



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“VISIÓN ACTUAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN
STREPTOMYCES”**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

LUIS CONTRERAS CASTRO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS**
VOCAL: **Profesor: JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA**
SECRETARIO: **Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ**
1er. SUPLENTE: **Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA**
2° SUPLENTE: **Profesor: SANTIAGO ÁVILA RÍOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Análisis Químico, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez

SUSTENTANTE:

Luis Contreras Castro

Agradecimientos

A mis padres, a mi hermana y a mis abuelos, sin cuyo apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A mi asesor, ya que sin sus conocimientos, su apoyo y sobre todo su paciencia, no podría haber concluido esta etapa.

A esos amigos de toda la vida que han estado conmigo ya tanto tiempo, en las buenas como en las malas, con la esperanza de que sigan ahí por más que los años pasen.

A todos y cada uno de los grandes amigos que conocí en este periodo, que me acompañaron en cada momento, que me hicieron ver la vida con otros ojos, que abrieron mis horizontes, que me demostraron que la vida realmente vale la pena, que me enseñaron a ser una mejor persona y con los que espero continuar compartiendo mi camino.

A DGAPA (Proyecto PE206207) por proporcionar apoyo financiero para aplicar de mejor manera la parte bioinformática empleada en este trabajo.

Al proyecto CONACyT CO1-46894 por el financiamiento otorgado al proporcionarme una beca como apoyo al estudio realizado.

Contenido

Objetivos	6
Metodología.....	6
Introducción.....	7
La clase Actinobacteria.....	7
Generalidades del género Streptomyces.....	9
Importancia de Streptomyces en la industria	20
Desarrollo	30
Estudios Genómicos de Streptomyces	30
Metabolismo secundario de Streptomyces.....	41
Formación del micelio aéreo.....	41
Esporulación	51
Regulación del metabolismo secundario	58
Conclusiones.....	72
Recomendaciones.....	73
Anexos	74
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	84
Bibliografía	86

Objetivos

- Dar un panorama general sobre la visión actual del metabolismo secundario del género *Streptomyces* por su enorme importancia en la rama industrial.
- Resaltar la importancia sobre el estudio de éste género debido a su estrecha relación con tanto la síntesis de antibióticos ya conocidos como el descubrimiento de nuevos compuestos.
- Generar interés en el tema al mostrar las distintas perspectivas abordadas por otros profesionales en el mundo, para así intentar abrir nuevos campos de estudio tanto en la Facultad de Química de la UNAM como en los centros de investigación del país en general.

Metodología

Para la realización de este trabajo de investigación se consultaron primero los trabajos relevantes sobre la naturaleza de los actinomicetos, así como de las generalidades del género *Streptomyces*. Se prosiguió a conseguir artículos relacionados con las irregularidades genéticas dadas por el género, para después proceder a buscar aquellos trabajos de secuenciación de cada especie en particular. Lo siguiente fue conseguir información acerca del metabolismo secundario del género de microorganismos en cuestión, estando dada por *Streptomyces coelicolor* de manera mayoritaria en casi todos los trabajos encontrados. Por último se buscaron artículos que intentaran ahondar en la naturaleza regulatoria de varias proteínas relacionadas con el tema para lograr concluir con el panorama general del trabajo. Todos los artículos fueron encontrados en la base de datos del buscador del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Introducción

La clase Actinobacteria.

Las bacterias Gram-positivas se dividen en 2 grandes ramas: los organismos con bajo contenido de citosina y guanina, conteniendo géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, básicamente del filum Firmicutes; y los organismos de alto contenido de guanina y citosina, denominados genéricamente como “actinomicetos”. Muchos de estos últimos, aunque no todos, habitúan el desarrollo de micelios en algunas etapas de su vida, lo cual era considerado en un principio como característico de éstos (Dworkin *et al.*, 2007) y además hizo que por muchos años se les considerara como “hongos” precisamente por su similitud morfológica. La clase *Actinobacteria*, pertenece a este último grupo y, en términos de número y variedad de especies identificadas, representa una de las más grandes unidades taxonómicas dentro de los 18 linajes actualmente reconocidos dentro del dominio *Bacteria* e incluye a 5 subclases y 14 subórdenes. En agosto del año 2008, esta clase comprendía 51 familias y 253 géneros (Fragoso, 2009). El alto contenido de guanina y citosina de *Actinobacteria*, puede ir desde un 51% en algunas corinebacterias, hasta un 70% en *Streptomyces* y *Frankia* (Ventura *et al.*, 2007).

Estudios moleculares basados en el secuenciamiento del gen 16S rRNA de distintos grupos dentro de la clase *Actinobacteria* ha llevado al reconocimiento de varias familias y géneros, los cuales no solo incluyen organismos con crecimiento micelial, sino también organismos con morfología más simple, como lo son las bifidobacterias y los micrococos (Fig. 1).

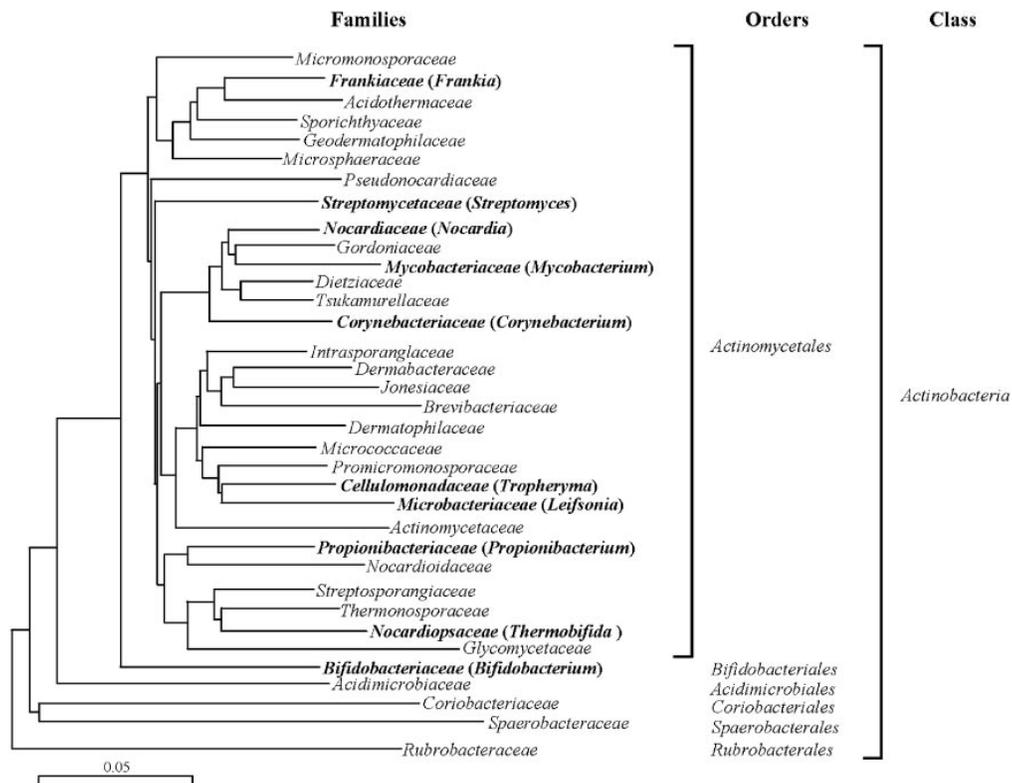


Fig. 1. Árbol filogenético de *Actinobacteria* basado en 1,500 nucleótidos del gen 16S rRNA. Escala, 5 nucleótidos (Ventura *et al.*, 2007).

La divergencia de las actinobacterias de otras bacterias es tan antigua que no es posible identificar cual es el grupo más cercano filogenéticamente a *Actinobacteria* con certeza (Ventura *et al.*, 2007) (Fig. 2). *Actinobacteria* exhibe una variedad muy amplia de morfologías, desde cocoide, coco-bacilos, hasta fragmentos de hifas y micelios altamente diferenciados. También exhiben diversas propiedades metabólicas y fisiológicas, generando todo tipo de metabolitos tanto primarios como secundarios, desde enzimas como proteasas e hidrolasas, hasta moléculas con capacidad antimicrobiana. Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos lo que incluye los ambientes marinos. Se puede encontrar variedad, a su vez, en sus “estilos de vida” pues los hay desde patógenos, comensales de plantas, simbiontes fijadores de nitrógeno, habitantes del tracto gastrointestinal hasta comensales del suelo. Algunos poseen características inusuales, como la

formación de micelio aéreo esporulativo en el género *Streptomyces*, o el persistente estado no replicativo exhibido de ciertas micobacterias.

La importancia en el estudio de *Actinobacteria* está centrada en dos géneros de alto impacto económico para la salud pública: a) *Mycobacterium*, los cuales incluyen al agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad y b) *Streptomyces*, los cuales son el modelo genético por excelencia en cuanto a la producción de la gran mayoría de los antibióticos empleados de manera comercial (Baltz, 2007; Ventura *et al.*, 2007).

Esta capacidad ha convertido a las especies de *Streptomyces* en los microorganismos primarios de producción de antibióticos, estudiados y explotados en la industria farmacéutica. Por su importancia para esta área industrial, el presente trabajo se centró en el género *Streptomyces* y en lo que hasta el momento se ha reportado para la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios, entre los que destacan precisamente, los antibióticos.

Generalidades del género Streptomyces.

El género *Streptomyces* comprende un gran grupo de microorganismos con algunos rasgos muy característicos comparados con muchas otras bacterias por su complejo ciclo de vida parecido al fúngico y su olor a tierra. Son microorganismos ubicuos y muestran una gran diversidad en cuanto al color de sus colonias, pigmentos secretados, etc., comparándolos con otras bacterias. Pertenecen a la familia *Streptomycetaceae* dentro del orden de los *Actinomycetales*, creada por Waksman y Henrici en 1943 (Waksman y Henrici, 1943). Originalmente, esta familia solo contenía a *Streptomyces*; varios años después, los géneros *Kitasatospora* y *Streptacidiphilus* se agregaron (Zhang *et al.* 1997; Kim *et al.* 2003). El género se encuentra definido por características tanto quimiotaxonómicas como fenotípicas y genéticas, dándose actualmente un mayor

énfasis a las homologías en el gen 16SrRNA, además del análisis de la pared celular y los patrones de ácidos grasos.

Las bacterias del género *Streptomyces* son consideradas como Gram-positivas, y resistentes a la decoloración de ácido-alcohol. Son organismos aeróbicos cuyo porcentaje de G y C es de 66 a 78 mol%. El tamaño de su genoma radica alrededor de 9 Mb (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). La hifa vegetativa (0.5-2.0µm de diámetro) produce un micelio extensamente ramificado que raramente se fragmenta. El micelio aéreo forma cadenas de 3 a más esporas cuando madura. Algunas especies pueden tener cadenas cortas de esporas en el micelio vegetativo y las esporas son no móviles. En un medio de agar complejo se forman colonias discretas, liquenoides y butirosas. La superficie de las colonias inicialmente es relativamente suave, pero conforme se desarrolla micelio aéreo la colonia se vuelve flocosa, granular, polvorienta o aterciopelada (Fig. 2).

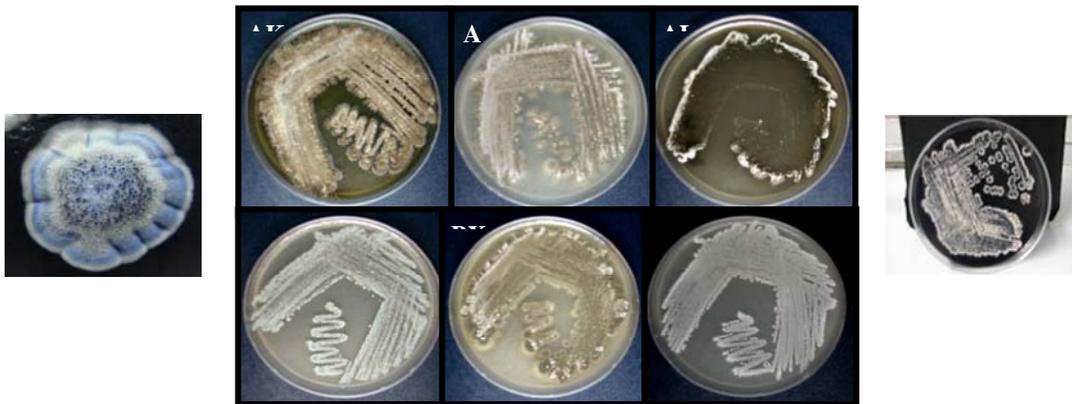


Fig. 2. Fotografía de colonias de *Streptomyces* (Maldonado, sin publicar).

Los estreptomicetos tienen, comparándolos con otras bacterias, un ciclo de vida atípico. El ciclo comienza con una espora, también llamada *artrospora* o *conidia*. La germinación comienza bajo condiciones ambientales favorables, las cuales dependen de la temperatura, de la presencia de nutrientes exógenos como pedazos de zanahoria, micelio de hongos (Goodfellow y Williams, 1983), condiciones aeróbicas y falta de componentes inhibitorios de otros microorganismos (Kutzner, 1981) para generar una red extensamente ramificada de hifas multinucleadas conocida como el micelio vegetativo, de sustrato o primario. La diferenciación comienza con la formación de hifa aérea especializada

(el micelio secundario), la cual crece hacia el exterior de la superficie de la colonia. Más tarde, esta hifa aérea es septada en compartimentos uninucleados y se convierten en cadenas de esporas que rara vez se fragmentan. El número de esporas en una cadena puede variar de 3 a más (Fig. 3).

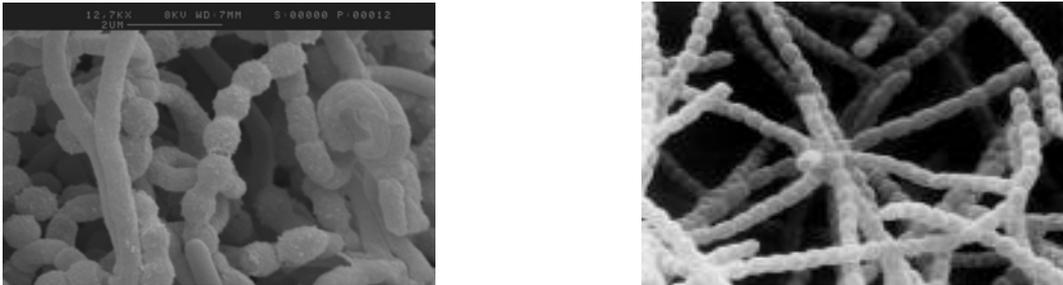


Fig 3. Microscopía electrónica de colonias de *Streptomyces* mostrando la hifa y esporas (Maldonado, sin publicar).

Para completar el ciclo, las esporas son liberadas al ambiente (Fig. 4). Por la relevancia y vínculo con la síntesis de metabolitos secundarios este tema será abordado más a fondo posteriormente.

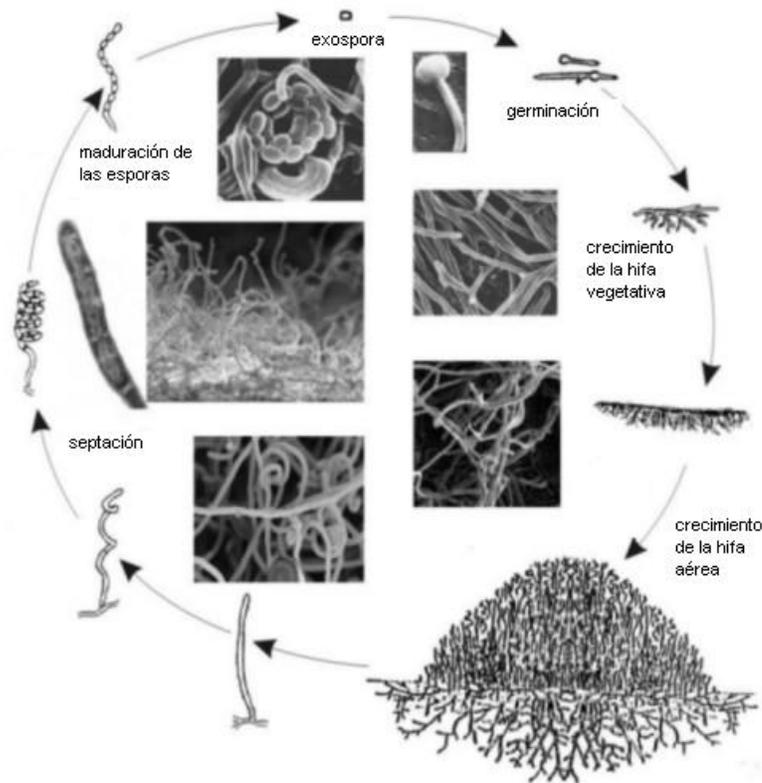


Fig. 4. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Obtenido de <http://www.iitd.pan.wroc.pl/Dept/Mic/gb/projects.html>

Los estreptomicetos son organismos con respiración oxidativa obligada (excepto *S. thermoautotrophicus*, que crece bajo atmósferas micro-aerofílicas), quimiorganotróficos (con excepción de *S. thermocarboxydovorans*, *S. thermocarboxydus*, *S. thermospinisporus* y *S. thermoautotrophicus*, los cuales tienen respectivamente un metabolismo quimiolitótrofo y el último, autótrofo) y requieren niveles bajos de humedad. La reacción de la catalasa es positiva. Muchas especies representativas pueden degradar sustratos poliméricos como caseína, gelatina, hipoxantina, almidón y celulosa. Además, utilizan como fuentes de carbono para su crecimiento una amplia gama de compuestos orgánicos, la cual es una de las características utilizadas para clasificar al género. Es requerida, a su vez, una fuente de nitrógeno inorgánico para su crecimiento (Williams *et al.*, 1989). La temperatura de crecimiento se encuentra entre los 25°C y los 35°C, siendo la óptima de 28°C para la mayor parte de los estreptomicetos; sin embargo, se conocen algunas especies que son termofílicas y psicofílicas. La mayoría de los estreptomicetos son neutrófilos y pueden crecer en un rango de pH entre 5.0 y 9.0, aunque se ha establecido que el rango óptimo de crecimiento es entre 6.5 y 8.0. Se encuentran ampliamente distribuidos en los suelos terrestres, incluidas las compostas. La primera especie caracterizada que se designó como la representativa del género es *Streptomyces albus*.

Muy pocas especies son patogénicas para animales y otras pocas fitopatógenas. Hasta ahora solamente 12 especies son consideradas virulentas para las plantas, siendo las de mayor importancia las que generan costras en las papas debido a las enormes pérdidas económicas que esto ocasiona. Lo anterior es notoriamente minúsculo si consideramos que el género *Streptomyces* actualmente incluye más de 600 especies. De lo que se ha reportado en la literatura, solo dos especies son patógenas para el humano: *S. somaliensis* y *S. sudanensis* (Fragoso, 2009). Ambas especies causan *actinomicetoma*, el cual es una infección localizada, crónica, progresiva y destructiva de la piel, tejido subcutáneo y eventualmente del hueso (Fig. 5). Esta enfermedad es endémica de climas tropicales y subtropicales y lleva frecuentemente a deformidades así como

a la amputación de las extremidades infectadas. En México se han reportado 1844 casos de *actinomycetoma* desde 1901 hasta 2004, siendo el 85,5% de los casos reportados en todo el continente americano. De todos estos casos en México, el 87% es causado por *Nocardia brasiliensis*, mientras que el 13% restante por *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otidiscavarum* y *Streptomyces somaliensis*. En cuanto a la distribución de los casos recopilados en México, se han reportado casos en casi toda la República. Predomina en los estados de Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (Serrano, 2007).



Fig. 5. Imagen de actinomycetoma tomada por el Dr. Rubén López Martínez de la página de la Facultad de Medicina de la UNAM.

El género *Streptomyces* es muy diverso morfológicamente. El color del micelio aéreo o vegetativo, la configuración de las cadenas de esporas y la ornamentación de las esporas son utilizadas como marcadores taxonómicos. Todas son determinadas utilizando tiempos de incubación bien definidos y medios de cultivo específicos (Shirling y Gottlieb, 1966), siendo algunos de los utilizados el agar extracto de soya y tripticasa y el agar avena o medio de Bennett. En un principio se desarrolló una rueda de colores para la determinación del color del

micelio (Tresner y Backus, 1963), aunque su uso era algo problemático debido a las grandes diferencias entre especies. Fue hasta años después que Shirling y Gottlieb (1966) realizaron un estudio más a fondo de caracterización, en el que además del color, se ayudaron con la configuración de las cadenas de esporas, la cual actualmente es determinada por microscopía de electrones y asignada a una de las siguientes categorías: rectas, curvas, en forma de espiral y verticiladas. Idealmente, sólo una configuración es encontrada en una cepa, aunque se han reportado combinaciones de distintas configuraciones (Shirling y Gottlieb, 1968). La ornamentación de las esporas puede ser suave, espinosa, rugosa o peluda (Fig. 6).

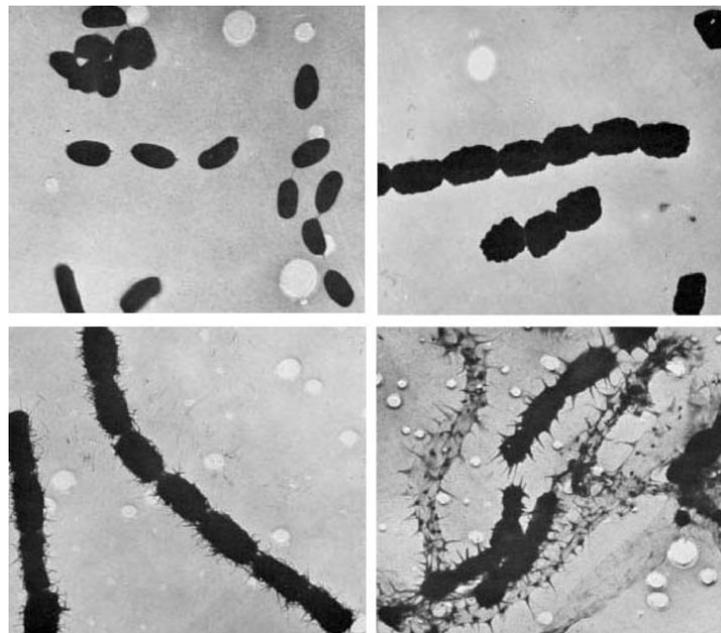


Fig. 6. Micrografías de electrones de 4 tipos de artrosporas de estreptomicetos: suave, rugosa, peluda y espinosa (Dworkin, *et al.*, 2007).

La producción de pigmentos depende en gran parte de la composición del medio y las condiciones de cultivo y son utilizados también como marcadores taxonómicos. Los pigmentos solubles son predictivos en muchos casos para la producción de componentes bioactivos. No se debe olvidar que las diferencias entre especies de *Streptomyces* no solo radican en sus pigmentos, sino también en la producción de sus metabolitos secundarios entre los cuales los de mayor

interés en el área farmacéutica siguen siendo los antibióticos por su impacto en salud pública.

Una de las características quimiotaxonómicas más importantes para la identificación de cepas de éste género es la pared celular de peptidoglicano. Ésta contiene grandes cantidades de ácido LL-diaminopimérico (LL-A₂pm). La pared celular de *Streptomyces* muestra la típica ultraestructura y composición química de las bacterias Gram-positivas. Tienen una estructura de varias capas de cadenas de peptidoglicano. El peptidoglicano es un heteropolímero que consiste de cadenas de heteropolisacáridos unidas entre sí por pequeñas unidades peptídicas. La base del peptidoglicano es construida alternando unidades β -1,4 de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. El grupo carboxilo del ácido murámico es sustituido por un oligopéptido alternando los aminoácidos D- y L (Schleifer y Kandler, 1972). *Streptomyces* se caracteriza por el tetrapéptido L-Ala-D-Glu-LL-A₂pm-D-Ala (Fig. 7). Este tetrapéptido es unido por un puente de pentaglicina, el cual se extiende desde el carbono terminal de la D-alanina de la unidad peptídica, hasta el grupo amino localizado en el carbono D del LL-A₂pm, resultando en una estructura macromolecular que forma la envoltura de la célula. Este tipo de peptidoglicano, LL-A₂pm-Gly₅ o peptidoglicano tipo A3 γ (Schleifer y Kandler, 1972), es diagnóstico para los estreptomicetos. Se puede encontrar ácido acetilmurámico en el tipo glicolil de la pared celular de *Streptomyces*, así como en todos los demás actinomicetos. Residuos de fosfato del ácido murámico son los puntos de unión al ácido teicóico, el cual es diagnóstico para las bacterias Gram-positivas. Los ácidos teicóicos de la pared celular (substancias poliméricas que contienen grupos fosfodiéster repetidos) consisten de polioles (como glicerol y ribitol), azúcares del tipo N-acetilamino o los dos. Los ácidos teicóicos de los estreptomicetos son del mismo tipo de estructura que los de las bacterias Gram-positivas, pudiendo contener fosfato de ribitol o polímeros de glicerol fosfato. Además de estas características, el tipo de acil de los residuos de muramil en los peptidoglicanos de la pared celular es de acetyl (Uchida y Seino, 1997).

