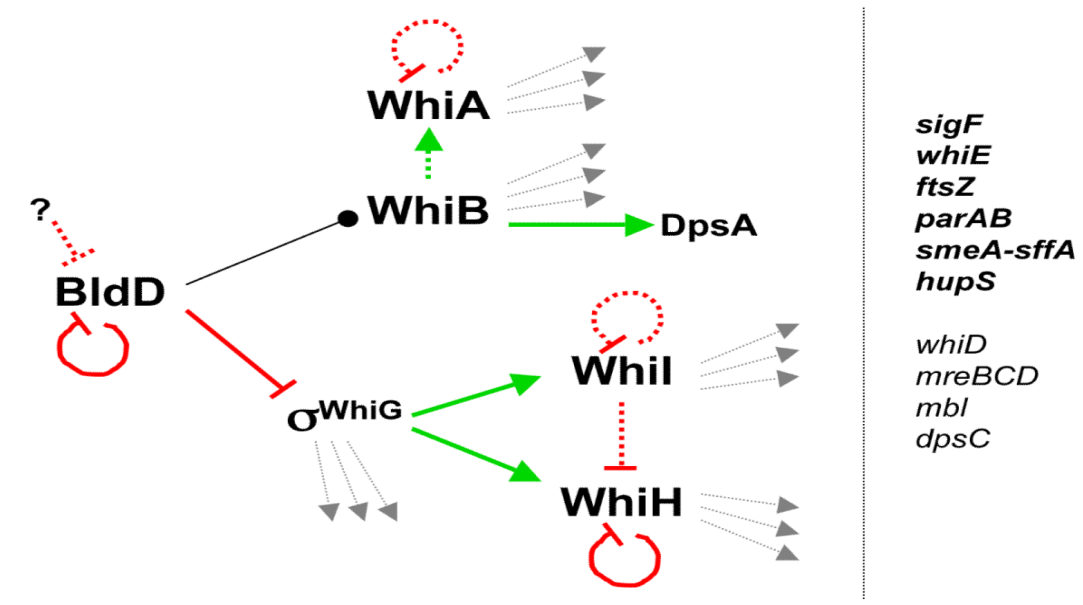




**Figura 13. Modello per la formazione delle ife aeree in *Streptomyces coelicolor*.** (a) Segnali ambientali e signalling indotti da molecole extracellulari esercitano la loro influenza sullo sviluppo attraverso la cascata *bld*. Questa cascata induce la formazione di RamR, delle chaplins ChpE e ChpH (cerchi rossi) e di componenti del pathway sky (cerchi blue). RamR attiva la sintesi di RamS, che viene convertito in SapB (cerchi gialli). SapB viene secreto attraverso il trasportatore RamAB (cerchi viola) e insieme a ChpE e ChpH, favoriscono la crescita del micelio aereo abbassando la tensione superficiale all'interfaccia aria/acqua. (b) Dopo il passaggio da crescita sommersa a crescita aerea prende il sopravvento il pathway sky. Questo pathway include un sensore della crescita aerea (cerchi blue). Come conseguenza, i geni *rodlin* e *chaplin*, e probabilmente altri geni sono attivati. Rodlins (cerchi verdi) e chaplins (cerchi rossi) si assemblano in un rodlet idrofobico che favorisce la crescita verso l'alto e previene l'aggregazione delle ife. L'inserto mostra come appare il rodlet layer al microscopio elettronico (Claessen *et al.*, 2006).

### 1.5.4. Geni *whi*

L'analisi dei mutanti *whi* ha permesso di identificare almeno cinque geni coinvolti nel processo di formazione delle spore: *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* e *whiI* (Fig. 14).

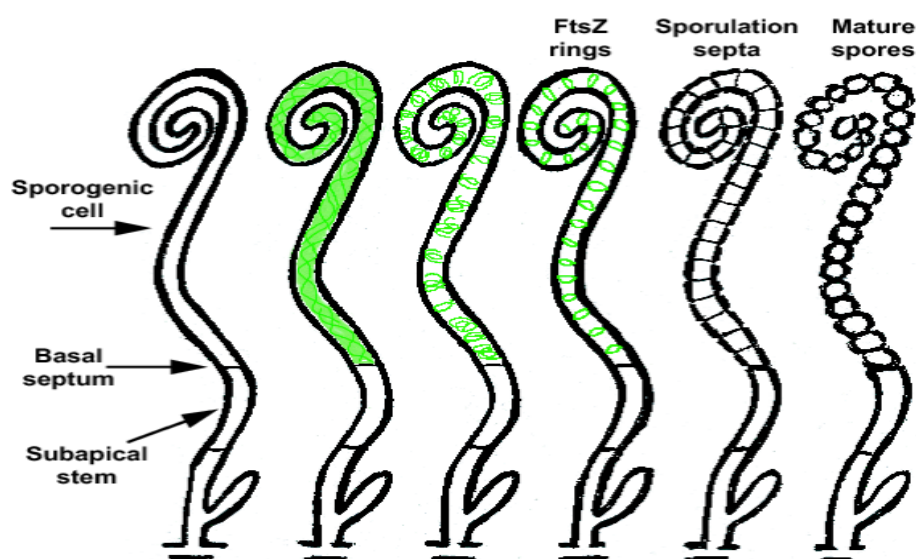


**Figura 14. Rappresentazione schematica dei geni *whi* coinvolti nel differenziamento delle ife aeree in spore in *S. coelicolor*.** Le frecce indicano un effetto positivo o attivante. Le linee perpendicolari alla fine della linea intera indica un controllo negativo o di repressione. Le linee tratteggiate indicano interazioni ipotetiche. Le linee che finiscono con un pallino indicano una interazione diretta, ma l'effetto sull'espressione del gene non è chiaro. I geni indicati in grassetto a destra della linea nera sono up-regolati durante la sporulazione e richiedono uno o più regolatori codificati dai geni *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* e *whiI*. Gli altri geni indicati risultano up-regolati durante la sporulazione ma non è chiara la dipendenza dai geni *whi* (McCormick *et al.*, 2012).

*whiG*, la cui espressione è repressa da *bldD*, codifica per un fattore sigma ( $\sigma_{whi}$ ) necessario per iniziare il processo di formazione delle spore (Chater *et al.*, 1989). Mutanti *whiG* sono bloccati negli stadi iniziali del processo di formazione delle spore, pertanto,  $\sigma_{whi}$ , potrebbe essere un regolatore delle ife aeree in ife sporulanti. Due geni target di *whiG* sono *whiI* e *whiH* che appartengono, rispettivamente, alla famiglia dei regolatori FixJ e GntR (Ryding *et al.*, 1998; Ainsa *et al.*, 1999). *whiI* può subire eventi di fosforilazione, probabilmente, da parte di una istidina chinasi che non è stata ancora identificata. Un'interessante caratteristica di *whiI* è che mutazioni a carico dei residui fosforilabili, non inficiano le tappe iniziali del differenziamento, mentre alterano il processo tardivo di maturazione delle spore. Questo suggerisce che potrebbe subire uno switch tra due differenti stati, uno richiesto per la formazione del compartimento che precede la formazione delle spore, ed uno necessario, successivamente, per la maturazione delle spore (Tian *et al.*,

2007). Infatti, mutanti nulli per *whiI* sono bloccati nel processo di settazione delle spore e nella condensazione cromosomale (Ainsa *et al.*, 1999). Inoltre *whiI*, oltre a regolare negativamente se stesso, reprime anche l'espressione di *whiH* (Ryding *et al.*, 1998; Ainsa *et al.*, 1999).

Altri due geni richiesti per la sporulazione sono *whiA* e *whiB*. La trascrizione di questi geni è indipendente da *whiG*, suggerendo quindi che *whiA/whiB* e *whiG/whiH/whiI* formano due pathway paralleli ma convergenti (Fig. 14) (Solieri *et al.*, 1992; Chater, 1999). Il legame di *bldD* sul promotore di *whiB* suggerisce un controllo negativo di *bldD* sul pathway *whiA/whiB* (den Hengst *et al.*, 2010). La de-repressione di *whiB* durante lo sviluppo, permette a quest'ultimo di potere attivare l'espressione di *whiA*. Ceppi mutati nei geni *whiA* o *whiB* mostrano un fenotipo essenzialmente identico caratterizzato da ife aeree lunghe e prive di setti (Chater, 1972; Flardh *et al.*, 1999). In Fig. 15 sono riassunti gli stadi di differenziamento delle ife aeree in catene di spore.



**Figura 15. Stadi del differenziamento delle ife aeree in catene di spore. rappresentazione schematica della conversione di una cellula sporogena apicale in una catena di spore.** Un setto basale delimita la cellula sporogena apicale dalla sottostante cellula definita "subapical stem". In verde è indicata la produzione di FtsZ nelle cellule sporogeniche e la formazione dei "Z rings" che determinano la formazione dei setti necessari alla formazione di catene di spore (McCormick *et al.*, 2012).

## 1.6 Antibiotici prodotti da *Streptomyces coelicolor*

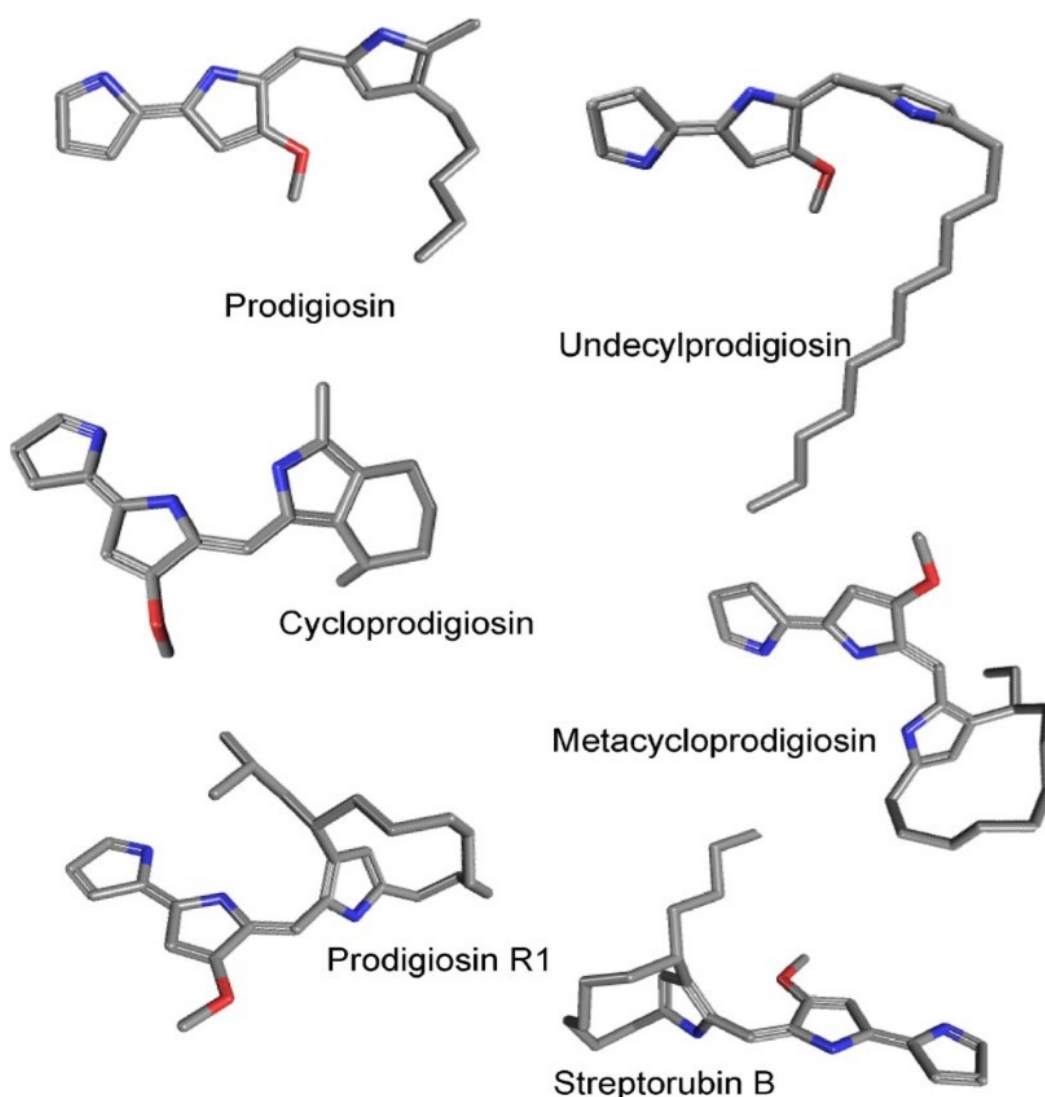
Prima del sequenziamento del genoma si pensava che *S. coelicolor* producesse cinque metaboliti secondari, quali l'antibiotico actinorodina, l'undecilprodigiosina, l'antibiotico calcio dipendente (CDA) (Hopwood *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1998), un sideroforo e il pigmento grigio delle spore (Davis *et al.*, 1990). L'analisi della sequenza nucleotidica del cromosoma ha rivelato che il ceppo contiene un numero nettamente più elevato di cluster biosintetici per metaboliti secondari e in particolare sono stati identificati altri 18 cluster necessari per la sintesi di policheti, peptidi, siderofori, opanoidi, feromoni e terpeni.

Gli antibiotici più caratterizzati prodotti da *Streptomyces coelicolor* sono actinorodina, undecilprodigiosina e l'antibiotico calcio dipendente:

- l'actinorodina (Act), un antibiotico di colore blu diffusibile da cui il batterio prende il nome, viene prodotto a livello intracellulare e poi secreto all'esterno, in particolare il colore è dato dalla forma lattonica dell'antibiotico, la  $\gamma$ -actinorodina, è anche un indicatore di pH che diventa rosso in condizioni acide e blu in condizione di base (Coisne, 1999; Bystrykn *et al.*, 1996) ed è stato molto utile proprio per isolare *Streptomyces coelicolor*. Attualmente l'actinorodina non viene utilizzata farmaceuticamente, ma i suoi geni codificanti sono stati studiati per la produzione di antibiotici polichetidici in altre specie;
- l'undecilprodigiosina (Red), un antibiotico miceliale di colore rosso appartenente alla famiglia delle prodigiosine, (Chater e Bibb, 1997; Champness, 2000), anche utilizzato come agente antitumorale e come immunosoppressore;
- il CDA, un antibiotico calcio-dipendente (Chong *et al.*, 1998), è così chiamato perché la sua attività battericida contro i batteri gram-positivi è svolta solo in presenza di ioni calcio,

## 1.7 Prodigiosine

Le prodigiosine sono una grande famiglia di antibiotici tripirrolici pigmentati di colore rosso, prodotti come metaboliti secondari (Fig. 16) da molti batteri sia marini che terrestri, fra i quali *S. coelicolor* (Gerber 1975a; Hobbs *et al.* 1990; Kawasaki *et al.* 2008). L'interesse nei confronti di questa particolare classe di antibiotici, dipende dalla loro attività antitumorale, immunosoppressiva, antifungina, antibatterica, antiprotozoica e antimalarica, a livelli non tossici per le cellule di mammifero (Williamson *et al.* 2006).



**Figura 16. Prodigiosine batteriche.**

Molte attività antimicrobiche sono dovute alla conformazione delle prodigiosine, infatti le concentrazioni minime di inibizione, sia nei confronti di batteri Gram-positivi che

di batteri Gram negativi, variano da 10 a 100 µg/mL. Solitamente le prodigiosine con forma ciclica hanno una maggiore attività antibatterica rispetto a quelle lineari (Lee *et al.* 2011). Le prodigiosine hanno degli effetti antifungini su *Trichophyton* che è causa del “piede dell'atleta”, malattia che, ad oggi, può essere curata solo con pochissimi farmaci (Nakashima *et al.* 2005). È stato anche dimostrato che ad elevate concentrazioni hanno un'attività antifungina sui patogeni delle piante (Someya *et al.* 2001). Ulteriore proprietà delle prodigiosine è quella antimalarica. In vitro prodigiosina ed undecilprodigiosina, a concentrazioni nanomolari, al di sotto dei livelli di citotossicità, hanno elevate attività contro *Plasmodium falciparum*, causa eziologica della malaria (Castro 1967). Le proprietà maggiormente studiate sono quelle antitumorali ed immunosoppressive. È stato dimostrato che le prodigiosine hanno la capacità di contribuire ad indurre la necrosi del tumore (Bennett and Bentley 2000). Le prodigiosine sono state saggiate in più di 60 tipologie diverse di tumori ed è stato confermato che inibiscono la proliferazione dei linfociti T in cellule di topo (Han *et al.*, 1998; Magae *et al.* 1996; Nakamura *et al.* 1986). A livelli non citotossici per le cellule, le prodigiosine svolgono anche un ruolo preventivo nello sviluppo del cancro, bloccando il ciclo cellulare: agiscono alcalinizzando i compartimenti cellulari acidi, come i lisosomi, e aumentano l'acidità del citoplasma (Melvin *et al.* 1999). Infine le prodigiosine interferiscono con il pathway delle MAPK (attivato da RAS, spesso mutato, o non più funzionale, in molti tipi di tumori), compromettendo lo sviluppo del tumore (Dhillon *et al.* 2007).

## 1.7.1 Cluster *red*

*Streptomyces coelicolor* produce l'undecilprodigosina ed il suo derivato ciclico, la streptorubina B. La biosintesi dell'undecilprodigosina e del suo derivato ciclico è diretta dal cluster *Red*. Il cluster *Red* consta di 23 geni ed è organizzato, inoltre, in quattro differenti unità trascrizionali (Cerdeño *et al.* 2001) (Fig. 17).

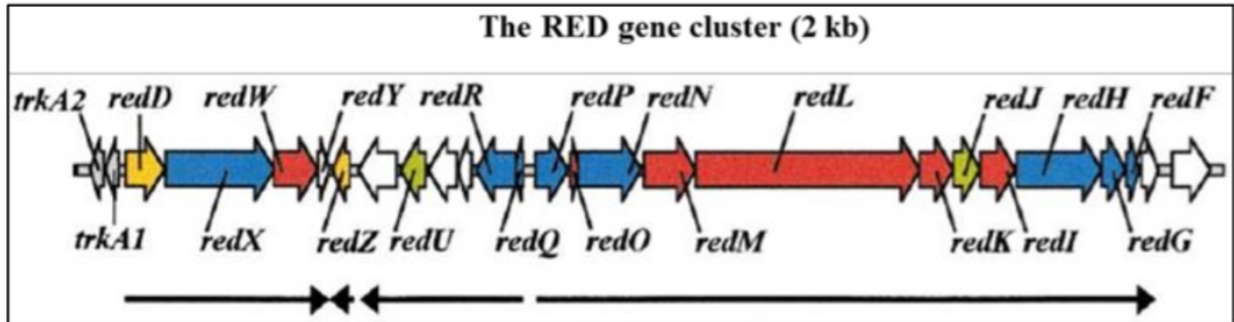


Figura 17. Organizzazione del cluster *red* di *S. coelicolor*. Le frecce nere in basso indicano le quattro unità trascrizionali.

In particolare, la biosintesi di prodigosine avviene tramite la formazione e la condensazione di due intermedi, il 4-metossi- 2,2'-dipirrolo-5-carbossaldeide (MBC) e un monopirrolo, nel caso di *S. coelicolor* il 2-undecilpirrolo (2UP) (Stanley *et al.* 2006) (Fig. 18).

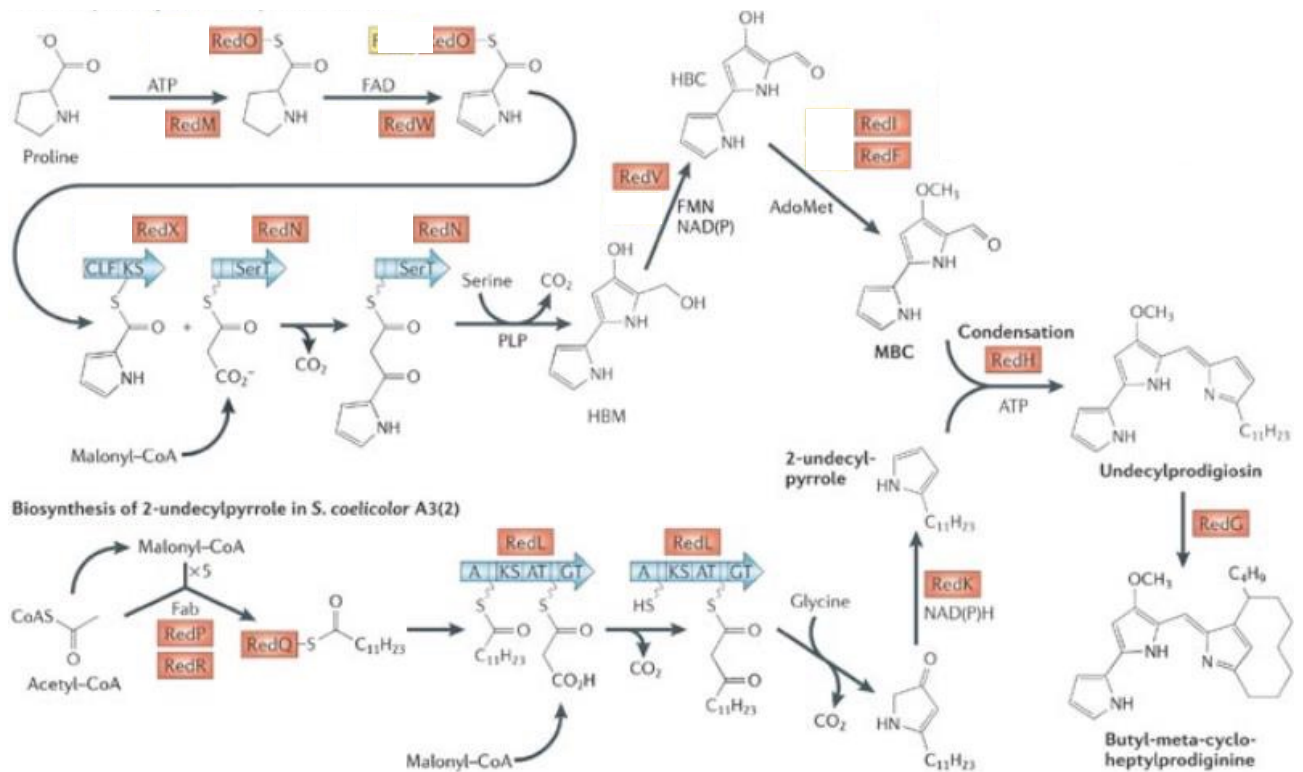


Figura 18. Biosintesi dell'undecilprodigosina e della streptorubina B.

Il pathway *red* è regolato da una minicascata trascrizionale, operata da due regolatori trascrizionali: *redD* e *redZ*. In particolare, la produzione di undecilprodigiosina in *S. coelicolor* A3(2) è sotto il controllo positivo dell'attivatore pathway-specifico *redD*, che fa parte delle proteine SARP (streptomycete antibiotic regulatory protein). *RedZ*, d'altro canto, attiva la trascrizione di *redD*. *RedZ*, inoltre, si autoregola negativamente, ed è sotto il controllo traduzionale di *bldA*, che, come già detto, codifica per un tRNA per un raro codone della leucina (UUA) ( Fig. 18) (Williamson *et al.*, 2006). Ciò è dimostrato dal fatto che, in vitro, il legame di *redZ* al promotore di *redD* è inibito dall'aggiunta di undecilprodigiosina, per cui è implicito un meccanismo a feedback negativo che modula la produzione di tale metabolita secondario ( Wang *et al.*, 2009) (Fig. 19).

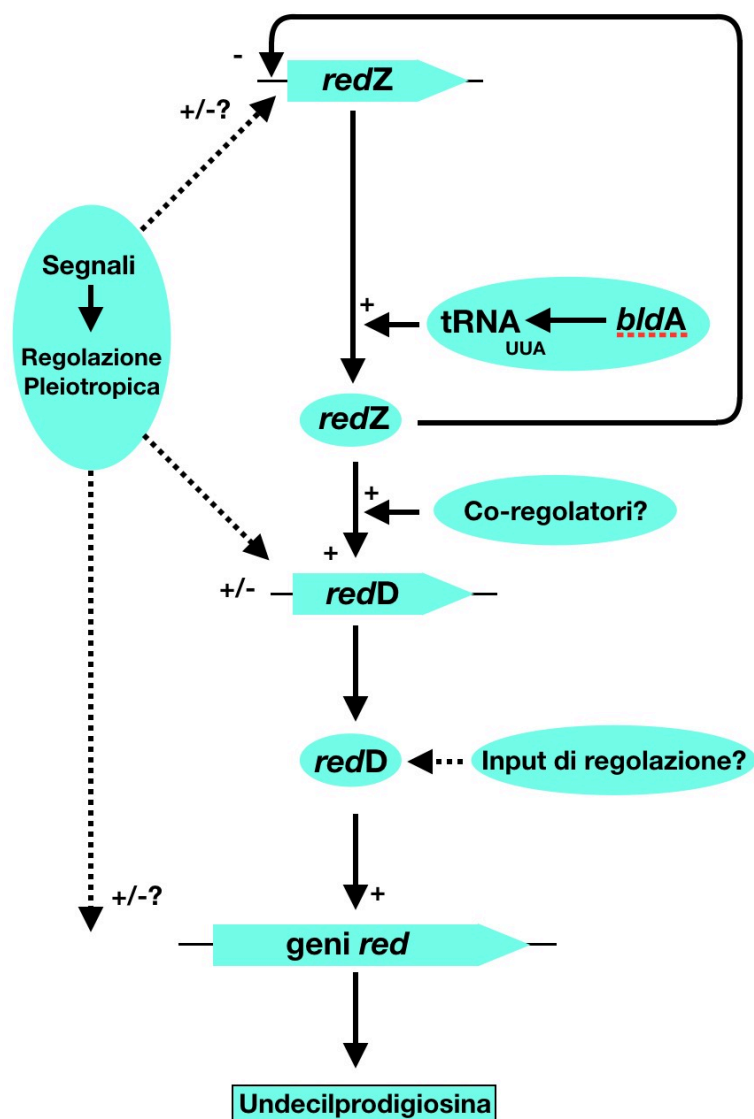


Figura 19. Cascata di regolazione dei geni *red*.



Fra gli altri geni, invece, *redP*, *Q*, *R*, *K* ed *L*, sono implicati nella biosintesi del 2UP (Mo S.J., *et al.*, 2008) mentre *redO*, *W*, *M*, *N*, *X*, *V*, *I* ed *F* sono coinvolti nella sintesi dell'MBC (Stanley A. E., *et al.*, 2006) (Fig. 19). Di elevato interesse, è, inoltre, il gene *redH*, che codifica per una proteina che catalizza la condensazione dei due intermedi, a formare, appunto, l'undecilprodigosina (Haynes *et al.* 2008). Infine importante è il ruolo di *redG*, proteina che consente l'ulteriore carbociclizzazione ossidativa dell'undecilprodigosina, formando così la streptorubina B (Withall D. M. *et al.*, 2015; Haynes *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2008).

## 2. SCOPO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA

Negli ultimi decenni la comunità scientifica ha manifestato grande interesse per gli streptomiceti poichè sono caratterizzati da un differenziamento morfologico e fisiologico che culmina con la produzione di spore e di numerosi metaboliti secondari con proprietà antibiotiche, antibatteriche e antitumorali. Nel corso degli anni il differenziamento morfologico è stato studiato utilizzando principalmente due classi di ceppi mutanti. I mutanti *bld*, incapaci di formare il micelio aereo (Hopwood *et al.*, 1970) sono utilizzati per studiare i meccanismi che regolano la transizione da micelio substrato a micelio aereo, invece i mutanti *whi*, incapaci di formare spore (Hopwood *et al.*, 1970; Chater, 1972) sono utilizzati per studiare il processo di formazione delle spore. Spesso i mutanti del differenziamento, oltre a mostrare delle differenze dal punto di vista morfologico, presentano delle diversità fisiologiche che si manifestano con una produzione diversa in termini di quantità e qualità di metaboliti secondari, e in particolare di antibiotici.

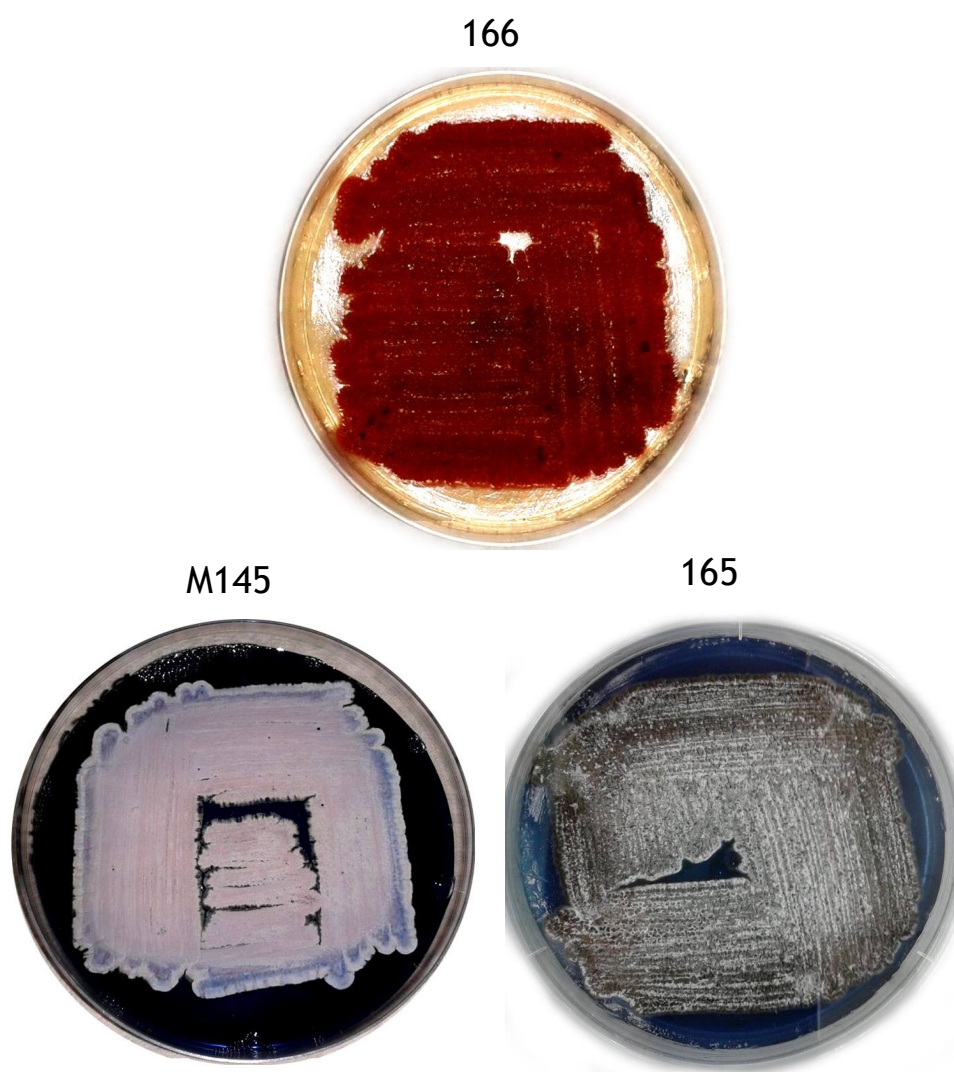
Lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di caratterizzare il ceppo 166 *bldF* di *Streptomyces coelicolor*. Il ceppo 166 (*hisBp*, *pheA1*, *strRA1 bldF*, Puglia *et al.*, 1984), ottenuto in seguito a mutagenesi random tramite trattamento con nitrosoguanidina (Puglia *et al.*, 1984) non produce, a differenza di altri mutanti *bld*, micelio aereo e spore in tutte le condizioni di crescita saggiate. E' auxotrofo per gli aminoacidi istidina e fenilalanina ed è streptomycin resistente. Produce su terreno solido grandi quantità dell'antibiotico miceliale undecilprodigiosina ma non è in grado di produrre l'antibiotico blu diffusibile actinorodina (Puglia *et al.*, 1984) (Fig. 20).

Analisi PFGE (Pulsed Gel Electrophoresis) e analisi del genoma del ceppo 166, eseguite in collaborazione con il Dr. Marco Galardini del Dip. di Biologia dell'Università degli Studi di Firenze, mostrano una delezione nel braccio destro del cromosoma, in prossimità di uno dei telomeri, di circa 60 Kb comprendente i geni SCO7757-7826, come il ceppo 165 da cui deriva, e numerose mutazioni puntiformi lungo il genoma (manoscritto in preparazione).

