



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“PROPIEDADES DEL PRODUCTO DE  
EXPRESIÓN SCO2127  
Y SU POSIBLE PAPEL EN EL PROCESO DE  
REPRESIÓN POR  
GLUCOSA EN *Streptomyces coelicolor*”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A :  
**ADÁN CHÁVEZ CASTILLO**



Tutor: Dr. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MÉXICO, D. F.

Mayo 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# “PROPIEDADES DEL PRODUCTO DE EXPRESIÓN SCO2127 Y SU POSIBLE PAPEL EN EL PROCESO DE REPRESIÓN POR GLUCOSA EN *Streptomyces coelicolor*”

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Edgardo Escamilla Marván	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Química de Proteínas de la Facultad de Medicina, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de secuenciación de proteínas.

Se reconoce la valiosa asesoría técnica de la Maestra Beatriz Ruiz Villafán durante la realización de este proyecto.

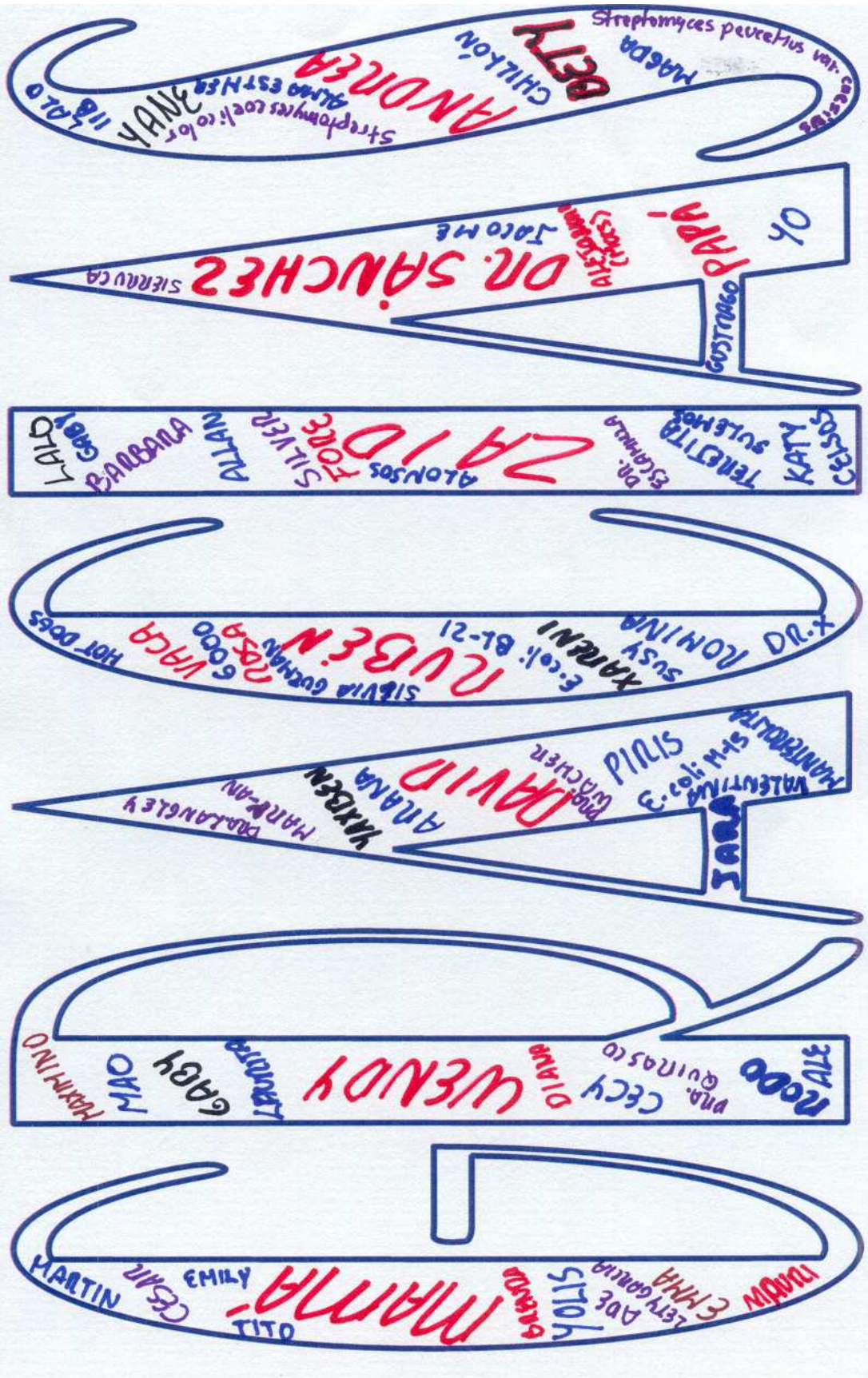
El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (P46469Z) y PAEP-UNAM (66551245). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 9 de marzo de 2010

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Edgardo Escamilla Marván	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. María del Carmen Wachter R.	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

SON MUCHAS LAS PERSONAS EXTRAORDINARIAS QUE HAN ESTADO CONMIGO EN ESTA AVENTURA...  
Y LAS BACTERIAS TAMBIEN...





**SECCIÓN (PÁGINA)**

**RESUMEN (2)**

**ABSTRACT (4)**

**ABREVIATURAS (6)**

**ANTECEDENTES (8)**

**¿Qué son los *Streptomyces*? (8)**

**El género *Streptomyces* pertenece al orden de los Actinomicetos (9)**

**Los *Streptomyces* han evolucionado (10)**

**Los *Streptomyces* y su historia (10)**

**¿Por qué los *Streptomyces* son tan importantes? (11)**

***Streptomyces coelicolor* M-145, el que marca la pauta. (12)**

***Streptomyces* y su ciclo de vida ((12)**

***Streptomyces* y su desarrollo morfofisiológico (14)**

**La cascada *bld* y el comienzo del desarrollo del micelio aéreo en *Streptomyces* (16)**

**La utilización preferencial de las fuentes de carbono disponibles: Represión Catabólica por Carbono (19)**

**Transportando carbohidratos: El sistema PTS (20)**

**¿Cómo se lleva a cabo la RCC en *Escherichia coli*?. El caso de una bacteria Gram negativa (21)**

***Bacillus subtilis*: un ejemplo de Represión Catabólica por Carbono en Gram-positivos con bajo contenido en G-C (23)**

***Streptomyces* y su mecanismo de Represión Catabólica por Carbono (24)**

**El transporte de glucosa en *Streptomyces* (26)**

**Existe un gen en *S. coelicolor* denominado *sco2127* (27)**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (29)**

**HIPOTESIS (29)**

**OBJETIVOS (30)**

**MATERIALES Y MÉTODOS (31)**

**RESULTADOS (38)**

**DISCUSION (44)**

**CONCLUSIONES (51)**

**PERSPECTIVAS (51)**

**REFERENCIAS (52)**

**ANEXO (63)**

**PUBLICACION**

## RESUMEN

El gen *sco2127* de *Streptomyces coelicolor* (576 pb), se encuentra contiguo y corriente arriba del gen de la glucosa cinasa (*glkA*). Hasta hace algunos años se desconocía totalmente la función de su producto de expresión. Con la ayuda de una mutante de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* aislada como resistente al efecto de 2-desoxiglucosa (Dog<sup>R</sup>) con deficiencias tanto en el transporte de glucosa como en la actividad de glucosa cinasa e insensible a represión catabólica por glucosa (RCG), este gen (*sco2127*) fue capaz de restablecer la totalidad del fenotipo, pero, ¿cómo lo hace?

Considerando que *sco2127* no codifica para la permeasa de glucosa (GlcP1) ni para la Glk y además carece de motivos de unión al DNA, la posibilidad de una interacción directa de su producto de expresión (SCO2127), con otras proteínas, fue considerado como un posible mecanismo de acción.

Para este propósito, *sco2127* fue amplificado por PCR, subclonado en el plásmido de expresión pQE30 y su producto (SCO2127-His<sub>6</sub>) sobreexpresado. Este procedimiento permitió la purificación de SCO2127 (por su unión a sefarosa niquelada) y la producción de anticuerpos policlonales anti-SCO2127 para llevar a cabo ensayos de interacción proteína-proteína. En ensayos tipo western-blot, los anticuerpos policlonales anti-SCO2127 reconocieron una proteína de aproximadamente 34 kDa al emplear lisados proteicos de *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, más no así en lisados proteicos obtenidos a partir de una cepa carente del gen *sco2127* ( $\Delta$ *sco2127*). Empleando dichos anticuerpos se pudo detectar la presencia de la proteína SCO2127 en cultivos de *S. coelicolor* crecidas en un medio complejo a partir de las 24 h de crecimiento, manteniéndose la señal a lo largo de la fase estacionaria.

Los ensayos de unión proteína-proteína llevados a cabo mediante las pruebas de captura (pull-down) y Far-western (overlay) coincidieron en indicar que SCO2127 es capaz de unirse a dos proteínas; por un lado a la proteína BldKB (SCO5113), que es una lipoproteína receptora de oligopéptidos perteneciente a una oligopéptido permeasa (BldK) de la familia de transportadores tipo ABC (ATP binding cassette) y por otro lado, a una posible endopeptidasa membranal (SCO2582). Con base en los resultados obtenidos y en adición a la

participación de SCO2127 en el proceso de represión catabólica por carbono (RCC), podemos proponer que esta proteína está involucrada en la regulación del proceso de diferenciación morfológica de *S. coelicolor*, lo cual fue corroborado con experimentos de microscopía electrónica en los cuales se observa un retraso en la formación del micelio aéreo en la cepa silvestre, con respecto a la cepa mutante ( $\Delta sco2127$ ).





## ABSTRACT

The *sco2127* gene from *Streptomyces coelicolor* (576 bp), lies adjacent to and upstream from the gene encoding for glucose kinase (*glkA*). Until recently, ago the function of the *sco2127* expression product was totally unknown. With the help of a *Streptomyces peucetius* var. *caesius* mutant isolated as resistant to the effect of 2-deoxyglucose (Dog<sup>R</sup>) containing deficiencies in both glucose transport and glucose kinase activity and insensitive to glucose catabolite repression (RCG), this gene (*sco2127*) was able to restore all phenotypes, but how can it do that?

Considering that *sco2127* does not encode for a glucose permease (GlcP1) nor for a Glk, and also lacks DNA binding motifs, we considered the possibility that a direct interaction of SCO2127 with other proteins may be its possible mechanism of action. For this purpose, *sco2127* was amplified by PCR, subcloned into the expression plasmid pQE30 and its product (SCO2127-His<sub>6</sub>) overexpressed. This procedure allowed both, SCO2127 purification (with a Ni-sepharose resin) and production of polyclonal antibodies against the purified protein. The antibodies gave a positive reaction against both, *S. coelicolor* and *S. peucetius* var. *caesius* intracellular extracts, appearing as a single band of 34 kDa in western blot assays. Null reaction was observed when using extracts from a *S. coelicolor* mutant lacking the *sco2127* gene ( $\Delta$ *sco2127*). This protein was detected in cultures of *S. coelicolor* at 24 and 48 h of fermentation in 50 and 100 mM glucose, respectively; remaining stable during the stationary growth phase. Pull down assays using crude extracts of *S. coelicolor* grown in the same media, followed by far-western blotting, allowed detection of two proteins bound to SCO2127. The use of mass spectrometry identified these proteins as SCO5113 and SCO2582. SCO5113 (BldKB) is a lipoprotein oligopeptide receptor that belongs to a periplasmic ABC (ATP binding cassette) type permease involved in the transport of the morphogenic oligopeptide Bld261 in the early morphology differentiation of *S. coelicolor*; while SCO2582, is a putative membrane metalloendopeptidase probably involved in protein processing. Based on the results and in addition to the participation of SCO2127 in the process of carbon catabolite repression (CCR), we propose that this protein is involved in regulating the process of morphological

differentiation of *S. coelicolor*, which was corroborated by electron microscopy experiments in which there is a delay in aerial mycelium formation in wild strain, respect to the mutant strain ( $\Delta sco2127$ ).

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ABC	ATP binding cassette
AC	Adenilato ciclasa
Act	Actinorrodina
AMPC	Adenosín-monofosfato cíclico
BglG	Antiterminador transcripcional de la familia Bgl
BldKB	Lipoproteína receptora de oligopéptidos perteneciente a una permeasa
	ABC
CAP	Proteína activadora de genes catabólicos
Crr	Factor de resistencia a represión catabólica
Dog <sup>R</sup>	Resistente a 2-desoxiglucosa
DXR	Doxorrubicina
EI	Enzima 1 del sistema PTS
EII	Enzima II del sistema PTS
FBP	Fructosa 1,6-bifosfato
GlcP	Permeasa de glucosa simportador de protones
Glk/ <i>glk</i>	Glucosa cinasa
GlpK	Glicerol cinasa
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfato
GylR	Represor del operador de glicerol
His	Histidina
His <sub>6</sub>	Extremo de seis histidinas en tándem
HPr	Proteína rica en histidinas del sistema PTS
HPrK	HPr cinasa/fosforilasa
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LacY	Galactósido permeasa
LB	Luria-Bertanni
MalR	Represor del operador de maltosa
Mb	Megabases
Ni	Níquel
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
pQE30	Plasmid Quick Expression 30
pREP4	Plásmido de represión 4
PTS	Sistema de fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa

<b>RCC</b>	Represión catabólica por carbono
<b>RCG</b>	Represión catabólica ejercida por glucosa
<b>Red</b>	Undecilprodigiosina
<b>SCO/sco</b>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<b>SCP</b>	Plásmido de <i>S. coelicolor</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio
<b>var.</b>	Variedad
<b>YMG</b>	Yeast-Malt-Glucose
<b><math>\Delta</math>sco2127</b>	Cepa mutante de <i>S. coelicolor</i> carente del gen <i>sco2127</i>

## ANTECEDENTES

### ¿Qué son los *Streptomyces*?

Los *Streptomyces* (uno de los grupos del orden de los actinomicetos al cual pertenece *Streptomyces*) son bacterias Gram positivas saprofíticas y miceliales cuyo hábitat principal es el suelo; presentan un ciclo de vida inusual y complejo; además producen un amplio rango de metabolitos secundarios con importantes aplicaciones en medicina humana y veterinaria; así como en agricultura (Champness et al., 2000; Chater, 2001). Las colonias crecen en forma vegetativa mediante la formación de un micelio ramificado que se encuentra en el sustrato, el cual está compuesto de hifas multigenómicas, las cuales ocasionalmente se encuentran divididas por la pared celular. La diferenciación morfológica comienza con el crecimiento de la hifa en el que los filamentos individuales se proyectan desde la superficie de la colonia hacia el aire. Finalmente la hifa aérea madura en esporas. La diferenciación de hifas en esporas se presenta cuando los nutrientes comienzan a agotarse (Chater, 2001; Karoonuthaisiri et al., 2005; Kelemen and Buttner, 1998). Además, la diferenciación celular en el género *Streptomyces* es comúnmente acompañada por la producción de metabolitos secundarios y regulada por complejos mecanismos interrelacionados (Distler et al., 1992; Hopwood, 1988). Los *Streptomyces* pueden crecer en un gran número de fuentes de carbono y producir metabolitos secundarios que son sintetizados a partir de precursores metabólicos primarios durante la fase estacionaria de crecimiento, la cual se ve afectada por el abastecimiento de oxígeno, nutrientes u otros factores ambientales (Imriskova et al., 2005). Los metabolitos secundarios incluyen antibióticos, inmunosupresores, insecticidas y agentes antitumorales (Uguru et al., 2005). El género *Streptomyces* es de vital importancia en la producción de diversos productos farmacéuticos (Demain, 2000). Los *Streptomyces*, además son de gran importancia en el medio ambiente porque debido a su gran rango de procesos metabólicos dan lugar a la biotransformación, mediante la degradación de restos insolubles de otros organismos, tales como lignocelulosa y quitina (Bentley et al., 2002). También estos sistemas microbianos son importantes en la industria biotecnológica debido a la

producción de enzimas tales como amilasas, celulasas, xilanasas, agarasas, manasas y quitinasas; haciendo de ellos una rica fuente de productos naturales para la industria farmacéutica y agrícola (Hodgson, 2000). Por lo tanto, estos microorganismos han sido sujetos de investigación genética enfocada a la producción de metabolitos secundarios (Paradkar *et al.*, 2003).

### **El género *Streptomyces* pertenece al orden de los Actinomicetos**

El orden de los actinomicetales comprende bacterias típicamente aeróbicas, filamentosas y sensibles a las condiciones ácidas (Gottlieb, 1974). Los principales grupos del orden *Actinomycetes* son los *Actinoplanetes*, *Maduromyces*, *Nocardiomorficos*, *Actinomycetes*, y *Streptomyces* (McNeil and Brown, 1994). A pesar de sus diferencias taxonómicas y filogenéticas, las bacterias difteroidales y/o filamentosas están actualmente clasificadas en el género *Actinomyces*, *Arcanobacterium* y *Rothia*, representando un grupo homólogo. La formación de esporas es un criterio que los separa en subgrupos de especies no-esporulantes, como bacterias corineformes, morfológicamente variables, no sensibles al ácido o bacterias filamentosas; bacterias productoras de ácido propiónico que son anaeróbicas o aerotolerantes, capaces de formar filamentos y ramificaciones; y los anaerobios obligados. Un segundo grupo está formado por especies esporulantes de actinomicetos, que comprenden bacterias filamentosas frecuentemente ramificadas y con una gran diversidad morfológica (Madigan *et al.*, 2003). La clasificación es de acuerdo al tipo de pared celular; que incluyen Eubacterias gram positivas con alto contenido en GC. Esta subdivisión incluye los géneros *Corynebacterium*, *Bifidumbacterium*, *Streptomyces* y *Mycobacterium* (Woese, 1987), los cuales han recibido mucha atención debido a su aplicación en la industria o por su capacidad para causar enfermedades de importancia médica. Los más simples son esferas y bastones unicelulares, entre los que se incluyen las corinebacterias, dentro de las que se encuentran el agente causante de la difteria y especies benéficas de uso industrial usadas para producir aminoácidos como suplementos alimenticios. Existen otros actinomicetos que incluyen a las micobacterias que son causantes de enfermedades como la tuberculosis y la lepra. Los miembros del género *Streptomyces* son los más complejos; ya que éstos crecen formando un



micelio de hifas filamentosas ramificadas y se reproducen de manera similar a los mohos formando ramificaciones aéreas que se convierten en cadenas de esporas. La denominación actinomiceto significa “hongo rayo”; ya que el primer ejemplar conocido creció formando hifas con ramificaciones como un rayo, aunque ahora se sabe que los actinomicetos son de morfología muy diversa (Chater, 2006). Además, los estreptomicetos representan una de las principales fuentes de metabolitos secundarios incluyendo a los antibióticos (Hodgson, 2000).

### **Los *Streptomyces* han evolucionado**

Los primeros *Streptomyces* aparecieron hace aproximadamente 450 millones de años, dando origen a todas las especies de *Streptomyces* que conocemos hasta hoy. El estímulo para que éstos se desarrollaran y que eventualmente los ha hecho tan útiles para el hombre, fue probablemente la colonización del suelo por las plantas verdes hace aproximadamente 550 millones de años (Embley *et al.*, 1994), lo cual probablemente fue una poderosa forma de selección para organismos que pudieran digerir la celulosa en las plantas y beneficiarse de los nutrientes que en ellas se encontraban. Microorganismos tales como los streptomicetos y los hongos filamentosos que crecen como micelios de hifas filamentosas ramificadas, estaban entre aquellos que aparecieron en respuesta a esta oportunidad; ya que los organismos miceliales pueden atacar, penetrar y alimentarse de tejidos muertos de plantas, ayudados por la secreción de enzimas tales como celulasas y xilanasas. Parece ser que los streptomicetos también adquirieron pronto la capacidad de atacar a sus competidores fúngicos, ya que todos los streptomicetos están equipados con una serie de quitinasas capaces de romper paredes celulares de hongos. Para ayudar a su dispersión, algunas formas de hifas fragmentadas deben haber coevolucionado con el crecimiento micelial y esto fue presumiblemente el punto de partida para la evolución de las esporas (Chater 2006).

## Los *Streptomyces* y su historia

Aunque Ferdinand Cohn fue el primero en describir una cepa de *Streptomyces*, este nombre fue eventualmente conferido por Selman Waksman en 1942; él se interesó en los *Streptomyces* por que estaban relacionados a la producción de antibióticos (trabajo por el cual recibió el premio Nobel). El primer antibiótico de uso médico y comercial producido por *Streptomyces* fue la estreptomicina, la cual se usa para el tratamiento de la tuberculosis, y comenzó a utilizarse a mitad de los años 40's. Por razones más comerciales que biológicas, el descubrimiento de nuevos metabolitos de interés en *Streptomyces* disminuyó a partir de 1960; por lo tanto, lo que se sabe hoy acerca de dichos metabolitos en este género es poco. Un estudiante de posgrado de Cambridge comenzó a trabajar en la genética y biología molecular de streptomycetes productores de antibióticos, su nombre es David Hopwood, ahora Sir David Hopwood. Él eligió al organismo *Streptomyces coelicolor*, que se convirtió en la especie modelo a nivel internacional para investigaciones relacionadas con el género *Streptomyces*, después de que el mapa de varios genes del cromosoma de *S. coelicolor* fuera publicado (Bentley et al., 2002).