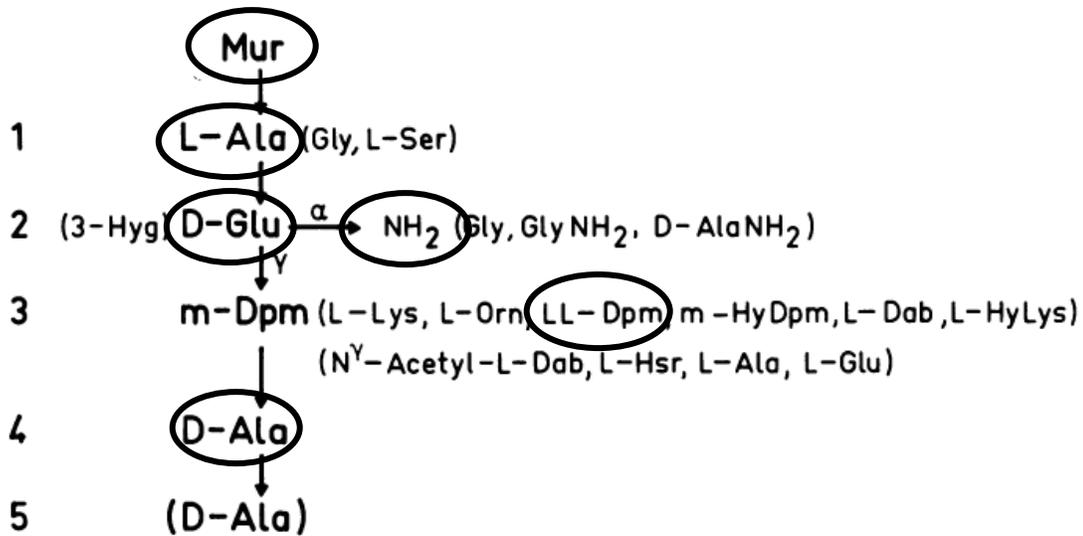


Fig. 7. Variaciones de las subunidades del peptidoglicano. Los aminoácidos entre paréntesis pueden reemplazar al aminoácido o sustituyente correspondientes. La composición y estructura del peptidoglicano varía enormemente en las bacterias gram-positivas. En el caso de *Streptomyces*, los elementos circulados son los que componen a la molécula (Schleifer, 1972).

Además de la pared celular, existen otras características fenotípicas que pueden llegar a clasificar a los estreptomicetos, aunque no son particulares ni concluyentes, pero dignas de mención:

- Los lípidos de membrana de *Streptomyces* se componen principalmente de difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), y manósidos de fosfatidilinositol (PIMs). La composición de los lípidos ha sido extensivamente investigada y resumida por Lechevalier *et al.* (1977). Los glicolípidos no son consistentes en los estreptomicetos, y su composición tanto cualitativa como cuantitativa depende en sobremanera de las condiciones de cultivo. Bajo condiciones limitantes de fosfatos, la cantidad de glicolípidos aumenta significativamente. Los marcadores lipídicos del tipo II (PII) son fosfatidiletanolamina (PE), metil-PE, hidroxil-PE y liso-PE. Además de otras familias, los miembros de la familia *Streptomycetaceae* contienen los fosfolípidos tipo II. Lípidos adicionales como fosfomonoéster (PME) y OH-PE, además de la presencia o ausencia de PI y PG, ayudan a una mejor diferenciación.

- Los estreptomicetos contienen menaquinonas (Collins y Jones, 1982), y como la mayor parte de los actinomicetos, sintetizan quinonas que tienen un lado de la cadena isoprenoide parcialmente saturada en la posición 3 del anillo de naftoquinona. Los estreptomicetos sintetizan menaquinonas con una cadena isoprenoide altamente hidrogenada. De 3 a 4 unidades isoprenoides (muy raras veces 5) se encuentran saturadas. Los actinomicetos que pertenecen a este tipo sintetizan menaquinonas con la misma longitud de cadena pero con diferente grado de saturación.
- Por último, los miembros del género carecen de ácidos micólicos y contienen cantidades importantes de ácidos grasos saturados *iso* y *anteiso*. Los estreptomicetos sintetizan ácidos grasos ramificados terminales. Los ácidos grasos *anteiso* son sintetizados desde 2-metilbutirato, llevando a un número non de carbonos. Por otro lado, si los compuestos iniciales son isovalerato e isobutirato, la formación de ácidos grasos *iso* se lleva a cabo con un número non de átomos de carbono (Dworkin *et al.*, 2007).

Dentro de la quimiotaxonomía no se deben olvidar los análisis celulares en los que se aplica la espectrometría de masa en combinación con la pirólisis al punto de Curie (PyMS), los ensayos utilizando fagos específicos y los estudios de proteómica de cada microorganismo (Anderson y Wellington, 2001). La PyMS consiste en que las células de estudio son expuestas a altas temperaturas por medio de una degradación termal no oxidativa, y el pirolisado resultante es analizado utilizando espectrometría de masas, generando un “fingerprint” único del microorganismo. Los ensayos de proteómica son perfiles de proteínas analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida para generar patrones de bandas que pueden ser utilizados para delimitar especies y subespecies. Las proteínas pueden ser analizadas tanto por electroforesis de 1 dimensión como de 2 dimensiones.

Junto con la diferenciación de las características quimiotaxonómicas, la aplicación de técnicas moleculares al análisis de los genomas bacterianos es ampliamente utilizada para la clasificación y diferenciación del género. Dentro de las técnicas más utilizadas se encuentra la hibridación DNA-DNA de cromosomas totales, los ensayos de restricción, ensayos de RAPD (Amplificados al azar de DNA polimórfico), secuenciamiento del cromosoma bacteriano o sólo de la región 16SrRNA, entre otras. La comparación de las secuencias del rRNA es una herramienta particularmente poderosa en la taxonomía de *Streptomyces*, debido a que estos genes se encuentran muy conservados entre las bacterias. Existen 3 regiones dentro del gen 16SrRNA (Fig. 8) de *Streptomyces* que cuentan con la suficiente variación en su secuencia para poder generar sondas que clasifiquen al género (regiones alfa y beta) y a la especie (regiones gamma). Los genes 23SrRNA, 5SrRNA y las secuencias de otras proteínas ribosomales también han sido utilizadas para investigar la relación entre especies dentro del género *Streptomyces* (Anderson y Wellington, 2001) pero lo extenso del género ha impedido generar una base de datos tan grande como la que existe para el gen del 16S. No debe olvidarse que la clasificación filogenética utilizando solamente técnicas moleculares, como la secuenciación del gen 16SrRNA, es incompleta debido a la enorme complejidad del género, por lo que debe ser acompañada por técnicas quimiotaxonómicas para llevar a cabo el correcto estudio de la especie. Un árbol filogenético de *Streptomyces* puede ser revisado en el anexo 1. No se incluyen los estreptomicetos no cultivables debido a que no se han realizado tales análisis a la fecha.

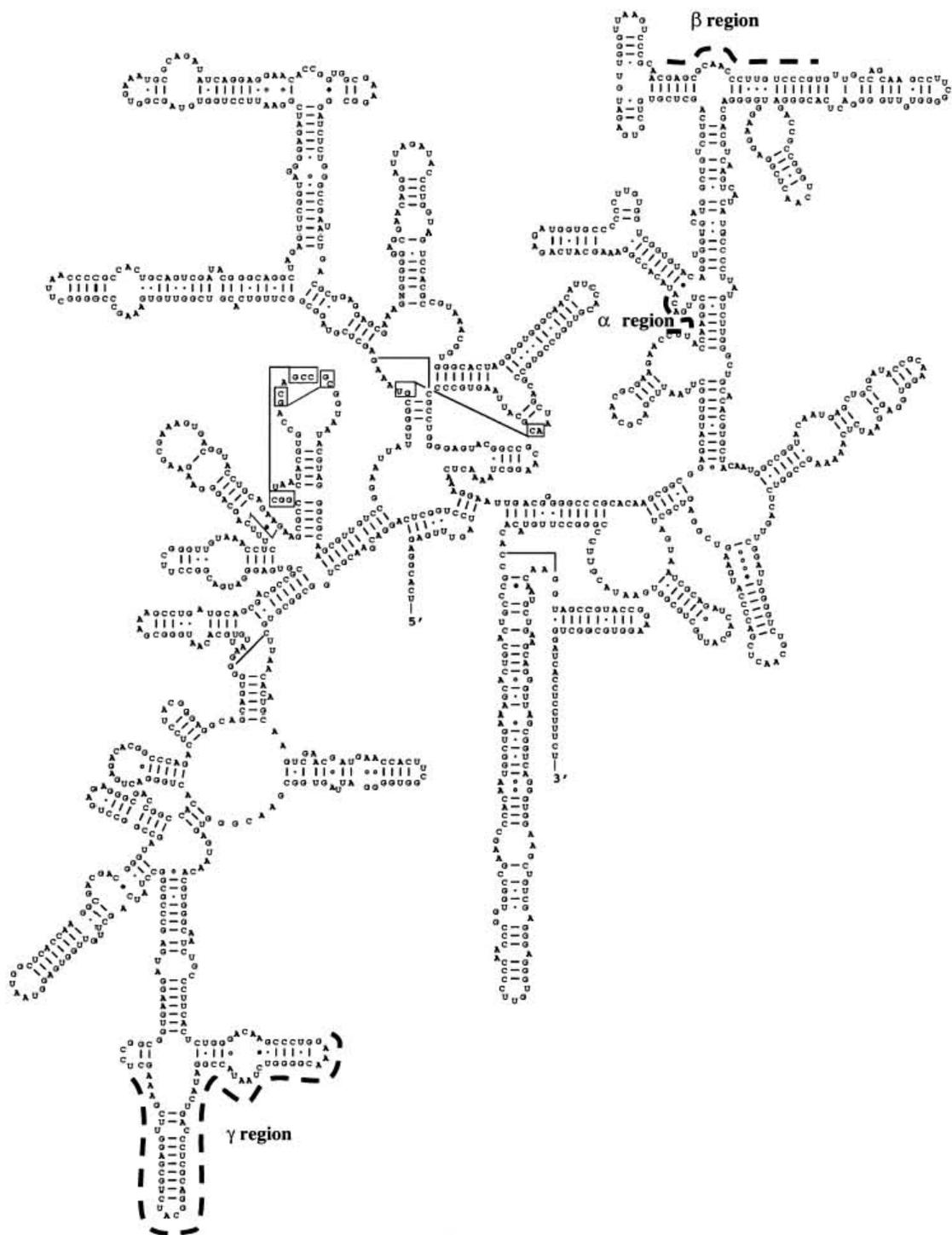


Fig 8. Estructura secundaria del 16SrRNA de *Streptomyces coelicolor*. Las regiones variables que son utilizadas como diagnósticas para el género *Streptomyces* están marcadas (α , β , y γ) y corresponden a los nucleótidos 982-998, 1102-1122 y 158-203 respectivamente (Anderson y Wellington, 2001).

Importancia de Streptomyces en la industria

El género *Streptomyces* usa una extraordinaria variedad de mecanismos extracelulares para su crecimiento primario y para facilitar asociaciones íntimas con otros microorganismos, así como para alcanzar los mencionados atributos complejos de desarrollo y de metabolismo secundario. Esto lo vuelve un género sumamente importante desde un punto de vista industrial. Desde el descubrimiento de la estreptomicina por Waksman como el primer antibiótico de uso terapéutico en el tratamiento de la tuberculosis en 1942, se ha encontrado que los estreptomicetos sintetizan una impresionante cantidad de inhibidores químicos para distintos procesos celulares, así como proteínas de uso variado. Estos incluyen antibióticos, fungicidas, citostáticos, moduladores de la respuesta inmune y efectora del crecimiento de las plantas (Omura, 1992; Hopwood, 2007). Los genes para la síntesis de tales metabolitos probablemente emergieron hace millones de años (Baltz, 2006). Esto es importante, si se quiere comenzar a comprender el origen de las vías metabólicas relacionadas con metabolitos extracelulares o incluso para la identificación de nuevas rutas metabólicas.

El ancestro más reciente de los estreptomicetos modernos parece haber vivido hace 440 millones de años, cuando probablemente se encontraba íntimamente relacionado con la colonización de la tierra por las plantas verdes (Chater y Chandra, 2006). Este panorama ubica a estas bacterias en un papel formativo en la evolución del suelo. En este hábitat, las esporas de *Streptomyces* son muy abundantes, generando filamentos de hifas ramificadas bajo las condiciones adecuadas. Esta adaptación los ayuda a adherirse y a penetrar los restos orgánicos insolubles de hongos, plantas y otros organismos, los cuales son degradados por exoenzimas hidrolíticas para proveer los nutrientes necesarios para su crecimiento. Esto da una idea de que no solo los estreptomicetos se encargan de generar metabolitos secundarios de importancia industrial, sino también otros metabolitos como las enzimas mencionadas, y en gran cantidad. Cuando estos microorganismos son cultivados por unos cuantos días en el laboratorio, ya sea en nutrientes solubles o en materiales insolubles, pero que

asemejen más sus condiciones naturales, desarrollan todos los componentes característicos explicados anteriormente (micelio vegetativo, hifa aérea y esporas). Su crecimiento aéreo es logrado a expensas de la biomasa del micelio vegetativo, el cual sufre una lisis extensiva para alimentar la fase reproductiva. De este modo, los pocos miligramos de biomasa del micelio vegetativo de la colonia son convertidos en millones de esporas. La producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios se encuentra estrechamente relacionada con esta vía de desarrollo, de ahí su importancia (Chater *et al.*, 2010).

En cuanto a la producción de enzimas, las más industrializadas son las hidrolasas, principalmente utilizadas en detergentes, comidas y bebidas, textiles y comida animal. Diferentes *Streptomyces spp* pueden sintetizarlas debido a su metabolismo no fastidioso y a su desarrollado sistema de secreción. El análisis completo del genoma de *S. coelicolor* ha revelado que, respectivamente el 7.8% y el 10.5% de las proteínas son transportadoras y proteínas secretadas (Weber *et al.*, 2003). Además, los estreptomicetos están considerados como organismos GRAS (del inglés, *Generally Regarded As Safe* o usualmente considerados seguros), lo que significa que no son vistos como patógenos importantes del humano. Entre las hidrolasas más importantes producidas para la industria, se encuentran las proteasas, las lipasas, las alfa-amilasas, las fosfatasas, las xilosa-isomerasas y las xilanasas (Tabla 1.). Son usadas, de manera respectiva, para la degradación de proteínas (textil; Aretz *et al.*, 1989), para remover grasa (detergentes; Sommer *et al.*, 1997), para la hidrólisis del almidón en glucosa (producciones de cerveza, bebidas, detergentes), para la liberación de fosfatos (alimentación animal; Labeda *et al.*, 1997), la interconversión de glucosa y fructosa y la degradación de polisacáridos (alimentación de animales, textil, industria del papel; Bandlish *et al.*, 2002).

Tabla 1. Enzimas importantes en la industria producidas por *Streptomyces* spp.

Enzima	Actividad Biológica	Producida por
Alfa-amilasa	Producción de glucosa-maltosa	<i>S. sp</i>
		<i>S. megasporus</i> SO12
		<i>S. lividans</i>
		<i>S. griseus</i>
		<i>S. rimosus</i>
		<i>S. limosus</i>
		<i>S. venezulae</i>
		<i>S. hygrosopicus</i>
		<i>S. yunnanensis</i>
		<i>S. scopiformis</i>
<i>S. thermogriseus</i>		
Lipasa	Remoción de grasas	<i>S. cinnamoneus</i>
		<i>S. rimosus</i>
		<i>S. seoulensis</i>
Xilanasa	Hidrólisis de polisacáridos no celulósicos en pulpa de madera Biodecoloración	<i>S. roseiscleroticus</i>
		<i>S. galbus</i>
		<i>S. Albus</i>
		<i>S. speibonae</i>
		<i>S. mexicanus</i>
		<i>S. thermocoprophilus</i>
Proteasa	Degradación de proteínas	<i>S. lividans</i> TK 24
Fosfatasa	Liberación de fosfato	<i>S. stramineus</i>
Xilosa	Interconversión de glucosa y fructosa	<i>S. Marinus</i>
		<i>S. olivaceoviridis</i> E-86
		<i>S. thermovulgaris</i> 127
		<i>S. fradiae</i>

(Modificada de Lanoot, 2005).

Es importante mencionar que los estreptomicetos juegan un papel muy importante en la biodegradación de quitina, celulosa, lignina, pectina y varios compuestos orgánicos relacionados, los cuales son químicamente casi inertes, debido a varias de las proteínas antes mencionadas que secretan; un ejemplo de esta importancia está en que casi toda especie de *Streptomyces* usa la quitina no

sólo como fuente de carbono sino también como fuente de nitrógeno, de manera contraria a otras bacterias quitinolíticas. Estas bacterias son de vital importancia por la ayuda que prestan al ecosistema reciclando este tipo de moléculas. Además de los estreptomicetos, solo un número limitado de otras bacterias, tanto aerobias (*Cytophaga*) como anaerobias (*Clostridium*), y hongos juegan un papel importante en este proceso.

En cuanto a los metabolitos secundarios, la historia del descubrimiento de compuestos bioactivos en estos microorganismos se remonta a 1940 cuando Waksman y sus compañeros purificaron el antibiótico actinomicina de *S. antibioticus*, seguido de estreptomicina en 1942; sin embargo, fue la estreptomicina producida por *S. griseus* la que activó la búsqueda sistemática de antibióticos en los estreptomicetos y otros microorganismos filamentosos por la industria de los 50, 60 y 70s. Entre 1955 y 1962, aproximadamente el 80% de los antibióticos se originaban, en su mayor parte, de *Streptomyces* (Berdy, 1974). El clímax de los descubrimientos llegó en 1970. Tan sólo en el 2000, 23000 metabolitos secundarios microbianos eran conocidos, de los cuales el 42% eran producidos por actinobacterias, el 42% por hongos y el 16% restante por otras bacterias (Lazzarini *et al.*, 2000); dentro de estas actinobacterias, el género *Streptomyces* era el más grande productor de antibióticos (Watve *et al.*, 2001). De 12000 metabolitos secundarios con actividad antibiótica conocidos en 1995, el 55% eran producidos por estreptomicetos y un 11% adicional por otros actinomicetos. Se puede comprender la gran importancia de este género en la industria farmacéutica y su gran impacto en la historia de la medicina. Además del campo de los antibióticos, una gran cantidad de compuestos naturales son producidos a su vez por los estreptomicetos (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos compuestos naturales, además de los antibióticos, producidos por *Streptomyces spp* (Modificada de Lanoot, 2005).

Compuesto	Actividad Biológica	Producido por
Antracilcina	Antitumor	<i>S. galilaeus</i>
Ciclipostina	Inhibidor de la lipasa	<i>S. sp.</i>
Higromicina	Inmunosupresor	<i>S. hygrosopicus</i>
Piperastatina A	Inhibidor de la serin carboxipeptidasa	<i>S. lavendofoliae</i>
Estreptozotocina	Diabetogénico	<i>S. achromogenes</i>
Bafilomicina	Inhibidor de ATP-asa de bacterias, plantas y animales	<i>S. griseus</i>
		<i>S. halstedii</i>
Valinomicina	Ionóforo, tóxico para procaryotes y eucaryotes.	<i>S. griseus</i>

Algunos de los grupos de antibióticos producidos por las especies de *Streptomyces* son los siguientes:

- **Beta lactámicos.** Este grupo ocupa la mayor parte del mercado de antibióticos (54%, Madigan *et al.*, 2003). Han sido usados de manera extensiva para el tratamiento de varias infecciones bacterianas por más de medio siglo. Los beta-lactámicos más importantes son la penicilina, la cefalosporina, la cefamicina y el ácido clavulánico secretado por *S. clavuligerus*. Otros productores son *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum* y *Nocardia lactamdurans* (Thykaer y Nielsen, 2003). El mecanismo de acción de estos antibióticos es a nivel de la pared celular al inhibir la síntesis de peptidoglicano. La producción de penicilina es una de las industrias biotecnológicas más antiguas y grandes del mercado mundial con más de 60000 toneladas en el año 2000. Es probable que sea el medicamento más efectivo que existe, en cuanto a costos se trata. La estructura más común de los beta-lactámicos se puede ver en la figura 9.

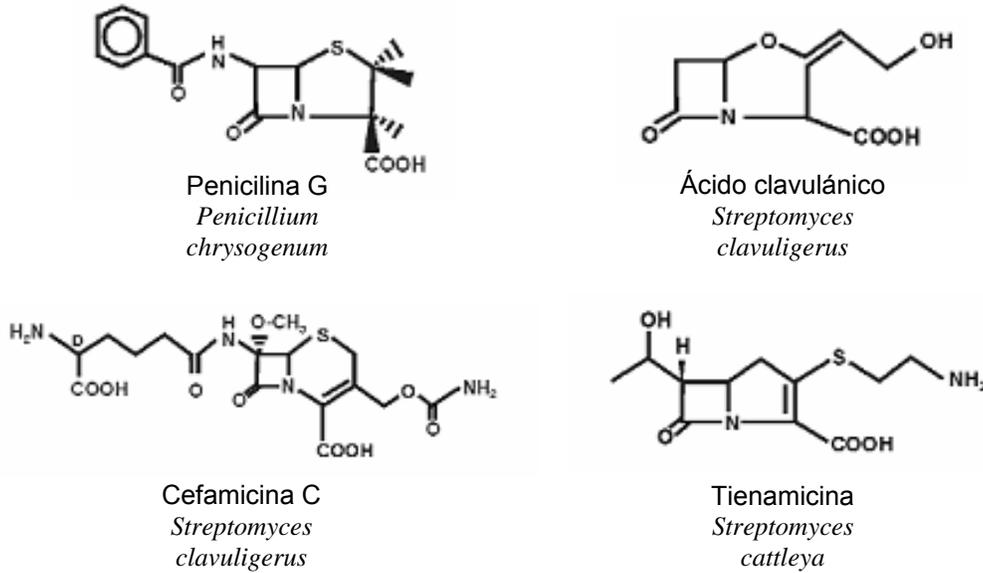


Fig. 9. Estructuras de antibióticos β -lactámicos. Los nombres genéricos de las familias, los nombres específicos de sus estructuras y los microorganismos productores (no necesariamente *Streptomyces*) están indicados (Modificado de Liras y Martín, 2006).

- Macrólidos.** Estos antibióticos pertenecen al 11% de los antibióticos clínicamente utilizados. Consisten de un largo grupo de miembros naturales y derivados semisintéticos, todos compuestos de un anillo de aglicona (14 o más átomos de carbono) al cual están unidos varios azúcares (Fig. 10). La mayoría de los antibióticos de esta familia son producidos por estreptomicetos como *S. ambofaciens* (espiramicina) y *S. halstedii* (carbomicina). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas en los ribosomas. Su espectro de bioactividad es similar al de los beta-lactámicos y por lo tanto, es usado para tratar infecciones en pacientes que son alérgicos a los antibióticos con anillos beta-lactámicos (Lanoot, 2005).