Tutti i tentativi di identificare il/i gene/i che causano il fenotipo *bldF* non hanno avuto successo (Passantino *et al.*, 1991) probabilmente perché il ceppo ha subito più di una

mutazione. Inoltre il ceppo 166 non produce la proteina SapB e non complementa né subisce complementazione extracellulare con altri ceppi *bld*.

Per questo lavoro in tutti gli esperimenti condotti sono stati analizzati come controllo il ceppo 165 e il ceppo M145 di *S.coelicolor*. Il ceppo 165 (*hisBp*, *pheA1*, *strRA1*, SCP1-, SCP2+, Puglia *et al.*, 1982) è stato ottenuto dal ceppo wild-type A3(2) ed è caratterizzato da un differenziamento limitato di ife aeree e spore. Inoltre, è auxotrofo per l'istidina e la fenilalanina ed è streptomicina resistente. Produce gli antibiotici undecilprodigiosina e actinorodina la cui diffusione nel terreno di coltura è molto evidente per il colore blu intenso. (Fig. 20).



**Figura 20: fenotipo dei ceppi 166, M145 e 165.**

Il ceppo wild-type, M145, è privo del plasmide lineare SCP1 e del plasmide circolare SCP2 (SCP1-, SCP2-, Kieser *et al.*, 2000), e deriva dal ceppo wild-type di *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Hopwood *et al.*, 1973 Bentley *et al* 2002). Coltivato su terreno solido forma delle colonie bianche e opache, che diventano successivamente grigie in seguito alla produzione delle spore, caratterizzate dalla presenza di un pigmento grigio associato alla parete (Fig. 20).

Pertanto lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare e approfondire le conoscenze morfo-fisiologiche sul ceppo mutante del differenziamento 166, eseguendo:

- analisi di Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) volte a rivelare differenze morfologiche;
- analisi zimografiche per saggiare la presenza di proteasi secrete;
- analisi proteomiche differenziali per identificare, mediante analisi di spettrometria di massa Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF), proteine differenzialmente abbondanti e pathway metabolici in cui sono coinvolte;.
- analisi di Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) per indagare i livelli d'espressione di geni specifici coinvolti nel metabolismo;
- analisi della produzione di molecole bioattive e di lipidi attraverso cromatografia e gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

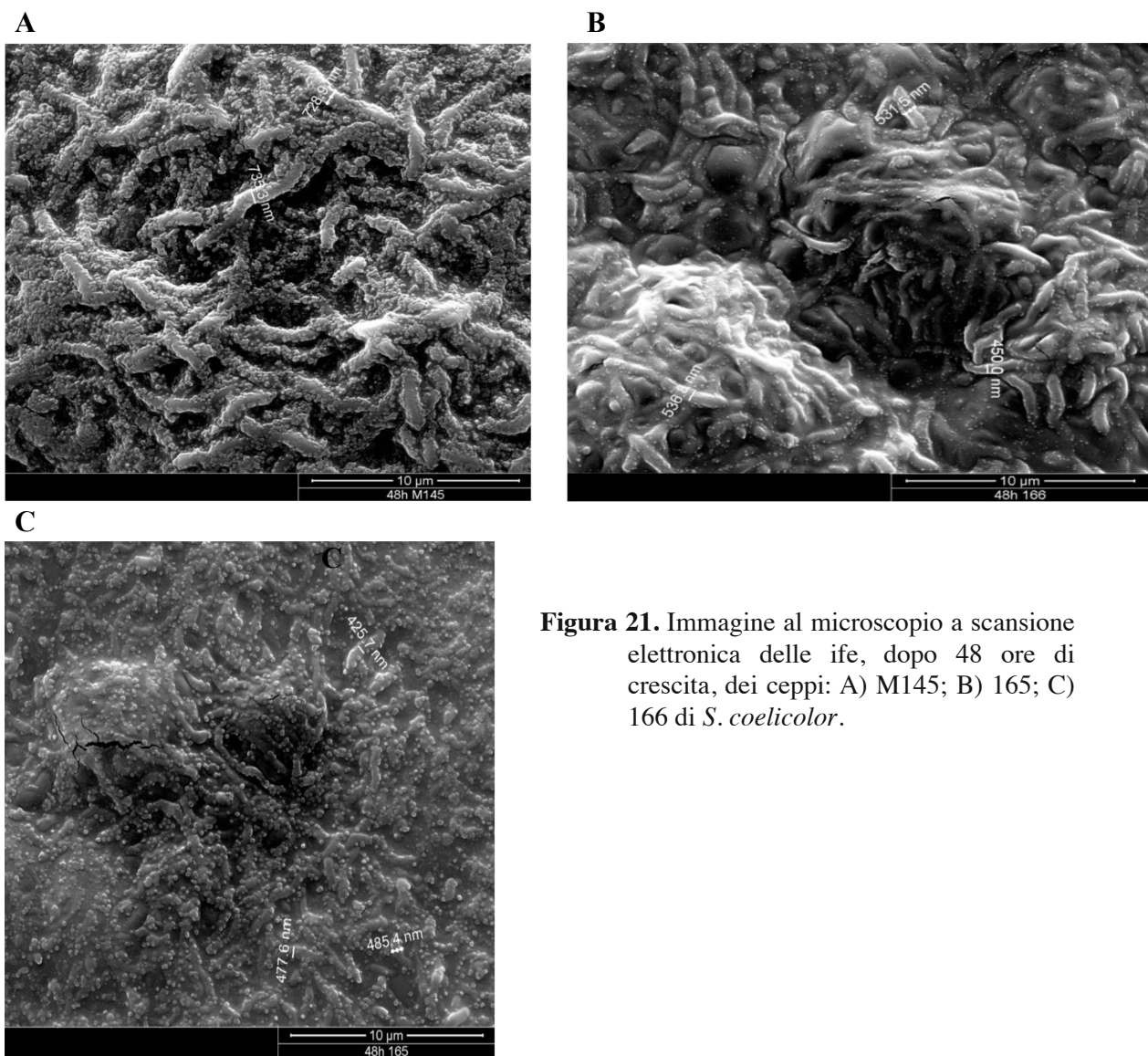
Gli streptomiceti sono un importante risorsa di antibiotici e composti bioattivi di grande importanza commerciale. Più di metà dei farmaci antimicrobici e degli agenti antitumorali di rilevanza clinica sono prodotti da questo genere (Liu et al., 2013; Sánchez, S., & Demain, A. L. 2014). In particolare *Streptomyces coelicolor* A3(2) è il ceppo più studiato ed è utilizzato come modello per lo studio degli actinomiceti.

Il complesso differenziamento morfologico e fisiologico di *S. coelicolor* è stato studiato utilizzando principalmente due classi di ceppi mutanti. I mutanti *bld*, incapaci di formare il micelio aereo (Hopwood et al., 1970), e i mutanti *whi*, incapaci di formare spore (Hopwood et al., 1970; Chater, 1972). I mutanti del differenziamento, oltre a mostrare delle differenze dal punto di vista morfologico, presentano delle diversità fisiologiche che si manifestano con una produzione differente in termini di quantità e qualità di metaboliti secondari, e in particolare di antibiotici.

In questo lavoro è stato studiato un ceppo mutante del differenziamento denominato 166 *bldF* ottenuto nel laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologie del dipartimento STEBICEF dell'Università di Palermo.

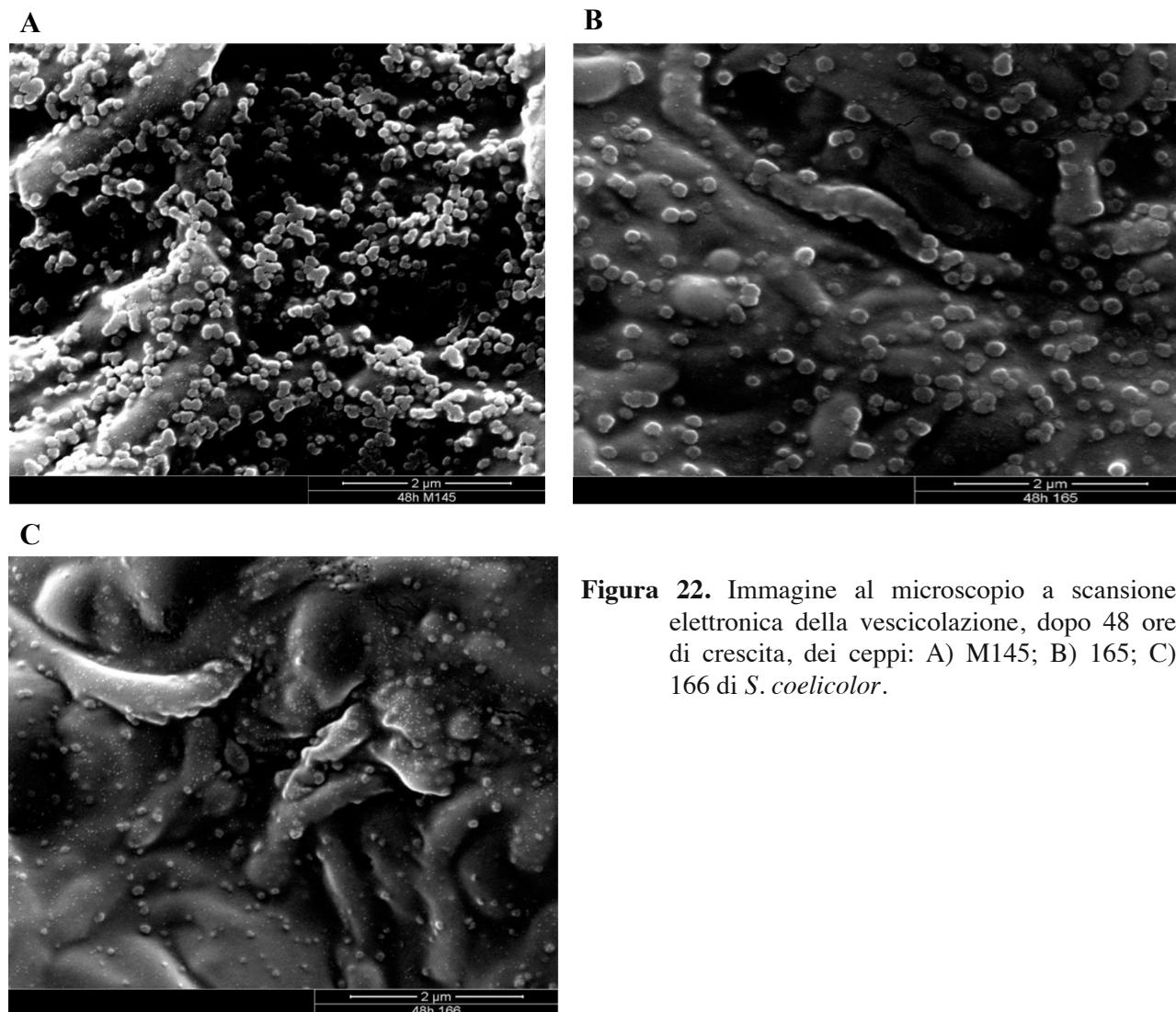
### 3.1 Analisi di Microscopia a Scansione Elettronica delle ife del ceppo 166 di *Streptomyces coelicolor*

Il ceppo 166 e i due ceppi controllo sono stati fatti crescere su terreno agarizzato R2YED. Dopo 48 ore di crescita il micelio presente in una fettina di 1 cm<sup>2</sup> di terreno è stato osservato mediante microscopia elettronica a scansione. Quest'analisi ha rivelato che i ceppi 166 e 165 presentano in media delle ife con diametro di circa 500 nm, mentre le ife del ceppo M145 presentano un diametro di circa 730 nm (Fig. 21). Il ceppo 166 quindi produce ife di diametro inferiore a quelle del ceppo wild type e uguali a quelle del ceppo da cui deriva.



**Figura 21.** Immagine al microscopio a scansione elettronica delle ife, dopo 48 ore di crescita, dei ceppi: A) M145; B) 165; C) 166 di *S. coelicolor*.

Ad un ingrandimento maggiore è stato possibile osservare che sulla superficie delle ife del ceppo M145 sono presenti numerose vescicole extracellulari che ricoprono quasi completamente la superficie delle ife (Fig. 22). Invece, nel ceppo 166 *bldF* le vescicole sono presenti in quantità decisamente inferiore. Il ceppo 165 ha invece un numero più elevato di vescicole extracellulari rispetto al ceppo 166.



**Figura 22.** Immagine al microscopio a scansione elettronica della vescicolazione, dopo 48 ore di crescita, dei ceppi: A) M145; B) 165; C) 166 di *S. coelicolor*.

Le vescicole extracellulari batteriche sono particelle sferiche costituite da un doppio strato fosfolipidico con dimensioni che variano da 10 a 200 nm e possono contenere diverse componenti cellulari come proteine, acidi nucleici, lipidi, molecole biologicamente attive, molecole segnale (Brown *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Le vescicole mediano diverse funzioni biologiche come: la comunicazione intercellulare, l'export di molecole, la formazione di biofilm, il trasferimento orizzontale di materiale genetico, uptake di nutrienti ma anche il rilascio di tossine e fattori di virulenza (Liu *et al.*, 2018).

Questi risultati mostrano per la prima volta che le ife del micelio di *S.coelicolor* cresciuto su terreno solido producono vescicole. Fino ad oggi le vescicole erano state osservate nelle “Blue droplets “, essudati sulla superficie del micelio sporificato del batterio (Schrempf *et al.*, 2011).



### 3.2 Saggio dell' attività proteasica delle proteine secrete dal ceppo 166 di *Streptomyces coelicolor*

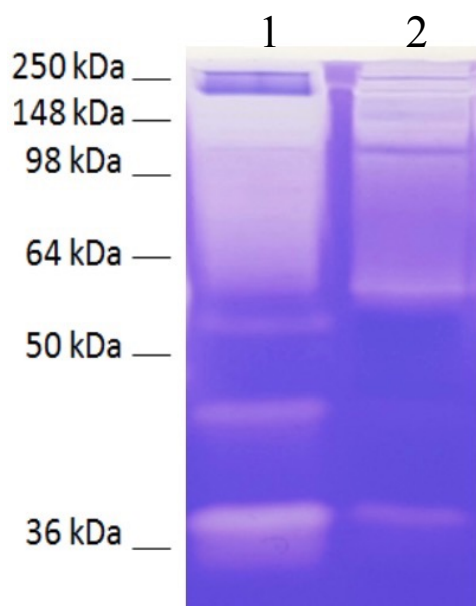
Gli Streptomiceti, come detto in precedenza, sono in grado di secernere parecchi enzimi extracellulari ed in particolare enzimi con attività idrolitiche (Bentley SD, 2002; Coté A *et al.*, 2007; Salamone M. *et al.*, 2015). A tal proposito è stata saggiata qualitativamente la possibilità da parte del ceppo 166 di *S. coelicolor* di secernere attività proteasiche.

E' stato prelevato lo spent medium dei ceppi 166 e M145 cresciuti in terreno liquido minimo Ferm II media (Ghorbel, 2014) per 5 giorni, ed è stata eseguita un' analisi quantitativa tramite il saggio di Bradford, attraverso cui è stata ricavata la concentrazione di ciascun campione (Tab.6)

Ceppo di <i>S. coelicolor</i>	Concentrazione di proteine nello spent medium
166 di <i>S. coelicolor</i>	5,73 µg/µl
M145 di <i>S. coelicolor</i>	6,4 µg/µl

**Tabella 6 .** Concentrazioni proteiche presenti nello spent medium dei ceppi 166 e M145 di *S. coelicolor*, ottenute mediante saggio di Bradford.

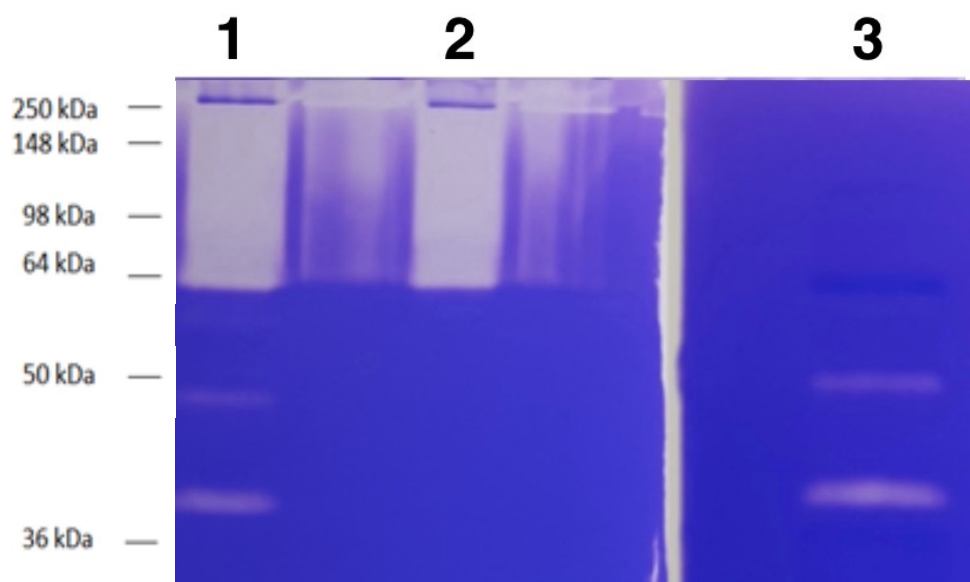
Per verificare la presenza di attività proteasica è stato effettuato un saggio zimografico delle proteine secrete, utilizzando come substrato la gelatina. L'analisi ha evidenziato come il ceppo 166 secerne diverse proteasi con pesi molecolari di circa 120, 58, 45 e 36kDa. Anche il ceppo M145 di *S. coelicolor* possiede delle proteasi di pesi molecolari paragonabili, tuttavia l'intensità delle bande corrispondenti alle attività proteiche risulta nettamente inferiore (fig. 23).



**Figura 23. Zimografia degli spent medium dei ceppi 166 e M145 di *S. coelicolor*.** Lane 1: spent medium del ceppo 166 di *S. coelicolor*; lane 2: spent medium del ceppo M145 di *S. coelicolor*.

Per determinare le sottoclassi di proteasi presenti nello spent medium del ceppo 166 di *S. coelicolor*, è stato eseguito un saggio zimografico utilizzando inibitori che agiscono in modo specifico sui meccanismi di idrolisi degli enzimi.

Lo spent medium è stato trattato con gli inibitori leupeptina, pepstatina, aprotinina, PMSF ed

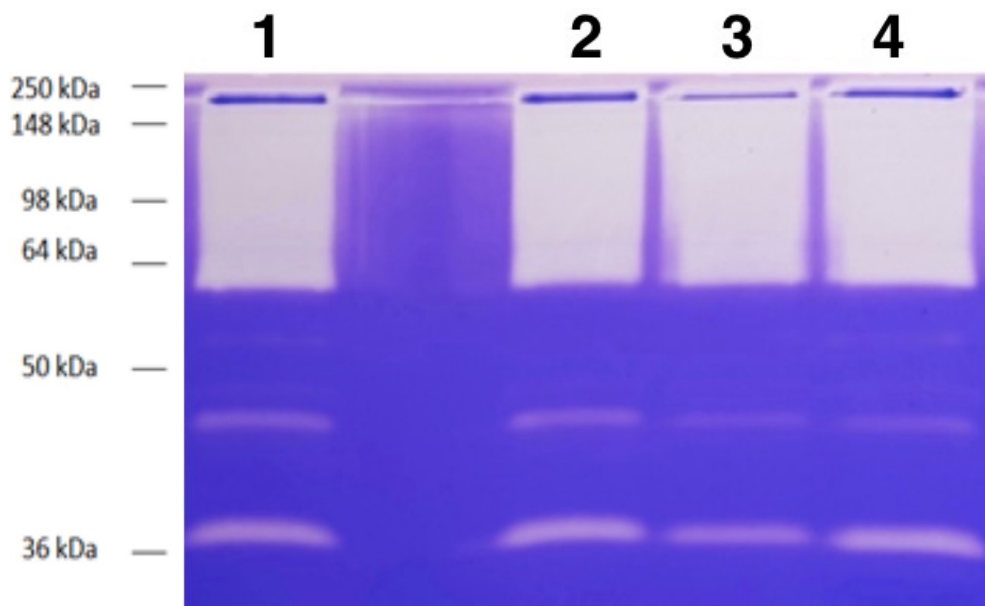


**Figura 24. Zimografia con inibitori di proteasi degli spent medium del ceppo 166 di *S. coelicolor*.** Lane 1: spent medium senza inibitori; lane 2: spent medium con aggiunta di PMSF; lane 3: spent medium con aggiunta di EDTA.

EDTA.

Dai risultati ottenuti si evince che lo spenti medium del ceppo 166 di *S. coelicolor* contiene metallo proteasi, sensibili all' inibitore EDTA che provoca la scomparsa delle bande proteiche di circa 120 e 58 kDa. Il PMSF invece provoca la scomparsa delle bande proteiche di circa 45 e 36 kDa, suggerendo che queste siano serino proteasi (Fig. 24).

Infine è possibile notare che pepstatina, leupeptina e aprotinina non hanno alcun effetto sull'attività proteasica secreta (Fig 25).



**Figura 25. Zimografia con inibitori di proteasi degli spent medium del ceppo 166 di *S. coelicolor*.** Lane 1: spent medium senza inibitori; lane 2: spent medium con aggiunta di pepstatina; lane 3: spent medium con aggiunta di leupeptina; lane 4: spent medium con aggiunta di aprotinina.

### **3.3 Analisi proteomica differenziale del ceppo 166 di *Streptomyces coelicolor***

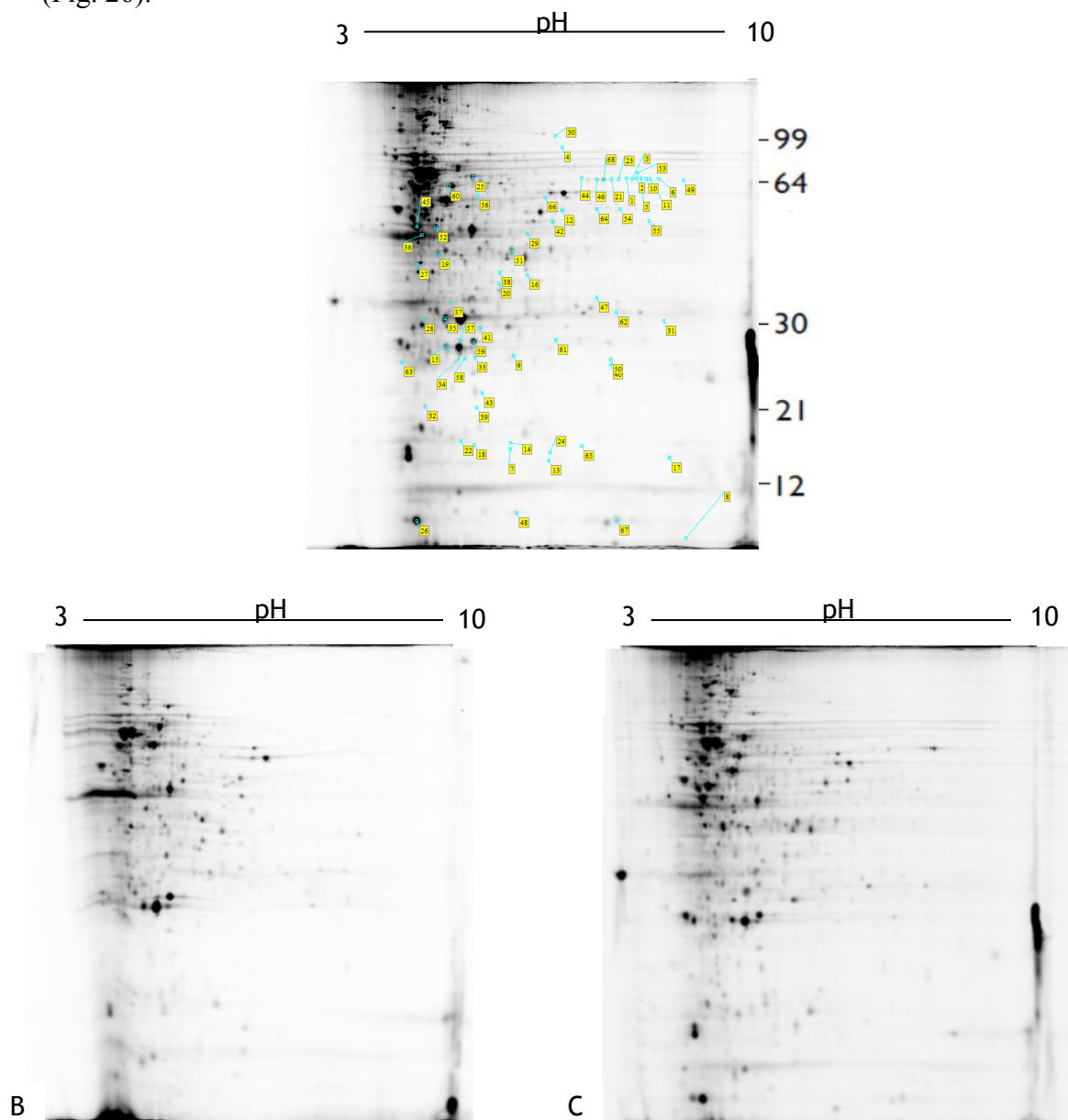
Per questa analisi sono state utilizzate le biomasse prelevate a due tempi di crescita (24 e 32 ore) da due replicati biologici di colture in parallelo coltivate in terreno liquido R2YED. Per ogni replicato biologico sono stati utilizzati due replicati tecnici.

Gli estratti proteici, la cui qualità è stata valutata mediante analisi SDS-PAGE, sono stati marcati utilizzando il kit *CyDye minimal labeling* (GE Healthcare) descritto in dettaglio nella sezione materiali e metodi. L'analisi 2D-DIGE è stata condotta utilizzando strip con gradiente non lineare di pH immobilizzato (IPG) 3-10 (18 cm) per l'isoelettrofocalizzazione (I dimensione) e SDS-PAGE con gel al 12,5% per la separazione dei campioni proteici (II dimensione).

Le immagini degli elettroferogrammi bidimensionali (2D-Gel) sono state acquisite grazie all'utilizzo dello scanner a fluorescenza *Ettan Dige Imager*, quindi processate e analizzate attraverso il software "*Image Master 2D platinum 7.0*". Le immagini dei 2D-Gel sono state comparate utilizzando il ceppo wild type M145 come riferimento e sono state considerate differenzialmente abbondanti in maniera statisticamente significativa, le spot incrementate o diminuite di 1,3 volte (calcolata come volume della spot) con una probabilità di ipotesi nulla ( $p$ ) minore di 0.06 ( $p < 0.06$ ) (calcolata usando l'ANOVA test).

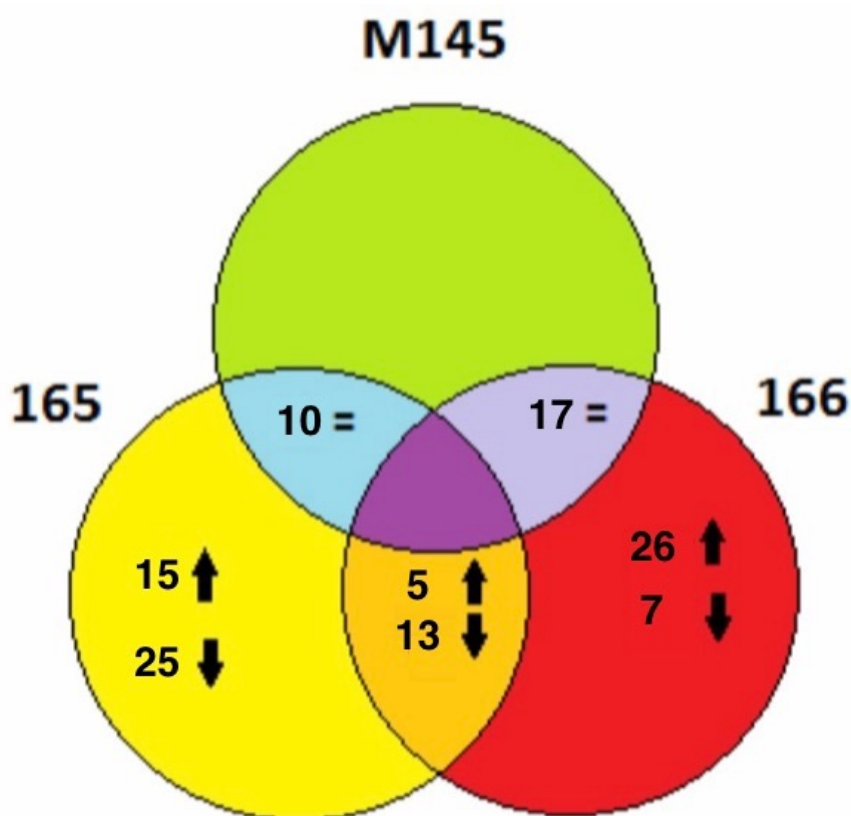
### 3.3.1 Analisi proteomica del ceppo 166 dopo 24 ore di crescita

L'analisi differenziale degli estratti proteici proveniente da biomasse prelevate da colture cresciute per 24 ore ha rivelato 68 spot differenzialmente abbondanti. Confrontando i valori di abbondanza relativa è stato possibile raggruppare le spot differenzialmente abbondanti in 7 profili di espressione ( $165 < M145 < 166$ ;  $165 > M145 < 166$ ;  $165 = M145 < 166$ ;  $165 > M145 > 166$ ;  $165 < M145 > 166$ ;  $165 > M145 = 166$ ;  $165 < M145 = 166$ ) (Fig. 26).



**Figura 26. Elettroferogrammi delle proteine dei ceppi M145 (A), 165 (B) e 166 (C) dopo 24 ore di crescita.** Le bandierine gialle indicano le spot differenzialmente abbondanti dopo 24 ore di crescita rivelate mediante analisi *in silico* effettuata con il programma "Image Master 2D Platinum 7.0".

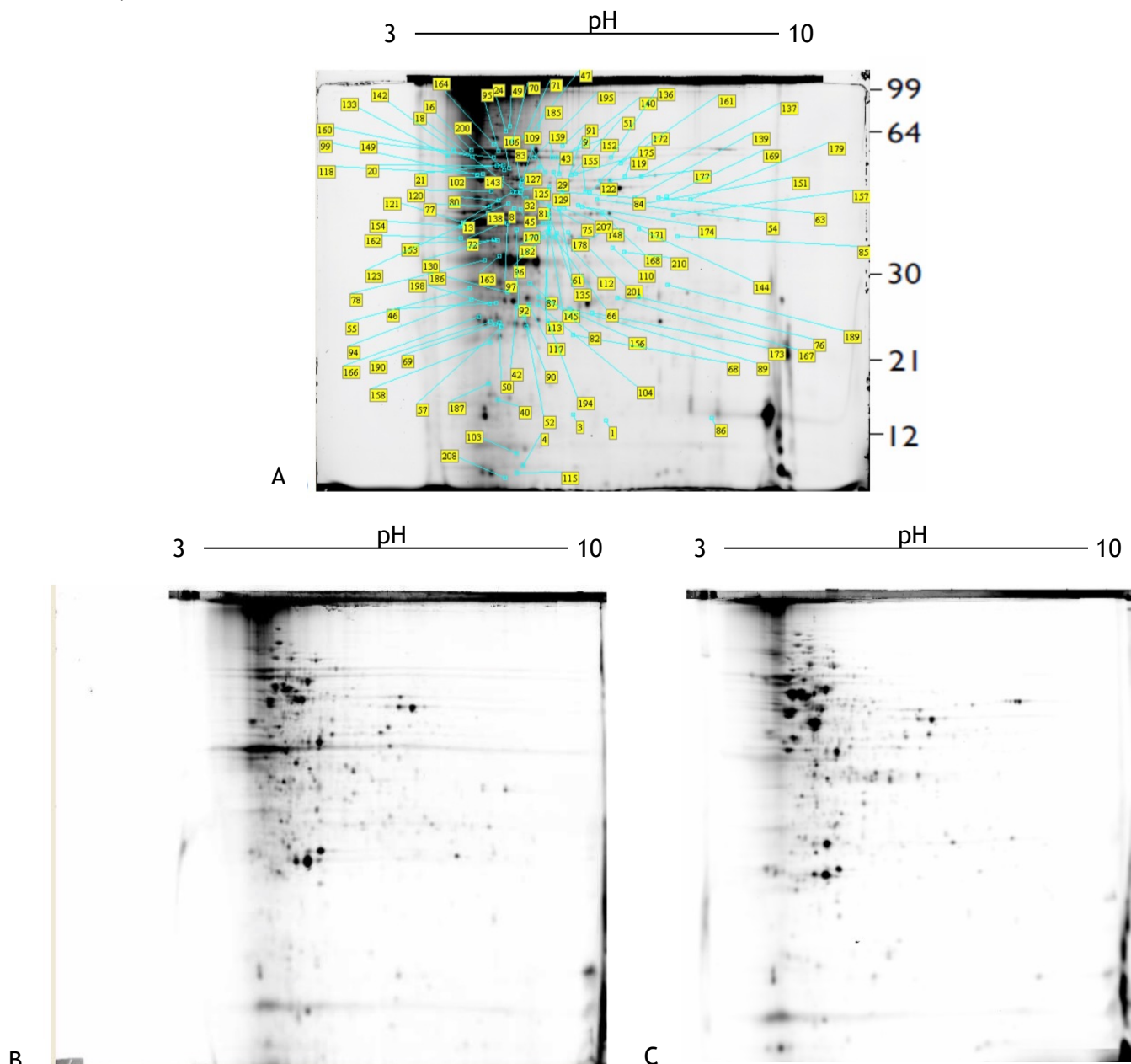
La distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti è riportata nei diagrammi di Venn (Fig. 27). Il ceppo 166 presenta 31 spot up-regolate (di cui 5 in comune con in ceppo 165), 20 spot down-regolate (di cui 13 in comune con il ceppo 165) e 17 spot egualmente abbondanti rispetto al ceppo w.t. M145. Il ceppo 165 ha 20 spot up-regolate, 38 down-regolate e 10 egualmente abbondanti rispetto al ceppo w.t. M145. Il ceppo 165 ha 20 spot up-regolate, 38 down-regolate e 10 egualmente abbondanti rispetto al ceppo w.t..