### ¿Por qué los *Streptomyces* son tan importantes?

Tres son las características que hacen de *Streptomyces* una bacteria tan fascinante: su complejo ciclo de vida, el cual culmina con la formación de un micelio aéreo capaz de esporular; su gran capacidad para producir metabolitos secundarios; y la producción de gran cantidad de enzimas extracelulares; ambos de gran interés científico y comercial. Estas tres características se manifiestan normalmente en las fases tardías del desarrollo de la colonia. Además, los estreptomicetos son productores de una gran variedad de compuestos bioactivos útiles en la industria. Este género produce diversas enzimas extracelulares como: celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc. Además producen una gran gama de metabolitos secundarios con actividad antibiótica como son: cloranfenicol producido por *Streptomyces venezuelae*, estreptomicina producida por *Streptomyces griseus*, así como inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico producido por *Streptomyces*

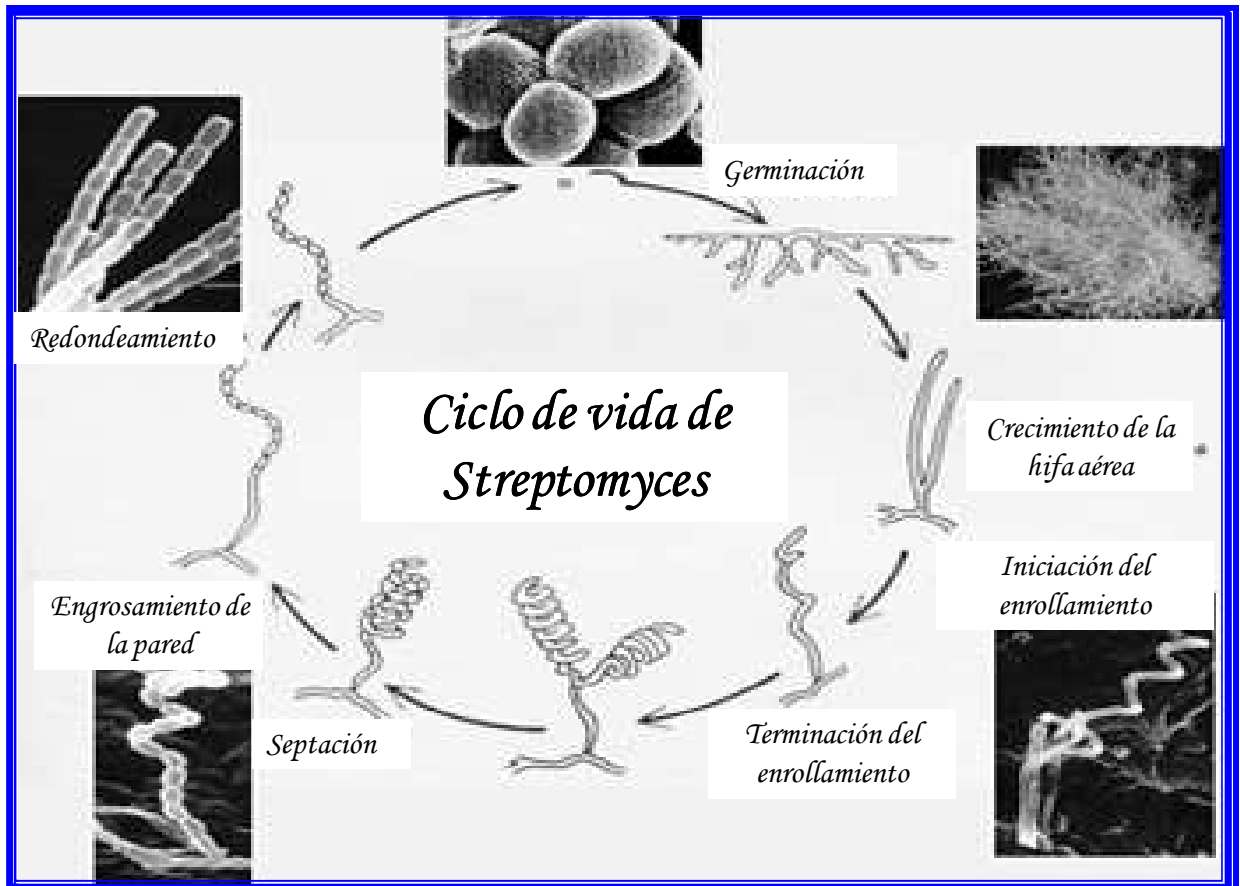
*achromogenes* var. *streptozoticus*. Herbicidas como bialafos, producido por *Streptomyces higroscopicus*. Agentes inmunosupresores como Fk506 producido por *Streptomyces tsukabensis*. Antiparasitarios como avermectina producida por *Streptomyces avermitilis* y compuestos con actividad anticancerígena como: daunorrubicina y doxorubicina (DXR) producidos por *Streptomyces peucetius* y *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, respectivamente (Hodgson, 2000; Demain and Sanchez, 2009).

### ***Streptomyces coelicolor* M-145, el que marca la pauta.**

*S. coelicolor* es el organismo modelo para estudios de esporulación y producción de antibióticos en estreptomicetos (Bralley and Jones, 2004). En el año 2002, fue secuenciado el genoma completo de la cepa M-145 de *S. coelicolor* derivado de la cepa A3(2), la cual carece de dos plásmidos (SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>) (Bentley *et al.*, 2002). *S. coelicolor* posee un genoma de 8.67 Mb y 7825 genes, casi dos veces el tamaño de los genomas de *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) y *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), lo cual refleja probablemente el tipo de vida del organismo (Hesketh *et al.*, 2002). Antes de que el proyecto de secuenciación comenzara se sabía que *S. coelicolor* producía cuatro antibióticos (uno de ellos codificado en un plásmido), dos de los cuales, actinorrodina (Act) y undecilprodigiosina (Red), son pigmentados y un pigmento de esporas que corresponde a un policétido (Hesketh *et al.*, 2002). Se sabe ahora que hay cerca de 20 grupos de genes que dirigen la síntesis de metabolitos secundarios y se han predicho más de 800 proteínas de secreción, 65 factores sigma, 37 homólogos a serín-treonín cinasas, 85 sensores de dos componentes tipo histidín-cinasas y una serie de reguladores transcripcionales (Bentley *et al.*, 2002).

## ***Streptomyces* y su ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Streptomyces* es uno de los más complejos entre los procariontes. El ciclo de vida inicia a partir de una espora que germina para formar un micelio vegetativo que crece por extensión apical que finalmente se ramifica, el cual es capaz de nutrirse de compuestos insolubles presentes en el suelo, produciendo una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares. En respuesta a la falta de nutrientes, comienza el proceso de diferenciación, es decir, el crecimiento de hifas aéreas que se nutren de la lisis del micelio vegetativo, y crecen hacia el ambiente aéreo rompiendo la tensión superficial, escapando del ambiente acuoso. La hifa aérea multinucleada, la cual puede contener más de 50 copias del cromosoma (lineal) en un solo compartimento sufre un proceso de diferenciación en largas cadenas compartimentalizadas de preesporas mononucleadas, que desarrollan delgadas paredes las cuales posteriormente comienzan a enroscarse y septarse, que generalmente adquieren pigmentación gris al madurar, debido a la síntesis de un policétido que las pigmenta. Las esporas, que se encuentran principalmente en estado de latencia, son el medio de dispersión de este organismo en el medio ambiente y pueden germinar eventualmente cuando encuentran las condiciones adecuadas (Flärdh K. and Buttner M. J., 2009).

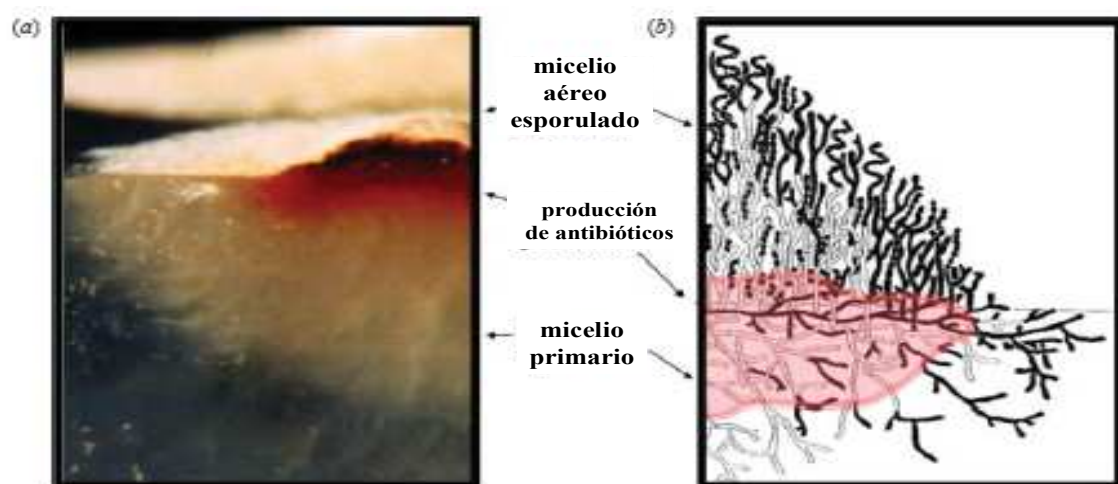


**Figura 1.** Ciclo de vida de *Streptomyces*. El ciclo comienza con la germinación de una espora latente que comienza a formar micelio vegetativo ramificado que le ayuda a absorber los nutrientes del medio ambiente. Al acabarse los nutrientes comienza la formación de la hifa aérea, la cual se enrolla, se septa, engrosa su pared y finalmente libera al medio ambiente nuevas esporas que permanecerán en latencia hasta que las condiciones sean favorables para volver a comenzar el ciclo de crecimiento (Chater, 1998).

### ***Streptomyces* y su desarrollo morfofisiológico**

La germinación de una espora ocurre en respuesta a la presencia de nutrientes solubles, y en forma temprana se lleva a cabo un rápido crecimiento micelial que explota dichos nutrientes como “comida fácil”. Hasta que los nutrientes se han agotado, se comienzan a exportar enzimas extracelulares capaces de degradar sustratos insolubles. Debido a la gran cantidad de biomasa, cada compartimiento de la hifa necesita secretar sólo una pequeña cantidad de enzima para lograr niveles óptimos. Esto tiene algún sentido si los antibióticos son secretados al mismo tiempo, debido a que éstos protegen al

material recién solubilizado contra otros microorganismos que pueden competir con el micelio. Esto puede ser considerado como una estrategia tipo emboscada que convertiría a los invasores en posible alimento: un fenómeno denominado por Shi y Zussman (1993) como “atracción fatal”. En esta etapa, cuando están disponibles los nutrientes realmente asimilables, se comienza a formar el micelio aéreo. Dicho crecimiento es en parte parasítico del micelio del cual emerge, ya que parte de éste es lisado para proveer nutrientes para la hifa aérea (Wildermuth, 1970). Los antibióticos probablemente también protegen estos nutrientes contra otros organismos invasores (Figura 2).

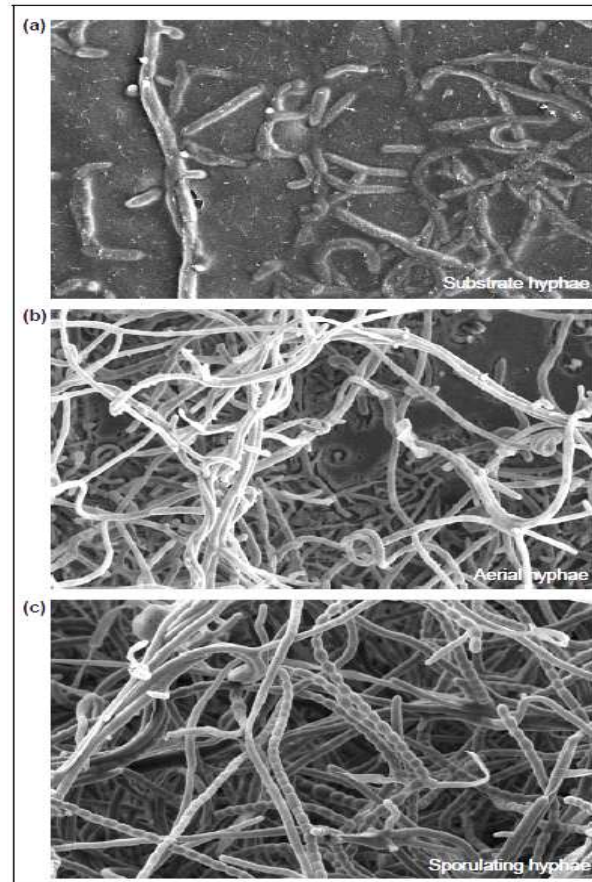


**Figura 2.** (a) Sección vertical a través de una colonia de *Streptomyces* creciendo en agar. (b) Diagrama que indica cómo la producción de antibióticos en la parte más baja de la colonia puede proteger los nutrientes liberados a partir de las células muertas (en blanco), lo cual puede mantener el crecimiento del micelio aéreo y la esporulación. Las células vivas se muestran en negro. (Tomado de Chater, 2006).

Después de que el micelio vegetativo se ha formado, comienza un proceso de diferenciación que da paso a la formación de las hifas aéreas, las cuales se septan para formar esporas. La cascada denominada *bld* (por bald=calvo, ya que los organismos que poseen mutaciones en este tipo de genes son incapaces de formar micelio aéreo) regula la iniciación de la formación del micelio aéreo, mientras que los genes *whi* controlan la formación de esporas. El crecimiento de la hifa aérea está acompañado por cambios en su superficie; ya que, mientras que la superficie de la hifa es hidrofílica y tiene una estructura lisa, por otro lado, la hifa aérea es de naturaleza hidrofóbica y la



estructura de su superficie se encuentra recubierta por mosaicos de pequeñas varillas que le dan una consistencia rugosa. En la Figura 3 se muestran los tres principales estadios de diferenciación morfológica de *S. coelicolor* en medio sólido.



**Figura 3.** Principales estadios de diferenciación morfológica de *S. coelicolor*. A diferencia de otras bacterias, los estreptomicetos presentan un desarrollo multicelular muy complejo. (a) Inicialmente, un micelio filamentososo coloniza el sustrato (Substrate hyphae = Hifas creciendo en el sustrato). (b) Después de un periodo de crecimiento asimilativo, la hifa aérea (Aerial hyphae) crece hacia el aire y eventualmente se septa para formar cadenas de exosporas pigmentadas (Sporulating hyphae = hifas esporuladas) (c). (Tomado de Claessen *et al.*, 2006).

### **La cascada *bld* y el comienzo del desarrollo del micelio aéreo en *Streptomyces***

La regulación de la formación de la hifa aérea es muy compleja. La cascada *bld* controla los mecanismos que eventualmente provocan la iniciación del crecimiento del micelio aéreo, resultando en la formación de moléculas activas

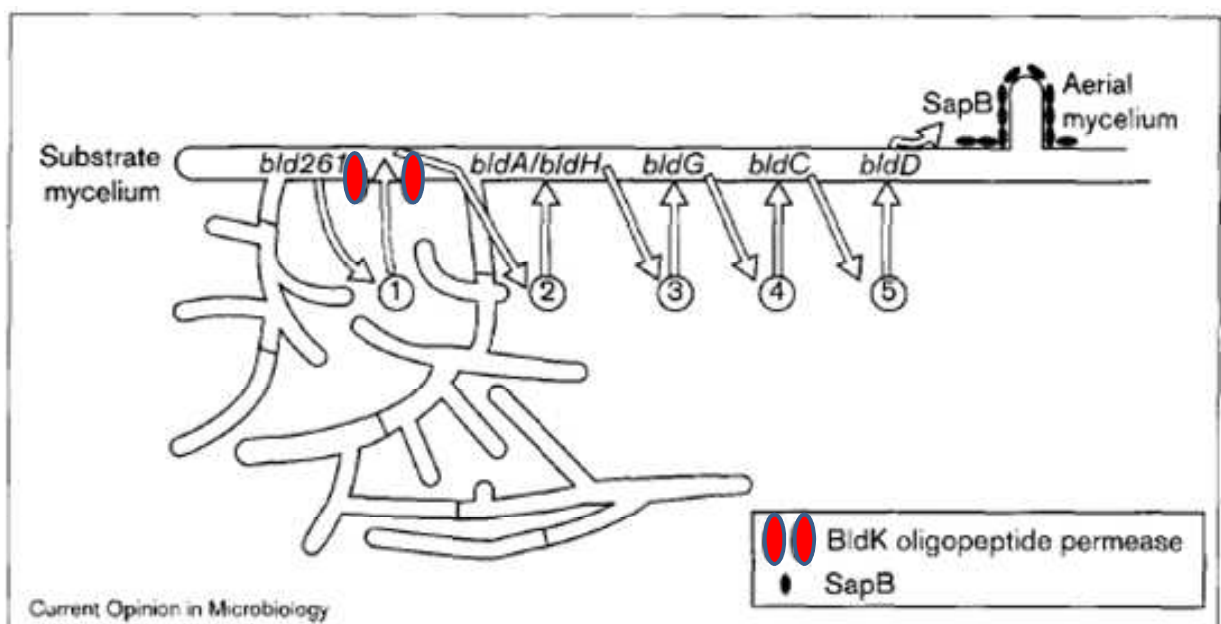
de superficie que disminuyen la tensión superficial del agua provocando que la hifa sea capaz de crecer hacia el aire. Además la cascada *bld* al parecer ayuda a la hifa para que lleve a cabo su desarrollo completo (Kelemen et al., 1998. Willey et al., 2006).

Un aspecto relevante de la diferenciación morfológica en los estreptomicetos es la comunicación intercelular. Se ha observado que la formación de micelio aéreo por mutantes *bld* puede restablecerse por crecimiento de la mutante cerca de una cepa silvestre de *S. coelicolor* o en el caso específico de mutantes *bld*, creciendo cerca de otros mutantes *bld* (Willey et al., 1993). Este fenómeno es llamado complementación extracelular. Se piensa que la complementación extracelular de mutantes *bld* cuando son inoculadas cerca de una cepa silvestre de *S. coelicolor*, es resultado en parte, de la difusión de una pequeña proteína hidrofóbica llamada SapB desde la cepa silvestre hacia la mutante *bld*; ya que con excepción de las mutantes *bldM* y *bldN*, todas las mutantes *bld* son incapaces de producir y secretar dicha molécula biosurfactante (Willey et al., 1991). Se cree que el fenómeno de complementación extracelular "*bld-bld*" constituye una cascada de señalización jerárquica, donde cada señal dentro de esta cascada, induciría la producción de la siguiente, para finalmente culminar con la síntesis de SapB (Figura 4). Esta complementación extracelular es siempre unidireccional con un mutante *bld* actuando como "donadora y la otra como "receptora". Se sabe, a partir de experimentos de complementación extracelular, que dicha complementación entre mutantes *bld* se lleva a cabo de manera jerárquica; por lo que se ha establecido dicha jerarquía en el orden que se muestra a continuación, en el que cada mutante es capaz de restablecer el defecto en el desarrollo de todas las mutantes a su izquierda, pero no a su derecha.

$$[bld261] < [bldK] < [bldA, bldH] < [bldG] < [bldC] < [bldD]$$

Con base en este modelo, cada señal genera la siguiente señal, causando eventualmente la producción de SapB dependiente de *bldD*, y probablemente de otros morfógenos que provoquen el crecimiento de la hifa aérea (Figura 4).

Se asume que la cascada *bld* posibilita a la bacteria para integrar factores como el balance de energía y la densidad de la hifa con factores medioambientales como la disponibilidad de nutrientes y estrés (Pope et al., 1996. Kelemen et al., 1998. Chater et al., 2003). Esto está apoyado por que se ha encontrado que las mutaciones en varios genes resultan en un fenotipo *bld*, incluyendo genes que codifican para proteínas regulatorias, genes involucrados en el metabolismo primario y factores sigma que responden al estrés (Tabla 1). De esta forma, la cascada *bld* puede ser considerada como una ruta central a través de la cual las señales tanto medioambientales como extracelulares ejercen su influencia (Claessen et al., 2006).



**Figura 4.** Modelo de la cascada *bld* en *S. coelicolor*. Representación del inicio de la formación del micelio aéreo (aerial mycelium) a partir del micelio vegetativo (substrate mycelium) en medio sólido. La señal 1 es producida de manera dependiente del péptido morfógeno Bld261, el cual se acumula extracelularmente. Dicha señal es nuevamente internalizada por la oligopéptido permeasa BldK, lo cual provoca la síntesis y liberación de la señal 2, y así sucesivamente, lo cual finalmente culmina con la producción del biosurfactante SapB, cuya producción depende de *bldD*, para comenzar a producir el micelio aéreo (Kelemen and Buttner, 1998).

