



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

PAPEL DEL GEN *sco2127* EN LA REPRESION CATABOLICA POR GLUCOSA  
EN *Streptomyces coelicolor*

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ANGELA VICTORIA FORERO FORERO

DIRECTOR DE TESIS

DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. ROMINA RODRIGUEZ SANOJA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DR. ROBERTO ARREGUIN HERNANDEZ

INSTITUTO DE QUIMICA

MEXICO, D.F., MARZO 2012

PAPEL DEL GEN *sco2127* EN LA REPRESION CATABOLICA POR GLUCOSA  
EN *Streptomyces coelicolor*

RECONOCIMIENTOS

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

El comité tutorial que asesoro el desarrollo de esta tesis estuvo formado por

Dra. Romina Rodríguez Sanoja Instituto de Investigaciones biomédicas, UNAM

Dr. Roberto Arreguín Espinosa Instituto de Química, UNAM

Dr. Sergio Sánchez Esquivel Instituto de Investigaciones biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Luis Servín, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del instituto de investigaciones biomédicas quien donó cepas y nos dio a conocer la técnica de PCR targeting®, para este proyecto.

Se reconoce la colaboración de JEOL DE MEXICO SA DE CV, INSTUTO MEXICANO DEL PETROLEO Y LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE FACULTAD DE CIENCIAS UNAM para la realización de las fotografías de microscopía electrónica.

Se reconoce la colaboración de la Lic. Lucia Brito Ocampo y de Lic. Martha Cariño Aguilar de la Biblioteca del IIB-UNAM

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

El proyecto fue parcialmente apoyado por el CONACYT (CB2008-100564-IIBO) y por el programa PAPIIT (IN201413) de la DGAPA.

El jurado del examen doctoral estuvo constituido por

Presidente Dra. María Lourdes Girard Cuesy

Secretario Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Vocal Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Vocal Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Sarabia

Vocal Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

## **CONTENIDO**

**RESUMEN (1)**

**ABSTRACT (2)**

**INTRODUCCION (3)**

**Actinomicetos (3)**

***Streptomyces* (4)**

**Ciclo de vida de *Streptomyces* (4)**

**Represión catabólica por carbono (RCC), un fenómeno fascinante! (5)**

**El sistema PTS (6)**

**Cómo ocurre la RCC en bacterias Gram-negativa: *Escherichia coli* (7)**

**Regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC: *Bacillus subtilis* (7)**

**Regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC: *Streptomyces* (9)**

**Sistema PTS en *Streptomyces* (9)**

**Transporte de carbohidratos (10)**

**Estudios sobre los transportadores de glucosa en *Streptomyces coelicolor* (11)**

**Actinorrodina y RCC (12)**

**Diferenciación Morfológica y RCC (12)**

**Avances en la comprensión de la RC por glucosa en *Streptomyces* (14)**

**La glucosa cinasa (Glc): una enzima misteriosa... (14)**

**Antecedentes a este proyecto (15)**

**El gen *sco2127* (16)**

**PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA (19)**

**OBJETIVOS (19)**

**MATERIALES Y MÉTODOS (20)**

**Cepas y Plásmidos (20)**

**Obtención de la cepa mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127* (20)**

**1. Obtención del cassette templado de amplificación (21)**

2. Diseño de primers para amplificación del casete de interrupción (21)
3. Inserción del cósmido *SC6E10* en *E. coli BW25113/pJJ790*. (22)
4. Inserción del casete de interrupción y generación del cósmido interrumpido en *sco2127*. (23)
5. Comprobación de la correcta inserción del casete de interrupción en el cósmido *SC6E10*. (23)
6. Inserción del cósmido en la cepa *E. coli ET12567/pUZ8002* (24)
7. Conjugación intergenérica para obtener mutantes de *S. coelicolor* con reemplazo del gen *sco2127* por casete de resistencia a apramicina (24)
8. Comprobación de la generación de la mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *SCO2127::Apra*. (25)

### **Caracterización de la mutante (26)**

*Determinación de curva de crecimiento por peso seco*. (26)

*Determinación de actividad de  $\beta$ -galactosidasa*. (26)

*Determinación de actividad de glucosa cinasa*. (26)

*Determinación de carbohidratos totales*. (26)

*Determinación de actinorrodina*. (27)

*Comparación morfológica por microscopia electrónica de barrido*. (27)

### **RESULTADOS (28)**

#### **Amplificación del cassette de interrupción (28)**

**Verificación de integridad y el correcto reemplazo del gen *sco2127* por el casete de resistencia a apramicina por medio de enzimas de restricción *in vitro*. (28)**

**Conjugación intergenérica para la obtención de mutantes de *S. coelicolor* con reemplazo del gen *sco2127* por casete de resistencia a apramicina en el cromosoma. (29)**

**Comprobación de la generación de la mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*. (29)**

**Digestión de las bandas para análisis por tamaño de corte. (30)**

**Prueba preliminar de expresión. (31)**

**Caracterización de la mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*. (31)**

*Crecimiento y pH* (31)

*Actividad de  $\beta$ -galactosidasa* (33)

*Actividad de Glk* (33)

*Producción de actinorrodina* (34)

*Diferenciación morfo-fisiológica* (36)

### **DISCUSIÓN (38)**

**CONCLUSIONES (40)**

**PERSPECTIVAS (40)**

**REFERENCIAS (41)**

**ANEXOS (48)**

**Metodología PCR targeting®**

**Publicaciones**

## FIGURAS

Fig 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*

Fig. 2. Sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP).

Fig. 3. Mecanismo de RCC en *B. subtilis*.

Fig. 4. Modelo del efecto de bajas y altas concentraciones de N-acetilglucosamina (N-AcGlc) en el medio.

Fig. 5. Sistemas de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*

Fig. 6. Modelo del posible papel regulatorio de la glucosa cinasa en *S. coelicolor*

Fig. 7. Fragmento de 2.9 kb con el cual se complementaron las mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. coelicolor*

Fig. 8. plásmido pIJ773 y cassette de interrupción que se extrae del mismo

Fig. 9. Ciclo de PCR para la obtención del cassette de interrupción de apramicina.

Fig. 10. *E. coli* BW25113/pIJ790

Fig. 11. *E. coli* BW25113/cos.int.

Fig.12. Gel de agarosa al 0.8% se observa el producto de PCR de 1462 pb.

Fig. 13. Gel de agarosa al 0.8%. En este se observan los productos de digestión del cósmido SC6E10 y del cósmido interrumpido, cortados con las enzimas XbaI, SacI, y XhoI.

Fig.14. Confirmación de mutantes en medio selectivo.

Fig.15. Ciclo de PCR para *S. coelicolor* M145 y para las mutantes *S. coelicolor* ΔSCO2127::Apra, así como los productos de amplificación en geles de agarosa al 1%.

Fig.16 Análisis de restricción y gel de agarosa al 1% con la digestión del producto de PCR *sco2127* y cassette de resistencia a apramicina.

Fig.17. Western blot realizado con extractos crudos de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* Δ*sco2127*::Apra, y *S. peucetius* var. *caesius* enfrentados al anticuerpo policlonal anti-*sco212*.

Fig.18. Crecimiento, pH, actividad de β-galactosidasa y actividad de Glk en medios (a) L50G100 y (b) L50.

Fig.19. Crecimiento, pH y actividad de Glk en medios G50 (△, ▲), G100 (\*) y M50 (◇,◆) para la cepa M145 (a y c) y para la cepa mutante (b y d).

Fig. 20. Determinación cualitativa de producción de actinorrodina en *S. coelicolor* y *S. coelicolor* Δ*sco2127*. El medio empleado fue TSB a diferentes concentraciones de glucosa.

**Fig. 21. Efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre el crecimiento (■, □) y la producción específica de actinorrodina (●, ○) en *S. coelicolor* M145 (símbolos negros) y la mutante  $\Delta$ *sco2127* (símbolos claros)**

**Fig. 22. Microfotografías electrónicas de barrido de *S. coelicolor* M145 (A and C) y la mutante  $\Delta$ *sco2127* (B and D).**

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius*

Tabla 2. Efecto de la complementación de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre transporte, actividad de Glk y sensibilidad a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*

Tabla 3. Cepas y Plásmidos

Tabla 4. Condiciones de crecimiento en diferentes fuentes de carbono

## RESUMEN



*Streptomyces coelicolor* es un microorganismo modelo en estudios fisiológicos y de regulación para muchos actinomicetos pertenecientes a este género. A este microorganismo, y algunos de sus congéneres les ocurre un fascinante fenómeno conocido como REPRESION CATABOLICA POR FUENTE DE CARBONO (RCC). Particularmente para *S. coelicolor* la glucosa es su fuente de carbono favorita y la que prefiere consumir por encima de otras que se encuentren cerca de ella. Esto provoca que muchos de sus genes, especialmente los asociados a la producción de metabolitos secundarios, se prendan o se apaguen a medida que consumen las fuentes de carbono de manera ordenada y jerárquica.

Se ha visto que cuando *S. coelicolor* se crece en presencia de diversas fuentes de carbono, incluyendo a la glucosa, el microorganismo prefiere metabolizar glucosa y a la vez previene la utilización de otras fuentes de carbono y reprime la producción de algunos de sus metabolitos secundarios, como la actinorrodina (pigmento azul).

Estudios previos en nuestro laboratorio, mostraron que mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes al análogo de glucosa, 2-desoxiglucosa, son capaces de producir sus metabolitos secundarios aun en presencia de altas concentraciones de glucosa (es decir, eran insensibles a RCC), tienen baja actividad de glucosa cinasa y bajo transporte de glucosa. Adicionalmente, la complementación de éstas mutantes con el gen *sco2127* (proveniente de *S. coelicolor*), es capaz de reestablecer su fenotipo inicial.

El genoma de *S. coelicolor* ya fue secuenciado y hoy en día sabemos que *sco2127* tiene 576 pb. Se encuentra contiguo y corriente arriba del gen de la glucosa cinasa (*glkA*) y hay muchas evidencias que soportan su importancia en el proceso de RCC en *S. coelicolor*.

Con el fin de conocer un poco más sobre el efecto de este misterioso gen en la RCC, en este estudio se generó una mutante de *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127* por medio de la metodología de PCR targeting® que está basada en los mecanismo de recombinación homóloga tanto de *Streptomyces* como de *Escherichia coli*.

Esta mutante nos permitió saber que el gen *sco2127* no tiene efectos directos sobre crecimiento y consumo de glucosa al menos en los medios probados en este estudio, ni tampoco sobre la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (una enzima asociada a metabolismo primario). Sin embargo, un efecto de éste gen sobre la producción de actinorrodina y la diferenciación morfofisiológica fue evidenciada en éste microorganismo.

La mutación de *sco2127* generó una visible disminución de la represión por glucosa sobre la producción de actinorrodina. Así mismo, fue visible que la mutación estimuló la diferenciación del micelio aéreo aun en altas concentraciones de glucosa.



## ABSTRACT

*Streptomyces coelicolor* is a model organism utilized for physiological and regulation studies for many actinomycetes belonging to this genus. In this microorganism, and some congeners occur a fascinating phenomenon known as carbon catabolite repression (CCR). Particularly for *S. coelicolor* glucose is its favored carbon source for consumption over others present nearby. This causes many of its genes, especially those associated with the production of secondary metabolites from turning on or shutting off in a hierarchical order as the carbon sources are consumed, .

It has been seen that when *S. coelicolor* is grown in the presence of various carbon sources, including glucose, this microorganism metabolizes glucose and simultaneously prevents other carbon sources utilization and represses the production of some secondary metabolites like actinorhodin (blue pigment).

Previous studies in our laboratory have shown that mutants of *S. peucetius* var. *caesius* resistant to the glucose analogue, 2-deoxyglucose, are capable to produce their secondary metabolites even in the presence of high glucose concentrations (ie, were insensitive to CCR), have low glucose kinase activity and low glucose transport. In addition, complementation of these mutants with the *sco2127* gene (from *S. coelicolor*), is able to restore their original phenotype.

The *S. coelicolor* genome has already been sequenced and today we know that *sco2127* has 576 bp. The *sco2127* gene is located adjacent and upstream of that of glucose kinase (*glkA*) and there are many evidences supporting its importance in the process of CCR in *S. coelicolor*.

To learn more about the effect of this mysterious gene in CCR, in this study a *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127* mutant was generated through PCR targeting methodology which is based on the mechanism of homologous recombination of both, *Streptomyces* and *Escherichia coli*.

This mutant allowed us to know that *sco2127* has neither a direct effect on growth and glucose consumption, at least in the media tested in this study, nor on the activity of  $\beta$ -galactosidase (an enzyme associated with primary metabolism). However, an effect of this gene on actinorhodin production and morphophysiological differentiation was evidenced in this microorganism.

The *sco2127* mutation generated a visible decrease in glucose repression of actinorhodin production. Furthermore, it was also visible that mutation stimulated aerial mycelium differentiation, even at high glucose concentrations.



## INTRODUCCIÓN

### Actinomicetos

En cierto modo, los actinomicetos constituyen un grupo mal definido de microorganismos que, aunque son unánimemente clasificados dentro de los Esquizomicetos formando el orden Actinomicetales, en general son estudiados separadamente por sus características especiales. Lo más destacable es su capacidad para formar agregados filiformes, parecidos a las hifas fúngicas y que tienen aproximadamente una micra de espesor, formando un micelio ramificado que puede subdividirse en células bacterianas aisladas. Su cultivo en un medio líquido no produce una turbidez uniforme como en el caso de las bacterias sino que forman pellets y su crecimiento no sigue el modelo exponencial de las bacterias sino el cúbico propio de los hongos. Entre los géneros que tienen mayor interés para el estudio de la microbiología del suelo cabe citar a la *Nocardia*, que alterna una fase vegetativa con micelio con otra representada en forma de elementos bacilares y el *Streptomyces* y *Micromonospora*, que presentan un micelio indivisible y productor de esporas (Pinzón Pinto, 2010).

Los actinomicetos son numerosos y están ampliamente distribuidos no solamente en el suelo, desde su superficie hasta grandes profundidades, sino en abonos, cieno de los ríos y fondo de los lagos. En general prefieren los medios alcalinos y son predominantemente saprófitos aunque se conocen patógenos de plantas, animales domésticos e incluso humanos. Las técnicas empleadas para su investigación ecológica son múltiples y muestran que el número de formas viables no difiere mucho de unas a otras, de lo que se infiere que pueden degradar fuentes de nutrientes muy variadas. El tipo de suelo, el contenido en materia orgánica y el pH modifican la población cuantitativamente. En zonas templadas, existen de 100,000 a 100 millones por gramo, siempre que el pH no baje de 5, estas cifras bajan mucho en turbas ácidas, tundra y suelos encharcados. En áreas alcalinas y secas su abundancia es espectacular, pasando del 10-50%, en condiciones normales, al 95 % de la flora total. En general, prefieren zonas templadas de pastos y hierbas, luego terrenos cultivados y finalmente vírgenes. Abundan más en suelos con materia orgánica y abonados con ella. Al utilizar abonos amoniacales, que dan lugar a ácido nítrico, se elimina viabilidad a los actinomicetos, mientras que la adición de cal la incrementa. Si la humedad pasa a constituir el 85-100% de la capacidad del suelo, los actinomicetos apenas aparecen debido a la falta de oxígeno; por el otro extremo soportan sequías y son encontrados en zonas desérticas. Su temperatura óptima reside entre 28-37° C y sus estaciones anuales más favorables son la primavera y el otoño. Se encuentran en el horizonte A del suelo, pero por efecto del arrastre de los conidios por el agua, se encuentran también a grandes profundidades y en mayores proporciones con respecto a las bacterias. En el horizonte C del suelo se obtienen aun de 100 a 100,000 colonias por gramo (Pinzón Pinto, 2010).

La importancia de sus fermentaciones con formación de antibióticos ha obligado a dar un gran paso encaminado al mejor conocimiento de su fisiología, pero su papel en el suelo es aún muy poco conocido. Son poco competitivos en la adquisición de sustancias nutritivas, fundamentalmente ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. La celulosa es atacada muy lentamente y lo mismo el almidón, inulina y quitina, cuya hidrólisis es especialmente característica de los actinomicetos. Existen algunos oligocarbofílicos por desarrollarse en medios deficientes en carbono (Pinzón Pinto, 2010).

Como fuentes de nitrógeno, utilizan amoníaco, nitratos, aminoácidos, peptonas y proteínas. No asimilan el nitrógeno molecular ni producen desnitrificación. Según Waksman se pueden atribuir a estos microorganismos las siguientes funciones:

a) Descomposición de los residuos animales y vegetales con liberación de ácidos orgánicos de los compuestos carbonados y amoníaco de las sustancias nitrogenadas.

b) Participación activa en los procesos de humificación y en particular en la formación de sustancias melánicas.



c) Mineralización del humus con la consiguiente liberación de principios útiles para la nutrición de las plantas.

d) Secreción de sustancias antibióticas como estreptomina, tetraciclina y otros, a fin de producir equilibrios genéricos o antagónicos específicos hacia los componentes de la microflora bacteriana.

e) Acción fitopatógena ejercida por algunas especies sobre plantas de interés agrícola.

Por último, su propio micelio representa una interesante materia prima para la síntesis de compuestos húmicos (Pinzón Pinto, 2010).

### ***Streptomyces***

Los estreptomicetos son bacterias Gram-positivas pertenecientes al orden de los actinomicetos, poseen un alto contenido de G+C en su genoma y tienen un ciclo de vida complejo, por lo que inicialmente fueron clasificados como hongos filamentosos. Son de un especial atractivo científico y económico a causa de la gran variedad de metabolitos secundarios que producen entre los que se encuentran antibióticos como el cloranfenicol (producido por *Streptomyces venezuelae*), estreptomina (producida por *Streptomyces griseus*) e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (producidos por *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus*), agentes antitumorales, insecticidas y enzimas extracelulares como celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, ect. (Demain & Sanchez, 2009; Sanchez & Demain, 2011). El género *Streptomyces* sintetiza más del 60% de los antibióticos (Berdy, 2005), los cuales son producidos fermentativamente y su formación puede ocurrir a partir de diversas fuentes de carbono (FC).

El primero en emplear el término Streptothrix fue Conh en el año de 1875 al referirse a un organismo filamentosos encontrado en conductos lacrimales humanos (Hopwood, 1999). Posteriormente Selman Waksman empleo el término al extraer de dicho microorganismo el primer antibiotico empleado a nivel terapéutico en la década de los 40's: la estreptomina

Desde aquel entonces, y por más de 60 años, *Streptomyces* ha sido uno de los géneros mas estudiado a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico. Los genomas de *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *S. griseus*, *Streptomyces higroscopicus*, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces rimosus* están secuenciados o se tiene el mapa físico de algunos de ellos. Otros como *S. venezuelae*, *Streptomyces noursei* y *Streptomyces peucetius* son de propiedad de compañías y por consiguiente es poca la información liberada.

### **Ciclo de vida de *Streptomyces***

El ciclo de vida de los *Streptomyces* comienza a partir de una espora que germina y forma un micelio vegetativo que crece por extensión apical y finalmente se ramifica. Dicho micelio es capaz de producir enzimas extracelulares para alimentarse de compuestos insolubles presentes en el suelo. Cuando dichos compuestos comienzan a escasear, el micelio vegetativo se diferencia a micelio aéreo formando una estructura de cadena de preesporas mononucleadas, con pared delgada que comienza a enroscarse. Cuando estas esporas están maduras comenzaran a desprenderse y al encontrar condiciones adecuadas, iniciarán nuevamente el ciclo (Flårdh & Buttner, 2009).

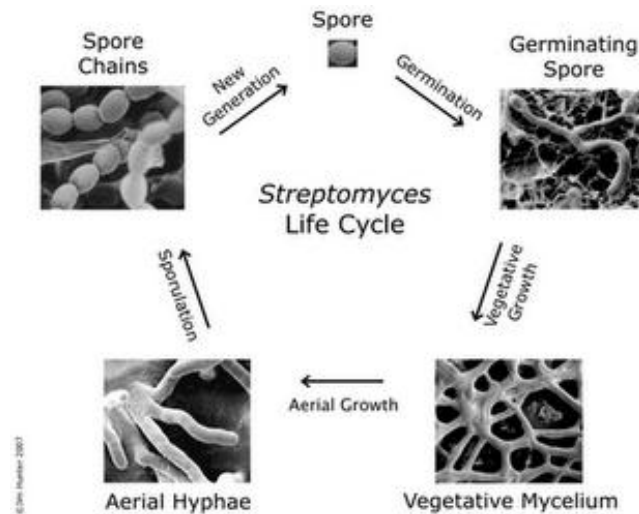


Fig. 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*  
[http://skepticonwonder.fieldofscience.com/2009\\_03\\_01\\_archive.html](http://skepticonwonder.fieldofscience.com/2009_03_01_archive.html)

### Represión catabólica por carbono, un fenómeno fascinante!

Cuando las bacterias son expuestas a diferentes fuentes de carbono, prefieren aquellos carbohidratos que son más fáciles de degradar y que les proporcionan los mejores rendimientos para su crecimiento y desarrollo. El mecanismo de control global que gobierna y coordina la utilización de fuentes de carbono de manera sistemática y organizada se denomina represión catabólica por carbono (RCC) (Saier & Reizer, 1992).

Se sabe que este mecanismo puede operar a distintos niveles (transcripción, procesamiento de RNA, traducción y modificación de proteínas), generando respuestas que afectan directa o indirectamente la actividad de las enzimas sensibles al fenómeno (exclusión de inductores, represión transcripcional o interrupción de la traducción de proteínas) (Kwakman & Postma, 1994).

Existen diversos sistemas de control que se encuentran relacionados con la regulación por fuente de carbono. Dentro de ellos, uno de los mejor conocidos es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), tanto de *Escherichia coli* como de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en los últimos 25 años se ha venido trabajando arduamente en la comprensión de los fenómenos de RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC como son los *Streptomyces*. En este género se ha visto que la síntesis de pigmentos, antibióticos y demás metabolitos secundarios que producen parecen estar regulada por el mecanismo de RCC.

Todos los genes u operones que participan en el catabolismo de carbohidratos son regulados por proteínas de control específico e inductores requeridos para su expresión. El control directo de la actividad de los reguladores, o de la formación de inductores, es una medida eficiente para silenciar la expresión. Por estos mecanismos las bacterias son capaces de establecer una jerarquía en la utilización de carbohidratos (Bruckner & Titgemeyer, 2002) y las capacita para incrementar su nutrición con miras a optimizar su tasa de crecimiento en ambientes naturales donde existen mezclas complejas de nutrientes (Stülke & Hillen, 1999).

Los sistemas en donde el fenómeno de RCC está mejor caracterizado son por un lado, la bacteria Gram-negativa *E. coli* y por otro, las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC en su genoma como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. Así mismo, existen avances en la comprensión de la RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC en su genoma como *Streptomyces* y *Mycobacterium* (Stülke & Hillen, 1999).



## El sistema PTS

Dentro de los sistemas de transporte y fosforilación de carbohidratos que han sido descritos en numerosos géneros bacterianos, hasta ahora, el mejor estudiado es el sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (sugar phosphotransferase system) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP).

Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las que destacan la activación de proteínas inductoras de operones catabólicos, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y patogenicidad (Stülke & Hillen, 1998; Nothaft *et al.*, 2003). Más de 20 carbohidratos diferentes son transportados por este sistema y en dicho proceso se utiliza al PEP como donador del grupo fosfato (Postma *et al.*, 1993).

El sistema PTS consta de dos enzimas generales no específicas que son la enzima EI y la proteína estable al calor HP. Además se incluyen una gran cantidad de permeasas específicas para cada carbohidrato en particular, llamadas EII. Las enzimas EII poseen tres o cuatro dominios, dos de ellos están involucrados en la transferencia de fosfato (EIIA y EIIB) y el tercero (EIIC) actúa como permeasa de membrana (Stülke & Hillen, 1999). EIIA es citoplásmico y soluble, EIIB es un dominio periférico de membrana que aunque es hidrófilo, se liga al lado citoplásmico de la membrana a través de EIIC. EIIC es una proteína integral de membrana que se une a su azúcar específico para liberarlo en el interior de la célula.

La cascada de fosforilación inicia con la enzima EI (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato de alta energía (en presencia de  $Mg^{++}$ ) a la proteína HPr (proteína pequeña, termoestable y rica en histidina). Estas dos proteínas tienen localización citoplásmica y su síntesis es constitutiva. La síntesis de las enzimas EIIABC se induce por el sustrato correspondiente.