**Figura 27. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti dei ceppi M145, 165 e 166 dopo 24 ore di crescita.**

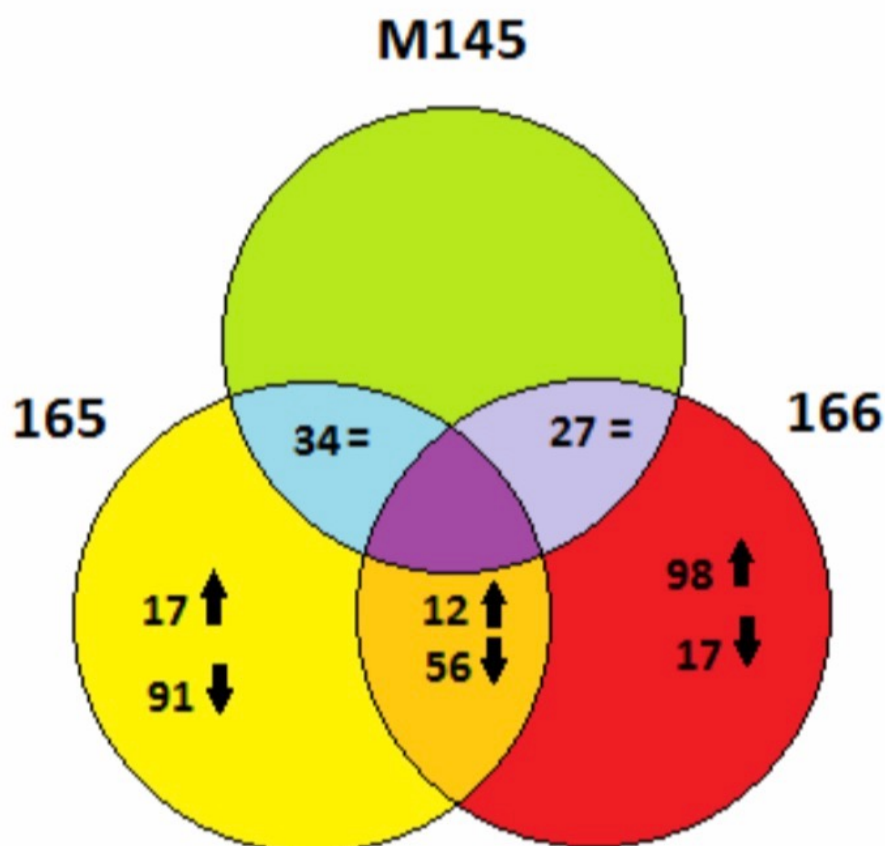
### 3.3.2 Analisi proteomica del ceppo 166 dopo 32 ore di crescita

L'analisi differenziale degli estratti proteici proveniente da biomasse prelevate da colture cresciute per 32 ore ha rivelato 210 spot differenzialmente abbondanti. Confrontando i valori di abbondanza relativa è stato possibile raggruppare le spot differenzialmente abbondanti in 8 profili di espressione ( $165 < M145 < 166$ ,  $165 < M145 > 166$ ,  $165 = M145 < 166$ ,  $165 < M145 = 166$ ,  $165 > M145 = 166$ ,  $165 = M145 > 166$ ,  $165 > M145 < 166$ ,  $165 > M145 > 166$ ) (Fig. 28).



**Figura 28. Elettroferogrammi delle proteine dei ceppi M145 (A), 165 (B) e 166 (C) dopo 32 ore di crescita.** Le bandierine gialle indicano le spot differenzialmente abbondanti dopo 32 ore di crescita rivelate mediante analisi *in silico* effettuata con il programma “Image Master 2D Platinum 7.0”.

La distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 32 ore di crescita è riportata nei diagrammi di Venn (Fig. 23). Il ceppo 166 ha 110 spot up-regolate (di cui 12 in comune con in ceppo 165), 73 spot down-regolate (di cui 56 in comune con il ceppo 165) e 27 spot egualmente abbondanti rispetto al ceppo w.t. M145. Il ceppo 165 ha 29 spot up-regolate, 147 down-regolate e 34 egualmente abbondanti rispetto al ceppo M145 (Fig. 29).



**Figura 29. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti dei ceppi M145, 165 e 166 dopo 32 ore di crescita.**



### 3.4 Identificazione e analisi funzionale delle proteine differenzialmente abbondanti

Tutte le spot differenzialmente espresse sono state prelevate tramite manual spotting e successivamente, le proteine, sono state identificate mediante analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) eseguita presso il laboratorio di Proteomica e Spettrometria di Massa del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Napoli diretto dal Dottore Andrea Scaloni. I risultati di spettrometria di massa sono stati quindi inseriti nella pagina web contenente le annotazioni del genoma di ([ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/S\\_coelicolor/classwise.txt](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/S_coelicolor/classwise.txt)) e nelle banche dati bioinformatiche di UniProt (Universal Protein, [www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/)) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, [www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)). UniProt è la più grande banca dati bioinformatica per le sequenze proteiche di tutti gli organismi viventi, mentre KEGG è una delle più importanti banche dati realizzata dall'università di Kyoto che contiene informazioni sui pathway metabolici della cellula e di diversi organismi viventi. Sulla base di tutti i dati raccolti è stato possibile attribuire ad ogni proteina un putativo ruolo funzionale ed è stato possibile raggruppare le proteine differenzialmente abbondanti in classi funzionali (Tab. 7 e 8).

**Tabella 7. Proteine differenzialmente abbondanti nei ceppi 165 e 166 dopo 24 ore di crescita**

Protein spot	Protein description	Gene name	Protein accession	pI/Mw (Da)	Expression value 165/M145	Expression value 166/M145	Expression profile	Functional class	Metabolic pathway/cellular function
11	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_ST RCO <sup>-</sup>	6,99/574 77	1,0	29,5	165=M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
10	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_ST RCO <sup>-</sup>	6,99/574 77	1,0	29,0	165=M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
5	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_ST RCO <sup>-</sup>	6,99/574 77	-1,4	19,0	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
2	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_ST RCO <sup>-</sup>	6,99/574 77	-1,5	11,3	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
6	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_ST RCO <sup>-</sup>	6,99/574 77	1,0	8,6	165=M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism

23	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_STRCO	6,99/574 77	-2,7	1,8	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
44	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_STRCO	6,99/574 77	-1,9	1,6	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
49	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_STRCO	6,99/574 77	-2,1	3,1	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
1	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_STRCO	6,99/574 77	-1,7	5,1	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
3	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr Q9ADA6 Q9ADA6_STRCO	6,99/574 77	-1,9	5,4	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospho lipid metabolism
35	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	tr Q93S07 Q93S07_STRCO	5,42/274 14	-7,1	-4,0	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
41	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	tr Q93S07 Q93S07_STRCO	5,42/274 14	-2,9	-1,9	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
61	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	tr Q93S07 Q93S07_STRCO	5,42/274 14	-1,9	-3,3	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
47	Putative enoyl-CoA hydratase	SCK13.22 (SCO4930)	tr Q9EWW0 Q9EWW0_STRCO	6,17/282 75	-1,6	1,0	165<M145=166	Carbon metabolism	Fatty acids degradation
45	Succinyl-CoA synthetase subunit beta	sucC (SCO4808)	sp Q9KY56 SUCC1_STRCO	4,76/416 34	-2,4	1,4	165<M145<166	Carbon metabolism	Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)
16	Succinyl-CoA synthetase subunit alpha	SCD63A.20, sucD (SCO4809)	tr Q9KY55 Q9KY55_STRCO	5,5/3027 7	1,0	5,3	165=M145<166	Carbon metabolism	tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)
56	Fumarate hydratase	fumC (SCO5042)	sp Q9FBN6 FUMC_STRCO	5,3/4903 8	1,0	2,2	165=M145<166	Carbon metabolism	tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)
62	F0F1 ATP synthase subunit delta	2SC6G5.14, atpH (SCO5370)	sp Q9K4D6 ATPD_STRCO	6,88/291 65	4,6	1,0	165>M145=166	Energy metabolism	Oxidative phosphorylation
25	Putative diaminobutyrate pyruvate aminotransferase	SC1G7.05 (SCO6279)	tr Q93S10 Q93S10_STRCO	5,26/569 99	-13,8	-2,9	165<M145>166	Amino acid metabolism	L-aspartate 4-semialdehyde, L-alanine anabolism metabolism

53	Putative diaminobutyrate pyruvate aminotransferase	SC1G7.05 (SCO6279)	tr Q93S10 Q93S10_STR CO	5,26/569 99	-1,9	1,0	165<M145=166	Amino acid metabolism	L-aspartate 4-semialdehyde, L-alanine anabolism metabolism
42	L-alanine dehydrogenase	SC151.13c (SCO1773)	tr Q9S227 Q9S227_STR CO	5,73/397 75	-3,2	-1,3	165<M145>166	Amino acid metabolism	L-alanine catabolism metabolism
60	Glutamine synthetase	glnA, SC3H12.06 (SCO2198)	sp P15106 GLNA_STR CO	5,1/5259 2	2,6	1,0	165>M145=166	Amino acid metabolism	Alanine, aspartate and glutamate anabolic metabolism
52	Ketol-acid reductoisomerase	ilvC, SC8D9.26 (SCO5514)	sp Q9Z565 ILVC1_STR CO	4,93/364 59	-1,6	2,0	165<M145<166	Amino acid metabolism	Valine, leucine and isoleucine anabolic metabolism
38	Putative formyltransferase	SCF34.18 (SCO0499)	tr Q9RK07 Q9RK07_STR CO	5,56/353 21	1,0	3,1	165=M145<166	Translation and modification	N-formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA)
32	Ribosome-binding factor A	rbfA (SCO5708)	sp Q9Z527 RBFA_STR CO	4,69/173 80	1,0	2,0	165=M145<166	Translation and modification	Ribosome binding factor
67	30S ribosomal protein S6	rpsF (SCO3906)	sp Q9X8U2 RS6_STR CO	6,13/111 70	-3,2	1,0	165<M145=166	Translation and modification	Ribosomal protein
19	Elongation factor Tu-1 (EC: 3.6.5.3)	tuf (SCO4662)	sp P40174 EFTU1_STR CO	5,01/438 11	-2,0	2,3	165<M145<166	Translation and modification	Elongation factor
51	Elongation factor Ts	tsf (SCO5625)	sp O31213 EFTS_STR CO	5,51/299 44	-1,7	2,0	165<M145<166	Translation and modification	Elongation factor
68	Inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr Q9L017 Q9L017_STR CO	6,18/526 14	-6,0	1,0	165<M145=166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
21	Inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr Q9L017 Q9L017_STR CO	6,18/526 14	-2,1	2,0	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
46	Inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr Q9L017 Q9L017_STR CO	6,18/526 14	-2,3	1,6	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
22	60 kDa chaperonin 2	groEL (SCO4296)	sp Q9KXU5 CH602_STR CO	4,79/567 95	-2,0	1,0	165<M145=166	Macromolecule metabolism	Folding/RNA degradation
36	60 kDa chaperonin 2	groEL (SCO4296)	sp Q9KXU5 CH602_STR CO	4,79/567 95	2,5	-2,1	165>M145>166	Macromolecule metabolism	Folding/RNA degradation
18	60 kDa chaperonin 2	groEL (SCO4296)	sp Q9KXU5 CH602_STR CO	4,79/567 95	1,9	-3,4	165>M145>166	Macromolecule metabolism	Folding/RNA degradation
37	60 kDa chaperonin GroEL1	groEL (SCO4762)	gi 406598 emb CAA53019.1	4,84/569 99	1,5	-1,4	165>M145>166	Macromolecule metabolism	Folding/RNA degradation

39	60 kDa chaperonin GroEL1	groEL (SCO4762)	sp P40171 CH601_STRCO	4,87/571 41	3,5	1,0	165>M145=166	Macromolecule metabolism	Folding/RNA degradation
26	10 kDa chaperonin GroES	groES (SCO4761)	sp P0A345 CH10_STRCO	4,65/109 40	-2,5	1,0	165<M145=166	Macromolecule metabolism	Folding
30	Putative Clp-family ATP-binding protease	SCE94.24c (SCO3373)	tr Q9S6T8 Q9S6T8_STRCO	5,73/929 57	-1,6	2,1	165<M145<166	Macromolecule metabolism	Degradation of proteins, peptides, glycoproteins
59	Superoxide dismutase	2SCG2.12c, sodF2 (SCO0999)	tr Q9X469 Q9X469_STRCO	5,27/235 85	3,0	1,5	165>M145<166	Protection responses	Detoxification
57	Superoxide dismutase	2SCG2.12c, sodF2 (SCO0999)	tr Q9X469 Q9X469_STRCO	5,27/235 85	2,5	1,6	165>M145<166	Protection responses	Detoxification
15	Superoxide dismutase	SC8E4A.03, sodF (SCO2633)	sp O51917 SODF_STRCO	5,15/235 13	2,8	1,5	165>M145<166	Protection responses	Detoxification
66	Putative beta-lactamase	SCH24.34 (SCO3912)	tr Q9X8U8 Q9X8U8_STRCO	5,8/4905 1	-1,6	1,0	165<M145=166	Protection responses	Detoxification
34	Putative DNA-binding protein	SCF55.20 (SCO0596)	tr Q7AKS6 Q7AKS6_STRCO	5,07/200 40	4,4	1,0	165>M145=166	Protection responses	DNA protecting protein
12	ABC transporter ATP-binding protein	msiK, SCD8A.13c (SCO4240)	tr Q9L0Q1 Q9L0Q1_STRCO	5,79/404 28	-1,7	4,5	165<M145<166	Membrane transport	Multiple sugar transport system
27	Lipoprotein	2SCK8.11 (SCO4885)	tr Q9AK41 Q9AK41_STRCO	4,92/361 06	3,0	1,0	165>M145=166	Membrane transport	Putative simple sugar transport system
29	Phosphate-binding protein	pstS, SCD84.09c (SCO4142)	tr Q9KZV9 Q9KZV9_STRCO	4,84/383 02	2,5	-1,6	165>M145>166	Membrane transport	Phosphate transport system
40	Putative transcriptional regulator	SCD6.32c (SCO4454)	tr Q9KZX2 Q9KZX2_STRCO	6,15/214 08	-2,9	-3,1	165<M145>166	Regulation (TetR family)	transcriptional regulator
50	Putative transcriptional regulatory protein	SC6D11.37 (SCO7441)	tr Q9L119 Q9L119_STRCO	6,14/215 38	-5,8	-2,5	165<M145>166	Regulation (TetR family)	transcriptional regulator
55	Putative transcriptional regulator	SCE59.17c (SCO2958)	tr Q9L1T7 Q9L1T7_STRCO	6,74/416 38	-2,2	-2,2	165<M145>166	Regulation	DNA binding protein/phosphorelay response regulator activity/uroporphyrinogen-III Synthase activity
28	Putative uncharacterized protein	SCI51.15c (SCO1775)	tr Q9S225 Q9S225_STRCO	4,74/232 97	-2,1	-2,1	165<M145>166	Unknown function	putativa ADP-ribose pyrophosphatase

20	Putative uncharacterized protein	SCBAC17 A6.24 (SCO7491)	tr[Q93JA5] Q93JA5_STR CO	5,37/29382	1,9	6,3	165>M145<166	Unknown function	
4	Putative uncharacterized protein	SCBAC17 A6.26 (SCO7493)	tr[Q93JA3] Q93JA3_STR CO	5,9/70099	2,9	4,6	165>M145<166	Unknown function	Putative glycogen debranching enzyme
48	Putative uncharacterized protein	SCF15.03c (SCO0682)	tr[Q9RK34] Q9RK34_STR CO	5,58/13484	-2,4	-6,3	165<M145>166	Unknown function	
54	Putative flavoprotein homologue (partial)	SC9C5.01c, SCL6.34c (SCO1477)	tr[Q8CK27] Q8CK27_STR CO	7,17/45263	-4,2	1,0	165<M145=166	Others	Pantothenate and CoA biosynthesis
64	Recombinase A	recA (SCO5769)	sp[O50487] RECA_STR CO	5,96/39558	-2,9	1,0	165<M145=166	Others	DNA Replication and repair
33	Putative secreted protein	SCD8A.24c (SCO4251)	tr[Q9L0P0] Q9L0P0_STR CO	5,2/18950	2,5	-2,3	165>M145>166	Others	

**Tabella 8. Proteine differenzialmente abbondanti nei ceppi 165 e 166 dopo 32 ore di crescita**

protein spot	protein description	gene name	protein accession	Mr th. (Da)	pI th.	expression value 165/M145	expression value 166/M145	expression profile	functional class	metabolic pathway/cellular function
27	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-2,1	6,8	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
12	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,6	25,3	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
59	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,9	7,0	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
30	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,6	55,0	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
14	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,6	12,9	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
5	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,3	99,7	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
199	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-3,5	1,8	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
99	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,3	2,1	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
118	Putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-2,1	2,0	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
6	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase	SCI52.03 (SCO1661)	tr[Q9ADA6] Q9ADA6_STR CO	57477	6,99	-1,4	95,0	165<M145<166	Carbon metabolism	Glycerophospholipid metabolism
117	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	SCD63A.20, sucD (SCO4809)	gi 21223187 ref NP_628966.1	30277	5,5	-1,7	-2,0	165<M145>166	Carbon metabolism	Citrate cycle

88	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	SCD63A.20, sucD (SCO4809)	tr Q9KY55 Q9KY55_STRCO	30277	5,5	-2,4	1,5	165<M145>166	Carbon metabolism	Citrate cycle
148	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	SCD63A.20, sucD (SCO4809)	gij 21223187 ref NP_628966.1	30277	5,5	1,0	2,2	165=M145<166	Carbon metabolism	Citrate cycle
76	phosphoglyceromutase	gpmA (SCO4209)	gij 21222605 ref NP_628384.1	28319	6,08	-2,0	1,5	165<M145<166	Carbon metabolism	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase
167	phosphoglyceromutase	gpmA (SCO4209)	gij 21222605 ref NP_628384.1	28319	6,08	-2,2	1,7	165<M145=166	Carbon metabolism	Glycine, serine and threonine metabolism
31	succinyl-CoA synthetase subunit beta	sucC (SCO4808)	sp Q9KY56 SUCC1_STRCO	41634	4,76	-2,6	1,7	165<M145<166	Carbon metabolism	Citrate cycle
70	isocitrate dehydrogenase		gij 4927874 gb AAD33338.1 AF127018_1	80014,0	5,3	1,0	2,8	165=M145<166	Carbon metabolism	Citrate cycle
174	type II citrate synthase	gltA (SCO2736)	gij 21221189 ref NP_626968.1	47771	5,68	-1,2	2,2	165=M145<166	Carbon metabolism	citrate synthase
180	fumarate hydratase	fumC (SCO5042)	sp Q9FBN6 FUMC_STRCO	49038	5,3	-1,9	1,9	165<M145<166	Carbon metabolism	Citrate cycle
105	Putative enoyl-CoA hydratase	SCK13.22 (SCO4930)	tr Q9EWW0 Q9EWW0_STRCO	28275	6,17	1,0	3,3	165=M145<166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
104	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	gij 21224601 ref NP_630380.1	27414	5,42	-3,0	-6,0	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
94	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	gij 21224601 ref NP_630380.1	27414	5,42	-2,2	-2,8	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
89	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	gij 21224601 ref NP_630380.1	27414	5,42	-21,4	-8,7	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
79	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	tr Q93S07 Q93S07_STRCO	27414	5,42	-5,5	-6,5	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
50	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	gij 21224601 ref NP_630380.1	27414,0	5,4	-4,2	-2,0	165<M145>166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
46	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	SC1G7.08c (SCO6282)	gij 21224601 ref NP_630380.1	27414,0	5,4	-1,5	2,1	165<M145<166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
189	3-oxoacyl-ACP reductase	fabG, SCI28.09c (SCO1815)	gij 21220305 ref NP_626084.1	24874	6,18	1,0	2,1	165=M145<166	Carbon metabolism	Fatty acid biosynthesis
111	F0F1 ATP synthase subunit delta	2SC6G5.14, atpH (SCO5370)	sp Q9K4D6 ATPD_STRCO	29165	6,88	2,0	1,0	165>M145=166	Energy metabolism	Oxidative phosphorylation
153	F0F1 ATP synthase subunit beta	2SC6G5.17, atpD (SCO5373)	gij 21223733 ref NP_629512.1	52260	4,76	-1,8	-2,4	165<M145>166	Energy metabolism	Oxidative phosphorylation
130	F0F1 ATP synthase subunit beta	2SC6G5.17, atpD (SCO5373)	gij 21223733 ref NP_629512.1	52260	4,76	-2,9	-2,3	165<M145>166	Energy metabolism	Oxidative phosphorylation
106	F0F1 ATP synthase subunit alpha	2SC6G5.15, atpA (SCO5371)	gij 21223731 ref NP_629510.1	57449	4,98	2,8	3,0	165=M145<166	Energy metabolism	ATP synthetis
10	ABC transporter ATP-binding protein	msiK, SCD8A.13c (SCO4240)	tr Q9L0Q1 Q9L0Q1_STRCO	40428	5,79	1,0	7,5	165=M145<166	Membrane transport	Multiple sugar transport system
160	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij 21223834 ref NP_629613.1	65445	6,08	-1,5	-1,4	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system

159	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-2,3	-2,5	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
140	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-2,4	-2,6	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
187	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-5,5	-3,0	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
195	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-1,9	-1,6	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
152	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-2,6	-4,4	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
136	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-1,4	-2,1	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
133	oligopeptide-binding lipoprotein	SC2A11.11 (SCO5477)	gij21223834 ref  NP_629613.1	65445	6,08	-1,6	-2,0	165<M145>166	Membrane transport	Peptides/nickel transport system
154	phosphate-binding protein	pstS, SCD84.09c (SCO4142)	gij21222540 ref  NP_628319.1	38302	4,84	1,0	-2,2	165=M145>166	Membrane transport	ABC transporters / Two-component system
121	phosphate-binding protein	pstS, SCD84.09c (SCO4142)	gij21222540 ref  NP_628319.1	38302	4,84	1,7	-2,1	165>M145<166	Membrane transport	ABC transporters / Two-component system
72	phosphate-binding protein	pstS, SCD84.09c (SCO4142)	gij21222540 ref  NP_628319.1	38302	4,84	1,8	-2,3	165>M145>166	Membrane transport	ABC transporters / Two-component system
142	ABC transporter lipoprotein BldKB	bldKB, SCBAC31E1 1.09 (SCO5113)	gij21223484 ref  NP_629263.1	65550	5,28	-1,5	1,1	165<M145=166	Membrane transport	ABC transporter lipoprotein BldKB
112	ABC transporter lipoprotein BldKB	bldKB, SCBAC31E1 1.09 (SCO5113)	gij21223484 ref  NP_629263.1	65550	5,28	-2,8	1,0	165<M145=166	Membrane transport	ABC transporter lipoprotein BldKB
95	ABC transporter lipoprotein BldKB	bldKB, SCBAC31E1 1.09 (SCO5113)	gij21223484 ref  NP_629263.1	65550	5,28	-1,8	1,7	165<M145<166	Membrane transport	ABC transporter lipoprotein BldKB
151	ABC transporter intracellular ATPase subunit BldKD	bldKD, SCBAC31E1 1.11 (SCO5115)	gij21223486 ref  NP_629265.1	38465	6,21	-2,2	1,3	165<M145<166	Membrane transport	ABC transporter intracellular ATPase subunit BldKD
123	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	SC7H2.22 (SCO2008)	gij21220490 ref  NP_626269.1	43534	5,27	-3,7	-2,5	165<M145>166	Membrane transport	ABC transporters
82	ABC transporter ATP-binding protein	SCI5.06c (SCO1798)	gij21220289 ref  NP_626068.1	29100	5,17	-2,0	1,3	165<M145<166	Membrane transport	ABC transporters
57	ABC transporter ATP-binding protein	msiK, SCD8A.13c (SCO4240)	gij21222635 ref  NP_628414.1	40428	5,79	-1,8	2,1	165<M145<166	Membrane transport	Multiple sugar transport system
54	ABC transporter ATP-binding protein	msiK, SCD8A.13c (SCO4240)	gij21222635 ref  NP_628414.1	40428	5,79	1,0	4,6	165=M145<166	Membrane transport	Multiple sugar transport system
186	phosphate transport system regulator	2SCD46.42c , SCD8A.01c (SCO4228)	gij32141230 ref  NP_733631.1	25441	4,93	-2,1	1,0	165<M145=166	Membrane transport	phosphate transport system protein

114	lipoprotein	2SCK8.11 (SCO4885)	tr[Q9AK41] Q9AK41_STR CO	36106	4,92	2,5	1,0	165>M145=166	Membrane transport	Putative simple sugar transport system
146	inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr[Q9L017] Q9L017_STR O	52614	6,18	-5,6	1,0	165<M145=166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
126	inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr[Q9L017] Q9L017_STR O	52614	6,18	-5,3	1,0	165<M145=166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
67	inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	tr[Q9L017] Q9L017_STR O	52614	6,18	-9,7	1,5	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
175	inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	gij21223149  ref  NP_628928.1	52614	6,18	-3,0	1,3	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine metabolism
137	inosine 5' monophosphate dehydrogenase	guaB, SCD63.02 (SCO4770)	gij21223149  ref  NP_628928.1	52614	6,18	-5,9	1,2	165<M145=166	Nucleotide metabolism	Purine metabolism
173	phosphoribosylformylglycin amidase synthase I	purQ, SCD25.14 (SCO4078)	gij21222480  ref  NP_628259.1	24684	5,61	-1,5	2,3	165<M145<166	Nucleotide metabolism	phosphoribos ylformylglyc inamidase synthase
156	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	pyrF (SCO1481)	gij21219982  ref  NP_625761.1	28830	5,29	-2,6	-1,7	165<M145>166	Nucleotide metabolism	orotidine 5'- phosphate decarboxylas e
109	Bifunctional phosphoribosylaminoimidaz olecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	purH (SCO4814)	gij21223192  ref  NP_628971.1	55351	5,35	-1,7	1,4	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
29	Bifunctional phosphoribosylaminoimidaz olecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	purH (SCO4814)	gij21223192  ref  NP_628971.1	55351	5,35	-1,7	2,6	165<M145<166	Nucleotide metabolism	Purine biosynthesis
44	10 kDa chaperonin GroES	groES (SCO4761)	sp P0A345  CH10_STRCO	10940	4,65	-1,3	2,3	165<M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding
127	chaperonin GroEL	groEL (SCO4296)	gij21222689  ref  NP_628468.1	56795	4,79	-1,6	-1,6	165<M145>166	Macromolec ule metabolism	Folding, sorting and degradation; RNA degradation
120	chaperonin GroEL	groEL (SCO4296)	gij21222689  ref  NP_628468.1	56795	4,79	-2,4	1,0	165<M145=166	Macromolec ule metabolism	Folding, sorting and degradation; RNA degradation
20	chaperonin GroEL	groEL (SCO4296)	gij21222689  ref  NP_628468.1	56795	4,79	-2,2	2,7	165>M145>166	Macromolec ule metabolism	Folding/ RNA degradation
143	chaperonin GroEL	groEL (SCO4296)	gij21222689  ref  NP_628468.1	56795	4,79	-2,2	-2,0	165<M145>166	Macromolec ule metabolism	Folding, sorting and degradation; RNA degradation
116	60 kDa chaperonin 2	groEL (SCO4296)	sp Q9KXU5  CH602_STR O	56795	4,79	1,0	2,2	165=M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding/ RNA degradation
21	chaperonin GroEL	groEL (SCO4762)	gij406598 emb  CAA53019.1	56999	4,84	-1,6	4,0	165<M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding/ RNA degradation
200	chaperonin GroEL	groEL (SCO4762)	gij21223141  ref  NP_628920.1	57141	4,87	1,0	3,8	165=M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding/ RNA degradation
169	chaperone protein DnaJ	dnaJ2 (SCO2554)	gij21221013  ref  NP_626792.1	40976	6,21	1,0	3,9	165=M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding
97	molecular chaperone DnaK	dnaK (SCO3671)	gij32141213  ref  NP_733614.1	66287	4,76	1,8	-2,6	165>M145>166	Macromolec ule metabolism	Folding
78	molecular chaperone DnaK	dnaK (SCO3671)	gij32141213  ref  NP_733614.1	66287	4,76	-2,5	-5,6	165<M145>166	Macromolec ule metabolism	Folding



24	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB	clpB (SCO3661)	gi 32141212  ref  NP_733613.1	94380	4,95	-2,3	2,3	165<M145<166	Macromolec ule metabolism	Folding/ degradation
196	putative diaminobutyrate- pyruvate aminotransferase	SC1G7.05 (SCO6279)	tr Q93S10  Q93S10_STRC O	56999	5,26	-2,6	-1,4	165<M145>166	Amino acid metabolism	L-aspartate 4- semialdehyd e, L-alanine anabolism metabolism
41	ketol-acid reductoisomerase	ilvC, SC8D9.26 (SCO5514)	sp Q9Z565  ILVC1_STRC O	36459	4,93	-2,4	1,9	165<M145<166	Amino acid metabolism	Valine, leucine and isoleucine anabolic meabolism
150	homogentisate 1,2- dioxygenase	hgd, SC1I1.04 (SCO1715)	gi 21220209  ref  NP_625988.1	48502	5,49	-2,0	2,6	165<M145<166	Amino acid metabolism	homogentisat e 1,2- dioxygenase
145	anthranilate phosphoribosyltransferase	trpD (SCO2147)	gi 21220624  ref  NP_626403.1	37052	5,39	1,3	-1,8	165=M145>166	Amino acid metabolism	Phenylalanin e, tyrosine and tryptophan biosynthesis
135	phosphoserine aminotransferase	SCD19.21c (SCO4366)	gi 21222757  ref  NP_628536.1	38862	5,55	2,0	1,0	165>M145=166	Amino acid metabolism	phosphoserin e aminotransfe rase
138	fumarylacetoacetase	SCD16A.03 (SCO4580)	gi 21222963  ref  NP_628742.1	44902	4,93	-1,5	1,0	165<M145=166	Amino acid metabolism	fumarylaceto acetase
129	UDP-N- acetylmuramoylalanyl-D- glutamyl-2,6- diaminopimelate- D-alanyl- alanyl ligase	murF, SC4A10.21c (SCO2088)	gi 21220568  ref  NP_626347.1	48939	5,36	1,0	1,3	165<M145<166	Amino acid metabolism	UDP-N- acetylmuram oylalanyl-D- glutamyl-2,6 - diaminopime late-D- alanyl-alanyl ligase
125	peptide monooxygenase	SCF34.17c (SCO0498)	gi 21219036  ref  NP_624815.1	50048	5,14	-2,2	1,5	165<M145<166	Amino acid metabolism	Monooxygen ase
107	leucyl aminopeptidase	SC5F7.22 (SCO2179)	gi 21220653  ref  NP_626432.1	52022	5,45	1,0	3,4	165=M145<166	Amino acid metabolism	Glutathione metabolism
92	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	asd1, SC8E4A.10 (SCO2640)	gi 21221097  ref  NP_626876.1	35888	5,07	1,0	3,3	165=M145<166	Amino acid metabolism	Oxidoreduct ase
81	glutamate dehydrogenase	gdhA, SCD31.08 (SCO4683)	gi 21223063  ref  NP_628842.1	49622	5,24	-8,5	-3,1	165<M145>166	Amino acid metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
75	glutamate dehydrogenase	gdhA, SCD31.08 (SCO4683)	gi 21223063  ref  NP_628842.1	49622	5,24	-9,5	-6,0	165<M145>166	Amino acid metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
63	chorismate synthase	aroF, SC9C5.20c (SCO1496)	gi 21219997  ref  NP_625776.1	41609	6,02	-3,0	2,6	165<M145<166	Amino acid metabolism	Phenylalanin e, tyrosine and tryptophan biosynthesis
47	5- methyltetrahydropteroyltrigl utamate/homocysteine	metE, SCBAC19F3 .12 (SCO0985)	gi 21219502  ref  NP_625281.1	83785	5,17	1,0	3,8	165=M145<166	Amino acid metabolism	Cysteine and methionine metabolism
185	glutamine synthetase	glnA, SC3H12.06 (SCO2198)	gi 21220671  ref  NP_626450.1	52592	5,01	1,7	1,8	165>M145<166	Amino acid metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
197	gamma-glutamyl kinase	proB (SCO2587)	gi 21221046  ref  NP_626825.1	38816	6,73	-2,3	1,0	165<M145=166	Amino acid metabolism	Arginine and proline metabolism