- Estreptograminas.** Representan una clase única de antibióticos, debido a su gran actividad antibacteriana y su mecanismo de acción único. Estos antibióticos son producidos por varias especies de *Streptomyces*, como la virginiamicina, la micamicina y la pristinamicina (Fig. 12), secretadas por *S. virginiae*, *S. mitakaensis* y *S. pristinaespiralis* respectivamente, y han sido clasificados en 2 grupos: las macrolactonas (grupo A) y los hexadepsipéptidos cíclicos (grupo B). Los dos grupos unen ribosomas bacterianos e inhiben la síntesis de proteínas en el paso de la elongación y actúan sinérgicamente in vivo; la mezcla de los 2 grupos es más potente que los dos grupos individuales y su acción combinada es irreversible. Las estreptograminas han demostrado tener actividad contra microorganismos Gram-positivos incluyendo aquellos resistentes a varios medicamentos. Aún más, la ausencia de resistencia cruzada hacia macrólidos en cualquiera de los microorganismos a los que se le aplican las estreptograminas, y la rara resistencia cruzada entre los 2 grupos (A y B), son una de las características principales de estos antibióticos, ofreciendo la posibilidad de tratamiento para un gran número de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas multi-resistentes (Lanoot, 2005).

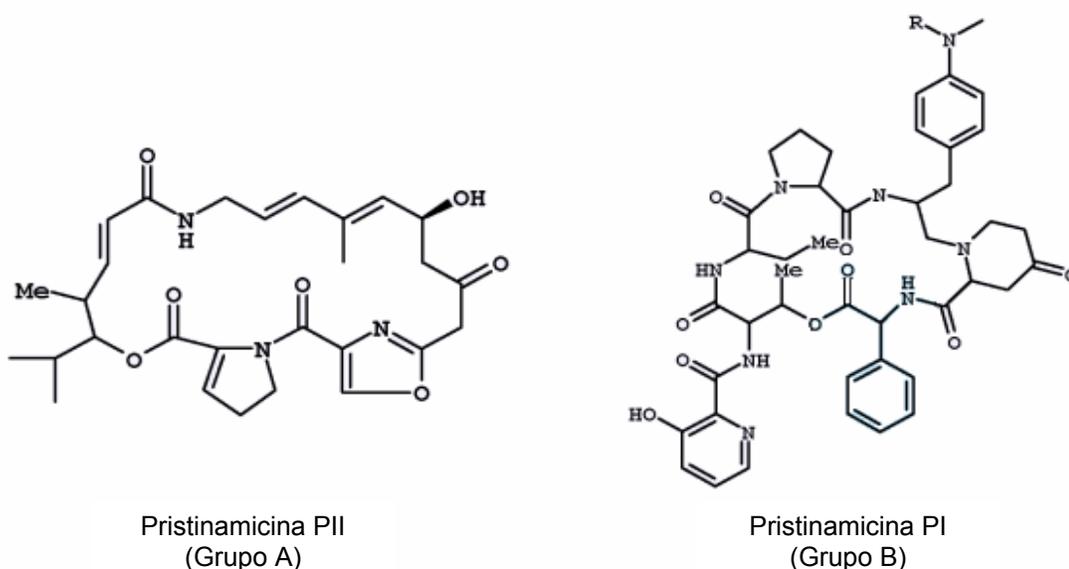


Fig. 12. Estructura de pristinamicinas del grupo A y B producidas por *S. pristinaespiralis*.

- **Aminoglicósidos.** Este grupo contiene amino azúcares unidos por enlaces glicosídicos a otros amino azúcares inhibiendo la síntesis de proteínas en la subunidad 30S del ribosoma (Fig. 13). Su espectro de actividad abarca a las bacterias Gram-negativas. Sus productores son *S. griseus* (Mansouri y Piepersberg, 1991) y *S. kanamyceticus* (Okami *et al.*, 1959) secretando respectivamente estreptomycinina y kanamicina. Hoy en día, este grupo de antibióticos tiene un uso restringido y solo abarca un 3% del total de antibióticos producidos y utilizados (Madigan *et al.*, 2003).

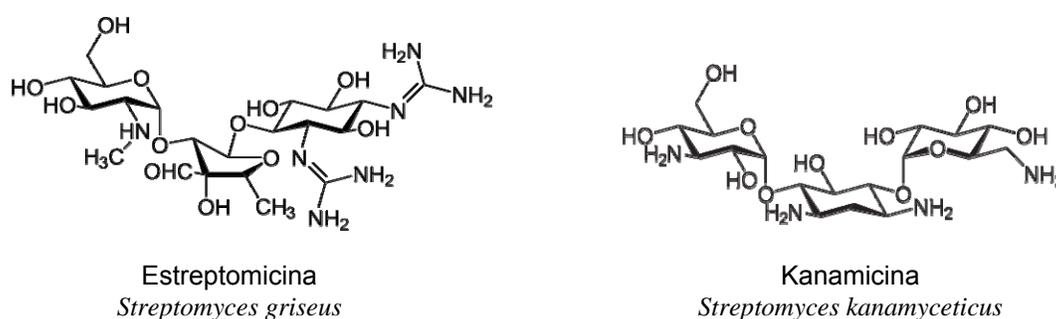


Fig. 13. Estructura de aminoglicósidos. Nombre de estructuras y organismos productores.

Los pocos antibióticos encontrados actualmente, tienen estructuras químicas ya conocidas, aunque mejoran su espectro de actividad comparándolos con su grupo de compuestos relacionados. Toda esta gran diversidad de compuestos bioactivos producidos por *Streptomyces* se debe a las características intrínsecas del género mencionadas alrededor de toda esta introducción, además de características genotípicas y de desarrollo como se indicará en secciones posteriores.

En la figura 14 se puede encontrar el sitio de acción de algunos de los antibióticos mencionados anteriormente, así como de otros grupos conocidos para dar una idea del complejo mecanismo de acción que puede tener cada una de estas moléculas por separado.

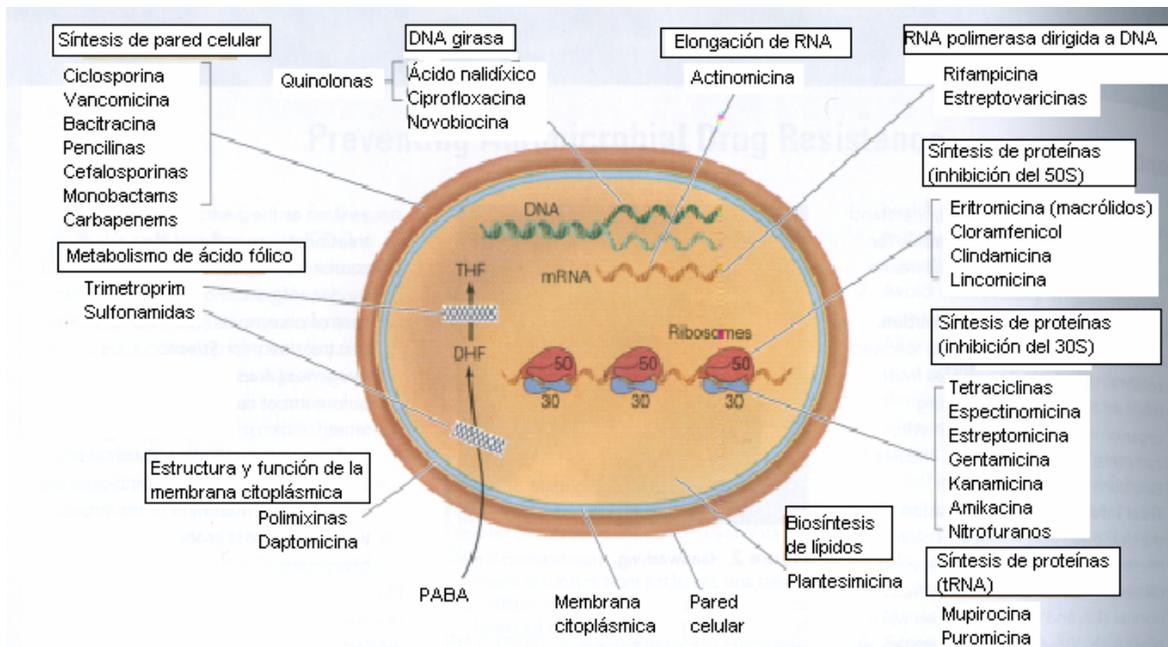


Fig. 14. Sitio y mecanismo de acción de varios grupos de antibióticos. Los sitios de acción van desde la síntesis de la pared celular hasta la síntesis de proteínas y la elongación del RNA.

Desarrollo

Estudios Genómicos de Streptomyces

El genoma de *Streptomyces* consiste de un cromosoma de 8 a 9 Mb. A diferencia de otros cromosomas eubacterianos, el cromosoma de *Streptomyces* es lineal y contiene un punto de origen de replicación central (*oriC*) y secuencias terminales repetidas invertidas únicas (TIRs) con proteínas terminales (Tpgs) covalentemente unidas a los extremos 5' (Ohnishi, *et al.* 2008), lo cual también aplica para sus plásmidos (Fig. 15). Los cromosomas lineares, que son de los elementos predominantes en la genética de los eucariontes, también han sido identificados en organismos como *Borrelia burgdorferi*, que causa la enfermedad de Lyme y es transmitida por garrapatas y *Agrobacterium tumefaciens*, que causa la corona de agallas, una enfermedad causante de tumores en mas de ochenta familias de plantas herbáceas y forestales.

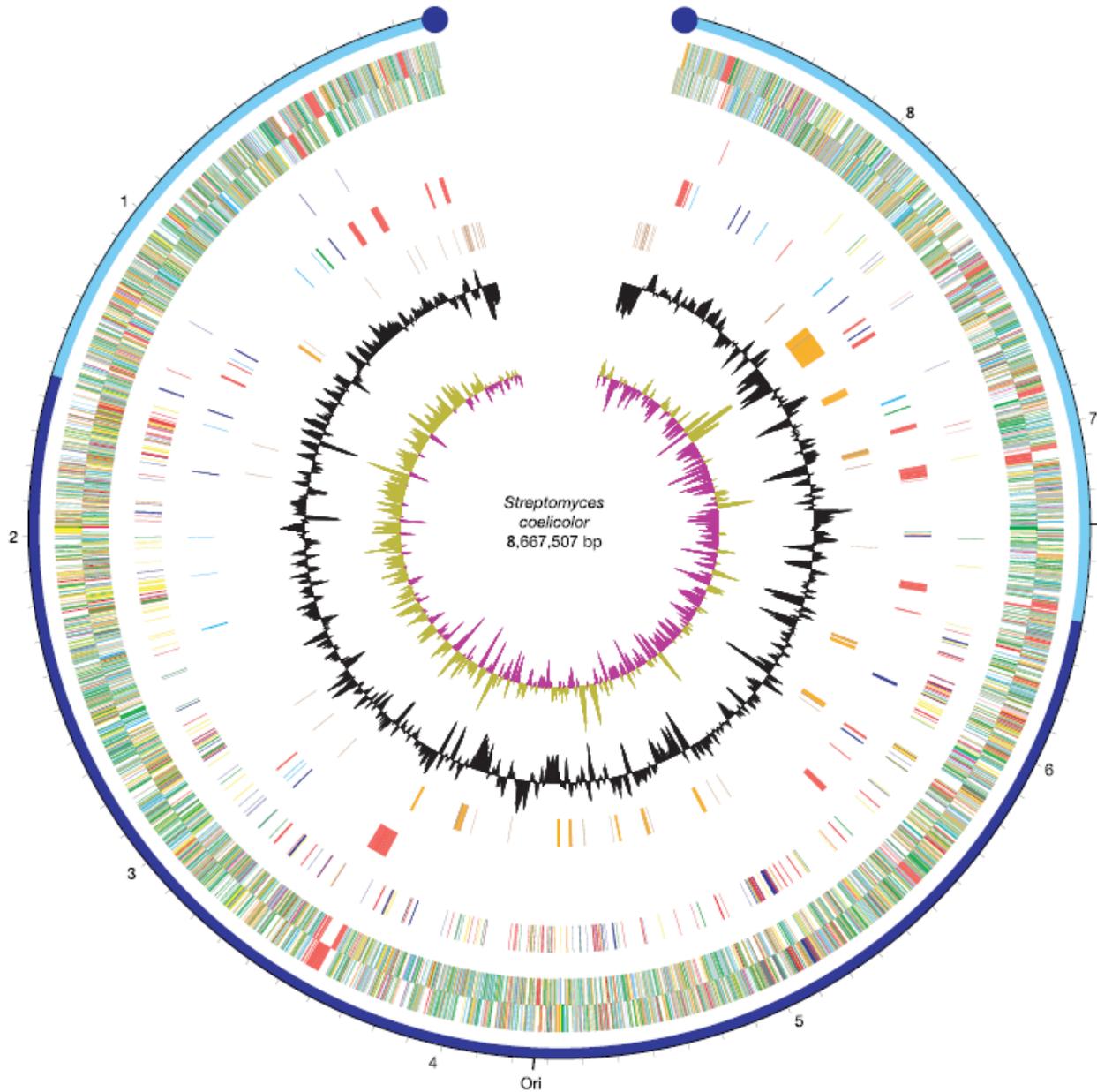


Fig. 15. Representación circular del cromosoma de *Streptomyces coelicolor*. La escala exterior está numerada en contra de las agujas del reloj (para corresponder con el mapa previamente publicado) en megabases e indica las regiones del núcleo (azul oscuro) y brazos (azul claro) del cromosoma. Círculos 1 y 2 (de afuera hacia adentro), todos los genes (cadena inversa y normal respectivamente) coloreados por función (negro, metabolismo de energía; rojo, información transferida y metabolismo secundario; verde oscuro, asociado a la superficie; cian, degradación de moléculas grandes; magenta, degradación de moléculas pequeñas; amarillo, metabolismo central o intermediario; azul opaco, reguladores; naranja, regiones hipotéticas conservadas; café, pseudogenes; verde opaco, desconocido; gris, misceláneas); círculo 3, genes “esenciales” seleccionados (para división celular, replicación de DNA, transcripción, traducción y síntesis de aminoácidos, círculos de color aplican los mismo que 1 y 2); círculo 4, genes de contingencia seleccionados (rojo, metabolismo secundario; azul opaco, exoenzimas; azul oscuro, conservación; verde, proteínas de vesículas de gas); círculo 5, elementos móviles (café, transposasas; naranja, genes putativos adquiridos lateralmente); círculo 6, contenido de G+C; círculo 7, bias de GC ((G-C/G+C), caqui indica el valor mayor a 1, morado menor a 1). El origen de replicación (ori) y las proteínas terminales (círculos azules) también están indicados (Bentley 2002).

A la fecha, se han secuenciado 5 genomas de *Streptomyces*, siendo los de principal importancia *Streptomyces coelicolor* A3 (2) publicado en el año 2002 por Bentley y colegas, *Streptomyces avermitilis* publicado en 2003 por Ikeda y colaboradores y *Streptomyces griseus* IFO 13350 publicado en 2008 por Ohnishi y colaboradores. Son diversas las razones por las cuáles sólo estos han sido los primeros, de muchos más en un futuro. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) es genéticamente el representante mejor conocido del género, por lo que se le dio vital importancia y fue el primero de todos secuenciado. *Streptomyces avermitilis* produce principalmente ivermectina (Fig. 16), un grupo de agentes antiparasitarios utilizados en la medicina humana y veterinaria, siendo un microorganismo con gran importancia en la industria, por lo que se estuvo secuenciando en los mismos años que *Streptomyces coelicolor*. En cuanto a *Streptomyces griseus* produce industrialmente estreptomicina (Fig. 17). Otra razón es que de manera indiscutible, *Streptomyces griseus* ha proveído los primeros ejemplos bacterianos bien estudiados de señalización extracelular por compuestos difusibles de bajo peso molecular, lo que se mencionará en secciones posteriores (Ohnishi *et al.*, 2008).

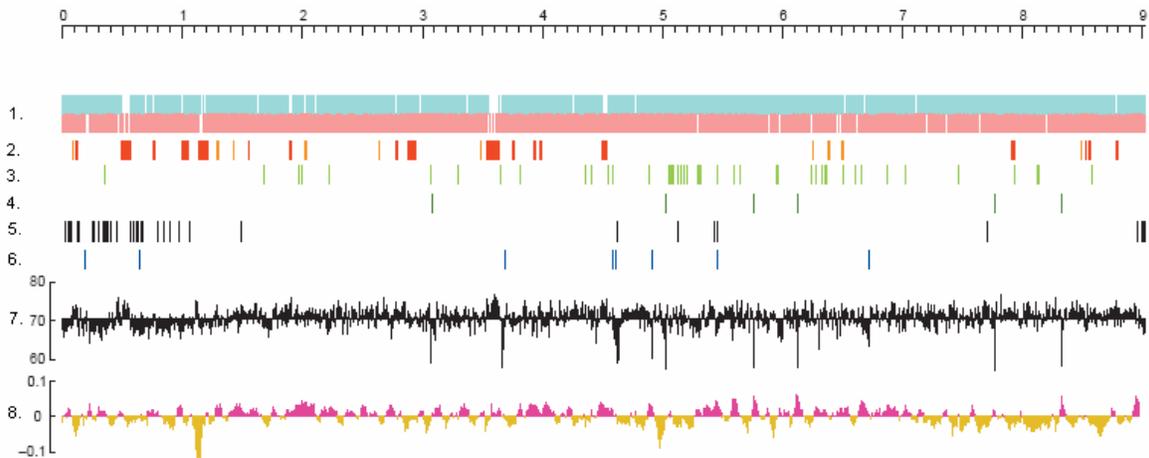


Fig. 16. Representación esquemática del cromosoma de *S. avermitilis*. 1. Distribución de los genes de acuerdo a la dirección de la transcripción (cadena + (superior), cadena - (inferior)). 2. Distribución de clusters de genes de metabolitos secundarios. 3. Distribución de tRNAs. 4. Distribución de operones de rRNA. 5. Distribución de IS y genes de transposasas. 6. Distribución de secuencias relacionadas con fagos o plásmidos integrales. 7. % de variación de GC en los replicones. 8. Bias de GC (Modificado de Ikeda, 2003).

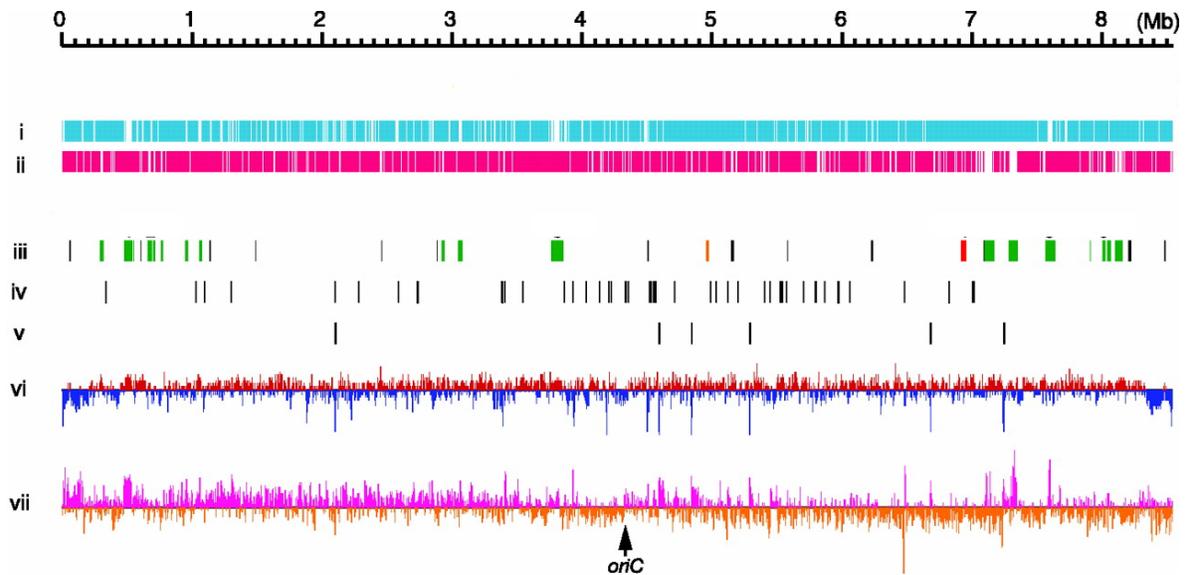


Fig. 17. Representación esquemática del cromosoma de *S. griseus*. i. Distribución de ORFs de acuerdo a la dirección de transcripción, cadena positiva. ii. Igual que 1, pero cadena negativa. iii. Distribución de clusters de genes de metabolitos secundarios. Rojo, estreptomicina (*str*, *sts*); naranja, grixazona (*gri*); verde, PKS y/o NRPS; negro, otros. iv. Distribución de genes de tRNA. v. Distribución de operones de rRNA. vi. % de variación de GC. vii. Bias de GC (Modificado de Ohnishi, 2008).

Los 2 estreptomicetos restantes cuyos genomas ya están secuenciados y se tiene acceso al público son los de *Streptomyces bingchenggensis* BCW-1 y *Streptomyces scabiei* 87.22 (Información obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). Del primero no se han realizado muchos estudios genómicos debido a que la secuencia completa fue liberada el 28 de mayo de 2010, y por esta razón fue incluido pero no estudiado en este trabajo. Se conoce, sin embargo, produce milbemicinas, una familia de lactonas macrocíclicas usadas ampliamente en la medicina humana, veterinaria, y en agricultura para promover la protección de diversos sembradíos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/46847>). El segundo estreptomiceto se caracteriza por ser el agente causal de la “*enfermedad de las costras*” que afecta una gran variedad de vegetales subterráneos como las papas y los nabos. Es de suma importancia en agricultura por los grandes daños que causa en cosechas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/40749>). Este último no será tampoco incluido de manera extensa pues su estudio se encuentra más relacionado con la

patogenia de vegetales. Algunos estreptomicetos cuyo proyecto de secuenciación se encuentran en proceso se indican en la tabla 3:

Tabla 3. Proyectos de secuenciación de genomas de estreptomicetos en progreso.

<i>Streptomyces albus</i> J1074	<i>Streptomyces</i> sp. AA4
<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	<i>Streptomyces</i> sp. ACT-1
<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	<i>Streptomyces</i> sp. ACTE
<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	<i>Streptomyces</i> sp. C
<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	<i>Streptomyces</i> sp. H668
<i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	<i>Streptomyces</i> sp. Mg1
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ATCC 53653	<i>Streptomyces</i> sp. SA3_actF
<i>Streptomyces ipomoeae</i> 91-03	<i>Streptomyces</i> sp. SA3_actG
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>Streptomyces</i> sp. SPB74
<i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952	<i>Streptomyces</i> sp. SPB78
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486	<i>Streptomyces</i> sp. e14
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379	<i>Streptomyces sviceus</i> ATCC29083
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> Car8
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	

Información obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>

Para poder dar una idea general de la información genética de los estreptomicetos, se resumirán las características de los tres genomas secuenciados hasta ahora con mayor importancia, con mención de su capacidad de producción de metabolitos secundarios (Tabla 4).

Tabla 4. Características generales de los cromosomas de los 3 genomas secuenciados de especies de *Streptomyces*.

Especie	Tamaño (bp)	TIR (bp)	Contenido promedio G+C	ORFs	Tamaño promedio de CDS (bp)	Densidad codificante	No. operones de rRNA (16S-23S-5S)	No. De genes de tRNA	No. de tmRNAs	No. de 4.5S RNAs
<i>S. griseus</i>	8,545,929	132,910	72.2	7,138	1055	88.1	6	66	1	1
<i>S. coelicolor</i> ^a	8,667,507	21,653	72.1	7,825	991	88.9	6	63	1	1
<i>S. avermitilis</i> ^b	9,025,608	49	70.7	7,583	1,027	86.3	6	68	1	1

^a Información reportada por Bentley *et al.*

^b Información actualizada.

^c tmRNAs, RNAs mensajeros de transferencia; CDS, secuencia codificante de proteínas. La topología de los cromosomas es linear.

^d No olvidar que se tienen también las secuencias de *S. bingchengensis* BCW-1 y de *S. scabiei* 87.22, aunque no se posee toda la información mostrada en esta tabla.

^e El anexo 2 contiene una tabla de categorías funcionales de 2 de los 3 genomas aquí analizados.