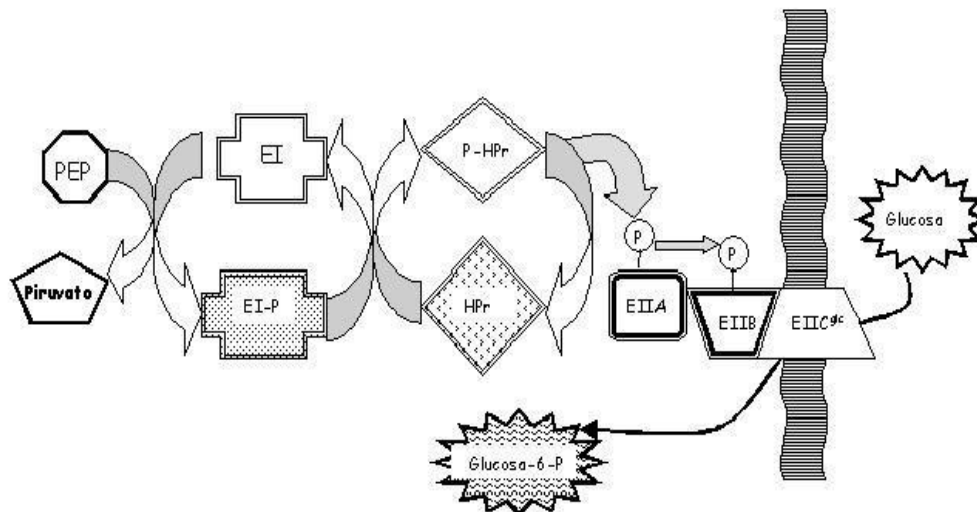


Fig. 2. Sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Las enzimas EI, HPr, EIIA y EIIB son fosfotransferasas y la EIIC es una permeasa que cataliza la translocación del carbohidrato del periplasma al citosol. La enzima EIIC es específica para cada azúcar (Adaptado de Postma *et al.*, 1993).

La HPr fosforilada (HPr-P) transfiere el fosfato a la enzima EIIA. En presencia de  $Mg^{++}$ , la EIIA transfiere rápidamente el fosfato a la enzima específica EIIB, con la que se asocia (p. ej., EIIB<sup>Glc</sup>), que a su vez fosforila el azúcar (en el caso de la glucosa, ésta se convierte en glucosa-6-P). En este momento la EIIC pierde su afinidad por el azúcar modificado, que de esta forma entra al citoplasma y queda listo para actuar como sustrato de la primera reacción de su catabolismo (ver Fig. 1).

### Cómo ocurre la RCC en bacterias Gram-negativa: *E. coli*

La represión catabólica en *E. coli* involucra una proteína activadora de transcripción CRP (proteína receptora de AMP cíclico) denominada también CAP (proteína activadora de genes catabólicos), la adenilato ciclasa (AC), el AMP cíclico (AMPc), y la enzima EIIA específica para la glucosa (EIIA<sup>Glc</sup>). Si no hay glucosa en el medio, EIIA<sup>Glc</sup> está fosforilada y se une a AC y la activa. Esto provoca la síntesis de AMPc, que a altas concentraciones se une a CRP activa los genes catabólicos. Si hay glucosa en el medio, EIIA<sup>Glc</sup> no está fosforilada y no se une a AC pero sí se une a enzimas metabólicas y transportadores de fuentes de carbono secundarias como LacY (galactósido permeasa) y GlpK (glicerol cinasa). Este sistema es denominado exclusión de inductor debido a que previene la incorporación intracelular del inductor del respectivo sistema catabólico (Bettenbrock et al., 2007).

### Regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC: *B. subtilis*

En las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G-C en su genoma, el mecanismo de RCC está íntimamente ligado a proteínas del sistema PTS. Específicamente, en *B. subtilis* y *B. megaterium*, la mayoría de las señales de la RCC son dependientes de las enzimas HPr, HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y la enzima de control catabólico (CcpA). Ellas son las encargadas de sensar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono (Stülke & Hillen, 1999).

En estos sistemas se ha reportado la presencia de una proteína homóloga a HPr, denominada Crh. Dicha proteína muestra un 45% de homología en su secuencia con HPr y ambas son fosforiladas de manera eficiente por la HPr-K/P. Sin embargo, la contribución de Crh a la RCC difiere a la de HPr. Se cree que Crh puede estar involucrada en la RCC por fuentes de carbono como malato o succinato. La justificación a esta hipótesis será explicada más adelante.

En *B. subtilis*, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos, como la fructosa 1,6-bifosfato (FBF). Este metabolito activa la HPr-K/P que fosforila a HPr en la serina 46. La interacción de HPr-Ser-P con CcpA permite que CcpA se una a regiones del DNA denominadas sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito) (Kim & Chamblis, 1997). De esta manera, el complejo FBF-HPr-Ser-P-CcpA unido a *cre* en las regiones regulatorias de operones sensibles a RCC, inhiben la iniciación de la transcripción.

En *Bacillus* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, la proteína HPr-K/P puede actuar como cinasa o como fosfatasa, dependiendo del estado nutricional de la célula (Hanson et al., 2002). La actividad cinasa de HPr-K/P en *B. subtilis* es dependiente de intermediarios de la glucólisis como la fructosa 1,6-bifosfato y es inhibida por el fosfato inorgánico. De manera contraria, la actividad fosfatasa es estimulada por fosfato inorgánico.

Existen otras HPr-K/P que son activadas por altas concentraciones de ATP y son independientes de fructosa 1,6-bifosfato, como es el caso de las HPr-K/P provenientes de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus salivarius* (Hanson et al., 2002). La enzima HPr puede ser fosforilada en dos sitios: en la His-15 por la enzima EI del sistema PTS y en la Ser-46 por HPr-K/P dependiente de ATP, la cual es activada por el metabolito fructosa-1,6-bifosfato (FBP) (Galinier et al., 1998; Reizer et al., 1998). La fosforilación en la serina 46 tiene exclusivamente propósitos regulatorios.



La RCC en *B. subtilis* se da de dos formas: una es reprimiendo los genes catabólicos y los operones mediante la proteína de control catabólico A, CcpA, la cual previene la transcripción de genes (actuando sobre elementos *cre*) y otra, al no inducir operones catabólicos gracias a la fosforilación de la enzima HPr, que a su vez, puede estimular la actividad de algunas enzimas, inductores, activadores transcripcionales, o antiterminadores (Henkin, 1996).

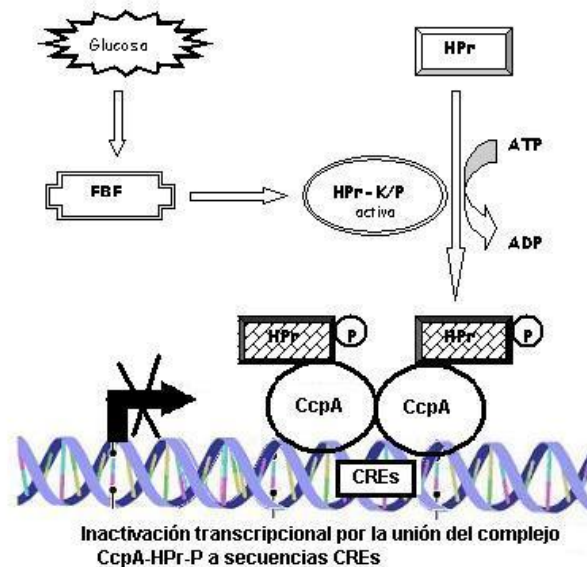


Fig. 3. Mecanismo de RCC en *B. subtilis*.

Existen 17 bacterias del phylum *Firmicutes*, al cual pertenece *B. subtilis*, con su genoma secuenciado. Todos estos genomas contienen secuencias que codifican para la HPr-K/P. Secuencias homólogas para esta proteína fueron encontradas en 11 de estos 17 microorganismos, y es de esperar que en los 6 restantes también posean una secuencia homóloga (Warner & Lolkema, 2003).

En *B. subtilis*, la histidina del sitio activo Crh es reemplazada por una glutamina, mientras que el resto de aminoácidos permanece similar a secuencias de HPr de organismos semejantes. Un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas similares a HPr, revela los mismos motivos de secuencia en tres proteínas similares a HPr de bacilos que pueden contener Crh y HPr de manera simultánea (Warner & Lolkema, 2003). Esto sugiere que se encuentran bastante conservadas en este género.

Los genes que codifican para la proteína HPr en *Bacillus* están organizados como un operón, junto con el gen que codifica para la enzima EI de PTS y usualmente son transcritos policistricamente. En *B. subtilis*, el par de genes es precedido por el gen que codifica para enzimas del PTS específicas para cada azúcar EIIABC. En cuatro especies de *Bacillus*, el gen que codifica para Crh esta agrupado con tres genes. Estos son: *yvcJ*, *yvcK* y *yvcL*. En *B. subtilis* estos genes codifican para proteínas cuya función se desconoce, además de que este clúster no está asociado con ninguna proteína del sistema PTS (Warner & Lolkema, 2003).

CcpA, pertenece a la familia de proteínas reguladoras LacI/GalR (Henkin, 1996). Es el principal componente en la RCC en *B. subtilis* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC (Henkin, 1996; Stülke & Hillen, 1999). Genes *ccpA* han sido clonados de mutantes en *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus*, donde ha sido demostrada su implicación en la RCC, lo que sugiere un mecanismo común en las bacterias

Gram-positivas con bajo contenido de GC. Al inactivar el gen *ccpB*, el cual codifica para un *ccpA* homólogo, se incrementa parcialmente la RCC de los genes *gnt* y *xyl*.



La unión de CcpA a los sitios *cre* es posible por la formación de un complejo entre los coefectores HPr y Crh fosforilados (Repizo *et al.*, 2006). La forma en que se afecta la unión de CcpA a las secuencias *cre*, por efecto de las fuentes de carbono represoras, fue demostrada en *B. subtilis* y *B. megaterium* al introducirles una mutación en *ptsH1*. Como resultado de ello, se previene la fosforilación de HPr en la Serina 46 y se genera un fenotipo similar al que presentan las mutantes en *ccpA*. Esto indica que la interacción específica entre CcpA y HPr-Ser46-P, resulta en su unión a *cre* (Stülke & Hillen, 1999).

### Regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC: *Streptomyces*

El género *Streptomyces* sintetiza más del 60% de los antibióticos (Demain & Sanchez 2009) que son producidos fermentativamente. Su síntesis puede ocurrir a partir de diversas fuentes de carbono (FC) y puede ser susceptible a RCC. En *S. coelicolor*, la Glk parece jugar un papel regulatorio a nivel de transcripción y exclusión de inductores (Kwakman & Postma, 1994).

#### Sistema PTS en *Streptomyces*

La presencia del sistema PTS en *S. coelicolor* fue reportada por primera vez en el año 1995 (Titgemeyer *et al.*, 1995). En 1999 dos grupos reportaron la clonación del gen *ptsH* cuyo producto es la fosfotransferasa HPr (Butler *et al.*, 1999, Parche *et al.*, 1999). En el año 2000, Parche *et al.*, reportaron la existencia de tres genes de *S. coelicolor* que codifican para proteínas homólogas no específicas del PTS y 6 genes que codifican para proteínas homólogas específicas. *S. coelicolor* tiene menos genes *pts* que la gran cantidad que posee *E. coli* y los 27 genes *pts* que contiene *B. subtilis*.

Se conoce la existencia del sistema PTS para internalizar la fructosa en *S. coelicolor* y también los genes que codifican, tanto para las enzimas EI, EIIA<sup>Cr</sup> y HPr, como para dos posibles permeasas de N-acetilglucosamina y una posible permeasa de maltosa (NagE1, NagE2 y MalX1) (Parche *et al.*, 2000). No obstante, no se sabe el papel directo del sistema PTS en el fenómeno de RCC. Así mismo, la actividad cinasa de HPr-K/P parece estar ausente en *S. coelicolor* (Stülke & Hillen, 1999).

En el año 2003, Nothaft *et al.* sugirieron que la fuente de carbono N-acetilglucosamina podía ser el posible sustrato de NagE1 o NagE2 y se comprobó, por caracterización *in vitro*, que la enzima EIIA<sup>Cr</sup> funcionaba como una proteína EIIA específica para N-acetilglucosamina. Por medio de análisis mutacional del gen *ccr-pstI*, se demostró que EI y EIIA<sup>Cr</sup> son parte del sistema PTS para N-acetilglucosamina, y que si falta uno u otro, las células no pueden crecer en presencia de ella, mientras que la utilización de galactosa, glucosamina, glucosa, glutamato, glicerol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa, no parece verse afectada. La expresión de *ccr-pstI* como un operón y *ptsH* juntos, son inducidos por la presencia de N-acetilglucosamina.

En 2004, Derouaux *et al.*, caracterizaron la proteína receptora de catabolito Crp, la cual está involucrada en el sistema PTS de *S. coelicolor*. Esta proteína, codificada por el gen *SCO3571* o gen *crp*, es la única proteína de la superfamilia CRP-FNR presente en *S. coelicolor*. La inactivación de dicha proteína genera una deficiencia en la germinación de esporas y un fenotipo similar al de la mutante en el gen que codifica para la adenilato ciclasa (*cya*), que imposibilita la producción de AMP cíclico (AMPc). Esto sugiere que el AMPc puede ser una molécula clave para iniciar los eventos de germinación pues el sistema adenilato ciclasa-AMPc-Crp activa el proceso de desarrollo. En este trabajo se comprobó por tres métodos distintos que la proteína Crp de *S. coelicolor* es capaz de unirse a AMPc: (1) al comparar la secuencia de aminoácidos de Crp con 2



secuencias de la superfamilia CRP-FNR [Crp de *E. coli* y el factor regulador de la virulencia (Vfr) de *Pseudomonas aeruginosa*], que son capaces de unirse a AMPc, se observa que sus dominios de unión al nucleótido se encuentran altamente conservados; (2) al enfrentar *in vitro* a la proteína Crp-His6 purificada, con el AMPc unido a una matriz de agarosa, se observa una alta capacidad de unión de la proteína al nucleótido; (3) al enfrentar *in vivo* extractos celulares totales de *S. coelicolor* con AMPc, se detectó por cromatografía de afinidad una alta eficiencia de unión. No obstante, en este estudio, no pudo establecerse la capacidad de unión de la proteína Crp a secuencias de DNA.

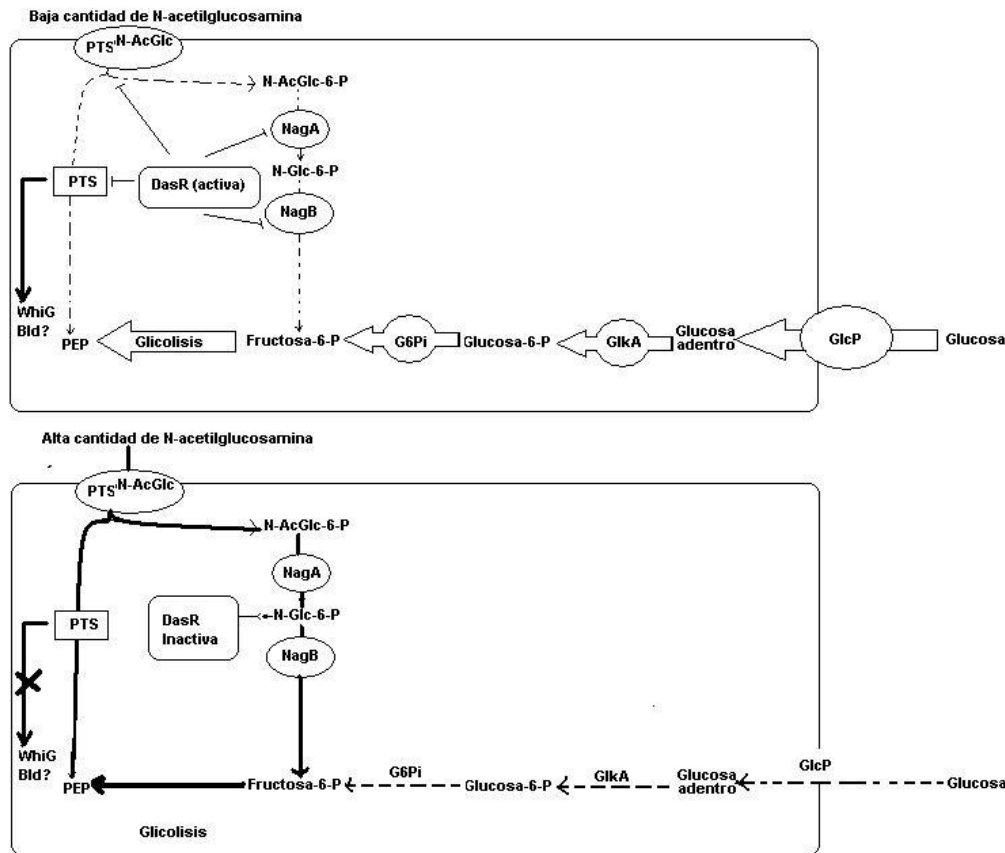


Fig. 4. Modelo del efecto de bajas y altas concentraciones de N-acetilglucosamina (N-AcGlc) en el medio. Abreviaturas: N-AcGlc: N-acetilglucosamina, PTS<sup>N-AcGlc</sup>: sistema PTS para incorporación de N-acetilglucosamina, PEP: fosfoenolpiruvato, N-AcGlc-6-P: N-acetilglucosamina-6-fosfato, N-Glc-6-P: glucosamina-6-fosfato, NagA: N-acetilglucosamina-6-fosfato-desacetilasa, NagB: glucosamina-6-fosfato-isomerasa, G6Pi: glucosa-6-fosfato-isomerasa, GlkA: glucosa cinasa (Adaptado de Rigali *et al.*, 2006).

### Transporte de carbohidratos

Uno de los estudios más completos acerca de los sistemas de incorporación de carbohidratos es el reportado por Bertram *et al.*, en el 2004. A raíz de la publicación de la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor*, se realizaron tres consideraciones importantes sobre la incorporación de carbohidratos a la célula: (1) 172 genes codifican para proteínas que son excretadas como hidrolasas, quitinasas, celulasas, lipasas, nucleasas y proteasas (2) alrededor de 81 permeasas del sistema ABC (ATP binding cassette) están presentes en el genoma de *S. coelicolor*, éstas pueden ser utilizadas para incorporar azúcares, oligopéptidos y nucleósidos y (3) se detectaron 45

secuencias que parecen codificar para proteínas de unión a solutos y estas también parecen ser importantes para la incorporación de carbohidratos. La gran cantidad de exoenzimas y sistemas ABC detectado, diez veces mayor que en otras bacterias, nos da una idea de la amplia capacidad metabólica de los estreptomicetos (Bentley *et al.*, 2002).

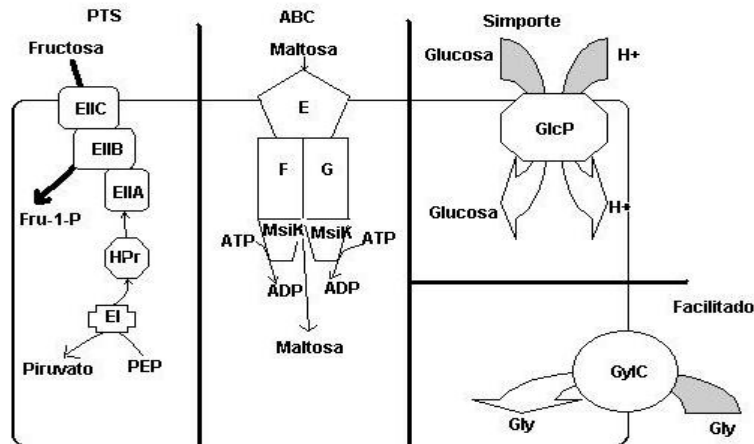


Fig. 5. Sistemas de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor* (Adaptado de Bertram *et al.*, 2004)

En el genoma de *S. coelicolor* están presentes 53 sistemas de transporte de carbohidratos. De estos, 22 incluyen 14 permeasas de la familia de transportadores ABC, 4 permeasas específicas del sistema PTS, 2 copias de una proteína de la superfamilia mayor de facilitadores (MSF), una proteína de la familia simporte de soluto de sodio (SSS) y un facilitador de la familia mayor de proteínas intrínsecas (MIP).

### Estudios sobre los transportadores de glucosa en *S. coelicolor*

En el 2005 van Wezel *et al.*, realizaron un análisis bioquímico de la permeasa de glucosa GlcP de *S. coelicolor* y describieron su papel en la regulación transcripcional por medio de mutaciones en *glcP1* y *glcP2*. GlcP es una proteína con dos juegos de seis dominios transmembranales, unidos entre sí por asa citoplásmica. Esto concuerda con la clasificación de ésta como miembro de la superfamilia mayor de facilitadores (MFS), a la cual pertenecen permeasas de azúcares bacterianos y eucarióticos, simportes dependientes de  $H^+$  y las proteínas facilitadoras. La proteína GlcP esta codificada por dos genes en el cromosoma de *S. coelicolor*: *glcP1(sco5578)* que está localizado en la región central del cromosoma y *glcP2(sco7153)*, localizado en el brazo derecho del mismo, con diferencia entre ellas de sólo de una base, quizás producto de una mutación silenciosa, ya que codifican para el mismo producto de 472 aminoácidos. Una región duplicada de 36 pb río abajo de la región palíndrome de 16 nt, contiene el sitio de unión a factores de transcripción.

La identificación de GlcP como el principal transportador de glucosa en *S. coelicolor* A3(2) da nuevas luces sobre las etapas tempranas de los procesos mediados por glucosa en este microorganismo (van Wezel *et al.*, 2005).

## Actinorrodina y RCC

*S. coelicolor* produce cuatro antibióticos de importancia: actinorrodina (llamado comúnmente pigmento azul), undecilprodigiosina (pigmento rojo), metilencomicina (codificada en el plásmido SCP1) y un metabolito dependiente de calcio. De los cuatro, el más estudiado es la actinorrodina, un compuesto derivado de 16 unidades de acetato producido por las policétidos sintetasas tipo II (Lal *et al.*, 2000) capaz de funcionar como indicador de pH del medio en el cual crece en microorganismo tornándose rojo (no debe ser confundido con la undecilprodigiosina) en pHs por debajo de 7.0, encontrándose de forma intracelular, y azul, por encima de 7.0 liberándose al medio de cultivo como  $\gamma$ -actinorrodina (Bystrykh *et al.*, 1996).

La producción de actinorrodina toma lugar en la fase estacionaria del crecimiento y esta correlacionada con la diferenciación morfológica del microorganismo. Su biosíntesis es codificada por un cluster de genes denominados *act*, los cuales se localizan en una región de 26 kb en el genoma (Malpartida & Hopwood, 1986).

Su síntesis está sujeta a presencia de glucosa en el medio, limitaciones de amonio, nitratos y fosfatos, así como de pH en el medio de cultivo. Incluso, existen reportes de que elementos traza como el hierro, pueden afectar la producción de dicho pigmento (Coisne *et al.*, 1999)

Profundizando en la regulación fuente de carbono, se sabe que la glucosa inhibe la producción de actinorrodina en *S. lividans* por represión de la síntesis del mRNA *afsR2* que codifica para un factor regulatorio global involucrado en la estimulación de biosíntesis de metabolitos secundarios (Kim *et al.*, 2001). De la misma forma que en *S. lividans*, este gen es necesario en *S. coelicolor* para la producción de actinorrodina. El uso reciente de electroforesis de dos dimensiones, demostró que la proteína AfsR2 se une a SCO6569 sugiriendo que dicha proteína es una regulador dependiente de AfsR2 para la síntesis de actinorrodina (Im *et al.*, 2009)

## Diferenciación Morfológica y RCC

Otros mecanismos de insensibilidad a RCC están relacionados con la diferenciación celular. Un estudio de la relación entre el desarrollo de hifas aéreas y esporas y la RCC fue realizado por Pope *et al.*, en 1996. Ellos reportaron que en seis clases diferentes de mutantes *bld* (incapaces de producir hifas aéreas) de *S. coelicolor*, la expresión del gen *galP1* es insensible a represión catabólica. La posterior caracterización de las mutantes *bldA* y *bldB* indicó que en estas cepas la transcripción de *galP1*, gen que se cree está involucrado en la incorporación de galactosa, es independiente de galactosa e insensible a RC. La complementación de dichas mutantes con el *bldA* o *bldB* restaura tanto la sensibilidad a RC como la producción de hifas aéreas (Pope *et al.*, 1996).