<b>Tabla 1. Genes que al ser mutados en <i>S. coelicolor</i> resultan en un fenotipo <i>bld</i> (Claessen <i>et al.</i>, 2006).</b>	
<b><i>bldA</i></b>	Leucil-RNA <sup>t</sup> para el codón UUA
<b><i>bldB</i></b>	Proteína de unión a DNA que contiene un motivo hélice-vuelta-hélice que probablemente forma un homodímero
<b><i>bldC</i></b>	Posible activador transcripcional de la familia MerR
<b><i>bldD</i></b>	Pequeña proteína de unión a DNA que se une al promotor de <i>whiG</i> , <i>bldN</i> y <i>sigH</i>
<b><i>bldG</i></b>	Posible factor anti-anti-sigma
<b><i>bldH</i></b>	Homólogo a AdpA conteniendo el codón TTA
<b><i>bldI</i></b>	Función desconocida
<b><i>bldJ</i></b>	Función desconocida
<b><i>bldK</i></b>	Oligopéptido permeasa encargada de la importación de un péptido de señalización de 655 Da (Bld261) codificado indirectamente por el gen <i>bldJ</i>
<b><i>bldL</i></b>	Función desconocida
<b><i>bldM</i></b>	Regulador de respuesta; probablemente activo en estados tempranos y tardíos del desarrollo
<b><i>bldN</i></b>	Factor sigma de función extracitoplasmática; reconoce la región promotora de <i>bldM</i> ; probablemente activo en estados tempranos y tardíos del desarrollo

El locus *bldK* ha sido identificado como un grupo de genes contiguos (*bldKA*, *-B*, *-C*, *-D* y *-E*) que conforman una oligopéptido permeasa que actúa como el primer receptor de una señal extracelular de naturaleza oligopeptídica (Nodwell *et al.*, 1996. Nodwell *et al.*, 1998), además se sabe que el complejo BldK está involucrado en el control de la formación de micelio aéreo (Shin *et al.*, 2007). La cascada de señalización que desencadena el desarrollo morfológico en *Streptomyces coelicolor* comienza con la importación del oligopéptido Bld261, que a su vez es captado por la lipoproteína BldKB, para que éste sea nuevamente reinternalizado por la permeasa BldK, continuando así con la cascada de señalización. Las cepas de *S. coelicolor* mutadas en el gen *bldK* no son deficientes en represión catabólica por carbono y su fenotipo

morfológico es parcialmente suprimido cuando es cultivada en medio mínimo conteniendo manitol como única fuente de carbono (Nodwell *et al.*, 1996).

### **La utilización preferencial de las fuentes de carbono disponibles: Represión Catabólica por Carbono**

La mayoría de las bacterias pueden usar selectivamente los substratos de una mezcla de fuentes de carbono. La presencia de fuentes de carbono preferenciales previene la expresión, y frecuentemente, la actividad de sistemas catabólicos que permiten el uso de fuentes de carbono secundarias. Este tipo de regulación es llamada represión catabólica por carbono (RCC), y se puede llevar a cabo por distintos mecanismos regulatorios, como la activación de la transcripción; así como la represión y control de la traducción por alguna proteína de unión a RNA en diferentes bacterias. Las fuentes de carbono pueden ser cometabolizadas o la bacteria puede usar preferencialmente la más accesible y cuyo consumo genere un crecimiento más rápido. En muchos organismos la glucosa es la fuente de carbono preferencial y frecuentemente previene el uso de otras fuentes de carbono secundarias. Esta preferencia por glucosa sobre otras fuentes de carbono es llamada represión catabólica por glucosa (RCG), o en forma más general, RCC. En la actualidad la RCC se define como un fenómeno regulatorio por medio del cual la expresión o funciones para el uso de fuentes de carbono secundarias y las actividades de las enzimas correspondientes son limitadas en presencia de una fuente de carbono preferencial, como la glucosa. La RCC es un mecanismo de competencia importante en el medio ambiente natural, debido a que la selección de fuentes de carbono preferenciales es determinante en el grado de crecimiento y por lo tanto, del éxito en la competencia con otros microorganismos (Görke and Stülke, 2008).

La RCC se ha identificado en la mayoría de las bacterias heterotróficas de vida libre, incluyendo bacterias autotróficas facultativas, las cuales reprimen los genes para la fijación de dióxido de carbono en presencia de fuentes de carbono orgánicas (Bowien and Kusian, 2002). Además es uno de los fenómenos regulatorios más importantes en muchas bacterias:

aproximadamente del 5 -10% de todos los genes de una bacteria están sujetos a RCC (Liu *et al.*, 2005).

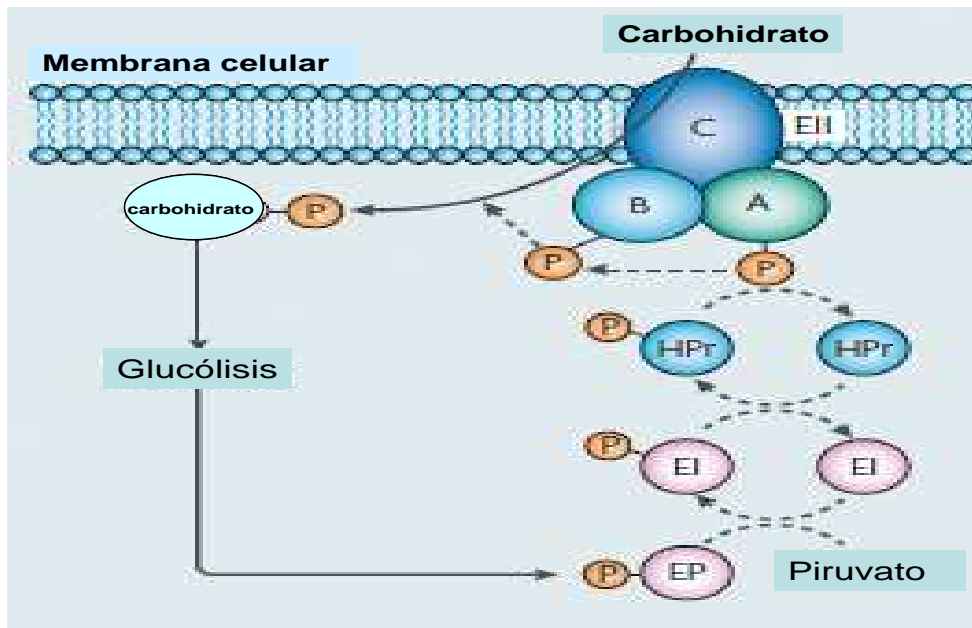
RCC ha sido estudiada intensamente en *E. coli* y *B. subtilis*, en ambos, la RCC implica un mecanismo global y varios mecanismos regulatorios operón-específicos, tales como exclusión del inductor y prevención de la inducción. En ambos microorganismos los mecanismos globales de regulación son similares: los genes que son capaces de usar fuentes de carbono secundarias no se expresan cuando la glucosa, u otra fuente de carbono preferencial, están disponibles, pero el mecanismo molecular por el cual dicha regulación global se lleva a cabo es completamente diferente en ambos microorganismos. En *E. coli* la RCC es mediada por la prevención de la activación transcripcional de genes catabólicos en presencia de glucosa y en *B. subtilis* por regulación negativa a través de una proteína represora en presencia de glucosa (Görke and Stülke, 2008). Aunque los mecanismos difieren en ambos organismos, el sistema de fosfotransferasa de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) es importante en ambos microorganismos en la transducción de señales que producen RCC (Cases *et al.*, 2007).

### **Transportando carbohidratos: El sistema PTS**

El PTS (sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol-piruvato) es un sistema multiprotéico de transferencia de grupos fosforilo que está acoplado al transporte de carbohidratos a través de la membrana citoplasmática con la concomitante fosforilación del carbohidrato transportado (Postma *et al.*, 1993). Este tipo de transporte existe exclusivamente en bacterias. El PTS está compuesto de al menos tres proteínas distintas que pueden estar fusionadas o codificadas separadamente: la enzima I (EI), la proteína rica en histidinas (HPr) y la enzima II (EII). La proteína EI comienza la cascada de fosforilación, autofosforilándose a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), y el grupo fosforilo es transferido subsecuentemente al residuo His15 (residuo de histidina en posición 15) en HPr, el cual dona el grupo fosforilo a un residuo de histidina en el dominio A (EIIA) de las proteínas transportadoras EII. Finalmente, el grupo fosforilo es transferido a un residuo en el dominio EIIB y de éste al carbohidrato durante su incorporación a través del dominio de



membrana C (EII<sub>C</sub>) (Figura 5). Mientras que el dominio EIIA del transportador de glucosa (EIIA<sup>Glc</sup>) desencadena RCC en enterobacterias, HPr lleva a cabo esta función en *Firmicutes* (Görke and Stülke, 2008). A continuación se muestra un esquema general del mecanismo PTS.

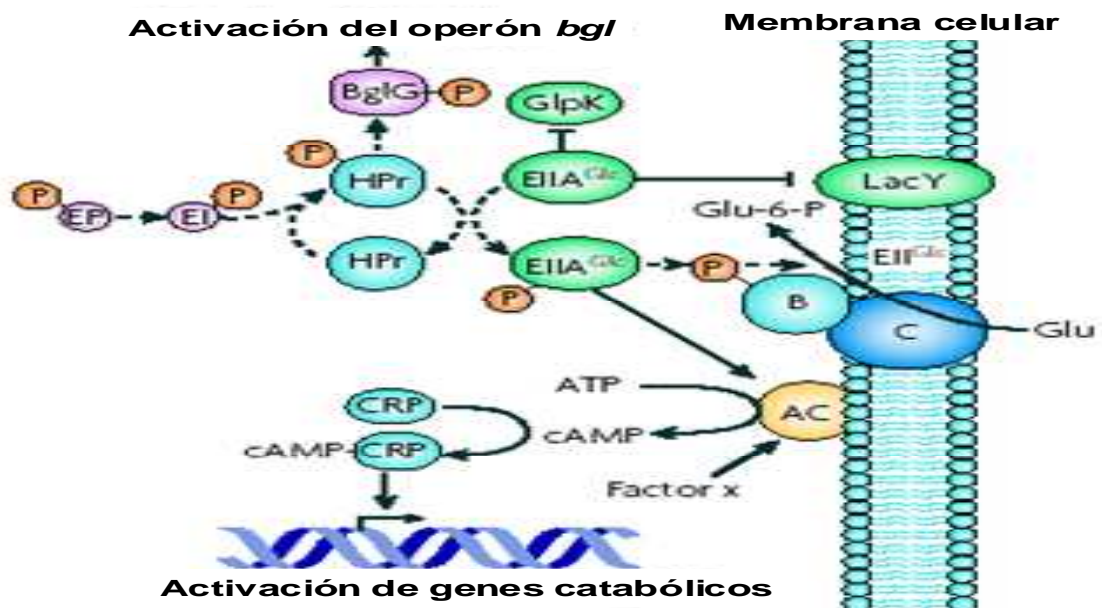


**Figura 5.** Esquema general del sistema PTS bacteriano. El sistema PTS consiste en una cascada de fosforilación de distintas proteínas para poder internalizar una fuente de carbono en su forma fosforilada, para ser finalmente metabolizada. Tomado de Görke and Stülke, 2008.

Todas las reacciones de transferencia del grupo fosforilo entre las proteínas PTS son reversibles. Por lo tanto, los estados de fosforilación de todas las proteínas PTS que están presentes a cierto tiempo están determinadas por dos factores: la actividad del transporte PTS y la relación PEP–piruvato, que refleja el flujo a través de la glucólisis. Esta modulación dinámica de los estados de fosforilación de las proteínas PTS en respuesta a las condiciones nutricionales y al estado metabólico de la célula proveen las bases para la regulación y señalización mediada por el sistema PTS (Görke and Stülke, 2008).

## **¿Cómo se lleva a cabo la RCC en *Escherichia coli*?. El caso de una bacteria Gram negativa.**

Los principales proteínas participantes en la RCC en *E. coli* son el activador de la transcripción CRP (proteína receptora de AMP cíclico (AMPc)); también llamada proteína activadora de genes catabólicos (CAP), el metabolito señal AMPc, la adenilato ciclasa (AC) y el componente IIA específico de glucosa del sistema PTS (EIIA<sup>Glc</sup>; también llamado factor de resistencia a represión catabólica (Crr) o EII<sup>Crr</sup>). Cuando EIIA<sup>Glc</sup> se encuentra fosforilada, se une y activa AC, lo cual provoca la síntesis de AMPc. Un factor desconocido (factor X) también se requiere para la activación de AC. Las altas concentraciones de AMPc conllevan a la formación del complejo AMPc- CRP el cual se une y activa los promotores de genes catabólicos. En su estado no fosforilado EIIA<sup>Glc</sup> es incapaz de activar AC; en este caso EIIA<sup>Glc</sup> se une e inactiva enzimas metabólicas y transportadores de fuentes de carbono secundarias, tales como GlpK (glicerol cinasa), LacY (galactósido permeasa) y otras proteínas. Este mecanismo es denominado exclusión del inductor; ya que previene la incorporación intracelular del inductor del respectivo sistema catabólico. El estado de fosforilación de EIIA<sup>Glc</sup> está determinado por la actividad del transporte del sistema PTS (la presencia de algún azúcar transportado por el sistema PTS provoca la defosforilación de EIIA<sup>Glc</sup>) y la relación intracelular entre fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato la cual disminuye cuando existe un alto flujo durante la glucólisis. La enzima Hpr en su estado fosforilado es capaz de activar a la proteína BglG, un antiterminador transcripcional de la familia BglG (Bettenbrock *et al.*, 2007).

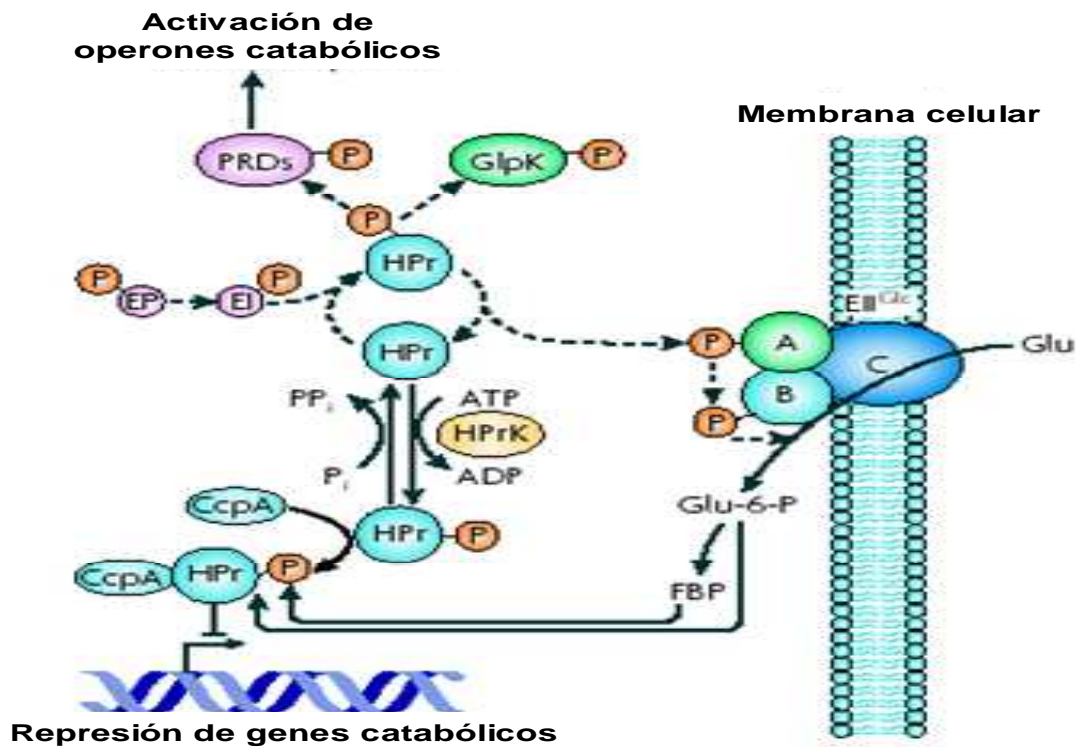


**Figura 6.** Sistema PTS en la bacteria Gram negativa *E. coli*. Las flechas discontinuas indican transferencia de grupos fosfato. Tomado de Görke and Stülke, 2008

### ***Bacillus subtilis*: un ejemplo de Represión Catabólica por Carbono en Gram-positivos con bajo contenido en G-C**

En *B. subtilis* las proteínas que juegan un papel clave en la RCC son el factor de transcripción pleiotrópico CcpA (proteína A de control catabólico), la proteína HPr del sistema PTS, la HPr cinasa/fosforilasa (HPrK) y los intermediarios glucolíticos fructosa 1,6-bifosfato (FBP) y glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) (Warner and Lolkema, 2003). La HPr puede ser fosforilada en Ser46 (residuo Serina en posición 46) por la HPrK; esta fosforilación ocurre cuando la concentración intracelular de FBP y ATP son altas, lo cual refleja la presencia de fuentes de carbono preferenciales. HPr(Ser-P) (HPr fosforilada en serina) se une a la proteína CcpA y esta interacción es estimulada por intermediarios glucolíticos, tales como FBP y Glu-6-P. El complejo CcpA y HPr(Ser-P) se une a sitios *cre* (elementos de respuesta a catabolito) en el DNA, reprimiendo finalmente la transcripción de genes catabólicos. HPrK es también responsable de la defosforilación de HPr(Ser-P) en concentraciones altas de fosfato inorgánico (Pi) y bajas concentraciones de ATP, y cuando la concentración de FBP refleja poco suplemento nutricional a la célula. Además HPr(His-P)

también contribuye a la RCC; ya que en ausencia de glucosa, HPr(His-P) fosforila la glicerol cinasa (GlpK) y reguladores transcripcionales que contienen dominios regulatorios PTS (PRDs), lo cual es un prerequisite para su actividad. Así, en presencia de glucosa, se previene la activación de reguladores PRD por sus inductores. Este mecanismo ha sido llamado prevención de la inducción (Figura 7) (Görke and Stülke, 2008).



**Figura 7.** Sistema PTS en la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Las flechas discontinuas indican transferencia de grupos fosfato. Tomado de Görke and Stülke, 2008.

### ***Streptomyces* y su mecanismo de Represión Catabólica por Carbono**

En el género *Streptomyces*, la utilización preferencial de fuentes de carbono fácilmente metabolizables y la síntesis de metabolitos secundarios son regulados por un fenómeno denominado regulación catabólica por carbono (RCC) (Angell *et al.*, 1992; Brückner and Titgemeyer, 2002; Hodgson, 2000; Titgemeyer and Hillen, 2002). Aunque el fenómeno de RCC ha sido estudiado en actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces*, en *Bifidobacterium longum* y *Corynebacterium glutamicum*; hasta el momento no se han descubierto mecanismos comunes de RCC en este grupo de bacterias. En *S.*

*coelicolor*, la RCC de genes que están involucrados en la utilización de fuentes de carbono secundarias parece ser independiente del sistema PTS (van Wezel *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha reportado que el sistema PTS es responsable de RCC en muchas bacterias (Brückner and Titgemeyer, 2002). En *S. coelicolor* se han identificado dos enzimas del sistema PTS, la enzima I (EI) y HPr, y la permeasa específica de fructosa (Enzima EII), las cuales son requeridas para la incorporación de fructosa y para ejercer represión. También han sido identificados los genes PTS para el transporte y concomitante fosforilación de N-acetilglucosamina; *ptsI* (EI), *ptsH* (HPr), *crr* (IIACrr), *malX2* (IIBGlcNac), *nagE2* (IICGlcNaAc) (Nothaft *et al.*, 2003; Titgemeyer *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2002), los cuales también se sugiere que están involucrados en RCC (Butler *et al.*, 1999; Nothaft *et al.*, 2003; Parche *et al.*, 1999; Titgemeyer *et al.*, 1995). Sin embargo, la delección del gen *ptsH* que codifica para HPr no tiene efecto en la represión por glucosa de agarasa, galactocinasa y glicerol cinasa, lo cual sugiere que el sistema PTS no juega un papel directo en RCC (Butler *et al.*, 1999; Parche *et al.*, 1999).

Se ha descubierto que la glucosa cinasa (Glk) juega un papel central en la RCC en *S. coelicolor* (Hodgson, 1982). Existen reportes de mutantes de *S. coelicolor* resistentes al análogo no metabolizable de glucosa, la 2-desoxiglucosa (DOG) y parecen ser generalmente deficientes en represión por glucosa. La pérdida de represión por glucosa en tales mutantes está correlacionada con la ausencia de actividad de Glk dependiente de ATP (Seno and Chater, 1983). Angell *et al.* (1992) demostraron que la complementación de mutantes resistentes al análogo de glucosa no metabolizable (DOG) con el gen de glucosa cinasa (*glkA*) restablece no solo la actividad de GlkA; sino también la sensibilidad a DOG y la represión por glucosa. Interesantemente, cuando estas mutantes fueron complementadas con el gen de *glk* de la bacteria Gram negativa *Zymomonas mobilis*, se restableció la actividad de Glk, la utilización de glucosa, pero no la represión ejercida por este carbohidrato (Angell *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren una actividad regulatoria, diferente de la actividad catalítica de esta enzima, necesaria para llevar a cabo RCC en este microorganismo. Debido a que Glk no está involucrada en el metabolismo de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, se concluyó en base a este experimento que el estado bioquímico de la glucosa cinasa, más

que el flujo a través de la glucosa cinasa, es importante para ejercer la RCC (Kwakman and Postma, 1994). El papel regulatorio para la glucosa cinasa en la represión por glucosa en *S. coelicolor* A3(2) fue confirmado por Kwakman and Postma (1994). Adicionalmente, se demostró que la sobreexpresión del gen de *glkA* provoca la pérdida de represión por glucosa. Interesantemente, Glk no contiene sitios de unión a DNA predecibles por lo que es inviable que regule directamente la transcripción. Sin embargo, se ha propuesto que GlkA transmita eventualmente la señal de RCC vía la interacción con factores de transcripción (Angell *et al.*, 1992; Mahr and Titgemeyer, 2001); los cuales pueden incluir reguladores específicos como MalR y GylR, represores de los operones de maltosa y glicerol, respectivamente, o reguladores pleiotrópicos como CcrA y BldB. (Pope *et al.*, 1996; van Wezel *et al.*, 1997).