Streptomyces coelicolor tiene un cromosoma linear con 8,667,507 pares de bases, conteniendo el número más grande de genes descubierto hasta ahora en una bacteria. Los 7,825 genes predichos incluyen más de 20 clusters que codifican para metabolitos secundarios conocidos o desconocidos. El genoma contiene una proporción sin precedentes de genes regulatorios, predominando aquellos involucrados en respuestas a estímulos externos y estrés, y muchos juegos de genes duplicados que pueden representar isoformas “específicas de tejido” operando en las diferentes fases del desarrollo de las colonias, una situación única de esta bacteria (Bentley, 2002).

En cuanto a los metabolitos secundarios de *S. coelicolor*, ya se habían estudiado desde antes de la secuenciación los clusters de genes específicos para la biosíntesis de un antibiótico aromático poliquétido llamado *actinorhodina*, clusters para los llamados complejos RED de antibióticos de prodignina roja de oligopirrol, y para los péptidos no ribosomales CDA; así como clusters del gen *whiE*, el cual codifica una poliquétido sintasa tipo II para pigmentos grises de esporas. El genoma reveló 18 clusters más que codificarían para enzimas que se sabe son características del metabolismo secundario. Estas incluyen poliquétido sintasas modulares tanto de tipo I como de tipo II (PKS), calcona sintasas, sintetetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS), terpenos ciclasas, entre muchas otras. La distribución de los clusters en el cromosoma no parece ser al azar, encontrándose cierta preponderancia en los brazos, pero especialmente en la región cercana del límite del brazo derecho y la parte central. Aunque se conocen las enzimas, se desconocen muchos de los antibióticos y metabolitos secundarios que se pueden generar, por lo que se aplican técnicas de comparación con clusters similares en otros organismos, así como herramientas de análisis de secuencias recientemente desarrolladas, para generar así un panorama de las probables estructuras de los productos terminales de estos genes. Es digno de notarse que 3 de los clusters para metabolitos secundarios, codifiquen para la síntesis de sideróforos, lo que implica que *S. coelicolor* se encuentra bajo presión selectiva para buscar hierro en situaciones de baja disponibilidad del mismo. Por lo

mismo, algunos de los productos de estos clusters podrían ser calificados de “metabolitos de estrés”, encargados de combatir situaciones de estrés físico, químico o biológico (Bentley, 2002).

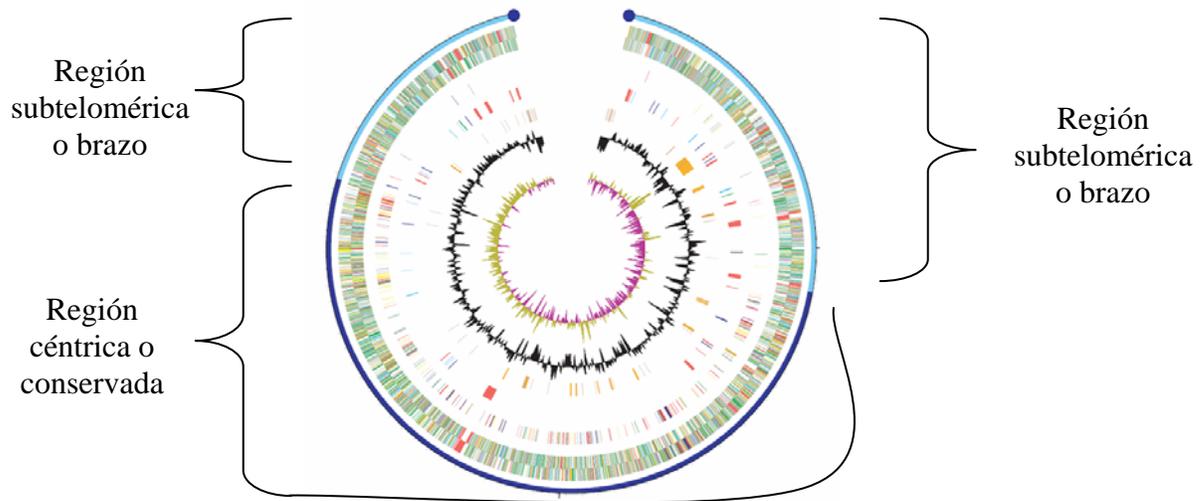


Fig. 18. Regiones del genoma de *Streptomyces coelicolor*.

Streptomyces avermitilis contiene un genoma de 9,025,608 bases y codifica para, al menos 7,574 ORFs potenciales. 35% de los ORFs constituyen 721 familias de genes parálogos. Treinta clusters de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios han sido identificados, correspondiendo al 6.6% del genoma. La comparación con *S. coelicolor* A3 (2) reveló que la región interna de 6.5Mb en el genoma de *S. avermitilis* estaba altamente conservado con respecto al orden de genes, y contenía todos los genes esenciales conocidos pero mostró una estructura perfectamente asimétrica en el centro *oriC*. Contrastando con esto, las regiones terminales no estaban conservadas y contenían de manera preferencial genes no esenciales (Ikeda *et al.*, 2003).

De los 30 clusters de genes que *S. avermitilis* posee relacionados al metabolismo secundario, 17 están localizados en las regiones subteloméricas. Los clusters de genes específicos para las vías biosintéticas de avermectina y pentaene, a su vez estaban localizados en la región subtelomérica de 2 Mb del brazo de la izquierda. Contrastando con esto, varios clusters de genes para

metabolitos secundarios comúnmente producidos por varias especies de *Streptomyces*, como por ejemplo la geosmina, la pentalenolactona y la oligomicina, se encontraban en la región conservada de 6.5Mb del genoma (Ikeda *et al.*, 2003).

Por último, *Streptomyces griseus* posee un genoma de 8,545,929 bp, con 7,138 ORFs predichos. Contiene secuencias repetidas invertidas terminales extremadamente largas, de 123,910 bp cada una. La secuencia de los nucleótidos de los telómeros, así como su estructura secundaria, que consiste de varios palíndromos, son diferentes que los telómeros típicos conservados en otras especies de *Streptomyces*. De acuerdo con la diferencia, el cromosoma tiene pseudogenes para una proteína terminal conservada (Tpg) y una proteína asociada al telómero (Tap). Al realizar la comparación con los otros 2 genomas ya secuenciados, se descubrió la existencia de al menos 24 proteínas específicas de *Streptomyces* (Ohnishi *et al.*, 2008).

El genoma de *S. griseus* contiene al menos 34 clusters de genes o simplemente genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios conocidos o desconocidos. El cluster para la biosíntesis de estreptomycinina se encuentra casi al final de la zona conservada del cromosoma, cerca del brazo derecho. Otros clusters para metabolitos secundarios también fueron analizados, específicamente grixazona, un carotenoide y melanina HPQ. De los 34 totales encontrados, 18 se encuentran fuera de la región conservada del cromosoma, reforzando la idea de que las regiones variables subteloméricas del cromosoma lineal contribuyen a la diversidad metabólica del género. *Streptomyces griseus* provee un claro ejemplo de lo críptico que es el metabolismo secundario. Además del cluster para carotenoides descrito anteriormente, se pueden encontrar otros 2 clusters en la secuencia TIR. Este microorganismo tiene 3 copias del cluster para carotenoides en el cromosoma y sin embargo, es incapaz de producirlos bajo ninguna condición hasta ahora examinada. Falta más investigación con respecto al tema para lograr comprender el metabolismo secundario y sus consecuencias en su totalidad (Ohnishi *et al.*, 2008).

Con toda la información recién planteada, se puede observar que la mayor parte de los genes esenciales se encuentran en la región céntrica o “nuclear” del cromosoma de *Streptomyces*, mientras que varios de los genes utilizados para el metabolismo secundario, así como genes “accesorios”, se encuentran repartidos en los brazos del cromosoma teniendo enormes consecuencias de biodiversidad. Como dato adicional, la cantidad de información correspondiente a compuestos bioactivos excede a la de genomas que no sean de estreptomicetos: 3 en *Bacillus subtilis* (Kuns *et al.*, 1997) y 4 en *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Stover *et al.*, 2000). La mayoría de los genomas, sin embargo, carecen de cualquier cluster de genes de productos naturales (Bentley *et al.*, 2002).

Lo que vuelve único al cromosoma de *Streptomyces*, además de algunas de las características mencionadas anteriormente, son los TIRs y las proteínas terminales identificadas en sus cromosomas (Ikeda *et al.*, 2003). Es por esta razón que su cromosoma tiene un modo especial de replicación. Mientras que otros genomas lineales inician su replicación desde las proteínas terminales, como una sola cadena desde cualquier extremo de la molécula, el cromosoma de *Streptomyces* se replica bidireccionalmente desde el típico *oriC* ubicado al centro del mismo. En los cromosomas circulares, las 2 bandas generadas en la replicación se encuentran eventualmente para completar a la molécula nueva, pero los replicones lineales encaran un problema terminal: la banda líder sintetizada llega hasta el final del cromosoma, pero la remoción del primer de RNA en el último fragmento de Okazaki de la banda retrasada deja un hueco en el lado 3' (donde la cadena ya no es doble, solo sencilla), el cual es “parchado” por la síntesis de DNA generada por la proteína terminal (TP). La TP esta codificada por un gen en el cromosoma de *Streptomyces* y en algunos plásmidos lineales (Hopwood, 2006).

Las TIRs de *Streptomyces* varían de menos de 1kb a más de 550kb. Estas secuencias terminales contienen alrededor de 7 secuencias palindrómicas

estrechamente empaquetadas, las cuales se piensa que se encuentran en la región donde la cadena de DNA es sencilla, y se cree que esto podría lograr que la cadena se pliegue sobre sí misma para generar sitios estructurales de reconocimiento para las proteínas terminales (TP). Aunque esto es solo una posibilidad, estudios recientes en *Streptomyces griseus* muestran que las zonas palindrómicas son blanco de proteínas asociadas a telómeros (Tap), las cuales se encuentran codificadas por un ORF río arriba del gen de la TP, y se encargan de reclutar a la TP al término del cromosoma. Tap y Tp, a su vez, son proteínas candidatas para la unión de los extremos del cromosoma, aunque se necesitan identificar más proteínas (Hopwood, 2006).

El cromosoma de *Streptomyces* es inherentemente inestable, y frecuentemente sufre de rearrreglos cromosómicos, tanto espontáneos como generados por tratamientos mutagénicos, bastante fuertes, particularmente en las regiones terminales donde casi no residen genes esenciales. Estos cambios incluyen deleciones, amplificaciones, reemplazamiento de brazos y circularización. Se pueden llevar a cabo deleciones de hasta el 25% del genoma (2Mb en un genoma de 8Mb) en un 0.5% de esporas germinativas (Volf y Altenbuchner, 2000). Además, las sustancias tóxicas originadas del metabolismo de la misma bacteria, así como daño por luz UV, entre otros factores, pueden dañar el DNA, llevándose a cabo, por ejemplo, mutaciones puntuales en los genes. De aquí que toda una gama de genes alterados o recombinados puedan expresarse, llevando a configuraciones de proteínas nuevas. La amplia gama de plásmidos tanto lineares (característicos del género) como circulares que puedan ser transferidos entre bacterias y los eventos de recombinación que puedan llevar a cabo, da una idea de la gran cantidad de metabolitos que pueden o no ser generados. La inestabilidad cromosomal lleva a inestabilidad genética, la cual es ubicua entre las diversas especies de *Streptomyces*, y afecta casi todas las funciones de vida; como por ejemplo, la diferenciación del metabolismo secundario y la respuesta a cambios ambientales. Hace tiempo se creía que la inestabilidad se debía a la estructura lineal; sin embargo, se ha demostrado que no es atribuible a este

hecho, ya que algunos mutantes con cromosomas circulares muestran una frecuencia aún mayor de inestabilidad genética. Teóricamente, estos rearrreglos cromosomales pueden darse por vías de recombinación homóloga o no-homóloga; sin embargo, los mecanismos involucrados en este tipo de rearrreglos de *Streptomyces* no han sido estudiados de manera satisfactoria (Chen *et al.*, 2010).

Metabolismo secundario de Streptomyces

Formación del micelio aéreo

Cuando una espora de *Streptomyces* encuentra las condiciones favorables y los nutrientes necesarios, germina y uno o dos tubos germinativos emergen y crecen para formar hifas. Estos tubos germinativos crecen al extenderse sus puntas y al ramificarse para formar el micelio vegetativo, el cual usualmente se abre camino a lo más profundo del sustrato que lo rodea. Al terminarse los nutrientes y gracias a otras señales, la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica comienza. Se comienzan a crear las hifas aéreas, las cuales rompen la tensión superficial al escapar del ambiente acuoso del micelio vegetativo y crecen en el aire, como su nombre lo indica. La hifa aérea se divide por un tipo muy especial de división celular en cadenas largas de compartimientos de preesporas, las cuales desarrollan paredes gruesas, sintetizan pigmentos grises y adquieren otras características de esporas maduras. Comparando a las esporas de *Streptomyces* con las endosporas formadas por las diversas especies de *Bacillus*, las esporas de los estreptomicetos son menos resistentes a condiciones adversas, aunque pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en estado disecado, por lo que se puede concluir que estas esporas están especializadas para ser repartidas dentro de su propio ambiente (Flärdh y Buttner, 2009).

Haciendo rápidamente una mención de la formación del micelio vegetativo debido a su peculiaridad, su crecimiento ocurre gracias a la extensión de las puntas de los tubos germinativos y a la formación de ramas, por lo que el material de la pared celular sólo es sintetizado en las puntas, lo cual ha sido demostrado

experimentalmente (Flårdh, 2003) (Fig. 19). Este patrón de crecimiento es completamente diferente al de casi todas las bacterias. En *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y otros microorganismos con forma de bacilo, la elongación es orquestada por un citoesqueleto helical formado por el homólogo bacteriano de actina MreB (Carbadillo-López, 2006). Este citoesqueleto dirige la inserción de nuevos peptidoglicanos en las paredes laterales, resultando en la extensión de la célula y en la adquisición de la forma bacilar, mientras que los polos celulares se mantienen inertes al haberse formado gracias a la división celular. Contrario a esto, la extensión de las puntas de *Streptomyces* no depende de mreB, y como ya se mencionó, la síntesis solo ocurre en las puntas de la hifa. Aunque todos los genomas de *Streptomyces* secuenciados a la fecha contienen al menos 2 genes de mreB, diversos estudios en *Streptomyces coelicolor* muestran que estos genes tienen un bajo impacto en la extensión del micelio vegetativo, y más bien se encuentran involucrados de manera más estrecha con la esporulación de la hifa aérea (Mazza *et al.*, 2006).



Fig. 19. Crecimiento polarizado del micelio vegetativo. Zonas apicales marcadas con conjugado de vancomicina fluorescente (rojo) debido a que tiñe los sitios donde el precursor lipídico de peptidoglicanos II es exportado y expuesto en la superficie de la pared; localización de la proteína determinante de la polaridad DivIVA marcada con proteína verde fluorescente (EGFP, verde) (Flårdh y Buttner, 2009).

Este crecimiento apical independiente de mreB parece depender de la proteína DivIVA. A la fecha no se sabe mucho de esta proteína, más que se enfoca en las puntas (Flårdh, 2003) y que la depleción de ésta lleva a una pérdida del ensamblaje de la pared celular (Letek *et al.*, 2008). Por otro lado, la sobre expresión de DivIVA lleva al ensamblaje de muchos focos alrededor de las paredes laterales donde se establece el crecimiento de la pared celular, llevando a ramas múltiples aberrantes. Esta información sugiere que DivIVA se encarga de

reclutar a la maquinaria biosintética necesaria para la formación de la pared celular en nuevos sitios. La punta de la hifa es probablemente un lugar donde se encuentran concentradas muchas funciones importantes. El peptidoglicano, así como otros componentes de la envoltura celular como ácidos teicóicos, proteínas de superficie y lípidos de membrana, pueden ser secretados y armados específicamente en las zonas de crecimiento apical, aunque todo esto debe ser comprobado experimentalmente. Como ejemplo de esto, la maquinaria que produce el péptido surfactante, del cual se hablará más adelante, SapB (proteína B asociada a esporas) parece encontrarse localizada en estas puntas. DivIVA claramente es uno de los marcadores moleculares que identifican este sitio subcelular tan ocupado en *Streptomyces*, aunque no se debe descartar la participación de más moléculas (Flärdh y Buttner, 2009).

Para romper la tensión superficial del medio y crecer en el aire, *S. coelicolor* tiene que cubrir su hifa aérea de una capa hidrofóbica, la cual no se encuentra en la hifa vegetativa en el medio acuoso, y también de péptido surfactante SapB, al menos en medios enriquecidos. Aunque la capa hidrofóbica fue identificada por primera vez por microscopía de electrones en los inicios de 1960 y SapB fue identificada cerca del año de 1990, ambos componentes eludieron la caracterización genética y bioquímica por varios años, incluso aún después de que se completo la secuenciación del genoma de *S. coelicolor*. Es por esta razón que la reciente elucidación de la estructura de SapB, la identificación de los genes que especifican su producción, así como la caracterización de los componentes principales de la capa hidrofóbica son importantes avances en el entendimiento de la morfogénesis del metabolismo secundario de los estreptomicetos (Flärdh y Buttner, 2009). Además de SapB, se conocen otras moléculas involucradas en el proceso físico del crecimiento aéreo como lo son las proteínas “chaplins” y “rodlinas”, que componen el material fibroso de la capa hidrofóbica. La alta actividad de superficie que tienen estos 3 tipos de proteínas ha llevado a la idea generalizada de que su papel principal es permitir que la hifa aérea rompa la tensión superficial del ambiente acuoso que rodea a la hifa vegetativa. Tomando

esto en cuenta y sabiendo que aún después de que la hifa emergió, las proteínas continúan cubriéndola, se cree que deben guardar un compartimiento hidratado que incluye a la pared celular. Es difícil evitar inferir que este compartimiento cilíndrico forma un canal por el que los nutrientes y otros metabolitos se pueden difundir del sustrato a las puntas crecientes de la hifa aérea (Chater *et al.*, 2010).

En medios enriquecidos de cultivo, *S.coelicolor* produce SapB para permitir la formación eficiente de la hifa aérea; es importante recalcar esto por razones que se verán más adelante. Se sabe que SapB se encuentra codificado por un cluster de genes de formación rápida del micelio aéreo (*ram*), el cual contiene *ramR*, un gen que codifica para un regulador que directamente activa el operón *ramCSAB*. Se sabe que el gen *ramS* codifica para un prepéptido de SapB de 42 aminoácidos, el cual sufre una extensa modificación post-traducciona catalizada por la SapB-sintetasa RamC. Se cree que el dominio amino terminal de RamC funciona como una deshidratasa de serina que convierte 4 residuos de serina de RamS en dehidroalaninas (Dha), de las cuales 2 reaccionan subsecuentemente con tioles de cisteína para formar anillos intramoleculares de lantioninas. Esta reacción se cree que es catalizada por el dominio carboxi-terminal de ciclasa de RamC. Por último, el péptido líder es removido por una proteasa desconocida para generar el residuo maduro de 21 aminoácidos de SapB, el cual probablemente sea exportado de la hifa por el transportador de cassette de unión de ATP (ABC) codificado por *ramA* y *ramB* (Kodani *et al.*, 2004) (Fig. 20).

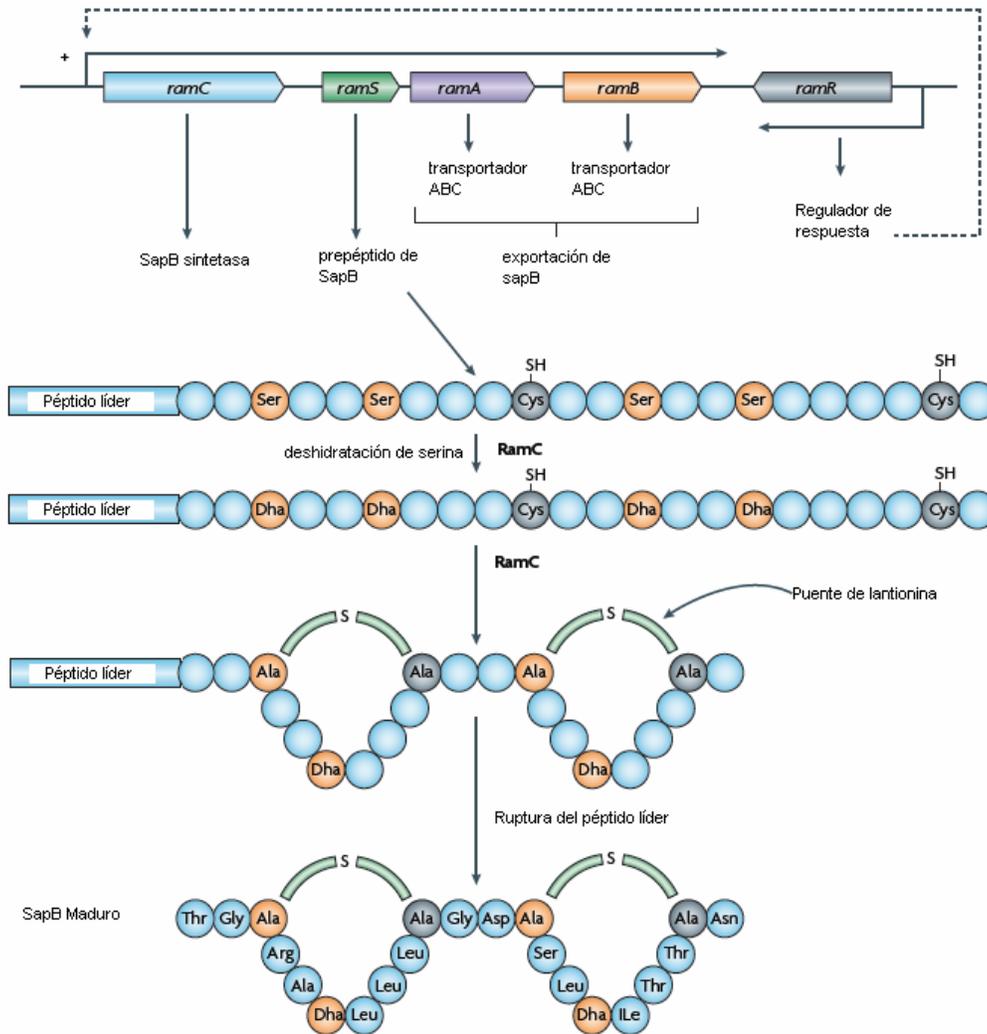


Fig. 20. Modelo de la biosíntesis del péptido surfactante parecido a lantibióticos SapB (Modificado de Flårdh y Buttner, 2009).

Se sabe que copias extra de los genes *ram* inducen una formación del micelio aéreo muy rápida, mientras que la delección del cluster *ram*, o del cluster ortólogo *amf* en *S. griseus*, causa la pérdida de la hifa aérea (O'Connor *et al.*, 2002). La función bioquímica de las proteínas Ram no fue aclarada hasta que se comprendió que el término carboxilo de RamC era similar a las sintetasas de lantibióticos. Los lantibióticos son antibióticos oligopeptídicos sintetizados ribosomalmente producidos por bacterias Gram positivas. Son traducidos como prepeptidos inactivos que sufren una modificación post-traducciona muy extensiva antes de ser rotos para generar el péptido maduro. La similitud de RamC a las

sintetasas de lantibióticos generó la duda de que SapB se encontrara estructuralmente relacionada con los lantibióticos; fue gracias a esta idea que en 2004 SapB fue caracterizada estructuralmente y se vislumbró su modificación postraducciona. Aunque SapB se encuentre estructuralmente y biosintéticamente relacionada a los lantibióticos, una clase muy grande de productos naturales de los estreptomicetos, parece no tener actividad antimicrobiana aparente y parece haber desarrollado una función muy distinta como péptido surfactante (Flärdh y Buttner, 2009). Esto da una idea de que, biológicamente hablando, no se conoce mucho sobre el papel que juegan los antibióticos en el medio ambiente, además de su conocida actividad antimicrobiana, y de que pueden estar involucrados de manera muy distinta a lo que se cree en el metabolismo secundario de estos microorganismos.