Los estudios de regulación de otros genes sujetos a RC indican que en la mutante *bld* la expresión de *dagA* y *gyl* también es insensible a RC y que la complementación de estas mutantes con el gen *bldB* restablece la sensibilidad a RC. La mutación *bldB* no afecta la expresión de promotores insensibles a RC, lo que sugiere que esta mutación no afecta la transcripción a nivel general sino que afecta específicamente a los genes sujetos a RC (Pope *et al.*, 1996). En *S. lividans* se identificó el gen regulador *reg1* que está involucrado en la represión de la  $\alpha$ -amilasa. Dicho gen codifica para la proteína Reg1 que contiene motivos de unión a DNA en su extremo N-terminal, comparte algunas similitudes con la familia LacI/GalR. Reg1 posee un 95% de identidad con MalR y un 31% de identidad con la proteína CcpA de *B. subtilis* (Naguyen *et al.*, 1997). El represor transcripcional del gen *gyl* (GylR), esta también sujeto a RC. Contiene sitios de unión a DNA y tiene similitud con represores transcripcionales. Se ha visto que mutaciones en los genes *glkA*, *ccrA1* y *bld*, afectan la RC del gen *gyl*. Se cree que la regulación de dicho operón requiere de diversos reguladores tanto específicos como generales (Hindle & Smith, 1994)

En el año 2006, Rigali *et al.*, reportaron que concentraciones extracelulares por encima de 10 mM de N-acetilglucosamina, monómero que la quitina, previenen que *S. coelicolor* progrese más allá del estadio de micelio vegetativo. Así mismo, evidenciaron que la señal es transmitida a través del regulador DasR (deficient in aerial mycellium and spore formation) perteneciente a la familia GntR que controla el regulón de N-acetilglucosamina y los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, necesarios para la incorporación de N-acetilglucosamina. En un trabajo anterior Rigali *et al.*, predijeron la secuencia de unión del regulador DasR a la secuencia consenso ACTGGTCTAGACCACT, localizada río arriba de los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, que codifican para las fosfotransferasas HPr, la enzima EI y la enzima EIIA<sup>Crr</sup>, respectivamente (Rigali *et al.*, 2004). Así mismo, se examinó un posible sitio de unión de DasR río arriba de muchos de los genes relacionados con el metabolismo de la N-acetilglucosamina.

Al realizar la mutación del gene *dasR* en *S. coelicolor* M145, se observó que la mutante no es capaz de generar micelio aéreo ni esporas. Un paso importante en la formación de hifas aéreas es la producción del antibiótico SapB; una molécula hidrofóbica derivada del producto codificado por el gen *ramS* que permite que emerjan las hifas aéreas. La producción de SapB está regulada por los genes *bld*. Se ha visto que la “complementación” entre mutantes que crecen juntas es satisfactoria. Esta relación es unidireccional: una mutante actúa como secretor y la otra es un receptor de las moléculas excretadas restaurando la formación de hifas aéreas. Así, es propuesta una complementación jerárquica de mutantes *bld*: *bldJ*→ *bldK*→ *bldA/H*→ *bldG*→ *bldC*→ *bldD* en donde las mutantes de la izquierda son donadores y las de la derecha los receptores. Experimentos de complementación demuestran que la esporulación puede ser inducida en la mutante en *dasR* por crecimiento cercano a cepa silvestre M145 y a las mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldF* y *whiG*, mientras que la proximidad a las mutantes *bldD*, *bldG*, *bldJ* y *bldK* no genera el mismo efecto. Esto demuestra que la mutante en *dasR* no se ajusta a la cascada de complementación anteriormente mencionada y no puede complementar ninguna de las mutantes *bld*. (Rigali *et al.*, 2006).

La internalización de N-acetilglucosamina mediada por el sistema PTS parece ser constitutiva en mutantes *dasR*, mientras que en la cepa silvestre, la incorporación es inducida por la presencia de N-acetilglucosamina. Los niveles de proteínas HPr y EIIA<sup>Crr</sup> en ausencia o presencia de N-acetilglucosamina son los mismos en la mutante *dasR*, mientras que en la cepa silvestre sólo son detectables en presencia de dicho sustrato. Para establecer la relación entre mutantes *dasR* y mutantes *pts*, fue llevada a cabo una complementación similar a la anteriormente descrita, revelando que las mutantes *dasR* no pueden actuar como secretoras y por consiguiente no pueden complementar mutantes *pts* y que las mutantes *pts* apenas si pueden restaurar el desarrollo en la mutante *dasR*. Una mutante en *nagE2* (en transporte de N-acetilglucosamina), puede restaurar el desarrollo de la mutante *dasR*, pero mutantes *ptsI*, *ptsH* y *crr* no generan el mismo efecto en la mutante *dasR*. Esto indica que el fenotipo de mutantes incapaces de generar micelio aéreo no refleja la imposibilidad de utilizar N-acetilglucosamina.

Finalmente Rigali *et al.* (2006), generaron un modelo del posible mecanismo de regulación de DasR en la utilización de N-acetilglucosamina (ver Fig. 4). Cuando hay baja concentración de N-acetilglucosamina y existe glucosa, la glucosa es el sustrato predilecto. Esta es transportada por el simporte GlcP, mientras que el sistema PTS para N-acetilglucosamina es expresado a nivel basal (Nothaft *et al.*, 2003) y los componentes del PTS transfieren el fosfato a proteínas específicas para el desarrollo. Cuando la concentración extracelular de N-acetilglucosamina es alta, ésta es transportada y metabolizada a glucosamina-6-P, que induce el regulón de N-acetilglucosamina por inhibición de la capacidad de unión a DNA de DasR. En estas condiciones, los componentes del sistema PTS activan la transferencia del grupo fosfato del PEP a la N-acetilglucosamina. Así, la concentración extracelular de N-acetilglucosamina determina la transferencia del fosfato al azúcar transportado o a proteínas de desarrollo dependientes del PTS (Rigali *et al.*, 2006). DasR es parte de un sistema de detección nutricional, actuando como un regulador pleiotrópico y multifuncional en actinomicetos, y controla el regulón de la N-acetilglucosamina y otras rutas relacionadas, además del transporte de otros azúcares (Rigali *et al.*, 2006).

## Avances en la comprensión de la RC por glucosa en *Streptomyces*

### La Glk: una enzima misteriosa...

En el año 2000, Mahr *et al.*, realizaron un estudio con miras a la purificación y caracterización bioquímica de la Glk de *S. coelicolor* y demostraron que la cantidad de enzima presente en la célula es similar en condiciones de represión y no represión, es decir, su expresión es constitutiva independientemente de la fuente de carbono empleada en el medio. La Glk es una enzima perteneciente a la familia ROK (represor, orf, kinase) que comprende cinasas bacterianas y reguladores como NagC de *E. coli* y XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1994). La técnica de difracción circular y la predicción de la estructura secundaria *in silico* permitió saber, que la proteína tiene alrededor de 32% de  $\alpha$ -hélices, 26% de hojas  $\beta$  extendidas, 13% hojas  $\beta$  plegadas y 29% de distribución al azar. La secuencia de aminoácidos de la glucosa cinasa de *S. lividans* y *S. coelicolor* resultó ser idéntica y por consiguiente se cree que tienen el mismo papel en ambos organismos (Mahr *et al.*, 2000).

Aparentemente, la Glk no contiene los dominios de unión a DNA en el extremo N-terminal que se encuentran en proteínas represoras de la familia ROK, y por ello no puede regular directamente la transcripción. Por ello, se ha propuesto que podría interactuar con factores de transcripción y desencadenar una cascada de señalización para la RCC (Angell *et al.*, 1992).

Algunas de las proteínas con las que podría interactuar Glk son los productos codificados por los genes *malR* y *gylR*, represores de los operones de maltosa y glicerol respectivamente. El gen *malR* de *S. coelicolor* A3(2), codifica para una proteína represora homóloga a la familia de proteínas represoras LacI/GalR. La interrupción o delección de dicho gen ocasiona la expresión constitutiva del gen *malE*, requerido para la utilización de maltosa y cuya expresión es inducida por la presencia de dicho sustrato y reprimida por glucosa (van Wezel *et al.*, 1997). Se cree que la proteína MalR es un regulador de la inducción por sustrato y la represión por glucosa en el metabolismo de la maltosa (van Wezel *et al.*, 1997).

En otros organismos como *B. subtilis*, *B. megatherium* y *E. coli*, la actividad de Glk ha sido estudiada y se ha visto que ésta es independiente de la fuente de carbono en los dos primeros, mientras que en *E. coli* ocurre algo similar, solo que la actividad se reduce a la mitad cuando las células se crecen en presencia de glucosa, debido a que ésta se fosforila primordialmente por el sistema PTS (Mahr *et al.*, 2000).

La Glk de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* fueron caracterizadas bioquímicamente por Imriskova *et al.*, en el 2005. Ambas son enzimas citosólicas, homotetraméricas, con un peso molecular aproximado de cada monómero de 32 y 31 kDa, respectivamente. La Glk de *S. coelicolor* parece ser más estable que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, ya que después de algunas horas de almacenamiento a 4°C ésta última se disocia en un 85% a su forma dimérica. Sin embargo, la presencia de 100 mM de glucosa evita su disociación. Este comportamiento no se observa en la Glk de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2005). Recientemente reportamos la secuencia del gen que codifica para Glk en *S. peucetius* var. *caesius* (gi:50263005 de Gene bank). Dicha secuencia posee un 98% de identidad con la de *S. avermitilis* y un 87% con la de *S. lividans* y *S. coelicolor* (Langley *et al.*, 2004).

En el 2007, van Wezel *et al.*, propusieron que la cantidad de proteína Glk es más o menos independiente de la fase de crecimiento pero su actividad catalítica depende de la presencia de glucosa en el medio (van Wezel *et al.*, 2007). Así mismo, reportan que el transporte de glucosa y la actividad de Glk presentan perfiles similares, lo que indica una posible relación funcional entre ellos. Prueba de ello es que la incorporación de glucosa en una cepa mutada en Glk decae drásticamente (van Wezel *et al.*, 2007). Análisis de RT-PCR muestran que tanto el nivel de expresión basal como el nivel de expresión inducida por glucosa del gen *glcP1*, son similares en la cepa mutante en *glk* y en la cepa silvestre, lo que demuestra que la expresión de *glcP1* no



depende de la presencia de *glk*. Es decir, la diferencia en las actividades de transporte entre la cepa silvestre y la mutante en *glk* no generan diferencias en la expresión de *glcP1*. Una probable explicación es que la incorporación de la glucosa en la mutante es inhibida por la acumulación de glucosa intracelular. Una reducción en la incorporación de glucosa fue observada en una mutante en *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* (Ramos *et al.*, 2004). Estos datos hicieron pensar que *glk* y *glcP* operan en conjunto y quizás interactúan entre sí (van Wezel *et al.*, 2007).

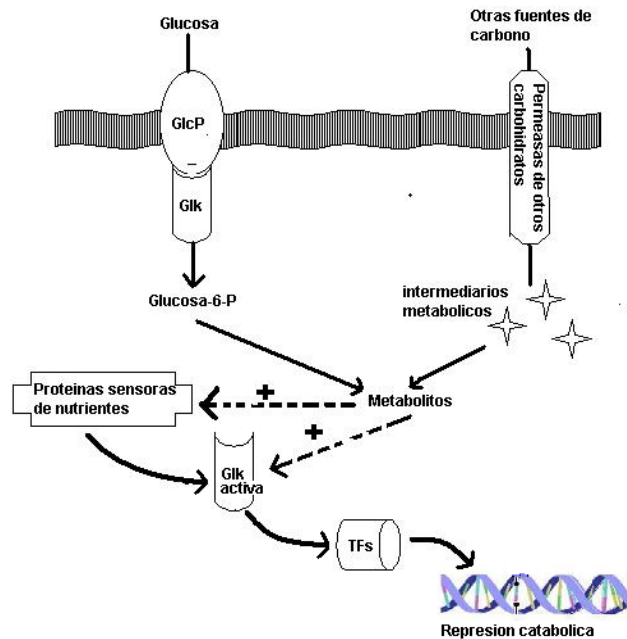


Fig. 6. Modelo del posible papel regulatorio de la glucosa cinasa en *S. coelicolor* (Adaptado de van Wessel *et al.*, 2007).

Para examinar si *glk* se une a *glcP*, se realizaron pruebas de western blot con anticuerpos anti-Glk, mostrando que cuando las células son crecidas en glicerol como única fuente de carbono, la Glk es encontrada únicamente en la fracción citoplásmica, pero cuando las células se crecen en glucosa, una cantidad significativa de *glk* es encontrada en la fracción membranal. Esta observación ha generado un modelo en el que se propone que el tetrámero de la Glk forma un complejo con la proteína de transporte de glucosa *glcP* en la membrana celular, mientras que la forma citoplásmica de la Glk actúa en respuesta a la presencia de glucosa, ATP u otros metabolitos aún desconocidos (van Wezel *et al.*, 2007)

Los datos anteriores sugieren que la actividad de Glk es modulada a través de la activación o modificación post-traducciona dependiente de intermediarios metabólicos, lo que ocurre en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC donde la HPr-K/P, previamente activada por un metabolito, a su vez activa el complejo represor global CcpA/HPr-Ser-P a través de la fosforilación de la serina. Las modificaciones que sufre la Glk para pasar de inactiva a activa son desconocidas. Glk pertenece a una familia de cinasas cuyas cisteínas son vitales para su actividad y es posible que jueguen un papel clave en el control de su función (van Wezel *et al.*, 2007).

### Antecedentes del presente proyecto

En 1982, Hodgson reportó el aislamiento de mutantes de *S. coelicolor* resistentes a la inhibición de su crecimiento en glicerol o arabinosa por un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (Dog). La Dog, al ser fosforilada en el primer paso de la glucólisis, se convierte en Dog-6-P, compuesto

altamente tóxico para la célula que no puede ser metabolizado por los pasos siguientes de la vía glucolítica y cuya acumulación redundante en la muerte celular.

Las mutantes aisladas fueron denominadas *Dog<sup>R</sup>*. Estas presentan un decremento en la sensibilidad a represión por varias fuentes de carbono, apreciable por la síntesis de los pigmentos coloreados actinorrodina y undecilprodigiosina, y una reducción en la actividad de Glk, aunque el transporte de glucosa no estaba afectado (Hodgson, 1982). A dichas mutantes *Dog<sup>R</sup>* de *S. coelicolor*, se les complementó la deficiencia con un fragmento de 2.9 kb que contiene el gen *glkA*, con el cual recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, la actividad de GlkA y la sensibilidad a RCC (ausencia de producción de pigmentos) (Ikeda *et al.*, 1984). La expresión del gen de *glkA* en *E. coli* confirmó que su producto es una proteína que cataliza la fosforilación de la glucosa (Angell *et al.*, 1992). Sabiendo que en *B. subtilis*, Glk es importante a nivel de generación del intermediario glucosa-6-P, en *S. coelicolor* se trató de averiguar si el papel de Glk en la RCC era semejante.

Para lo anterior, se realizó la complementación de mutantes en *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de la glucosa cinasa de *Zymomonas mobilis*. Este gen restablece la capacidad de utilización de la glucosa y la actividad de Glk, pero no la sensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1992).

Esto sugiere que la Glk tiene una actividad regulatoria diferente a la catalítica y juega un papel importante en la regulación del metabolismo del carbono.

### El gen *sco2127*

En estudios ulteriores por mapeo con la nucleasa S1, se caracterizó cada ORF del fragmento de 2.9 kb: el ORF1 (*sco2128*) es un marco de lectura incompleto que hipotéticamente codifica para una proteína de 44.7 kDa, el ORF2 (*sco2127*) es un marco de lectura completo que hipotéticamente codifica para una proteína de 20.1 kDa, y finalmente el ORF3 (*sco2126*) es el gen *glkA* que codifica para la glucosa cinasa dependiente de ATP, una proteína de 33.1 kDa encargada de la fosforilación de la glucosa. Estudios de complementación de las mutantes *Dog<sup>R</sup>*, demostraron que con *glkA* se reestablece la capacidad de utilizar glucosa, la actividad de GlkA y sólo parcialmente la sensibilidad a RCC. Sin embargo, para alcanzar los niveles de actividad de Glk encontrados en la cepa silvestre es necesaria la transcripción a partir de ambos promotores. Al transformar con *glkA* y *sco2127* simultáneamente, además del fenotipo anterior, se restablece completamente la sensibilidad a RCC a niveles similares a los de la cepa silvestre (Angell *et al.*, 1992).

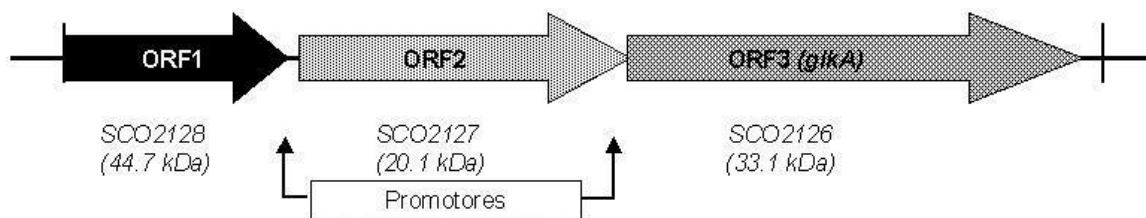


Fig. 7. Fragmento de 2.9 kb con el cual se complementaron las mutantes *Dog<sup>R</sup>* de *S. coelicolor* (Ikeda *et al.*, 1984).

Resultados similares se obtuvieron con las mutantes *Dog<sup>R</sup>* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996). Estas mutantes también se caracterizan por ser insensibles a RCC y la actividad de Glk se encuentra disminuida entre el 10 y 30% de la cepa original. A diferencia de las mutantes de *S. coelicolor*, las de *S. peucetius* var. *caesius* pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono y tienen afectado parcialmente el transporte de glucosa (Escalante *et al.*, 1999).

A partir de una cepa Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius* se aislaron una nueva serie de mutantes por su sensibilidad a Dog. En la tabla 1 se muestran algunas de las características de las mutantes Dog<sup>S</sup> obtenidas (Ramos *et al.*, 2004).

Una de éstas cepas, al igual que la cepa parental, mostró resistencia a la RCC por glucosa, con deficiencias en la incorporación de glucosa y en la actividad de Glk (Dog<sup>R</sup>-2), pero en la otra (Dog<sup>R</sup>-11), se observa buena incorporación y actividad de Glk, pero resistencia a RCC, sugiriendo que no hay una correlación clara entre la actividad de Glk, la sensibilidad a Dog y la RCC como si se observa en mutantes de *S. coelicolor* (Hodgson, 1982).

Tabla 1. Características de las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Sensibilidad a Dog <sup>a</sup>	Transporte de glucosa % <sup>b</sup>	Actividad de Glk % <sup>c</sup>	Sensibilidad a RCC <sup>d</sup>
Original	S	100	100	S
Dog <sup>R</sup>	R	51	15	R
Dog <sup>S</sup> -2	S	18	37	R
Dog <sup>S</sup> -11	S	71	84	R

<sup>a</sup> Las cepas sensibles (S) no crecen en presencia de 2-desoxiglucosa mas lactosa 55 mM y las resistentes (R) si crecen.

<sup>b</sup> Incorporación de glucosa 100% (2.21mmol/mg de peso seco de micelio).

<sup>c</sup> Glk: 100% (170 U/mg proteína).

<sup>d</sup> La sensibilidad a RCC se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) formado en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí.

Adaptado de Ramos *et al.*, 2004.

Revisando el efecto del gen *glkA* y *sco2127* de *S. coelicolor*, sobre la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a RCC de mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius*, Guzmán *et al.*, en el 2005, evidenciaron el papel estimulador de *sco2127* sobre estos parámetros y como consecuencia sobre el catabolismo de la glucosa. En *S. peucetius* var. *caesius* se detectó por Southern blot la presencia de genes homólogos a *glkA* y *sco2127* de *S. coelicolor* que se cree están adyacentes en el genoma. Se sabe que existen genes homólogos a *glkA* y *sco2127* en *S. avermitilis* con identidad de 86 y 95% respectivamente, con relación a los de *S. coelicolor*, lo que sugiere que están altamente conservados (Guzmán *et al.*, 2005)

Los estudios de complementación con el gen de *glkA* en mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius* permitieron la recuperación de actividad de Glk, pero no el transporte de glucosa, mientras que la complementación de las mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius* con el gen *sco2127* aumentó la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a la RCC, lo que se vio reflejado en la imposibilidad de sintetizar β-galactosidasa (enzima requerida para utilización de lactosa) y antraciclinas (metabolitos secundarios) en presencia de glucosa (Guzmán *et al.*, 2005).

Tabla 2. Efecto de la complementación de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre transporte, actividad de Glk y sensibilidad a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa % <sup>a</sup>	Actividad de Glk % <sup>b</sup>	Sensibilidad a RCC <sup>c</sup>
Original	-----	100	100	S
Dog <sup>R</sup>	-----	51	15	R
SDR-1	<i>glkA</i>	49	95	S
SDR-2	<i>sco2127</i>	108	115	S
SDR-3	<i>sco2127+glkA</i>	113	331	S

<sup>a</sup> Incorporación de glucosa: 100% (2.21 μmol/mg de micelio seco).

<sup>b</sup> Glk: 100% (170 U/mg de proteína).

<sup>c</sup> La sensibilidad a RCC se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí  
Modificado de Guzmán *et al.*, 2005



De éste modo, la función del gen *sco2127* aún se desconoce, aunque su cotranscripción con *glkA* sugiere que existe una conexión funcional entre los dos productos. Bajo tales consideraciones nos preguntamos cual será el papel del gen *sco2127* sobre el mecanismo de represión catabólica por glucosa en *Streptomyces coelicolor*





## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los avances que se han realizado por mas de dos décadas hacia la comprensión del fenómeno de RCC en *Streptomyces*, es poco lo que se sabe del mismo. Existen fuertes evidencias de la existencia de este fenómeno y su relación con diferenciación morfológica, producción de metabolitos secundarios y otros aspectos del ciclo de vida en dicho genero.

Por los estudios de complementación de mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistentes al efecto de la 2-desoxiglucosa, se cree que el producto del gen *sco2127* es capaz de restaurar pleiotrópicamente la sensibilidad a RCC reflejada en la producción de metabolitos secundarios, la actividad de la enzima Glk y el transporte de glucosa.

El estudio del efecto de la mutación específica de *sco2127* brindará mayores evidencias del papel que podría tener el producto codificante de este gen en la RCC en *S. coelicolor*.