Así, la glucosa cinasa pertenece al grupo de enzimas bifuncionales que ejerce funciones en la regulación genética aparte de su actividad catalítica (Commichau and Stülke, 2008). Se ha sugerido que la Glk activada por algún metabolito interactúa directamente con reguladores operón-específicos, provocando RCC de los operones catabólicos respectivos (Görke and Stülke, 2008). Existen evidencias que la Glk está asociada a membrana cuando las células son cultivadas en presencia de glucosa o cuando se sobreproduce la glucosa permeasa (GlcP). La asociación con membrana se correlaciona con alta actividad de Glk y la presencia de dos isoformas de Glk. Se ha supuesto que las modificaciones postraduccionales serían decisivas para que la Glk funcione como enzima (interacción con GlcP) o como una proteína reguladora (interacción con factores de transcripción) (van Wezel *et al.*, 2007). Es importante entender las interrelaciones entre metabolismo primario y secundario y establecer las vías regulatorias para la comprensión de la regulación del catabolismo de la fuente de carbono (Delic *et al.*, 1992; Khetan *et al.*, 1999).

### **El transporte de glucosa en *Streptomyces***

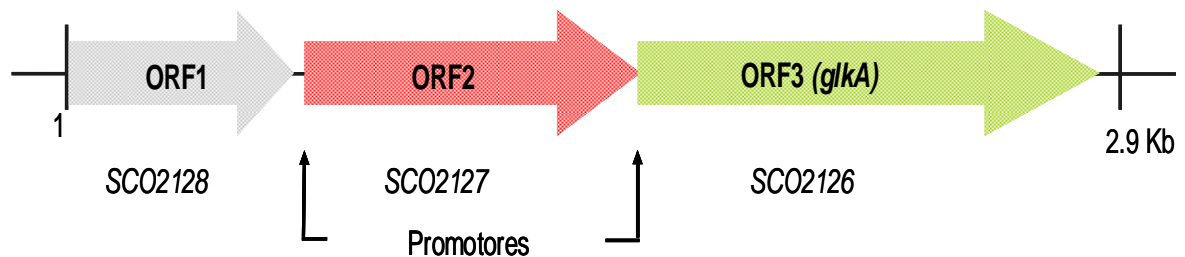
Fundamentalmente, el transporte y la RCC están íntimamente relacionados. La correlación entre el transporte de glucosa y la RCC ha sido abordada recientemente y se encontró que la incorporación de glucosa está

disminuida en mutantes *glkA* (Ramos *et al.*, 2004. van Wezel *et al.*, 2007). La naturaleza molecular de los sistemas de incorporación de glucosa fueron descritos recientemente por van Wezel *et al.*, (2005). La incorporación de glucosa en *S. coelicolor* está mediada por simportadores GlcP H<sup>+</sup> (van Wezel *et al.*, 2007). La permeasa de glucosa simportadora de protones (GlcP) es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) que contienen simportadores/H<sup>+</sup> y proteínas facilitadoras (Pao *et al.*, 1998). El gen de la permeasa de glucosa se encuentra repetido dos veces en el genoma de *S. coelicolor* y son denominados *glcP1* y *glcP2*. Para determinar las características genéticas de GlcP1, se midió la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa empleando la expresión heteróloga de *glcP1* en una cepa de *E. coli* mutada en el transporte de glucosa. Se obtuvo un valor de  $K_m$  de  $41 \pm 5 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $23 \pm 1 \text{ nmol min.}^{-1}$  indicando que la GlcP es un transportador de glucosa de alta afinidad. El análisis transcripcional demostró que la expresión de *glcP1* es esencial para la incorporación de glucosa, mientras que *glcP2* se expresa en forma variable. Se ha sugerido que GlcP2 puede expresarse bajo diferentes condiciones de crecimiento. GlcP además se encuentra en *Streptomyces lividans* (van Wezel *et al.*, 2005) y *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003). Cuando se dilucidó el genoma de este último, fue sorprendente que esta especie tiene sólo un gen *glcP*. La incorporación de glucosa por permeasas impulsadas por ATP o por mecanismos de difusión facilitada al parecer son poco comunes en bacterias y han sido encontrados solamente en *Thermus thermophilus* y *Zymomonas mobilis*, respectivamente.

### **Existe un gen en *S. coelicolor* denominado *sco2127***

Mutantes de *S. coelicolor* aisladas por su capacidad de crecer en glicerol o lactosa en presencia del análogo no metabolizable de glucosa 2-desoxiglucosa (DOG), son insensibles a RCC; así como a la utilización de otras fuentes de carbono (Hodgson, 1982). La insensibilidad de estas mutantes (Dog<sup>R</sup>) a RCC al parecer se debe tanto a una falla para utilizar DOG y una disminución de la actividad de glucosa cinasa (Hodgson, 1982; Angell *et al.*, 1994), lo cual impide la producción de catabolitos de glucosa (Ramos *et al.*, 2004). El fenotipo Dog<sup>R</sup> se restablece al nivel de la cepa original (silvestre) si se

transforma la mutante con un fragmento de DNA de *S. coelicolor* digerido con la enzima de restricción *BclI* (T↓GATCA) de 2.9 kb, el cual contiene dos marcos de lectura abiertos y completos, los cuales codifican para la enzima glucosa cinasa (*glk*), codificada en el gen *sco2126*; y el gen *sco2127*, que codificaría para una proteína hipotética de 20.1 kDa (Figura 8) (Ikeda *et al.*, 1984). Un derivado del fago temperado ΦC31 conteniendo sólo el gen de *glkA*, es capaz de restablecer parcialmente el fenotipo silvestre cuando se utiliza para lisogenizar a una mutante de *S. coelicolor* sin el gen de *glk* y con el fenotipo Dog<sup>R</sup>. La restauración completa del fenotipo sólo se consigue cuando se emplea un fago temperado ΦC31KC896 conteniendo los genes *glk* y *sco2127* (Angell *et al.*, 1992).



**Figura 8.** Fragmento de 2.9 kb obtenido a partir de la digestión del cósmido SC6E10 de *S. coelicolor* empleando la enzima *BclI*. El fragmento contiene un marco de lectura (ORF) incompleto (SCO2128) y dos marcos de lectura abiertos completos, los cuales codifican para la enzima Glk (*glkA*), codificada en el gen *sco2126*; y el gen *sco2127* (576 bp) y que codificaría para una proteína hipotética de 191 aminoácidos con un peso molecular de 20.1 kDa. Tanto *sco2127* como *glkA* poseen sus propias secuencias promotoras; aunque no se han detectado secuencias de paro entre *sco2127* y *sco2126*, por lo que es probable que *glkA* pueda contrascriptarse a partir de la transcripción de *sco2127*.

Estudios reportados por Guzmán *et al.* (2005a, 2005b) sugieren que el producto de expresión SCO2127 es capaz de estimular el transporte de glucosa y la actividad de glucosa cinasa en mutantes de *S. peuceetius var. caesius* (Dog<sup>R</sup>), lo cual sugiere que dicho producto de expresión posee una actividad en trans. *sco2127* no codifica para secuencias de unión a DNA (Angell y col., 1992) y es probable que el efecto sea el resultado de interacción proteína–proteína. Con base a las evidencias reportadas podemos decir que la



región *sco2127* parece corresponder a un elemento regulatorio, pues sin codificar para la Glk ni para la permeasa de glucosa (GlcP), es capaz de restaurar ambas actividades en cepas con deficiencias en las mismas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la proteína codificada en la región *sco2127* de *Streptomyces coelicolor* *per se* es capaz de restaurar pleiotrópicamente la sensibilidad a RCC, la actividad de la enzima Glk y el transporte de glucosa en cepas mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes al efecto de 2-desoxiglucosa (Dog<sup>R</sup>). Estudios *in silico* han demostrado que el producto protéico no posee motivos de unión a DNA, por lo que su posible mecanismo de acción deba involucrar la unión a otras proteínas. Con la finalidad de conocer más a fondo el mecanismo de acción del producto de expresión SCO2127, el gen *sco2127* fue aislado y clonado; y su producto de expresión, expresado y purificado, para poder conocer su cinética de expresión y su posible interacción con otras proteínas.

## HIPOTESIS

La región *sco2127* codifica para una proteína capaz de activar transportadores de glucosa y a la enzima glucosa cinasa de *S. coelicolor*, con el fin de ajustar la concentración de las señales metabólicas responsables de informar a la célula de la situación nutricional extracelular existente.

## OBJETIVOS

Establecer la naturaleza del producto de expresión del gen *sco2127*; así como determinar su forma de acción en el proceso de represión catabólica por glucosa en *Streptomyces coelicolor*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Aislar, amplificar, clonar y transformar el gen *sco2127* de *S. coelicolor*
- ✓ Expresar y purificar la proteína SCO2127 de *S. coelicolor*.
- ✓ Elaborar anticuerpos policlonales anti-SCO2127 en modelo de conejo.
- ✓ Monitorear la cinética de expresión de SCO2127 empleando anticuerpos policlonales anti-SCO2127.
- ✓ Llevar a cabo ensayos de unión proteína-proteína entre SCO2127 y proteínas presentes en extractos crudos de *S. coelicolor*.
- ✓ Determinar la identidad de las proteínas capaces de interactuar con SCO2127.
- ✓ Con base a los resultados obtenidos, proponer el posible mecanismo de acción de la proteína SCO2127 en *S. coelicolor*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

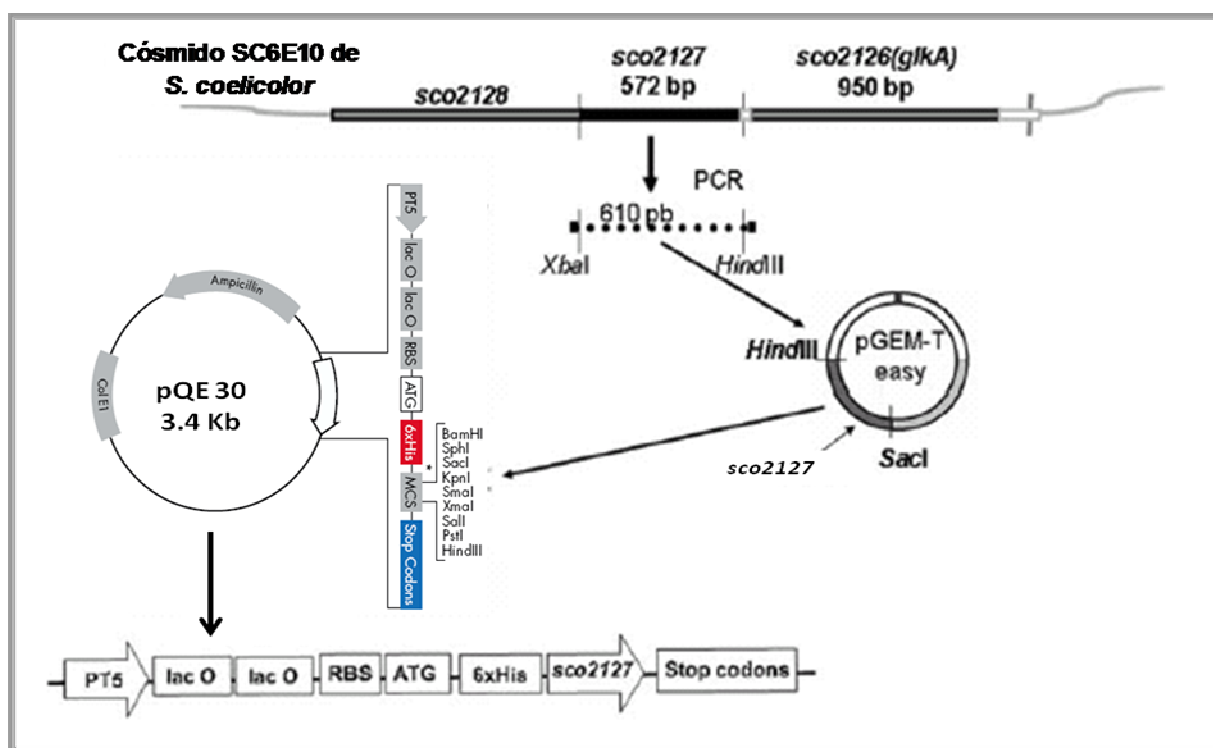
### Los microorganismos y cómo se cultivaron

Se empleó *S. coelicolor* A3(2) M145 (SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>, protótrofo) (Donado por el Dr. Luis Servín) y la cepa mutante de *S. coelicolor* ( $\Delta$ sco2127) (Elaborada por la Ing. Angela Forero). Los cultivos iniciales se inocularon con 10<sup>6</sup> esporas (mantenidas en 20% de glicerol) en matraces de 250 mL con 50 mL de medio YMG g/L (extracto de levadura, 4.0; extracto de malta, 10; glucosa 50 mM, 9.0; o glucosa 100 mM, 18.0) Los cultivos fueron incubados durante 48 h a 29°C con agitación (180 rpm). Las células fueron colectadas por centrifugación (10400xg durante 10 min), lavadas dos veces y resuspendidas en 5 mL de solución salina. Para estudiar la síntesis de SCO2127, matraces de 250-mL con 50 mL de YMG a concentraciones altas (100 mM) y bajas (50 mM) de glucosa fueron inoculados con 1 mL de las células de cultivo inicial y cultivados bajo las condiciones antes mencionadas. Las células fueron colectadas por centrifugación (10400xg durante 10 min) a diferentes tiempos de fermentación y lisadas por sonicación (ocho pulsos durante 30 s con una amplitud de 60 W, dejando un min entre cada pulso), centrifugadas a 5900 x g durante 10 min y los sobrenadantes fueron usados para ser analizados mediante western blot. *E. coli* M-15 ( la cual contiene el plásmido pREP4 que codifica para el represor *lac* y actúa en trans para asegurar la expresión controlada de la proteína en cuestión) (QIAexpress-Qiagen). Las bacterias fueron cultivadas en caldo LB suplementado con ampicilina y kanamicina (100 y 25 µg/mL, respectivamente) a 37°C y 200 rpm. *E. coli* DH5α (la cual contiene el cósmido SC6E10) fue crecida también en caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL).

### La expresión y purificación de SCO2127 con tallo de Histidinas (SCO2127-His<sub>6</sub>)

El gen *sco2127* fue amplificado por PCR y se empleó como templado el cósmido SC6E10 de *S. coelicolor* (Donado por el Dr. Luis Servín). Los oligonucleótidos fueron diseñados basados en la secuencia genética reportada de *sco2127* (Angell *et al.*, 1992), la cual abarca tanto la secuencia de inicio y término de la transcripción. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de *sco2127* fueron: (5´ - AGGAGTCCGTCTAGAGCGAAG), rev (5´ - GGCAAGCTTACCCGAGGC). Los sitios de restricción para *Xba*I y *Hind*III se incluyeron en los fragmentos amplificados, respectivamente y se encuentran subrayados.

Las condiciones de PCR para la amplificación de *sco2127* fueron descritas previamente por Guzmán *et al.* (2005a). El producto de PCR de 694 pb fue clonado en el plásmido para productos de PCR, pGEM-T Easy (Promega) y la secuencia del gen *sco2127* fue verificada (Laragen Inc.). Para llevar a cabo la sobreexpresión de *sco2127*, el fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *SacI-HindIII* y posteriormente subclonado en el plásmido de expresión pQE30 (Qiagen) (SCO2127-His<sub>6</sub>) (Figura 9) y usado para transformar por electroporación la cepa de *E. coli* M-15, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas fueron cultivadas en agar LB suplementado con ampicilina y kanamicina (100 y 25 µg/mL, respectivamente) y cultivadas a 37°C durante 18 h.



**Figura 9.** Diagrama que muestra el procedimiento que se llevó a cabo para la amplificación y clonación de *sco2127* en el plásmido de sobreexpresión pQE30. PT5: promotor T5; lac O: operador lac; RBS: sitio de unión a ribosoma; ATG: codón de inicio; His<sub>6</sub>: secuencia de seis histidinas en tándem; MCS: sitio de clonación múltiple; Col E1: origen de replicación *colE1* (tomado de Chávez *et al.* 2009).

Se seleccionó una de las colonias resistente a ambos antibióticos y se cultivó en caldo LB (10 mL) con la misma concentración de antibióticos y en las condiciones antes mencionadas en agitación rotatoria (160 rpm). Después de 18 h de incubación, el cultivo

fue transferido a un matraz Fernbach con 500 mL de caldo LB y se incubó de 2-5 h en las mismas condiciones, hasta que las células alcanzaran una densidad óptica (DO) de 0.5 – 0.8 a 600 nm. En ese momento se adicionó al medio de cultivo IPTG (isopropil-tiogalactósido) a una concentración final de 0.4 mM y se incubó a las células durante una hora más, bajo las mismas condiciones.

Se cosecharon alícuotas (50 mL) de células inducidas y se centrifugaron a 4060xg durante 5 min y la biomasa se recolectó y resuspendió en 300 µl de solución de lisis [5 µl de cocktail de inhibidor de proteasas (Sigma) y 995 µl de amortiguador de lisis (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 M de NaCl; 50 mM de imidazol y 20 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol)]. La suspensión celular fue lisada por sonicación en hielo (3 pulsos de 60W durante 10 s cada uno, dejando un periodo de tiempo de un min entre cada pulso), posteriormente se centrifugó el sonificado en frío a 5900xg durante 10 min. Se recolectó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µl de la misma solución de lisis y se sonicó de nuevo, sólo que ahora se emplearon 3 pulsos de 20 s y fue centrifugado bajo las mismas condiciones. Se mezclaron ambos sobrenadantes y se les adicionó 0.5 mL de Triton X-100 (sigma) al 20% v/v y se ajustó a una concentración final de Triton X-100 al 1% v/v, dejándose agitar suavemente durante 30 min y posteriormente se centrifugó en frío a 4500xg durante 15 min. Enseguida se colectó el sobrenadante (750 µl) y se vaciaron a un micro tubo de 1.5-mL conteniendo 250 µl de sefarosa niquelada (GE Health care Bio-sciences AB; catálogo no. 17-5268-01), se incubó durante 8 min. a temperatura ambiente con agitación suave y se centrifugó a 500xg durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante, conteniendo las proteínas no adsorbidas y se almacenó a 4°C antes de ser analizado por SDS-PAGE. La sefarosa niquelada se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de lavado (20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 M de NaCl; 50 mM de imidazol), se agitó durante 5 min y se centrifugó a 500xg durante 3 min. Este procedimiento se repitió nueve veces más. Finalmente, la sefarosa fue tratada con dos volúmenes (1.0 mL cada uno) de amortiguador de elución (20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 M NaCl; 300 mM imidazol), agitada suavemente durante 5 min y centrifugada a 500xg durante 3 min y se recuperó el sobrenadante que contenía SCO2127-His<sub>6</sub> purificado. El procedimiento de elución se repitió al menos cuatro veces más. El sobrenadante (5 mL) se almacenó a 4°C antes de ser analizado mediante SDS-PAGE y se empleó como antígeno para la producción de anticuerpos anti-SCO2127.

## **Producción de anticuerpos policlonales anti-SCO2127**

Los anticuerpos policlonales anti-SCO2127-His<sub>6</sub> se produjeron en conejos Nueva Zelanda hembras de aproximadamente 3 meses. Previo a la primera inmunización se obtuvieron 2 mL de sangre por punción en la vena de la oreja y después se inyectaron vía intradérmica (repartido en seis puntos a lo largo del lomo del conejo) 2 mL de una emulsión conteniendo 50 mg de SCO2127 puro, disuelto en solución salina fisiológica (NaCl 0.9% en agua destilada) mezclado con adyuvante completo de Freund (Sigma) en una relación 1:1. Después de 3 y 28 días se reinmunizó con la misma cantidad de proteína mezclada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) (1:1). Después de 35 días se colectaron 5 –10 mL de sangre y se comprobó la avidéz de los anticuerpos anti-SCO2127 mediante western blot. Finalmente se extrajo la máxima cantidad de sangre por punción cardiaca, se obtuvo el suero y éste se almacenó en tubos Eppendorff de 1.5-mL a -20°C, hasta su uso (Hu *et al.*, 2002).

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida**

El procedimiento de electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida se llevó a cabo de acuerdo a los procedimientos estándar descritos en el apéndice (Harper *et al.*, 1996). Se emplearon lisados proteicos conteniendo 15 µg de proteína total por pozo para analizar mediante SDS-PAGE.