32	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	aroA2, SC7E4.09c (SCO5212)	gi 21223580 ref NP_629359.1	45880	5,15	-1,7	3,1	165<M145<166	Amino acid metabolism	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
3	L-ectoine synthase	ectC (SCO1866)	gi 21220354 ref NP_626133.1	15149	5,42	1,0	7,2	164=M145<166	Amino acid metabolism	Glycine, serine and threonine metabolism
77	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	rpoA, SC6G4.07 (SCO4729)	gi 21223108 ref NP_628887.1	36730	4,66	-3,2	1,0	165<M145=166	Regulation	Nucleotide metabolism
162	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	rpoA, SC6G4.07 (SCO4729)	gi 21223108 ref NP_628887.1	36730	4,66	1,0	-2,3	165=M145>166	Regulation	Nucleotide metabolism
168	transcriptional repressor protein	SC7B7.05 (SCO6008)	gi 21224343 ref NP_630122.1	41221	5,68	-4,5	-4,7	165<M145>166	Regulation	transcriptional repressor protein
23	Putative transcriptional regulatory protein	SC6D11.37 (SCO7441)	tr Q9L119 Q9L119_STRCO	21538	6,14	-7,9	-8,6	165<M145>166	Regulation	transcriptional regulator (TetR family)
198	regulator	SC1C2.33c (SCO5552)	gi 21223907 ref NP_629686.1	25016	11,24	-1,9	-2,7	165<M145>166	Regulation	transcriptional regulator
39	Putative DNA-binding protein	scf55.20 (sco0596)	tr Q7AKS6 Q7AKS6_STRCO	20040	5,07	1,8	-2,6	165>M145>166	Protection responses	DNA protecting protein
166	Tellurium resistance protein	SCD95A.10c (SCO4277)	gi 21222670 ref NP_628449.1	20332	4,49	1,6	2,7	165>M145<166	Protection responses	Tellurium resistance protein
115	ATP/GTP binding protein	SC5C7.16 (SCO6531)	gi 21224833 ref NP_630612.1	14439	5,02	1,7	-1,5	165>M145>166	Protection responses	ATP/GTP binding protein
34	Export associated protein	SCC54.25c (SCO1965)	gi 21220450 ref NP_626229.1	20619	5,74	-4,7	-4,3	165<M145>166	Protection responses	stress response
103	ATP/GTP binding protein	SC5C7.16 (SCO6531)	gi 21224833 ref NP_630612.1	14439	5,02	2,3	1,0	165>M145=166	Protection responses	ATP/GTP binding protein
83	transport associated protein	SCI7.21 (SCO1903)	gi 21220390 ref NP_626169.1	41497	5,07	-1,7	2,5	165<M145<166	Protection responses	Transport associated protein
131	superoxide dismutase	2SCG2.12c, sodF2 (SCO0999)	tr Q9X469 Q9X469_STRCO	23585	5,27	2,1	-1,7	165>M145<166	Protection responses	Detoxification
90	superoxide dismutase	2SCG2.12c, sodF2 (SCO0999)	tr Q9X469 Q9X469_STRCO	23585	5,27	3,6	1,4	165>M145=166	Protection responses	Detoxification
52	Superoxide dismutase	SC8E4A.03, sodF (SCO2633)	gi 21221090 ref NP_626869.1	23513	5,15	3,5	5,3	165>M145<166	Protection responses	Detoxification
108	putative formyltransferase	SCF34.18 (SCO0499)	tr Q9RK07 Q9RK07_STRCO	35321	5,56	-1,4	2,3	165<M145<166	Translation and modification	N-formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA)
98	30S ribosomal protein S6	rpsF (SCO3906)	sp Q9X8U2 RS6_STRCO	11170	6,13	-2,6	1,0	165<M145=166	Translation and modification	Ribosomal protein
35	elongation factor Ts	tsf (SCO5625)	sp O31213 EFTS_STRCO	29944	5,51	-3,2	2,1	165<M145<166	Translation and modification	Elongation factor
66	Elongation factor Ts	tsf (SCO5625)	gi 21223980 ref NP_629759.1	29944,0	5,5	-2,8	1,7	165<M145<166	Translation and modification	Elongation factor
158	50S ribosomal protein L5	rpLE (SCO4714)	gi 21223094 ref NP_628873.1	20840	9,69	2,3	1,0	165>M145=166	Translation and modification	Ribosomal protein

87	Tyrosine--tRNA ligase	tyrS (SCO1818)	gi 21220307  ref  NP_626086.1	46410	5,36	-1,8	1,6	165<M145<166	Translation and modificatio n	Aminoacyl- tRNA biosynthesis
84	Serine--tRNA ligase	SCD78.28c, serS (SCO3961)	gi 21222366  ref  NP_628145.1	47197	5,39	-2,0	2,0	165<M145<166	Translation and modificatio n	Aminoacyl- tRNA biosynthesis
69	30S ribosomal protein S5	rpsE (SCO4719)	gi 21223099  ref  NP_628878.1	20544	10,2	-2,3	1,9	165<M145<166	Translation and modificatio n	Ribosomal protein
55	30S ribosomal protein S2	rpsB (SCO5624)	gi 6226896 sp  O31212.3  RS2_STRCO	33602	5,17	-4,0	-4,9	165<M145>166	Translation and modificatio n	Ribosomal protein
208	30S ribosomal protein S2	rpsB (SCO5624)	gi 6226896 sp  O31212.3  RS2_STRCO	33602	5,17	-1,7	-1,7	165>M145>166	Translation and modificatio n	Ribosomal protein
13	elongation factor	SCO4662	gi 1091582 prf  2021268A	43779,0	5,0	-4,2	3,7	165<M145<166	Translation and modificatio n	Elongation factor
18	elongation factor	SCO4662	gi 1091582 prf  2021268A	43779,0	5,0	-4,1	4,6	165<M145<166	Translation and modificatio n	Elongation factor
80	elongation factor	SCO4662	gi 1091582 prf  2021268A	43779,0	5,0	-5,4	-2,5	165<M145>166	Translation and modificatio n	Elongation factor
49	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	pheT (SCO1594)	gi 21220091  ref  NP_625870.1	90386	5	1,0	2,5	165=M145<166	Translation and modificatio n	phenylalanyl -tRNA aminoacylati on
9	glycyl-tRNA synthetase	glyS, SCC121.07c (SCO2504)	gi 21220965  ref  NP_626744.1	52806	5,45	-1,3	4,7	165<M145<166	Translation and modificatio n	glycyl-tRNA synthetase
42	Elongation factor P	efp, SC9C5.15c (SCO1491)	gi 21219992  ref  NP_625771.1	20636	5,01	-2,6	2,3	165<M145<166	Translation and modificatio n	Elongation factor
16	30S ribosomal protein S1	rpsA (SCO1998)	gi 21220480  ref  NP_626259.1	55001	4,54	-1,5	1,5	165<M145<166	Translation and modificatio n	Ribosome protein
178	alcohol dehydrogenase	SCJ12.11c (SCO0199)	gi 21218755  ref  NP_624534.1	35744	5,76	-1,5	1,6	165<M145<166	Carbohydrat e metabolism	alcohol dehydrogena se
177	catalase	katA (SCO0379)	gi 21218922  ref  NP_624701.1	55139	5,84	2,4	2,4	165>M145<166	Carbohydrat e metabolism	catalase
172	catalase	katA (SCO0379)	gi 21218922  ref  NP_624701.1	55139	5,84	1,0	2,1	165=M145<166	Carbohydrat e metabolism	catalase
132	aldehyde dehydrogenase	SCK13.05c (SCO4913)	gi 21223287  ref  NP_629066.1	51524	5,49	-1,3	2,6	165<M145<166	Carbohydrat e metabolism	aldehyde dehydrogena se
91	Transketolase B	tktB (SCO6663)	gi 21224959  ref  NP_630738.1	74541	5,41	1,5	3,7	165>M145<166	Carbohydrat e metabolism	Pentose phosphate pathway
96	polysaccharide biosynthesis-like protein	2SCK8.07 (SCO4881)	gi 21223255  ref  NP_629034.1	34716	5,29	-3,2	1,0	165<M145=166	Carbohydrat e metabolism	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
51	pyruvate kinase	pyk2, SC8F4.27c (SCO5423)	gi 21223783  ref  NP_629562.1	51363	5,49	-2,8	3,6	165<M145<166	Carbohydrat e metabolism	pyruvate kinase

43	pyruvate kinase	pyk2, SC8F4.27c (SCO5423)	gi 21223783  ref  NP_629562.1	51363	5,49	-2,3	2,2	165<M145<166	Carbohydrate metabolism	pyruvate kinase
8	zinc-containing dehydrogenase	SCJ1.28c (SCO0179)	gi 21218736  ref  NP_624515.1	37701	5,05	1,0	5,3	165=M145<166	Oxidoreductase	dehydrogenase
45	zinc-containing dehydrogenase	SCJ1.28c (SCO0179)	gi 21218736  ref  NP_624515.1	37701	5,05	1,0	2,1	165=M145<166	Oxidoreductase	dehydrogenase
207	oxidoreductase	SCBAC17A 6.23 (SCO7490)	gi 21225758  ref  NP_631537.1	40104	5,57	1,3	3,9	165>M145<166	Oxidoreductase	oxidoreductase
171	oxidoreductase	SCBAC17A 6.23 (SCO7490)	gi 21225758  ref  NP_631537.1	40104	5,57	-2,2	3,4	165<M145<166	Oxidoreductase	oxidoreductase
61	oxidoreductase	SCBAC17A 6.23 (SCO7490)	gi 21225758  ref  NP_631537.1	40104	5,57	-1,8	1,5	165<M145<166	Oxidoreductase	oxidoreductase
193	dihydrolipoamide dehydrogenase	pdhL, SC5F7.21 (SCO2180)	gi 21220654  ref  NP_626433.1	51536	5,92	-1,4	2,0	165<M145<166	Oxidoreductase	Metabolic pathways (coinvolta in tanti pathway diversi)
179	oxidase	redG, SC10A5.02 (SCO5897)	gi 21224238  ref  NP_630017.1	45235	6,65	-6,0	-2,0	165<M145>166	Oxidoreductase	aromatic compound catabolic process
144	oxidoreductase	SCBAC20F6 .16 (SCO5073)	gi 21223445  ref  NP_629224.1	34079	6,01	-2,5	-3,7	165<M145>166	Oxidoreductase	oxidoreductase
1	Hypothetical protein	mmyY (sco:SCP1.2 29c.)	gi 21234226  ref  NP_639837.1	17531	5,73	18,5	1,0	165>M145=166	Unknow function	
164	hypothetical protein	SCBAC17A 6.26 (SCO7493)	gi 21225761  ref  NP_631540.1	70099	5,9	-1,7	1,4	165<M145<166	Unknow function	
163	hypothetical protein	SCBAC25E 3.04c (SCO3967)	gi 21222371  ref  NP_628150.1	25827	5,07	-2,0	-3,0	165<M145>166	Unknow function	
161	hypothetical protein	SC10F4.04c (SCO7631)	gi 21225892  ref  NP_631671.1	68273	5,99	-1,5	1,8	165<M145<166	Unknow function	
119	hypothetical protein	SCI41.30c (SCO1647)	gi 21220143  ref  NP_625922.1	51363	5,49	-3,4	1,7	165<M145<166	Unknow function	
110	hypothetical protein	SC8D9.31 (SCO5519)	gi 21223875  ref  NP_629654.1	34524	5,75	-1,8	1,6	165<M145<166	Unknow function	
86	hypothetical protein	SCH66.02c (SCO3581)	gi 21221998  ref  NP_627777.1	16478	7,9	-3,2	3,6	165<M145<166	Unknow function	
85	hypothetical protein	2SC7G11.03 c (SCO5241)	gi 21223608  ref  NP_629387.1	34306	6,46	-2,3	1,4	165<M145<166	Unknow function	
73	Hypothetical protein	SCD8A.25c (SCO4252)	gi 21223041  ref  NP_628820.1	16527	4,86	-2,7	-3,0	165<M145>166	Unknow function	
40	Hypothetical protein	SCD8A.25c (SCO4252)	gi 21223041  ref  NP_628820.1	16527,0	4,86	-3,5	1,0	165<M145=166	Unknow function	
190	hypothetical protein	SCC8A.26c (SCO2368)	gi 21220836  ref  NP_626615.1	20375	4,56	1,0	1,8	165=M145<166	Unknow function	
210	hypothetical protein	SCJ12.12c (SCO0200)	gi 21218756  ref  NP_624535.1	32237	5,9	1,0	3,2	165=M145<166	Unknow function	
4	Hypothetical protein	SCD31.12c (SCO4687)	gi 21223067  ref  NP_628846.1	12893	5,14	-2,6	-5,0	165<M145>166	Unknow function	

17	ATP/GTP-binding protein	2SCK31.15c (SCO4955)	gij21223328  ref  NP_629107.1	42033	6,84	-11,0	-5,4	165<M145>166	Others	ATP/GTP-binding protein
201	alcohol dehydrogenase	SCJ12.11c (SCO0199)	gij21218755  ref  NP_624534.1	35744	5,76	-1,9	1,6	165<M145<166	Others	Metabolic pathways
65	putative flavoprotein homologue (partial)	SC9C5.01c, SCL6.34c (SCO1477)	tr Q8CK27  Q8CK27_STR CO	45263	7,17	-2,8	1,8	165<M145<166	Others	Pantothenate and CoA biosynthesis
194	cellulose-binding protein	2SC6G5.40c (SCO5396)	gij21223756  ref  NP_629535.1	34585	5,29	1,7	-1,8	165>M145=166	Others	cellulose-binding protein
182	methyltransferase	redI, SC3F7.15 (SCO5895)	gij21224237  ref  NP_630016.1	39598	5,31	-1,5	1,0	165<M145=166	Others	methyltransferase
122	uroporphyrin-III methyltransferase	SCL11.09c (SCO1553)	gij21220052  ref  NP_625831.1	42764	5,65	-1,8	1,8	165<M145<166	Others	uroporphyrin-III methyltransferase (Metabolism of cofactors and vitamins)
170	aminotransferase	SCG20A.34 (SCO1054)	gij21219570  ref  NP_625349.1	42098	5,29	1,0	-2,0	165=M145>166	Others	Aminotransferase
157	esterase	SCF34.09 SCO0490)	gij21219028  ref  NP_624807.1	39027	6,4	-6,0	-1,6	165<M145>166	Others	esterase
165	recombinase A	recA (SCO5769)	sp O50487  RECA_STRC O	39558	5,96	-2,6	1,5	165<M145<166	Replication and repair DNA	DNA Replication and repair
71	NAD-dependent DNA ligase LigA	ligA (SCO5494)	gij21223850  ref  NP_629629.1	80865	5,13	-2,0	2,2	165<M145<166	Replication and repair DNA	DNA damage, repair and replication

### 3.4.1 Analisi funzionale delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 24 ore di crescita

Le proteine differenzialmente abbondanti sono state suddivise in 11 classi funzionali: metabolismo del carbonio; metabolismo energetico; metabolismo amminoacidico; traduzione e modificazione; metabolismo nucleotidico; metabolismo delle macromolecole; risposta protettiva; trasporto di membrana; regolazione; altro, categoria a cui appartengono proteine il cui ruolo rientra in diverse categorie funzionali (biosintesi di CoA e pantotenato, replicazione e riparo del DNA); ignota, categoria di proteine la cui funzione è sconosciuta o ipotetica. Fra le diverse classi funzionali le più abbondanti sono quelle del metabolismo del carbonio (30%), metabolismo delle macromolecole (13%), metabolismo amminoacidico (9%), traduzione e modificazione (9%) e risposta protettiva (9%). Le proteine del metabolismo del carbonio sono state suddivise ulteriormente in altre tre classi funzionali: metabolismo lipidico, che risulta la più abbondante (59%), metabolismo degli acidi grassi e metabolismo energetico del carbonio (Fig. 30) (Tab. 7).

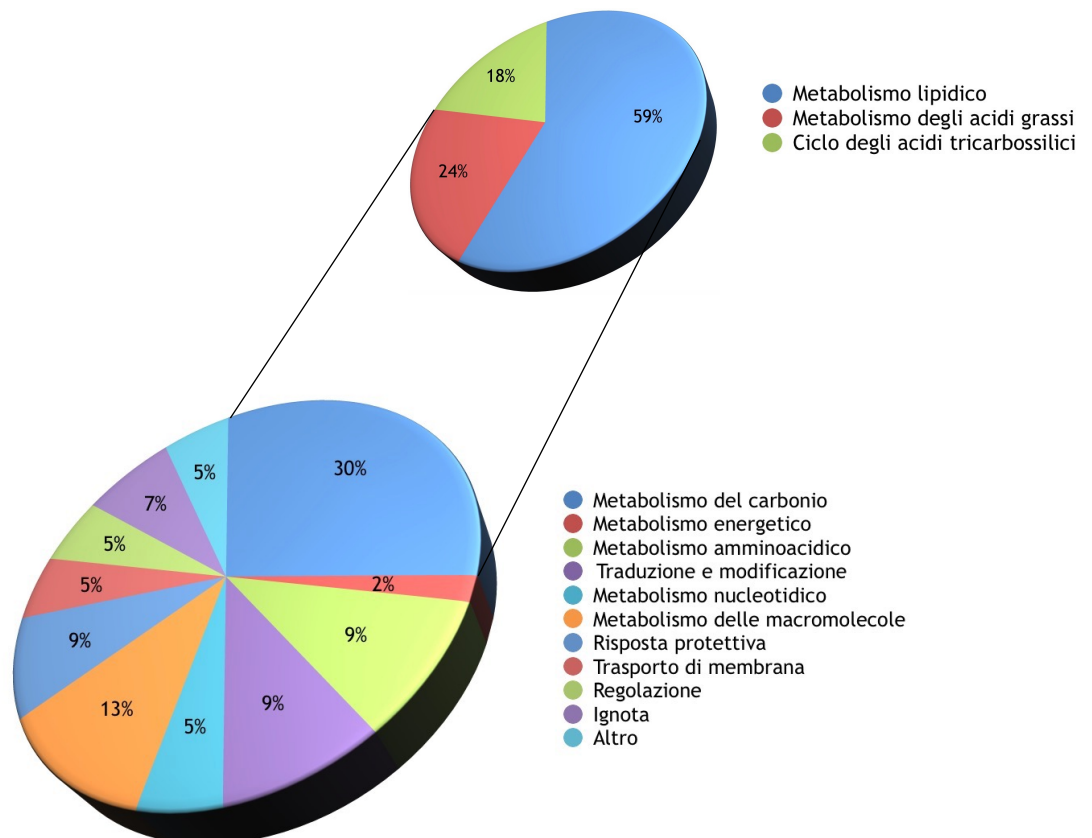
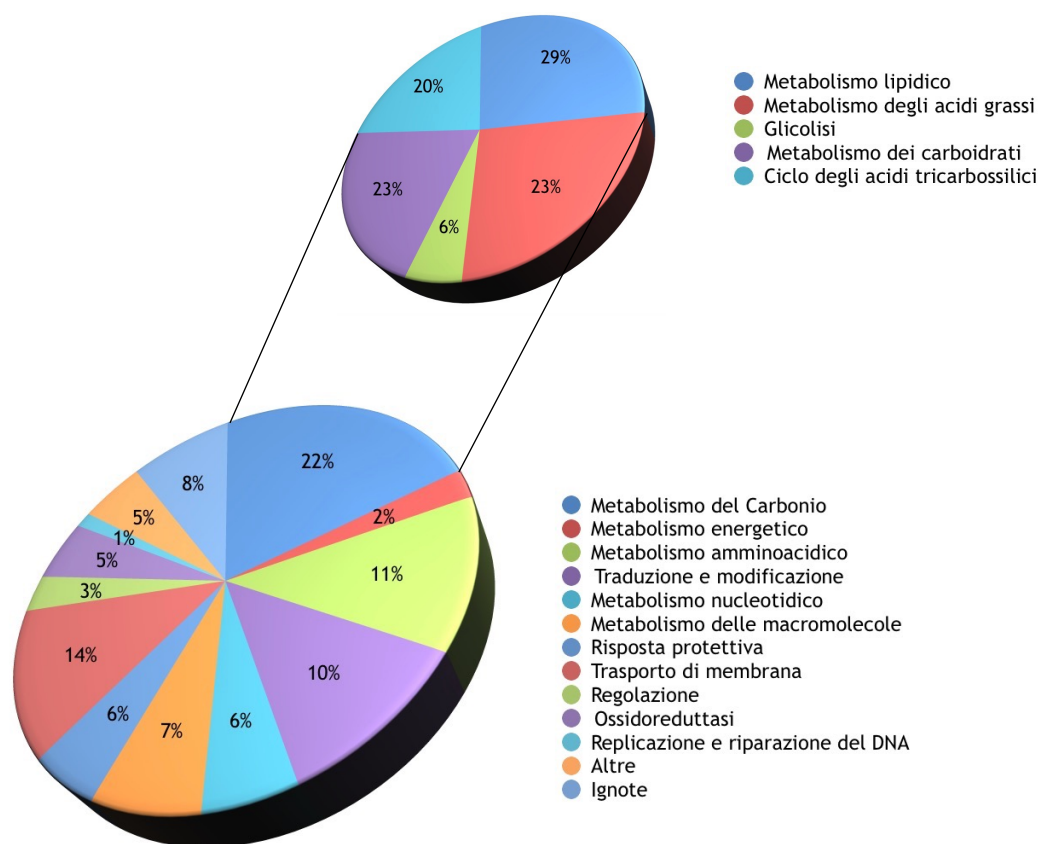


Figura 30. Distribuzione in classi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 24 ore di crescita.

### 3.4.2 Analisi funzionale delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 32 ore di crescita

Le proteine differenzialmente abbondanti sono state suddivise in 13 classi funzionali: metabolismo del carbonio; metabolismo energetico; metabolismo amminoacidico; traduzione e modificazione; metabolismo nucleotidico; metabolismo delle macromolecole; risposta protettiva; trasporto di membrana; regolazione; ossidoreduttasi; Replicazione e riparazione del DNA, altre, categoria a cui appartengono proteine il cui ruolo rientra in diverse categorie funzionali (biosintesi di CoA e pantotenato); ignote, categoria di proteine la cui funzione è sconosciuta o ipotetica. Fra le diverse classi funzionali le più abbondanti sono quelle del metabolismo del carbonio (22%), trasporto di membrana (14%), metabolismo amminoacidico (11%), traduzione e modificazione (10%). Le proteine del metabolismo del carbonio sono state suddivise ulteriormente in altre cinque classi funzionali: metabolismo lipidico, metabolismo degli acidi grassi, glicolisi, metabolismo dei carboidrati e ciclo degli acidi tricarbossilici (Fig. 31) (Tab. 8).



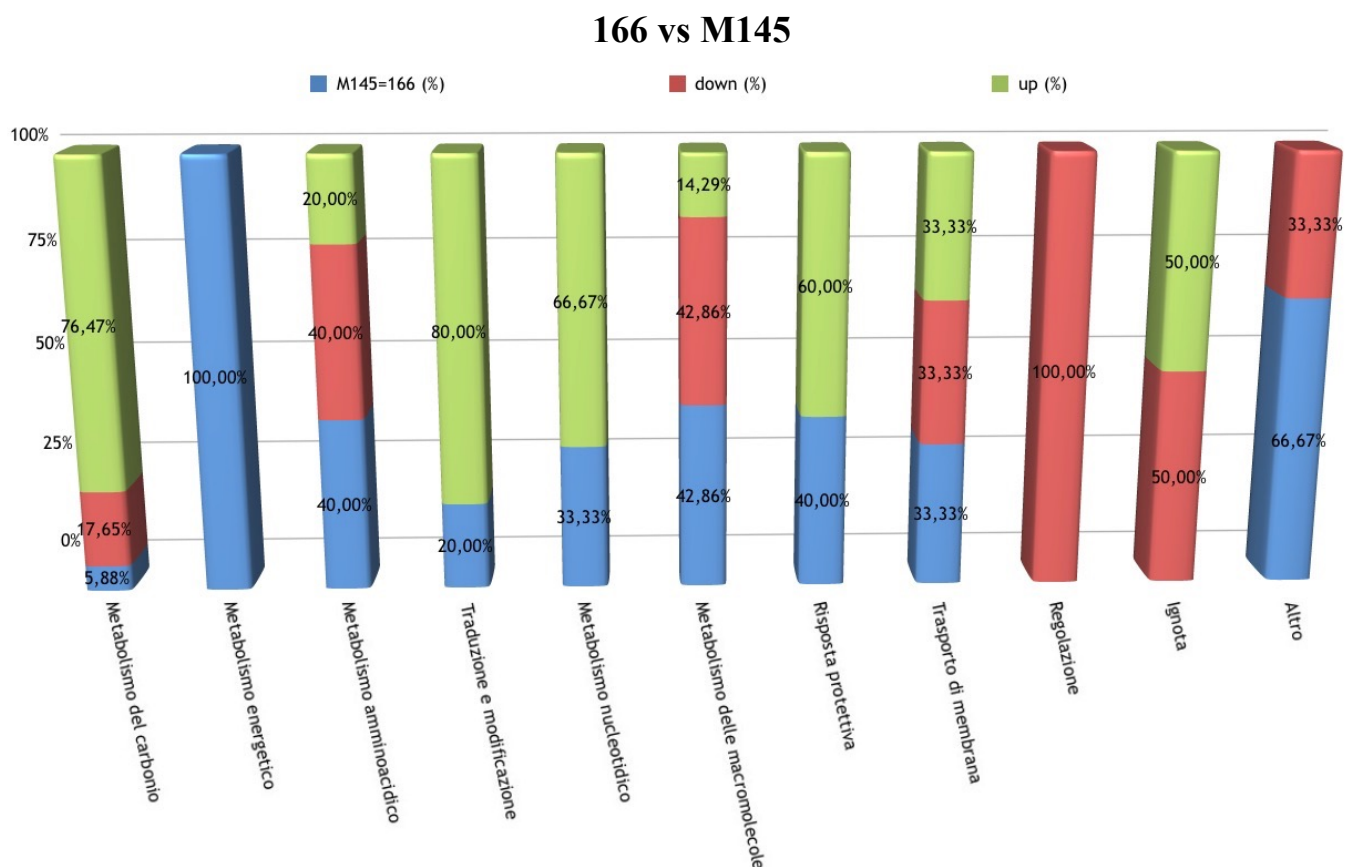
**Figura 31. Distribuzione in classi funzionali delle proteine differenzialmente abbondanti dopo 32 ore di crescita.**

### 3.5 Analisi delle abbondanze relative all'interno delle diverse classi funzionali

Per avere una visione di insieme delle proteine up- e down-regolate, le proteine di ciascuna classe funzionale sono state separate in base al loro profilo di abbondanza, ossia il loro incremento o decremento paragonate al ceppo M145 wild type (Fig. 32 e 33).

#### 3.5.1 Analisi delle abbondanze relative dopo 24 ore di crescita

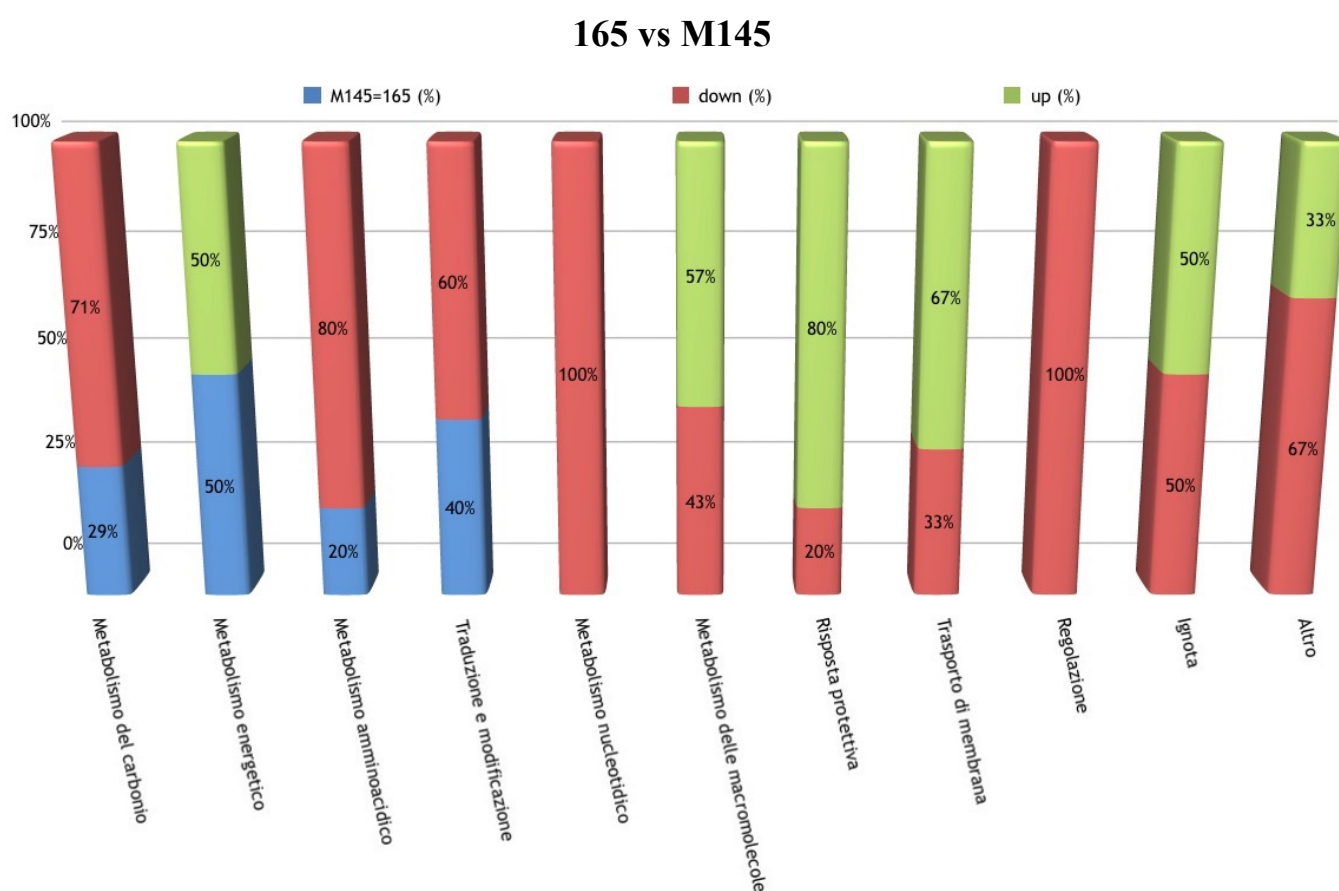
Questa indagine ha evidenziato che nel ceppo 166 risultano up-regolate proteine del metabolismo del carbonio, traduzione e modificazione, metabolismo nucleotidico e risposta protettiva. Risultano, invece, down-regolate le proteine che appartengono alle classi del metabolismo degli amminoacidi, metabolismo delle macromolecole, regolazione ed una ipotetica proteina di secrezione che rientra nella classe funzionale definita "altro" (Fig. 32).