## OBJETIVOS

### General:

Establecer papel del gen *sco2127* sobre el mecanismo de represión catabólica por glucosa en *Streptomyces coelicolor*

### Particulares:

- Construir una cepa de *S. coelicolor* con una delección total de *sco2127* por medio de la metodología de PCR targeting
- Reconocer el efecto de dicha mutación sobre:
  - Crecimiento y consumo de fuentes de carbono
  - Actividad de  $\beta$ -galactosidasa
  - Actividad de Glk
  - Producción de Actinorrodina.
  - Diferenciación morfológica.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas y Plásmidos

En la tabla se enlistan los plásmidos y cepa empleados en el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 3. Cepas y Plásmidos

Plasmidos	Genotipo relevante	Fuente referencia
pIJ773	<i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> )+oriT	Gust <i>et al.</i> , 2003, John Innes Centre
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>	Gust <i>et al.</i> , 2003
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4	Gust <i>et al.</i> , 2003
SC6E10	Cosmidos de <i>S. coelicolor</i> que contioene <i>sco2127</i> proveniente de la libreria genomica de <i>S. coelicolor</i>	John Innes Centre
pCP20	<i>cI857 lambda ts rep</i> , <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>FLP</i>	Gust <i>et al.</i> , 2003.
Cosmido interrumpido	SC6E10:: <i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> )+oriT, $\Delta$ <i>sco2127</i>	Este estudio
Cosmido sin cassette	SC6E10, $\Delta$ <i>sco2127</i>	Este estudio
<i>E. coli</i>		
BW25113	K12 derivative: $\Delta$ <i>araBAD</i> , $\Delta$ <i>rhaBAD</i>	Gust <i>et al.</i> , 2003, John Innes Centre
ET12567	<i>F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44</i>	Choi <i>et al.</i> (2004)
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 <math>\lambda</math>- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Sambrook and Russell (2001)
BT340	F-, $\Delta$ (argF-lac)169, $\phi$ 80dlacZ58(M15), <i>glnV44</i> (AS), & $\lambda$ mbda-, <i>rfbC1</i> , <i>gyrA96</i> (NalR) <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , pCP20	Gust <i>et al.</i> , 2003, John Innes Centre
<i>S. coelicolor</i>		
M145	SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup>	John Innes Centre
$\Delta$ <i>sco2127</i>	M145: $\Delta$ <i>sco2127</i>	Este estudio

### Obtención de la cepa mutante *S. coelicolor* $\Delta$ *sco2127*

Para llevar a cabo la delección del gen *sco2127* en *Streptomyces coelicolor* se empleo una técnica denominada **PCR targeting**®. Dicha técnica consiste en el reemplazo de un gen blanco por un casete de resistencia a un antibiótico, y el subsiguiente reemplazo de este último por una pequeña secuencia denominada cicatriz. Todo lo anterior directamente en el cromosoma del microorganismo. Dicha metodología está fundamentada en los diversos procesos de recombinación propios de *Streptomyces* y de *E. coli*

1. Obtención del cassette templado de amplificación

El plásmido pIJ773 (Fig. 8) fue extraído de una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El fragmento obtenido, que contiene el casete de interrupción con resistencia a apramicina (*aac (3)IV* con tamaño de 1384 pb) posee el origen de transferencia *oriT* del plásmido RP4 (vital para la conjugación intergenérica). A ambos lados del casete se encuentran las secuencias *FRT* requeridas para el reconocimiento de las recombinasas *FLP*. El plásmido fue un obsequio del Dr. Luis Servin del IIB-UNAM

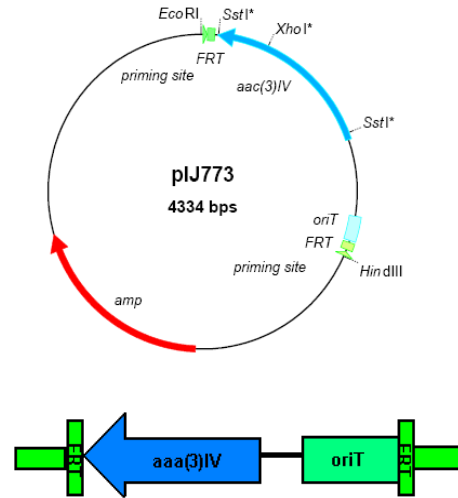
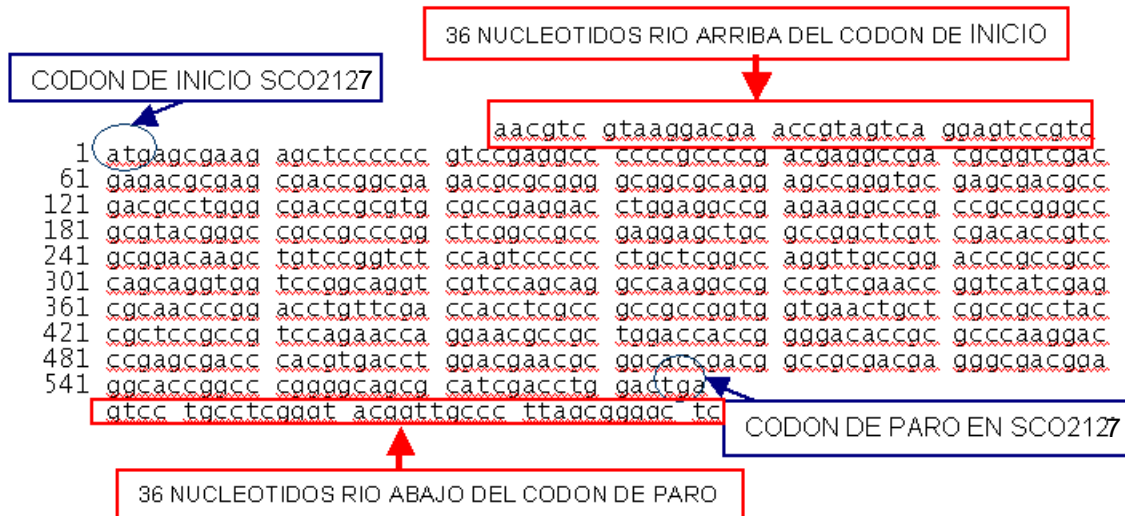


Fig. 8. plásmido pIJ773. El casete de interrupción que se extrae del mismo se muestra en la parte inferior de la figura

2. Diseño de primers para amplificación del casete de interrupción

Teniendo la secuencia del gen *sco2127* (576 pb), se diseñaron los primers de amplificación del casete de interrupción de acuerdo al siguiente esquema:



PRIMER FORWARD:  
 5'aacgc gtaaggacga accgtagtc ggagtcgctc atg attccgggatccgtcgacc 3'

20 NUCLEOTIDOS CORRESPONDIENTES A LAS SECUENCIAS FRT

**PRIMER REVERSE:**

5´ tgagtcc tgctcgggt acggtgccc ttagcggggc tc 3´

**Generación de la complementaria:**

3´ actcagg acggagccca tgccaacggg aatcgcccc ag 5´

**Adición de los 19 nucleotidos correspondientes a las secuencias FRT:**

5´ gagccccgctaagggcaaccgtacccgaggcaggactca **tgtaggctggagctgcttc 3´**

19 NUCLEOTIDOS CORRESPONDIENTES A LAS SECUENCIAS FRT

A continuación, en la Fig. 9 se presenta el ciclo de PCR:

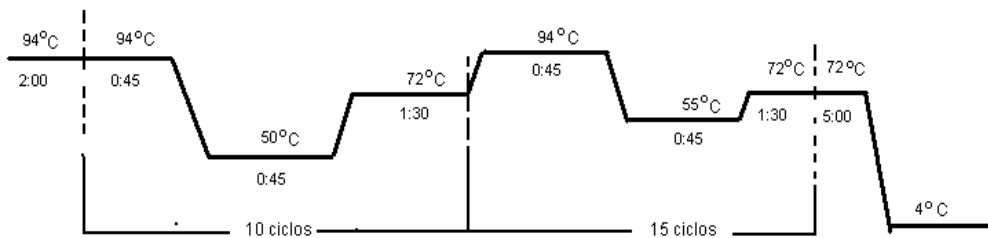


Fig. 9. Ciclo de PCR para la obtención del cassette de interrupción de apramicina.

**3. Insercion del cosmido SC6E10 en *E. coli* BW25113/pIJ790.**

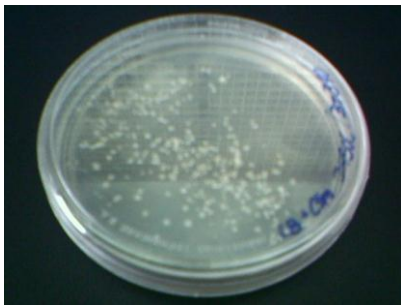


Fig. 10. Placa mostrando células competentes de *E. coli* BW25113/pIJ790.

El plásmido *pIJ790* o “Lamba red recombination plasmid” consta de un replicón sensible a la temperatura, un gen de resistencia a cloranfenicol y los genes que codifican para las funciones de recombinación del bacteriófago lamda: *gam*, *exo* y *beta*. Dicha maquinaria promueve un incremento considerable en la tasa de recombinación cuando se utiliza DNA lineal (Danseko y Waner, 2000) ya que la unión de la proteína codificada por el gen *gam* inhibe la acción de la nucleasa bacteriana RecBCD evitando que esta degrade el DNA lineal extraño que entra a la célula (Court *et al.* 2002)

El cósmido que contiene el gen *sco2127*, el SC6E10 (biblioteca genómica de *S. coelicolor*, acceso EMBL:X65932) fue introducido por electroporación a células competentes de *E. coli* BW25113/pIJ790 (Fig. 10). Las colonias con fenotipo  $\text{CIm}^R$ ,  $\text{Kan}^R$  fueron incubadas durante toda una noche a 30°C. Estas fueron el preinóculo para la transformación con el casete de resistencia a apramicina.

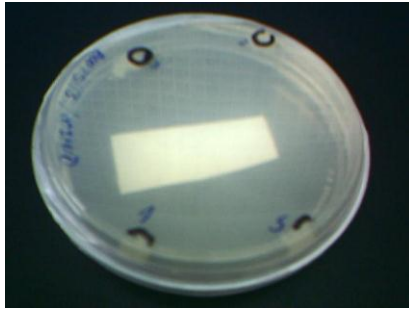
4. Inserción del casete de interrupción y generación del cósmido interrumpido en *sco2127*.

Fig. 11. Placa mostrando *E. coli* BW25113/cos.int. Los círculos negros muestran las colonias obtenidas

Células competentes de *E. coli* BW25113/pIJ790/SC6E10 fueron transformadas con 100 ng del producto de PCR (casete de resistencia a apramicina con secuencias FRT en sus extremos) e incubadas a 37°C para inducir la pérdida del plásmido pIJ790. Las células con fenotipo Clm<sup>S</sup>, Apra<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup> fueron conservadas en stock para pruebas de confirmación de la correcta inserción del casete de interrupción en el cósmido SC6E10.

## 5. Comprobación de la correcta inserción del casete de interrupción en el cósmido SC6E10

a. Extracción y purificación: De 50 ml de cultivo de células de *E. coli* BW25113/cos.int. (cósmido interrumpido) (Fig. 11) se aisló el cósmido interrumpido por lisis alcalina. Así mismo, una alícuota del cósmido SC6E10, disponible en el laboratorio, fue empleada para transformar células de *E. coli* BW25113/pIJ790 induciendo la pérdida del plásmido termosensible al crecerlas a 37°C.

De 50 ml de cultivo de *E. coli* BW25113/SC6E10 se extrajo cósmido SC6E10 como se describió anteriormente, el cual servirá como control.

b. Trabajo *in silico*:\_El trabajo *in silico*, consistió en armar la secuencia del cósmido completo SC6E10 y el cósmido interrumpido. En la base de datos de NCBI® aparece la secuencia de SC6E10. Esto es, el inserto de DNA genómico que fue ligado al Supercos 1 (vector de clonación en donde fue construida la biblioteca genómica de *S. coelicolor*), mas no la secuencia de dicho vector.

Al tener conocimiento de cómo se elaboró la biblioteca genómica de *S. coelicolor* se puede generar el cósmido con las herramientas de la informática procediendo así:

- Se digirió la secuencia del Supercos 1 ([www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)) con *Xba*I y *Bam* HI
- Se insertó la secuencia del SC6E10 (tomada del NCBI) en el sitio *Bam* HI
- Se eliminaron las secuencias que quedan externas a los sitios *cos* y que se pierden al llevar a cabo el empaquetamiento en el fago

Para el cósmido interrumpido se insertó la secuencia del casete de resistencia a apramicina en el sitio donde se encuentra la secuencia del gen *sco2127* en el cósmido SC6E10 y se procedió de la misma forma como se construyó el cósmido completo SC6E10.

c. Análisis de restricción por medio del programa “Restriction Mapper” ([www.restrictionmapper.com](http://www.restrictionmapper.com))

Los programas disponibles en Internet para hacer la “digestión virtual” de una secuencia de DNA son una poderosa herramienta que, con solo introducir la secuencia requerida, permiten predecir la ubicación de los cortes con diversas enzimas de restricción y el tamaño de los fragmentos que se generan al realizar la digestión *in vitro*. El programa empleado para realizar la digestión del cósmido SC6E10 y el cósmido interrumpido fue el Restriction Mapper® y arrojó un listado de más de 100 enzimas de restricción de las cuales se escogieron las que cumplieran con los siguientes requisitos:

- a. Que cortaran la menor cantidad de veces el cósmido.
- b. Que brindaran cantidades y tamaños de fragmentos relevantes para tener la certeza de que el cósmido está correctamente interrumpido.
- c. Que fueran enzimas disponibles en el laboratorio o que fueran fáciles de conseguir.

Bajo estos parámetros, se seleccionaron 5 enzimas y de estas 5 se probaron 3, las que mejores estimaciones podían brindar. Estas fueron *SacI*, *XhoI* y *XbaI*.

d. Verificación de integridad y el correcto reemplazo del gen *sco2127* por el casete de resistencia a apramicina por medio de enzimas de restricción *in vitro*

Habiendo escogido las enzimas de restricción, se realizó la digestión *in vitro* y los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%.

#### 6. Inserción del cósmido en la cepa *E. coli ET12567/pUZ8002*

Para evitar la acción del sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor* sobre el cósmido interrumpido, es necesario transformarlo en una cepa deficiente en metilación como *E. coli ET12567*.

El sistema de restricción metil-específico en *Streptomyces* fue reportado por Mac Neil *et al.*, en 1988. En su trabajo, reportan que los sistemas de restricción modificación están ampliamente distribuidos en el género *Streptomyces* y que la mayoría de ellos están compuestos por una metilasa y una endonucleasa. La metilasa modifica el DNA del huésped en una secuencia específica de 4 o más bases y la enzima de restricción rompe el DNA foráneo que no ha sido modificado.

En cepas con sistema de restricción metil específico, el DNA foráneo viene ya modificado (metilado) y sufre ruptura mientras que el DNA del hospedero permanece intacto.

*E. coli ET12567/pUZ8002* además de ser una cepa no metilante, contiene el plásmido no transmisible *pUZ8002*, que carece de una función en *cis* para su propia transferencia (Kieser *et al.*, 2000) pero que codifica proteínas necesarias para la conjugación intergenérica.

Dicha conjugación intergenérica entre *E. coli* y *S. coelicolor* permitirá la recombinación entre el casete de resistencia a apramicina y el gen *sco2127* del genoma, con esto, el casete de resistencia entrará a ocupar el lugar de dicho gen en el cromosoma de *Streptomyces*.

Una vez comprobado que el cósmido está correctamente interrumpido se procedió a insertarlo en la cepa de *E. coli ET12567/pUZ8002* mediante electroporación. Se aislaron 18 transformantes a las cuales se les practicó un mini prep con el fin de conocer el estado en el que se encontraba el cósmido al interior de la célula.

La digestión con *XhoI*, una de las enzimas utilizadas para la comprobación de la correcta inserción del casete de resistencia en el cósmido *SC6E10*, brindó los mismos tamaños de fragmento obtenidos anteriormente. Esto confirmó que el cósmido interrumpido no ha sufrido cambio alguno dentro de la cepa *ET12567/pUZ8002*.

#### 7. Conjugación intergenérica para obtener mutantes de *S. coelicolor* con reemplazo del gen *sco2127* por casete de resistencia a apramicina

La conjugación intergenérica se lleva a cabo entre células de *E. coli ET12567/pUZ8002* en plena fase exponencial de crecimiento, y esporas de *S. coelicolor* M145 las cuales han sido previamente sometidas a un "heat-shock" de 50°C por 10 min.

El producto de dicho tratamiento fue plaqueado en agar MS con MgCl<sub>2</sub> 10 mM sin antibióticos durante 16 h a 30°C.



Después de este tiempo, a dichas cajas se les agrego ácido nalidixico a una concentración de 0.5 mg/ml y apramicina a una concentración de 1.25 mg/ml, y se continuó con el crecimiento por 16 h más a 30°C.

Posteriormente, las colonias aisladas fueron picadas y transferidas por duplicado a medio MS con ácido nalidixico 25 µg/ml, apramicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml; y a medio únicamente con ácido nalidixico 25 µg/ml y apramicina 50 µg/ml y se dejaron crecer durante 48 h a 30°C.

A las mutantes confirmadas con el fenotipo deseado (resistencia a apramicina por inserción del casete en el cromosoma) se les purificó por medio de aislamiento de colonia y posteriormente se cosecharon esporas para obtener un stock para las pruebas pendientes por hacer.

## 8. Comprobación de la generación de la mutante *S. coelicolor* $\Delta$ *sco2127::Apra*.

### a. Diseño de oligos, ciclo de PCR y secuenciación

Se desarrollaron oligos 100 pb río arriba y 100 pb río abajo del gen *sco2127* para determinar que fuera correcta la inserción del casete por medio de la diferencia de tamaño de fragmento generado tanto en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 como en la mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*.

#### Primers utilizados:

```

841 ccgtacgcga ggagtcgac ctggtccgcc gcgggcagca actggccgtc ccgccgggc
901 cgttccgcgc caccgtcccg ctgccgtcgg cgtgcccgcg ctgcaccgtc gacggggccg
961 ccctgcgcga cggcacgctc gccgtccggt tcgcccgcga cccggaactg tggccgcggg
1021 ggcgatgacc cgcggagccc cggagcgcgg gcccgttcgg gtaacgtcgt aaggacgaac
1081 cgtagtcagg agtccgtcAT GAGCGAAGAG CTCCCCCGT CCGAGGCCCC CCGCCCCGAC
1141 GAGGCCGACG CGGTCGACGA GACGCGAGCG ACCGGCGAGA CGCGCGGGGC GGCGCAGGAG
1201 CCGGGTGCGA GCGACGCCGA CGCCTGGGCG ACCGCGTGCG CCGAGGACCT GGAGGCCGAG
1261 AAGGCCCGCC GCCGGGCCGC GTACGGGCCG CCGCCCGGCT CGGCCGCCGA GGAGCTGCGC
1321 CGGCTCGTGC ACACCGTCGC GGACAAGCTG TCCGGTCTCC AGTCCCCCT GCTCGGCCAG
1381 GTTGCCGGAC CCGCCGCCA GCAGGTGGTC CGGCAGGTCG TCCAGCAGGC CAAGGCCGOC
1441 GTCGAACGG TCATCGAGCG CAACCCGGAC CTGTTGACC ACCTCGCCGC CGCCGGTGGT
1501 GAAGTGTCTG CCGCCTACCG CTCCGCCGTC CAGAACCAGG AACGCCGCTG GACCACCGGG
1561 GACACCGCGC CCAAGGACCC GAGCGACCCA CGTGACCTGG ACGAACGCGG CACCGACGGC
1621 CGCGACGAGG GCGACGGAGG CACCGGCCCG GGGCAGCGCA TCGACCTGGA CTGAgtcctg
1681 cctcgggtac ggttgccett agcggggctc gaccgaactg agggattcat gggactcacc
1741 atcggcgtcg acatcggcgg cacgaagatc gcgcccggcg tggtcgacga ggaaggcaac
1801 atcctctcga cccacaaggt gccgacccc accacacccg aggccatcgt ggacgccatc

```

### b. Digestión de las bandas para análisis por tamaño de corte

Paralelamente a lo anterior, la secuencia teórica de las bandas de *sco2127* y del casete de resistencia a apramicina fueron digeridas *in silico* con tres enzimas de restricción bajo el criterio de que brindarían diferencias de tamaño que fueran relevantes al estimar si el casete realmente se encuentra en el lugar de *sco2127* en el cromosoma de *Streptomyces*. La digestión *in silico* se realizó con ayuda del programa Restriction Mapper (anteriormente utilizado).



## Caracterización de la mutante

Para la preparación del cultivo semilla, 100  $\mu$ l de esporas ( $\sim 10^9$ /ml) fueron inoculadas en matraces de 250-ml con 50 ml de medio NMMP (Hodgson, 1982), suplementado con 0.5% de casaminoácidos y 50 mM de manitol. Las esporas fueron crecidas durante 48 h bajo agitación gírica constante de 180 rpm a 29°C. El micelio obtenido fue lavado con 50 ml de NaCl 0.85% y resuspendido en 5 ml de la misma solución. La fermentación se inició con 1 ml de inóculo en el mismo tipo de matraces. La fermentación se llevo a cabo en medio NMMP suplementado con 0.5% de casaminoácidos en cinco diferentes condiciones de fuente de carbono como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de crecimiento en diferentes fuentes de carbono

L50G100	lactosa 50 mM + glucosa 100 mM
L50	lactosa 50 mM
M50	manitol 50 mM
G50	glucosa 50 mM
G100	glucosa 100 mM

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de la fermentación por triplicado. La condición M50 fue tomada como el control de todas las pruebas realizadas ya que se tiene reportada como fuente de carbono no represora (Kwakman y Postma, 1994). G50 fue empleada como concentración no represora de glucosa y G100 como represora (Guzmán *et al.*, 2005).

### *Determinación de curva de crecimiento por peso seco*

Para la determinación de peso seco, a partir de los cultivos se tomaron muestras de 5 ml, las cuales se filtraron al vacío sobre discos de papel filtro Whatman No.1, previamente pesados. La biomasa recuperada fue secada a 60 °C durante 8 h y pesada.

### *Determinación de actividad de $\beta$ -galactosidasa*

La actividad de  $\beta$ -galactosidasa fue determinada espectrofotométricamente en células toluenizadas, empleando o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato siguiendo la metodología reportada por Eckardt *et al.* (1987). Una unidad de actividad enzimática equivale a 1 nmol de ONPG hidrolizado a 37 °C por min por mg de proteína del cultivo.

### *Determinación de actividad de glucosa cinasa*

La actividad de Glk se determinó en extractos libres de células preparados a diferentes tiempos de la fermentación. Los extractos enzimáticos fueron obtenidos por sonicación en buffer PED ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  75 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, ditiotreitól 2 mM), después fueron centrifugados a 13,000 rpm a 4 °C durante 30 min. Los sobrenadantes fueron probados empleando 50  $\mu$ g de proteína total, en una mezcla de reacción que contiene en un volumen de 1746  $\mu$ l, tris-HCl 100 mM pH 7.2,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  250 mM, NADP 5 mM, ATP 100 mM y agua. La cuantificación de dicha actividad fue monitoreada espectrofotométricamente midiendo la reducción de  $\text{NADP}^+$  a 340 nm a 37°C (Imiriskova *et al.*, 2001). La actividad se expresa como unidades de actividad por miligramo de proteína total del extracto. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de NADPH por min. Para el cálculo de actividad específica de la enzima, se midió la cantidad de proteína total por el método de Bradford (Guzmán *et al.*, 2005).

### *Determinación de carbohidratos totales*

La concentración de glucosa residual fue determinada en el medio de cultivo empleando el kit de glucosa oxidasa y leída a 520 nm (Hycel, Australia) (Escalante *et al.*, 1999). Los otros carbohidratos residuales empleados fueron determinados por el método de fenol-sulfúrico, leyendo la reacción a 490 nm (Southgate, 1976).

#### *Determinación de actinorrodina*

La determinación cualitativa del antibiótico se llevo a cabo sembrando 100  $\mu$ l de esporas ( $\sim 10^9$ /ml) en cajas de medio TSB (tryptic soy broth (CM129)) complementado con glucosa en concentraciones de 0, 40, 60, 80 y 100 mM, hasta las 72 h de crecimiento, tiempo al cual fueron tomadas fotografías.

La determinación cuantitativa del antibiótico se llevó a cabo en una fermentacion en medio R5 sin agar y sin sacarosa, suplementado con concentraciones de glucosa de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mM y en medio NMMP suplementado con las mismas concentraciones de glucosa. En 2 ml de medio de cultivo previamente extraídos con 2 ml de KOH 3 N. La actinorrodina fue leída a 640 nm y la concentración determinada con base en el coeficiente de extinción de  $25,320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  reportado por Bystrykh *et al.* (1996).

#### *Comparación morfológica por microscopia electrónica de barrido.*

Para realizar comparaciones en cuanto a desarrollo morfologico entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta$ *sco2127*, ambas cepas fueron crecidas en medio YMG agar con 100 mM de glucosa, y se tomaron muestras a las 48 y 72 h de crecimiento, las muestras de la capa de crecimiento fueron depositadas en portamuestras y observadas en el microsocopio electronico ambiental FEIXL30 ESEM.

## RESULTADOS

### Amplificación del cassette de interrupción

Una vez extraído el cassette de interrupción del plásmido pIJ773, éste fue amplificado con los primers diseñados que se muestran en la sección de materiales y métodos (Diseño de primers para amplificación del casete de interrupción). Dicha amplificación (Fig. 12) añadió al cassette secuencias homólogas a las que se encuentran río arriba y río abajo del gen *sco2127* en el genoma. Esto brindará el escenario adecuado para la recombinación homóloga en *S. coelicolor*.

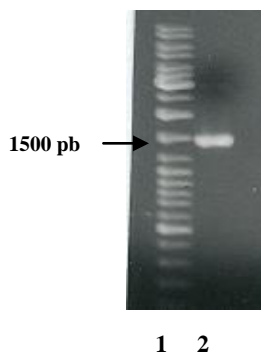


Fig.12. Gel de agarosa al 0.8% donde se observa el producto de PCR de 1462 pb.  
Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb.  
Carril 2: amplificación del cassette con el tamaño esperado 1384 pb casete +78 nucleótidos de la región que delimita el gen= 1462 pb.

### Verificación de integridad y el correcto reemplazo del gen *sco2127* por el cassette de resistencia a apramicina por medio de enzimas de restricción *in vitro*

Una vez obtenidas colonias aisladas de *E. coli* BW25113 que contenían el cosmido Interrumpido, este último se extrajo y se realizó la digestión con las enzimas *Xba*I, *Sac*I, y *Xho*I con la finalidad de comprobar el reemplazo del gen *sco2127* por el cassette de resistencia a apramicina en el cósmido. El resultado de la digestión se presenta en el gel de agarosa al 0.8% de la Fig. 13, que muestra los tamaños de fragmento esperados y confirma la delección del gen *sco2127* en el cósmido *SC6E10*

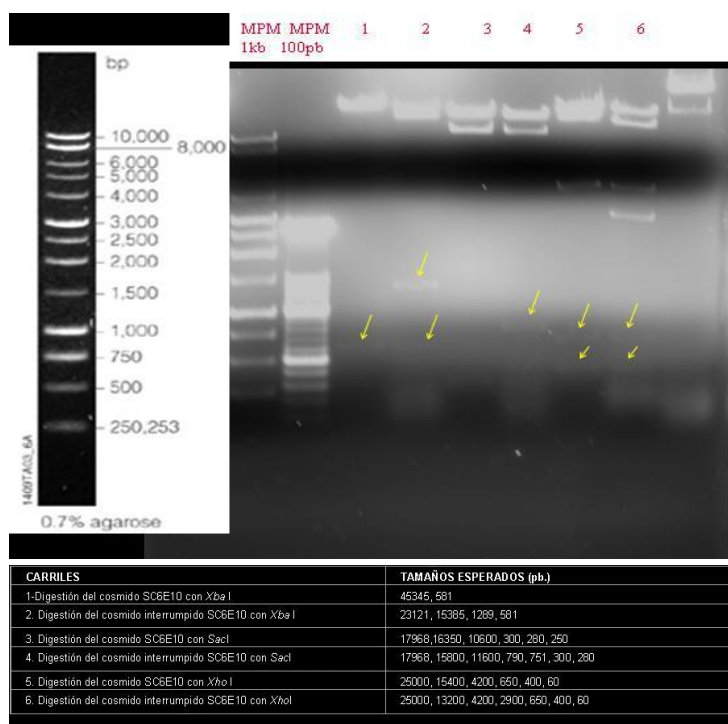


Fig. 13. Gel de agarosa al 0.8%. En este gel, las flechas indican los productos de digestión del cósmido *SC6E10* y del cósmido interrumpido, cortados con las enzimas *Xba*I, *Sac*I, y *Xho*I.