En medios enriquecidos de cultivo, *Streptomyces* genera SapB, y por lo tanto genera el micelio aéreo; sin embargo, en medios mínimos de cultivo, SapB no es producida y aún así *Streptomyces* genera el micelio aéreo. Esto indica que existe una vía independiente de SapB para la formación del micelio aéreo, y ésta es mediada por las otras proteínas de la capa hidrofóbica, las chaplinas. Cuando se cuantifican *in vitro*, tanto la proteína SapB como las chaplinas tienen una poderosa actividad surfactante en las interfaces agua-aire, son capaces de disminuir la tensión superficial en sobremanera (Claessen *et al.*, 2003). Esta habilidad es central a la función de tales proteínas en permitir a la hifa aérea reproductiva escapar del ambiente acuoso del micelio vegetativo. El número de chaplinas varía entre especies, pero *S. coelicolor* tiene ocho. Tres de estas chaplinas (las chaplinas largas A, B y C) tienen, junto con dos dominios de chaplina hidrofóbicos de 50 aminoácidos cada uno (Flärdh y Buttner, 2009), extensiones en la parte carboxilo terminal que contienen sitios de reconocimiento para enzimas sortasas. Al menos dos sortasas, y tal vez hasta siete, son codificadas en el genoma de *S. coelicolor*. Las chaplinas cortas consisten de un dominio de chaplina, precedido por un péptido-senial de secreción Sec. A través de sus sitios de reconocimiento de sortasas, las chaplinas largas son unidas

covalentemente a la pared celular, proveyendo una clase de andamio en el cual se pueden unir las chaplinas “pequeñas” (las cuales evidentemente carecen de tales dominios de unión a la pared celular y viajan al exterior de la pared celular gracias a su péptido señal); aunque incluso en la ausencia de las chaplinas largas, las pequeñas tienen la capacidad de agruparse y generar el crecimiento aéreo y la esporulación. Todas las chaplinas se unen en forma de filamentos amiloideos. De la investigación realizada se sabe que una cepa que contenga sólo los genes de chaplinas conservados en todos los genomas de *Streptomyces*, los genes *chpC*, *E* y *H*, muestra un desarrollo de micelio aéreo casi de tipo silvestre. Esto fue consistente con uno de los modelos propuestos para el funcionamiento de tales chaplinas: ChpC brinda un ancla por medio de su sortasa a la pared celular en la cual ChpH se une, mientras que ChpE, la única chaplina que carece de cisteínas conservadas, juega un papel de soporte en la unión de ChpH (DiBerardo *et al.*, 2008).

La producción de las chaplinas de SapB es clave en la iniciación de la diferenciación celular de *S. coelicolor*; sin embargo, las vías de señalización que llevan a su expresión son poco comprendidas. El regulador de respuesta RamR directamente activa los genes para la producción y exportación de SapB, pero *ramR* no posee ningún gen sensor genéticamente ligado y no se sabe nada a la fecha de mecanismos reguladores que gobiernen directamente su transcripción, lo cual sucede al nivel de la formación del micelio aéreo. De manera similar, poco se sabe de la regulación de las chaplinas (Flärdh y Buttner, 2009).

El otro componente de la capa hidrofóbica de *S. coelicolor* lo componen las proteínas rodlinas, RdIA y RdIB. Los mutantes carentes de los genes *rdIA* y *rdIB* aún pueden formar una capa hidrofóbica y un micelio aéreo normal; sin embargo, se ha demostrado que estas proteínas pueden ser extraídas junto con las chaplinas en las esporas. Las rodlinas interactúan con las fibras de los polímeros de chaplinas para organizarlos en pares de bastones, los cuales dan una apariencia de cesto de mimbre a la superficie de las esporas de *S. coelicolor* (Fig.

21). No se pueden encontrar tales bastones formadores de esporas suaves en *S. avermitilis*, lo cual es consistente con la falta de los genes de rodlinas en su genoma. El hecho de que otros estreptomicetos tengan esporas decoradas de manera muy elaborada hace dudar de un propósito biológico de estas proteínas. El uso casi accesorio de estas rodlinas no ha sido estudiado con detenimiento y tal vez se encuentre involucrado más a fondo, no tanto en el desarrollo del micelio aéreo, sino más bien en la esporulación, aunque esto es solo especulación (Chater *et al.*, 2010; Flärdh y Buttner, 2009).



Fig. 21. Filamentos de chaplinas organizados en estructuras de alto orden gracias a las rodlinas, generando la ultraestructura de “cesto de mimbre” observada en las esporas e hifas aéreas de *Streptomyces coelicolor* (Flärdh y Buttner, 2009).

Cabe mencionar que además de estas proteínas, se ha encontrado una celulosa sintasa (CslA) en las puntas de las hifas. Esto se ha demostrado al teñir las hifas de *S. coelicolor* con calcofluor blanco, el cual es usado para la detección citológica de β -glucanos como celulosa y quitina, encontrándolo preferentemente en las puntas, las cuales son los sitios activos de la extensión de la pared celular como se explicó anteriormente. Predicciones estructurales indican que un dominio carboxilo terminal extracitoplásmico está conectado vía siete dominios transmembranales a un dominio amino terminal, el cual parece interactuar con el

determinante DivIVA descrito también anteriormente. La delección del determinante CslA provoca la pérdida de β -glucanos en las puntas de las hifas, lo cual también genera un fenotipo que no produce hifas aéreas; sin embargo, al adicionar un extracto enriquecido de chaplinas y rodlinas, se corrige parcialmente el fenotipo. Esto llevó a la teoría de que los β -glucanos sintetizados por CslA funcionan como una clase de vendaje para estabilizar el material de la capa naciente mientras que las chaplinas y rodlinas son liberadas para el crecimiento aéreo; sin embargo, recientes estudios proponen un modelo algo distinto. La unión de la hifa de *S. coelicolor* a la superficie hidrofóbica de un medio de cultivo en un líquido estático es considerablemente reducida en un mutante sin chaplinas, la unión siendo mediada por fimbrias extracelulares que se encuentran compuestas principalmente por chaplinas. Las fimbrias emergen de pequeños picos en las paredes laterales de la hifa y aunque no se encuentran en una mutante sin chaplinas, los picos quedan. Cabe resaltar que estas estructuras de picos también son los sitios de unión de fibras más pequeñas y más finas, vistas más fácilmente en el mutante sin chaplinas. La producción de estas fibras depende de *cs/A* y son eliminadas con un tratamiento de celulasa. Al aplicar un tratamiento similar en las cepas silvestres se desprenden las fimbrias de la hifa, lo que provoca la pérdida de su habilidad de unirse a superficies. *In vitro*, las chaplinas purificadas pueden juntarse en paquetes de fibras amiloideas para formar estructuras parecidas a las fimbrias. Se ha propuesto que *in vivo* las chaplinas se unen en estructuras amiloideas para así poder ensamblarse con las fibras de celulosa para formar las fimbrias (Chater *et al.*, 2010).

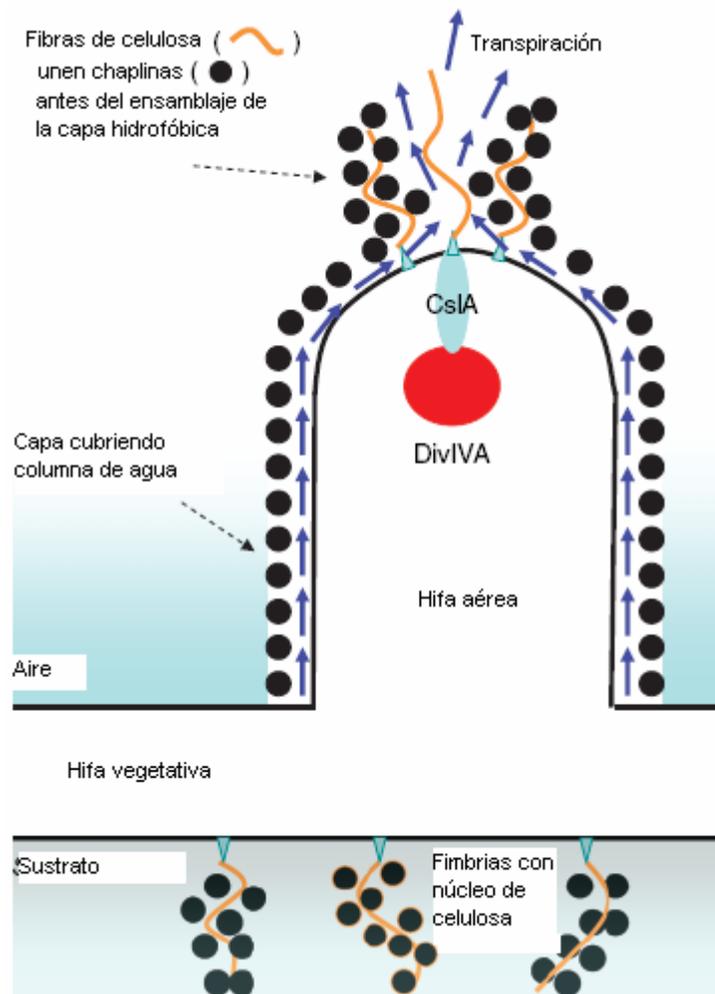


Fig. 22. Papel de las proteínas activas de superficie en la adherencia de la hifa vegetativa y el crecimiento de la hifa aérea. En los puntos de contacto entre la hifa vegetativa y una superficie hidrofóbica, las fibras de celulosa (naranja) son empujadas fuera y actúan como núcleos de los complejos amiloideos de las chaplinas (puntos negros) para formar fimbrias, las cuales sirven de organelos de unión. Fibras de celulosa también salen en las puntas de las hifas, donde se encuentra un complejo de celulosa sintasa (CslA, azul) con el determinante de polaridad DivIVA (rojo). El modelo asume tentativamente que, por el motivo de que la celulosa en las puntas parece ayudar a las chaplinas a formar la capa hidrofóbica de la hifa aérea, esto sucede por la formación de estructuras relacionadas con fimbrias. Una vez formada la hifa, se predice que la cara interna hidrofílica de la capa contenga una columna de agua en una clase de compartimiento periplásmico. En el supuesto de que la capa se encuentre abierta en la punta creciente, se especula que la evaporación de agua en ésta genera transpiración y gracias a esto puede elevar nutrientes de la base a las partes superiores de la hifa aérea, manteniendo la hidratación del micelio aéreo.

(Modificado de Chater *et al.*, 2010).

Esporulación

Después de que la hifa aérea se forma, puede entrar en una nueva etapa de desarrollo que involucra la reorganización de varios procesos fundamentales como el crecimiento y el ciclo celular, lo que lleva a la diferenciación de la célula apical en una cadena de esporas. Algunos de los genes requeridos para la esporulación de la hifa aérea han sido identificados utilizando mutantes de *S. coelicolor* que fallan al producir un pigmento gris particular asociado con las últimas etapas de maduración de las esporas llamados mutantes blancos (*whi*) (McCormick, 2009). Estas cepas mutantes producen colonias blancas amarillentas o de color gris claro con hifas aéreas cuyo desarrollo se encuentra arrestado en distintas etapas. A continuación se podrá ver un resumen de los genes más asociados con el fenotipo Whi tomado de Flärdh y Buttner, 2009:

- *whiG* – Codifica para un factor sigma de la RNA polimerasa. Los mutantes de este gen arrestan el desarrollo en etapas tempranas de la esporulación de la hifa y puede ser un regulador clave en el cambio de la hifa aérea a su modo de esporulación. Solo se conocen 2 genes diana de este factor: *whiI* y *whiH*.
- *whiH* – Codifica para un miembro de una familia de represores. Aunque los mutantes de este gen tienen pigmentación reducida de esporas y hacen en su mayor parte hifas aéreas no diferenciadas, algunos fragmentos de hifa pobremente septados parecidos a esporas son generados con nucleoides condensados pero irregularmente particionados. WhiH parece ser autorregulatorio, aunque no se conocen otros blancos de esta proteína.
- *whiI* – Codifica para un regulador de respuesta. Es curioso como WhiI carece de residuos de aspartato y lisina que son altamente conservados en paquetes de fosforilación de reguladores de respuesta convencionales. Los mutantes carentes del gen no crean septos de esporulación y a comparación de los mutantes *whiH*, no muestran condensación de nucleoides. A la fecha no se han identificado blancos de su proteína.

- *whiA* – Constituye junto con *whiB*, una vía convergente que controla la esporulación en la hifa aérea independiente de *whiG*. Los ortólogos de *whiA* son ubicuos entre las bacterias Gram positivas. Se ha predicho que WhiA se dobla y une DNA en una manera similar a las endonucleasas, aunque carece de actividad de endonucleasa, sugiriendo que puede ser un factor de transcripción. Los mutantes de *whiA* y *whiB* tienen fenotipos muy parecidos: ambos fallan en detener la extensión de la hifa aérea y por lo mismo producen filamentos estrechos y largos que nunca inician la septación de la esporulación.
- *whiB* y *whiD* – Codifican para miembros de la familia de proteínas específicas de actinobacterias Wbl, de las cuales WhiB es la fundadora. Tales proteínas tienen diversos papeles en la biología de *Streptomyces* y las mycobacterias en general. Son pequeñas (de 81 a 122 residuos) y tienen cuatro cisteínas no variantes que unen un cluster sensible al oxígeno de [4Fe-4S]. El papel bioquímico de estas proteínas es controversial: pueden funcionar como factores de transcripción o pueden servir de reductasas de disulfuro.
- *sigF* – Codifica para uno de los nueve factores σ^B sigma de respuesta a estrés en *S. coelicolor* (estos factores se encuentran filogenéticamente y funcionalmente relacionados con σ^B , el cual controla la respuesta general ante el estrés en *Bacillus subtilis*). Las mutaciones en *sigF* parecen afectar específicamente la maduración de las preesporas, llevando a esporas irregulares y de paredes delgadas con nucleoides no condensados. No se conocen blancos directos, pero la expresión de un promotor en el cluster *whiE* depende de *sigF*. Dentro de los otros factores sigma, el H y el B también afectan la respuesta ante el estrés y al desarrollo.
- *whiE* – Es un locus complejo de ocho genes que son transcritos en la esporulación tardía. *whiE* especifica la síntesis del pigmento poliquétido gris de la espora.

- *ssgA* y los genes *salp* – Estos codifican para pequeñas proteínas ácidas encontradas sólo en los estreptomicetos y algunos otros actinomicetos. Los genomas de *Streptomyces* usualmente codifican 6 o 7 parálogos de SALP (proteínas parecidas a SsgA). Su función bioquímica sigue siendo desconocida, aunque se sabe que algunas de estas proteínas afectan la división celular o etapas específicas del desarrollo de las esporas.

La hifa aérea contiene inicialmente focos apicales de DivIVA, los cuales crecen por extensión de puntas como se explicó anteriormente, y ocasionalmente generan paredes entre hifas las cuales son muy parecidas a las encontradas en la hifa vegetativa (Flärdh *et al.*, 1999). Durante la etapa inicial del desarrollo de la hifa aérea se desarrolla un compartimiento apical largo y no septado, el cual contendrá una gran cadena de esporas. A este compartimiento se le denomina la célula esporogénica. En tales células se pueden encontrar altos niveles de replicación de DNA, encontrándose en cada una de éstas hasta 50 copias de cromosomas, a veces incluso más. La célula esporogénica entonces detendrá su extensión e iniciará divisiones celulares múltiples y sincronizadas (Fig. 23). Este cambio de elongación de la hifa a división celular requiere de los genes *whiA* y *whiB*, aunque la naturaleza del cambio no se conoce (esto se sabe desde Flärdh *et al.*, 1999 y en Flärdh, 2009 sigue siendo comentando). La proteína integral pequeña de membrana CrgA puede influenciar a su vez la coordinación del cambio entre la extensión de la hifa aérea y la septación al inhibir la división celular en el momento correcto (Del Sol, 2006). El gen *crgA* se encuentra cerca del origen de replicación en todos los genomas de actinomicetos, aunque el mecanismo exacto de acción de CrgA y la función de todos sus ortólogos en actinomicetos no esporulantes no se conoce.

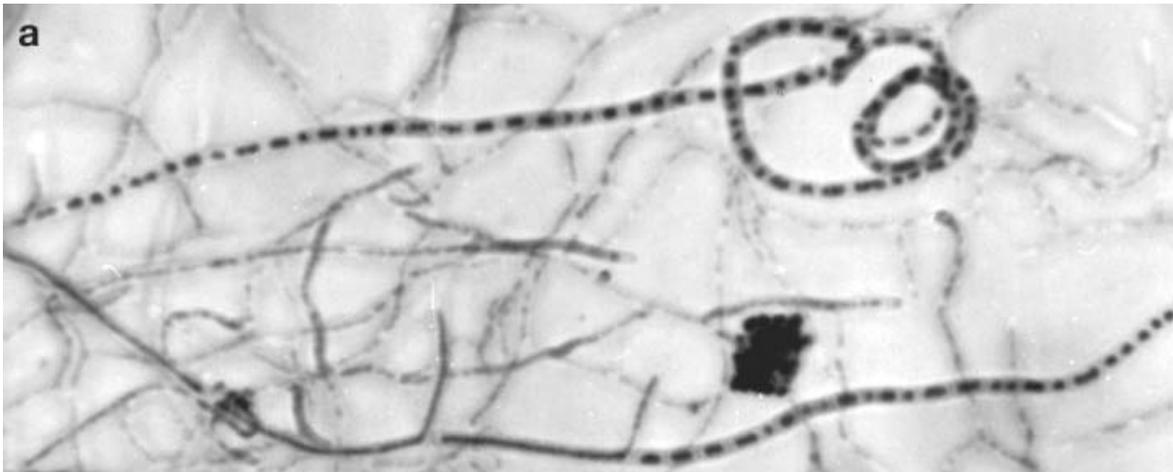


Fig. 23. Micrografía de la hifa aérea *S. coelicolor* teñida para ver nucleoides; la hifa inferior muestra un gradiente de madurez de izquierda a derecha, de largas líneas de DNA en regiones basales, pasando por cuerpos de longitud intermedia (células esporángicas), a compartimientos uni-genómicos de esporas cerca de la punta; mientras que la hifa superior muestra la segregación sincronizada del genoma (Hopwood, 2006).

El siguiente paso consiste en que la célula esporogénica es dividida por un tipo muy especial de división celular controlada, la septación de la esporulación. Como la división celular en la parte vegetativa que lleva a cabo la creación de las paredes entre hifas, la septación en la esporulación es dirigida por el homólogo bacteriano de tubulina FtsZ (McCormick, 2009). En casi todas las bacterias FtsZ se junta en un anillo citocinético, el anillo Z, el cual define los sitios de división y recluta a otras proteínas encargadas de esto. De lo que se sabe del genoma de *S. coelicolor*, estas proteínas incluyen a FtsW, FtsI, FtsL, FtsQ y DivIC, las cuales en *E. coli* y *B. subtilis* son reclutadas en los sitios de división donde se encuentra un anillo Z estable y parecen generar el mecanismo de unión entre el anillo Z y la maquinaria biosintética del peptidoglicano. No está claro cómo es que la formación de una escalera de múltiples anillos Z distribuidos en intervalos de aproximadamente 1.3 μm alrededor de toda la célula esporogénica se encuentre regulado. Un requisito previo es que la expresión de *ftsZ* tiene que estar regulada río arriba por un promotor de desarrollo específico de la hifa aérea. De este modo, los mutantes que carecen de *whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH* o *whiI* fallan al regular este

promotor de *p2ftsZ*, lo cual puede explicar el porqué de la falla de estos mutantes al generar septos de esporulación. La transcripción de *ftsZ* probablemente lleva a niveles celulares de FtsZ lo suficientemente altos como para alcanzar la concentración suficiente para la polimerización. Por lo tanto, FtsZ se polimeriza para formar filamentos helicoidales alrededor de la célula esporángica, los cuales son remodelados en anillos distribuidos de manera regular. Todavía no se sabe qué es lo que provoque que los anillos se formen en intervalos regularmente espaciados. Estudios recientes sugieren que hay requerimientos especiales para que el anillo Z se forme en la esporulación. Primero, *crgA* en *S. coelicolor* parece inhibir la unión de FtsZ en anillos regulares cuando es sobreexpresada. Segundo, la delección de *whiD* en *S. coelicolor* resulta no sólo en un menor número de cadenas de esporas, sino en irregularidades en el espaciamiento y en las formas de los septos y en la formación de mini compartimientos que no contienen información genética. Por último, la proteína citoplásmica SsgA ha sido implicada en el control positivo de la división celular tanto de *S. griseus* como de *S. coelicolor*, pero no parece ser parte del divisoma *per se*. El gen *ssgA* es regulado río arriba y es requerido para la formación de esporas. La sobreexpresión de *ssgA* estimula la división celular y aumenta la fragmentación del micelio del sustrato. Hay otros seis parálogos de *ssgA* en *S. coelicolor* y al menos tres de éstos afectan la formación o el posicionamiento del septo de esporulación; a pesar de todo esto, no se conoce la función bioquímica de esta familia de proteínas (Flärdh y Buttner, 2009).

Una célula esporángica puede contener más de 50 copias del cromosoma lineal de *Streptomyces*, inicialmente como material nuclear continuo que corre a través de toda la célula. El DNA luego se segrega en esporas unigenómicas, pero la partición completa en nucleoides individuales no ocurre sino hasta las etapas finales de la septación (Flärdh, 2003). El posicionamiento ordenado y la segregación de los cromosomas durante la esporulación involucra al menos 2 sistemas: ParAB y FtsK.

El cluster de los genes *parAB* de *S. coelicolor* es similar al locus de partición del cromosoma de tantas otras bacterias así como de plásmidos y codifica para la “ATPasa citoesquelética de Walker A” ParA y para la proteína de unión al DNA ParB, la que une específicamente a sitios de *parS* (Thanbichler y Shapiro, 2008). Los mutantes que carecen de alguno de estos dos genes producen alrededor del 15% de sus esporas con contenido irregular de DNA, pero en general no tienen otros defectos. El operón *parAB* tiene 2 promotores, uno de los cuales se encuentra muy regulado por la hifa esporogénica, de tal modo que depende de varios de los genes *whi*. Al unirse a cerca de 20 sitios *parS* centrados alrededor del origen de replicación, ParB se ensambla en un largo complejo de nucleoproteínas. Estas nucleoproteínas se distribuyen de manera regular alrededor de la célula esporogénica (considerando que en la célula esporángica no sólo hay 1 cromosoma, sino varios y por lo tanto varios complejos de nucleoproteínas), y la división celular se lleva a cabo entre éstas, de tal modo que cada compartimiento de preesporas contiene sólo una copia del cromosoma. ParA asiste en la formación de los complejos de ParB en el DNA y en la distribución regular de los focos de ParB. El ensamblaje de los focos de ParB coincide con la formación de filamentos helicoidales de ParA que se parecen originar en la punta y a través de la célula esporángica. Estos filamentos pueden ayudar a generar la fuerza necesaria para mover y posicionar los focos de ParB en intervalos regulares por la célula, y por lo mismo las regiones cromosomales *oriC* de replicación (Jakimowicz *et al.*, 2007).

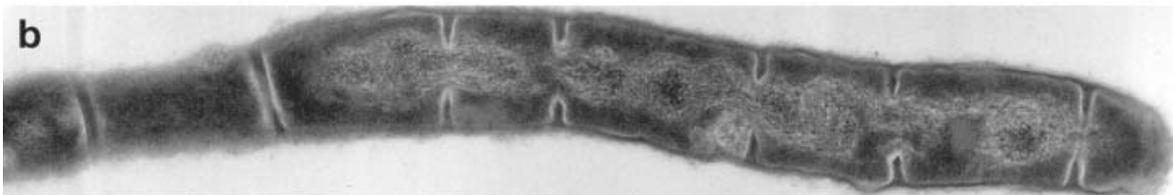


Fig. 24. Micrografía de transmisión de electrones de la sección delgada de una hifa aérea esporulante con el septo de esporulación cerrándose en posiciones ocupadas por nucleoides. (Hopwood, 2006).