**Figura 32. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti del ceppo 166 all'interno delle classi funzionali**



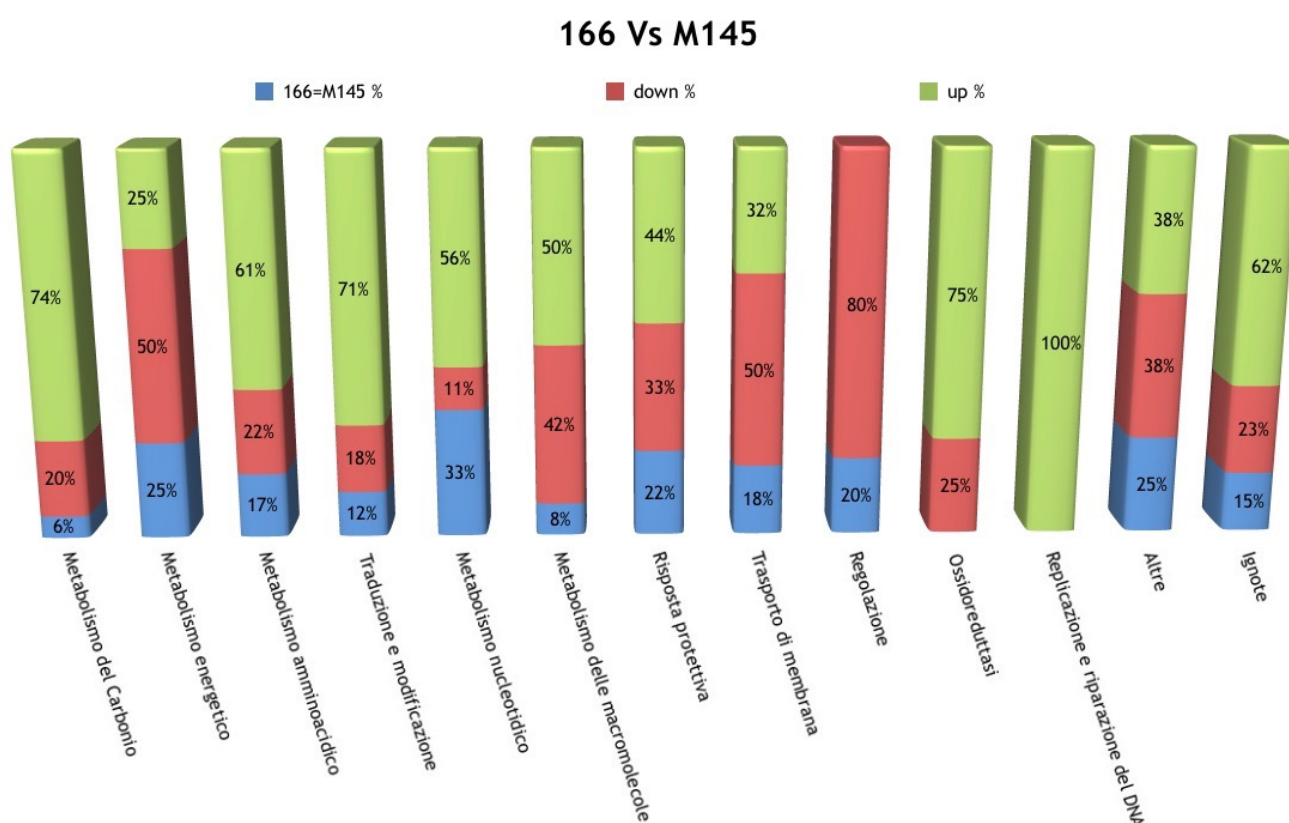
Nel ceppo 165 risultano up-regolate proteine che appartengono alle classi del metabolismo energetico, metabolismo delle macromolecole, risposta protettiva e trasportatori di membrana. Risultano, invece, down-regolate le proteine che appartengono alle classi del metabolismo del carbonio, metabolismo degli amminoacidi, traduzione e modificazione, metabolismo nucleotidico, regolazione e proteine del metabolismo del pantotenato, biosintesi del coenzima-A e replicazione e riparo del DNA che rientrano nella classe funzionale definita “altro” (Fig 33).



**Figura 33. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti del ceppo 165 all'interno delle classi funzionali**

### 3.5.2 Analisi delle abbondanze relative dopo 32 ore di crescita

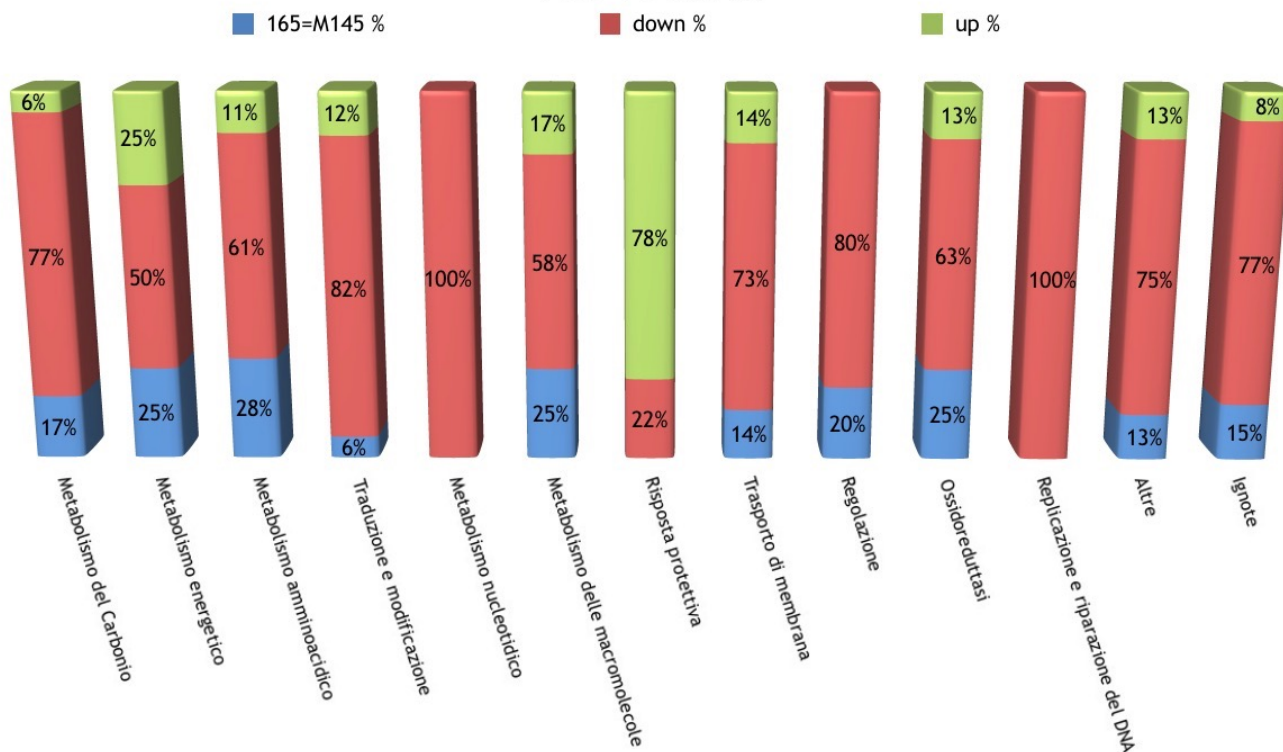
Questa indagine ha evidenziato che nel ceppo 166 risultano up-regolate proteine del metabolismo del carbonio, metabolismo degli amminoacidi, traduzione e modificazione, metabolismo nucleotidico, metabolismo delle macromolecole, risposta protettiva, ossidoreduttasi, replicazione e riparazione del DNA e le proteine della classe “ignote”. Risultano, invece, down-regolate le proteine che appartengono alle classi del metabolismo energetico, trasporto di membrana e regolazione (Fig. 34).



**Figura 34. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti del ceppo 166 all'interno delle classi funzionali**

Nel ceppo 165 risultano up-regolate proteine che appartengono alla classe della risposta protettiva. Risultano, invece, down-regolate le proteine che appartengono alle classi del metabolismo del carbonio, metabolismo energetico, metabolismo degli amminoacidi, traduzione e modificazione, metabolismo nucleotidico, metabolismo delle macromolecole, trasporto di membrana, regolazione, ossidoreduttasi, replicazione e riparazione del DNA e le proteine delle classi “altre” e “ignote” (Fig 35).

## 165 Vs M145



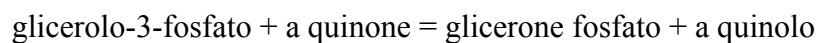
**Figura 35. Distribuzione delle proteine differenzialmente abbondanti del ceppo 165 all'interno delle classi funzionali**

## 3.6 Proteine differenzialmente espresse nel ceppo 166 *bldF*

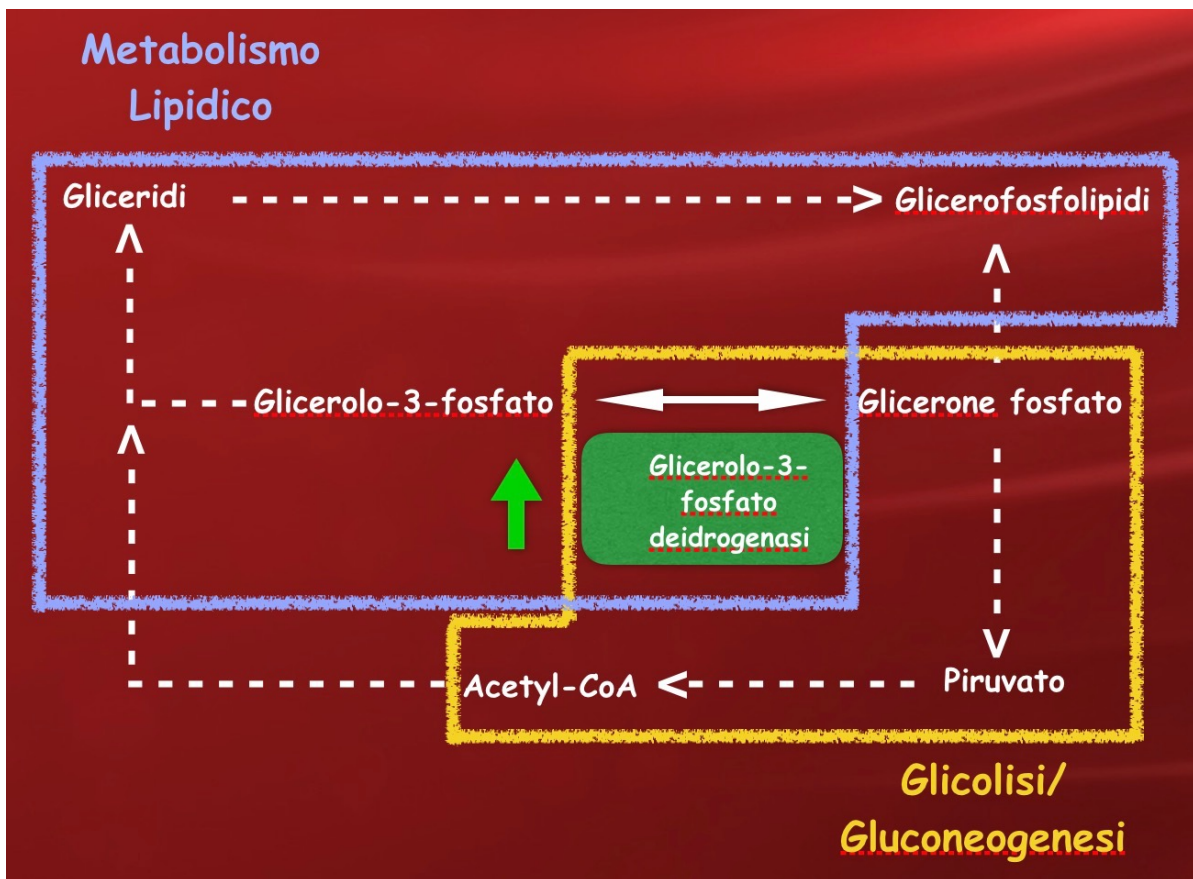
### 3.6.1 Classe funzionale del metabolismo del carbonio

L'analisi proteomica ha mostrato che alcune proteine della classe del metabolismo del carbonio, prodotte dal ceppo 166, hanno una notevole differente abbondanza relativa rispetto al ceppo wild type. In particolare, in questa classe ci sono 10 spot, corrispondenti tutte ad una glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, che sono down-regolate nel ceppo 165, mentre risultano up-regolate nel ceppo 166 fino a 29,5 volte in più rispetto al ceppo w.t. M145 a 24 ore di crescita e fino a 99,7 volte alle 32 ore di crescita.

La glicerolo-3-fosfato deidrogenasi appartiene alla famiglia delle deidrogenasi FAD-dipendenti ed è un enzima chiave nella connessione tra metabolismo dei carboidrati e metabolismo lipidico. Nei batteri è localizzato nella membrana plasmatica e catalizza la reazione redox reversibile del glicerolo-3-fosfato in glicerone fosfato (noto anche come diidrossiacetonfosfato):



Se l'equilibrio della reazione è spostato verso la formazione del glicerolo-3-fosfato verrà favorito il metabolismo dei gliceridi, che intervengono nella sintesi dei glicerofosfolipidi. Se l'equilibrio è spostato verso la formazione del glicerone fosfato questo potrà o intervenire a sua volta nel metabolismo dei glicerofosfolipidi o attraverso la via glicolitica favorire la produzione dell'Acetil-CoA che potrà essere coinvolto sia nel metabolismo lipidico che in quello dei carboidrati (Fig. 36). Inoltre l'Acetil-CoA e il suo derivato Malonyl-CoA sono due importanti precursori per la biosintesi delle prodigiosine.



**Figura 36.** Pathway in cui è implicata la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi.

Il gene codificante la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi fa parte dell' operone *gylCABX* che è coinvolto nel catabolismo del glicerolo in *S.coelicolor* ed è glicerolo-inducibile e glucosio-reprimibile (Seno and Chater, 1983).

Esso comprende: *gylC* (SCO1659) che codifica per una proteina di membrana necessaria per il trasporto del glicerolo, *gylA* (SCO1660) che codifica per una glicerolo chinasi, *gylB* (SCO1661) che codifica per la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi e *gylX* (SCO1662) che codifica per una proteina con funzione sconosciuta che non è essenziale per il catabolismo del glicerolo. Questo operone è sotto il controllo del prodotto del gene *gylR* (SCO1658), glicerolo-inducibile e debolmente reprimibile dal glucosio, situato a monte dell'operone *gylCABX* (Smith and Chater 1988) (Fig. 37). Da studi effettuati nel 2017, è stata dimostrata l'esistenza di un altro regolatore dell'operone *gylCABX*, detto NdgR. Questo regolatore lega l'operone a monte della sequenza di *gylC* e reprime l'espressione dell'operone. Infatti, è stato visto che un mutante per il gene di NdgR presenta un'over-espressione dell'operone (Lee BR *et al.*, 2017).



**Figura 37.** Operone *glyCABX* di *S. coelicolor*.

### 3.6.2 Classe funzionale del metabolismo delle macromolecole

Un'altra classe funzionale che potrebbe essere messa in relazione al fenotipo osservato è quella del metabolismo delle macromolecole che comprende il gruppo delle proteine indotte da shock termico (Heat Shock Proteins, HSPs). Molte HSPs sono chaperones molecolari o proteasi che sono presenti nella cellula in condizioni fisiologiche. In seguito allo shock termico, i livelli di espressione di queste proteine aumentano per facilitare il “refolding” delle proteine denaturate e impedire la formazione di aggregati insolubili. Le proteasi invece degradano quelle proteine che sono state danneggiate in maniera irreversibile dallo shock. I principali chaperones sono le proteine del sistema DnaK (DnaK, DnaJ e GrpE) e del sistema GroE (GroES e GroEL), mentre la classe di proteasi ATP-dipendente include i complessi ClpAP, ClpXP e Lon. In particolare, i complessi proteolitici ClpP sono composti da due subunità indipendenti: una subunità catalitica, ClpP (21Kda) ed una subunità regolatrice con attività ATPasica, ClpA/ClpC (90KDa) o ClpX (45KDa), che conferisce al complesso la specificità per il substrato (Gottesman *et al.*, 1992; 1997).

Molti studi hanno sottolineato la correlazione tra stress e differenziamento. In *S. coelicolor* lo studio dell'espressione delle HSPs mostra una cinetica di sintesi che è funzione della fase di crescita e della durata dello stress termico (Puglia *et al.*, 1995). In particolare le HSPs sono over-esprese a 30°C, temperatura ottimale di crescita, durante la fase di transizione. Ciò ha fatto ipotizzare svolgessero un ruolo importante per il differenziamento. Inoltre, lo studio del cambiamento del proteoma in risposta a diverse forme di stress (caldo, freddo, etanolo, sale e trattamento con antibiotico) ha evidenziato che la sintesi della maggior parte delle proteine da stress è controllata durante lo sviluppo e che, in generale, i livelli di sintesi di proteine in grado di rispondere a stress di natura differente sono associati

con uno dei 4 stadi dello sviluppo. Ad esempio, quasi la metà delle proteine indotte da shock termico e osmotico sono indotte principalmente in fase RG1 e in fase T. L'induzione "fase di crescita dipendente" suggerisce che i regolatori di queste proteine potrebbero rispondere ad un comune segnale correlato allo sviluppo. Pertanto, i sistemi di regolazione della risposta allo stress termico e osmotico potrebbero o controllare direttamente il programma di sviluppo e differenziamento, oppure permettere alla cellula di adattarsi agli stress associati al differenziamento (Vohradsky *et al.*, 2000).

L'analisi 2D-DIGE ha mostrato che le proteine della famiglia hsp60 (del sistema GroE), nel ceppo 166, sono down-regolate dopo 24 ore di crescita e up-regolate dopo 32 ore. Questa differente espressione delle proteine della famiglia hsp60 potrebbe essere correlata con i difetti nel differenziamento del ceppo.

Nel genere streptomyces, alterazioni nella sintesi delle proteasi Clp influenzano il differenziamento morfologico e fisiologico. La distruzione del gene *clpP1* in *S. lividans* ed *S. coelicolor* genera un mutante *bld*, incapace di differenziare il micelio aereo (De Crecy-Lagard *et al.*, 1999). La ATPasi ClpX è coinvolta nel differenziamento di *S. lividans* e il mutante *clpX* mostra un fenotipo *bld* "condizionale", in cui la formazione del micelio aereo è bloccata in un mezzo di crescita acido (Viala and Mazodier, 2003). Sorprendentemente il prodotto di questo gene risulta up-regolato nel mutante 166. Una possibile spiegazione di questa up-regolazione potrebbe essere quella di impedire un accumulo di proteine "misfolded" che potrebbero formare aggregati insolubili nel mutante 166 a causa della down-regolazione delle HSPs.

### 3.6.3 Classe funzionale dei regolatori

L'analisi proteomica infine, ha messo in evidenza che anche le proteine della classe funzionale dei regolatori potrebbero essere messe in relazione con il fenotipo osservato. Fra i regolatori trascrizionali troviamo quelli della famiglia TetR. I membri di questa famiglia sono caratterizzati da un motivo di legame al DNA del tipo helix-turn-helix (HTH) e agiscono principalmente da repressori trascrizionali. Questi regolatori controllano geni i cui prodotti giocano un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo e nel differenziamento morfo-fisiologico dei batteri (Ramos *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Ad esempio, la over-espressione di un gene regolatore della famiglia TetR, (SCO3201), reprime fortemente la

produzione degli antibiotici undecilprodigiosina, actinorodina e dell'antibiotico calcio-dipendente in *S. coelicolor* e nel mutante *ppk* di *S.lividans*. Curiosamente, la over-espressione di questo gene ha un effetto inibitorio sul processo di sporulazione in *S. coelicolor*, ma non in *S. lividans*. La distruzione di questo gene in *S. coelicolor* e *S.lividans*, invece, non induce alcuna variazione fenotipica, facendo ipotizzare che quando over-espresso probabilmente controlla l'espressione dei geni target di altri regolatori TetR coinvolti nella regolazione del metabolismo e del differenziamento in *S. coelicolor* (Xu *et al.*, 2010). L'analisi proteomica ha mostrato che due regolatori della famiglia TetR (SCO4454 e SCO7441) sono down-regolati in entrambi i ceppi.

Altri regolatori trascrizionali sono i membri della famiglia ROK che sono implicati nella regolazione del metabolismo primario ed in particolare nel metabolismo del carbonio in *Streptomyces*. Delezione della SCO6008 (*rok7B7*) influenza fortemente la crescita e la produzione di antibiotici in *Streptomyces coelicolor*. Questa proteina è down-regolata sia nel ceppo 166 che nel ceppo 165 rispetto al ceppo wild-type probabilmente influenzandone il loro fenotipo ( Magdalena A. Swiatek *et al.*, 2013).



### **3.7 Analisi dell'espressione di geni dell'operone *gylCABX***

In base all'analisi dei risultati della proteomica differenziale e alle caratteristiche morfo-fisiologiche dei ceppi mutanti, alcuni geni dell'operone *gylCABX* sono stati selezionati per essere studiati in dettaglio nella loro espressione, attraverso qRT-PCR.

Per studiare l'espressione dei geni dell'operone *gylCABX* nei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*, cresciuti in terreno liquido R2YE, è stato estratto l' RNA dopo 24 e 32 ore di crescita a 30°C. La qualità dell'RNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1%.

Per controllare la qualità dell'RNA, è stata effettuata una RT-PCR, usando una coppia di primer per una regione del gene *hrdB* che codifica per un fattore sigma costitutivo. Dopo queste analisi, che hanno confermato la buona qualità dell'RNA, è stato realizzato l'archivio di cDNA per le successive analisi qRT-PCR.

### 3.7.1 Analisi qRT-PCR dei geni *gylC*, *gylA* e *gylB*

Il cDNA è stato utilizzato per valutare quantitativamente i livelli di espressione dei geni *gylC*, *gylA* e *gylB* dell'operone *gylCABX* nei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor* dopo 24 e 32 ore di crescita. In particolare sono state eseguite analisi qRT-PCR relative utilizzando il gene *hrdB* per normalizzare i valori di abbondanza dei trascritti.

L'analisi qRT-PCR ha mostrato che nel ceppo 166 l'espressione del gene *gylC* dopo 24 ore di crescita è simile a quella del ceppo M145, dopo 32 ore invece, è di circa 28 volte superiore (Fig. 38). Nel ceppo 165 *gylC* è notevolmente espresso dopo 24 ore di crescita per poi subire una drastica riduzione dopo 32 ore di crescita come avviene nel ceppo wt M145. (Fig38).

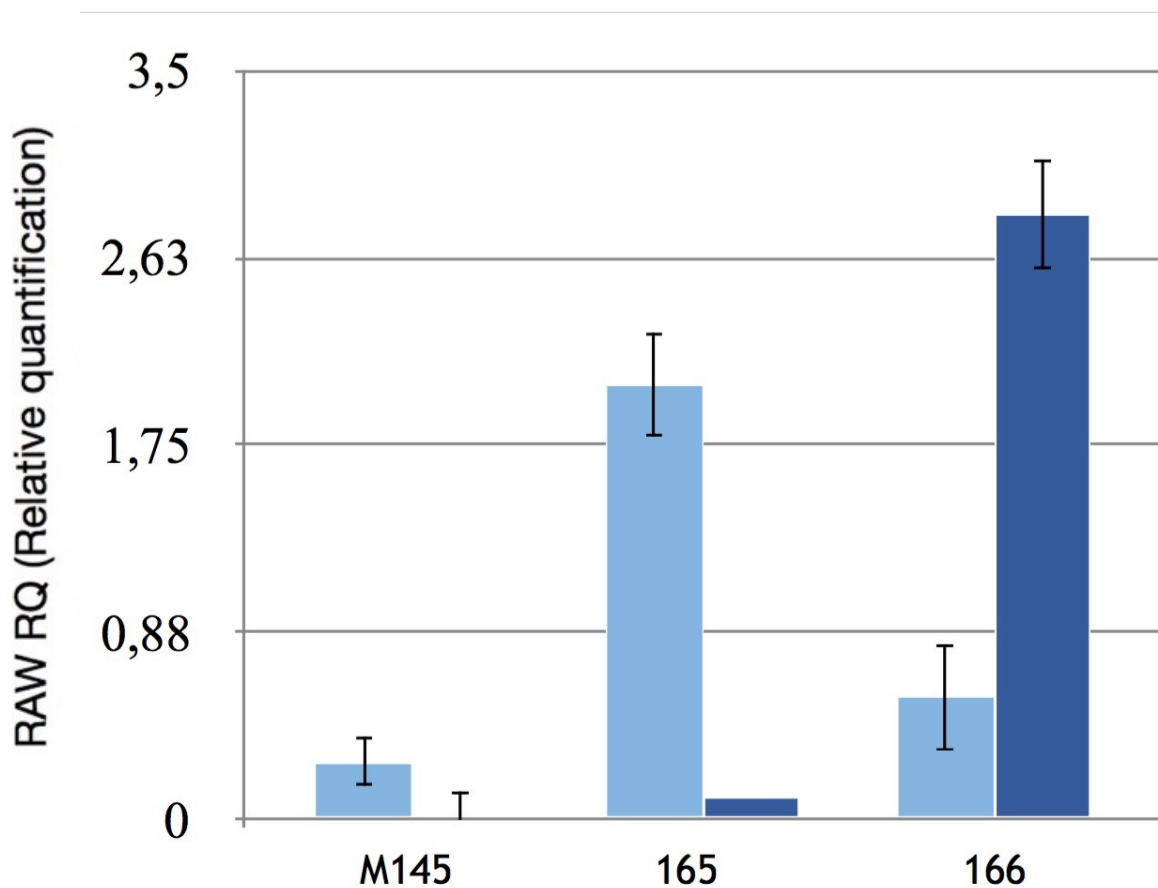
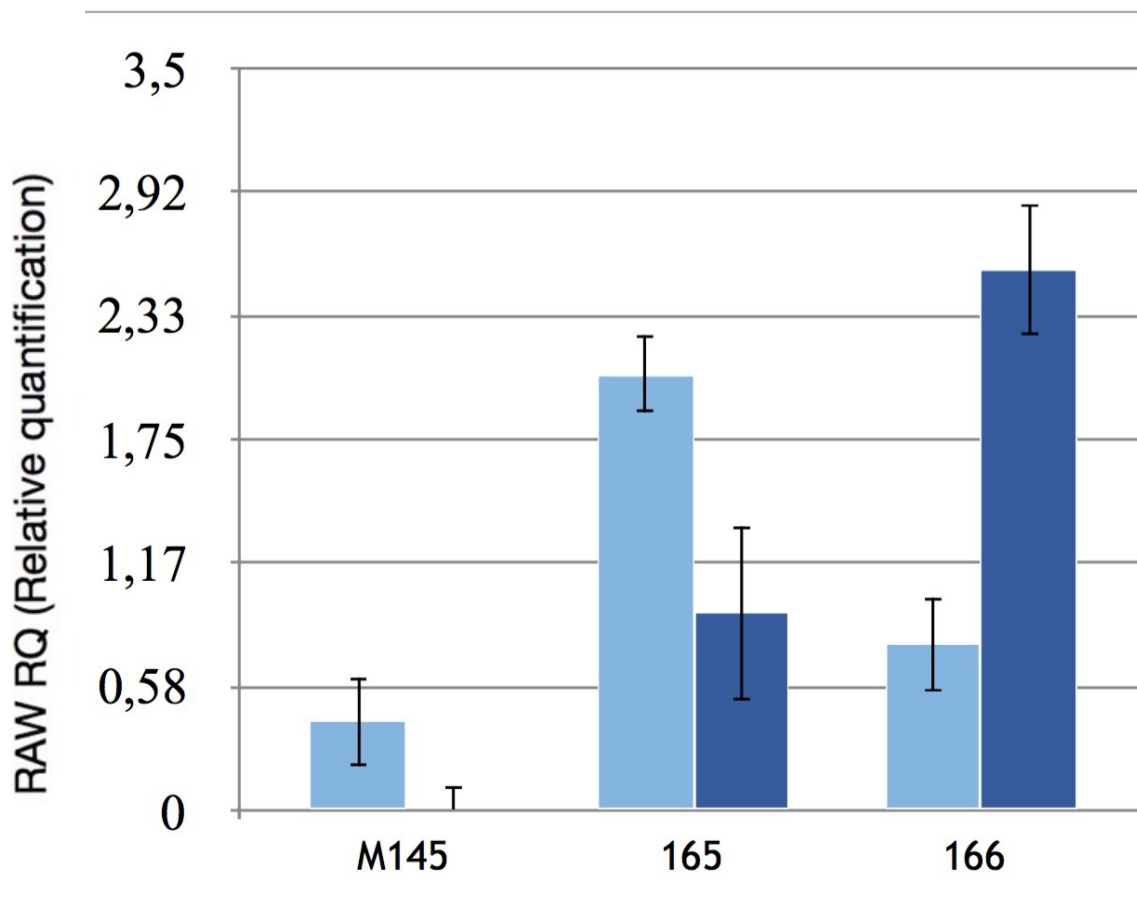


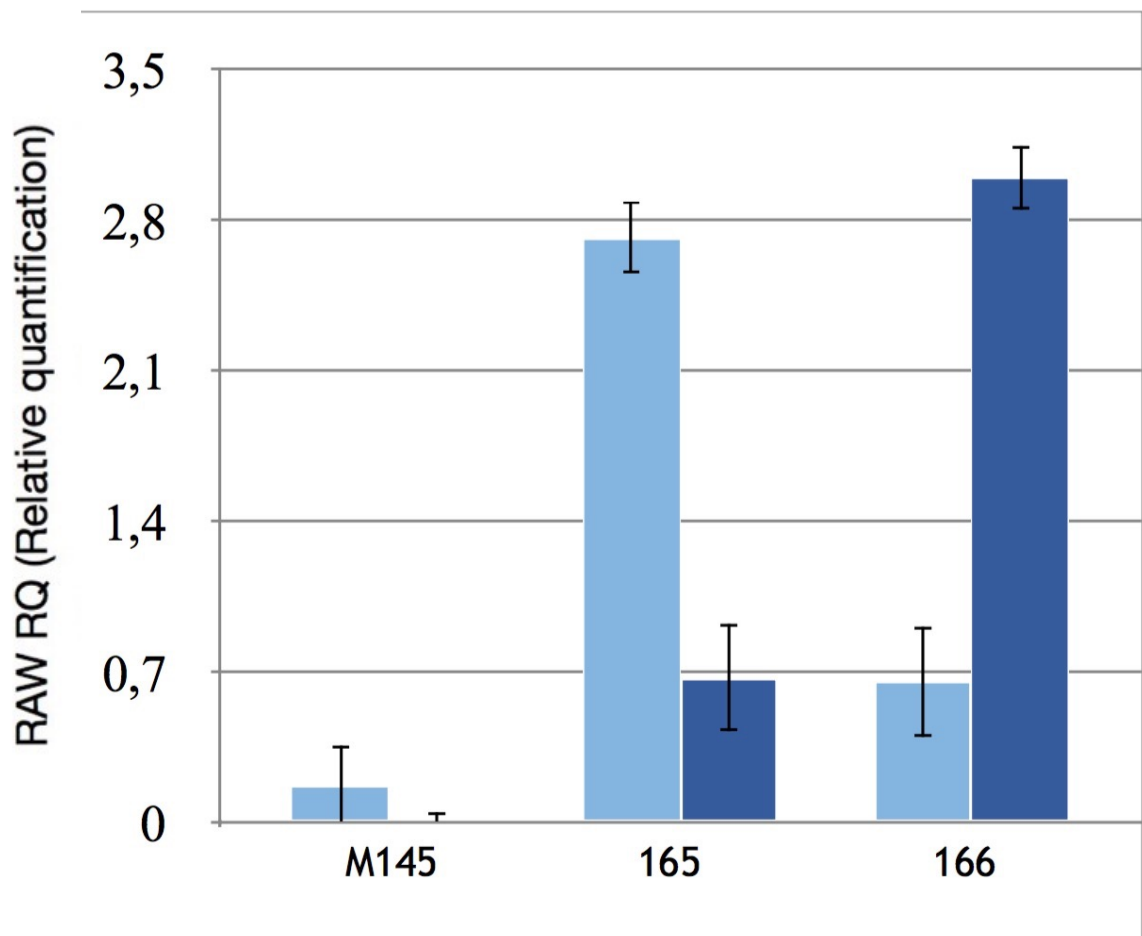
Figura 38. Analisi qRT-PCR del gene *gylC* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In azzurro 24 ore e in blu 32 ore.

Il gene *gylA* nel ceppo 166 viene espresso 1,8 e 25,5 volte in più rispetto al ceppo M145 rispettivamente dopo 24 e 32 ore di crescita. Nel ceppo 165 anche *gylA* è notevolmente espresso dopo 24 ore di crescita per poi subire una drastica riduzione dopo 32 ore di crescita come nel ceppo w.t. M145 (Fig. 39).