### Conjugación intergénica para la obtención de mutantes de *S. coelicolor* con reemplazo del gen *sco2127* por un casete de resistencia a apramicina en el cromosoma.

Una vez que se insertó el cósmido interrumpido en la cepa no metilante de *E. coli* ET12567, se conjugó intergenéricamente con *S. coelicolor* M145. El reemplazo del gen *sco2127* por el casete de resistencia a apramicina producto de la recombinación, fue comprobado por plaqueo en medio selectivo. De la conjugación se obtuvieron 200 exconjugantes de la cuales se aislaron 70 como se puede apreciar en la figura 14.

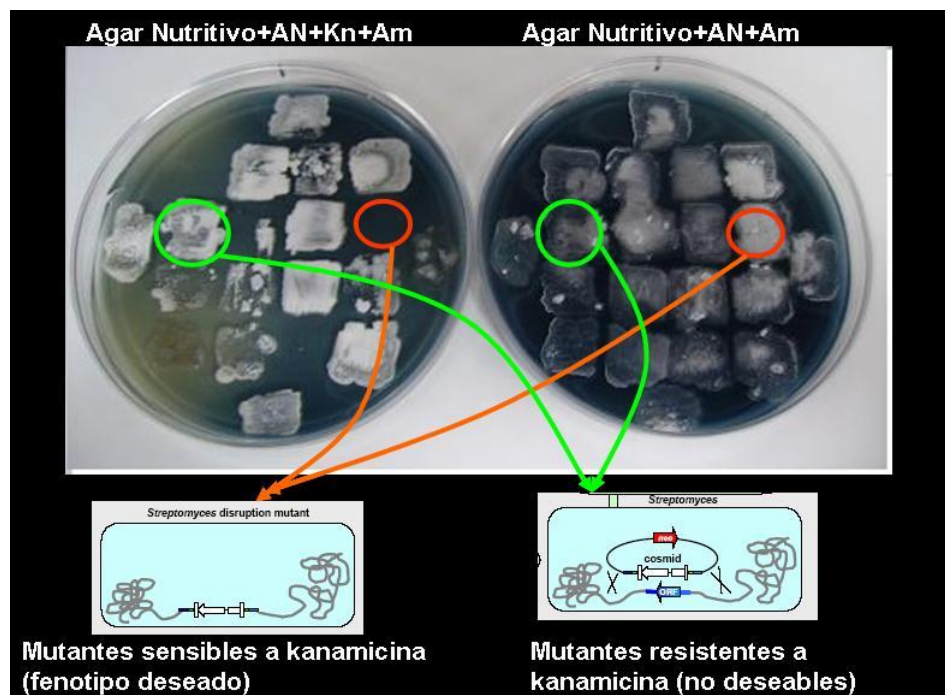


Fig.14. Confirmación de las mutantes en medio selectivo. Las mutantes que crecen en medio selectivo con kanamicina y apramicina (en círculos color verde) no lograron hacer la recombinación homóloga, mientras que las mutantes que lograron hacer la recombinación (en círculos color naranja) son sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina.

### Comprobación de la generación de la mutante *S. coelicolor* $\Delta$ *sco2127::Apra*.

De las 70 colonias aisladas, siete fueron probadas extrayendo su DNA genómico y realizando PCR tal y como se indicó en la sección de materiales y métodos (Fig.15).

Como control negativo, se utilizó DNA genómico extraído de *S. coelicolor* M145 y amplificado por PCR con los mismos primers.

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1%. Las bandas obtenidas fueron cortadas del gel, purificadas y enviadas a secuenciar, encontrando un alto porcentaje de identidad (96%) con la secuencia teórica del casete de interrupción de apramicina (AC:pIJ773).

La secuencia de 127 pb río abajo de dicho casete presentó alta identidad (99%) con respecto al gen *sco2126* (gen adyacente a *sco2127*) en el genoma de *S. coelicolor*

El tamaño del gen *sco2127* fue de 576 pb y el tamaño del fragmento producto de la amplificación a partir de los oligos diseñados de 1004 pb (control negativo). En el caso de haber logrado una correcta inserción del casete de interrupción en el sitio del gen *sco2127* del genoma, se esperaba un fragmento producto de amplificación de 1804 pb, ya que el tamaño del casete de interrupción es de 1384 pb. Como puede observarse en la Fig. 15B, este tamaño fue finalmente el obtenido.

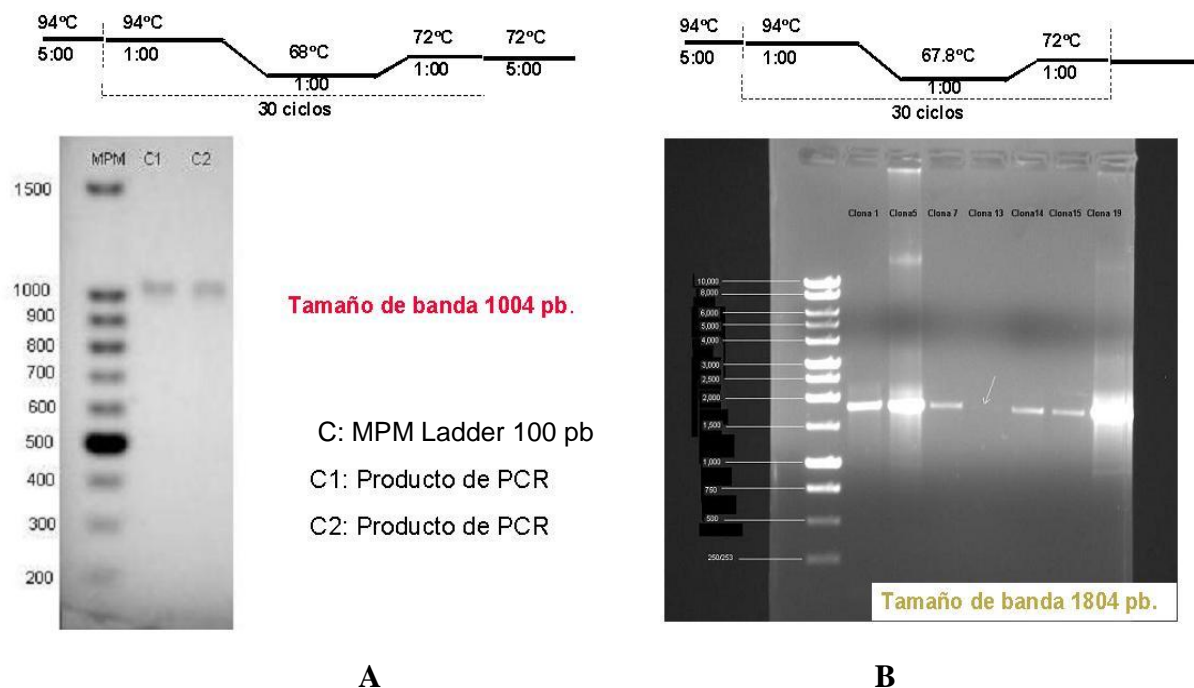


Fig.15. Ciclo de PCR para *S. coelicolor* M145 y para las mutantes *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*, así como los productos de amplificación en geles de agarosa al 1%. La diferencia del tamaño de las bandas fue el esperado.

### Digestión de las bandas para análisis por tamaño de corte.

Con el fin de garantizar la integridad de la secuencia del cassette de resistencia a apramicina, se realizó una digestión con enzimas de restricción tanto del producto de PCR *sco2127* como del cassette de resistencia a apramicina (Fig. 16). El análisis de restricción coincidió de manera correcta con el patrón de bandeado obtenido en el gel de agarosa al 1%.

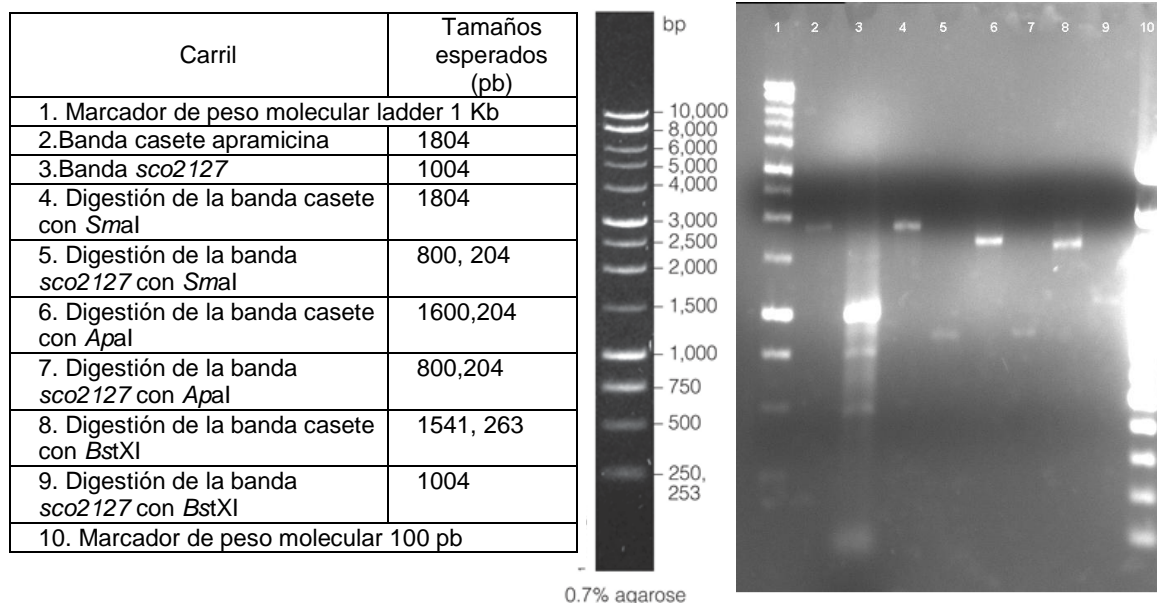


Fig.16 Análisis de restricción y gel de agarosa al 1% con la digestión del producto de PCR *sco2127* y cassette de resistencia a apramicina. Los tamaños obtenidos demuestran la integridad del cassette insertado en el genoma.

### Prueba preliminar de expresión

Un anticuerpo policlonal anti-*sco2127* obtenido anteriormente en el laboratorio (Chavez et al, 2011) se enfrentó a extractos crudos de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*, y *S. peucetius* var. *caesius*. Como puede verse en la Fig. 17, por medio de un western-blot, el anticuerpo fue capaz de detectar el producto de expresión de *sco2127* en los extractos celulares totales de *S. coelicolor* M145 y un probable ortólogo del mismo en *S. peucetius* var. *caesius*. En la mutante *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*, no hubo ninguna señal de reconocimiento.

#### WESTERN BLOT USANDO ANTI-SCO2127 SOBRE LISADOS DE *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius*

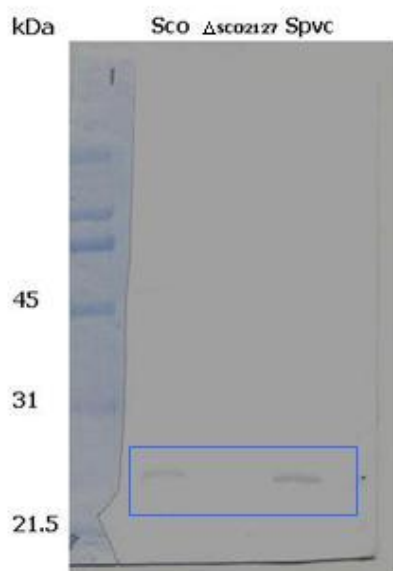


Fig.17. Western blot realizado con extractos crudos de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::Apra*, y *S. peucetius* var. *caesius*, enfrentados al anticuerpo policlonal anti-*sco2127*. En la imagen que no hay reconocimiento de la proteína SCO2127 en la mutante.

### Caracterización de la mutante *S. coelicolor* $\Delta$ *sco2127::Apra*

#### Crecimiento y pH

El crecimiento fue determinado con el fin de apreciar si la mutación de *sco2127* afectaba la producción de biomasa en función del tiempo. Las cepas M145 y  $\Delta$ *sco2127* de *S. coelicolor* mostraron un crecimiento similar en el medio L50G100 y L50 llegando a la fase pre-estacionaria a las 24 h de crecimiento (Fig. 18). En el medio L50G100 se observó un mejor crecimiento que en L50, tanto de la cepa mutante como de la silvestre. Probablemente esto sea debido a que la glucosa es fuente preferencial de carbono para este microorganismo. En el medio L50G100, a las 10 h de incubación se observó mayor crecimiento de la mutante con respecto a la silvestre, pero esto se vio compensado a las 24 h de crecimiento donde la cantidad de biomasa presente en ambas cepas fue similar. En el medio L50 se observó un menor crecimiento de las dos cepas y aun a las 72 h no se observó claramente una fase estacionaria en las mismas. El crecimiento de la mutante y de la silvestre fue lento y pobre en medios con lactosa como única fuente de carbono, observándose una leve basificación del medio. En medios con lactosa y glucosa se observó una clara acidificación del medio por parte de las cepas mutante y silvestre (Fig. 18a) esto puede estar indicando la formación de ácidos orgánicos debido al metabolismo de la glucosa como fuente preferencial de carbono.



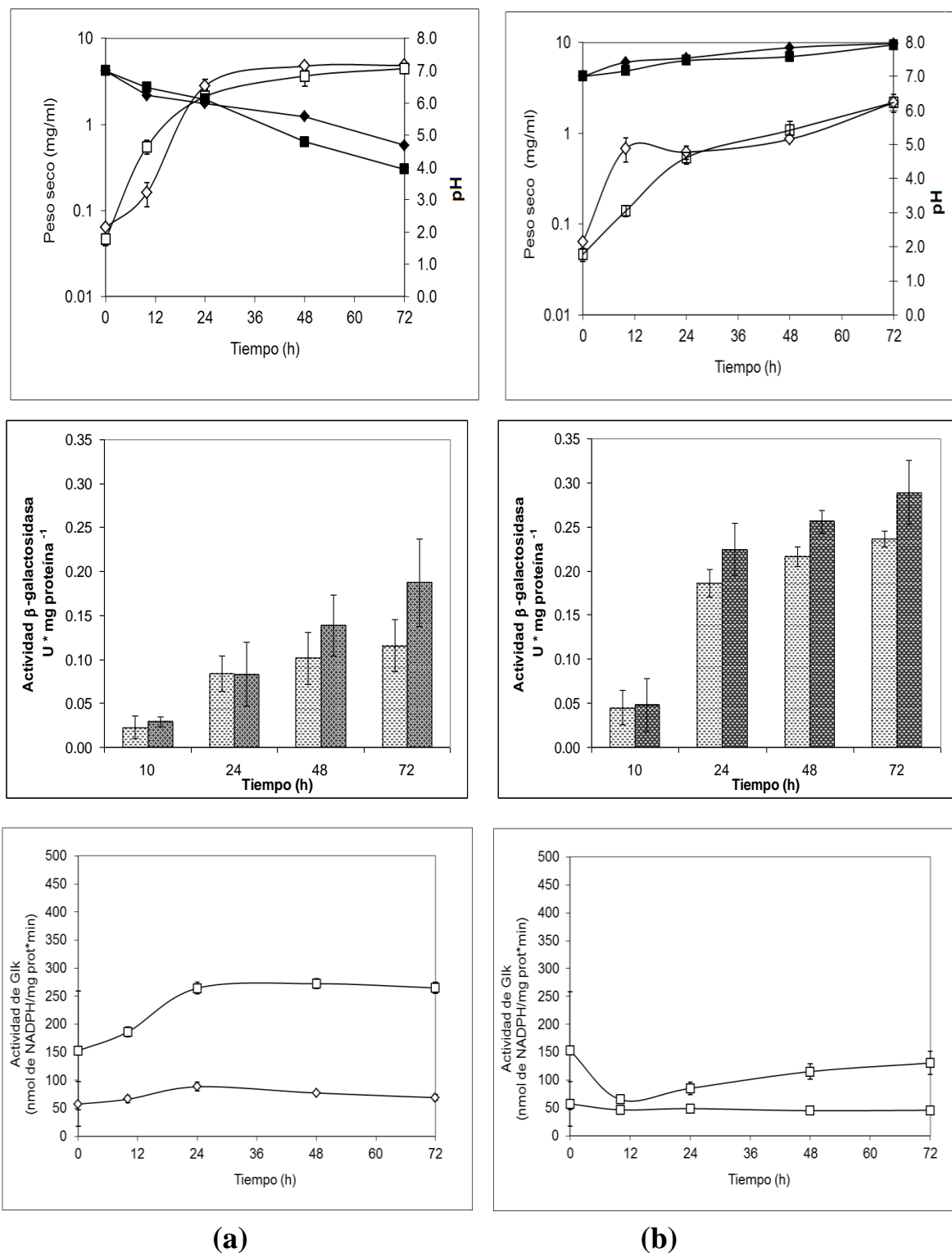


Fig.18. Crecimiento, pH, actividad de  $\beta$ -galactosidasa y actividad de Glk en medios (a) L50G100 y (b) L50. Los rombos blancos representan la cepa M145 mientras que los cuadrados blancos representan los comportamientos de la cepa mutante. Los rombos y cuadrados negros representan el pH en los cultivos de la cepa silvestre y mutante respectivamente. Para la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, las barras claras representan la actividad de la cepa silvestre y las oscuras la actividad de la cepa mutante.



### Actividad de $\beta$ -galactosidasa

La actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa fue el criterio elegido para estimar si la mutación del gen *sco2127* afectaba de alguna forma el metabolismo primario.

Cuando las cepas silvestre y mutante fueron crecidas en medio L50, se observó la actividad más alta de las evaluadas en los dos medios, alcanzando valores por encima de 0.29 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> para la mutante y por encima de 0.23 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> para la silvestre, a las 72 h de crecimiento. En el medio L50G100, se observó baja actividad de  $\beta$ -galactosidasa pero entre las 48 y 72 h pudo observarse una actividad ligeramente menor en la cepa silvestre que en la mutante. En medios con manitol, se apreció una actividad "basal" de  $\beta$ -galactosidasa que no rebasa 0.11 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> (no se muestra en la figura). La actividad de esta enzima fue levemente superior en la cepa mutante en esta condición. La represión fue visible en el medio L50G100 en la mutante y en la silvestre, ya que en presencia de glucosa la enzima relacionada con el metabolismo de la lactosa tuvo una menor actividad catalítica que la que se encontró en medios con lactosa como única fuente de carbono. Sin embargo, la represión fue mas perceptible en la cepa silvestre que en la mutante, cuyas actividades siempre fueron ligeramente menores que las de la cepa mutante. Esto podría estar indicando que *sco2127* no es el único gen responsable de la represión catabólica por glucosa sobre esta enzima del metabolismo primario en *S. coelicolor* (Fig. 18 a y b).

### Actividad de Glk

Con el fin de comparar si la mutación de *sco2127* afectaba la actividad de Glk de manera similar a lo que se había encontrado en mutantes Dog<sup>R</sup> (Guzmán et al., 2005), se midió la actividad catalítica de Glk para las cepas mutante y silvestre de *S. coelicolor*.

En el medio L50G100 se observó una máxima actividad de Glk de la cepa mutante de 272.30 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> a las 48 h de crecimiento, mientras de la cepa silvestre no rebasó los 80.32 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> alcanzadas a las 24 h de crecimiento. En el medio L50 se encontraron actividades más bajas. La cepa silvestre alcanzó un valor máximo cercano a 50 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> a las 24 h de crecimiento mientras la mutante alcanzó 130 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> a las 72 h de crecimiento (Fig. 18 a y b).

### Crecimiento y actividad de Glk en la cepa silvestre de *S. coelicolor* crecida en glucosa 50 y 100 mM.

Como puede verse en la Fig. 19 A y B, el crecimiento en glucosa 50 y 100 mM de la cepa mutante y de la silvestre fue muy similar entre ellas. En nuestro laboratorio la concentración de glucosa 50 mM fue establecida como no represora para *S. coelicolor*, mientras que la concentración de glucosa 100 mM fue establecida como represora; esto derivado de la observación de producción de antibióticos coloreados en medios ricos a diferentes concentraciones de glucosa, encontrándose que a 100 mM de glucosa la producción de antibióticos fue reprimida. En el medio G50 el crecimiento fue levemente inferior al crecimiento en G100 en ambas cepas (Figura 19A y B). Adicionalmente, el medio mostró acidificación en los cultivos de la cepa silvestre en ambas concentraciones de glucosa, mientras que en la mutante no fue tan aparente, aunque el crecimiento de ninguna de las dos cepas pareció ser afectado por esto.

La actividad de glucosa cinasa mostró un máximo a las 24 h de crecimiento para ambas cepas en medios G50 y G100 (Fig. 19 C y 19 D). En medio G50 la actividad de Glk para la cepa silvestre fue de 168 U\*mg de proteína<sup>-1</sup>, mientras que para la mutante fue de 246 U\*mg de proteína<sup>-1</sup>, un 30% mayor que la actividad en la silvestre. En medio G100, la actividad de Glk para la cepa silvestre fue de 357 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> mientras que para la mutante fue de 405 U\*mg de proteína<sup>-1</sup>. Nuevamente un 20% mayor la mutante que la actividad encontrada en la silvestre (Fig. 19 C y 19 D).

En el medio M50 (control), la actividad de Glk no mostró mucha variación a lo largo de la fermentación. La cepa silvestre alcanzó un máximo de 86 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> a las 24 h de crecimiento (Fig. 19C), mientras que la cepa mutante alcanzó 147 U\*mg de proteína<sup>-1</sup> al mismo tiempo de fermentación (Fig. 19 D). Dichas actividades disminuyeron sutilmente hasta las 72 h de crecimiento. En estudios previos, van Wesel et al., 2007 realizaron cinéticas de fermentación de la cepa silvestre hasta las 22 h de crecimiento, que coincide con el inicio de fase pre estacionaria, en medio NMMP suplementado con manitol 50 mM y NMMP con glucosa 50 mM. Los autores, obtienen un pico de actividad a las 18 h de crecimiento en glucosa 50 mm (el cual nosotros no detectamos por los tiempos de muestreo diferentes) y niveles de actividad similares a las 22 h de crecimiento en



medios con manitol y medios con glucosa. Nosotros obtuvimos niveles de actividad de Glk en la cepa silvestre a las 24 h de crecimiento en glucosa 50 mM, de casi el doble de los obtenidos en la cepa silvestre a las 24 h en medios con manitol 50 mM.

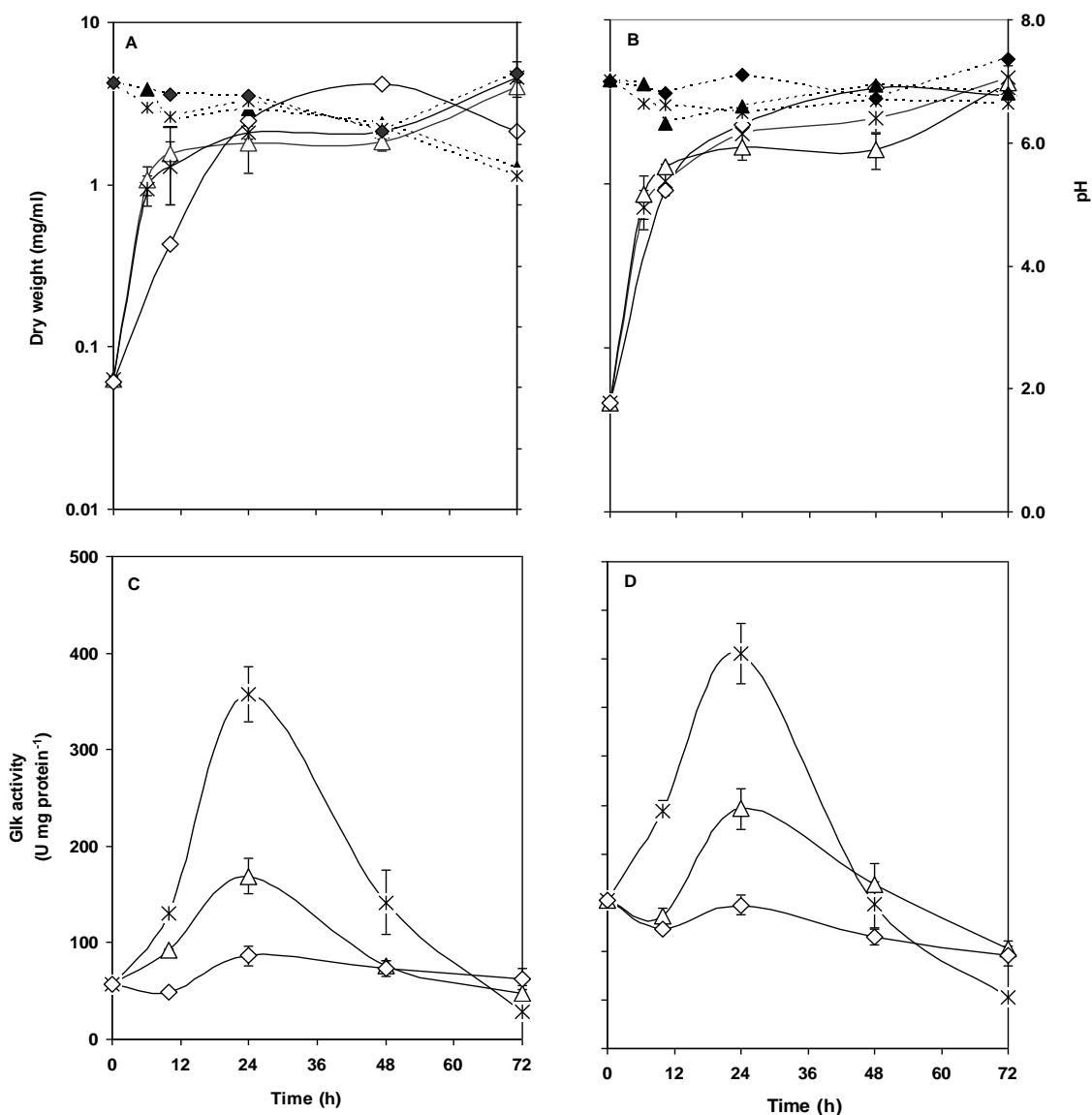


Fig.19. Crecimiento, pH y actividad de Glk en medios G50 ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), G100 ( $*$ ) y M50 ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ) para la cepa M145 (A y C) y para la cepa mutante (B y D). La curvas en línea punteada representan el pH en los cultivos de la cepa mutante y silvestre.