Los septos de esporulación constriñen los nucleoides no segregados (Fig. 24), lo que significa que se requiere un mecanismo para remover el DNA de los septos que se encuentren cerrándose, dado por la translocasa de DNA FtsK. La FtsK de *S. coelicolor* está localizada en los septos de esporulación, aunque no es requerida para el ensamblaje de los anillos Z o para la septación. Los mutantes que carecen del gen *ftsK* muestran una mayor inestabilidad genética de la que se tiene reportada asociada con grandes deleciones, además de que varias de sus esporas poseen contenido bastante irregular de DNA. Esto llevó a la teoría de que FtsK ayuda a mover al DNA a través de los septos, de manera que si falla esta segregación, el cromosoma es atrapado en el septo y se tienen que llevar a cabo rearrreglos cromosómicos, como las grandes deleciones reportadas. En *E. coli* FtsK actúa dándole dirección a la transferencia del DNA; el dominio γ de FtsK interactúa con las secuencias cortas asimétricas de DNA llamadas KOPS (FtsK-orienting polar sequences, secuencias polares orientadas a FtsK), las cuales se encuentran posicionadas alrededor de la región terminal del cromosoma y promueven la translocación de FtsK hacia esa región. En *S. coelicolor*, el dominio γ está conservado en FtsK y las secuencias KOPS se encuentran de manera preferencial en las cadenas líder cerca del término de los cromosomas. Así, FtsK puede posicionar y transportar los brazos del cromosoma lineal de manera correcta en relación al septo. Falta considerar aquellos cromosomas que se circularizan en ésta teoría por lo que se requieren más estudios (Flårdh y Buttner, 2009).

La maduración de esporas también involucra la producción de una pared celular gruesa y resistente a lisozimas, la cual es generada después de que la septación se llevó a cabo. La correcta formación de la pared celular depende de *mreB*, lo que puede explicar porque *Streptomyces* y otros actinomicetos esporulantes contengan los genes para esta actina, mientras que otras actinobacterias no. La deleción de *mreB* en *S. coelicolor* genera esporas hinchadas y defectivas con paredes celulares irregulares. La distribución de *mreB* ha sido estudiada en las distintas etapas del desarrollo de las esporas: primero

como bandas que coinciden con los septos de esporulación después de que el septo se cerró, y después esparciéndose para rodear a la espora completamente, delineando la membrana interna antes de desaparecer en las esporas maduras (Hopwood, 2006, Flärdh y Buttner, 2009).

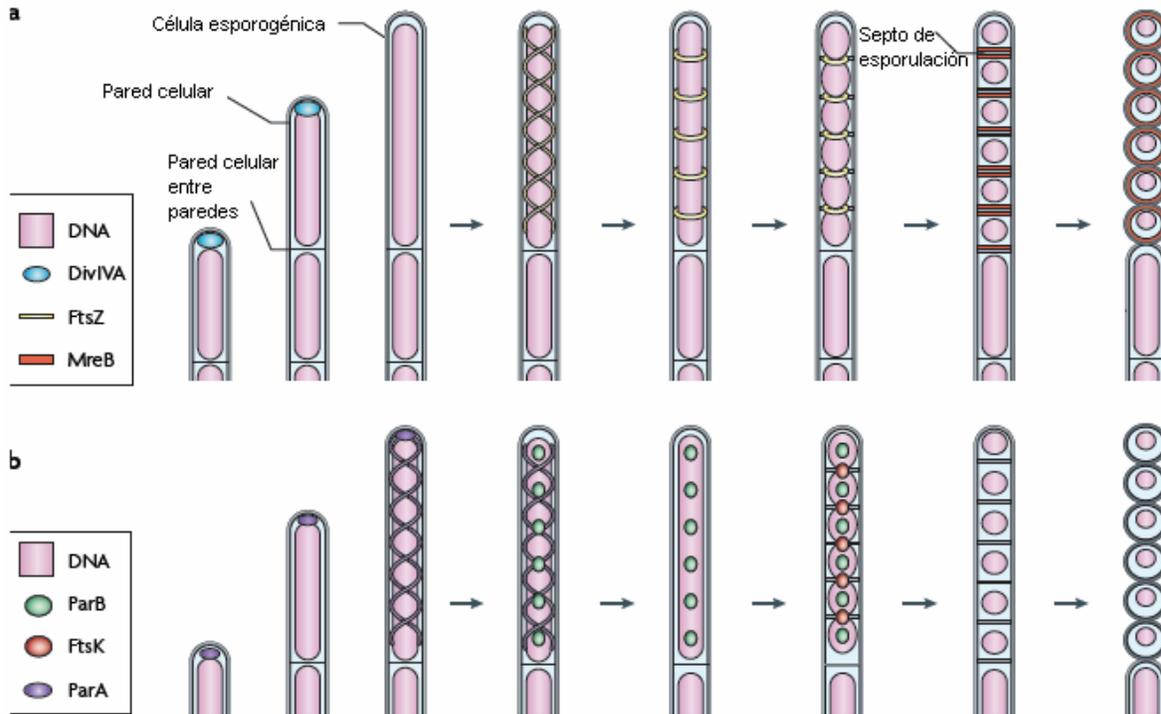


Fig. 25. Reorganización de los procesos biológicos celulares durante la diferenciación de la hifa aérea en esporas. a) Ensamblaje de la pared celular y división celular. b) Segregación de cromosomas (Flärdh y Buttner, 2009).

Regulación del metabolismo secundario

La producción de metabolitos secundarios de estos microorganismos coincide generalmente con, o a veces precede, el desarrollo de la hifa aérea en cultivos crecidos en superficies. En cultivos líquidos generalmente se confina a la fase estacionaria, y frecuentemente se asume que resulta de la limitación de los nutrientes. La mayor parte de los genes para la producción de metabolitos secundarios individuales se encuentran en clusters que varían de tamaño hasta 100kb. Muchos de estos clusters contienen genes reguladores de vías específicas cuya expresión frecuentemente depende de otros genes requeridos para la producción de varios metabolitos secundarios hechos por la cepa. Algunos de

estos genes, y más notablemente los genes *bld*, son a su vez necesarios para la formación de la hifa aérea y las esporas (Bibb, 2005).

Hopwood (1967) mostró una mutación desconocida en *Streptomyces coelicolor* llamada en ese entonces S48. Esta mutación era extraordinaria porque afectaba más de una función: tanto el pigmento azul responsable de darle el nombre *coelicolor* (azul cielo) al microorganismo como la habilidad de producir el micelio aéreo se habían perdido. En la cruce genética que Hopwood describió, la progenie era, o morfológicamente normal y azul, o no pigmentada y falta de cualquier tipo de micelio aéreo. La unión de estas dos características mostró formalmente que la misma mutación era responsable de ambos cambios. En 1976, Merrick encontró mutaciones similares en el mismo lugar del mapa genético, y nombró al gen correspondiente *bldA* (debido a la apariencia “calva” de las colonias, o “bald” en inglés) (Chater y Chandra, 2006).



Fig. 26. El efecto de la mutación en el gen *bldA*. La colonia de la izquierda es normal, con una superficie polvorosa esporulante y áreas coloreadas por antibióticos pigmentados. La colonia de la derecha carece del gen *bldA*, tiene una superficie brillante, arrugada, no esporulante, y no hace pigmentos (Chater, 2006).

De manera inusual, este gen codifica para un RNA de transferencia. No se debe olvidar que los tRNAs son pequeñas moléculas de RNA de menos de 100 bases de longitud las cuales sirven para traducir las tripletas de bases del código genético en uno de los 20 aminoácidos. El trabajo específico del tRNA de *bldA* es el de agregar un residuo de leucina a proteínas en desarrollo en las posiciones correspondientes al codón UUA, el cual en turno corresponde a TTA en el DNA del cual el RNA mensajero fue transcrito. UUA es uno de los seis diferentes codones para leucina y es importante debido a que, en primera, contrastándolo con otros codones, ningún otro tRNA puede traducirlo de manera eficiente, así que los codones de UUA dependen enormemente del tRNA de *bldA* para la traducción. En segunda, el DNA de *Streptomyces* es inusualmente rico en G y C y, de manera correspondiente, pobre en bases de T y A, así que estos codones de TTA son raros en los genes de este microorganismo. De hecho, de los 7825 genes revelados en la secuencia de *S. coelicolor*, tan sólo 145 contienen un codón de TTA (Chater y Chandra, 2006).

Gracias a ensayos de proteómica se han podido estudiar las mutaciones del gen *bldA*, ayudando a ligar la presencia de los codones de TTA en genes como *act* y *red* (genes relevantes en la síntesis de actinorhodina y en el complejo RED de antibióticos respectivamente). Hay evidencia circunstancial de que los genes regulatorios *actII-4* y *redZ* se encuentran involucrados en sistemas encargados de retroalimentación positiva de un tipo desconocido, debido a que tan sólo una copia extra de éstos genes causa un incremento fuera de proporciones del antibiótico en cuestión. De este modo, *bldA* interviene en un punto particularmente sensible en éstos sistemas, de tal modo que algún cambio en la actividad de este gen es fuertemente amplificado. Lo anterior ha sido ilustrado en el trabajo de la síntesis de otros antibióticos en *S. coelicolor*. Sus genes, que son utilizados para la síntesis de metilenomicina, se encuentran localizados en elementos extracromosomales, y se sabe que también cuentan con codones de TTA (en el cluster de genes para la producción de metilenomicina se encuentra en genes como *mmfL* y *mmvB*). Para estudiar la significancia de estos codones, cada uno

fue cambiado a su codón alternativo de leucina. El cambio de codones en *mmfL* permitió al mutante de *bldA* producir una sustancia extracelular no caracterizada que actuara como señal para la producción de metilenomicina. El otro cambio de codones en el gen *mmyB* permitió al mutante responder a tal señal preñdiendo los genes para la síntesis del antibiótico. Cuando ambos cambios fueron realizados, la producción de metilenomicina se volvió independiente de *bldA*. Esto demuestra los grandes cambios que genera la disponibilidad del tRNA de *bldA* en los sistemas de regulación (Chater y Chandra, 2006).

Una de las tantas proteínas ausentes del mutante *bldA* de *S. coelicolor* es un inhibidor de proteasas del tipo SSI codificado por SCO0762 (llamado inhibidor de la tripsina de *Streptomyces* o STI por su especificidad a la tripsina). Los inhibidores del tipo SSI son dímeros conservados de subunidades idénticas de unos 100 aminoácidos y se sabe que actúan con varias serín proteasas como las subtilisina, la quimiotripsina, la tripsina y las metaloproteasas contenedoras de zinc, al menos de *S. griseus* (Chater *et al.*, 2010). SCO076 no contiene un codón de TTA, en vez de eso, depende transcripcionalmente de la proteína reguladora AdpA, la cual sí es codificada por un gen que contiene TTA. El gen *adpA* es encontrado en *S. griseus* y es el análogo de *bldH* en *S. coelicolor* (Chater, 2006). En *S. griseus* también se encuentra la producción de un inhibidor de proteasas (SgiA) dependiente de AdpA, el cual sirve de ruta por medio de la cual el factor A regula sus efectos (explicado posteriormente). De los varios blancos sobre los que actúa AdpA en *S. griseus*, se incluyen 18 genes para proteasas. Dentro de estas proteasas se puede encontrar una metaloproteasa, la cual ha sido implicada en la diferenciación morfológica. Lo anterior sugiere que los defectos morfológicos de los mutantes *bldA* y *adpA* de *S. griseus* se deben, al menos de manera parcial, a los cambios en la abundancia y actividad de las proteasas extracelulares. Esto ha sido demostrado al agregar de manera exógena inhibidores de proteasa SgiA, los cuales inhiben la formación del micelio aéreo en *S. griseus* (Hirano *et al.*, 2006).

Dentro de las proteínas estudiadas que interactúan con STI, se han encontrado 2 proteasas. Ambas tienen dominios P de proproteína convertasa en la parte carboxilo terminal, lo cual es característico de proproteína convertasas del tipo de las subtilisinas eucarióticas, siendo esto responsable de la interacción. Una de ellas es codificada por SCO5447 y es una metaloproteasa neutral putativa homóloga a una proteasa de *S. griseus*, SgmA, la cual es dependiente de AdpA. La otra es codificada por SCO1355 y es una serín proteasa putativa cuyos dominios catalíticos, irónicamente, no se encuentran relacionados a los de SCO5447, a pesar del parecido de 55% de sus dominios P (Chater *et al.*, 2010).

En la figura 27 se puede observar un modelo propuesto por Chater, el cual liga los eventos regulatorios intracelulares con una cascada extracelular de proteasas. Actualmente no hay información que indique cómo es que la transcripción de la mayoría de los genes presentados en el modelo sea controlada. Willey *et al.* (1993) dedujo la existencia de una cascada de varias señales extracelulares no caracterizadas necesarias para el desarrollo micelial, basándose en la observación de la complementación cruzada extracelular de micelios aéreos deficientes dentro de una colección de mutantes *bld* de *S. coelicolor*, incluyendo a *bldA* y *adpA* (= *bldH*). La iniciación de tal cascada requiere que una señal dependiente de *bldJ* sea importada por el transportador oligopeptídico codificado por el locus de *bldK*, lo que llevará a la producción de otra señal dependiente de *bldA* y *bldH*. Esto a su vez llevará a la activación secuencial de más genes que codifican para factores de transcripción, en cada caso seguidos por la producción de otra señal más, en el orden de *bldG*, *bldC*, *bldD* y *bldN* (Chater y Chandra, 2006). Si, como ha sido sugerido, esta cascada y la cascada de proteasas se traslapan o incluso llegan a ser las mismas, muchos de estos genes de proteasas, como lo son SCO1355 y SCO5447 podrían resultar regulados por los genes *bld*.

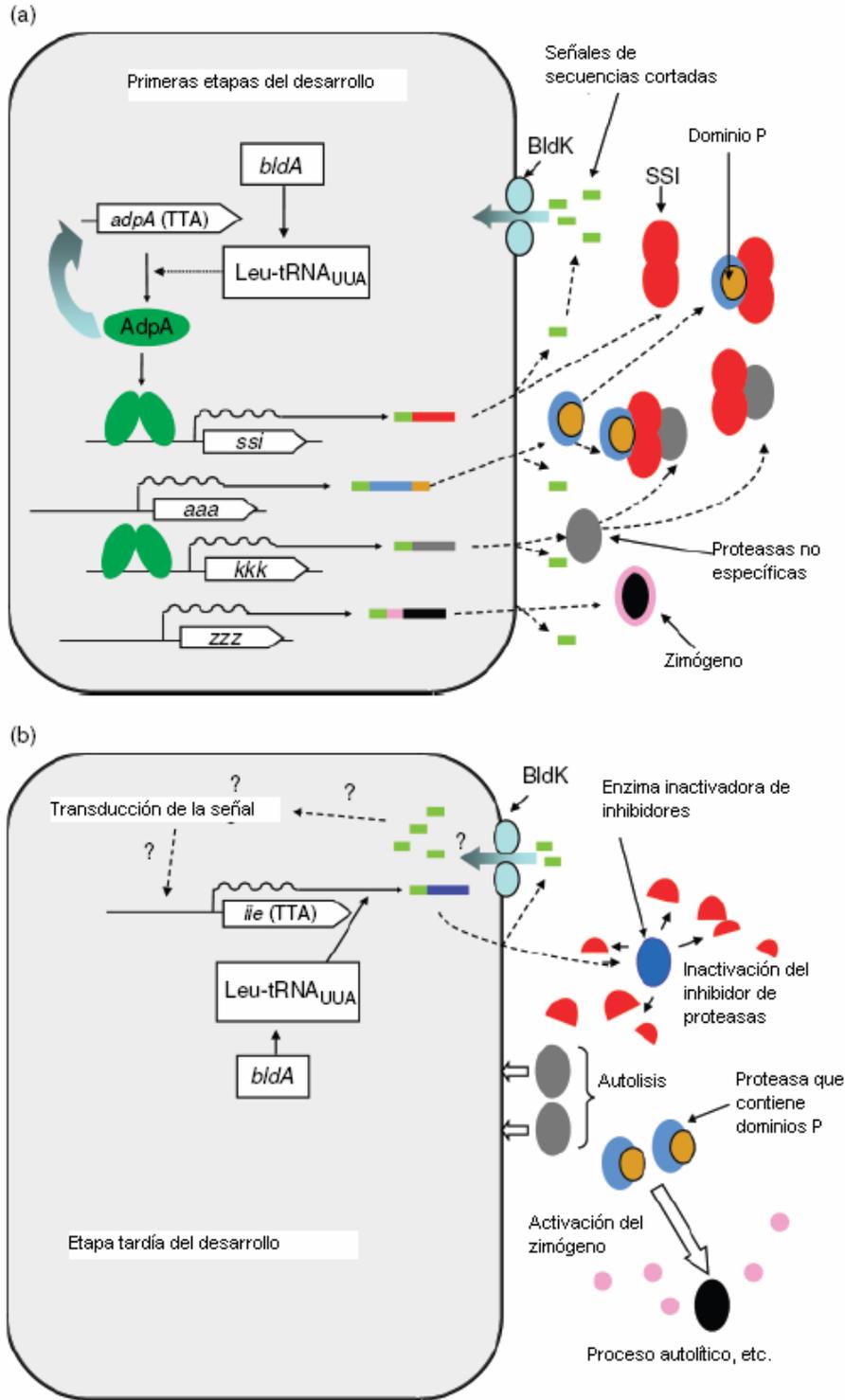


Fig. 27. Modelo general de la cascada de proteasas extracelulares que contribuyen al desarrollo de *Streptomyces*. a) Cascada detenida en la fase principal del crecimiento. Dentro de la hifa varios genes como *ssi*, *aaa*, *kkk*, y *zzz* son activados, algunos por la acción de AdpA (verde oscuro), el cual depende del tRNA cofidicado por *bldA* y su autoactivación. La secreción de los productos génicos resulta en la liberación de señales peptídicas (verde claro). SSI (rojo) se dimeriza para formar un inhibidor de proteasas, el cual une los dominios P (ocre) de ciertas proteasas así como a otras proteasas (en gris) para inactivarlas. Mientras las proteasas estén inactivas, las prosequencias (rosa) de los zimógenos no se rompen, y por lo tanto, éstos se encuentran inactivos. b) Liberación de la cascada en la fase estacionaria, activando la autólisis. Una enzima inactivada de inhibidores (IIE, azul brillante) es secretada (en *S. coelicolor*, su producción requiere la traducción de un codón de UUA). Se especula que la

inducción de IIE puede depender de la toma de oligopéptidos específicos por el transportador BldK, y que tal oligopéptidos (verde claro) puede derivarse de la secuencia señalizadora secretada por un componente de la cascada de proteasas. IIE inactiva a SSI liberando las proteasas. Las proteasas no específicas participan en la autólisis, mientras que las proteasas de dominio P activan a los zimógenos para generar enzimas (negras) que juegan papeles más específicos en el desarrollo micelial o en la autólisis (Chater *et al.*, 2010).

En comparación con *S. coelicolor*, la vía de señalización que lleva al inicio de la formación del micelio aéreo en *S. griseus* es bien conocida. La parte más importante de esta vía es el factor autorregulador A, una molécula de señalización parecida a hormonas del grupo de las γ -butirolactonas (estructuralmente similares a las lactonas de homoserina involucradas en el *quorum sensing* de las bacterias Gram-negativas). El factor A es producido por la condensación de una proteína acarreadora de 8-metil-3-oxononanil-acil y el grupo hidroxilo de un fosfato de dihidroxiacetona, catalizado por la proteína del gen *afsA* (Kato *et al.*, 2007). La pérdida de este gen lleva a la pérdida de la producción de estreptomycinina y otros metabolitos secundarios, así como a la pérdida de diferenciación morfológica; sin embargo, esto puede ser restaurado al agregar factor A de manera externa (Chater *et al.*, 2010).

En los estreptomicetos las γ -butirolactonas son producidas en gran manera, aunque sus papeles varían de especie a especie. En *S. coelicolor* y en la mayor parte de los estreptomicetos, por ejemplo, las γ -butirolactonas juegan un papel muy importante en el control de la biosíntesis de antibióticos, aunque no parecen estar involucradas en la diferenciación morfológica. De este modo, sus genes codificantes controlan directamente la producción de virginiamicina en *Streptomyces virginiae*, controlan la biosíntesis de los antibióticos nucleósidos showdomicina y minimicina en *Streptomyces lavendulae* y evocan la producción precoz de los antibióticos pigmentados Act y Red en *S. coelicolor* (Bibb, 2005). Poco se sabe de la biosíntesis de las γ -butirolactonas. Inicialmente se encontró que AfsA estaba involucrada directamente con la síntesis del factor A; sin embargo, estudios recientes sugirieron que la familia AfsA de proteínas más bien juega un complejo papel regulador, no tanto catalítico (Bibb, 2005). En *S. griseus*, el factor A actúa en la diferenciación por medio de un regulador maestro llamado AdpA, del que ya se habló anteriormente. Durante el desarrollo vegetativo, la proteína receptora del factor A, ArpA, bloquea la transcripción de *adpA*. La lenta acumulación del factor A y su interacción acumulativa con ArpA lleva a la liberación de la expresión de *adpA* y la subsecuente activación del regulón AdpA

(Bibb, 2005; Chater *et al.*, 2010; Flårdh y Buttner, 2009). Los blancos directos de AdpA incluyen genes que codifican para proteínas clave en la diferenciación morfológica como el factor sigma AdsA, que es un factor sigma de función extracelular requerido para la formación del micelio aéreo (Yamazaki *et al.*, 2000), SsgA, una proteína que influye fuertemente en la formación del septo, y AmfR, que es el regulador de respuesta que controla la expresión del operón biosintético adyacente de SapB, *amfTSBA* (Fig. 28). Otro blanco conocido es *strR*, el cual activa la síntesis de estreptomicina; además, se sabe que afecta la producción de antibióticos como la grixazona y los poliquétidos de hexahidroxiperilenequinona, aunque la activación de su cascada de señalización por medio de este factor sigue siendo incierta. Es de este modo que la acumulación del factor A lleva directamente a la activación de funciones clave del desarrollo, incluyendo la síntesis del surfactante peptídico SapB (Flårdh y Buttner, 2009).

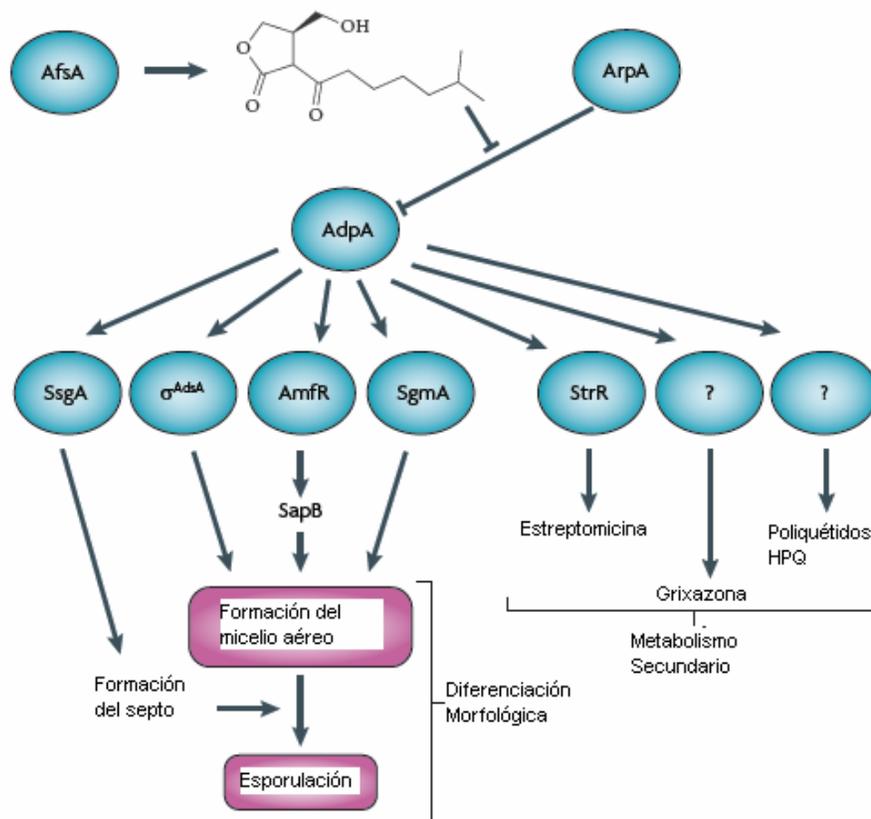


Fig. 28. La cascada de señalización del factor A activa la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario en *S. griseus* (Modificada de Flårdh y Buttner, 2009).