**Figura 39.** Analisi qRT-PCR del gene *gylA* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In azzurro 24 ore e in blu 32 ore.

Infine l'espressione del gene *gylB* aumenta da 24 a 32 ore di 4,6 volte ed è 4 e 30 volte maggiore rispetto al ceppo M145 dopo 24 e 32 ore di crescita. Nel ceppo 165, *gylB* viene espresso ad alti livelli dopo 24 ore subendo, però, una diminuzione di circa 4 volte dopo 32 ore (Fig. 40)



**Figura 40.** Analisi qRT-PCR del gene *gylB* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In azzurro 24 ore e in blu 32 ore.

### 3.8 Analisi dell'espressione di geni del cluster *red*

Altro cluster genico, oggetto di studio, è stato il cluster *Red* che dirige la biosintesi dell'undecilprodigiosina e del suo derivato ciclico, la streptorubina, molecole miceliali di colore rosso che danno il tipico colore al ceppo mutante 166. Il cluster *Red* consta di 23 geni (Fig. 17). Per lo studio dell'espressione genica sono stati selezionati i geni: *redD*, che codifica per un regolatore trascrizione che regola positivamente la produzione di undecilprodigiosina e fa parte delle proteine SARP (streptomycete antibiotic regulatory protein); *redZ*, che codifica per un altro regolatore trascrizionale che legandosi al prodotto di *redD* attiva l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi dell'undecilprodigiosina; *redH*, la cui proteina corrispondente catalizza la condensazione dei due intermedi, a formare l'undecilprodigiosina.

Per studiare l'espressione dei geni del cluster *Red* nei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*, cresciuti in terreno liquido R2YE, è stato estratto l'RNA dopo 24 e 32 ore di crescita a 30°C. La qualità dell'RNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1%.

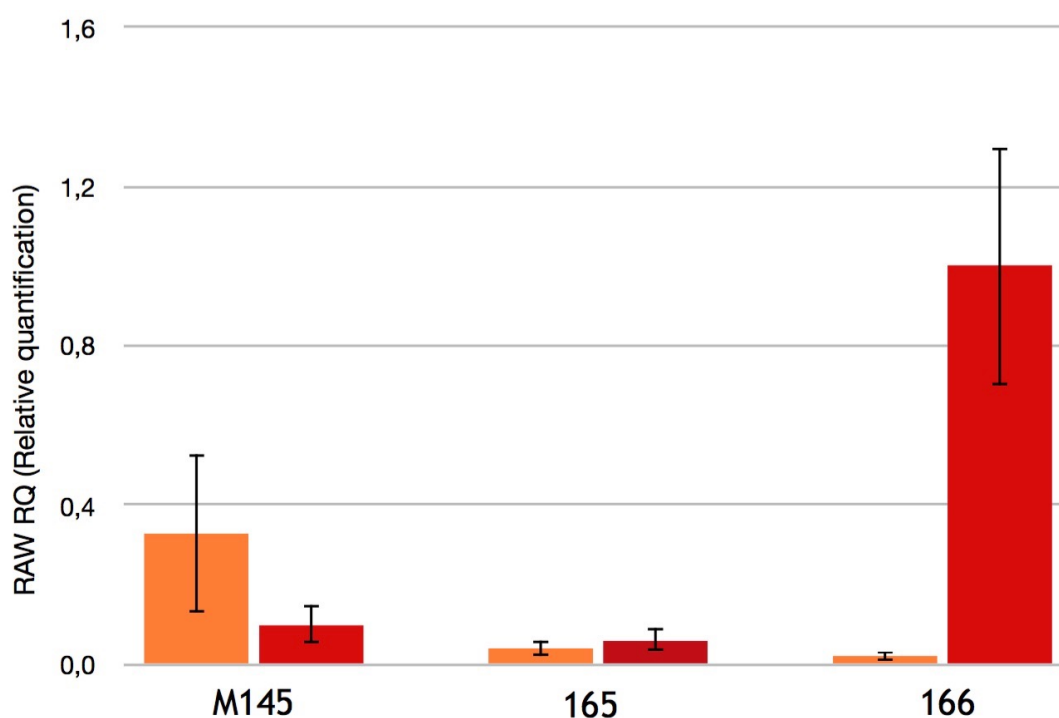
Per controllare la qualità dell'RNA, è stata effettuata una RT-PCR, usando una coppia di primer per una regione di *hrdB*. Dopo queste analisi, che hanno confermato la buona qualità dell'RNA, è stato realizzato l'archivio di cDNA per le successive analisi qRT-PCR.

### 3.8.1 Analisi qRT-PCR dei geni *redD*, *redZ* e *redH*

Il cDNA è stato utilizzato per valutare quantitativamente i livelli di espressione dei geni *redD*, *redZ* e *redH* del cluster *RED* nei ceppi 166, 165 e M145 di *S. coelicolor* dopo 24 e 32 ore di crescita. In particolare sono state eseguite analisi Real-Time PCR quantitative relative utilizzando il gene *hrdB* come endogeno e costitutivo su cui normalizzare i valori di abbondanza dei trascritti.

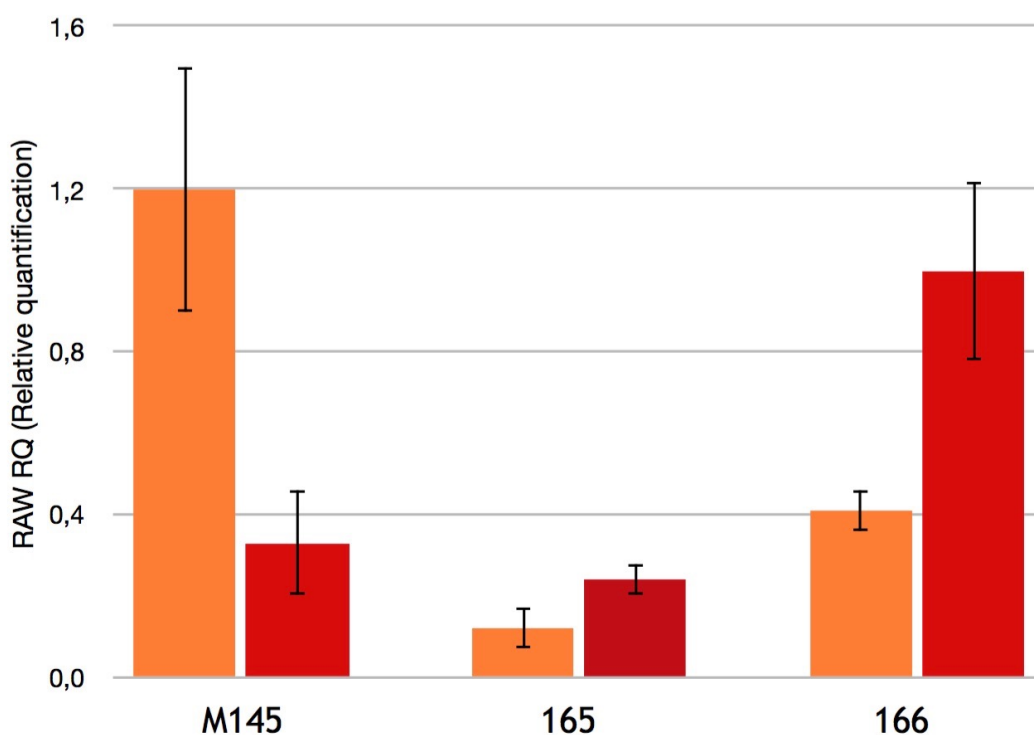
Nel ceppo 166, il gene *redD*, è trascritto in quantità esigue dopo 24 ore di crescita, ma la produzione aumenta di 50 volte alle 32 ore. Nel ceppo M145, il gene, è moderatamente trascritto dopo 24 ore e tale espressione diminuisce repentinamente dopo 32 ore di crescita. Nel ceppo 165, la trascrizione a 24 e 32 ore è bassa e presenta valori equiparabili.

In generale, a 24 ore, il ceppo 166 ha una trascrizione minore di circa 16,5 volte rispetto al ceppo M145, tuttavia a 32 ore la situazione si ribalta e il gene ha un'espressione maggiore di 10 volte rispetto al ceppo M145 (Fig. 41).



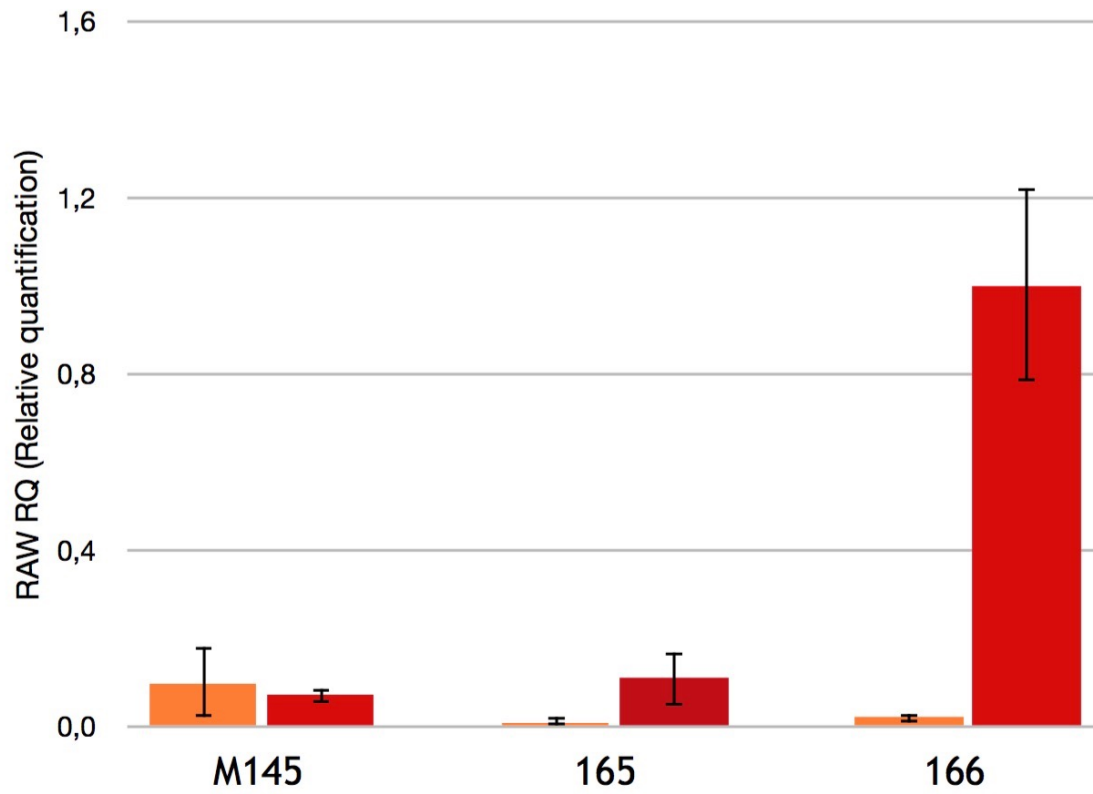
**Figura 41.** Analisi qRT-PCR del gene *redD* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In arancione 24 ore e in rosso 32 ore.

Il ceppo 166 dopo 24 ore presenta una trascrizione del gene *redZ* inferiore di circa un terzo rispetto al ceppo wild type ed è paragonabile all'espressione nel ceppo 165. A 32 ore di crescita la sua espressione raddoppia ed è maggiore di circa 2,5 volte rispetto al ceppo M145 e 165 (Fig.42).



**Figura 42.** Analisi qRT-PCR del gene *redZ* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In arancione 24 ore e in rosso 32 ore.

Infine il ceppo 166 produce un'esigua quantità di trascritto del gene *redH* dopo 24 ore, paragonabile al ceppo 165, ma dopo 32 ore la trascrizione aumenta di 50 volte. Confrontando la trascrizione dopo 24 ore di crescita, il gene è trascritto nel ceppo mutante 5 volte in meno rispetto al ceppo M145. Dopo 32 ore, invece, il gene è trascritto 14,3 volte in più rispetto al ceppo wild-type (Fig.43).



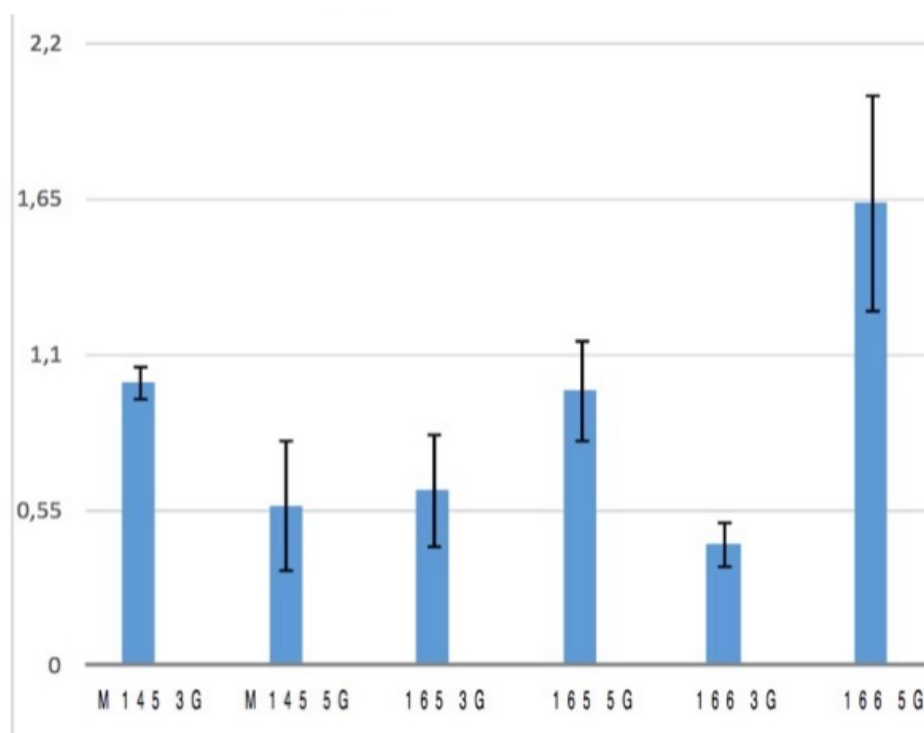
**Figura 43.** Analisi qRT-PCR del gene *redH* dei ceppi M145, 165 e 166 di *S. coelicolor*. In arancione 24 ore e in rosso 32 ore.



### 3.9 Produzione di prodigiosine nel ceppo 166 *bldF*

Per esaminare le differenti produzioni di undecilprodigiosina, da parte dei ceppi mutanti rispetto al ceppo selvatico, sono state eseguite analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF. I dati relativi ai ceppi analizzati derivano da colture cresciute in terreno agarizzato o liquido. Per ogni ceppo, sono stati prelevati dei campioni a tempi di crescita differenti (come descritto nel par. 5.17). Quindi, in seguito al processamento e all'estrazione metanolica, è stato possibile analizzare il quantitativo di prodigiosine. I valori ottenuti per ogni tempo di crescita analizzato sono derivati dalla media aritmetica delle tre misure ottenute in seguito all'analisi del triplicato biologico.

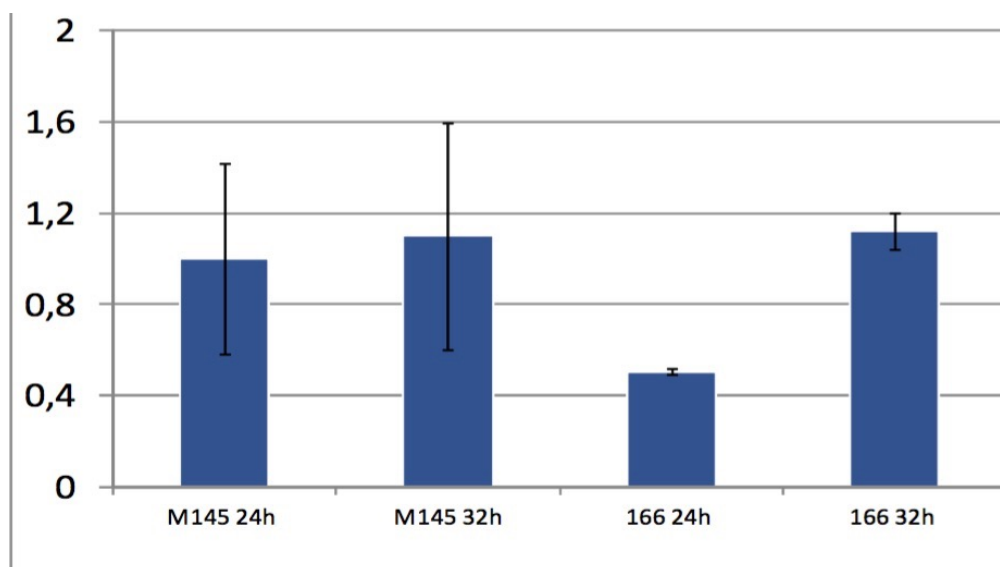
Per quanto riguarda le analisi effettuate su terreno agarizzato sono stati scelti come tempi di crescita 3 e 5 giorni, e i valori sono stati normalizzati prendendo come riferimento il ceppo selvatico al terzo giorno di crescita. Innanzitutto, una cinetica di produzione differente è osservabile fra i tre ceppi analizzati, con i ceppi 166 e 165 che presentano una maggiore produzione di undecilprodigiosina al quinto giorno di crescita rispetto al ceppo M145 che ha il picco massimo di produzione al terzo giorno di crescita. Tuttavia, non sono state riscontrate differenze significative nella produzione massima di undecilprodigiosina fra i tre ceppi, eccetto un leggero aumento nel ceppo 166 al quinto giorno di crescita (Fig. 44).



**Figura 44. Produzione di undecilprodigiosina nei ceppi di *S. coelicolor* incubati su terreno solido. 3G e 5G indicano rispettivamente 3 e 5 giorni di crescita.**

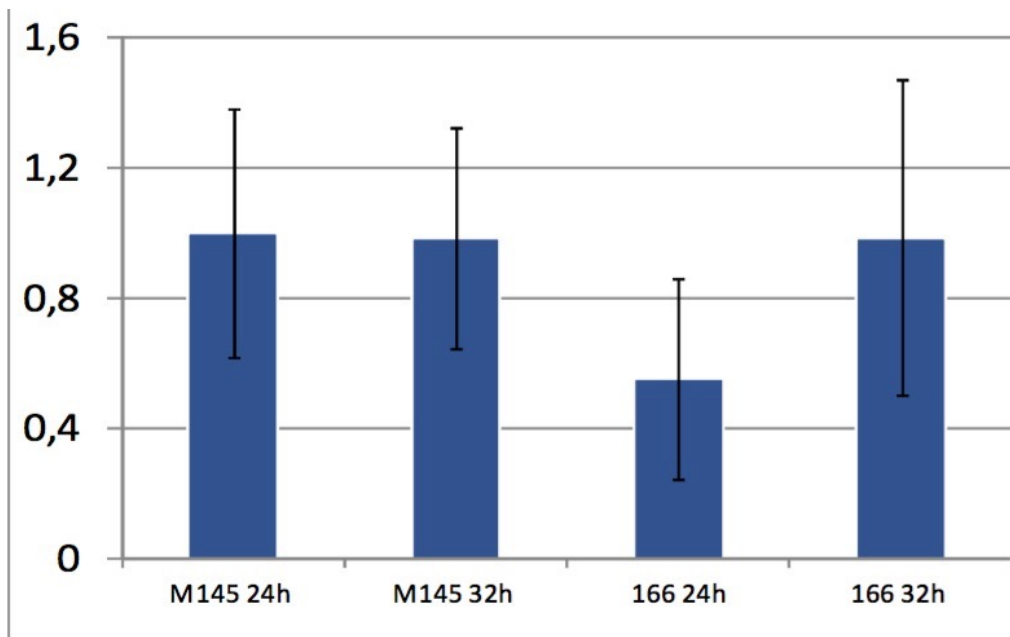
La produzione di undecilprodigiosina è stata analizzata anche in colture liquide. In questo caso, i dati elaborati si riferiscono alle concentrazioni della molecola a 24 ore e 32 ore di crescita, in colture da 50 mL in beute da 250 mL e in colture da 250 mL in beute da 1L. I valori misurati, così come in solido, sono stati opportunamente normalizzati. È stato preso come riferimento il ceppo selvatico a 24 ore di crescita.

Nella prima condizione di crescita 50 mL di terreno in beute da 250 mL sono stati inoculati con i ceppi batterici M145 e 166. Dalle analisi eseguite è possibile osservare che la produzione di undecilprodigiosina nel ceppo 166 alle 24 ore mostra una concentrazione inferiore rispetto al ceppo selvatico. Dopo 32 ore di crescita la concentrazione raddoppia ed è paragonabile alla produzione del ceppo M145. La produzione massima è quindi simile in entrambi i ceppi (Fig. 45).



**Figura 45. Produzione di undecilprodigiosina nei ceppi di *S. coelicolor* in colture allestite in beute da 250 mL.**

Nella seconda condizione di crescita 250 mL di terreno in beute da 1 L sono stati inoculati con i ceppi batterici 166 e M145. I dati ottenuti confermano i risultati della prima condizione di crescita sperimentata. Il ceppo M145 presenta un'uguale concentrazione di undecilprodigiosina nei due punti di crescita. Il ceppo 166 segue lo stesso andamento del ceppo selvatico. La produzione massima di undecilprodigiosina è simile in entrambi i ceppi (Fig. 46).



**Figura 46. Produzione di undecilprodigiosina nei ceppi di *S. coelicolor* in colture allestite in beute da 1 L.**

### 3.10 Produzione di acidi grassi nel ceppo 166 *bldF*

Per esaminare le differenti produzioni di acidi grassi del ceppo 166, rispetto al ceppo selvatico, è stata eseguita un'analisi Gas-Cromatografica accoppiata a Spettrometria di Massa (GC-MS).

Per ogni ceppo, sono stati prelevati dei campioni a 24 ore di crescita (come descritto nel par. 5.19). Quindi, in seguito al processamento e all'estrazione metanolica, è stato possibile analizzare il quantitativo di acidi grassi. I valori ottenuti sono derivati dalla media aritmetica delle tre misure ottenute in seguito all'analisi del triplicato biologico. I valori misurati sono stati opportunamente normalizzati. È stato preso come riferimento il ceppo selvatico a 24 ore di crescita. In particolare è stata analizzata la produzione di due acidi grassi, l'acido oleico e l'acido stearico.

La produzione di acido oleico, nel ceppo 166 è nettamente superiore rispetto agli altri due ceppi di ben 5 volte. Invece, il ceppo wild-type e il ceppo 165 presentano una concentrazione della molecola quasi identica fra loro (Fig 47).

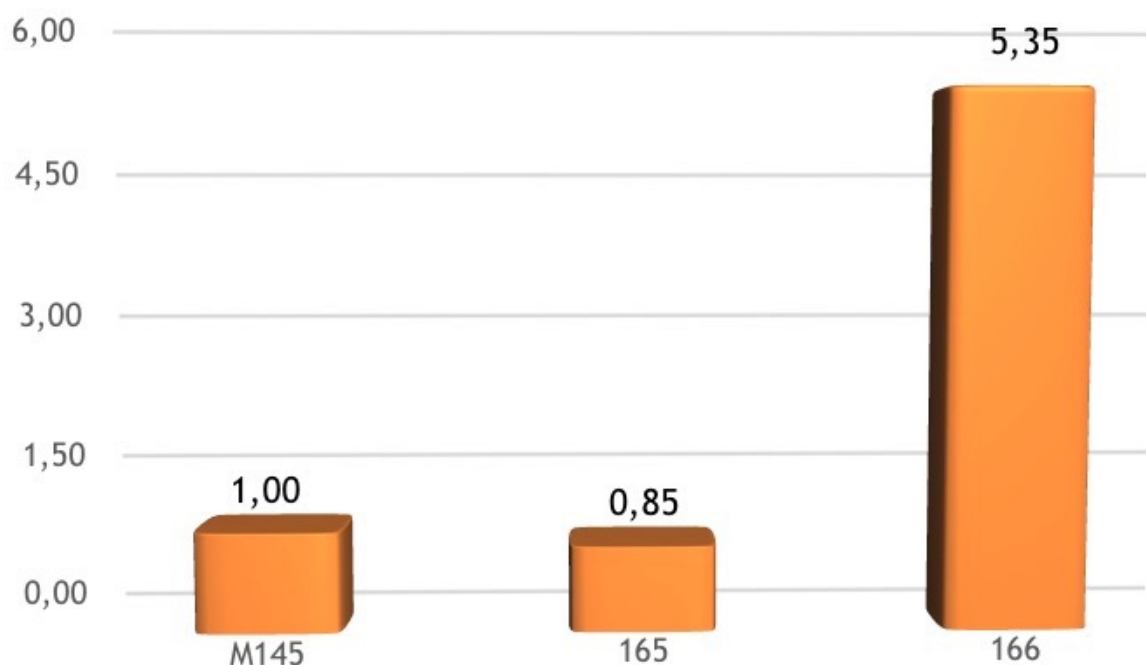
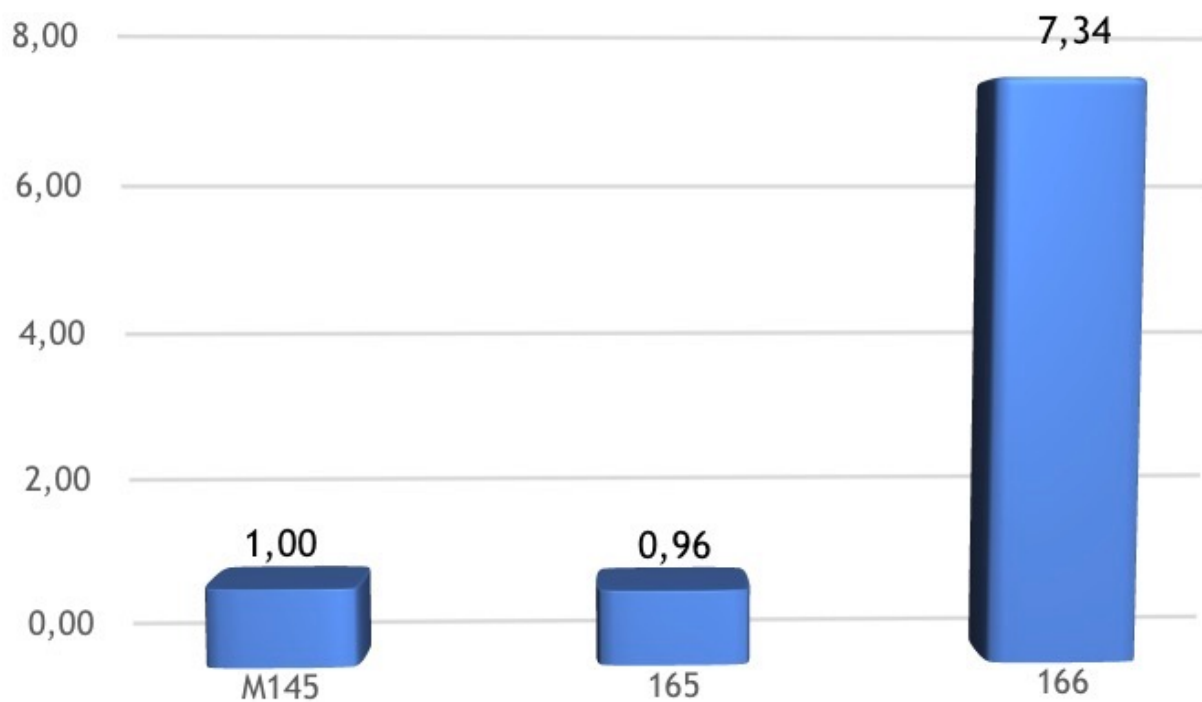


Figura 47. Produzione di acido oleico nei ceppi di *S. coelicolor* M145, 165 e 166.

Per quanto riguarda la produzione di acido stearico troviamo un andamento molto simile rispetto all'acido oleico, con una quantità della acido grasso prodotta dal ceppo 166 ben 7 volte maggiore rispetto ai ceppi M145 e 165 (Fig 48).



**Figura 48. Produzione di acido stearico nei ceppi di *S. coelicolor* M145, 165 e 166.**

## 4. CONCLUSIONI

Gli streptomiceti sono caratterizzati da un differenziamento morfologico e fisiologico che culmina con la produzione di spore e di numerosi metaboliti secondari con proprietà antibiotiche, antibatteriche e antitumorali. Il differenziamento morfo-fisiologico degli streptomiceti è stato studiato utilizzando principalmente i mutanti *bld*, incapaci di formare il micelio aereo e i mutanti *whi*, incapaci di formare spore (Hopwood *et al.*, 1970; Chater, 1972). I mutanti del differenziamento oltre a mostrare delle differenze dal punto di vista morfologico, spesso, presentano una produzione diversa in termini di quantità e qualità di metaboliti secondari di grande interesse commerciale (Ho *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013).

Analisi di Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) hanno mostrato che il ceppo mutante del differenziamento di *S. coelicolor*, 166 (*BldF*), produce ife vegetative con un diametro inferiore rispetto a quelle del ceppo selvatico e che su queste ife è presente un numero inferiore di vescicole. Questi risultati mettono in evidenza differenze morfo-fisiologiche del ceppo mutante rispetto a quelle ceppo wild-type.

Per identificare proteine correlate con il differenziamento e che possano spiegare il fenotipo osservato dei mutanti sono state effettuate analisi di proteomica differenziale sulle biomasse del ceppo mutante 166 e dei due ceppi controllo M145 e 165, dopo 24 e 32 ore di crescita. Questa analisi ha mostrato che la classe funzionale del metabolismo del carbonio, in particolare modo quella del metabolismo lipidico, risulta fortemente up-regolata nel mutante 166 rispetto al ceppo w.t. Questa classe contiene 10 spot che corrispondono ad una glicerolo-3-fosfato deidrogenasi che fa parte dell'operone *gylCABX* glicerolo-inducibile e glucosio-reprimibile (Seno and Chater 1983). Questo enzima è coinvolto nel catabolismo del glicerolo ed è un enzima chiave nella connessione tra metabolismo dei carboidrati e metabolismo lipidico.

I risultati hanno mostrato che la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi è fortemente up-regolata nel ceppo 166 fino a 29,5 volte in più rispetto al ceppo M145 a 24 ore di crescita e fino a 99,7 volte alle 32 ore di crescita.

L'elevata espressione della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi è dovuta ad una notevole trascrizione del gene *gylB* che lo codifica. L'analisi qRT-PCR, infatti, ha mostrato che i geni

*gylC*, *gylA* e *gylB* dell'operone *gylCABX* risultano fortemente over-espressi nel ceppo 166 rispetto al ceppo wild-type M145 dopo 32 ore di crescita.

Da dati inerenti la sequenza del genoma del ceppo 166 (manoscritto in preparazione) sappiamo che c'è una mutazione per sostituzione di base (C $\leftrightarrow$ T) nella regione del promotore dell'operone *gylCABX*, sicuramente sarà interessante analizzare e approfondire l'effetto che ha la mutazione puntiforme nella regione del promotore sull'espressione dell'operone *gylCABX* per capire se c'è una correlazione con l'up-regolazione della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi nel mutante 166.

Analisi dell'espressione di alcuni geni del cluster *red* sono state effettuate per valutare eventuali differenze fra il ceppo mutante 166 e il ceppo wild-type. Il cluster *red* dirige la biosintesi dell'undecilprodigiosina e del suo derivato ciclico, la streptorubina, molecole miceliali di colore rosso che danno il tipico colore al ceppo mutante 166. Il cluster *red* consta di 23 geni. Per lo studio dell'espressione genica sono stati selezionati i geni: *redD*, che codifica per un regolatore trascrizione che regola positivamente la produzione di undecilprodigiosina e fa parte delle proteine SARP (streptomycete antibiotic regulatory protein); *redZ*, che codifica per un altro regolatore trascrizionale che legandosi al prodotto di *redD* attiva l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi dell'undecilprodigiosina; *redH*, la cui proteina corrispondente catalizza la condensazione dei due intermedi, a formare l'undecilprodigiosina. I risultati della qRT-PCR hanno mostrato una maggiore espressione di tutti e 3 i geni nel ceppo 166 rispetto agli altri due ceppi studiati, dopo 32 ore di crescita.

Per esaminare la produzione di undecilprodigiosina sono state eseguite analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF. I risultati delle analisi su terreno agarizzato ai tempi di crescita di 3 e 5 giorni hanno mostrato una maggiore produzione di undecilprodigiosina nel ceppo 166 dopo 5 giorni di crescita.

Invece, i risultati della produzione di undecilprodigiosina in terreno liquido dopo 24 e 32 ore di crescita non hanno mostrato differenze significative tra i ceppi.