#### Producción de actinorrodina

Con el fin de evaluar cualitativamente el metabolismo secundario relacionado a la producción de pigmentos, se realizó una siembra de las cepas mutante y silvestre en cajas de medio rico TSB suplementado con diferentes concentraciones de glucosa.

Las cajas mostraron diferencias relevantes entre la cepa silvestre y la mutante  $\Delta sco2127$ . Como se observa en las fotografías de la Fig. 20, la cepa M145 a concentración de 100 mM de glucosa dejó de producir el antibiótico actinorrodina (pigmento azul) mientras que la undecilprodigiosina (pigmento rojo) pareció ser insensible a represión a estas concentraciones.

Para evaluar el efecto de la mutación de *sco2127* sobre la represión de la producción de este metabolito secundario se evaluó la producción de actinorrodina total, intra y extracelular, en un gradiente de concentraciones de glucosa (0 a 200 mM) en el medio mínimo NMMP. En ambas cepas, hasta las 24 h de crecimiento, la actinorrodina fue intracelular y de una tonalidad rojiza (la cual no debe ser confundida con el pigmento rojo undecilprodigiosina, uno de los otros metabolitos secundarios producido por *S. coelicolor*). Las mayores producciones de pigmento para cada concentración de glucosa, se encontraron en la fase estacionaria de las 48 a las 72 h de crecimiento. En la concentración de 0 mM de glucosa se observó la mayor producción de actinorrodina para ambas cepas. A medida que se aumentó la concentración de glucosa en el medio donde se creció la cepa silvestre, la producción de actinorrodina fue reprimida. Fue notorio que la cepa mutante siempre presentó menor producción global que la cepa silvestre, al menos en este medio, pero la primera se vio poco alterada al aumentar en contenido de glucosa

Tomando como referencia de 100% a la producción de actinorrodina en medios sin glucosa para ambas cepas, fue notoria la reducción de producción de actinorrodina en medios con glucosa 50 mM para la cepa silvestre, alrededor de un 60%, mientras que la cepa mutante solo vio reducida su producción en un 2% en las mismas condiciones (Fig. 21). En medios con glucosa 200 mM, la reducción de producción en la cepa silvestre fue de un 83%, mientras que para la cepa mutante la reducción fue de un 11% en las mismas condiciones. Es curioso observar que incluso en concentraciones de 25 mM de glucosa y 150 mM de glucosa, la producción de actinorrodina en la cepa mutante pareció ser un 25% y un 15% mayor respectivamente, a la producción en medios carentes de glucosa. Se ha observado que en otros medios líquidos como el medio R5A la producción de actinorrodina es claramente favorecida en la cepa mutante en relación a la silvestre (Chavez et al., comunicación personal). Esto coincide con lo encontrado en medio completo sólido (Fig. 20), en donde el aumento en la concentración de glucosa en el medio no pareció afectar la producción de actinorrodina en la cepa mutante.

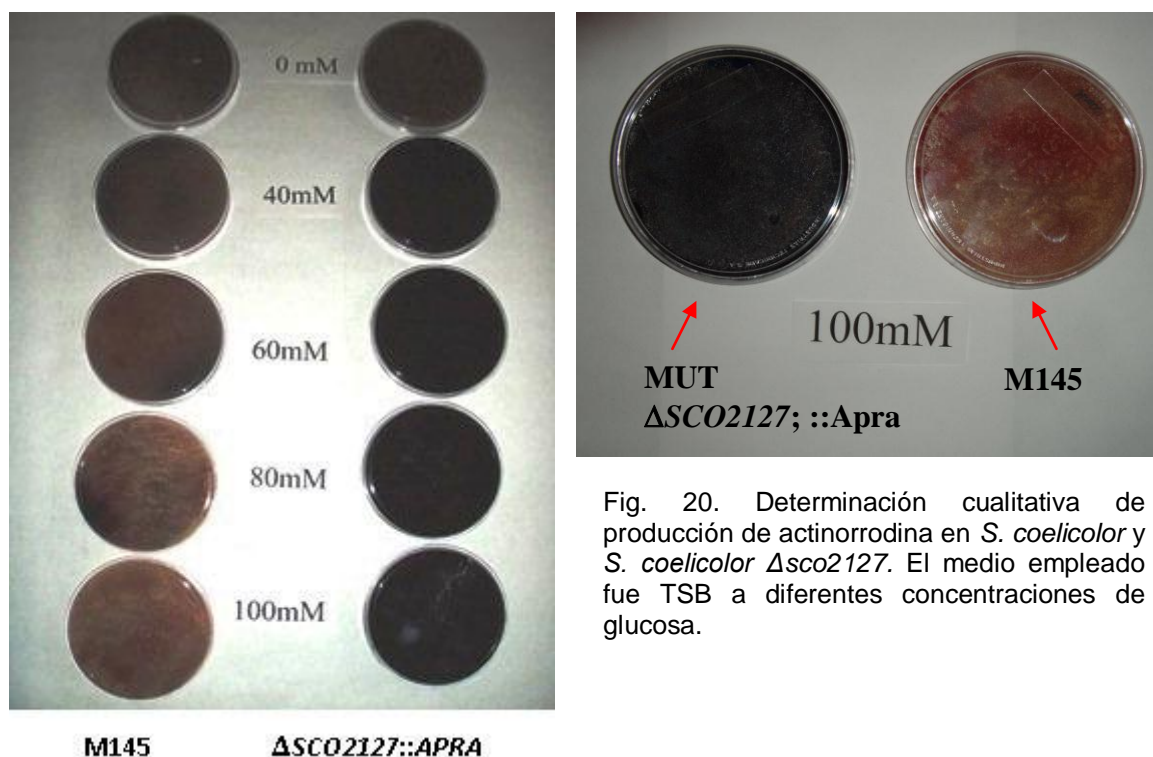


Fig. 20. Determinación cualitativa de producción de actinorrodina en *S. coelicolor* y *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127*. El medio empleado fue TSB a diferentes concentraciones de glucosa.

En 2008, Borodina *et al.*, reportaron para la cepa silvestre de *S. coelicolor* producciones máximas de actinorrodina de hasta 15 mM/mg de peso seco a las 64.5 h de crecimiento en medio R2YE y de 0.5 mM/mg de peso seco a las 88.5 h de crecimiento en medio mínimo. Cabe resaltar que dichos medios no contienen glucosa. Aunque nosotros no empleamos los mismos medios, observamos también la producción de actinorrodina total máxima posterior a las 48 h de crecimiento con valores por encima de 6 mM/mg de peso seco.

La drástica disminución de pH fue una tendencia uniforme en la cepa silvestre en las diferentes concentraciones de glucosa, lo cual mostró la utilización de la glucosa como fuente de carbono. En el caso de los medios sin glucosa se observó un valor de pH superior, debido al metabolismo de los casaminoácidos presentes en el medio los cuales son empleados por la célula como fuente de carbono ocasionando la basificación del medio (Fig. 21). En la cepa mutante, la acidificación del medio no fue tan drástica como en la cepa silvestre. La acidificación del medio hace que la actinorrodina se quede al interior de la célula permaneciendo de un color rojizo. Únicamente en medios sin glucosa se pudo apreciar actinorrodina de color azul.

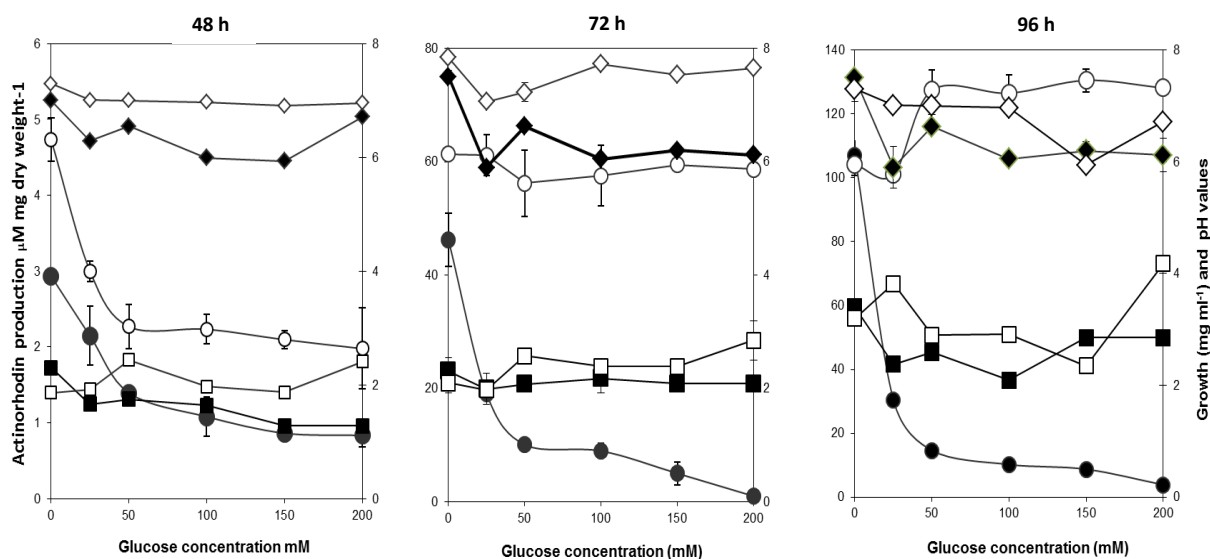


Fig. 21. Efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre el crecimiento (■, □) y la producción específica de actinorrodina (●, ○) en *S. coelicolor* M145 (símbolos negros) y la mutante  $\Delta$ *sco2127* (símbolos claros). Ambas cepas fueron crecidas en medio R5A a 29 °C. Se muestran los datos obtenidos a las 48, 72 y 96 h de crecimiento.

#### Diferenciación morfo fisiológica

Con el fin de apreciar si la mutación de *sco2127* tiene implicaciones sobre la diferenciación de micelio, se realizaron preparaciones de muestras de micelio crecido hasta las 48 y 72 h en YMG con 100 mM de glucosa y se observaron por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido. Mientras que el micelio de la cepa silvestre a las 48 h de crecimiento se encontró liso y aun no mostró segmentación, a ese mismo tiempo la mutante  $\Delta$ *sco2127* ya mostraba septación y engrosamiento de la pared previo a la generación de esporas. A las 72 h de crecimiento la cepa silvestre comenzó a mostrar segmentación del micelio, y redondeamientos de la pared celular, mientras que en la cepa mutante se aprecian claramente las esporas formadas.

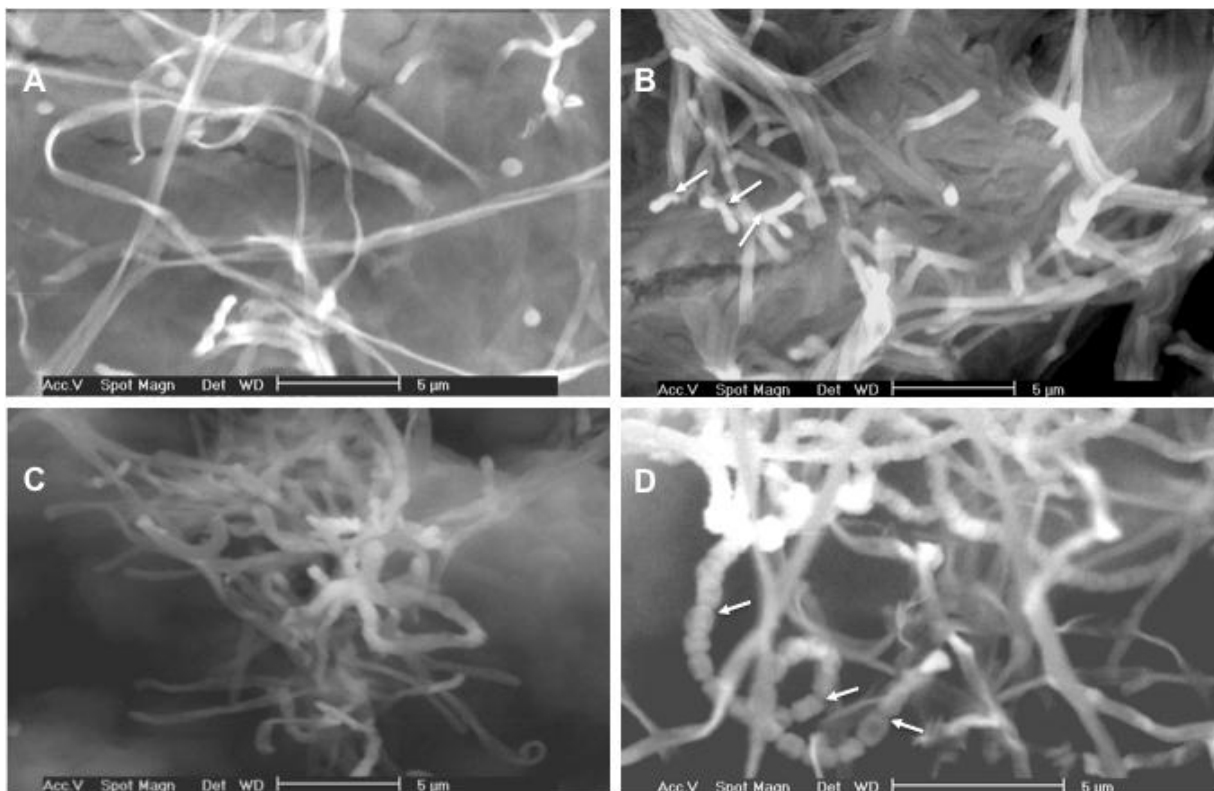


Fig. 22. Microfotografías electrónicas de barrido de *S. coelicolor* M145 (A and C) y la mutante  $\Delta$ *sco2127* (B and D). Micelio desarrollado a las 48 horas (A and B) y 72 horas (C and D) en medio sólido YMG conteniendo 100 mM de glucosa. La iniciación de micelio aéreo (B) y la septación de dicho micelio (D) son indicadas por flechas. La barra indican la escala de 5  $\mu$ m.



## DISCUSION

Estudios previos en nuestro laboratorio (Guzmán et al 2005) y otros laboratorios (Kwakman y Postma, 1994). Angell et al 1992) han sugerido la posible participación del producto del gen *sco2127* en la RCC de varias enzimas catabólicas y la formación de micelio aéreo en *S. coelicolor* (Chávez et al., 2011). Sin embargo, esta es la primera vez que dicho gen es deletado. De manera específica, se analiza el efecto de la delección sobre múltiples aspectos relacionados con la represión catabólica por glucosa.

Se encontró que la mutación no parece afectar el metabolismo general de la célula, ya que no se encontraron diferencias significativas en la biomasa producida por las dos cepas cuando se cultivan en un medio NMMP suplementado con M50, G50 y G100. El consumo de glucosa fue similar cuando ambas cepas fueron cultivadas en presencia de este carbohidrato y exhibió un patrón bifásico. Por lo tanto, se observó una fase temprana absorción activa, seguida por baja incorporación de carbohidratos. De acuerdo con la utilización de glucosa, un perfil similar en la producción Glk se observó en ambas cepas cultivadas en las concentraciones de glucosa empleadas.

El crecimiento de ambas cepas en los medios probados fue muy similar y fue claro que el mejor crecimiento se dió en glucosa y el más pobre en lactosa. Desde hace varios años se conoce que la glucosa es fuente preferencial de carbono en los estreptomicetos debido a su fácil transporte y metabolismo en comparación a otros carbohidratos.

En conclusión, se observó que la mutación no afectó el crecimiento del microorganismo y la mutante siguió metabolizando la glucosa, la lactosa y el manitol, viendose esto reflejado en la producción de biomasa. Parece que *sco2127* no es un gen imprescindible para el metabolismo de la glucosa ni para la jerarquización del consumo de fuentes de carbono alternas, ya que aun habiendo sido deletado, la cepa mutante consumió de manera eficiente la glucosa y el azúcar reprimió actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, cuando estaban presentes en el medio.

En todas las condiciones de crecimiento estudiadas, se encontró presente la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, tanto en la cepa mutante como en la silvestre, siendo mayores los valores de actividad encontrados en la condición L50 seguidos por los valores de actividad encontrados en la condición L50G100. A pesar de que en la cepa mutante siempre se encontró actividad levemente aumentada en comparación a la cepa silvestre, es claro que en medios con glucosa se observó represión de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa ejercida por la presencia de glucosa. Esto puede estar indicando que la mutación de *sco2127* no es suficiente para superar la represión ejercida por la glucosa.

En el presente trabajo se encontró que la producción actinorrodina fue suprimida fuertemente por la presencia de altas concentraciones de glucosa en la cepa silvestre de *S. coelicolor* crecida en medio R5A. Por el contrario, la biosíntesis de antibiótico por la mutante  $\Delta$ *sco2127* fue insensible a este efecto, lo cual apoya la contribución de *SCO2127* en el efecto supresor de glucosa en la producción de antibióticos. Aunque la undecilprogiosina no se determinó, esta no parece ser influenciada por la presencia de glucosa en la cepa M145 y en la mutante  $\Delta$ *sco2127*. Anteriormente, varios grupos de investigación han demostrado que la producción de undecilprogiosina no está influenciada por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Hobbs et al 1990; Kang et al 1998). La insensibilidad a la presencia de glucosa en la producción de actinorrodina por la mutante  $\Delta$ *sco2127* se observó también en un medio químicamente definido (NMMP). Teniendo en cuenta que ambas cepas exhibieron una producción de Glk similar, pero sólo la mutante mostró insensibilidad a la represión por glucosa, el papel de esta enzima en el mecanismo de supresión de actinorrodina no puede sostenerse. Esto es diferente de la función de Glk en la represión de glucosa reportado para agarasa y la producción de glicerol quinasa (Kwakman y Postma, 1994).





Análisis de la secuencia de aminoácidos de SCO2127 no sugiere la presencia de motivos de unión a ADN. Por lo tanto, el mecanismo para explicar el efecto de la glucosa sobre la producción actinorrodina probablemente implica la unión de SCO2127 a otra proteína (s). En nuestro laboratorio se encontró anteriormente que SCO2127 se une a SCO5113 (BldKB) y a SCO2582 (Chávez et al. 2011). BldKB es una lipoproteína de tipo ABC permeasa (aproximadamente 66 kDa) que participa en la diferenciación de micelio y probablemente también en la producción de actinorrodina (Meng et al, 2011).

En *Streptomyces lividans*, se ha reportado una proteína reguladora que participa en la RCC de la producción actinorrodina. En este microorganismo, la glucosa inhibe la producción de antibiótico mediante la represión de la síntesis de mRNA de *afsR2*, que codifica una proteína reguladora global implicada en la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kim et al. 2001). Como se esperaba, el efecto de represión no se observa cuando la glucosa es sustituida por glicerol en el medio de cultivo (Kim et al. 2001). Al igual que en *S. lividans*, este gen es necesario en *S. coelicolor* para la producción de actinorrodina. Utilizando electroforesis en gel de dos dimensiones, recientemente se ha demostrado que AfsR2 se une a SCO6569 que codifica para una proteína secretada de unión a solutos, lo que sugiere que esta proteína es un regulador río abajo dependiente de AfsR2 para la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* (Lee et al. 2009). En nuestro laboratorio, se ha intentado buscar interacciones o similitudes entre AfsR2 y SCO2127, ya sea para detectar la unión entre estas proteínas o para alinear sus secuencias de aminoácidos utilizando diferentes programas. Sin embargo, ni la unión entre SCO2127 y AfsR2 ha sido encontrada, ni identidad entre estas proteínas ha sido detectada cuando sus secuencias de aminoácidos fueron alineadas a través de diferentes programas (Clustal W, BI2seq, CLC Workbench, T-Coffee y Muscle). Por otra parte, tampoco se detectó homología entre *sco2127* y *sco6569* cuando sus secuencias de ADN fueron alineadas, lo que sugiere que SCO2127 es una nueva proteína que probablemente participa en la represión catabólica de la producción de actinorrodina.

Por medio de la observación morfológica se pudo apreciar que la glucosa retarda la diferenciación celular en la cepa silvestre pero esto no ocurre en la mutante  $\Delta$ *sco2127* de *S. coelicolor*. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Chouayekh et al. en el 2007, cuando aislaron y caracterizaron mutantes de *S. lividans* TK24, las cuales mostraron una disminución a la represión por glucosa sobre la expresión del gen de la alfa amilasa. Dicho gen, en condiciones normales esta fuertemente sujeto a represión por glucosa. En estas mutantes se encontró interrumpido el gen *sbIA*. Este gen parece codificar para fosfatasa de fosfatos de inositol. Al crecer dichas mutantes en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, éstas parecen esporular muchos más rápido que la cepa silvestre. Estas observaciones sugieren que a altas concentraciones de glucosa se retrasa el proceso de esporulación y que el gen *sbIA* parece jugar un papel importante en esta represión (Chouayekh et al., 2007)

Se cree que los productos de genes *bld*, pertenecientes a la cascada de señalización de diferenciación morfológica, específicamente el producto del gen *bldB*, interactue con la glucosa cinasa para dar lugar a la RCC (Pope et al., 1996). Además, ésta proteína (BldB) podría estar interactuando con otras proteínas tipo SCO2127. Mutantes *bld* han sido involucradas en las modificaciones de la glucosa cinasa, en respuesta a la disponibilidad de carbono en el medio, especialmente en la generación de señales específicas de detección de la glucosa.

Las evidencias obtenidas en el presente estudio esclarecen, que si bien el producto del gen *sco2127* no parecer tener un efecto directo sobre crecimiento, ni sobre la jerarquización de consumo de fuentes de carbono, ni sobre el metabolismo primario de *S. coelicolor*, sí posee un efecto regulatorio importante en la producción de actinorrodina y en la diferenciación morfológica cuando este microorganismo es crecido en glucosa como fuente de carbono. Son muchos los interrogantes que quedan por resolver acerca de la forma como lo hace y las condiciones generales de la célula que estimulan su acción.

## CONCLUSIONES

- El gen *sco2127* fue deletado del genoma de *S. coelicolor* M145
- Bajo las condiciones de crecimiento empleadas en el presente estudio, la mutación del gen *sco2127* no parece afectar el metabolismo general de la célula, ya que no se encontraron diferencias significativas en la biomasa producida por las dos cepas.
- El consumo de glucosa fue similar cuando ambas cepas fueron cultivadas en presencia de este carbohidrato y exhibió un patrón bifásico.
- Se observó un perfil similar de actividad de Glk en ambas cepas cultivadas en las concentraciones de glucosa empleadas.
- El gen *sco2127* no parece ser imprescindible para el metabolismo de la glucosa ni para la jerarquización del consumo de fuentes de carbono alternas. La mutación del mismo, no es suficiente para superar la represión ejercida por la glucosa sobre la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.
- La biosíntesis de actinorrodina en la mutante  $\Delta$ *sco2127* fue insensible al efecto represor de la glucosa lo cual apoya la contribución de *SCO2127* en el efecto supresor de glucosa en la producción de antibióticos
- La diferenciación morfológica en la mutante  $\Delta$ *sco2127* no es afectada por el efecto retardante de la glucosa observado en la cepa *S. coelicolor* M145.