Aunque el papel de diferenciación del factor A no esté conservado en *S. coelicolor*, muchos elementos de la vía de señalización sí lo están y son iguales de importantes para la diferenciación: El gen *amfRTSBA* es equivalente al *ramRCSAB* de *S. coelicolor* y *ssgA* es vital para la formación del septo en ambas especies; el ortólogo de *adpA* es *bldH* en *S. coelicolor*, el ortólogo del gen del factor sigma *adS* es *bldN* y cada uno es requerido para la formación del micelio aéreo en ambas especies. Por otro lado, *bldH* no está bajo el control de las γ -butirolactonas en *S. coelicolor*, y BldH no parece regular a *bldN*. De manera similar, el promotor *amfTSBA* es reprimido por BldD en *S. griseus*, pero BldD no regula a su promotor equivalente *ramCSAB* en *S. coelicolor*, enfatizando que las “conexiones” en ambas especies no son necesariamente las mismas (Flårdh y Buttner, 2009).

Se sabe que otro tipo de factores autorreguladores están emergiendo con el avance de la investigación, por ejemplo: se encontró que un factor extracelular involucrado en la regulación de biosíntesis de metilenomicina era resistente a medios básicos (no característico de las γ -butirolactonas), llevando al descubrimiento de una nueva clase de autorreguladores de furano, estrechamente relacionados con las γ -butirolactonas. Otro tipo de autorregulador, el factor PI [2, 3-diamino-2, 3-bis (hidroximetil)-1, 4-butanediol], el cual todavía no ha sido caracterizado biosintéticamente ni genéticamente, puede activar la biosíntesis de pimaricina en un mutante de *Streptomyces natalensis* (es incluso intercambiable con el factor A en este sistema) (Chater *et al.*, 2010).

La noción de que una reducción en la tasa de crecimiento, si no el cese del crecimiento, es una señal importante para activar el metabolismo secundario, es consistente con muchos trabajos publicados. Dada su probable participación en la expresión de los genes relacionados con el control del crecimiento en bacterias unicelulares, el papel del nucleótido de guanosina altamente fosforilado (ρ) ppGpp en la producción de antibióticos en los estreptomicetos ha recibido mucha atención en los últimos años (Bibb, 2005). Su sintetasa asociada a ribosomas (RelA) es

requerida para la producción de antibióticos bajo condiciones limitadas de nitrógeno en *Streptomyces coelicolor* A3 (2) y para producción de cefamicina C en *Streptomyces clavuligerus*. Este nucleótido, también conocido como factor astringente, está involucrado en un importante sistema para censar el nivel de nutrientes y generar respuestas adaptativas en las bacterias. Se sabe que esto efectúa una respuesta rápida cuando se terminan los aminoácidos en *Escherichia coli*, regulando tanto la biosíntesis de rRNA como la producción de ribosomas. El mecanismo de acción de ppGpp ha sido estudiado de manera extensiva en *E. coli*, e involucra la reorientación de la transcripción de genes vía unión a la RNA polimerasa. En *S. coelicolor*, RelA parece ser la única fuente de síntesis de ppGpp. Aún más, cuando es sembrado en condiciones limitantes de nitrógeno, un mutante de *relA* falla en la producción de 2 antibióticos: el poliquétido pigmentado de azul actinorhodina mencionado ya varias veces en este trabajo (Act), y los antibióticos rojos de tripirrol undecilprodigiosina (Red); a su vez, los mutantes retrasaron su diferenciación morfológica. Hesketh *et al.* Usó un derivado truncado en el lado carboxilo de *relA* expresado de un promotor para lograr niveles controlables de la producción de ppGpp en *S. coelicolor*, independientemente de la falta de aminoácidos, y demostró un nexo entre la inducción de la síntesis de ppGpp y la transcripción incrementada del gen activador y controlador de la biosíntesis de Act, *actII-ORF4*. Esto apoyó bastantes estudios previos en los que se había mostrado que ppGpp influenciaba la síntesis de antibióticos en *Streptomyces*. La sugerencia de que ppGpp sirve para regular otras funciones celulares distintas a la biogénesis de ribosomas concuerda con los resultados de los estudios en otras especies bacterianas, donde juega un rol importante en diversos procesos, incluyendo el comportamiento social (*quorum sensing* y formación de biofilm), patogénesis, simbiosis, estrés y desarrollo morfológico. En *E. coli* ya se considera a ppGpp como un regulador global más que un simple regulador en la producción de ribosomas, redirigiendo la transcripción para que así genes importantes para la sobrevivencia y la virulencia sean favorecidos a expensas de aquellos requeridos para el crecimiento y la proliferación (Hesketh *et al.*, 2007).

En cuanto a las proteínas reguladoras, muchas de las que se encuentran relacionadas con las vías específicas del control de metabolismo secundario en los estreptomicetos pertenecen a la familia SARP. No se discutirán a fondo estas proteínas debido a que su naturaleza dependerá en gran parte de la vía específica del antibiótico que se esté tratando y este trabajo intenta dar un panorama más general de las moléculas involucradas en la regulación. Se ha encontrado relación de estos activadores transcripcionales con clusters del metabolismo secundario que codifican para poliquétidos aromáticos, péptidos sintetizados por ribosomas y no sintetizados por ribosomas, undecilprodigininas, poliquétidos tipo I, β -lactámicos, entre otros. Mientras estos genes, los cuales codifican para diversas clases filogenéticamente diversas de proteínas reguladoras en bacterias, se encuentran en muchos de los clusters de genes para metabolitos secundarios, la familia de proteínas SARP sólo se ha encontrado en los actinomicetos, y muchas dentro del género de los estreptomicetos (otros géneros incluyen *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Thermobifida* y *Lechevalieria*). Un miembro de la familia SARP, CcaR, regula la biosíntesis tanto de cefamicina C como de ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus*. CcaR une varias regiones promotoras dentro del cluster de cefamicina C, probablemente activando su transcripción, así como regulando positivamente su propia síntesis. La disrupción de *ccaR* elimina la expresión de *claR*, la cual codifica para proteínas reguladoras requeridas específicamente para la producción de ácido clavulánico (Bibb, 2005).

Mientras que la familia de proteínas SARP ha recibido bastante reconocimiento en virtud de su rol como reguladores específicos de vías para la producción de antibióticos, al menos 13 clusters de genes para poliquétidos tipo I y dos clusters para glicopéptidos se han encontrado que codifican para miembros de la familia LAL (reguladores largos unidores de ATP de la familia LuxR) de reguladores transcripcionales. Como la familia SARP, los homólogos similares parecen estar confinados a los actinomicetos. Aunque se entiende relativamente poco del papel general de estas proteínas en la regulación de la producción de

antibióticos, su delección, o generación de mutaciones en sus sitios unidores de ATP, provoca la pérdida de la producción de pikromicina en *Streptomyces venezuelae*. 3 homólogos de LAL son codificados en el cluster de genes de la nistatina de *Streptomyces noursei*, donde varios estudios sugieren una compleja cascada reguladora para la producción de los macrólidos de polienos. También se pueden encontrar múltiples homólogos de LAL en los clusters de la anfotericina, candicidina y la geldanamicina (Bibb, 2005).

Por último, dentro de las mutantes de *S. coelicolor*, una de las que vale la pena mencionar es la de *absB* identificada por Champness y sus colegas en 1992. La mutante de *S. coelicolor* forma hifas aéreas y esporas, pero es incapaz de producir actinorhodina, el complejo RED y los antibióticos dependientes de calcio (Huang *et al.*, 2005). Se encontró que tenía una mutación que generaba la pérdida de su función en un gen que codificaba para un ortólogo de la RNasa III (*rnc*) de *Escherichia coli*, una endorribonucleasa específica de RNA de doble cadena (Sello y Buttner, 2008). Además de su papel general en el procesamiento de RNA, la RNasa III está involucrada en la regulación de la expresión de genes en *Escherichia coli* y en otras bacterias. En *E. coli*, la RNasa III autoregula su propia expresión al romper una cadena líder no traducida de su propio mRNA. Esta ruptura lleva a un incremento en el decaimiento del mRNA de RNasa III, regulando la expresión de su gen *rnc*. De los estudios realizados en *S. coelicolor*, no se sabe aún cuales son los blancos de esta proteína para lograr regular la producción de antibióticos. Se cree que la RNasa III sea requerida para el procesamiento de los transcritos de genes reguladores ya identificados, como *actIII-orf4* y *redD*. No debe olvidarse la posibilidad a su vez, de que los transcritos de otros genes no identificados sean los verdaderos blancos de la RNasa III. De este modo se puede tener la certeza de que la RNasa III procesa, en general, transcritos para activadores de la producción de antibióticos. En el mutante de *absB*, tales activadores no serían producidos, al menos no en sus formas activas, y ningún antibiótico se podría realizar. De manera alternativa, la RNasa III podría ser requerida para degradar los transcritos de represores de la síntesis de antibióticos;

del mismo modo, en el mutante *absB* estos transcritos y sus productos persistirían. Se requieren más estudios para conocer los verdaderos mecanismos que esta proteína posee (Gravenbeek y Jones, 2008).

Alrededor de todo el trabajo se pudo notar cómo *Streptomyces* es un género muy peculiar con características únicas, lo que lo vuelve un microorganismo relativamente desconocido para el microbiólogo en general y por lo tanto, de difícil estudio; de ahí que radique la importancia de intentar establecer un panorama general sobre el mismo. La necesidad de establecer tal panorama queda bastante clara considerando el gran impacto que tienen los estreptomicetos en la industria gracias a la producción de sus cientos de metabolitos, no sólo de origen secundario, sino primario a su vez.

Por otro lado, el estudio de las características comentadas en este trabajo incluso podría llegar a ayudar en la búsqueda de nuevos antibióticos como parte de la problemática actual. La resistencia hacia los antibióticos ya conocidos está aumentando, y de manera más preocupante se observa la emergencia de organismos multi-resistentes en los hospitales. Debido a esto, por muchos años la investigación de antibióticos se enfocó casi totalmente en crear nuevos derivados de las clases ya establecidas de antibióticos, lo que se fue dificultando considerando que los mecanismos de resistencia ya existentes hacia estas clases los abordaban fácilmente (Payne, 2004). Es por esta razón que se necesitan nuevas clases de antibióticos. Se sabe, de acuerdo a algunas cifras estimadas, que los 10 cm superiores de la superficie terrestre contienen de 10^{25} a 10^{26} actinomicetos, pero solamente un aproximado de 10^7 ha sido analizado para la producción de antibióticos en los últimos 50 años, abriendo lugar para más estudios; sin embargo se debe tomar en cuenta un factor crucial: la distribución de las vías biosintéticas de antibióticos en los actinomicetos. Las vías para la eritromicina y la estreptomicina, por ejemplo, tienen una antigüedad de 500 millones de años, mientras que la de la vancomicina, incluyendo su mecanismo de resistencia, tiene al menos 200 millones de años. Otras vías biosintéticas parecen

no ser tan antiguas, y por lo mismo, su frecuencia de distribución es menor en las muestras de suelo. Considerando la distribución de vías biosintéticas y su antigüedad en los actinomicetos terrestres, algunos investigadores encontraron estreptotricina en cerca del 10% de actinomicetos de una muestra de suelo recolectada al azar, principalmente de *Streptomyces*. La estreptomycinina fue encontrada en cerca del 1% de esa muestra, mientras que la tetraciclina y la actinomicina se encontraban presentes en cerca del 0.1%. No hay duda sobre la razón por la cual estos antibióticos fueron de los primeros en ser descubiertos. Las vías para la eritromicina y la vancomicina son poco abundantes, presentándose con frecuencias de cerca de 5×10^{-6} y 1.5×10^{-5} respectivamente, y sin embargo fueron lo suficientemente abundantes para ser aisladas con los métodos de los años cincuentas. Muchos otros antibióticos, tal vez cerca de 2000, fueron aislados con frecuencias cercanas a $1-2 \times 10^{-7}$. Por lo tanto, se ha estimado que todos los antibióticos que quedan por ser descubiertos, se encontrarán en una frecuencia menor a 10^{-7} por actinomiceto analizado. El reto de encontrar tales antibióticos es que otros muchísimo más comunes y ya conocidos aparecen también en estas búsquedas con mayor frecuencia, y necesitan ser descartados (Baltz, 2007). En otras palabras, entre todos los antibióticos conocidos actualmente, la frecuencia de distribución de los más comunes sobrepasa ampliamente la de los menos comunes, por lo que no es de extrañar que algunos estudios reporten que el porcentaje de redescubrimiento de moléculas antimicrobianas ya conocidas se acerque al 99.9% (Keller y Zengler, 2004). Es por esta razón que los esfuerzos para la búsqueda de nuevos antibióticos deben ser derivados en encontrar nuevos métodos de análisis de búsqueda o en encontrar nuevos medios de cultivo y de muestreo que permitan el enriquecimiento para especies todavía no examinadas de actinomicetos. De cualquier modo, la importancia del estudio de los actinomicetos y de *Streptomyces* en este sentido queda aclarada, ya que el conocer más a fondo las distintas especies y géneros y sus características únicas y verdaderos requerimientos pueden facilitar estos descubrimientos.

Conclusiones

Comenzando desde su inusual cromosoma, su alta producción de metabolitos secundarios en comparación con otras bacterias, hasta su formación de hifas y esporas, *Streptomyces* es un género con un gigantesco campo de estudio del cual falta mucho por investigar como se pudo observar en este trabajo. En la sección de genética se notó la dificultad que se tiene para explicar la inestabilidad del genoma, así como la relativa oscuridad del tema en cuanto a la razón de ser del gran potencial que tiene el microorganismo, en cuanto a número de genes se trata, para la producción de metabolitos secundarios. En la formación de hifas y esporas se observó que estos procesos apenas y han logrado ser explicados, aunque se tengan muchas teorías al respecto. Por último, en la parte de regulación, se logró resaltar lo mucho que falta de investigación en cuanto al tema.

Es menester reiterar la necesidad de profundizar en estos temas si se planea comprender sobre la producción de los metabolitos generados por *Streptomyces*, e incluso por otras bacterias u hongos en general; esto porque muchas de las moléculas encontradas en el género tienen un gran parentesco con moléculas de otros microorganismos. Lo anterior puede dar luz a nuevas teorías sobre el funcionamiento de moléculas ya conocidas, por lo que se comprende que el adentrarse en el estudio de los estreptomicetos puede ser incluso un ejercicio de retrospectiva sobre temas ya dados por visto y de los que se puede obtener más información.

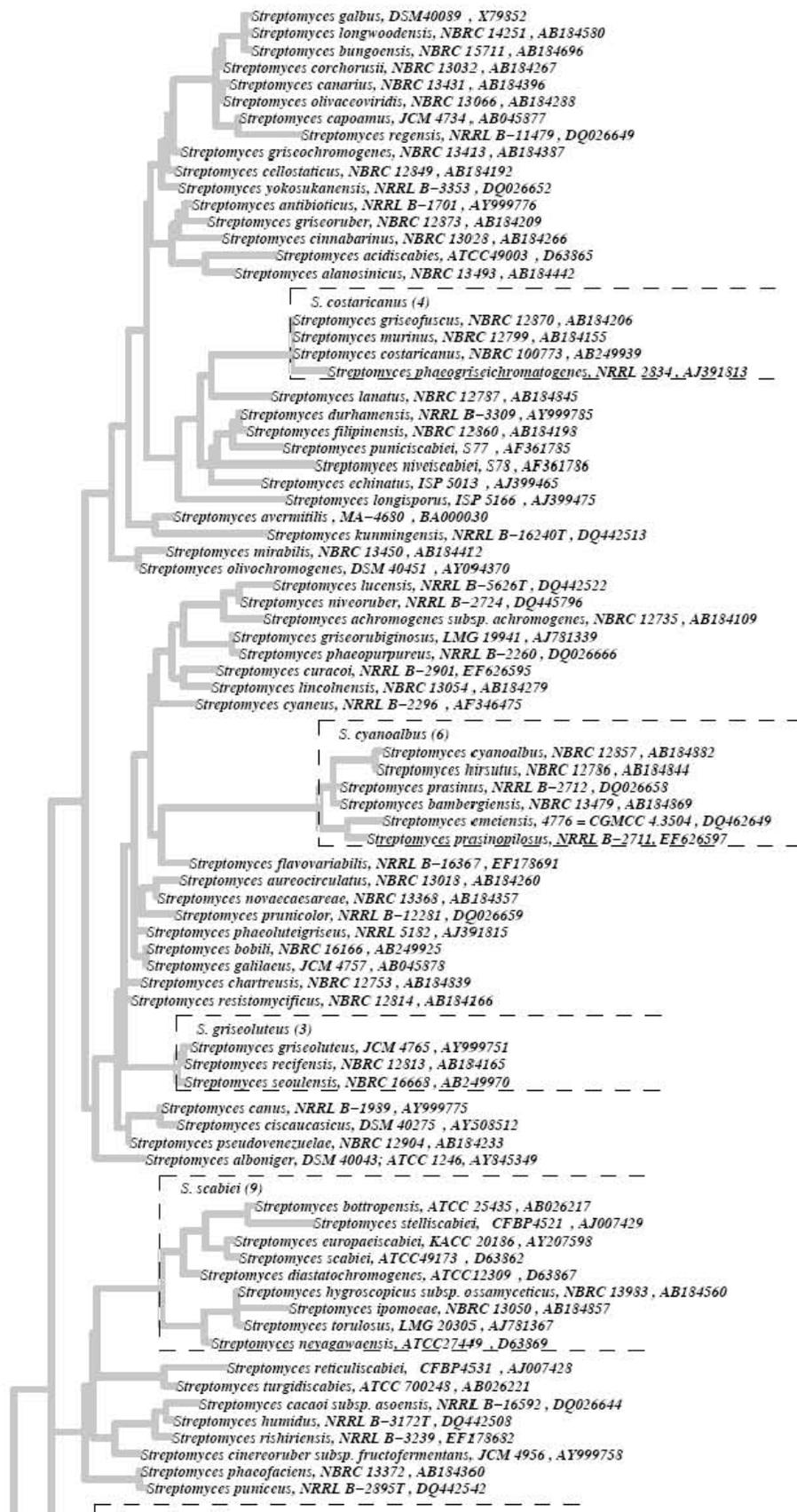
Recomendaciones

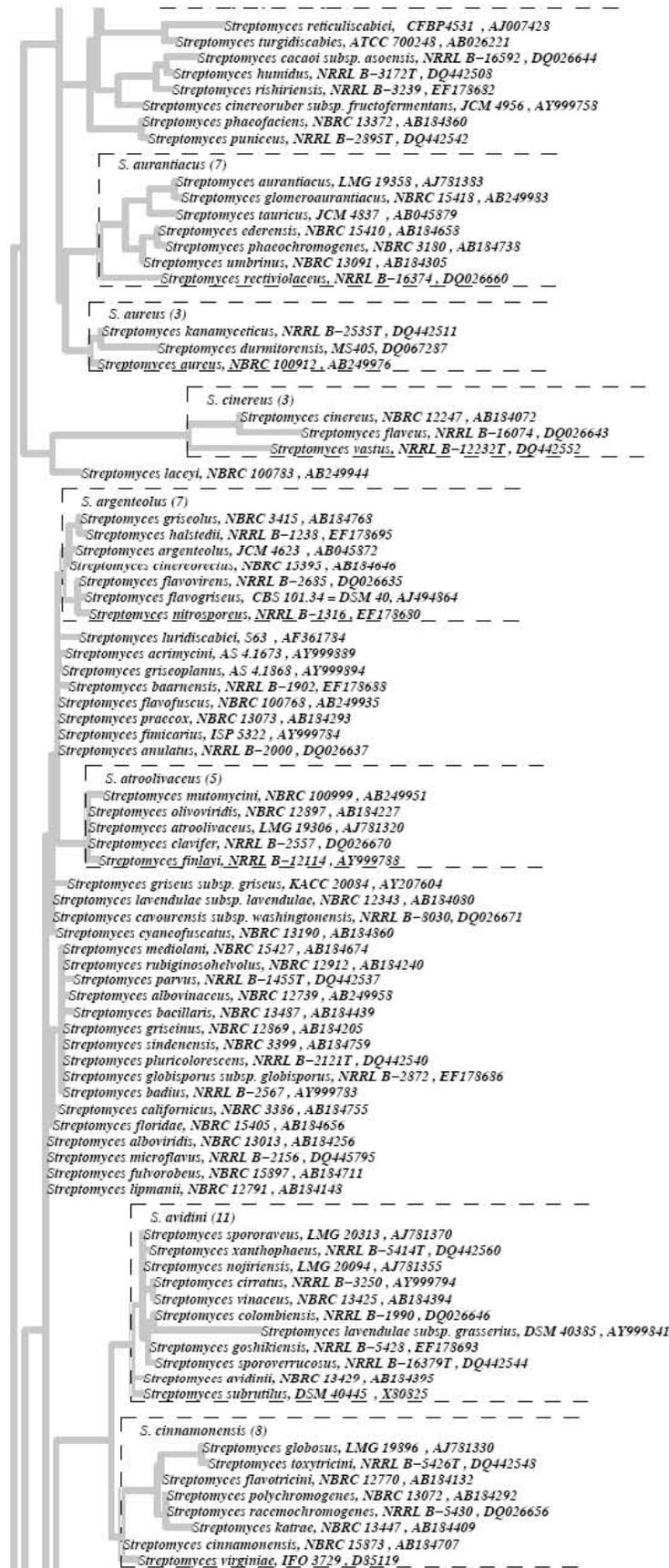
- Se debe ahondar en el estudio de la genética del microorganismo para clarificar su inestabilidad.
- Se debe analizar el número de estreptomicetos no cultivables y compararlo filogenéticamente con las especies ya conocidas para tener una idea del potencial del campo en el que se puede trabajar.
- Se debe continuar con el secuenciamiento de más cepas para tener toda la información posible sobre el género *Streptomyces*.
- Se debería obtener no sólo los genomas, sino también de ser posible, los proteomas de los microorganismos para mayor comprensión de los temas vistos en este trabajo.