Infine è stata analizzata tramite analisi Gas-Cromatografica accoppiata a Spettrometria di massa (GC-MS) la produzione di acidi grassi da parte del ceppo mutante 166 paragonandola alla produzione del ceppo selvatico e del ceppo M165. Sorprendentemente i risultati ottenuti mostrano che nel ceppo 166 è registrata una

concentrazione nettamente superiore rispetto agli altri due ceppi di ben 5 volte. Per quanto riguarda la produzione di acido stearico troviamo un andamento molto simile con un incremento della quantità di acido grasso prodotta simile di ben 7 volte nel ceppo 166.

Questo suggerisce che la massiva espressione del gene *gylB* e l'over-produzione dell'enzima glicerolo-3-fosfato deidrogenasi nel ceppo mutante del differenziamento, 166, spingono il metabolismo verso la produzione di acidi grassi, grazie alla produzione di importanti precursori metabolici, favorendo solo in parte la produzione di prodigiosine.

Questa massiva produzione di acidi grassi probabilmente influenza il tipico aspetto ceroso e lucido di questo ceppo. Ulteriori esperimenti dovranno chiarire dove sia la regione di accumulo di questi acidi grassi.



## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 I Ceppi di *Streptomyces coelicolor* utilizzati

M145 (w.t., SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>, Kieser *et al.*, 2000)

165 (*hisBp*, *pheA1*, *strRA1*, SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>+</sup>, Puglia *et al.*, 1982; 2005)

166 (*hisBp*, *pheA1*, *strRA1*, SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>+</sup> Puglia *et al.*, 1984).

### 5.2 Terreni di coltura

#### 5.2.1 Terreno liquido e solido R2YED

Saccarosio	51,5 g/0,4L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,125 g/0,4L
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5,06 g/0,4L
Glucosio	5 g/0,4L
Difco casaminoacidi	0,05 g/0,4L
Estratto di lievito	2,5 g/0,4L

Se si prepara terreno solido, si aggiunge Agar alla percentuale di 1,5%.

Dopo sterilizzazione in autoclave (1 atm, 121°C, 30 minuti) si aggiungono:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5%	5 ml		
CaCl <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O 3,68%	40 ml	*Elementi in tracce (L <sup>-1</sup> ):	
L-prolina 20%	7,5 ml	ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
NaOH 1N	2,5 ml	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200 mg
TES 5,73% pH 7,2	50 ml	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg
*Elementi in tracce	1 ml	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
		Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	10 mg

\*\*Istidina (10 mg/ml) 2,6 ml

\*\*Fenilalanina (7,5 mg/ml) 2,5 ml

\*\*Per i ceppi mutanti 165 e 166 il terreno viene addizionato con gli amminoacidi istidina e fenilalanina.

### 5.2.2 Terreno liquido FERM II

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,4 g/L

MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,3 g/L

FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L

ZnCl<sub>2</sub> 0,1 g/L

CuSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L

MgCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O 0,003 g/L

CaCl<sub>2</sub> 0,01 g/L

NaCl 0,03 g/L

Dopo sterilizzazione in autoclave (1 atm, 121°C, 30 minuti) si aggiungono:

Destrina 20 g/L

Tryptone 10 g/L

## 5.3 Condizioni di Crescita

### 5.3.1 In terreno liquido R2YED

I ceppi M145, 165 e 166 di *Streptomyces coelicolor* sono stati incubati separatamente per 48 ore in 25 ml di terreno liquido R2YED, ad una concentrazione di  $5 \cdot 10^7$  ufc/ml, all'interno di beute con scalanatura da 250 ml, alla temperatura di 30°C in agitazione a 200 rpm.

Successivamente da ogni coltura sono stati prelevati 1,25 ml di sospensione che è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm. I pellets ottenuti, dopo opportuni lavaggi in acqua sterile, sono stati inoculati nuovamente in 25 ml di terreno liquido R2YED fresco all'interno di beute con scalanatura da 250 ml a 30°C e 200 rpm. Le biomasse sono state raccolte a 24 e 32 ore prelevando 5 ml di sospensione che è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm. Le biomasse ottenute sono state conservate a -80°C.

### 5.3.2 Su terreno solido R2YED

Una concentrazione pari a  $5 \cdot 10^7$  ufc/ml dei ceppi M145, 165 e 166 di *Streptomyces coelicolor* è stata seminata su piastre di terreno solido R2YED. I batteri sono stati incubati a 30°C per 3 e 5 giorni.

### 5.3.3 In terreno liquido FERM II

I ceppi M145, 165 e 166 di *Streptomyces coelicolor* sono stati incubati separatamente per 48 h in 25 ml di terreno liquido R2YED, ad una concentrazione di  $5 \cdot 10^7$  ufc/ml, all'interno di beute con scalanatura da 250 ml, alla temperatura di 30°C in agitazione a 200 rpm. Successivamente da ogni coltura sono stati prelevati 1,25 ml di sospensione che è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm. I pellets ottenuti, dopo opportuni lavaggi in acqua sterile, sono stati riinoculati in 25 ml di terreno liquido FERM II fresco all'interno di beute con scalanatura da 250 ml a 30°C e 200 rpm. Le biomasse sono state raccolte dopo 5 giorni di crescita prelevando 5 ml di sospensione che è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm. Le biomasse ottenute sono state utilizzate immediatamente per effettuare i saggi zimografici.

## 5.4 Primer utilizzati

*hrdb* (sco5820)

For 5' -GGTCGAGGTCATCAACAAGC- 3'

Rev 5' -CTCGATGAGGTCACCGAACT- 3'

product size: 177 bp

*redD* (sco5877)

For 5' -ACCCAGCCTGTACAACCTTCG- 3'

Rev 5' -CACAGTTCGTCCACCAGGTC- 3'

product size: 177 bp

*redZ* (sco5881)

For 5' -AAACGTCGGTTCGAAGAACTG- 3'

Rev 5' -TTGCCCTGGGTCAGTAAGAG- 3'

product size: 181 bp

*redH* (sco5896)

For 5' -TCTTCCACCTGTTCCAGACC- 3'

Rev 5' -GTAGTAGCGGGCGAAGCTC- 3'

product size: 154 bp

*gylC* (sco1659)

For 5' -CCAGCTCCGACATCTTCATC-3'

Rev 5' -GAGAGCGGACCCGATATGTA-3'

product size: 181 bp

*gylA* (sco1660)

For 5' -ACACCTGGGTCATCTGGAAC-3'

Rev 5' - GTGATCTCGCCGTACACCTC -3'

product size: 196 bp

*gylB* (sco1661)

For 5' - CGGGACCTCATCACGTACTC-3'

Rev 5' - GCCTCCAGCTTCTTCATCAC-3'

product size: 182 bp

## 5.5 Preparazioni generali

### 5.5.1 Preparazione di una sospensione di spore del ceppo M145 di *Streptomyces coelicolor*

Il recupero di spore di *S. coelicolor* dalle piastre Petri è stato eseguito come descritto da Kieser *et al.*, 2000, ma con alcune modifiche. La superficie della piastra è stata raschiata con una spatola usando 3-6 ml di acqua. La sospensione di spore è stata recuperata e quindi filtrata mediante una siringa di plastica contenente una lana di cotone. La sospensione è stata

centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm/min, il supernatante è stato versato e le spore sono state risospese in una soluzione acquosa di glicerolo al 20% v/v.

### **5.5.2 Preparazione di una sospensione di micelio dei ceppi 166 e 165 di *Streptomyces coelicolor***

Per ottenere una sospensione di micelio dei ceppi 166 e 165 di *S.coelicolor*, il batterio è stato fatto crescere su terreno agarizzato R2YE Medium per 7/8 giorni. Successivamente, la superficie della piastra è stata raschiata con una spatola per raccogliere il micelio. Quest'ultimo è stato inserito in un omogeneizzatore Potter per l'omogeneizzazione del micelio. Raccolto il micelio omogeneizzato è stato aggiunto un egual volume di glicerolo 40% sterile ottenendo una soluzione acquosa di glicerolo al 20% contenente il micelio.

## **5.6 Preparazione dei campioni per l'osservazione mediante Microscopio a Scansione Elettronica (SEM)**

Dopo la crescita su terreno agarizzato R2YE (vedi par. condizioni di crescita su terreno solido R2YED), il micelio di ogni ceppo è stato trattato per essere osservato al microscopio elettronico a scansione (SEM). In particolare, fettine di terreno (1x1 cm<sup>2</sup>) contenente il micelio sono state trattate per tre minuti, con 1 mL di phosphate-saline Buffer (PBS, Sigma Aldrich) e successivamente immerse nella soluzione di fissaggio (PBS, 2% glutaraldeide e 4% paraformaldeide) per 10 minuti. Successivamente il reagente è stato rimosso ed i campioni sono stati trattati con etanolo 15% per 3 min. Prima dell'analisi SEM, le matrici contenenti i batteri fissati sono state fatte asciugare a 30 °C.

I campioni sono stati infine fissati su uno supporto in alluminio utilizzando un nastro ad anidride carbonica e sottoposti alla doratura (Sputter-ing Scancoat Six, Edwards) al fine di evitare il l'accumulo di cariche elettrostatiche che disturberebbero la rivelazione del fascio di elettroni secondari, generati a seguito dell'impatto del fascio elettronico primario, proveniente dalla sorgente, con il campione.

## **5.7 Analisi zimografiche**

### **5.7.1 Estrazione delle proteine dallo spent medium per analisi zimografiche**

Dopo 5 giorni di incubazione, è stato prelevato il mezzo di coltura ed è stato centrifugato a 4000 r.p.m. per 20 minuti. Lo spent medium è stato poi prelevato, assicurandosi di non risospendere il pellet, e in seguito diviso in aliquote da 1 ml.

### **5.7.2 Determinazione della concentrazione delle proteine presenti nello spent medium mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976)**

La quantizzazione delle proteine presenti nello spent medium è stata condotta mediante l'utilizzo delle istruzioni e dei reagenti presenti nel kit Protein Determination Reagent (USB Corporation). I valori delle concentrazioni dei campioni proteici si ottengono sulla base di una curva di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni nel range 5 - 120 µg di siero di albumina bovina (BSA).

### **5.7.3 SDS-PAGE nativa**

L' SDS PAGE nativa (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrilamide Gel Electrophoresis) è una tecnica che permette di separare le proteine in condizioni non denaturanti (Nowakowski AB. *et al.*, 2014). A differenza dunque dell' SDS PAGE, la mobilità delle proteine non è determinata solo dal peso molecolare ma anche dalla conformazione nativa.

L' SDS è un detergente anionico che rilassa i legami non covalenti, conferendogli una carica negativa netta. La separazione delle proteine, legate all' SDS, avviene in base al valore di massa molecolare, proprio perché il rapporto massa/carica per ogni proteina legata all' SDS, rimane costante. Questa separazione avviene su gel di poliacrilamide che emula una maglia in cui intrappolare le proteine.

Per separare le proteine è stato preparato un gel di poliacrilamide al 12%, il quale è suddiviso in due componenti (Tab. 9):

- lo stacking gel (pH 6.8) è la parte superiore del gel che permette di convogliare i campioni negli appositi pozzetti in modo da farli migrare contemporaneamente;

- il resolving gel (pH 8.8) è la porzione inferiore, in cui avverrà la vera e propria separazione delle proteine in base al loro peso.

	Resolving gel (ml)	Stacking gel
Acrilamide	2,0	0,5
Tris 1,5 M pH 8.8	1,3	-
Tris 0,5 M pH 6.8	-	0,38
SDS 10%	0,05	0,03
H <sub>2</sub> O	1,6	2,1
APS 10%	0,05	0,03
TEMED	0,002	0,03

**Tabella 9. Componenti utilizzati nella corsa elettroforetica su gel nativo al 12% di acrilammide**

La corsa elettroforetica è stata effettuata sottoponendo i campioni, insieme al loading buffer (Tris 50 mM pH 6.8, 0.1% blu di bromofenolo, 10% glicerolo, 10% SDS), in rapporto di 1:1 con il campione (10 µl di loading buffer, 10 µl di campione), che favorisce la loro corsa ad una corrente continua di circa 160V, in presenza di un tampone trizma base (glicina 0.38 M e tris HCl 0.05 M).

Per avere una stima del peso molecolare, le bande ottenute dalla migrazione del campione sono state comparate ad un marker, il SeeBlue Pre-Stained.

Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato immerso in acqua distillata per 1 minuto e riscaldato per 30 secondi; questa operazione è stata ripetuta per tre volte.

Al fine di visualizzare le bande proteiche ottenute, il gel è stato colorato con il SimplyBlue™ SafeStain della ThermoFisher.

#### **5.7.4 Analisi zimografica per la rivelazione di attività proteiche secrete**

La zimografia è una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilammide, addizionato con un substrato specifico, che permette di evidenziare enzimi con attività idrolitica in base all'idrolisi del substrato incorporato (Heussen *et al.*, 1980).

Tale tecnica è semi-quantitativa, in quanto permette la visualizzazione del numero e del peso molecolare approssimativo delle proteasi in un campione, comparate ad un marker che contiene un insieme di proteine a peso molecolare noto.

Per rivelare la presenza di proteasi (Von den Hoff *et al.*, 2005) è stata addizionata, come substrato di digestione, la gelatina all' 1% (Ghorbel *et al.*, 2014) al resolving gel sottraendo il volume corrispondente dell' acqua.

Una volta terminata la corsa, il gel è stato immerso in un buffer di lavaggio (2,5% Triton X-100 e 0,02% di  $\text{NaN}_3$ ) per 10 minuti a temperatura ambiente, in modo da rimuovere l' SDS e successivamente è stato immerso in un buffer di attivazione a 50 °C per 1 h (1,5% di Triton X-100, 0,02  $\text{NaN}_3$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM Tris a pH 7.5) per far agire in modo ottimale gli enzimi, riattivandoli.

Al fine di visualizzare la presenza di proteasi, il gel è stato colorato con il Blue di Comassie R-250, un colorante blu a base di trifenilmetano: le proteasi, che hanno agito sul substrato degradandolo, sono visibili come bande bianche, mentre il resto del gel rimane colorato di blu.

### **5.7.5 Saggio degli inibitori delle proteasi**

Per identificare le sottoclassi di proteasi, o escluderne alcune, si può applicare allo zimogramma, un saggio degli inibitori delle proteasi.

Tale saggio è stato svolto come una zimografia in cui sono stati caricati nei pozzetti oltre al campione e al loading buffer anche i singoli inibitori delle proteasi, uno per ciascun campione (Maniatis *et al.*, 1989); essi sono stati aggiunti un' ora prima della corsa elettroforetica.

Gli effetti degli inibitori sono poi comparati al campione senza inibitori, che risulterà essere il controllo negativo del saggio.

Tra i diversi inibitori disponibili, sono stati saggiati gli effetti di:

- PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride è un inibitore delle serino proteasi, in quanto lega covalentemente e specificamente il sito attivo dell' enzima che contiene un residuo di serina inibendolo. Di conseguenza tale enzima non potrà andare più a



legare il substrato e degradarlo e dunque allo zimogramma non sarà presente la banda bianca. Il PMSF è stato aggiunto alla concentrazione di 0,1 mM.

- **Pepstatina:** è un esapeptide (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta), che contiene l'amminoacido statina ((3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid) originariamente isolato proprio dagli Actinomiceti (Marciniszyn J Jr, 1976). Esso è un valido inibitore delle proteasi contenenti l'acido aspartico, come le pepsine e le catepsine. Agisce come antagonista competitivo, ovvero come analogo del substrato, legando il sito attivo dell'enzima ed è capace di inibirlo già a concentrazioni picomolari, in quanto la costante di dissociazione pepstatina-enzima è molto bassa.

La pepstatina è stata aggiunta al campione alla concentrazione di 0,001 mM

- **Aprotinina:** è composta da una singola catena polipeptidica con tre legami disulfidrici (PM 65111). Come la pepstatina, l'aprotinina è un competitore del substrato, si lega nel sito attivo degli enzimi in cui è presente una serina, bloccandolo. Esso forma il complesso stabile, aprotinina-enzima, che può essere dissociato a pH >10 o a pH <3.2.

L'aprotinina è stata aggiunta alla concentrazione di 0,002 mM.

- **Leupeptina:** la *N*-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-arginina, è un inibitore delle peptidasi contenenti serina, cisteina o treonina. Anche questa molecola, proprio come la pepstatina, è stata scoperta negli actinomiceti, ed è un competitore del substrato facilmente reversibile: un eccesso di substrato provoca il distacco della leupeptina e il legame col substrato specifico. La concentrazione effettiva da aggiungere al campione è di 0,001 mM

- **EDTA:** è un acido aminopolicarbossilico (EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid). Esso agisce come agente chelante, sequestrando gli ioni metallici, come Ca<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. Il target di questo inibitore pertanto, sono le metalloproteasi, in quanto chela gli ioni necessari all'attività catalitica di essi. La concentrazione di EDTA da aggiungere alla soluzione è di 0,002 mM ed inoltre è stato aggiunto un volume di EDTA a copertura del gel, dopo la fine della corsa elettroforetica in sostituzione al buffer di attivazione, in modo da sequestrare tutti gli ioni reintrodotti con il buffer di lavaggio.

## **5.8 Preparazione dei campioni per le analisi di proteomica differenziale**

### **5.8.1 Estrazione delle proteine totali**

Le proteine totali sono state estratte dalla biomassa dei campioni delle colture utilizzando il protocollo di estrazione di Puglia *et al.*, 1995. Per rimuovere le tracce di terreno di crescita, le biomasse sono state risospese in 1 ml di washing solution (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 4 mg/ml leucopeptina, 0.7 mg/ml pepstatina, 5 mg/ml benzamidina) e centrifugate a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C. Dopo decantazione i pellets sono stati risospesi in 1 ml di washing solution contenente 0.3% SDS e sonicati in ghiaccio tre volte per 15 secondi (*Vibra Cell, output control 4*), ponendo una pausa di 10 secondi tra un impulso e l'altro. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti, e raffreddati in ghiaccio per 10 minuti. Per eliminare DNA e RNA è stata aggiunta una mix di DNase (100 µg/ml) e RNasi (50 µg/ml) al lisato cellulare ed incubato in ghiaccio per 15 minuti. I detriti cellulari e le cellule non rotte sono state separate mediante centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4 °C. Dopo la dialisi in acqua distillata a 4 °C, le proteine sono state sottoposte a precipitazione in acetone (3:1 v/v) o.n. a -20 °C per rimuovere metaboliti e pigmenti batterici solubilizzati.

### **5.8.2 Preparazione dei campioni proteici per analisi di proteomica differenziale**

Dopo la precipitazione con acetone i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C e i pellets ottenuti sono stati asciugati in speed vacuum per 20 minuti. Per ottimizzare l'efficienza di marcatura delle proteine con i fluorofori Cy2, Cy3 e Cy5, le proteine sono state risospese in DIGE buffer pH 8,4 (1/10 del volume iniziale). Il pH è stato controllato e quando richiesto aggiustato utilizzando DIGE buffer. Valori di pH inferiori a 8,4 determinano infatti una riduzione dell'efficienza di marcatura, mentre valori di pH superiori rendono la reazione di marcatura poco specifica.

### **DIGE BUFFER pH 8,4 (10ml)**

Urea            5,4 g

Chaps           0,4 g

H<sub>2</sub>O mq        6 ml

Sciogliere a 37 °C e aggiungere:

Tris            0,0424 g

DTE            0,1 g

### **5.8.3 Determinazione della concentrazione delle proteine totali mediante Saggio di Bradford (Bradford 1976)**

La concentrazione delle proteine solubilizzate in DIGE buffer pH 8,4 è stata determinata utilizzando le istruzioni e i reagenti del *kit, Protein Assay* (BioRad) come descritto in precedenza nel par. 5.6.2.

### **5.8.4 Elettroforesi di proteine: SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).**

La qualità delle proteine estratte è stata valutata mediante una elettroforesi SDS-PAGE al 12 %. 10 µl di ogni campione addizionato con 5 µl di 3X sample buffer (0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 10% glicerolo, Beta-mercaptoetanololo, 1 mg/ml bromofenolo blu) sono stati denaturati per 5 minuti a 100°C, posti in ghiaccio per 10 minuti e caricati su gel avente la composizione riportata nella Tabella 10.

Reagenti	Resolving gel (10 ml)	Stackink gel (4 ml)
H <sub>2</sub> O	3.3 ml	2.7 ml
30% acrylamide mix	4.0 ml	0.67 ml
1.5 M Tris pH8.8	2.5 ml	-----
1 M Tris pH 6.8	-----	0.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.04 ml
10% APS	0.1 ml	0.04 ml
TEMED	0.004ml	0.004 ml

**Tabella 10. SDS-PAGE 12%**

La stima dei pesi molecolari è stata valutata facendo correre parallelamente 3  $\mu$ l di marker *SeeBlue Pre-Stained*. L'elettroforesi è stata condotta applicando un voltaggio di 120V e un amperaggio di 25mA in un tampone di scorrimento Running buffer 1X (0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris). I gel alla fine della corsa sono stati colorati con *SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen ®)* utilizzando il protocollo *SimplyBlue™ SafeStain Microwave Protocol* fornito dalla casa produttrice del kit.

### **5.8.5 Marcature delle proteine con le cianine Cy2, Cy3 e Cy5 con l'approccio *minimal labeling***

Per la marcatura dei campioni sono state utilizzate le cianine CyDye Cy2, Cy3 e Cy5 che possiedono un gruppo reattivo NHS (N-idrossisuccinimide) disegnato per potersi legare covalentemente al gruppo amminico  $\epsilon$  dei residui di lisina mediante legame ammidico. Per garantire la comparabilità di pI e Mw tra le proteine marcate e quelle non marcate che migreranno nella stessa posizione nel gel 2D, la reazione di marcatura è stata realizzata con l'approccio *minimal labeling* che permette di marcare solo 1-2% dei residui di lisina e solo una piccola parte delle proteine del campione.

Ciascuno stock in polvere di molecole fluorescenti CyDye (Cy2, Cy3 o Cy5) è stato quindi ricostituito in un volume di dimetilformamide (DMF) per ottenere una concentrazione finale di 1 nmol/ $\mu$ l (*Stock solution*). Un volume di *stock solution* è stato quindi diluito in 1,5 volumi di DMF per ottenere una soluzione di lavoro (*Working solution*) di 400 pmoli/ $\mu$ l. 50  $\mu$ g di proteine estratte da due replicati biologici (I e II) sono state marcate con 400 pmoli di Cy3 o Cy5 secondo il seguente schema di marcatura Tabella 11:

NUMERO GEL	Cy3	Cy5	Cy2
1	M145 I	165 I	MIX
2	166 I	M145 I	MIX
3	165 I	166 I	MIX
4	M145 II	165 II	MIX
5	166 II	M145 II	MIX
6	165 II	166 II	MIX

**Tabella 11. Schema di marcatura delle proteine.**

La reazione di marcatura è stata condotta per 60 minuti al buio in ghiaccio ed è stata bloccata con 1  $\mu$ l di lisina 10 mM per 10 minuti al buio in ghiaccio. In seguito alla marcatura i campioni sono stati uniti nel rapporto di 1:1:1 ad uno standard interno di 50  $\mu$ g di proteine marcate con Cy2, ottenuto dall'unione di aliquote uguali di tutti i campioni da analizzare. Le proteine marcate possono essere usate subito per l'elettroforesi bidimensionale o conservate a -80°C

## 5.9 Elettroforesi bidimensionale (2D-DIGE)

### 5.9.1 Isoelettrofocalizzazione (IEF): I dimensione

La metodica IEF consente di separare le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI). Per l'IEF, la soluzione di reidratazione DeStreak (GE Healthcare) contenente un gradiente (IPG) 0,5% v/v di buffer (GE Healthcare) a pH immobilizzato e 20 mM DTT (Sigma Aldrich) è stato aggiunto a ciascuna miscela fino ad un volume finale di 340  $\mu$ l. L'IEF è stata eseguita, come descritto in precedenza (Gallo *et al.*, 2010), utilizzando IPG-strips da 18 cm con un range di pH 3 - 10 non lineare (GE Healthcare) mediante un apparecchio Ettan IPGphor III (GE Healthcare) a specifici parametri di voltaggio (Tab. 12).

FASE	VOLTAGGIO (V)	TEMPO (h)	TIPO DI VOLTAGGIO
reidratazione	_____	1:00	_____
I	30	10:00	step
II	200	1:00	step
III	300	00:30	step
IV	3500	3:00	gradiente
V	3500	1:00	step
VI	8000	00:30	gradiente
VII	8000	8:00	step

**Tabella 12. Protocollo di corsa per l'isoelettrofocalizzazione con IPG strip NL pH 3-10**

## 5.9.2 Equilibratura delle strip

Dopo l'IEF, per garantire durante la seconda dimensione la separazione delle proteine in base al proprio peso molecolare, le strip IPG sono state incubate con un buffer di equilibratura contenente ditioeritolo (DTE 2% w/v ) (agente riducente che rompe i legami disolfuro) (Sol. A) per 10 minuti. Successivamente i gruppi tiolici sono stati quindi bloccati da un'ulteriore incubazione con buffer di equilibratura contenente 2,5% w/v di iodoacetamide (Sol. B) per altri 10 minuti.

### **Buffer di equilibratura (100 ml):**

Tris-HCl pH 6,8	5 ml
urea 6M	36 g
H <sub>2</sub> O MilliQ	25 ml
SDS	2 g

Sciogliere a 35°C e poi aggiungere:

Glicerolo 86%	34,5 ml
---------------	---------

### **Soluzione A per 6 strip (30 ml):**

30 ml di soluzione di equilibratura + 0,3 g DTE

### **Soluzione B per 6 strip (30 ml):**

30 ml di soluzione di equilibratura + 0,375 g iodoacetamide + 120 µl di 0,5% bromofenolo blu.

## 5.9.3 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE): II dimensione

I gel (24 cm di larghezza x 22 cm di altezza x 1 mm di spessore) al 12,5% (188 ml 30% acrilamide stock, 113 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 4,5 ml 10% SDS, 4,5 ml 10% APS, 0,62 ml 10% TEMED, 140 ml H<sub>2</sub>O milliQ) sono stati preparati usando il six gel caster (GE Healthcare Life Sciences®). Le IPG strip sono state immobilizzate verticalmente sui gel con un gel di agarosio allo 0,5% in running buffer 1X (0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris) più bromofenolo blu. L'elettroforesi è stata condotta utilizzando l'apparecchio ETTAN DALTsix Electrophoresis Unit (GE Healthcare Life Sciences®) applicando un voltaggio di 110 V e 40 mA/gel alla temperatura di 10°C per circa 17 ore in presenza dei tamponi di

scorrimento buffer anodico 1X (0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris) e buffer catodico 2X (0,2 % SDS, 384 mM glicina, 50 mM Tris).

## **5.10 Acquisizione delle immagini mediante DIGE IMAGER (*GE Healthcare Life Sciences*®)**

Le immagini dei gel sono state acquisite grazie allo scanner *Ettan™ DIGE Imager* (*GE Healthcare Life Sciences*®) utilizzando i seguenti parametri: pixel di 100 µm e tempi di esposizione di 1.25, 0.3 e 0.6 secondi/pixel rispettivamente per i fluorofori Cy2, Cy3 e Cy5. La gamma di intensità di fluorescenza è tra 0 e 65000. In seguito all'acquisizione, il software crea un'immagine che mostra pixel per pixel l'emissione del fluoroforo che è direttamente proporzionale alla concentrazione di una data proteina visualizzata come una macchia tondeggiante (spot).

## **5.11 Analisi degli elettroferogrammi bidimensionali DIGE**

Al termine di una analisi 2D-PAGE si ottiene un elettroferogramma di proteine separate secondo due criteri indipendenti: punto isoelettrico (pI) e peso molecolare (Mw). Pertanto, la posizione di ogni spot proteica ha come coordinate i valori di pI (asse x) e Mw (asse y). Questi due valori, oltre che dalla struttura primaria delle proteine, sono determinati anche dalle modifiche post-traduzionali quali: fosforilazione, glicosilazione, acetilazione, adenilazione e tagli proteolitici. Le immagini, tramite il programma *ImagerMaster 2D platinum 7.0* sono state sottoposte sia ad un'analisi qualitativa dei profili globali di espressione, ossia presenza/assenza delle spot, sia ad un'analisi quantitativa, cioè il livello di abbondanza delle spot di una mappa bidimensionale.

I gel 2D in seguito all'acquisizione vengono convertiti in formato “*mel*” e sottoposti alla detection o riconoscimento delle spot e successiva eliminazione degli artefatti. Nell'analisi 2D-DIGE questa operazione è completamente automatica e viene effettuata sull'immagine relativa al campione standard marcato con Cy2 e successivamente estrapolata ai campioni marcati con Cy3 e Cy5.

Successivamente, gli spot uguali in ogni gel che rappresentano la stessa proteina vengono designati come “*landmark*” o ancore, ossia punti di riferimento in numero non inferiori a 50 e distribuite uniformemente su tutta la superficie dei 2D-Gel, utili per

effettuare in seguito una sovrapposizione automatica della totalità delle spot nei diversi 2D-Gel. L'analisi differenziale viene realizzata confrontando gli elettroferogrammi relativi ad uno stesso campione con quelli relativi ad un altro campione al fine di valutare in esso la presenza/assenza di spot. Per realizzare tale confronto, il programma applica particolari algoritmi che consentono di appaiare la posizione delle spot presenti sui 2D-Gel diversi. Infatti, gli spot che occupano la stessa posizione relativa nei 2D-Gel analizzati formano un gruppo. Tutti i 2D-Gel rappresentanti uno stesso campione proteico formano una classe.

All'interno della classe, il valore del livello di abbondanza di una spot è il valore medio calcolato in base ai valori che compongono il gruppo. In tal modo, l'analisi differenziale si basa sul confronto dei valori medi delle spot di ciascuna classe. La formazione dei gruppi, quindi, è un passaggio critico dell'analisi che può essere condotta in maniera automatizzata; tuttavia ciò può generare delle imprecisioni a causa delle inevitabili differenze tra le varie corse elettroforetiche. L'analisi quantitativa viene realizzata ricavando il volume di ogni spot, calcolato come funzione integrale della densità ottica (O.D.) sull'area. In questo modo si può analizzare il differente grado di abbondanza tra spot che riflette il livello d'espressione proteica in un campione. Per normalizzare i valori vengono usati i volumi relativi, ossia il volume di una singola spot dato come valore percentuale sul totale dei volumi di ogni spot. Nell'analisi DIGE tale volume è poi ulteriormente normalizzato per il valore delle spot marcate con Cy2. Infine, sono state considerate differenzialmente abbondanti le spot che mostrano una variazione in volume di 1,3 volte e con una probabilità di ipotesi nulla ( $p$ ) minore di 0.06 ( $p < 0.06$ ) calcolata usando l'ANOVA test.

## **5.12 Colorazione dei gel con nitrato di argento**

Per visualizzare gli spot proteici presenti nei gel è stata eseguita una colorazione argentica (Shevchenko A. *et al.*, 1996). I gel sono stati lavati per 5 minuti in H<sub>2</sub>O milliQ e fissati con destaining solution (40 metanolo : 10 acido acetico : 50 H<sub>2</sub>O) per 30 minuti in agitatore orbitale a temperatura ambiente. Successivamente sono stati effettuati 3 lavaggi di 45 minuti con H<sub>2</sub>O milliQ. I gel sono stati quindi incubati con 0.08% sodio tiosolfato per 5 minuti e lavati due volte per 1 minuto con H<sub>2</sub>O milliQ. I gel sono stati incubati con una



soluzione 0.4% nitrato di argento per 60 minuti a 4°C, lavati due volte per 1 minuto con H<sub>2</sub>O milliQ e sviluppati con una soluzione di 2% carbonato di sodio, 0.04% formaldeide. La reazione di sviluppo è stata bloccata con una soluzione di 1% acido acetico. È possibile conservare i gel a 4°C in una soluzione all'1% di acido acetico.

### **5.13 Identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa MALDI-TOF**

Le spot con le stesse coordinate spaziali sono state asportate tramite *spot-picking* manuale dai gel 2D-DIGE e sono state poste in una soluzione di acido acetico 1% in eppendorf da 0.5 ml. I campioni, dopo essere stati sottoposti a tre lavaggi con una soluzione di acido acetico 1%, sono stati spediti presso il laboratorio di *Spettrometria di massa e proteomica* del Dottore Andrea Scaloni, che ha sede a Napoli, per la caratterizzazione mediante MS-MALDI-TOF.

L'analisi MS-MALDI-TOF (Aebersold *et al.*, 2002) si basa sulla comparazione delle dimensioni dei frammenti peptidici ottenuti mediante digestione enzimatica (generalmente con tripsina) di un campione proteico da identificare, con quelli ottenuti per digestione *in silico* di prodotti genici presenti in una banca dati.