## **Western blot**

Después de la electroforesis (SDS-PAGE), las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (Difluoruro de polivinilo/Immobilon P, Millipore), previamente activadas en metanol puro, sumergidas en éste durante 20 s. Se empleó una cámara de transferencia electroforética (Mini Trans-Blot®, Biorad-170-3930). El proceso de transferencia se llevó a cabo a 60 V durante 90 min en amortiguador de transferencia (ver apéndice). Las membranas con las proteínas transferidas se incubaron a temperatura ambiente sumergiéndolas en amortiguador de lavado [0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma) y 3% (w/v) Difco skim milk in PBS]. Para la inmunodetección de SCO2127 en extractos proteicos de *Streptomyces*, se adicionaron los anticuerpos anti-SCO2127 (1:5000) elaborados en conejo y se incubaron con la membrana bajo las mismas condiciones durante una hora. Se

descartó dicha solución y la membrana se lavó tres veces durante un minuto cada una y con el mismo amortiguador, después se incubó nuevamente bajo condiciones similares en amortiguador de lavado con leche descremada (Difco) al 3% (w/v), conteniendo anticuerpos IgG (H+L) caprinos anti-conejo (1:10000) conjugados con HRP (Zymed). La membrana se lavó dos veces más con amortiguador de lavado durante un minuto cada vez y finalmente se desarrolló la reacción de inmunodetección de SCO2127 usando solución de revelado [tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (Sigma), 0.05% (w/v); cloruro de níquel hexahidratado, 0.02% y 0.1% (v/v) de peróxido de hidrógeno al 30%]. La reacción de revelado se detuvo adicionando agua destilada.

Con lo que respecta a la inmunodetección de SCO2127-His<sub>6</sub>, ésta se visualizó también mediante western-blot, pero en este caso se empleó un anticuerpo murino primario anti-His<sub>6</sub> (Roche Molecular Biochemicals) y un anticuerpo caprino secundario (anti-anti-His<sub>6</sub>) conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed) bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente y empleando la correspondiente solución de revelado para fosfatasa alcalina.

### **Cinética de expresión de la proteína SCO2127**

Con el objetivo de establecer el patrón de expresión de SCO2127 en *S. coelicolor* durante su crecimiento en medio YMG suplementado con altas y bajas concentraciones de glucosa (100 y 50 mM; respectivamente), se emplearon extractos proteicos para ser analizados por western blot a diferentes tiempos de fermentación (0, 4, 8, 18, 24, 48, 72, 96 h).

## **ENSAYOS DE UNION PROTEINA-PROTEINA**

### **Prueba de captura (Pull-Down)**

Para identificar interacciones entre SCO2127 y proteínas presentes en extractos proteicos de *S. coelicolor*, la proteína SCO2127-His<sub>6</sub> se utilizó como "bait" (anzuelo). Para llevar a cabo la inmovilización de SCO2127-His<sub>6</sub> se transfirieron 100 µl (20 mg proteína/mL) de dicha proteína a un microtubo de 1.5-mL, el cual contenía 250 µL de sefarosa níquelada y se diluyó a 1 mL con amortiguador de lavado. El tubo fue incubado a



temperatura ambiente durante 10 min con agitación rotatoria suave. Para eliminar las proteínas no adsorbidas a la resina de sefarosa niquelada, el tubo se centrifugó a 500xg durante 3 min, se descartó el sobrenadante y la resina se lavó 3 veces por inversión, empleando 1 mL de amortiguador de lavado cada vez y centrifugando a la misma velocidad.

Por otro lado, los extractos proteicos de *S. coelicolor* se obtuvieron a partir de células crecidas durante 48 h en matraces Fernbach de 2.8-L conteniendo 500 mL de medio YMG. Las células se cosecharon por centrifugación (10400xg) y fueron lavadas con 200 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), resuspendidas en 2 mL de PBS, sonicadas (8 pulsos de 60W durante 30 s en baño de hielo, dejando un minuto de reposo entre cada pulso) y centrifugadas en frío a 12600xg durante 10 min. Los extractos celulares de *S. coelicolor* ["prey" (presa)] fueron transferidos a tubos estériles y almacenados en hielo.

Para determinar la posible interacción entre SCO2127-His<sub>6</sub> (bait) y las proteínas presentes en los lisados de *S. coelicolor* (prey), se colocaron 800 µL de esta última, la cual contenía 500 µg proteína/mL; en un microtubo con 250 µL de sefarosa niquelada con SCO2127-His<sub>6</sub> inmovilizado en ésta, y se incubaron durante 2 h a 4°C en agitación rotatoria suave. El tubo se centrifugó a 500xg durante 3 min y se descartó el sobrenadante, enseguida se lavó la sefarosa niquelada con 1 mL de amortiguador de lavado y se mezcló perfectamente durante 3 min en agitación rotatoria suave. El procedimiento se repitió dos veces más y se descartó el volumen de lavado en cada ocasión. Finalmente, el complejo "bait-prey" se eluyó de la sefarosa niquelada vertiendo directamente 100 µL de amortiguador muestra 4X (empleado en SDS-PAGE) en agua MilliQ en una relación v/v (1:1) y calentando durante 5 min. Enseguida las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y teñidas con colorante de Coomassie G-250 (Biorad).

### **Far-Western (Overlay)**

Con la finalidad de corroborar la interacción proteína-proteína detectada mediante el ensayo de pull-down, se empleó la técnica de Far-western (overlay), para lo cual se corrieron lisados de *S. coelicolor* en SDS-PAGE al 8%, colocando 20 µg de proteína por pozo. Enseguida se transfirieron a una membrana de PVDF, siguiendo los procedimientos estándar. La membrana fue renaturalizada incubándola durante 2 h a temperatura

ambiente en una solución de leche descremada al 3% y Tween 20 al 0.05% en en PBS 1X con agitación rotatoria suave y se lavó tres veces durante 5 min en agitación rotatoria con una solución de Tween 20 al 0.05% en PBS 1X (solución de lavado). Después se incubó a temperatura ambiente durante 2 h con suficiente volumen (para cubrir la membrana) de solución de lavado la cual contenía 5 µg/mL de SCO2127-His<sub>6</sub>, bajo las condiciones anteriormente descritas. Se repitió el proceso de lavado y se incubó durante 1 h en solución de lavado conteniendo 0.5 µg/mL de anticuerpo anti-histidinas (Roche). Enseguida se repitieron los lavados y se incubó nuevamente en solución de lavado conteniendo anticuerpo secundario (1:2000) marcado con fosfatasa alcalina (Zymed) durante 1 h. Finalmente, se repitió el procedimiento de lavado y se reveló empleando procedimientos estándar.

### **Identificación de la proteínas que interactúan con SCO2127**

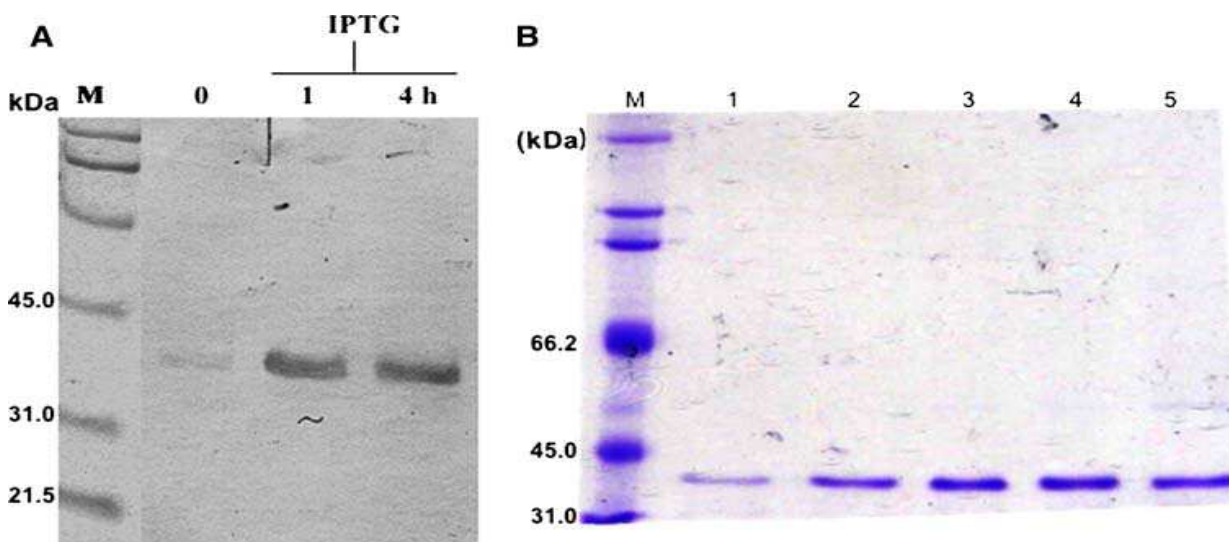
A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de unión proteína-proteína, aquellas proteínas capaces de unirse a SCO2127 fueron cortadas directamente del gel SDS-PAGE y secuenciadas mediante Espectrometría de masas de acuerdo a los procedimientos descritos en (Harper *et al.*, 1996).

## RESULTADOS

### Expresión y purificación de SCO2127-His<sub>6</sub>.

Una vez transformada la cepa de *E. coli* M-15 con la construcción PQE30-*sco2127*, se llevaron a cabo los ensayos de inducción empleando IPTG (0.4 mM) como inductor gratuito a diferentes tiempos (1 y 4 h post-inducción). Los extractos crudos de la cepas inducidas fueron analizados mediante western-blot, empleando anticuerpos anti-His<sub>6</sub>. Como puede observarse en la Figura 10 A, se detecta el producto de expresión SCO2127 con un peso de 34 kDa y básicamente no existen diferencias en la concentración de la proteína expresada a las 1 y 4 h post-inducción.

A partir de la cepa productora de SCO2127-His<sub>6</sub> se logró purificar mediante cromatografía de afinidad en sefarosa niquelada suficiente cantidad de SCO2127 (Fig. 10 B) para poderlo emplear como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales anti-SCO2127 y para llevar ensayos de unión proteína-proteína mediante las técnicas de pull-down y far-western.

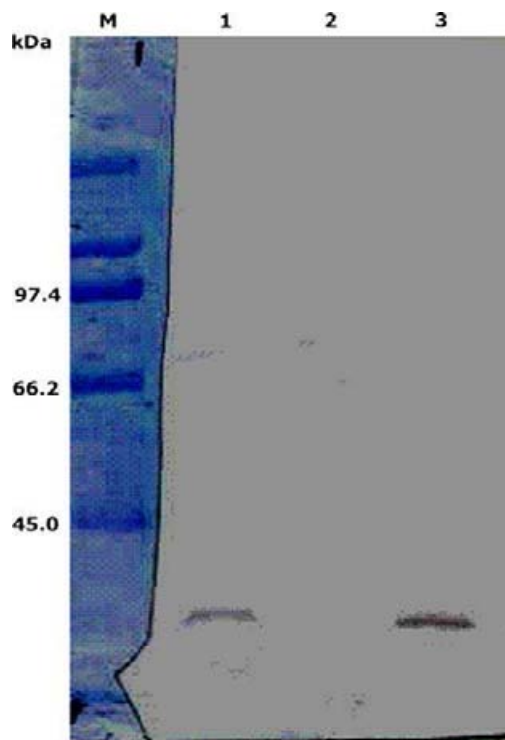


**Figura 10. A.** Análisis de expresión de SCO2127-His<sub>6</sub> mediante Western-blot. SDS-PAGE (8%) de extractos proteicos de *E. coli* M-15 transformada con el plásmido pQE30-*sco2127*, la cual fue cultivada en presencia del inductor IPTG (0.4 mM) durante 1 y 4 h. Los extractos de 0 h se obtuvieron de células no inducidas. El primer carril muestra el marcador de peso molecular. **B.** SDS-PAGE (8%) teñido con azul de Coomassie que muestra eluatos consecutivos de la proteína SCO2127-His<sub>6</sub> (líneas 1-5) obtenidas a partir de extractos proteicos de *E. coli* M-15 transformadas con el plásmido pQE30-*sco2127*. La proteína fue eluída con 300 mM de imidazol a partir de una columna de sefarosa niquelada.

## Producción de anticuerpos policlonales anti-SCO2127.

Los eluatos conteniendo SCO2127-His<sub>6</sub> fueron utilizados para inmunizar conejos Nueva Zelanda y producir anticuerpos policlonales anti-SCO2127, los cuales posteriormente se emplearon para detectar esta proteína en extractos proteicos de *S. coelicolor*. Con la finalidad de evaluar la especificidad de dichos anticuerpos, se llevó a cabo un ensayo de western-blot, empleando extractos proteicos de *S. coelicolor*, *S. peucetius* var. *caesius* y una mutante de *S. coelicolor* deletada en el gen *sco2127* ( $\Delta$ *sco2127*).

Como se muestra en la Figura 11, los anticuerpos anti-SCO2127 producen una reacción positiva en presencia de extractos celulares tanto de *S. coelicolor* como de *S. peucetius* var. *caesius* crecidos en presencia de 100 mM de glucosa. La reacción aparece como una sola banda de 34 kDa en la membrana de western blot. No se obtuvo reacción usando extractos de una mutante de *S. coelicolor* que carece del gen *sco2127* ( $\Delta$ *sco2127*).

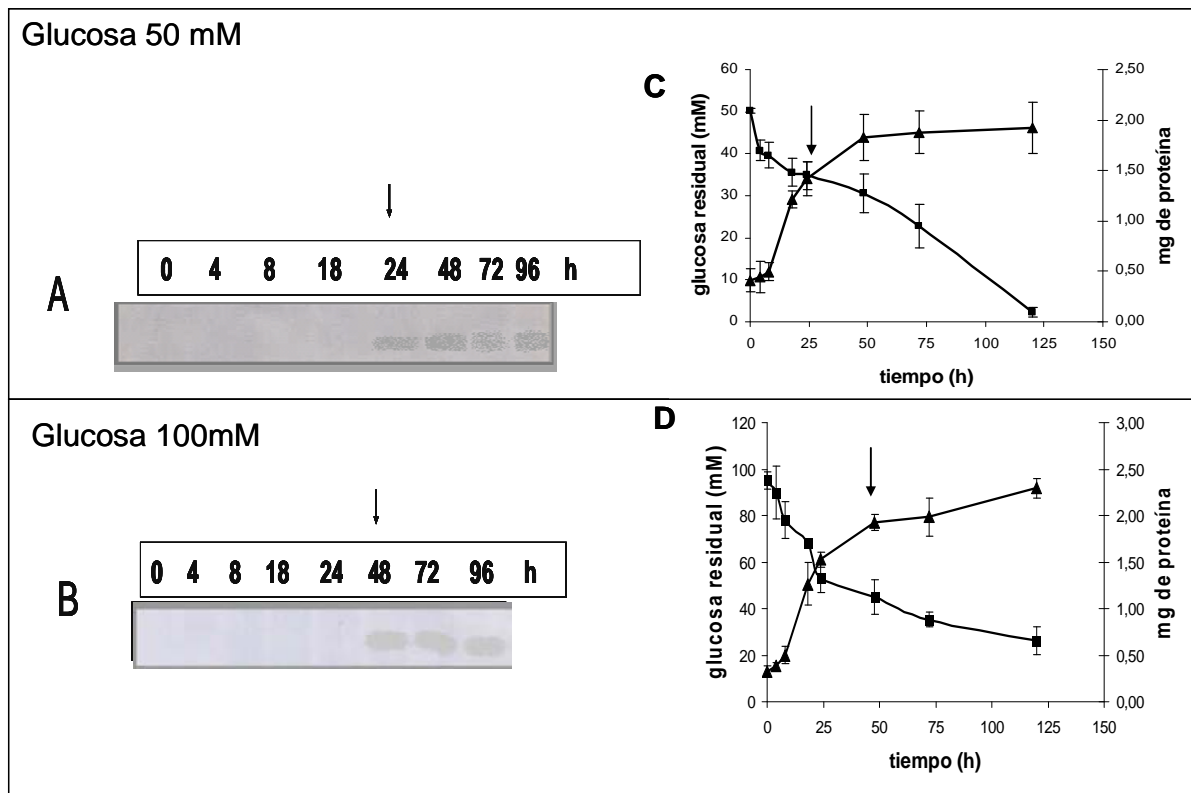


**Figura 11.** Western blot usando anticuerpos policlonales anti-SCO2127 dirigidos contra extractos proteicos de diferentes cepas de *Streptomyces* crecidas en 100 mM de glucosa: *S. coelicolor* (1), mutante de *S. coelicolor* con una deleción en el gen *sco2127* (2) y *S. peucetius* var. *caesius* (3). El marcador de peso molecular está indicado como M.

## Cinética de Expresión de SCO2127 en medio YMG

A una concentración inicial de glucosa de 50 mM en medio YMG, la expresión de SCO2127 se inició en la fase de crecimiento exponencial aproximadamente a las 24 h (Figura 12 A y C), lo cual difiere con el comportamiento observado cuando el microorganismo fue cultivado en caldo YMG con 100 mM de glucosa, en donde la expresión de SCO2127 comienza a detectarse a las 48 h de incubación (Figura 12 B y D), coincidiendo con el final de la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria.

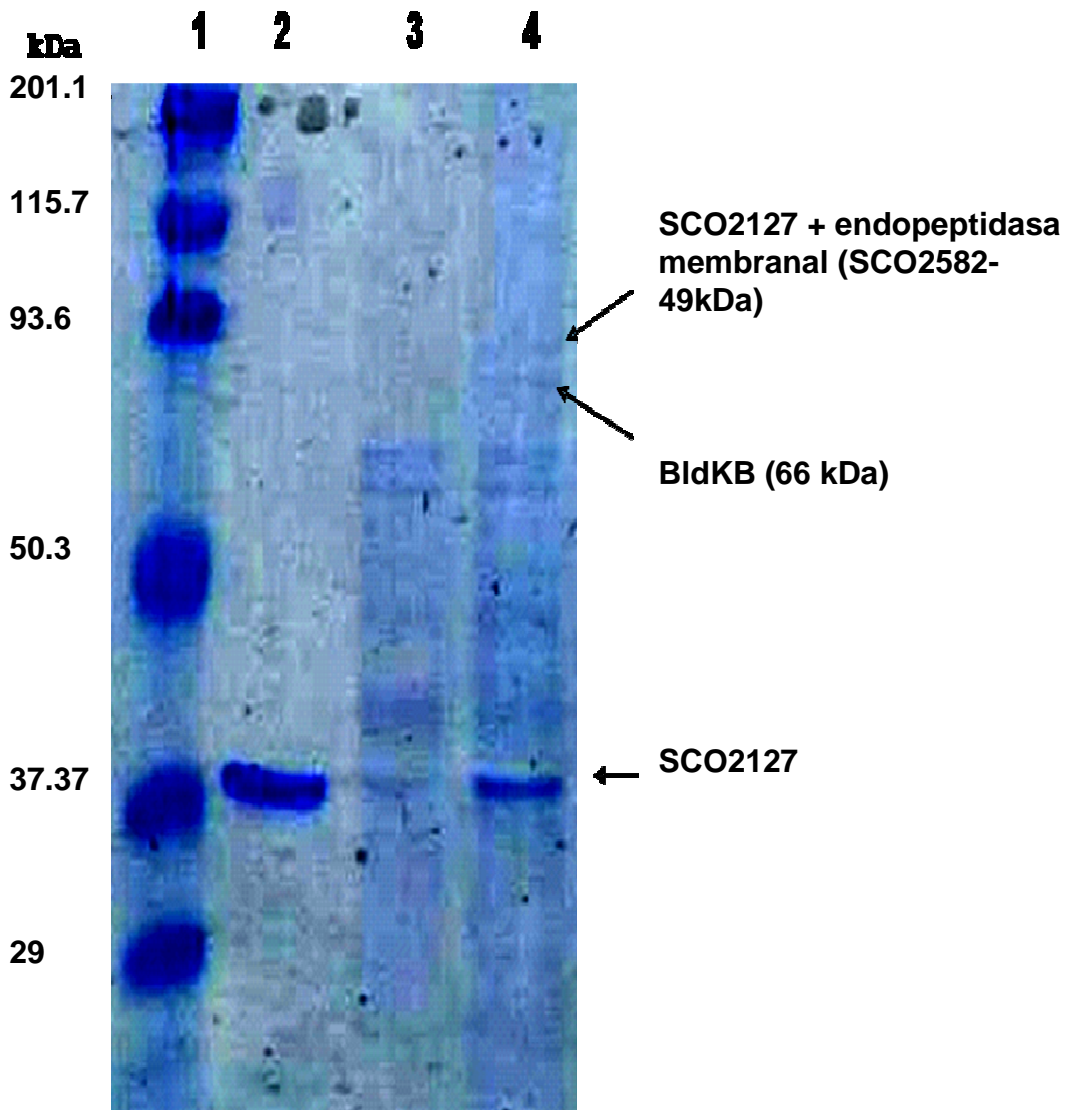
Este comportamiento contrasta con el observado cuando se cultiva a *S. coelicolor* en un medio mínimo (NMMP), en donde prácticamente a lo largo de toda la fermentación (0-72 h) se puede detectar SCO2127, en cultivos conteniendo ambas concentraciones de glucosa (50 y 100 mM) (Chávez *et al.*, 2009).