Es mucho lo que aún se desconoce de la participación de *sco2127* en la RCC en *S. coelicolor*. Este estudio es tan solo una aproximación que brinda elementos que pueden ser puntos de partida para futuros estudios.

## PERSPECTIVAS

- Generación de mutantes en zonas específicas del gen para detectar que lugares son estratégicamente importantes para su función.
- Analizar por medio de la técnica de microarreglos la expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios y diferenciación en la mutante  $\Delta$ *sco2127*, bajo diversas condiciones nutrimentales.
- Mutación de genes homólogos a *sco2127* en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y comparación de su fenotipo con las mutantes Dog<sup>R</sup>
- Cuantificación de otros metabolitos secundarios (ej. Undecilprodigiosina y antibiótico dependiente de calcio) producidos por la cepa silvestre de **S. coelicolor** y por la mutante  $\Delta$ *sco2127*
- Generación de anticuerpos monoclonales anti-*sco2127* que permitan realizar estudios de tipo inmunohistoquímico.



## REFERENCIAS

Angell S, Schwartz E & Bibb JM (1992) The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833–2844.

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, Rabinowitsch 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). *Nature* 417: 141-147.

Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J. Antibiot.* 58: 1-26

Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothhaft H, Saier M & Titgemeyer F (2004) *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186: 1362-1373.

Bettenbrock K, Sauter T, Jahreis K, Kremling A, Lengeler JW & Gilles ED (2007). Correlation between growth rates, EIICrr phosphorylation, an intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 189: 6891-6900.

Borodina I, Siebring J, Zhang J, Smith C, van Keulen G, Dijkhuizen L, Nielsen J (2008) Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mediated by phosphokinase deletion. *J. Biol. Chem.* 283: 25186-25199

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

Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TJ, Galinier A & Bibb MJ (1999) Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 279-288.

Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA & Dijkhuizen L (1996) Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 178: 2238-2244.

Chávez A, Forero A, Sánchez M, Rodríguez-Sanoja, R, Mendoza-Hernández G, Servín-Gonzalez L, Sánchez B, García-Huante Y, Rocha D, Langley E, Ruiz B & Sánchez S. (2011). Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 799-806.

Choi SU, Lee CK, Hwang YI, Kinoshita H, Nihira T (2004) Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B1 producer, *Arch. Microbiol.* 181: 294-298.

Chouayekh H, Nothaft H, Delaunay S, Linder M, Payrastra B, Seghezzi N, Titgemeyer F, Virolle MJ (2007) Phosphoinositides are involved in control of the glucose-dependent growth resumption that follows the transition phase in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 189: 741-749

Coisne S, Béchet M & Blondeau R (1999) Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media. *Lett. in Appl. Microbiol.* 28: 199-202.

Court DA, Sawitzke JA & Thomason LC (2002) Genetic engineering using homologous recombination. *Ann. Rev. Genet.* 36: 361-388.

Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 6640-6645

Demain AL & Sanchez S (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* 62: 5-15.

Derouaux A, Dehareng D, Lecocq E, Halici S, Nothaft H, Giannotta F, Moutzourelis G, Dusart J, Devreese B, Titgemeyer F, Beeumen JV & Rigali S (2004) Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind AMPc. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 325: 983-990.

Eckhardt T, Strickler J, Gorniak L, Burnett W, Fare R (1987) Characterization of the promoter signal sequence and amino terminus of a secreted  $\beta$ -galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 169: 4249-4256.

Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E & Sánchez S (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 572-578.

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

Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer MC, Deutscher J & Haiech J (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1823-1828.

Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1541-1546.

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

Hanson KG, Steinhauer K, Reizer J, Hillen W & Stülke J (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*, 148: 1805-1811.

Henkin TM (1996) The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.

Hindle Z & Smith P (1994) Substrate induction and catabolite repression on the *Streptomyces coelicolor* glycerol operón are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12:737-745.

Hobbs G, Frazer CM, Gardner CJ, Flett F & Oliver SG (1990). Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) : kinetics and the influence of nutrients *J. Gen. Microbiol.* 136: 2291-2296.

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

Hopwood DA (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology*, 145(9):2183-202.

Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ & Chater KF (1984) Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.

Im JH, Lee MJ, Lee SY & Kim ES (2009) A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Biochem.* 44: 373-377.



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

Kang SG, Jin W, Bibb M & Lee KJ (1988) Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 221-226.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.

Kim ES, Hong H, Choi CY & Cohen SN (2001): Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *J. Bacteriol.* 183: 2198-2203.

Kwakman JH & Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176: 2694-2698.

Kim JH & Chamblis GH (1997) Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and *amyO* target site. *Nucleic. Acid. Res.* 25: 3490-3496.

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

Lal R, Kumari R, Kaur H, Khanna R, Dhingra N & Tuteja D (2000) Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type-I PKSs. *Trends Biotechnol.* 18: 264-274.

Langley E, Mascareñas N, Ruíz B & Sánchez S (2004) *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase. NCBI Gen bank nucleotide. gi: 50263005.

Lee HN, Im JH, Lee MJ, Lee SY & Kim ES (2009) A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Process Biochem.* 44: 373-377.

Mac Neil D (1988) Characterization of unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5607-5612.

Mahr K, Wezel G, Svensson C, Kregel U, Bibb M & Titgemeyer F (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large purification and biochemical analysis. *Anton. van Leeuwen.* 78: 253-261.

Malpartida F & Hopwood DA (1996) Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet. MGG.* 205: 66-73.

Mellouli L, Karray-Rebai I & Bejar S (2002) Construction of  $\alpha$ -amylase-producing strains not subject to carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 157-162.

Meng L, Yang SH, Palaniyandi SA, Lee SK, Lee IA, Kim TJ & Suh JW (2011) Phosphoprotein affinity purification identifies proteins involved in S-adenosyl-L-methionine-induced enhancement of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Antibiot.* 64: 97-101.

Nguyen J, Francois F, Virolle M & Guérineau M (1997) Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *reg1*, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* 179: 6383-6390.

Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M & Titgemeyer F (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185: 7019-7023.

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

Parche S, Nothaft H, Kamionka A & Titgemeyer F (2000) Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Anton. van Leeuwen.* 78: 243-251.

Pinzón Pinto A (2010) Edafología. Bogotá Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Pope M, Green B & Westpheling J (1996) The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signaling. *Mol. Microbiol.* 19: 747-756.

Postma W, Lengeler JW & Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.

Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imiriskova I, Rodríguez Sanoja R, Sánchez S & Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var *caesius*. *Res. Microbiol.* 155: 267-274.

Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier M & Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molec. Microbiol.* 27: 1157-1169.

Repizo G, Blancato V, Sender P, Lolkema J & Magni C (2006) Catabolite repression of the *cisST* two-component system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 224-231.

Rigali S, Nothaft H, Noens E, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten H, Hopwood D, Titgemeyer F & van Wezel G (2006) The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molec. Microb.* 61: 1237-1251.

Rigali S, Schlicht M, Hoskisson P, Nothaft H, Merzbacher M, Joris B & Titgemeyer F (2004) Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships. *Nucleic Acids Res.* 32:3418-3426.

Saier MH & Reizer J (1992) Proposed uniform nomenclature of the proteins and proteins domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system based on structural, evolutionary and functional considerations. *J. Bacteriol.* 174: 1433-1438.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (third edition). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp A3.6–A3.10.

Sanchez S & Demain AL (2011) Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org. Proc. Res. Dev.* 15: 224-230.

Segura D, González R, Rodríguez R, Sandoval T, Escalante L & Sánchez, S (1996) *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4: 30–36.

Stülke J & Hillen W (1998) Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85: 583-592.



Stülke J & Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 195-201.

Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A & Saier MH Jr. (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140: 2349.

Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuver MH, Cui X & Saier MH Jr. (1995) Identification y characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology*, 141:51-58.

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

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

van Wezel G, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomane A, Bibb M & Titgemeyer F (2007) A new piece of an old Jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 67-74.

Warner J & Lolkema J (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 475-490.



## **ANEXOS**

### **Metodología PCR targeting®**

### **Publicaciones**

## PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Bertolt Gust, Tobias Kieser and Keith Chater, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR47UH, UK, Tel: +44 (0)1603 452751 Fax: +44 (0)1603 456844

### Introduction

Many bacteria are not readily transformable with linear DNA because of the presence of the intracellular *recBCD* exonuclease that degrades linear DNA. However, the  $\lambda$  RED (*gam*, *bet*, *exo*) functions promote a greatly enhanced rate of recombination when using linear DNA. By exploiting this, Datsenko and Wanner (2000) made 40 different disruptions on the *E. coli* chromosome by replacing the wild-type sequences with a selectable marker generated by PCR using primers with 36 nt homology extensions.

The strategy for PCR-targeting for mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* is to replace a chromosomal sequence within a *S. coelicolor* cosmid (Redenbach *et al.*, 1996) by a selectable marker that has been generated by PCR using primers with 39 nt homology extensions. The inclusion of *oriT* (RK2) in the disruption cassette allows conjugation to be used to introduce the PCR targeted cosmid DNA into *S. coelicolor*. Conjugation is much more efficient than transformation of protoplasts and it is readily applicable to many actinomycetes (Matsushima *et al.*, 1994). The potent methyl-specific restriction system of *S. coelicolor* is circumvented by passaging DNA through a methylation-deficient *E. coli* host such as ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992). Vectors containing *oriT* (RK2; Pansegrau *et al.*, 1994) are mobilisable *in trans* in *E. coli* by the self-transmissible pUB307 (Bennett *et al.*, 1977, Flett *et al.*, 1997) or the non-transmissible pUZ8002, which lacks a *cis*-acting function for its own transfer (Kieser *et al.*, 2000).

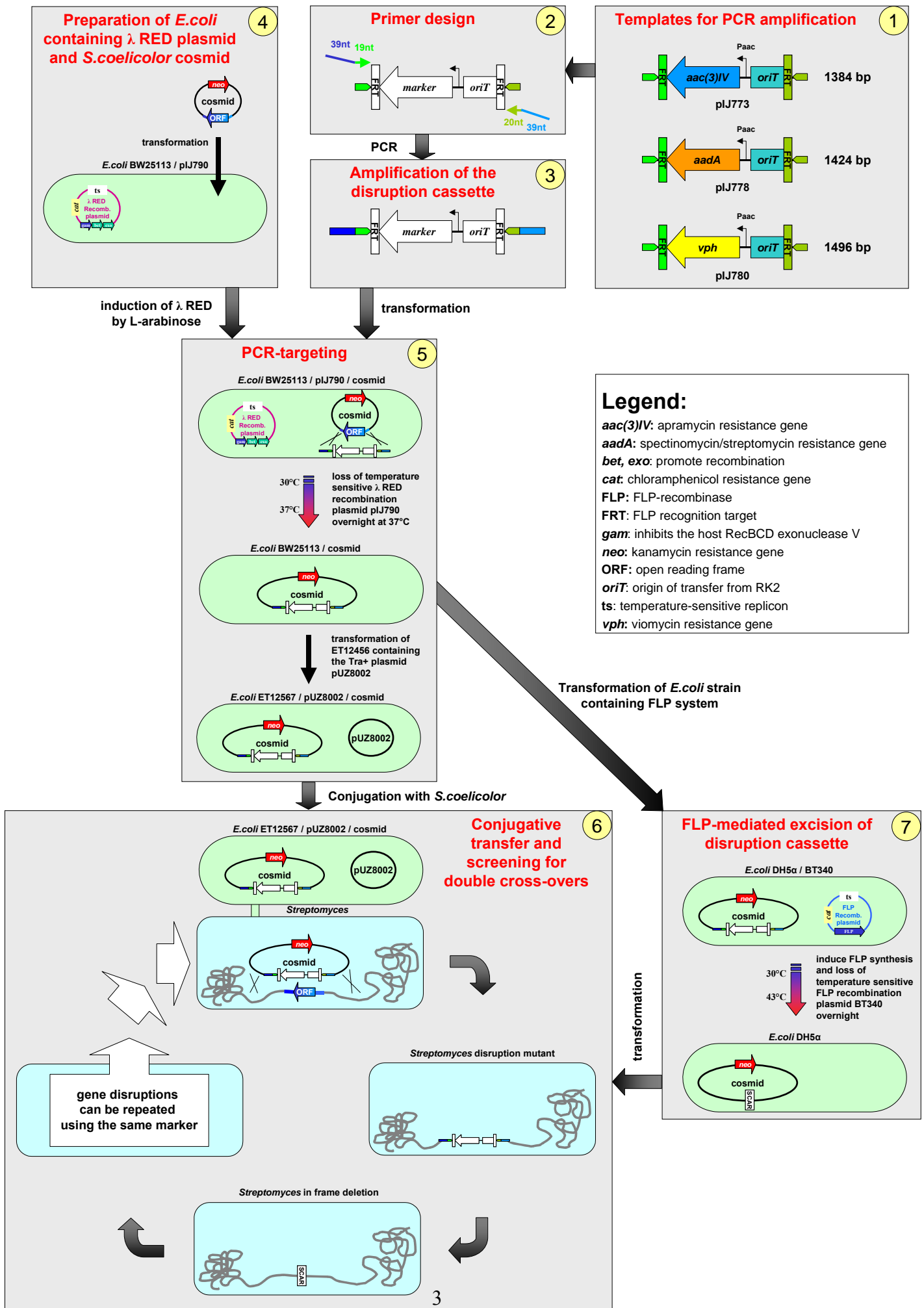
To adapt the procedure of  $\lambda$  RED mediated recombination for *Streptomyces*, cassettes for gene disruptions were constructed that can be selected both in *E. coli* and in *Streptomyces* (Table 1). After a single disruption with an *oriT*-containing cassette, further disruptions can be performed on the same cosmid using *oriT*-free cassettes containing alternative selective markers. The  $\lambda$  RED recombination plasmid pKD20

(*E. coli* Genetic Stock Center CGSC Strain # 7637) was modified by replacing the ampicillin resistance gene *bla* with the chloramphenicol resistance gene *cat*, generating pIJ790, to permit selection in the presence of Supercos1-derived cosmids (ampicillin and kanamycin resistance).

Name of plasmid	Resistance-marker	Resistance	Concentration for <i>E. coli</i>	<i>oriT</i>	Size of template
pIJ773 Fig. 5	<i>aac(3)IV</i>	apramycin	50 µg/ml LB	+	1382 bp
pIJ778 Fig. 6	<i>aadA</i>	spectinomycin streptomycin	50 µg/ml LB 50 µg/m LB	+	1425 bp
pIJ779.	<i>aadA</i>	spectinomycin- streptomycin	50 µg/ml LB 50 µg/ml LB	-	1057 bp
pIJ780 Fig.7	<i>vph</i>	viomycin	30 µg/ml DNA	+	1497 bp
pIJ781	<i>vph</i>	viomycin	30 µg/ml DNA	-	1622 bp

**Table 1:** Disruption cassettes containing different resistance markers with and without *oriT*: All disruption cassettes were cloned into the *EcoRV* site of pBluescript SK II (+) allowing the isolation of a *EcoRI/HindIII* fragment for use as template for the PCR reaction. The size of the cassettes includes the 19 bp and 20 bp primer site (see section 2: “primer design”) which are identical in all disruption cassettes. The resistance genes with or without *oriT* are flanked by FRT sites (FLP recognition targets) which allows FLP-mediated excision of the cassette (see section 7: “FLP-mediated excision of the disruption cassette”).

# Fig. 1: Flowchart of gene disruption by PCR-targeting



## Protocol (see Flowchart Fig. 1)

1

### Purification of the PCR template (resistance (-*oriT*) cassette)

Using whole plasmids as templates for the PCR can result in a high proportion of antibiotic-resistant transformants without gene disruption. This is caused by traces of CCC DNA that compete with the linear PCR fragment and result in the occurrence of false positive transformants. Using gel-purified disruption cassettes as templates prevents the occurrence of false positives.

1. Digest ~ 10 µg plasmid DNA (see Table 1) with 50 U *EcoRI* (Roche) and 50 U *HindIII* (Roche) in 1 X buffer B (Roche) in a 100 µl reaction.
  - A 2938 bp vector fragment and a fragment 14 bp larger than the size of the cassette given in Table 1 should be generated.
2. Run the digest on a 20 x 20 x 0.25 cm (100 ml) 1% TAE (1x) agarose gel at 5V/cm for 2 - 3 h in 1x TAE buffer.
  - Longer runs exhaust the buffer capacity and destroy the gel unless the buffer is recycled.
3. Cut out the cassette band from the gel and purify using the Qiagen gel extraction kit. The purified fragment is stored in 10 mM Tris.HCl (pH 8) at a concentration of 100 ng / µl at -20°C.
4. Absence of plasmid DNA is tested by using 1µl (100 ng) of purified cassette DNA to transform highly competent *E. coli* DH5α cells (10<sup>8</sup>/µg). Plate on LB agar containing 100 µg/ml carbenicillin. If any transformants appear, repeat steps 2-4.

**2****Design of long PCR primers**

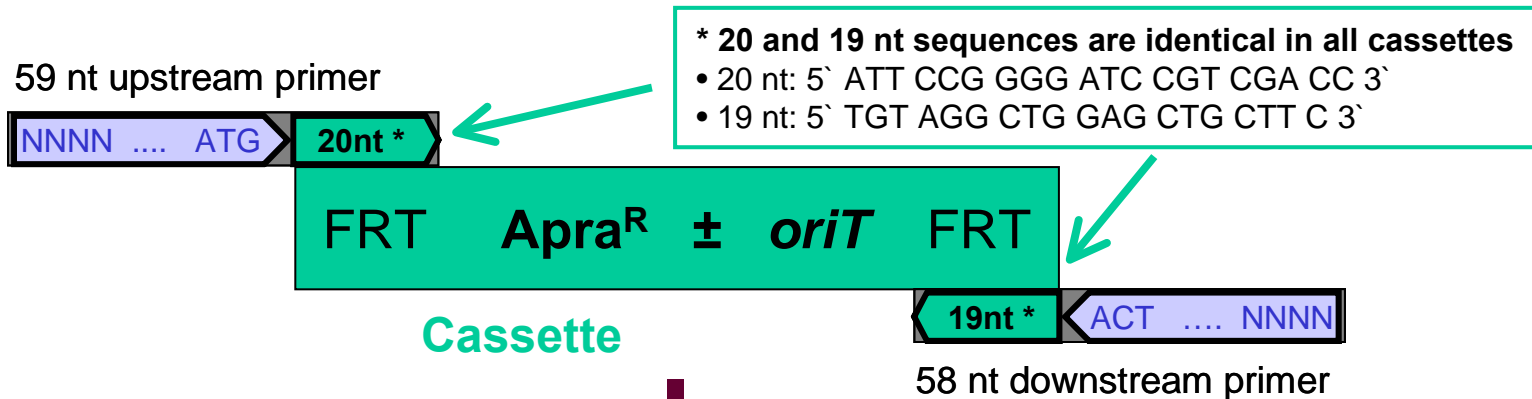
For each gene disruption, two long PCR primers (58 nt and 59 nt) are required. Each has at the 5' end 39 nt matching the *S. coelicolor* sequence adjacent to the gene to be inactivated, and a 3' sequence (19 nt or 20 nt) matching the right or left end of the disruption cassette (all cassettes have the same "right" and "left" ends). The precise positioning of the 39 nt sequence as indicated in Fig. 2 is important for creating in-frame deletions by FLP recombinase-induced excision of the resistance marker (see section 7).

- The 5'- 39 nt sequence of the forward primer (upstream primer; Fig. 2) must be from the coding strand of the gene of interest and its 3' end must be in the correct reading frame with respect to the replaced gene. The 5'- 39 nt sequence of the reverse primer (downstream primer; Fig. 2) must be from the *complementary* strand.
- To prevent unwanted recombination, a BlastN search is performed comparing each 39 nt sequence with the "real cosmid" (sequences at the Sanger Centre Homepage in the folder [ftp.sanger.ac.uk/pub/S\\_coelicolor/cosmid\\_inserts](ftp.sanger.ac.uk/pub/S_coelicolor/cosmid_inserts) and on the CD in the folder /S\_coelicolor/cosmid inserts). The perfect match should be found but no other matches >30 bp. If necessary, the 39 nt sequence is shifted in 3 nt steps until the above criteria are met.

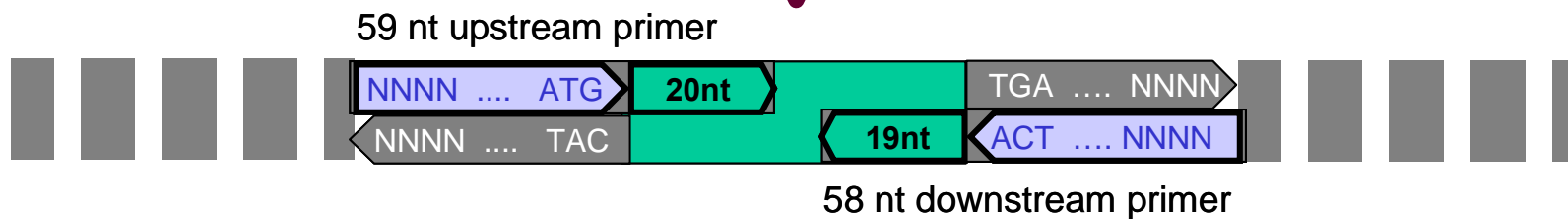
# Fig.2: Designing PCR primers for making an *in-frame* deletion (the example illustrates a complete deletion)

39 nt from sense strand ending in ATG or GTG start codon  
If sequence with >30 matches occurs in cosmid clone,  
move → 3n nt to maintain frame

39 nt from anti-sense strand ending in Stop codon  
← move -3n nt if necessary



**FLP recombinase (BT340)**



**81 bp scar**

(20bp + 19bp priming sequence + 42bp FLP core recombination site (see Fig.3); no in frame STOP)



**3**

**PCR amplification of the extended resistance cassette**

All PCR amplifications are performed using the Expand high fidelity PCR system according to the manufacturer’s instructions (Roche). Reaction conditions:

- Primers (100 pmoles/μl)                      0.5 μl each      50 pmoles each
- Template DNA (100 ng/μl)                0.5 μl            50 ng ≈ 0.06 pmoles
- Buffer (10x)                                    5 μl                1 x
- dNTPs (10 mM)                              1 μl each        50 μM each
- DMSO (100 %)                                2.5 μl            5%
- DNA polymerase (2.5 U/μl)               1 μl               2.5 Units
- Water    36 μl
- Total volume                                  50 μl

Cycle conditions:

- 1. Denaturation:      94°C, 2 min
  - 2. Denaturation:      94°C, 45 sec
  - 3. Primer annealing: **50°C**, 45 sec
  - 4. Extension:            72°C, 90 sec
  - 5. Denaturation:      94°C, 45 sec
  - 6. Primer annealing: **55°C**, 45 sec
  - 7. Extension:            72°C, 90 sec
  - 8. Final extension:    72°C, 5 min
- } 10 cycles
- } 15 cycles

5 μl of the PCR product is used for analysis by gel electrophoresis. The expected sizes are 78 bp larger than the sizes of the disruption cassettes listed in Table 1 (because of the 2 x 39 bp 5’-primer extensions). The remaining 45 μl of the PCR product is purified using the Qiagen PCR purification kit according to the manufacturer’s instructions. The PCR product is finally eluted from the columns with 12 μl of water (~200 ng/μl).

**4****Introduction of *S. coelicolor* cosmid clone into *E. coli* BW25113/pIJ790 ( $\lambda$  RED recombination plasmid) by electroporation**

pIJ790 contains the resistance marker *cat* (chloramphenicol resistance) and a temperature sensitive origin of replication (requires 30°C for replication).

1. Grow *E. coli* BW25113/pIJ790 overnight at 30°C in 10 ml LB (Luria-Bertani medium; Sambrook *et al.*, 1998) containing chloramphenicol (25 µg/ml).
2. Inoculate 100 µl *E. coli* BW25113/pIJ790 from overnight culture in 10 ml SOB (Hanahan, 1983) containing 20 mM MgSO<sub>4</sub> (add 200 µl of 1M stock to 10 ml SOB) and chloramphenicol (25 µg/ml).
3. Grow for 3-4 h at 30°C shaking at 200 rpm to an OD<sub>600</sub> of ~ 0.4.
4. Recover the cells by centrifugation at 4000 rpm for 5 min at 4°C in a Sorvall GS3 rotor (or equivalent).
5. Decant medium and resuspend the pellet by gentle mixing in 10 ml ice-cold 10 % glycerol.
6. Centrifuge as above and resuspend pellet in 5 ml ice-cold 10 % glycerol, centrifuge and decant. Resuspend the cell pellet in the remaining ~ 100 µl 10 % glycerol.
7. Mix 50 µl cell suspension with ~ 100 ng (1-2 µl) of cosmid DNA. Carry out electroporation in a 0.2 cm ice-cold electroporation cuvette using a BioRad GenePulser II set to: 200 Ω, 25 µF and 2,5 kV. The expected time constant is 4.5 – 4.9 ms.
8. Immediately add 1 ml ice cold LB to shocked cells and incubate shaking for 1h at 30°C.
9. Spread onto LB agar containing carbenicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml).
10. Incubate overnight at 30°C.
11. Transfer one isolated colony into 5 ml LB containing antibiotics as in (9) above.
12. Incubate overnight at 30°C. This culture will be used as a pre-culture for generating competent cells to be transformed with the extended resistance cassette.