### **5.14 Analisi bioinformatiche**

Le informazioni ottenute dall'analisi di spettrometria di massa sono state utilizzate per studi bioinformatici volti all'identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti e alla conoscenza del ruolo biologico. Le proteine sono state assegnate confrontando parallelamente la pagine web contenente le annotazioni del genoma di *Streptomyces coelicolor* ([ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/S\\_coelicolor/classwise.txt](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/S_coelicolor/classwise.txt)) come riportate nel gennaio 2014 e la banca dati UniProt (Universal Protein) contenente le sequenze proteiche di tutti gli organismi viventi. In seguito le proteine identificate sono state divise in classi funzionali in relazione al ruolo biologico attribuito tramite analisi fatte all'interno della banca dati KEGG PATHWAY (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) contenente informazioni sui pathway metabolici cellulari di diversi organismi viventi.

## **5.15 Preparazione dei campioni per le analisi di qRT-PCR.**

### **5.15.1 Estrazione dell'RNA.**

Per estrarre l'RNA dalla biomassa dei ceppi analizzati, cresciuti in terreno liquido R2YED secondo le indicazioni descritte nel par. 5.3.1, è stato utilizzato il Kit Illustra RNAspin Midi RNA Isolation della GE Healthcare. Sono stati prelevati 5 ml di ogni coltura dopo 24 e 32 ore di crescita. Dopo aver effettuato 2 lavaggi con 5 ml di H<sub>2</sub>O RNasi-free per eliminare eventuali residui di terreno, la biomassa è stata sospesa in 1 ml di H<sub>2</sub>O RNasi-free, e centrifugata a 4000 rpm per 10 min. Successivamente il pellet ottenuto è stato trattato secondo le istruzioni indicate nel kit modificando la concentrazione di lisozima da 2 a 50 mg/ml. La presenza dell'RNA è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%.

### **5.15.2 Trattamento con DNAsi**

L'RNA estratto da ogni campione è stato trattato con DNAsi I recombinant RNase free (Roche) per 1 h a 37°C, per eliminare qualsiasi residuo di DNA presente in soluzione. Successivamente la DNAsi è stata rimossa mediante trattamento con fenolo-cloroformio (1/1 V) e l'RNA è stato precipitato grazie all'aggiunta di 2 volumi di etanolo e 0,1 volume di sodio acetato 3 M a pH 5.2, o.n. a -80°C. Successivamente è stato eseguito un lavaggio con etanolo 70% e dopo aver essiccato il pellet di RNA, è stato risospeso in acqua contenente l'inibitore di RNAsi RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), per prevenire la degradazione dell'RNA.

### **5.15.3 Controllo della presenza di DNA residuo**

Per verificare l'assenza di DNA nei campioni a seguito di trattamento con DNAsi è stata eseguita una PCR di controllo, utilizzando i primer per il gene *hrdB*, codificante per un fattore sigma costruttivamente espresso.

La mix di reazione utilizzata consiste in 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, forward e reverse primer (0.5 µM ognuno), i quattro dNTPs (0.2 mM ognuno), 1U di Taq DNA Polymerase Recombinant, e 10 µl di campione.

La reazione di PCR è stata condotta secondo le condizioni descritte nella tabella 13.

Denaturazione Iniziale	94 °C	5 min	40 cicli
Denaturazione	94 °C	30 sec	
Annealing	60	30 sec	
Allungamento	72°C	45 sec	
Allungamento Finale	72°C	15 min	

**Tabella 13. Profilo termico della PCR.**

#### **5.15.4 RT PCR per controllo presenza e qualità RNA.**

Per controllare la presenza e la qualità dell'RNA è stato utilizzato il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase. Questo particolare kit presenta, al suo interno, sia una retrotrascrittasi, che lavora efficientemente a 50°, il cui compito è retrotrascrivere l'RNA in cDNA, sia la TAQ polimerasi, la quale è legata al platino, che la inattiva. Quindi, inizialmente la retrotrascrittasi svolge una retrotrascrizione per creare i cDNA relativi all' eventuale RNA presente, e successivamente, a 95° C, si inattiva. Contemporaneamente, a 95° si attiva la TAQ polimerasi, in quanto a questa temperatura avviene il distacco dal platino. È stata utilizzata una coppia di primer per il gene *hrdb* (descritti in precedenza).

La mix di reazione utilizzata consiste in 1X Reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, forward e reverse primer (0.2 µM ognuno), di 1U di Platinum® Taq DNA Polymerase e 0.010 pg - 1µg di RNA.

La reazione di PCR è stata condotta secondo le condizioni descritte nella tabella 14

Sintesi cDNA	50 °C	30 min	
Inattivazione	95 °C	10 min	
Denaturazione	95 °C	1 min	40 cicli
Annealing	60°C	1 min	
Allungamento	72°C	45 sec	
Allungamento Finale	72°C	15 min	

**Tabella 14. Profilo termico della PCR.**

### 5.15.5 Conversione dell'RNA in cDNA

Prima di costruire il cDNA è stato quantificato l'RNA estratto mediante l'utilizzo del Nanodrop della ByoRad®, uno strumento che consente di quantizzare i nanogrammi di una molecola (che sia di natura proteica o nucleotidica) presenti in ogni µl di soluzione.

Per la conversione dell'RNA in cDNA è stato utilizzato il kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” di Applied Biosystem seguendo le istruzioni indicate.

### 5.16 Real-time PCR quantitativa - relativa.

Per analizzare i livelli di espressione dei geni di interesse, è stata eseguita una Real-Time PCR quantitativa relativa, utilizzando come controllo interno il gene endogeno *hrdB*. I geni analizzati sono stati: *gylC*, *gylA* e *gylB*, appartenenti all'operone *gylCABX*, e *redD*, *redZ* e *redH*, appartenenti al cluster *RED*. Per la Real-time PCR è stata utilizzata una piastra MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher), in cui sono stati inseriti i cDNA dei tre ceppi in triplicato alle due tempistiche (24h e 32h). L'analisi è stata effettuata tramite il programma Real Time PCR system 7300 AbiPrism di Applied Biosystems®, utilizzando come mix di reazione il Power SYBR™ Green PCR Master Mix. Per la PCR sono state utilizzate le seguenti condizioni: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C seguiti da 40 cicli di 15 sec a 95°C e 1 min a 60°C. Successivamente la curva di Melting è stata effettuata da 60 to 95 °C per validare la specificità della reazione di PCR.

## **5.17 Preparazione dei campioni per analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF**

I ceppi M145, 165 e 166 sono stati coltivati in liquido secondo le indicazioni del par. 5.3.1. Dopo 24 e 32 ore di crescita, sono stati prelevati 10 mL da ogni coltura per eseguire analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF, e sono stati conservati alla temperatura di -80°C. Successivamente, i campioni sono stati liofilizzati, aggiunti di 25 ml di metanolo e posti in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Da ciascun tubo è poi stato prelevato 1 mL di estratto metabolico e conservato a -20°C. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

## **5.18 Analisi HPLC/MS/ESI/Q-TOF**

Gli estratti metanolici, provenienti sia dalle colture cresciute su terreno solido che su terreno liquido dei 3 ceppi analizzati, sono stati diluiti 1:10 in metanolo 100%. Tutti i campioni sono stati analizzati tramite HPLC/ESI/Q-TOF in modalità positiva. La separazione via HPLC è stata effettuata tramite colonna a fase inversa C18, utilizzando un gradiente H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN con la presenza di acido formico quale additivo per facilitare la protonazione degli analiti. La quantizzazione di undecilprodigiosina è stata calcolata in base alle aree dei picchi corrispondenti ottenuti mediante spettrometria di massa.

## **5.19 Analisi GS/MS**

I ceppi M145, 165 e 166 sono stati coltivati in liquido e trattati come descritto nel par. 5.17 e successivamente sono stati utilizzati per analisi GS/MS eseguite presso il Laboratorio della sezione di chimica organica del Dip. STEBICEF del Prof. Palumbo Piccionello.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Aebersold R. and Cravatt BF. Proteomic-advances, applications and the challenges that remain. *Trends Biotechnol.* 2002, 20:S1-2
- Aínsa JA, Parry HD, Chater KF. A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology.* 1999, 34:607–619.
- Bao, K. & Cohen, S. N. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* 2001, 15:1518–1527.
- Bennett J.W., Bentley R. Seeing red: the story of prodigiosins. *Adv Appl Microbiol.* 2000, 47:1–32
- Bentley S. D. , Chater K. F., Cerdeno-Tárraga 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., Rabbinowitsch 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. and Hopwood D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 2002, 417:141-147.
- Bentley S. D., Brown, S., Murphy, L.D., Harris D.E., Quail M.A. et al. SCP1, a 356023 bp linear plasmid adapter to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 2004; 51: 1615-1628.
- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo).* 2005, Jan;58(1):1-26.
- Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo).* 2012, Aug;65(8):385-95.
- Bibb, M.J., Molle, V., and Buttner, M.J.  $\sigma$ BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 2000, 182:4606-4616.
- Bignell, D.R., Warawa, J.L., Strap, J.L., Chater, K.F., and Leskiw, B.K. Study of the bldG locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology* 2000, 146:2161-2173.
- Bosso JA, Mauldin PD, Salgado CD. The association between antibiotic use and resistance: the role of secondary antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010, 29:1125–9.
- Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015 13:620–630
- Bystrykh LV1, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L. Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 1996 Apr; 178(8):2238-44.
- Cal S, Connolly BA, Nicieza RG, Sánchez J. Interaction of the periplasmic dG-selective *Streptomyces antibioticus* nuclease with oligonucleotide substrates. *Biochemistry.* 1996, 35:10828–10836.
- Castro A.J. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature* 1967 213: 903–904.
- Cerdeno A.M., Bibb M.J., Challis G.L. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem Biol* 2001 8:817–829.

- Challis, G.L., and Hopwood, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 100: 14555–14561.
- Chater KF. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*. 1972; 72:9–28.
- Chater, KF. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In: Losick, R.; Shapiro, L., editors. *Microbial Development*. Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY: 1984. p. 89-115.
- Chater, K.F.. Sporulation in *Streptomyces*. In *Regulation of prokaryotic development* (ed. I. Smith, R.A. Slepecky, and P. Setlowt, 1989 pp. 277-299. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Chater, K.F., and Bibb, M.J. Regulation of bacterial antibiotic production. In *Biotechnology*, 1997 Vol. 7. *Products of Secondary Metabolism*. Kleinkauf, H., and von Döhren, H. (eds). Weinheim, Germany: VCH, pp. 57–105.
- Chater, KF. Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In: Brun, YV.; Shimkets, L.J., editors. *Prokaryotic Development*. ASM Press; Washington, DC: 1999. p. 33-48.
- Chater KF. (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol*. 2001 Dec;4(6):667-73.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*. 2010; 34:171–98.
- Chater, KF. Differentiation in *Streptomyces*: the properties and programming of diverse cell-types. In: Dyson, P., editor. *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Caister Academic Press; Norfolk, UK: 2011. p. 43-86.
- Champness, W. (2000) Actinomycete development, antibiotic production and phylogeny. questions and challenges. In *Prokaryotic Development*. Brun, Y.V., and Skimketts, L.J. (eds). Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*, 2000 pp. 11–31.
- Chong, P.P., Podmore, S.M., Kieser, H.M., Redenbach, M., Turgay, K., Marahiel, M., *et al.* (1998) Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 144: 193–199.
- Claessen, D. et al. Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol Microbiol*. 2002 44:1483–1492
- Claessen, D. et al. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev*. 2003 17:1714–1726
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., *et al.* The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol* 2004 53: 433–443.
- Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HA. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol*. 2006; 14:313–319.
- Coisne, M. Be'chet and R. Blondeau. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media. *Applied Microbiology* 1999, 28, 199–202
- Coté A., Shareck F., Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Enzyme and Microbial Technology* 2007 42 (2008) 381–388

- Dalton KA, Thibessard A, Hunter JI, Kelemen GH. A novel compartment, the 'subapical stem' of the aerial hyphae, is the location of a *sigN*-dependent, developmentally distinct transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*. 2007, 64:719–737.
- Davis, N. K. & Chater, K. F. Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Microbiol.* 1990, 4:1679–1691
- Daza A, Martín JF, Dominguez A, Gil JA. Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J Gen Microbiol.* 1989, 135:2483–2491.
- de Crécy-Lagard V, Servant-Moisson P, Viala J, Grandvalet C, Mazodier P. Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*. 1999, 32:505–517.
- De Jong W, Manteca A, Sa´nchez J, Bucca G, Smith CP, et al. (2009) NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 71: 1591-1603.
- Delic V., Hopwood D.A. and Friend E.J.. Mutagenesis by N-methyl-N'nitro- Nnitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Research* 9, 1970 167-182.
- Den Hengst CD, Tran NT, Bibb MJ, Chandra G, Leskiw BK, Buttner MJ. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*. 2010; 78:361–379.
- Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W.. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007 26:3279–9320.
- Divya Prakash, Neelu Nawani, Mansi Prakash, Manish Bodas, Abul Mandal, Madhukar Khetmalas, and Balasaheb Kapadnis. Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential. Revenue Resource. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 264020, 8 pages.
- Eaton D, Ensign JC. *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. *J Bacteriol.* 1980; 143:377–382.
- Elliot, M.A., Damji, F., Passantino, R., Chater, K., and Leskiw, B. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J Bacteriol* 1998, 180: 1549-1555
- Elliot Marie A., J Maureen J. Bibb, Mark J. Buttner and Brenda K. Leskiw. (2001) BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* (2001) 40(1), 257-269
- Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M., and Buttner, M.J. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* (2003) 17: 1727–1740.
- Facey PD, Sevcikova B, Novakova R, Hitchings MD, Crack JC, Kormanec J, Dyson PJ, Del Sol R. The *dpsA* gene of *Streptomyces coelicolor*: Induction of expression from a single promoter in response to environmental stress or during development. *PLoS One*. 2011; 6:e25593.
- Flårdh K, Findlay KC, Chater KF. Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 1999; 145:2229–2243.



- Flårdh K, Leibovitz E, Buttner MJ, Chater KF. Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter. *Molecular Microbiology*. 2000; 38:737–749.
- Flardh K., Buttner M.J. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 2009 7(1):36-49.
- Garrity, G.M.. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York 2002.
- Ghorbel S., Kammoun M., Soltana H., Nasri M., Hmidet N. Streptomyces flavogriseus HS1: isolation and characterization of extracellular protease and their compatibility with laundry detergents, *BioMed Research International*, 2014 vol.2014
- Glazebrook MA, Doull JL, Stuttard C, Vining LC. Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *J Gen Microbiol*. 1990; 136:581–588.
- Granozzi C., Billetta R., Passantino R., Sollazzo M and Puglia AM. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* 1990, 136, 713-716.
- Grantcharova N, Lustig U, Flårdh K. Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 2005; 187:3227–3237.
- Gerber N.N.. New prodiginine (prodigiosin-like) pigment from *Streptomyces* Antimalarial activity of several prodiginines. *J Antibiot* 1975a 28:194–199.
- Gottesman, S., and Maurizi, M.R. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* 1992 56: 592–621.
- Gottesman, S., Wickner, S., and Maurizi, M. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* 1997 11: 815–823.
- Grund AD, Ensign JC. Properties of the germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J Gen Microbiol*. 1985; 131:833–847.
- Guijarro JA, Suarez JE, Salas JA, Hardisson C. Pattern of protein degradation during germination of *Streptomyces antibioticus* spores. *Can J Microbiol*. 1983; 29:637–643.
- Guijarro, J., Santamaria, R., Schauer, A., and Losick, R. Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated protein. *J Bacteriol* 1988, 170:1895–1901.
- Hardisson C, Manzanal MB, Salas JA, Suárez JE. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol*. 1978; 105:203–214.
- Haiser HJ, Yousef MR, Elliot MA. Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*. 2009; 191:6501–6512.
- Han S.B., Kim H.M., Kim Y.H., Lee C.W., Jang E.S., Son K.H., Kim S.U., Kim Y.K. (1998). Tcell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int J Immunopharmacol* 20:1–13.
- Haynes S.W., Sydor P.K., Stanley A.E., Song L. and Challis G.L., (2008). Role and substrate specificity of the *Streptomyces coelicolor* RedH enzyme in undecylprodiginine biosynthesis, *Chemical Communications Issue* 16, 1865-1867
- Higo A, Horinouchi S, Ohnishi Y. Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology*. 2011; 81:1607–1622.

- Hobbs G., Frazer C., Gardner D., Flett F., Oliver S.. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J Gen Microbiol* 1990 136:2291–2296.
- Hopwood DA, Wildermuth H, Palmer HM. Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation. *Journal of General Microbiology*. 1970; 61:397–408.
- Hopwood, D. A., Chater, K. F Dowding, J.E. and Vivian, A. Advances in *Streptomyces coelicolor* genetics. *Bacteriol Rev* 1973; 37:371-405
- Hopwood, D. A., Chater, K. F. & Bibb, M. J. in *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production* (eds Vining, L. C. & Studdart, C.) 65–102 (Butterworth-Heinemann, Newton, Massachusetts, 1995).
- Hopwood, DA. *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press; New York: 2007.
- Hunt, A.C. et al. The bldC developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family. *J. Bacteriol.* 2005 187, 716–728
- Heussen, C., Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochem.* 1980 102-196
- Jani C., Tocheva E.I., McAuley S., Jensen A., Nodwell J. *Streptomyces*: A Screening Tool for Bacterial Cell Division Inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*, 2014 Vol. 20(2) 275–284.
- Kawasaki T., Sakurai F., Hayakawa Y.. A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*. *J Nat Prod* 2008 71: 1265–1267.
- Keijsers, B.J.F. et al. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* ram genes: involvement of RamR in regulation of the ramCSAB operon. *J. Bacteriol.* (2002) 184:4420–4429
- Kieser T., Bibb M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A.. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation 2000.
- Kelemen, G.H., and Buttner, M.J. Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 1998 1: 656–662.
- Kelemen GH, Brian P, Flårdh K, Chamberlin LC, Chater KF, Buttner MJ. Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 1998a; 180:2515–2521.
- Kendrick KE, Ensign JC. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bacteriol.* 1983; 155:357–366.
- Kim Y., Edwards N., Fenselau C.. Extracellular vesicle proteomes reflect developmental phases of *Bacillus subtilis*. *Clin Proteomics* 2016 13:6
- Kinashi, H., Shimaji-Murayama, M. and Hanafusa, T. Nucleotide sequence analysis of the unusually long terminal inverted repeats of a giant linear plasmid, SCP1. *Plasmid* 1991, 26:123–130.
- Kodani, S. et al. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004 101:11448–11453
- Koepsel R, Ensign JC. Microcycle sporulation of *Streptomyces viridochromogenes*. *Arch Microbiol.* 1984:140:9–14.

- Kormanec J, Sevcikova B. The stress-response sigma factor IH controls the expression of *ssgB*, a homologue of the sporulation-specific cell division gene *ssgA*, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Genetics and Genomics*. 2002; 267:536–543.
- Kuimova TF, Soina VS. A submerged sporulation and ultrastructural changes in the mycelium of *Streptomyces chrysomallus*. *Hindustan Antibiot Bull*. 1981, 23:1–5.
- Lawlor, E.J., Baylis, H.A., and Chater, K.F. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev* 1987 1: 1305–1310.
- Lee B.R., Bhatia S.K., Song H.S., Kim J., Kim W., Park H.Y., Yoon J.J., Park S.H., Hwang D., Kim B.G., Yang Y.H.. The role of NdgR in glycerol metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2017 10.1007/s00449-017-1813-z.
- Lee CJ, Won HS, Kim JM, Lee BJ, Kang SO. Molecular domain organization of BldD, an essential transcriptional regulator for developmental process of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Proteins*. 2007; 68:344–352.
- Lee, H. N., J. Huang, J. H. Im, S. H. Kim, J. H. Noh, S. N. Cohen, and E. S. Kim. 2010. Putative TetR family transcriptional regulator SCO1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3039–3043.
- Lee J.S., Kim Y.S., Park S., Kim J., Kang S-J, Lee M-H, Ryu S., Choi J.M., Oh T-K, Yoon J.H. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl Environ Microbiol* 2011 77:4967–4973.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H.. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013 77, 112–143.
- Liu Y., Alexeeva S., Defourny K.A.Y., Smid E. J., Abee T.. Tiny but mighty: bacterial membrane vesicles in food biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018 49:179–184
- Ma, H. and Kendall, K. Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol*. 1994, 176: 3800–3811
- Magae J., Miller M.W., Nagai K., Shearer G.M.. Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells on murine skin and heart transplants. *J Antibiot (Tokyo)* 1996 49:86–90.
- Magdalena A. Swiatek, Jacob Gubbens, Giselda Bucca, Eunjung Song, Yung-Hun Yang, Emma Laing, Byung-Gee Kim, Colin P. Smith, Gilles P. van Wezela. The ROK Family Regulator Rok7B7 Pleiotropically Affects Xylose Utilization, Carbon Catabolite Repression, and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* 2013 Volume 195 p. 1236 –1248.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. and Engel J., *Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1989.
- Manteca A, Fernández M, Sánchez J. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent solid cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*. 2005; 151:3689–3697.
- Manteca A, Fernández M, Sánchez J. Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in solid cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res Microbiol*. 2006a; 157:143–152.
- Manteca A, Claessen D, Lopez-Iglesias C, Sánchez J. Aerial hyphae in solid cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol lett*. 2007; 274:118–125.

- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yaguë P, Sánchez J. Mycelium differentiation and antibiotic production in liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 3877-3886.
- Manteca A, Sánchez J. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:2920-2924.
- Manteca A, Jung HR, Schwämmle V, Jensen ON, Sánchez J. Quantitative proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* in liquid cultures reveals the switch in metabolism associated with hyphae differentiation. *J Proteome Res*. 2010b; 9:4801-4811.
- Marciniszyn J.Jr, Hartsuck JA., Tang J., , Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin, *Journal of Biological chemistry*, 1976 pp. 7088-94
- Mazurakova V, Sevcikova B, Rezuchova B, Kormanec J. Cascade of sigma factors in streptomycetes: identification of a new extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma J$  that is under the control of the stress-response sigma factor  $\sigma H$  in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Archives of Microbiology*. 2006; 186:435-446.
- Mazza P, Noens EE, Schirner K, et al. MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Molecular Microbiology*. 2006; 60:838-852.
- McCormick JR, Su EP, Driks A, Losick R. Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol Microbiol*. 1994; 14:243-254.
- McCormick JR, Flärdh K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36:206-231.
- Melvin M.S., Ferguson D.C., Lindquist N., Manderville R.A. DNA binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for intercalation at AT sites by tambjamine E and prodigiosin. *J Org Chem* 1999 64:6861-6869
- Mendez C, Braña AF, Manzanal MB, Hardisson C. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol*. 1985; 31:446-450.
- Miguelé EM, Hardisson C, Manzanal MB. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion equivalent to apoptosis in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol*. 1999; 145:515-525.
- Miguelé EM, Hardisson C, Manzanal MB. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion equivalent to apoptosis in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol*. 1999; 145:515-525. Romero-Rodríguez A., Ruiz-Villafán B., Tierrafría V. H., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S.. Carbon Catabolite Regulation of Secondary Metabolite Formation and Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 180:1152-1166.
- Mo S.J., Sydor P.K., Corre C., Alhamadsheh M.M., Stanley A.E., Haynes S.W., Song L., Reynolds K.A., Challis G.L.. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* Pathway to 2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis, *Chemistry & Biology* Volume 15, Issue 2, 22 February 2008, Pages 137-148.
- Mo S., Sydor P.K., Corre C., Alhamadsheh M.M., Stanley A.E., Haynes S.W., Song L., Reynolds K.A., Challis G.L.. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chem Biol* 2008, 15:137-148.
- Molle, V., and Buttner, M.J. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Mol Microbiol* 2000, 36: 1265-1278.

- Nakamura A., Nagai K., Ando K., Tamura G. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of murine splenocytes. *J Antibiot (Tokyo)* 1986, 39:1155–1159.
- Nakashima T., Kato Y., Yamaguchi K., Oda T. Evaluation of the anti- Trichophyton activity of a prodigiosin analogue produced by gamma-proteobacterium, using stratum corneum epidermis of the Yucatan micropig. *J Infect Chemother* 2005, 11:123– 128.
- Nodwell, J.R., McGovern, K., and Losick, R. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 1996, 22: 881-893.
- Noens EE, Mersinias V, Willemse J, Traag BA, Laing E, Chater KF, Smith CP, Koerten HK, van Wezel GP. Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an *ssgA* mutant of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*. 2007; 64:1244–1259.
- Novella IS, Barbés C, Sánchez J. Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can J Microbiol*. 1992; 38:769–773.
- Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH., Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions, *Metallomics* 2014, 6(5): 1068–1078.
- Paget, M. S. B., Hong, H.-J., Bibb, M. J. & Buttner, M. J. in Control of Bacterial Gene Expression (eds Hodgson, D. A. & Thomas, C. M.) 105–125 (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2002).
- Passantino R., Puglia A.M., Keith C.. Additional copies of the *act11* regulatory gene induce actinorhodin production in pleiotropic *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* 1991, 137, 2059-2064 .
- Pawlik K, Kotowska M, Kolesin' ski P. *Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk. *J. Mol. Microbiol Biotechnol* 2010. 19: 147-151.
- Piette A, Derouaux A, Gerkens P, et al. From dormant to germinating spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new perspectives from the *crp* null mutant. *J Proteome Res*. 2005; 4:1699–1708.
- Pope, M.K., Green, B.D., and Westpheling, J. The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Mol Microbiol* 1996 19: 747-756
- Pope, M.K., Green, B., and Westpheling, J. The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 1998 180: 1556-1562.
- Potúcková L, Kelemen GH, Findlay KC, Lonetto MA, Buttner MJ, Kormanec J. A new RNA polymerase sigma factor,  $\sigma F$ , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Molecular Microbiology*. 1995; 17:37–48.
- Puglia A.M., Misuraca F., Randazzo R., Sciandrello G. and Sermonti G.. Plasmid-dependent co-mutation in *streptomyces coelicolor* A3(2). *Curr Genet* 1982, 5, 89-92.
- Puglia AM, and Cappelletti E. A bald superfertile UV resistant strain in *streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiologica*, 1984; 7:263-266,
- Puglia AM, Vohradsky J, Thompson CJ. Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*. 1995; 17(4):737-46

- Ramos, J. L., M. Martinez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M. T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes.. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, 69:326–356.
- Rho YT, Lee KJ. Kinetic characterization of sporulation in *Streptomyces albidoflavus* SMF301 during submerged culture. *Microbiology.* 1994; 140:2061–2065.
- Rigali S, Nothhaft H, Noens EE, et al. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 2006; 61:1237–1251.
- Rueda B, Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture. *Can J Microbiol.* 2001; 47:1042–1047.
- Ryding NJ, Kelemen GH, Whatling CA, Flärdh K, Buttner MJ, Chater KF. A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology.* 1998; 29:343–357.
- Salamone M, Nicosia A, Bennici C, Quatrini P, Catania V, Mazzola S, et al. Comprehensive Analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* Strain Extracellular Serine Protease VpSP37. *PLoS ONE* 2015, 10(7): e0126349.
- Sánchez L, Braña AF. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* 1996; 142:1209–1220.
- Sánchez, S., & Demain, A. L.. Valuable products from microbes. In *Microbes in Process* ed. Neelam, G. & Abhinav, a (pp. 23–57). Danvers, MA: Nova Scientific Publishers, Inc. 2014.
- Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:677–688.
- Schrempf, H., Bujard, H., Hopwood D.A. and Goebel, W. Isolation of covalently closed circular desoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol* 1975; 121:416-421
- Schrempf H., Koebsch I., Walter S., Engelhardt H., and Meschke H.. Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence. *Microb. Biotechnol.* 2011, 4, 286–299.
- Seno E.T. & Chater K.F. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 1983 May;129(5):1403-13.
- Sevcikova B, Rezuchova B, Homerova D, Kormanec J. The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor  $\sigma^H$  in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology.* 2011; 192:5674–5681.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996, 68(5):850-8.
- Smith C.P. and Chater K.F.. Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glyceron operon. *J Mol Biol* 1988, 204: 569-580.
- Soliveri J, Brown KL, Buttner MJ, Chater KF. Two promoters for the *whiB* sporulation gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and their activities in relation to development. *Journal of Bacteriology.* 1992; 174:6215–6220.
- Someya N., Nakajima A., Hirayae K., Hibi A., Akutsu K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J Gen Plant Pathol* 2001, 67:312–317.

- Song L, Barona-Gomez F, Corre C, Xiang L, Udvary DW, Austin MB, Noel JP, Moore BS, Challis GL. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *J Am Chem Soc.* 2006; 128:14754–14755.
- Stanley A.E., Walton L.J., Zerikly M.K., Corre C. and Challis G.L. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy-2,29-bipyrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis, *Chemical Communications Issue 38*, 2006.
- Süsstrunk U, Pidoux J, Taubert S, Ullmann A, Thompson CJ. Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 1998; 30:33–46.
- Takano H, Fujimoto M, Urano H, Beppu T, Ueda K. Cross-interaction of anti- $\sigma^H$  factor RshA with BldG, an anti-sigma factor antagonist in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiology Letters.* 2011; 314:158–163.
- Tian Y, Fowler K, Findlay K, Tan H, Chater KF. An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology.* 2007; 189:2873–2885.
- Tillotson, R.D., Wosten, H.A., Richter, M., and Willey, J.M. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol Microbiol* 1998 30: 595±602.
- Viala J. and Mazodier P. The ATPase ClpX is conditionally involved in the morphological differentiation of *Streptomyces lividans*. *Mol Genetic Genomic* 2003, Feb 268(5):563-9
- Von den Hoff P.A.M., Snoek-van Beurden J.W., Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, the Netherlands, *BioTechniques*, 2005, Vol. 38, No.1, pp. 73–83
- Vohradsky J, Li XM, Dale G, Folcher M, Nguyen L, Viollier PH, Thompson CJ. Developmental control of stress stimulons in *Streptomyces coelicolor* revealed by statistical analyses of global gene expression patterns. *J Bacteriol.* 2000, Sep; 182(17):4979-86
- Wang L., Tian X., Wang J., Yang H., Fan K., Xu G., Yang K., Tan H.. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106: 8617–8622.
- Willey, J.M. et al. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* 1991, 65:641–650
- Willey J, Schwedock J and R Losick. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 1993 7: 895-903
- Willey, J.M. et al. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 2006, 59:731–742
- Williams, ST. Oligotrophy in soil: fact or fiction?. In: Fletcher, M.; Floodgate, GD., editors. *Bacteria in their Natural Environment.* Academic Press; London: 1985. p. 81-110.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P.C. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* 2006 4:887–899.
- Willemsse J, Borst JW, de Waal E, Bisseling T, van Wezel GP. Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes & Development.* 2011; 25:89–99.

- Withall D.M., Haynes S.W., and Challis G.L. (2015). Stereochemistry and Mechanism of Undecylprodigiosin Oxidative Carbocyclization to Streptorubin B by the Rieske Oxygenase RedG. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 7889–7897.
- Wolanski M, Donczew R, Kois-Ostrowska A, Masiewicz P, Jakimowicz D, Zakrzewska-Czerwinska J. The level of AdpA directly affects expression of developmental genes in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*. 2011; 193:6358–6365.
- Xu D, Seghezzi N., Esnault C and Viroille M.J. Repression of Antibiotic Production and Sporulation in *Streptomyces coelicolor* by overexpression of a TetR family transcriptional regulator. *Appl Environ Microbiol*, Dec. 2010, p. 7741-7753
- Xu W, Huang J, Lin R, Shi J, Cohen SN. Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor. *Molecular Microbiology*. 2009; 75:781–791.
- Yagüe P, Lopez-Garcia MT, Rioseras B, Sanchez J, and Manteca A. Pre-sporulation stages of streptomyces differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett.* 2013a May; 342(2): 79-88. doi:10.1111/1574-6968.12128
- Yagüe P, Rodriguez-Garcia A, Lopez-Garcia MT, Martin JF, Rioseras B, Sanchez J, Manteca A. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE*. 2013b; 8:e60665
- Yagüe P., Rodríguez-García A., López-García M.T., Martín J.F., Rioseras B., Sánchez J., Manteca A. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS One*, 2014, 8:e60665.
- Yang,C.-C., Huang,C.-H., Li,C.-Y., Tsay,Y.-G., Lee,S.-C. and Chen,C.W. The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: A novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol* 2002, 43:297–305.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., Jakimowicz, D., Majka, J., Messer, W. & Schrempf, H. Initiation of the *Streptomyces* chromosome replication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 78:211–221