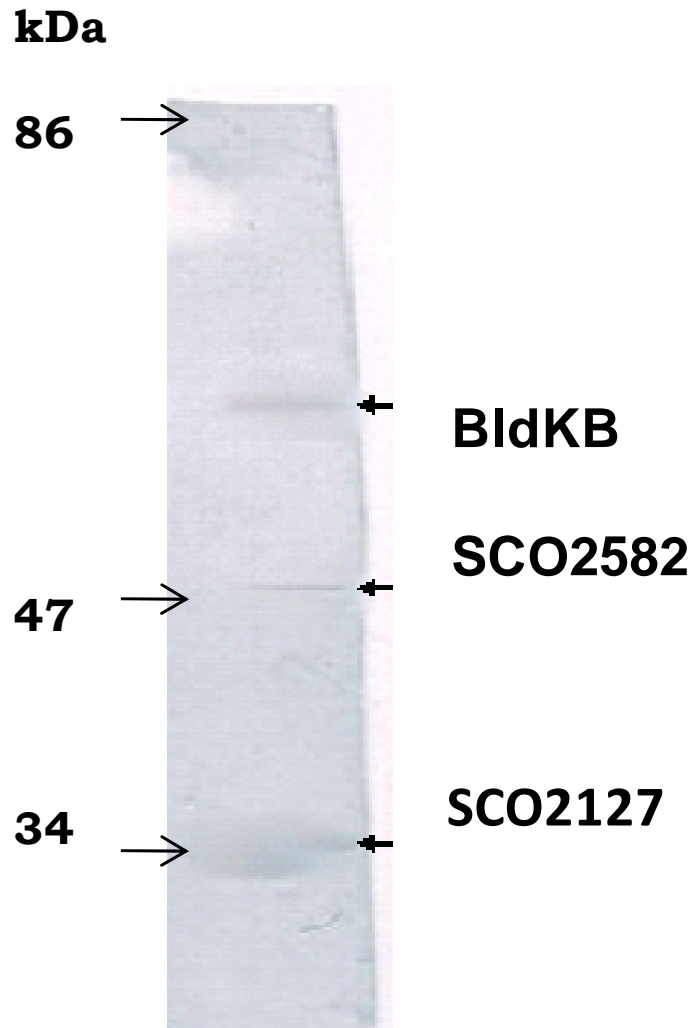
**Figura 12.** Cinética de expresión de SCO2127 en medio YMG. *S. coelicolor* M-145 fue cultivado en caldo YMG con concentraciones de glucosa de 50 y 100 mM. Se tomaron muestras de los cultivos a cada uno de los tiempos indicados (0-96 h) y los extractos proteicos fueron analizados mediante western blot empleando anticuerpos policlonales anti-SCO2127 (A y B); adicionalmente se determinó el crecimiento (▲) y el consumo de glucosa (■) en diferentes etapas de la fermentación (0-120 h). Las flechas indican el tiempo en el cual comienza a detectarse la expresión de SCO2127.

## Ensayos de unión entre SCO2127 y proteínas de extractos crudos de *S. coelicor*.

Al llevar a cabo ensayos de unión proteína-proteína mediante prueba de pull-down (Figura 13) y Far-western (Figura 14) a partir de células crecidas en YMG con 100 mM de glucosa, SCO2127 fue capaz de unirse a dos lipoproteínas cuya identidad fue establecida por espectrometría de masas como BldKB (SCO5113) y SCO2582. Ambas son lipoproteínas asociadas a membrana, posiblemente involucradas con la iniciación de la formación de micelio aéreo en *Streptomyces* (Nodwell *et al.*, 1996).



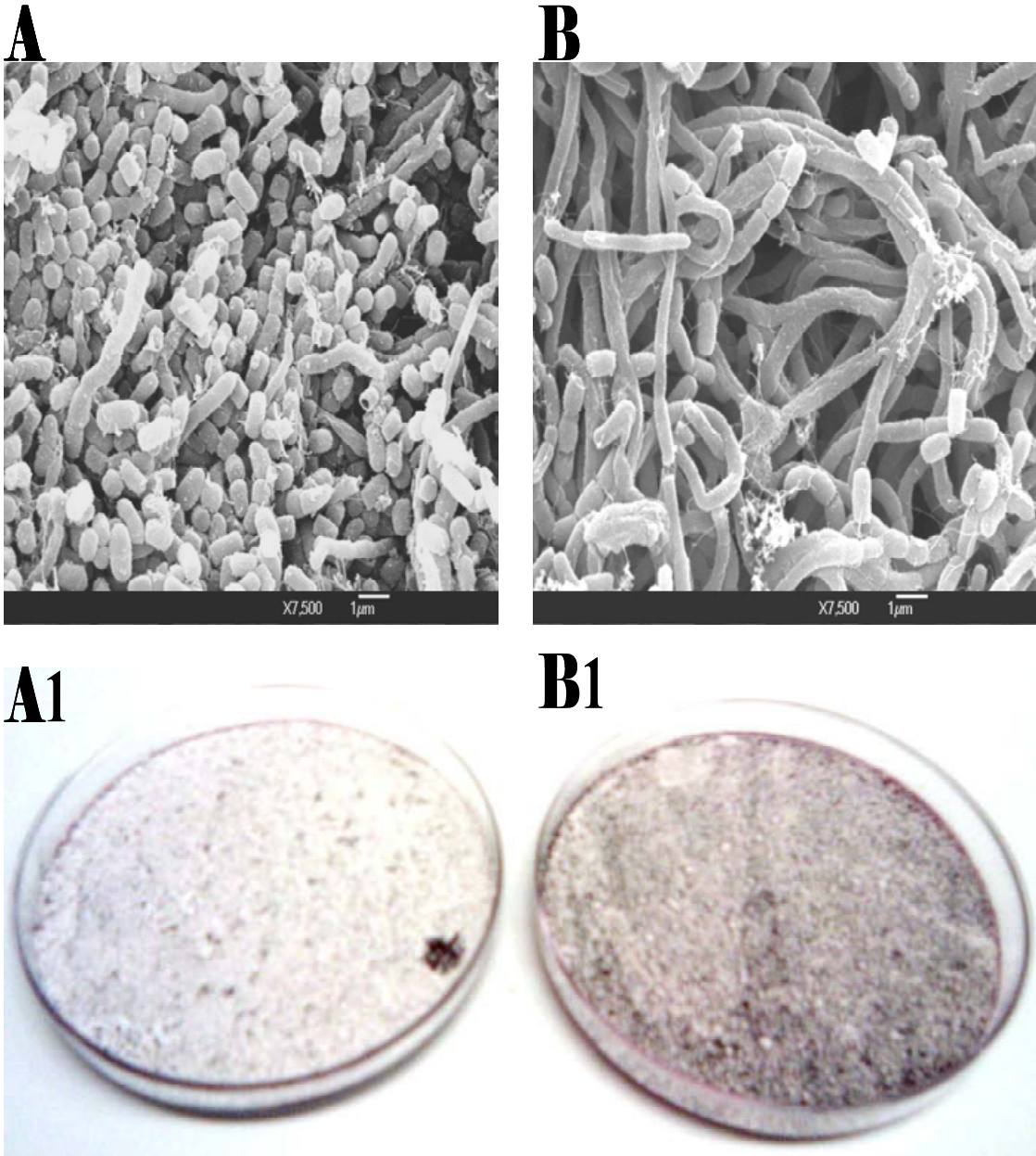
**Figura 13.** SDS-PAGE, teñido con Coomassie, de una prueba de captura (pull-down) de lisados de *S. coelicolor* enfrentados a la proteína SCO2127 inmovilizada en sefarosa níquelada. Línea 1: control positivo de SCO2127 unido a sefarosa níquelada. Línea 2: Control negativo de extractos crudos de *S. coelicolor* previamente expuestos a sefarosa níquelada. Línea 3: Extractos crudos de *S. coelicolor* expuestos a SCO2127 unido a sefarosa níquelada. Línea 1: Marcador de peso molecular.



**Figura 14.** Ensayo de unión proteína-proteína mediante la prueba de Far-western (Overlay) de SCO2127-His<sub>6</sub> enfrentado a extractos crudos de *S. coelicolor* previamente fijados en una membrana de PVDF y revelados mediante un anticuerpo secundario anti-anti-His<sub>6</sub> conjugado con fosfatasa alcalina. Se indican en el extremo izquierdo los valores del marcador de peso molecular.

Al conocer que las proteínas que interaccionan con SCO2127 pudieran estar relacionadas con el desarrollo del micelio aéreo, se decidió buscar diferencias morfológicas entre una cepa silvestre (A) y una mutante  $\Delta sco2127$  (B). Como puede apreciarse en la Figura 15, cuando ambas cepas son crecidas en agar YMG con 100 mM de glucosa y observadas mediante microscopía electrónica de barrido, se detecta un incremento en la velocidad de desarrollo morfológico de la cepa de *S. coelicolor*  $\Delta sco2127$ .





**Figura 15.** Diferencias morfológicas a nivel microscópico y macroscópico entre la cepa mutante de *S. coelicolor* M-145 ( $\Delta sco2127$ ) (A y A1) y una cepa silvestre (B y B1).  $1.5 \times 10^3$  esporas de ambos microorganismos fueron sembradas en agar YMG en presencia de 100 mM de glucosa e incubadas a 29°C durante 48 h y posteriormente observadas mediante microscopía electrónica de barrido. Se observa un aumento en la velocidad de desarrollo morfológico de la colonia que porta la mutación  $\Delta sco2127$ , comparado con la cepa silvestre; además se detectó insensibilidad a RCC en relación a la producción de actinorrodina en la cepa  $\Delta sco2127$ .



## DISCUSION

En este trabajo de investigación, bajo las condiciones de cultivo que se emplearon; se observó que la proteína SCO2127 se expresa durante las fases tardías del crecimiento exponencial. Adicionalmente se observaron diferencias en la cinética de expresión de dicha proteína dependientes de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo. De este modo, cuando se emplea una concentración inicial de 50 mM del azúcar en el medio, la expresión de SCO2127 se manifiesta aproximadamente a las 24 h de cultivo. Por otra parte, cuando la bacteria es cultivada en 100 mM de glucosa, la expresión de SCO2127 se inicia aproximadamente a las 48 h de fermentación. En cultivos con una concentración inicial de glucosa de 50 mM, el inicio de la expresión de SCO2127 coincide con una concentración residual de glucosa de 34 mM, mientras que a ese mismo tiempo, pero en concentración 100 mM inicial del azúcar, la concentración de glucosa residual es de 53 mM y SCO2127 aún no se detecta. Bajo esta condición, la banda de proteína que corresponde a SCO2127 es observada hasta las 48 h de cultivo, es decir hasta que la concentración residual de glucosa ha disminuido a un valor de 44 mM (Figura 12). Estas diferencias posiblemente reflejen de manera indirecta el papel que desempeña SCO2127 en relación al senso de las condiciones nutricionales del medio de cultivo, ya que conforme hay menor disposición de glucosa, la expresión de SCO2127 se produce más tempranamente durante la fermentación. Esto relacionado con la capacidad de SCO2127 para asociarse con un transportador ABC (BldK), ver más adelante; ya que los transportadores ABC permiten a la bacteria monitorear el medio ambiente y los cambios fisiológicos tales como reducción de nutrientes; además proveen la vía para hacer frente a los estímulos que provocan varios procesos de señalización intracelular (Dunny and Leonard, 1997).

La cinética de expresión de SCO2127 observada en este trabajo en células crecidas en YMG, contrasta con lo que observamos (Chávez *et al.* 2009) en cultivos crecidos en medio mínimo NMMP. Contrario a lo que sucede en YMG, bajo esas condiciones, la expresión de SCO2127 se detectó prácticamente desde el inicio y hasta el final de la fermentación (0-72 h), en glucosa 50 y 100 mM. En NMMP con 50 mM de glucosa, la expresión de SCO2127 disminuyó proporcionalmente a la concentración de glucosa residual en el medio y fue casi nula, al agotarse la glucosa residual. Sin embargo, cuando la concentración inicial de glucosa fue 100 mM, la expresión de

SCO2127 se mantuvo inclusive hasta las 72 h, lo cual coincidió con una concentración de glucosa remanente cercana al 50% de la concentración inicial (aproximadamente 50 mM). Con base en este comportamiento podríamos pensar en la posibilidad de que la expresión de SCO2127 esté en función directa de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo, y que los diferentes patrones de expresión observados a lo largo de la fermentación en estos dos medios (NMMP y YMG), probablemente se deban a la presencia de sustancias en el medio YMG, que posiblemente desencadenen otros procesos metabólicos que provoquen patrones de expresión diferentes a los observados en NMMP, donde la expresión de SCO2127 es prácticamente influenciada sólo por la presencia de glucosa.

Con base en los resultados obtenidos, y para conocer más acerca del mecanismo de acción de SCO2127 observado en medio YMG, se investigaron posibles interacciones de SCO2127 con otras proteínas en etapas de crecimiento donde ésta se expresa para conocer si estas interacciones proteína-proteína son las responsables de ejercer un efecto regulatorio en *S. coelicolor*, como el observado en *S. peucetius* var. *caesius* (Guzmán *et al.* 2005a).

Mediante experimentos de pull-down y far-western logramos detectar dos lipoproteínas que se unen a SCO2127. Una de ellas fue BldKB (SCO5113) y la otra SCO2582. BldKB (65.9 kDa), es una lipoproteína responsable de la captación del oligopéptido morfógeno Bld261, que pertenece a un sistema transportador tipo ABC (BldK), involucrado en la formación de micelio aéreo (Shin *et al.*, 2007). Este oligopéptido puede desencadenar una cascada de señalización que culmina con el desarrollo del micelio aéreo (Nodwell *et al.*, 1996). Al ser captado, Bld261 es internalizado por la permeasa BldK, lo cual produce una señal que es procesada, excretada e importada varias veces por una cascada *bld*, que involucra los productos de expresión de los siguientes genes *bld*: *bldK*, *-A/-H*, *-G*, *-C* y *-D*; provocando la producción de un efector final que activa *bldD*. Dicha cascada de señalización culmina con la formación de un biosurfactante denominado SapB, el cual forma una película hidrofóbica en la superficie de la hifa, provocando la formación de micelio aéreo (Figura 4) (Kodani *et al.*, 2004, Willey *et al.*, 2006). Dentro de todos estos eventos de señalización se ha documentado que, específicamente, *bldK* controla la cascada de señalización para la formación de micelio aéreo (Nodwell *et al.*, 1996. Nodwell *et al.*, 1998). Se ha reportado que la formación de micelio aéreo comienza al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria (etapas que coinciden con la

expresión de SCO2127 (Figura 12)) y que la formación de dicho micelio no se produce en cultivos crecidos en presencia de glucosa, hasta que ésta se agota o se encuentra en muy baja concentración (Cal *et al.*, 1995). También BldKB se mantiene abundante a lo largo del crecimiento de *S. coelicolor* (Kim *et al.*, 2005). Se sabe que sistemas regulatorios especializados monitorean una serie de estados fisiológicos únicos y controlan la expresión de numerosos genes para inducir procesos de desarrollo (Shin *et al.*, 2007). Algunas proteínas involucradas en el control del desarrollo son comunmente inducidas por condiciones de estrés. Por ejemplo, BldKB es inducida por shock salino, estrés ambiental y por disminución de nutrientes (Shin *et al.*, 2007); tal y como sucede con SCO2127, cuya expresión comienza cuando la concentración de glucosa empieza a disminuir en el medio de cultivo. Estas coincidencias en cuanto a los patrones de expresión y la interacción entre BldKB y SCO2127, nos hacen pensar en que dicha asociación favorece la regulación del desarrollo morfológico y fisiológico en *S. coelicolor*, en asociación estrecha a la concentración de glucosa disponible en el medio de cultivo.

Adicionalmente a su unión con BldKB, se detectó interacción de SCO2127 con un polipéptido de 49 kDa (SCO2582) que presenta homología con una endopeptidasa membranal hipotética. Basados en los procesos descubiertos en otros microorganismos que también utilizan proteasas para la exportación y procesamiento de oligopéptidos de señalización extracelular, es posible que SCO2582 se encargue del procesamiento y maduración del oligopéptido morfógeno Bld261, que finalmente debe ser internalizado por la permeasa BldK de *S. coelicolor*. Tal es el caso de las subunidades PrgZ y TraC de *Enterococcus faecalis* y OppA de *B. subtilis* (Lazazzera *et al.*, 2001).

Cabe hacer notar que, en el ensayo de Far-western (Figura 14), además de las interacciones SCO2127-BldKB y SCO2127-SCO2582 que se detectaron, también se encontró interacción SCO2127-SCO2127, por lo que no se descarta la posibilidad de que esta proteína sea capaz de formar dímeros u oligómeros, y que posiblemente, este tipo de interacciones sean determinantes para ejercer su función.

Se sabe que BldKB es componente de un factor regulatorio para la diferenciación en *S. coelicolor*, y que su síntesis es inducida por S- adenosilmetionina (SAM), un metabolito capaz de activar el metabolismo secundario en *Streptomyces spp.* y promover la síntesis de actinorrodina (ACT) y undecilprodigiosina (RED) en *S. coelicolor*. SAM induce la síntesis de varios componentes de transportadores ABC (por

ejemplo, SCO5260 y SCO5477 y BldKB) para modular el metabolismo secundario y el desarrollo morfológico en *S. coelicolor*. BldKB pertenece a la familia de componentes A de oligopéptido permeasas (OppA) (Shin *et al.*, 2007). Los complejos Opp bacterianos pertenecen a la familia de transportadores ABC y se ha encontrado que están involucrados en el transporte de moléculas regulatorias específicas (Detmers *et al.*, 2001. Levdikov *et al.*, 2005), y regulan, además de otros procesos, la fisiología celular (Havarstein *et al.*, 1995) y la esporulación (Rudner *et al.*, 1991. Stragier and Losick 1996).

Con base en lo anterior, como primera posibilidad en el mecanismo de acción de SCO2127, se propone que este tipo de interacciones en las fases tardías de crecimiento son parte de una compleja serie de procesos que auxilian en la regulación del proceso de formación del micelio aéreo en *S. coelicolor*.

La segunda posibilidad está relacionada con la función de la permeasa BldK, ya que además de ser un transportador de Bld261, se ha establecido que es capaz de transportar una amplia variedad de compuestos, incluyendo péptidos, aminoácidos y carbohidratos (Schmitt *et al.*, 2002). En general, los complejos Opp se sabe que también juegan un papel en la adquisición de péptidos extracelulares como nutrientes (Shin *et al.*, 2007), los cuales al ser fuentes de carbono, al igual que los carbohidratos, también podrían ejercer un efecto regulatorio. Se ha descubierto que 45 de las 81 permeasas tipo ABC en el genoma de *S. coelicolor* están involucradas en transporte de carbohidratos (Bentley *et al.*, 2002) y más recientemente, Bertram *et al.* (2004), identificaron más de 50 genes que codifican para sistemas de transporte de carbohidratos en *S. coelicolor* A(3)2, muchos de los cuales son transportadores tipo ABC. Además, estas permeasas son capaces de incorporar más de un carbohidrato (Hillerich *et al.*, 2006) y también poseen funciones adicionales como es el caso de BldK. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que exista un transporte activo de glucosa ejercido por BldK. Así, con una alta incorporación de glucosa uno esperaría la inducción de Glk y un incremento en el metabolismo del carbono. Independientemente del mecanismo que esté involucrado, la consecuencia final sería la formación de catabolitos que podrían ejercer RCC en *S. coelicolor* (Ramos *et al.*, 2004).

Hemos observado que en una mutante de *S. coelicolor* donde el gen *sco2127* ha sido completamente eliminado ( $\Delta$ *sco2127*), hay un aumento en la velocidad de formación del micelio aéreo, tal y como fue observado por Shin *et al.* (2007) en mutantes de *S. coelicolor* ( $\Delta$ *sco5476*), una proteína integral de membrana

perteneciente a una permeasa ABC que juega un papel regulatorio en la diferenciación de *S. coelicolor* tal como el complejo BldK, en donde el crecimiento se acelera en el inicio de la fase estacionaria comparado con la cepa silvestre. Adicionalmente, la producción de actinorrodina resultó insensible a RCC en la mutante  $\Delta sco2127$  (comunicación personal). En base a lo anterior suponemos que SCO2127, además de estar involucrado en la regulación del desarrollo morfológico, tiene un papel en la regulación del metabolismo secundario. Se sabe bien que las mutantes con defectos en el desarrollo de la hifa aérea, ocasionalmente tienen defectos en la producción de ACT y RED en *S. coelicolor*. La producción de antibióticos, así como el desarrollo del micelio aéreo poseen puntos de regulación en común. Debe de hacerse notar que la producción de ACT, pero no de RED, está suprimida en mutantes *bldK*, y el defecto fenotípico es dependiente de la fuente de carbono en el medio de cultivo (Nodwell *et al.*, 1996); ya que la suplementación de manitol como única fuente de carbono suprime el defecto en la biosíntesis de la mutante *bldK* (Shin *et al.*, 2007). Existen efectos relacionados a la regulación de la producción de ACT en mutantes deletadas tanto en *sco2127* como en *bldK*, ya sea desreprimiendo su síntesis en presencia de glucosa en el caso de cepas  $\Delta sco2127$  o suprimiendo su producción en cepas  $\Delta bldK$ . Ambos efectos regulatorios, aunque diferentes, nos indican que ambos genes están relacionados con el desarrollo fisiológico; además de su efecto comprobado en el desarrollo morfológico.