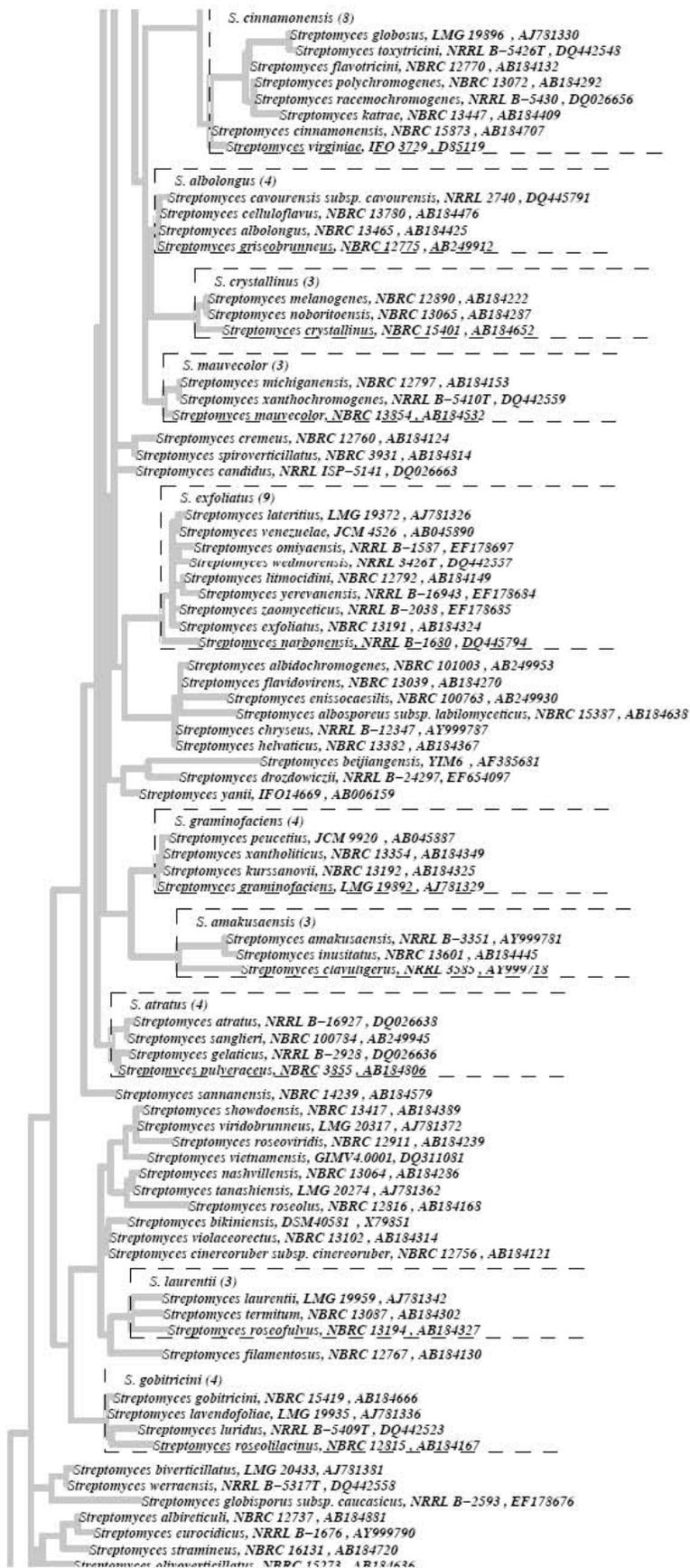
Anexos

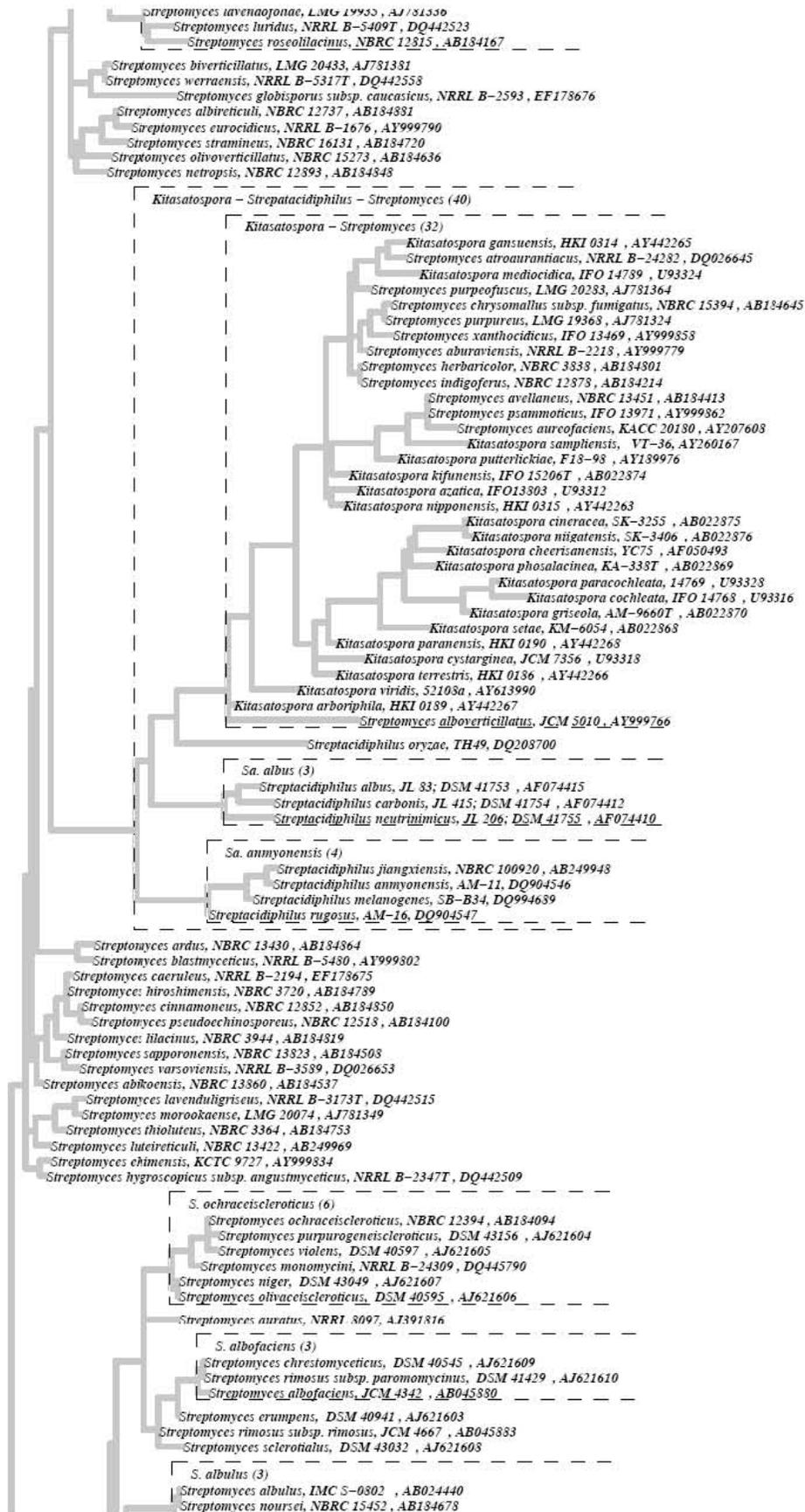
Anexo 1

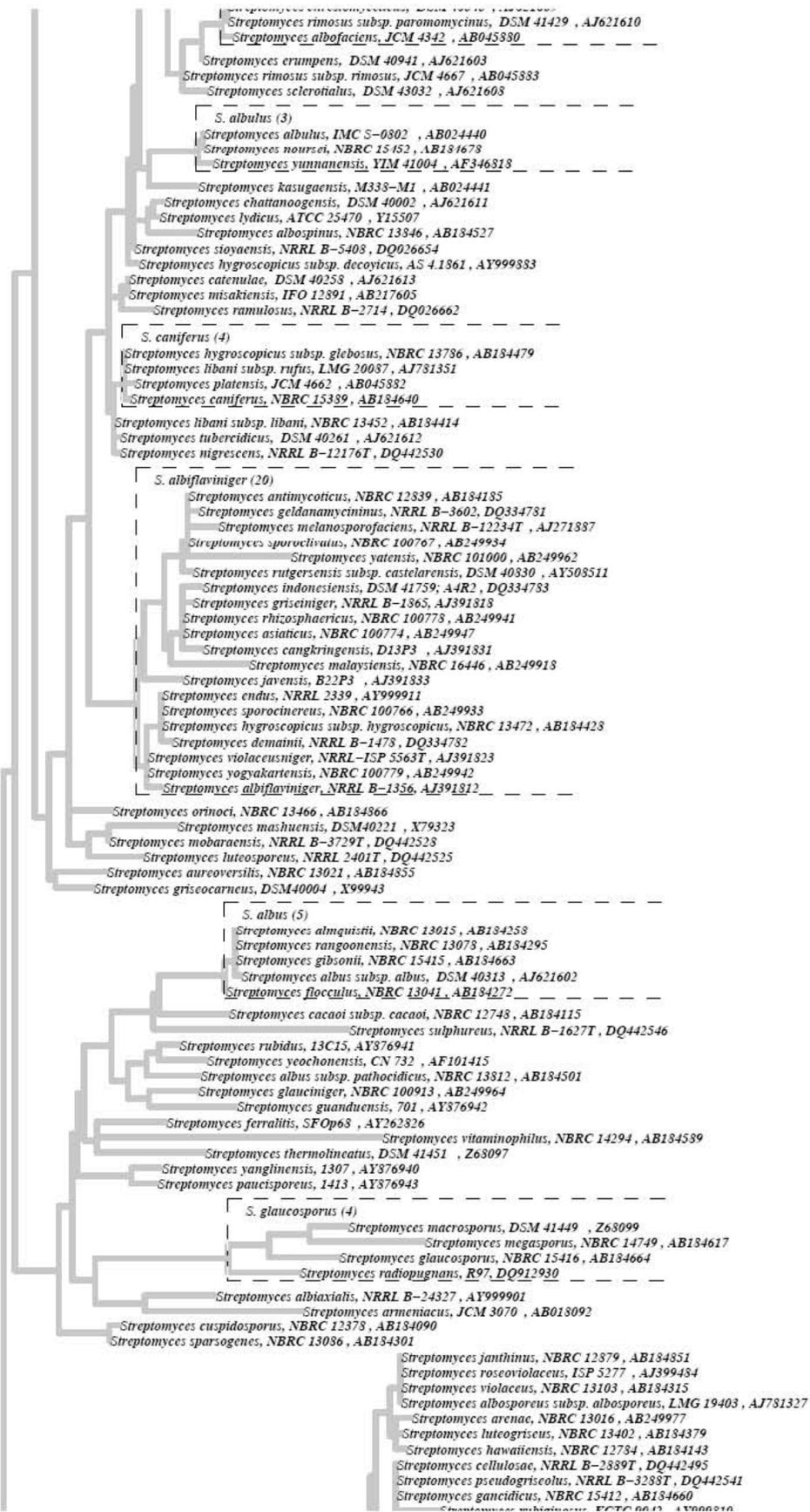
Árbol filogenético de *Streptomyces* utilizando secuencias representativas de subunidades del rRNA.
(Goodfellow *et. al*, 2011)



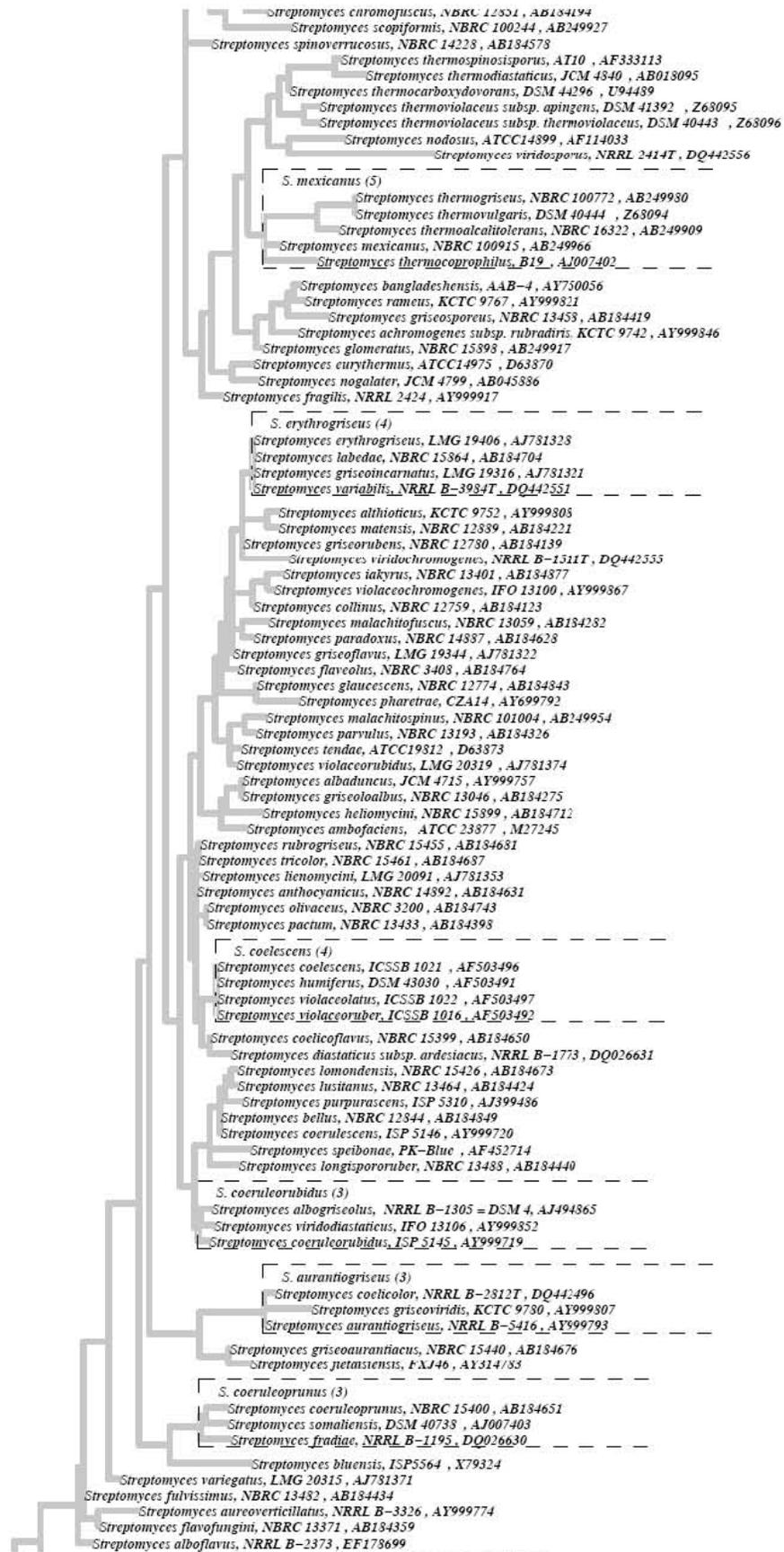


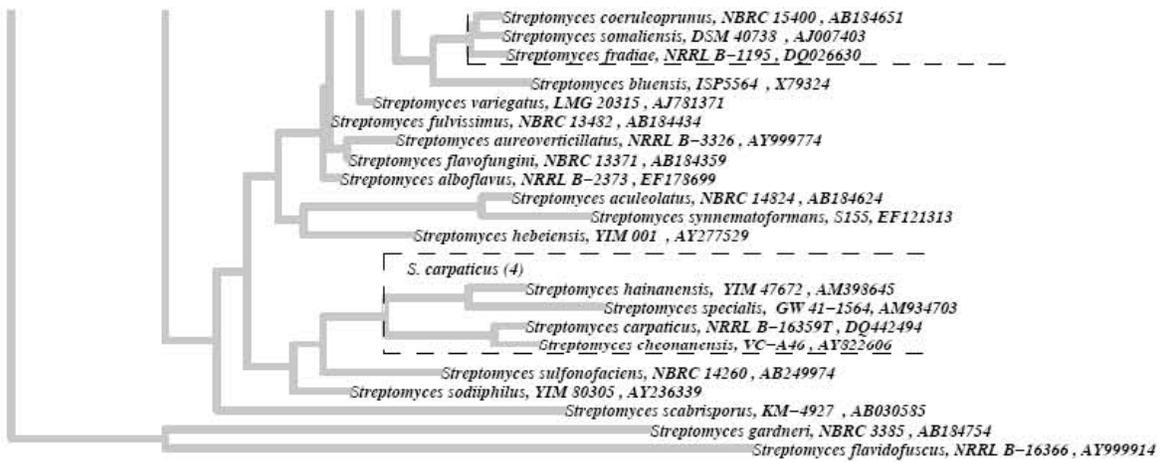












Anexo 2

Tabla de categorías funcionales de los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* armada de la página <http://cmr.jcvi.org> en 2011.

Categorías funcionales	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Biosíntesis de amino ácidos	155 (1.96%)	147 (1.92%)
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores	146 (1.85%)	159 (2.07%)
Envoltura celular	506 (6.41%)	674 (8.79%)
Procesos celulares	427 (5.41%)	336 (4.38%)
Metabolismo intermediario central	462 (5.85%)	388 (5.06%)
Metabolismo de DNA	454 (5.75%)	233 (3.04%)
Metabolismo de energía	1547 (19.59%)	798 (10.40%)
Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos	209 (2.65%)	221 (2.88%)
Motilidad y elementos extracromosomales	77 (0.98%)	122 (1.59%)
Manejo de proteínas	501 (6.34%)	304 (3.96%)
Síntesis de proteínas	361 (4.57%)	191 (2.49%)
Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	89 (1.12%)	89 (1.16%)
Funciones regulatorias	958 (12.13%)	744 (9.70%)
Transducción de señales	41 (0.52%)	27 (0.35%)
Transcripción	154 (1.95%)	134 (1.75%)
Proteínas de transporte y de unión	777 (9.84%)	736 (9.59%)
Sin clasificar	777 (9.84%)	1725 (22.88%)
Función desconocida	256 (3.24%)	613 (7.99%)
Total	7897 (100%)	7671 (100%)

No olvidar que muchas de estas categorías están compuestas por genes hipotéticos.

Bibliografia

1. Alanis AJ. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res.* 36(6):697-705.
2. Anderson AS, Wellington MH. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J of Syst Evol Microbiol.* 51 (3): 797-814.
3. Aretz W, Koller KP, Riess G. 1989. Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24. *FEMS Microbiol Lett.* 53 (1-2): 31-5.
4. Baltz R. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the Future. *Microbe.* 2 (3):125-131.
5. Baltz RH. 2006. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol.* 24 (12): 1533–1540.
6. Bandlish RK, Hess J, Epting KL, Vieille C, Kelly RM. 2002. Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. *Biotechnol Bioeng.* 20; 80 (2): 185-94.
7. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nat.* 417 (6885):141-147.
8. Berdy J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. In: *Advances in Applied Microbiology*, Edited by D Perlman. New York: Academic Press, pp. 08-406.
9. Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8 (2): 208-15.
10. Carballido-Lopez R. 2006. The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70 (4): 888–909.
11. Champness W, Riggle P, Adamidis T, Vandervere P. 1992. Identification of *Streptomyces coelicolor* genes involved in regulation of antibiotic synthesis. *Gene.* Jun 15; 115 (1-2): 55-60.
12. Chater KF, Chandra G 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev.* 30 (5): 651–672.
13. Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34(2): 171-198.
14. Chater KF. 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): 761-8.
15. Chen W, He F, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. 2010. Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *BMC Microbiol.* 10:198.

16. Claessen D. *et al.* 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17 (14): 1714–1726.
17. Collins MD, Jones D. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microb Rev.* 45 (2):316–345.
18. Del Sol R, Mullins JG, Grantcharova N, Flårdh K, Dyson P. 2006. Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 188 (4): 1540–1550.
19. DiBerardo C, Capstick DS, Bibb MJ, Findlay K, Buttner MJ, Elliot MA .2008. Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hyphae formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 190 (17): 5879–5889.
20. Dworkin M, Schleifer H, Stackenbrandt E. 2007. The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community. Springer, tercera edición, Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.
21. Flårdh K, Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 7 (1): 36-49.
22. Flårdh K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 6 (6): 564–571.
23. Flårdh K, Findlay KC, Chater KF. 1999. Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 145 (Pt 9): 2229–2243.
24. Fragoso DM. Caracterización fenológica y genotípica de bacterias gram + aisladas del pacífico mexicano. 2009. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
25. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman WB. 2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5 The Actinobacteria. 2nd edition, Springer, New York, USA.
26. Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37 (1):189-216.
27. Gravenbeek ML, Jones GH. 2008. The endonuclease activity of RNase III is required for the regulation of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 154 (Pt 11): 3547-55.
28. Hesketh A, Chen WJ, Ryding J, Chang S, Bibb M. 2007. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Genome Biol.* 8 (8): R161.
29. Hirano S, Kato JY, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2006. Control of the *Streptomyces subtilisin* inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 188 (17): 6207–6216.
30. Hopwood DA. 2007 *Streptomyces* in nature and medicine: The antibiotic makers. Oxford University Press, New York.
31. Hopwood DA. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Ann Rev Microbiol.* 40: 1-23.
32. Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ, Cohen SN. 2005. Cross-regulation among

- disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58 (5): 1276-87.
33. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*; *Nat Biotechnol.* 21 (5):526-531.
 34. Jakimowicz D, Zydek P, Kois A, Zakrzewska-Czerwinska J, Chater KF. 2007. Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae. *Mol. Microbiol.* 65 (3): 625–641.
 35. Kato JY, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007. Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *P Nat Acad Sci USA.* 104 (7): 2378–2383.
 36. Keller M, Zengler K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2 (2): 141-150.
 37. Kim BS, Lonsdale J, Seong CN, Goodfellow M. 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman y Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al., 1997. *Ant v Leeuwenhoek.* 83 (2):107 116.
 38. Kodani S, et al. 2004. The SapB morphogen is a lantibioticlike peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 101 (31): 11448–11453.
 39. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nat.* 390 (6657): 249-56.
 40. Kutzner HJ. 1981. The family Streptomycetateae, The Prokaryotics (vol II), Mortimer P. Starr, Heinz Stolp, Hans G. Trüper, Albert Balows, Hans G. Schlegel, Springer-Verlag, pp. 2029-2058.
 41. Labeda DP, Lechevalier MP, Testa RT. 1997. *Streptomyces stramineus* sp. Nov., a new species of the verticillate streptomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 47 (3): 747-53.
 42. Lanoot B. 2005. Improved taxonomy of the genus *Streptomyces*. Tesis doctoral. Universiteit Gent. Faculteit Wetenschappen, Laboratorium voor Microbiologie.
 43. Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Ant v Leeuwenhoek.* 78 (3-4): 399-405.
 44. Lechevalier MP. 1977a. Lipids in bacterial taxonomy: a taxonomist's view. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 5 (2):109–210.
 45. Letek M, et al. 2008. DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190 (9): 3283–3292.

46. Liras P, Martín JF. 2006. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int Microbiol.* 9 (1):9-19.
47. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms, 10th edition, Prentice Hall, New Jersey, USA.
48. Maldonado LA, Stach JE, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Ant v Leeuwenhoek.* 87 (1):11-18.
49. Mansouri K, Piepersberg W. 1991. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, strFGHIK, including a phosphatase gene. *Mol Gen Genet.* 228 (3): 459-69.
50. Mazza P, *et al.* 2006. MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol Microbiol.* 60 (4): 838–852.
51. McCormick JR. 2009. Cell division is dispensable but not irrelevant in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 12 (6): 689-98.
52. O'Connor TJ, Kanellis P, Nodwell JR. 2002. The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol Microbiol.* 45 (1): 45–57.
53. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11): 4050 - 4060.
54. Okami Y, Tazaki T, Katumata S, Honda K, Suzuki M, Umezawa H. 1959. Studies on *Streptomyces kanamyceticus*, producer of kanamycin. *J Antibiot (Tokyo).* 12: 252-6.
55. Omura S. 1992. The expanded horizon for microbial metabolites—a review. *Gene* 115 (1-2): 141–149.
56. Payne DJ. 2004. Antimicrobials-where next? *Microbiol Today* 31: 55-57.
57. Schleifer KH, Kandler O. 1972: Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriol Rev.* 36 (4):407-477.
58. Sello JK, Buttner MJ. 2008. The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation. *J Bacteriol.* 190 (11): 4079-83.
59. Serrano, JA. Actinomicetoma. Editores Plaza y Valdés, 2007. Colección Ciencia y Tecnología. Capítulo XII. Epidemiología del Actinomicetoma en Las Américas.
60. Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 16: 313-340.
61. Shirling EB, Gottlieb D. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces III*. Species descriptions from first and second studies. *Int J Syst Bacteriol.* 18: 279-392.
62. Sommer P, Bormann C, Gotz F. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol.* 63 (9): 3553-60.

63. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nat.* 406 (6799): 959-64.
64. Thanbichler M, Shapiro L. 2008. Getting organized — how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol.* 6 (1): 28–40.
65. Thykaer J, Nielsen J. 2003. Metabolic engineering of beta-lactam production. *Metab Eng.* 5 (1): 56-69.
66. Tresner HD, Backus EJ. 1963. System of color wheels for streptomycete taxonomy. *Appl Microbiol.* 11:335-338.
67. Uchida K, Seino A. 1997. Intra- and intergeneric relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. *Int J Syst Bacteriol.* 47 (1): 182-190.
68. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71 (3): 495-548
69. Volff JN, Altenbuchner J. 2000. A new beginning with new ends: linearization of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett.* 186 (2): 143-50.
70. Waksman SA, Henrici AT. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *J Bacteriol.* Oct; 46 (4): 337.41.
71. Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.* 176 (5): 386-390.
72. Weber T, Wezel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol.* 106 (2-3): 221-232.
73. Willey J, Schwedock J, Losick R. 1993. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 7 (5): 895–903.
74. Williams ST, Goodfellow M, Alderson G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Willkins. Baltimore, MD. 4:2453–2492.
75. Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2000. An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sigma (AdsA)) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 182 (16): 4596-605.
76. Zhang Z, Wang Y, Ruan J. 1997. A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *Int J Syst Bacteriol.* 47 (4):1048–1054.
77. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/imagenes%20de%20galeria/micetomas/pages/micetoma_nbrasiliensis1_R.jpg.htm
78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/40749>

79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/46847>
80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>