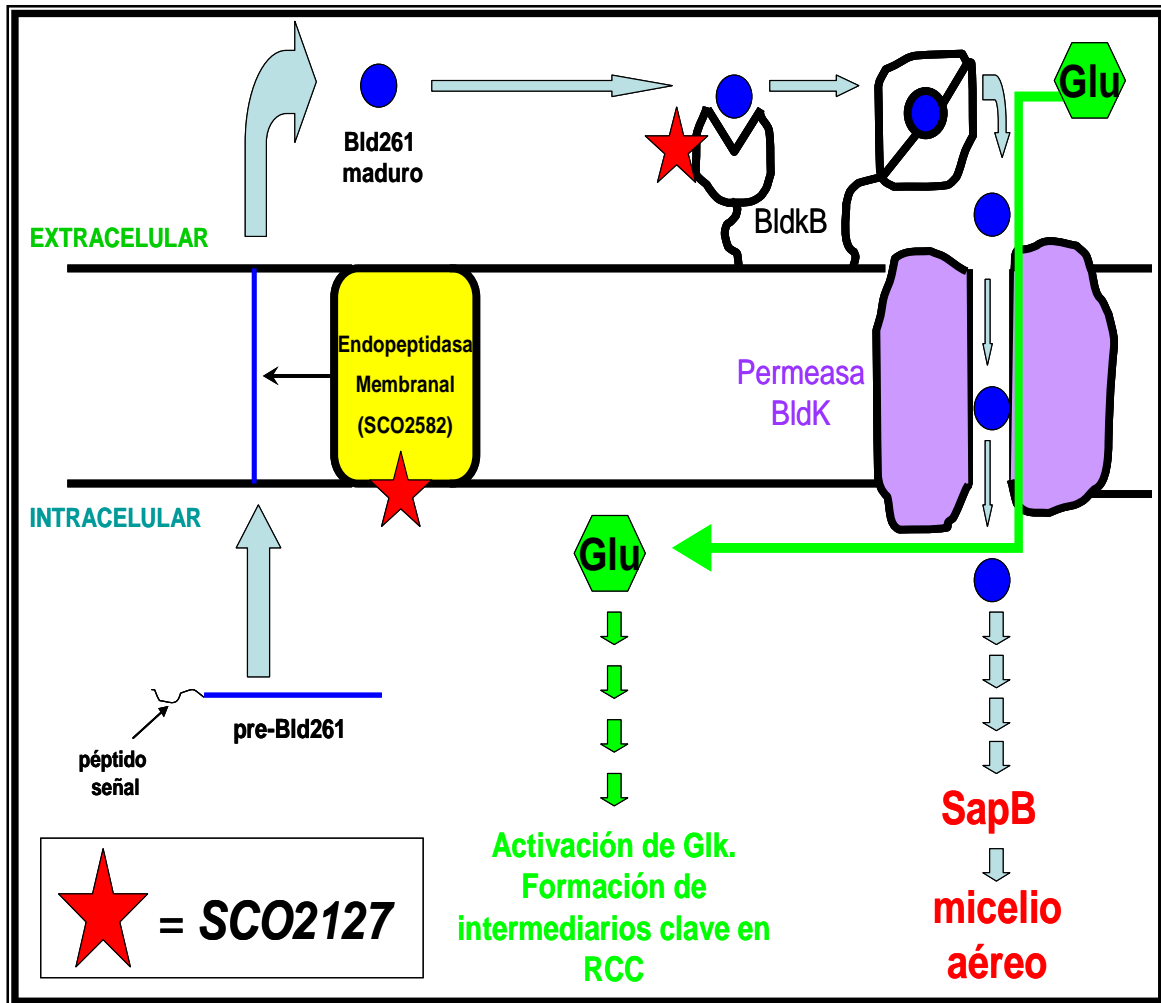
Basados en los resultados obtenidos por Guzmán *et al.* (2005a, 2005b) y Chávez *et al.*, (2009) en donde la expresión de SCO2127 disminuye en relación al consumo de glucosa, sospechamos que éste es capaz de interactuar con Glk en *S. coelicolor* para ejercer el mismo efecto observado en el proceso de RCC en *S. peuceetius* var. *caesius*. Sin embargo, hasta el momento no hemos sido capaces de detectar interacción alguna entre estas proteínas, posiblemente debido a la existencia de diferentes mecanismos presentes en ambas especies para ejercer la RCC.

Interesantemente, Glk no contiene sitios de unión a DNA predecibles, por lo que es inviable que regule directamente la transcripción. Sin embargo, se ha propuesto que GlkA transmita eventualmente la señal de RCC vía la interacción con factores de transcripción (Angell *et al.*, 1992; Mahr and Titgemeyer, 2001); los cuales pueden incluir reguladores específicos como MalR y GylR, represores de los operones de maltosa y glicerol, respectivamente, o reguladores pleiotrópicos como CcrA y BldB. (Ingram and Westpheling, 1995; Pope *et al.*, 1996; van Wezel *et al.*, 1997). Para verificar tal

interdependencia, MalR, GylR y BldB fueron sobreproducidos heterológamente y después purificados para probar su interacción con GlkA. Este objetivo ha sido abordado a través de varios años por el grupo de Fritz Titgemeyer usando técnicas como surface plasmon resonance, pruebas de captura (pull down), un servidor de biblioteca de péptidos, inmunoprecipitación y doble híbrido *in vivo* (Bertram and Titgemeyer, 2004; Mahr *et al.*, 2000; Mahr and Titgemeyer, 2001). Sin embargo, estos intentos, al igual que los que se han llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo, no han logrado identificar ninguna proteína capaz de interactuar con GlkA. No obstante, las investigaciones que se han enfocado en la regulación por carbono en *S. coelicolor* designan a la GlkA como una proteína que está involucrada en la transducción de señales en este organismo.

Aunque el conocimiento acerca de la regulación por carbono en *S. coelicolor* indica interacciones entre glucosa cinasa y proteínas regulatorias, la falta de un método adecuado para purificar los complejos de proteína nativa dificultan probar los modelos actuales. En años recientes, las proteínas con tallos se han vuelto altamente populares para purificar proteínas recombinantes y complejos nativos de proteínas (Terpe, 2003). Sin embargo, los hospederos usados para expresar las proteínas blanco son frecuentemente ricos en AT, lo que dificulta el estudio de proteínas codificadas por el uso de codones ricos en GC.

Con base en todo lo anterior, en la Figura 16 se propone un modelo del posible mecanismo de acción que la proteína SCO2127 podría llevar a cabo en relación al proceso de RCC y la diferenciación morfológica en *S. coelicolor*.



**Figura 16.** Mecanismo de acción propuesto para la proteína SCO2127 en *S. coelicolor*. La interacción de la proteína SCO2127 (estrella roja) con la endopeptidasa membranal SCO2582 (en amarillo), posiblemente estimule la actividad de SCO2582 para llevar a cabo el procesamiento del péptido Bld261 (círculo azul), el cual, una vez exportado es captado por la lipoproteína BldKB (en azul) y reincorporado a través de la permeasa BldK (en violeta), para desencadenar una cascada de señalización que culmina con el inicio de la formación del micelio aéreo. La permeasa BldK es capaz de incorporar carbohidratos, uno de los cuales, posiblemente sea la glucosa, la cual, al ser incorporada a la célula, posiblemente active la Glk, con la subsecuente formación de intermediarios metabólicos clave en ejercer RCC.

## CONCLUSIONES

- La región *sco2127* corresponde a un marco de lectura abierto capaz de expresar una proteína involucrada en el desarrollo morfofisiológico de *Streptomyces coelicolor* (SCO2127).
- Bajo las condiciones empleadas en este trabajo, la proteína SCO2127 comienza a sintetizarse durante las fases tardías del crecimiento exponencial, manteniéndose dicha expresión a lo largo de la fase estacionaria.
- SCO2127 es capaz de interactuar con las proteínas BldKB y un polipéptido homólogo a una endopeptidasa membranal (SCO2582), ambos involucrados en la diferenciación morfológica temprana en *S. coelicolor*.
- La proteína SCO2127 posiblemente actúe como un regulador negativo en la formación de micelio aéreo.

## PERSPECTIVAS

Adicional a lo que se conoce, respecto a la participación de SCO2127 en el proceso de Represión Catabólica por Carbono; los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la proteína SCO2127 está estrechamente involucrada con el proceso de diferenciación morfológica en *S. coelicolor*, por lo que, con la finalidad de conocer más acerca del mecanismo de acción de SCO2127, se proponen los siguientes estudios:

- Emplear la técnica de Pull-down, Far-western y Doble híbrido para llevar a cabo ensayos de unión entre SCO2127, Glk, GlcP1 (expresadas heterológamente en *E. coli*).
- Producir anticuerpos monoclonales anti-SCO2127 para monitorear dicha proteína mediante inmunohistoquímica.
- Llevar a cabo pruebas de sensibilidad a RCC, actividad de Glk y transporte de glucosa en la cepa  $\Delta$ *sco2127*
- Buscar los sitios específicos mediante los cuales SCO2127 se une a otras proteínas.
- Aislar y caracterizar mutantes con deleciones en el gen *sco2582*.



## REFERENCIAS

- Angell S, Schwarz E and Bibb MJ. (1992). **The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression.** Mol. Microbiol. 6: 2833-2844.
- Angell, S., Lewis, C.G., Buttner, M.J., and Bibb, M.J. (1994). **Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase.** Mol Gen Genet. 244: 135-143.
- Bentley, S.D., Chater, K. F. , Cerdeno-Tarraga, A. M. , Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, T., Murphy, L., Oliver, L., O'Neil, K., Rabbinowitsch, S., Rajandream, E., Rutherford, M.A., Rutter, K., Seeger, S., Saunders, K., Sharp, D., Squares, S., Squares, R., Taylor, S., Warren, K., Wietzorrek, T., Woodward, A., Barrell, J., Parkhill, B.G., and Hopwood DA. (2002). **Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Nature 9: 141-147.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothaft, H., Saier, M. H., Jr and Titgemeyer, F. (2004). **In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2).** J Bacteriol. 186: 1362–1373.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W. and Gilles, E.D. (2007). **Correlation between growth rates, EIICrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12.** J Bacteriol. 189(19): 6891-6900
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., et al. (1997). **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.** Science, 277: 1453–1462.
- Bowien. B. and Kusian B. (2002). **Genetics and control of CO<sub>2</sub> assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*.** Arch Microbiol. 178(2): 85-93.

Bralley, P., and Jones, G.H. (2004). **Organization and expression of the polynucleotid phosphorylase gene (*pnp*) of *Streptomyces*: Processing of *pnp* transcripts in *Streptomyces antibioticus*.** J Bacteriol. **186**: 3160-3172.

Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2002). **Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization.** FEMS Microbiol Lett. **209**: 141-148.

Butler, M.J., Deutscher, J., Postma, P.W., Wilson, T.J., Galinier, A., and Bibb, M.J. (1999). **Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2).** FEMS Microbiol Lett. **177**: 279-288.

Cal, S., Aparicio, J.F., de los Reyes-Gavilan, C.G., Nicieza, R.G. and Sanchez, J. (1995). **A novel exocyttoplasmic endonuclease from *Streptomyces antibioticus*.** Biochem J. **306** (Pt 1): 93-100.

Cases, I., Velázquez, F. and de Lorenzo, V. (2007). **The ancestral role of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomics.** Res Microbiol. **158**(8-9): 666-670.

Champness, W. (2000). **Actinomycete development, antibiotic production and phylogeny. questions and challenges.** In Prokaryotic Development. Brun, Y.V., and Skimketts, L.J.. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 11–31.

Chater K. F. (1998). **Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony.** Microbiol. **144**, 1465-1478.

Chater, K.F. (2001). **Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?.** Curr Opin Microbiol. **4**: 667-673.

Chater, K.F. and Horinouchi, S. (2003). **Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species.** Mol. Microbiol. **48**: 9–15.

Chater Keith F. (2006). ***Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 361(1469): 761–768.

Chávez A, García-Huante Y, Ruiz B, Langley E, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S. (2009). **Cloning and expression of the *sco2127* gene from *Streptomyces coelicolor* M145.** J Ind Microbiol Biotechnol. 36(5): 649-54.

Claessen Dennis, Wouter de Jong, Lubbert Dijkhuizen and Han A.B. Wösten. (2006). **Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!**. Trends Microbiol. 14 (7): 313-319.

Commichau, F.M. and Stülke J. (2008). **Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression.** Mol Microbiol. 67(4): 692-702.

Delic, I., Robbins, P. and Westpheling, J. (1992). **Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control.** Proc Natl Acad Sci U S A. 89(5):1885-1889.

Demain, A.L. (2000). **Small bugs, big business: the economic power of the microbe.** Biotechnol Adv. 18: 499-514.

Demain, A.L. and Sanchez, S. (2009). **Microbial drug discovery: 80 years of progress.** J. Antibiot. 62: 5-16.

Detmers, F. J., F. C. Lanfermeijer, and B. Poolman. (2001). **Peptides and ATP binding cassette peptide transporters.** Res. Microbiol. 152: 245-258.

Distler,, J., Mansouri, K., Mayer, G., Stockmann, M. and Piepersberg, W. (1992). **Streptomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces*.** Gene. 115(1-2): 105-11.

Dunny, G. M. and B. A. Leonard. (1997). **Cell-cell communication in Gram-positive bacteria**. Annu. Rev. Microbiol. 51: 557-564.

Embley, T.M. and Stackebrandt, E. (1994). **The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes**. Annu Rev Microbiol. 48: 257-89.

Flärdh, K. and Buttner, M.J. (2009). ***Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium**. Nature Rev Microbiol. Vol?(7): 36-49.

Görke, B. and Stülke, J. (2008). **Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients**. Nat Rev Microbiol. 6(8): 613-24.

Gottlieb, D. (1974). **Actinomycetalis**. **Bergery's Manual of determinative bacteriology**. Eighth Edition: pp. 657-861.

Guzmán, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., López, R., Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Servín-González, L., Sanchez, S. and Langley, E. (2005a). **Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius***. Microbiol. 151: 1717-1723.

Guzmán, S., Ramos, I., Moreno, E., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R., Escalante, L., Langley, E. and Sanchez S. (2005b). **Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius***. Appl Microbiol Biotechnol. 69(2): 200-206.

Harper S. and Speicher D. W. In: Coligan J. E., Dunn B. M., Ploegh H. L., Speicher D. W. and Wingfield P. T., Editors, **Current Protocols in Protein Science**, Wiley, New York (1996), pp. 16.2.1 - 16.2.11.

Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy, and D. A. Morrison. 1995. **An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11140-11144.

Hesketh, A.R., Chandra, G., Shaw, A.D., Rowland, J.J., Kell, D.B., Bibb, M.J. and Chater, K.F. (2002). **Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor***. Mol Microbiol. 46(4): 917-932.

Hillerich, B. and Westpheling, J. (2006). **A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source**. J. Bacteriol. 188: 7477-7487.

Hodgson, D.A. (1982). **Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose**. J. Gen Microbiol. 128: 2417-2430.

Hodgson, D.A. (2000). **Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria**. Adv Microb Physiol. 42: 47-238.

Hopwood, D.A. (1988). **The Leeuwenhoek lecture. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production**. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 235(1279): 121-138.

Hu YX, Guo JY, Shen L, Chen Y, Zhang ZC, Zhang YL. (2002). **Get effective polyclonal antisera in one month**. Cell Res. 12(2):157-60.

Ikeda, H., Seno, E.T., Bruton, C.J. and Chater, K.F. (1984). **Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor***. Mol Gen Genet. 196: 501-507.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003). **Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis***. Nat Biotechnol. 21: 526-531.

Imriskova, I., Arreguin-Espinosa, R., Guzman, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E., and Sanchez, S. (2005). **Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius***. Res Microbiol. 156: 361-366.

Ingram C. and Westpheling J. (1995). **The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter**. J. Bacteriol. 177, 3587-3588.

Karoonuthaisiri, N., Weaver, D., Huang, J., Cohen, S.N. and Kao, C.M. (2005). **Regional organization of gene expression in *Streptomyces coelicolor***. Gene, 353(1): 53-66.

Kelemen, G.H. and Buttner, M.J. (1998). **Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces***. Curr Opin Microbiol. 1(6): 656-662.

Kelemen, G.H. et al. (1998). **Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3(2)**. J Bacteriol. 180: 2515–2521.

Khetan, A., Malmberg, L.H., Kyung, Y.S., Sherman, D.H. and Hu, W.S. (1999). **Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus***. Biotechnol Prog. 15(6): 1020-1027.

Kim, D.W., Chater, K. F., Lee, K. J., and Hesketh, A. (2005). **Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specific tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor***. Microbiology. 151: 2707-2720.

Kodani, S. et al. (2004). **The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor***. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 11448–11453.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., et al. (1997). **The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis***. Nature, 390: 249–256.

Kwakman, J.H., and Postma, P.W. (1994). **Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor***. J Bacteriol. 176: 2694-2698.

Lazazzera B. A. (2001). **The intracellular function of extracellular signaling peptides**. Peptides, 22(10): 1519-1527.

Levdikov, V. M., E. V. Blagova, J. A. Brannigan, L. Wright, A. A. Vagin, and A. J. Wilkinson. (2005). **The structure of the oligopeptide-binding protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide**. J. Mol. Biol. 345: 879-892.

Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J. and Blattner, F.R. (2005). **Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli***. J Biol Chem. 280(16): 15921-15927.

Madigan, T.M., Martinko, J.M., and Parker, J. (2003). **Brock Biology of Microorganisms**. Pearson. Southern Illinois University, Carbondale. 1001 p.

Mahr, K., van Wezel, G.P., Svensson, C., Krenkel, U., Bibb, M.J., and Titgemeyer, F. (2000). **Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis**. Antonie Van Leeuwenhoek 78: 253-261.

Mahr, K., and Titgemeyer, F. (2001). **Carbon metabolism in *Streptomyces coelicolor*: A molecular view to glucose kinase and its role in carbon regulation and glucose transport**. Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. 100 s.

McNeil, M. and Brown, J. M. (1994). **The medically important actinomycetes: epidemiology and microbiology**. Clin Microbiol Rev. 7: 357-417.

Nodwell, J. R., K. McGovern, and R. Losick. (1996). **An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor***. Mol Microbiol. 22: 881–893.

Nodwell, J. R. and R. Losick. (1998). **Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*.** J. Bacteriol. 180: 1334-1337.

Nothhaft, H., Parche, S., Kamionka, A., and Titgemeyer, F. (2003). ***In vivo* analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*.** J Bacteriol. 185: 929-937.

Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1998). **Major facilitator superfamily.** Microbiol Mol Biol Rev. 62: 1-34.

Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraburttty, R. and Stassi, D. (2003). ***Streptomyces* genetics: a genomic perspective.** Crit Rev Biotechnol. 23(1): 1-27.

Parche, S., Schmid, R., and Titgemeyer, F. (1999). **The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene ptsH.** Eur J Biochem. 265: 308-317.

Pope, M.K. et al. (1996). **The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling.** Mol. Microbiol. 19: 747-756.

Postma, P.W, Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. (1993). **Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.** Microbiol Rev. 57(3): 543-594.

Ramos, I., Guzman, S., Escalante, L., Imriskova, I., Rodriguez-Sanoja, R., Sanchez, S., and Langley, E. (2004). **Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.** Res Microbiol. 155: 267-274.



Rudner, D. Z., J. R. LeDeaux, K. Ireton, and A. D. Grossman. 1991. **The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopermease locus and is required for sporulation and competence.** J. Bacteriol. 173: 1388-1398.

Schmitt, L., and R. Tampe. (2002). **Structure and mechanism of ABC transporters.** Curr Opin Struct Biol. 12: 754–760.

Seno, E.T., and Chater, K.F. (1983). **Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wildtype and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2).** J Gen Microbiol 129: 1403-1413.

Shi, W. and, Zusman, D.R. (1993). **Fatal attraction.** Nature. 366(6454): 414-415.

Shin, S.K., Park H. S., Kwon H. J., Yoon H. J., Suh J. W. (2007). **Genetic Characterization of Two S-Adenosylmethionine-induced ABC Transporters Reveals Their Roles in Modulations of Secondary Metabolism and Sporulation in *Streptomyces coelicolor* M145.** J. Microbiol. Biotechnol. 11; 17(11): 1818~1825.

Stragier, P. and R. Losick. 1996. **Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*.** Annu. Rev. Genet. 3: 203-212.

Terpe K. (2003). **Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** Appl Microbiol Biotechnol. 60:523–533.

Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M.H., Cui, X., and Saier, M.H., Jr. (1995). **Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species.** Microbiol. 141 (Pt 1): 51-58.

Titgemeyer, F., and Hillen, W. (2002). **Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution.** Antonie Van Leeuwenhoek, 82: 59-71.

van Wezel, G.P., White, J., Young, P., Postma, P.W. and Bibb, M.J. (1997). **Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by malR, a member of the lacI-galR family of regulatory genes.** Mol Microbiol. 23(3): 537-549.

van Wezel, G.P., Mahr, K., Konig, M., Traag, B.A., Pimentel-Schmitt, E.F., Willimek, A., and Titgemeyer, F. (2005). **GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Mol Microbiol. 55: 624-636.

van Wezel, G.P., Konig, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A.W., Bibb, M.J., and Titgemeyer, F. (2007). **A new Piece of an Old Jigsaw: Glucose Kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3 (2).** J Mol Microbiol Biotechnol. 12: 65-72.

Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S., and McDowall, K.J. (2005). **Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*.** Mol Microbiol. 58: 131-150.

Wang, F., Xiao, X., Saito, A., and Schrepf, H. (2002). ***Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate dependent uptake of N-acetylglucosamine.** Mol Genet Genom. 268: 344-351.

Warner, J.B. and Lolkema, J.S. (2003). **A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*.** FEMS Microbiol Lett. 220(2): 277-80.

Wildermuth, H. (1970). **Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*.** J Gen Microbiol. 60(1): 43-50.

Willey, J.M. et al. (1991). **Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*.** Cell 65: 641–650.

Willey, J.M. et al. (1993). **Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor***. *Genes Dev.* 7: 895–903.

Willey, J.M., Willems, A., Kodani, S., Nodwell, J.R. (2006). **Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor***. *Mol Microbiol.* 59: 731-742.

Woese, C. (1987). **Bacterial evolution**. *Microbiol Rev.* 51: 221–271

**ANEXO****MEDIOS DE CULTIVO****Luria – Bertanni (LB)**

	g/L
Bacto Triptona	10
NaCl	10
Extracto de Levadura	5
Agar-Agar	15

**Yest-Malt extract-Glucose (YMG)**

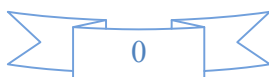
	g/L
Extracto de levadura	4
Extracto de Malta	10
Glucosa	18 (100 mM), 9 (50 mM)

Ajustar a pH 7.2

La concentración de glucosa debe de ser ajustada según se requiera preparar el medio con concentraciones bajas (50 mM) o altas (100 mM) de glucosa.

**Solución amortiguadora de fosfato (PBS) 10X**

	% (w/v)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14.412
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.76
NaCl	8.19



**Preparación del Amortiguador de Transferencia para Western-blot (10X)**

Reactivos	g/L
Glicina	144
Tris	30

Para preparar un litro de amortiguador de transferencia, mezclar 100 mL de amortiguador de transferencia 10X con 100 mL de metanol y aforar a 1000 mL con agua destilada.

**Preparación del amortiguador de lavado de membranas PVDF**

Reactivos	%
Tween 20	0.05 (v/v)
Leche descremada	3.00 (w/v)

Disolver en solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS)

**Solución de Revelado para Western - Blot**

Reactivos	%
Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB)	0.05 (w/v)
NiCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.02 (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	0.10 (v/v)

## Basic Protocol: Denaturing (SDS) Discontinuous Gel Electrophoresis: Laemmli Gel Method

Tomado directamente de Harper *et al.* (1996).

One-dimensional gel electrophoresis under denaturing conditions (i.e., in the presence of 0.1% SDS) separates proteins based on molecular size as they move through a polyacrylamide gel matrix toward the anode. The polyacrylamide gel is cast as a separating gel (sometimes called resolving or running gel) topped by a stacking gel and secured in an electrophoresis apparatus. After sample proteins are solubilized by boiling in the presence of SDS, an aliquot of the protein solution is applied to a gel lane, and the individual proteins are separated electrophoretically. The stacking gel, through a combination of low porosity and a lower buffer concentration and pH, concentrates proteins into a thin stack before they enter the resolving gel. 2-Mercaptoethanol (2-ME) or dithiothreitol (DTT) is added during solubilization to reduce disulfide bonds.

This protocol is designed for a vertical slab gel with a maximum size of 0.75 mm × 14 cm × 14 cm. For thicker gels or minigels, the volumes of stacking and separating gels and the operating current must be adjusted.

### Materials

- Separating and stacking gel solutions (Table 2)
- H<sub>2</sub>O-saturated isobutyl alcohol
- 1× Tris×Cl/SDS, pH 8.8 (dilute 4× Tris×Cl/SDS, pH 8.8; Table 2)
- Protein sample, on ice
- 2× and 1× SDS sample buffer (see recipe)
- Protein molecular weight standards (Tables 3 and 4)
- 6× SDS sample buffer (see recipe; optional)
- 1× SDS electrophoresis buffer (see recipe)
  
- Electrophoresis apparatus: e.g., Protean II 16-cm cell (Bio-Rad) or SE 600/400 16-cm unit (Hoefer) with clamps, glass plates, casting stand, and buffer chambers
- 0.75-mm spacers
- 0.45-µm filters (used in stock solution preparation)
- 25-mL Erlenmeyer side-arm flasks
- Vacuum pump with cold trap
- 0.75-mm Teflon comb with 1, 3, 5, 10, 15, or 20 teeth
- Screw-top microcentrifuge tubes (recommended)
- 25- or 100-µl syringe with flat-tipped needle
- Constant-current power supply

### Pour the separating gel

1. Assemble the glass-plate sandwich of the electrophoresis apparatus according to manufacturer's instructions using two clean glass plates and two 0.75-mm spacers.

If needed, clean the glass plates in liquid Alconox or RBS-35 (Pierce). These aqueous-based solutions are compatible with silver and Coomassie blue staining procedures.

2. Lock the sandwich to the casting stand.
3. Prepare the separating gel solution as directed in Table 2, degassing using a rubber-stoppered 25-mL Erlenmeyer side-arm flask connected with vacuum tubing to a vacuum pump with a cold trap. After adding the specified amount of 10% ammonium persulfate and TEMED to the degassed solution, stir gently to mix.

The desired percentage of acrylamide in the separating gel depends on the molecular size of the protein being separated. Generally, use 5% gels for SDS-denatured proteins of 60 to 200 kDa, 10% gels for SDS-

denatured proteins of 16 to 70 kDa, and 15% gels for SDS-denatured proteins of 12 to 45 kDa (Table 2).

The stacking gel is the same regardless of the separating gel used.

**Table 2** Recipes for Polyacrylamide Separating and Stacking Gels<sup>a</sup>

### SEPARATING GEL

Stock solution <sup>b</sup>	Final acrylamide concentration in separating gel (%) <sup>e</sup>									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12	13	15
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
4x Tris×Cl/SDS, pH 8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
H <sub>2</sub> O	8.75	8.25	7.75	7.50	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
10% (w/v) ammonium persulfate <sup>d</sup>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED <sup>e</sup>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

#### Preparation of separating gel

- In a 25-mL side-arm flask, mix 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide solution, 4x Tris×Cl/SDS, pH 8.8 (see reagents, below), and H<sub>2</sub>O. Degas under vacuum ~5 min. Add 10% ammonium persulfate and TEMED. Swirl gently to mix. Use immediately.

#### STACKING GEL (3.9% acrylamide)

- In a 25-mL side-arm flask, mix 0.65 mL of 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide, 1.25 mL of 4x Tris×Cl/SDS, pH 6.8 (see reagents, below), and 3.05 mL H<sub>2</sub>O. Degas under vacuum 10 to 15 min. Add 25 µl of 10% ammonium persulfate and 5 µl TEMED. Swirl gently to mix. Use immediately.

#### REAGENTS USED IN GELS

##### 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide

- Mix 30.0 g acrylamide and 0.8 g *N,N*-methylenebisacrylamide with H<sub>2</sub>O in a total volume of 100 mL. Filter the solution through a 0.45-µm filter and store at 4°C in the dark. The 2x crystallized grades of acrylamide and bisacrylamide are recommended. Discard after 30 days, as acrylamide gradually hydrolyzes to acrylic acid and ammonia.

**CAUTION:** Acrylamide monomer is neurotoxic. A mask should be worn when weighing acrylamide powder. Gloves should be worn while handling the solution, and the solution should not be pipetted by mouth.

##### 4x Tris×Cl/SDS, pH 6.8 (0.5 M Tris×Cl containing 0.4% SDS)

- Dissolve 6.05 g Tris base in 40 mL H<sub>2</sub>O. Adjust to pH 6.8 with 1 N HCl. Add H<sub>2</sub>O to 100 mL total volume. Filter the solution through a 0.45-µm filter, add 0.4 g SDS, and store at 4°C up to 1 month.

**4x TrisxCl/SDS, pH 8.8 (1.5 M TrisxCl containing 0.4% SDS)**

- Dissolve 91 g Tris base in 300 mL H<sub>2</sub>O. Adjust to pH 8.8 with 1 N HCl. Add H<sub>2</sub>O to 500 mL total volume. Filter the solution through a 0.45- $\mu$ m filter, add 2 g SDS, and store at 4°C up to 1 month .

---

<sup>a</sup>The recipes produce 15 mL of separating gel and 5 mL of stacking gel, which are adequate for a gel of dimensions 0.75 mm x 14 cm x 14 cm. The recipes are based on the SDS (denaturing) discontinuous buffer system of Laemmli (1970).

<sup>b</sup>All reagents and solutions used in the protocol must be prepared with Milli-Q-purified water or equivalent.

<sup>c</sup>Volumes are in milliliters. The desired percentage of acrylamide in the separating gel depends on the molecular size of the protein being separated.

<sup>d</sup>Best to prepare fresh. Failure to form a firm gel usually indicates a problem with the ammonium persulfate, TEMED, or both.

<sup>e</sup>TEMED, *N,N,N,N*-tetramethylethylenediamine.

4. Using a Pasteur pipet, apply the separating gel solution to the sandwich along an edge of one of the spacers until the height of the solution between the glass plates is ~11 cm.

Use the solution immediately; otherwise it will polymerize in the flask.

Sample volumes <10  $\mu$ l do not require a stacking gel. In this case, cast the resolving gel as usual, but extend the resolving gel into the comb (step 10) to form the wells. The proteins are then separated under the same conditions as used when a stacking gel is present. Although this protocol works well with single-concentration gels, a gradient gel is recommended for maximum resolution.

5. Using another Pasteur pipet, slowly cover the top of the gel with a layer (~1 cm thick) of H<sub>2</sub>O-saturated isobutyl alcohol, by gently layering the isobutyl alcohol against the edge of one and then the other of the spacers.

Be careful not to disturb the gel surface. The overlay provides a barrier to oxygen, which inhibits polymerization, and allows a flat interface to form during gel formation.

The H<sub>2</sub>O-saturated isobutyl alcohol is prepared by shaking isobutyl alcohol and H<sub>2</sub>O in a separatory funnel. The aqueous (lower) phase is removed. This procedure is repeated several times. The final upper phase is H<sub>2</sub>O-saturated isobutyl alcohol.

6. Allow the gel to polymerize 30 to 60 min at room temperature.

A sharp optical discontinuity at the overlay/gel interface will be visible on polymerization. Failure to form a firm gel usually indicates a problem with the ammonium persulfate, TEMED, or both. Ammonium persulfate solution should be made fresh before use. Ammonium persulfate should “crackle” when added to the water. If not, fresh ammonium persulfate should be purchased. Purchase TEMED in small bottles so, if necessary, a new previously unopened source can be tried.

Pour the stacking gel

7. Pour off the layer of H<sub>2</sub>O-saturated isobutyl alcohol and rinse with 1x TrisxCl/SDS, pH 8.8.

Residual isobutyl alcohol can reduce resolution of the protein bands; therefore, it must be completely removed. The isobutyl alcohol overlay should not be left on the gel longer than 2 hr.

8. Prepare the stacking gel solution as directed in Table 2.

Use the solution immediately to keep it from polymerizing in the flask.



- Using a Pasteur pipet, allow the stacking gel solution to trickle slowly into the center of the sandwich along an edge of one of the spacers until the height of the solution in the sandwich is ~1 cm from the top of the plates.

Be careful not to introduce air bubbles into the stacking gel.

- Insert a 0.75-mm Teflon comb into the layer of stacking gel solution. If necessary, add additional stacking gel to fill the spaces in the comb completely.

Again, be careful not to trap air bubbles in the tooth edges of the comb; they will cause small circular depressions in the well after polymerization that will lead to distortion in the protein bands during separation.

- Allow the stacking gel solution to polymerize 30 to 45 min at room temperature.

A sharp optical discontinuity will be visible around the wells on polymerization. Again, failure to form a firm gel usually indicates a problem with the ammonium persulfate, TEMED, or both.

Prepare the sample and load the gel

- Dilute a portion of the protein sample to be analyzed 1:1 (v/v) with 2× SDS sample buffer and heat 3 to 5 min at 100°C in a sealed screw-cap microcentrifuge tube. If the sample is a precipitated protein pellet, dissolve the protein in 50 to 100 µl of 1× SDS sample buffer and boil 3 to 5 min at 100°C. Dissolve protein molecular weight standards in 1× SDS sample buffer according to supplier's instructions; use these standards as a control (Tables [3](#) and [4](#)).

For dilute protein solutions, consider using 5:1 protein solution/6× SDS sample buffer to increase the amount of protein loaded. Proteins can also be concentrated by precipitation in acetone, ethanol, or trichloroacetic acid (TCA), but losses will occur.

For a 0.8-cm-wide well, 25 to 50 µg total protein in <20 µl is recommended for a complex mixture when staining with Coomassie blue, and 1 to 10 µg total protein is needed for samples containing one or a few proteins. If silver staining is used, 10- to 100-fold less protein can be applied (0.01 to 5 µg in <20 µl depending on sample complexity).

To achieve the highest resolution possible, the following precautions are recommended. Prior to adding the sample buffer, keep samples at 0°C. Add the SDS sample buffer (room temperature) directly to the 0°C sample (still on ice) in a screw-top microcentrifuge tube. Cap the tube to prevent evaporation, vortex, and transfer directly to a 100°C water bath for 3 to 5 min. Let immunoprecipitates dissolve for 1 hr at 56°C in 1× SDS sample buffer prior to boiling. DO NOT leave the sample in SDS sample buffer at room temperature without first heating to 100°C to inactivate proteases (see [Critical Parameters and Troubleshooting](#)). Endogenous proteases are very active in SDS sample buffer and will cause severe degradation of the sample proteins after even a few minutes at room temperature. To test for possible proteases, mix the sample with SDS sample buffer without heating and leave at room temperature for 1 to 3 hr. A loss of high-molecular-weight bands and a general smearing of the banding pattern indicate a protease problem. Once heated, the samples can sit at room temperature for the time it takes to load samples.

**Table 3** Molecular Weights of Protein Standards for Polyacrylamide Gel Electrophoresis<sup>a</sup>

Protein	Molecular weight (Da)
Cytochrome <i>c</i>	11,700
$\alpha$ -Lactalbumin	14,200
Lysozyme (hen egg white)	14,300
Myoglobin (sperm whale)	16,800
$\beta$ -Lactoglobulin	18,400
Trypsin inhibitor (soybean)	20,100
Trypsinogen, PMSF treated	24,000
Carbonic anhydrase (bovine erythrocytes)	29,000
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (rabbit muscle)	36,000
Lactate dehydrogenase (porcine heart)	36,000
Aldolase	40,000
Ovalbumin	45,000
Catalase	57,000
Bovine serum albumin	66,000
Phosphorylase <i>b</i> (rabbit muscle)	97,400
$\beta$ -Galactosidase	116,000
RNA polymerase, <i>E. coli</i>	160,000
Myosin, heavy chain (rabbit muscle)	205,000

<sup>a</sup>Protein standards are commercially available as prepared mixtures (see Table 4).

**Table 4** Protein Standard Mixtures Available from Selected Suppliers

Applications <sup>a</sup>	1-D	2-D <sup>b</sup>	Im	Pre <sup>c</sup>	Fluor	Gly	Phos	Bio	Tag	IEF	Nat
Bio-Rad	X	X	X					X	X	X	
CalBiochem	X						X				
Cell Signaling Technology	X		X					X			
Favorgen	X		X								
GE Healthcare	X		X	X				X	X	X	
Invitrogen	X		X	X	X	X	X		X	X	
NEB	X		X								
Norgen Biotek	X		X								
Novagen	X		X	X					X		
PerkinElmer	X		X								
Pierce	X	X	X	X							
Promega	X										
Qiagen	X		X						X		
R & D Systems	X		X					X			
Roche Applied Science	X								X		
Sigma-Aldrich	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
Upstate	X		X				X				
USB	X		X							X	

<sup>a</sup>Abbreviations: 1-D, one-dimensional gels; 2-D, two-dimensional gels; Im, immunoblotting; Pre, prestained; Fluor, fluorescent; Gly, glycoprotein; Phos, phosphoprotein; Bio, biotinylated; Tag, tagged; IEF, isoelectric focusing; Nat, native.

<sup>b</sup>2-D standards are useful as independently characterized internal controls or reference standards for 2-D SDS-PAGE. Many investigators simply use an internally characterized test sample as a reference set.

<sup>c</sup>Prestained standards, while not as sharply delineated as unstained standards, can be used to monitor progress of the separation since the bands are visible through the gel cassette during electrophoresis. They are also useful for marking the position of a band after electroblotting to a nitrocellulose or PVDF membrane prior to immunoassay or analysis by mass spectrometry.

- Carefully remove the Teflon comb without tearing the edges of the polyacrylamide wells. After the comb is removed, rinse wells with 1× SDS electrophoresis buffer.

The rinse removes unpolymerized monomer; otherwise, the monomer will continue to polymerize after the comb is removed, creating uneven wells that will interfere with sample loading and subsequent separation.

- Using a Pasteur pipet, fill the wells with 1× SDS electrophoresis buffer.

If well walls are not upright, they can be manipulated with a flat-tipped needle attached to a syringe.

- Attach gel sandwich to upper buffer chamber following manufacturer's instructions.
- Fill lower buffer chamber with the recommended amount of 1× SDS electrophoresis buffer.
- Place sandwich attached to upper buffer chamber into lower buffer chamber.

- Partially fill the upper buffer chamber with 1× SDS electrophoresis buffer so that the sample wells of the stacking gel are filled with buffer.

Monitor the upper buffer chamber for leaks and, if necessary, reassemble the unit. A slow leak in the upper buffer chamber may cause arcing around the upper electrode and damage the upper buffer chamber.

- Using a 25- or 100- $\mu$ l syringe with a flat-tipped needle, load the protein sample(s) into one or more wells by carefully applying the sample as a thin layer at the bottom of the wells. Load control wells with molecular weight standards. Add an equal volume of 1× SDS sample buffer to any empty wells to prevent spreading of adjoining lanes.

Disposable loading tips can be used with automatic pipettors to simplify loading.

Preparing the samples at approximately the same concentration and loading an equal volume to each well will ensure that all lanes are the same width and that the proteins run evenly. If unequal volumes of sample buffer are added to wells, the lane with the larger volume will spread during electrophoresis and constrict the adjacent lanes, causing distortions.

The samples will layer on the bottom of the wells because the glycerol added to the sample buffer gives the solution a greater density than the electrophoresis buffer. To keep bands tight, hold the tip of the needle near the bottom of the well and load the samples slowly. The bromphenol blue in the sample buffer makes sample application easy to follow visually.

- Fill the remainder of the upper buffer chamber with additional 1× SDS electrophoresis buffer so that the upper platinum electrode is completely covered. Do this slowly so that samples are not swept into adjacent wells.

#### Run the gel

- Connect the power supply to the cell and run at 10 mA of constant current for a slab gel 0.75 mm thick, until the bromphenol blue tracking dye enters the separating gel. Then increase the current to 15 mA.

For a standard 16-cm gel sandwich, 4 mA per 0.75-mm-thick gel will run ~15 hr (i.e., overnight); 15 mA per 0.75-mm gel will take 4 to 5 hr. To run two gels or a 1.5-mm-thick gel, simply double the current. When running a 1.5-mm gel at 30 mA, the temperature must be controlled (10° to 20°C) with a circulating constant-temperature water bath to prevent “smiling” (curvature in the migratory band). Temperatures <5°C should not be used because SDS in the running buffer will precipitate.

If the level of buffer in the upper chamber decreases, a leak has occurred.

- After the bromphenol blue tracking dye has reached the bottom of the separating gel, disconnect the power supply.

Refer to Safety Considerations under Electricity and Electrophoresis.

#### Disassemble the gel

- Discard electrophoresis buffer and remove the upper buffer chamber with the attached gel sandwich.
- Orient the gel so that the order of the sample wells is known, remove the sandwich from the upper buffer chamber, and lay the sandwich on a sheet of absorbent paper or paper towels.
- Carefully slide one of the spacers halfway from the edge of the sandwich along its entire length. Use the exposed spacer as a lever to pry open the glass plate, exposing the gel.

26. Carefully remove the gel from the lower plate. Cut a small triangle off one corner of the gel so the lane orientation is not lost during staining and drying. Proceed with protein detection.

Gradient gels are most easily picked up without tearing from the high concentration end of the gel using gloved fingers. Single concentration gels <10% can be picked up and placed in fixative, but are more easily removed if first immersed in fixative while left on the plate, allowing the gel to float off.

The gel can be stained with Coomassie blue or silver, or proteins can be electroeluted, electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for subsequent staining or sequence analysis, or transferred to a membrane for immunoblotting. If the proteins are radiolabeled, they can be detected by autoradiography.