## 5

PCR targeting of the *S. coelicolor* cosmid

*E. coli* BW25113/pIJ790 containing a *S. coelicolor* cosmid is electro-transformed with the extended resistance cassette. **The example described uses the apramycin – *oriT* disruption cassette from pIJ773.** Table 1 lists alternative cassettes and their resistance determinants.

1. Inoculate a 10 ml SOB (*without* MgSO<sub>4</sub>) culture containing carbenicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml) with 1% of the overnight culture of *E. coli* BW25113/pIJ790 and the *S. coelicolor* cosmid. Add 100 µl 1M L-arabinose stock solution (final concentration is 10 mM, induces *red* genes).
2. Grow for 3-4 h at 30°C shaking at 200 rpm to an OD<sub>600</sub> of ~ 0.4.
3. Recover the cells by centrifugation at 4000 rpm for 5 min at 4°C in a Sorvall GS3 rotor (or equivalent).
4. Decant medium and resuspend the pellet by gentle mixing in 10 ml ice-cold 10% glycerol.
5. Centrifuge as above and resuspend pellet in 5 ml ice-cold 10 % glycerol, centrifuge and decant. Resuspend the cell pellet in remaining ~ 100 µl 10 % glycerol.
6. Mix 50 µl cell suspension with ~ 100 ng (1-2 µl) of PCR product. Carry out electroporation in a 0.2 cm ice-cold electroporation cuvette using a BioRad GenePulser II set to: 200 Ω, 25 µF and 2,5 kV. The expected time constant is 4.5 – 4.9 ms.
7. Immediately add 1 ml ice cold LB to shocked cells and incubated shaking 1 h at 37°C (or 30°C if further gene disruptions will be made on the same cosmid; see below).
8. Spread onto LB agar containing carbenicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and apramycin (50 µg/ml). If no further gene disruptions will be made on this cosmid, incubate overnight at 37°C to promote the loss of pIJ790. (If further disruptions are planned propagate overnight at 30°C and include chloramphenicol (25 µg/ml) so that pIJ790 is retained).

- If no colonies are obtained after 16 h growth at 37°C, repeat the experiment starting with a 50 ml SOB culture instead of 10 ml culture for generating electrocompetent cells. Try to concentrate the cells as much as possible by removing all of the remaining 10% glycerol. Resuspend the cell pellet in 50 µl 10% glycerol and use for electroporation.
- After 12 – 16 h growth at 37°C different colony-sizes are observed. Cultivating for longer time results in an increased background of small colonies, which are false positives. It is important to note that at this stage wild-type and mutant cosmids exist within one cell. The transformation with a PCR product and its integration in the cosmid DNA by homologous recombination will not occur in all copies of the cosmid molecules in one cell. One copy of a cosmid containing the incoming resistance marker is sufficient for resistance to this antibiotic. Normally, the larger the size of a colony, the more copies of mutagenised cosmids are present. Inoculating a large colony in 5 ml LB liquid cultures containing carbenicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and apramycin (50 µg/ml) result in a growth at 37°C to a cell density ( $OD_{600} \sim 0.1 - 0.3$ ) within 3-4 h (*E. coli* BW25113 without pIJ790 grows very fast). After 6 h plasmid DNA can be isolated and tested by restriction analysis and/or PCR using the primers described below.
- PCR analysis with a primer pair (test primers) priming just ~ 100 bp outside the region affected by homologous recombination will generate the expected fragment after gene disruption, but will usually also generate the wild-type fragment, caused by remaining wild-type copies within the same transformant. These will be lost during the subsequent transformation step into the methylation-deficient *E. coli* host ET12567 containing the non-transmissible plasmid pUZ8002 (this is not a problem anyway because wild-type copies lack the *oriT*).
- Notes on viomycin selection: selecting for viomycin<sup>R</sup> depends critically on the amount of salt in the medium; more viomycin is required at higher salt concentrations. For a clean selection of *E. coli* clones, use DNA agar or 2xYT agar containing 30 µg/ml viomycin (see Kieser *et al.*, 2000).

For multiple gene replacements, choose an *oriT*-containing disruption cassette for the first knock-out, and a cassette without *oriT* and different resistance markers for further gene disruptions.

The gene disruption is confirmed by restriction analysis and/or PCR. Cosmid DNA of transformants is isolated from a 6 h, 37°C, 5 ml LB culture containing carbenicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) and apramycin (50 µg/ml). Alkaline lysis followed by phenol/chloroform extraction produces cosmid DNA suitable for restriction analysis.

### **Cosmid CCC DNA isolation**

1. Resuspend the cell pellet from 1 ml culture by vortexing in 100 µl solution I (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA).
2. Immediately add 200 µl solution II (200 mM NaOH; 1% SDS) and mix by inverting the tubes 10x.
3. Immediately add 150 µl solution III (3 M potassium acetate, pH 5.5) and mix by inverting the tubes 5x.
4. Spin at full speed in a microcentrifuge for 5 min at room temperature.
5. Immediately extract supernatant with 400 µl phenol/chloroform, vortex 2 min and spin at full speed in a micro centrifuge for 5 min.
6. Transfer the upper phase and add 600 µl 2-propanol. Leave the tubes on ice for 10 min.
7. Spin as above and wash the pellet with 200 µl 70% ethanol.
8. Spin as above and leave the tube open for 5 min at room temperature to dry the pellet. Resuspend the pellet in 50 µl 10mM Tris/HCl (pH 8) and use 10 µl for restriction digest.
  - **Omitting the phenol/chloroform extraction step results in degradation of the cosmid DNA. Use of miniprep-columns without including a phenol/chloroform extraction is not recommended.**

Verification of positive transformants by PCR requires an additional pair of 18 – 20 nt test primers which anneal 100 – 200 bp upstream and downstream of the 39 bp recombination region. (These primers can also be used later to verify the FLP-mediated excision of the resistance cassette.)

• Primers (100 pmoles/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l each	20 pmoles each
• Template DNA (~50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	50 ng
• Buffer (10x)	5 $\mu$ l	1 x
• dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l each	50 $\mu$ M each
• DMSO (100 %)	2.5 $\mu$ l	5%
• DNA polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	2.5 Units
• Water	36.1 $\mu$ l	
• Total volume	50 $\mu$ l	

Cycle conditions:

1. Denaturation:	94°C, 2 min	} 30 cycles
2. Denaturation:	94°C, 45 sec	
3. Primer annealing:	55°C, 45 sec	
4. Extension:	72°C, 90 sec	
5. Final extension:	72°C, 5 min	

5  $\mu$ l of the PCR product is used for gel electrophoresis.

## 6

Transfer of the mutant cosmids into *Streptomyces*

If the target *Streptomyces* for mutagenesis carries a methyl-sensing restriction system (as is the case for *S. coelicolor* and *S. avermitilis*), it is necessary to passage the cosmid containing an apramycin resistance-*oriT* cassette through a non-methylating *E. coli* host. To achieve this, it is introduced by transformation into the non-methylating *E. coli* ET12567 containing the RP4 derivative pUZ8002. The cosmid is then transferred to *Streptomyces* by intergeneric conjugation (see Table 2 for resistance markers). If the target *Streptomyces* for mutagenesis does **not** carry a methyl-sensing restriction system (as is the case for *S. lividans*), common *E. coli* strains such as DH5 $\alpha$  containing pUZ8002 can be used instead.

Description	Name	Replication	Carb <sup>R</sup>	Cml <sup>R</sup>	Kan <sup>R</sup>	Tet <sup>R</sup>
<i>S. coelicolor</i> cosmid clones	Supercos 1		Carb <sup>R</sup>		Kan <sup>R</sup>	
$\lambda$ Red plasmid	pIJ790	t <sup>s</sup>		Cml <sup>R</sup>		
FLP recombinase plasmid	BT340	t <sup>s</sup>	Carb <sup>R</sup>	Cml <sup>R</sup>		
OriT <sup>-</sup> RP4 derivative	pUZ8002				Kan <sup>R</sup>	
OriT <sup>+</sup> RP4 derivative	pUB307				Kan <sup>R</sup>	
Non-methylating <i>E. coli</i>	ET12567			Cml <sup>R</sup>		Tet <sup>R</sup>

**Table 2.** Resistance markers of vectors, helper plasmids and strains (carbenicillin resistance (Carb<sup>R</sup>), chloramphenicol resistance (Cml<sup>R</sup>), kanamycin resistance (Kan<sup>R</sup>), tetracycline resistance (Tet<sup>R</sup>), temperature sensitive replicon (t<sup>s</sup>)). See Table 1 for replacement cassettes.

1. Prepare competent cells of *E. coli* ET12567/pUZ8002 grown at 37°C in LB containing kanamycin (25  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml) to maintain selection for pUZ8002 and the *dam* mutation, respectively. (ET12567 has a doubling time > 30 min.)
  - **High competence is required when Dam-methylated plasmids are introduced into a *dam*<sup>-</sup> strain.**
2. Transform competent cells with the *oriT*-containing cosmid clone, and select for the incoming plasmid only using apramycin (50  $\mu$ g/ml) and carbenicillin (100  $\mu$ g/ml).



3. Inoculate a colony into 10 ml LB containing apramycin (50 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml) and kanamycin (50 µg/ml). Grow overnight at 37°C.
  - **Chloramphenicol<sup>S</sup> or Kanamycin<sup>S</sup> segregants arise frequently among transformants, so set up more than one culture. The kanamycin selection is probably ineffective because both the cosmid and pUZ8002 confer resistance (Table 2).**
4. Inoculate 100 µl overnight culture into 10 ml fresh LB plus antibiotics as above and grow for ~ 4 h at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.4.
5. Wash the cells twice with 10 ml of LB to remove antibiotics that might inhibit *Streptomyces*, and resuspend in 1 ml of LB.
6. While washing the *E. coli* cells, for each conjugation add 10 µl (10<sup>8</sup>) *Streptomyces* spores to 500 µl 2 × YT broth. Heat shock at 50°C for 10 min, then allow to cool.
7. Mix 0.5 ml *E. coli* cell suspension and 0.5 ml heat-shocked spores and spin briefly. Pour off most of the supernatant, then resuspend the pellet in the c. 50 µl residual liquid.
8. Make a dilution series from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-4</sup> each step in a total of 100 µl of water.
9. Plate out 100 µl of each dilution on MS agar + 10mM MgCl<sub>2</sub> (without antibiotics) and incubate at 30°C for 16-20 h.
10. Overlay the plate with 1 ml water containing 0.5 mg nalidixic acid (20 µl of 25 mg/ml stock; selectively kills *E. coli*) and 1.25 mg apramycin (25 µl of 50 mg/ml stock). Use a spreader to lightly distribute the antibiotic solution evenly. Continue incubation at 30°C.
11. Replica-plate each MS agar plate with single colonies onto DNA plates containing nalidixic acid (25 µg/ml) and apramycin (50 µg/ml) with and without kanamycin (50 µg/ml). Double cross-over exconjugants are kanamycin<sup>S</sup> and apramycin<sup>R</sup>. (DNA gives fast, non-sporulating growth.)
12. Kanamycin<sup>S</sup> clones are picked from the DNA plates and streaked for single colonies on MS agar (promotes sporulation) containing nalidixic acid (25 µg/ml) and apramycin (50 µg/ml).
13. Confirm kanamycin sensitivity by replica-plating onto DNA plates containing nalidixic acid (25 µg/ml) with and without kanamycin (50 µg/ml).
14. Purified kanamycin sensitive strains are then verified by PCR and Southern blot analysis.

- Typically, ~ 10 % of the exconjugants are double cross-over recombinants. The frequency of double cross-overs depends on the length of the flanking regions of homologous DNA on the cosmid. If < 1 kb is left on one side of the disrupted gene, obtaining kanamycin<sup>S</sup> double cross-over types directly on the conjugation plates may be difficult. It may be necessary to streak out several exconjugants for single colonies on MS agar without antibiotics. After 3-5 days growth replica-plate onto DNA with and without kanamycin.

Antibiotic	Stock mg/ml	µl for 1 ml overlay	Final conc. after flooding µg/ml	Concentration in	
				MS, DNA µg/ml	R2YE µg/ml
Apramycin	50	25	50	50	50
Kanamycin	50	100	200	50	200
Spectinomycin	200	25	200	400	400
Streptomycin	10	25	10	10	10
Viomycin	30	25	30	30	NA
Nalidixic acid	25 in 0.3 M NaOH	20	20	25	25

**Table 3:** Antibiotic concentrations for selection on *S. coelicolor* MS conjugation plates, DNA replica plates or R2YE protoplast regeneration plates (Note some small differences from Kieser *et al.*, 2000).

## 7

## FLP-mediated excision of the disruption cassette

The disruption cassettes are flanked by FRT sites (FLP recognition targets). Expression of the FLP-recombinase in *E. coli* removes the central part of the disruption cassette, leaving behind a 81 bp “scar” sequence which, in the preferred reading frame (bold in Fig. 3), lacks stop codons.

I	P	G	I	R	R	P	A	V	R	S	S	Y	S	L	E	S	I	G	T	S	K	Q	L	Q	P	T
F	R	G	S	V	D	L	Q	F	E	V	P	I	L	*	K	V	*	E	L	R	S	S	S	S	L	
S	G	D	P	S	T	C	S	S	K	F	L	F	S	R	K	Y	R	N	F	E	A	A	P	A	Y	
<u>ATTCGGGGATCCGTCGACCT</u> GCAGTTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACCTCGAAGCAGCTCCAGCCTACA																										
	10		20		30		40		50		60		70		80											
TAAGCCCCCTAGGCAGCTGGACGTCAAGCTTCAAGGATAAGAGATCTTTCATATCCTTGAAG	<u>CTTCGTCGAGGTCGGATGT</u>																									
N	R	P	D	T	S	R	C	N	S	T	G	I	R	*	F	T	Y	S	S	R	L	L	E	L	R	C
G	P	I	R	R	G	A	T	R	L	E	*	E	R	S	L	I	P	V	E	F	C	S	W	G	V	
E	P	S	G	D	V	Q	L	E	F	N	R	N	E	L	F	Y	L	F	K	S	A	A	G	A	*	

**Fig. 3:** Sequence of the 81 bp “scar” sequence remaining after FLP-mediated excision of the disruption cassette. The translation of the preferred reading frame is printed bold. The 20 and 19 nt priming sites are underlined and printed in colour. (Fig. 2 explains the determination of the reading frame.)

★ indicate stop codons,

priming site (20 nt)

priming site (19 nt)

This allows the generation of (hopefully) non-polar, unmarked in-frame deletions and repeated use of the same resistance marker for making multiple knock-outs in the same cosmid or in the same strain. *E. coli* DH5 $\alpha$  cells containing the temperature sensitive FLP recombination plasmid BT340 (Datsenko and Wanner, 2000; can be obtained from the *E. coli* Genetic Stock Center: CGSC Strain# 7629) are transformed with the mutagenised cosmid DNA (obtained in section 5). BT340 contains ampicillin and chloramphenicol resistance determinants and is temperature sensitive for replication (replicates at 30°C). FLP synthesis and loss of the plasmid are induced at 42°C (Cherepanov and Wackernagel, 1995).

1. Grow *E. coli* DH5 $\alpha$ /BT340 overnight at 30°C in 10 ml LB containing chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml).
  - **Transforming *E. coli* BW25113/cosmid::apramycin (mutagenised cosmid) with the plasmid BT340 is not recommended because the isolates after PCR targeting may still contain copies of undisrupted cosmid DNA (see page 10, second paragraph).**
2. Inoculate 100  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$ /BT340 from overnight culture into 10 ml LB containing chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml).
3. Grow for 3-4 h at 30°C shaking at 200 rpm to an OD<sub>600</sub> of  $\sim$  0.4.
4. Recover the cells by centrifugation at 4000 rpm for 5 min at 4°C in a Sorvall GS3 rotor (or equivalent).
5. Decant medium and resuspend the pellet by gentle mixing in 10 ml ice-cold 10 % glycerol.
6. Centrifuge as above and resuspend pellet in 5 ml ice-cold 10 % glycerol, centrifuge and decant. Resuspend the cell pellet in remaining  $\sim$  100  $\mu$ l 10% glycerol.
7. Mix 50  $\mu$ l cell suspension with  $\sim$  100 ng (1-2  $\mu$ l) of mutagenised cosmid DNA. Carry out electroporation in a 0.2 cm ice-cold electroporation cuvette using a BioRad GenePulser II set to: 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F and 2,5 kV. The expected time constant is 4.5 – 4.9 ms.
8. Immediately add 1 ml ice cold LB to shocked cells and incubate shaking for 1 h at 30°C.
9. Spread onto LB agar containing apramycin (50  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml).
10. Incubate for 2 d at 30°C (*E. coli* DH5 $\alpha$ /BT340 grows slowly at 30°C).
11. A single colony is streaked on an LB agar plate without antibiotics for single colonies and grown overnight at 42°C to induce expression of the FLP recombinase followed by the loss of plasmid BT340.
12. Make two masterplates by streaking 20 – 30 single colonies with a toothpick first on a LB agar plate containing apramycin (50  $\mu$ g/ml) and then on a LB agar plate containing kanamycin (50  $\mu$ g/ml).

13. Grow the masterplates overnight at 37°C. Apramycin<sup>S</sup> kanamycin<sup>R</sup> clones indicate the successful loss of the resistance cassette and are further verified by restriction and PCR analysis.

- Typically, ~ 10 % of the single colonies after non-selective growth lose the incoming resistance marker and the plasmid BT340 simultaneously.
- Using the same test primers as in section 5 (annealing ~ 100 bp upstream and downstream of the 39 nt primer sequence) should produce a PCR product of ~ 300 bp (200 bp + 81 bp “scar”). PCR fragments can be sequenced using the amplification primers for verification.

### **Replacing resistance cassette inserts in *S. coelicolor* with the unmarked “scar” sequence**

The chromosomal apramycin resistance cassette insert in *S. coelicolor* is replaced by the “scar” sequence. This is achieved by homologous recombination between the chromosome and the corresponding “scar cosmid” prepared in 7. The procedure differs from section 6 because the cosmid lacks *oriT*, and the desired product is antibiotic sensitive. Therefore, it is necessary to introduce the scar cosmid into *Streptomyces* by protoplast transformation, and then select for kanamycin resistant *Streptomyces* containing the entire scar cosmid integrated by a single crossover. Restreaking to kanamycin-free medium, followed by screening for concomitant loss of kanamycin resistance and apramycin resistance, then identifies the desired *Streptomyces* clones.

### **Preparation of *Streptomyces coelicolor* protoplasts**

1. Add 25 ml YEME medium to a baffled flask. Add ~ 0.1 ml spore suspension and required growth factors. Incubate 36-40 h at 30°C in an orbital incubator shaker.
  - Cultures of *S. lividans* and *S. coelicolor* are ready for harvesting when they start to produce red pigment
2. Pour culture broth into a 20 ml screw cap bottle and spin in the bench centrifuge (~ 1000 x g, 10 min).
  - Before centrifugation, examine the culture for contamination by unicellular bacteria, usually indicated by turbidity: the *Streptomyces* mycelium sediments

**quickly while unicellular contaminants remain suspended. In case of doubt, use the microscope.**

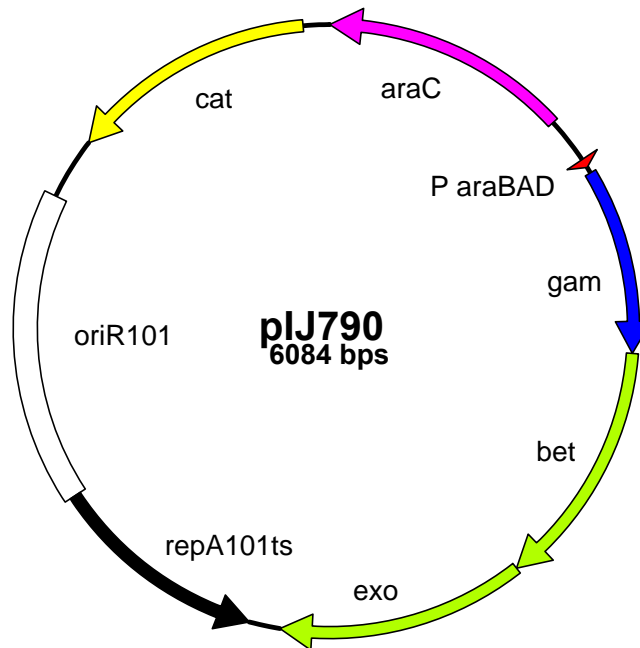
3. Discard the supernatant carefully; the pellet is easily disturbed.
  - **If the mycelium does not pellet add 5 ml sterile water to reduce the density of the medium and centrifuge again.**
4. Resuspend pellet in 15 ml 10.3% sucrose and spin in bench centrifuge as above. Discard supernatant.
5. Repeat step 4.
  - **The mycelial pellet, without added liquid, can be stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$**
6. Resuspend mycelium in 4 ml lysozyme solution (1 mg/ml P buffer, filter sterilised); incubate at  $30^{\circ}\text{C}$ , 15-60 min.
7. Draw in and out of a 5 ml pipette three times and incubate for a further 15 min.
  - **This helps to free protoplasts from the mycelium so that they will pass through the cotton wool filter used in step 9. At least with *S. lividans*, it is possible to obtain transformants with unfiltered material, but the washing (steps 9-10) is still needed to remove lysozyme.**
8. Add 5 ml P buffer. Repeat step 7.
9. Filter protoplasts through cotton wool (using a filter tube) and transfer to a plastic tube.
10. Sediment protoplasts gently by spinning in a bench centrifuge ( $\sim 1000 \times g$ , 7 min).
11. Discard supernatant and suspend protoplasts in 1 ml P buffer.
  - **At this and any other steps when pelleted protoplasts are to be resuspended, resuspend in the remaining drop of liquid by tapping the side of the tube repeatedly with a finger until the protoplasts are dispersed to form a creamy suspension, then add the suspending P buffer (otherwise the protoplast pellet is difficult to disperse). Avoid vortexing, which induces foaming and consequent lysis. To freeze the protoplasts for storage, place samples of the protoplast suspension in small plastic tubes, close them and place them in ice in a plastic beaker. Place the beaker at  $-70^{\circ}\text{C}$  overnight. Free the frozen protoplasts in their tubes from the ice and store at  $-70^{\circ}\text{C}$ . To thaw, shake the frozen tube under running warm water (i.e. freeze slowly, thaw quickly). To assess the proportion of non-protoplasted units in the suspension, samples can be diluted in parallel in P buffer and in dilute detergent ( $\sim 0.01\%$  SDS) and plated on regeneration plates. Any colonies arising after dilution in detergent are likely to have arisen from non-protoplasted units.**

## Rapid small-scale transformation of *Streptomyces coelicolor*

1. Dispense 50  $\mu\text{l}$  samples of protoplasts ( $\sim 10^{10}/\text{ml}$ ) into as many tubes as there are transformations.
  - We usually spin the protoplasts down immediately before the transformation experiment. This eliminates substances that may have leaked out of the protoplasts during storage and the contents of protoplasts which have lysed spontaneously (which may include nucleases).
2. Complete steps 2a-c for each transformation individually.
  - a. Add up to 5  $\mu\text{l}$  DNA solution to protoplasts and mix immediately by tapping tube.
  - b. Add 200  $\mu\text{l}$  25% PEG 1000 in P buffer and mix by pipetting up and down four times (be careful not to contaminate the barrel of the pipette).
  - c. Spread protoplast suspension (100-200  $\mu\text{l}$ ) on two dried R2YE plates. Use P buffer to make dilutions if required.
    - 1 ml glass pipettes can be used instead of spreaders. The solution will spread to some extent by itself if the plates are left on a horizontal surface.
3. Incubate plates at 30°C. After 14-20 h, flood for kanamycin selection. Score for resistant colonies after 3 d.
4. Select single colony and streak non-selectively for single colonies on MS agar plates and grow 3-4 d at 30°C.
5. Replica-plate to DNA agar plates with apramycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to screen for apramycin<sup>S</sup> and kanamycin<sup>S</sup> transformants.



### The $\lambda$ RED recombination plasmid pIJ790



**Fig. 4:** The  $\lambda$  RED recombination plasmid pKD20 (*E. coli* Genetic Sock Center CGSC Strain# 7637; Datsenko and Wanner, 2000) was modified by replacing the ampicillin resistance gene *bla* by the chloramphenicol resistance gene *cat*, generating pIJ790. Unlike pKD20, pIJ790 can be selected in presence of Supercos1.

#### Legend:

*araC*: encodes arabinose activator

*bet*: encodes single strand DNA binding protein

*cat*: chloramphenicol resistance gene

*exo*: exonuclease gene, promotes recombination together with *bet*

*gam*: gene product inhibits the host exonuclease V

oriR101: origin of replication

P araBAD: L-arabinose inducible promoter

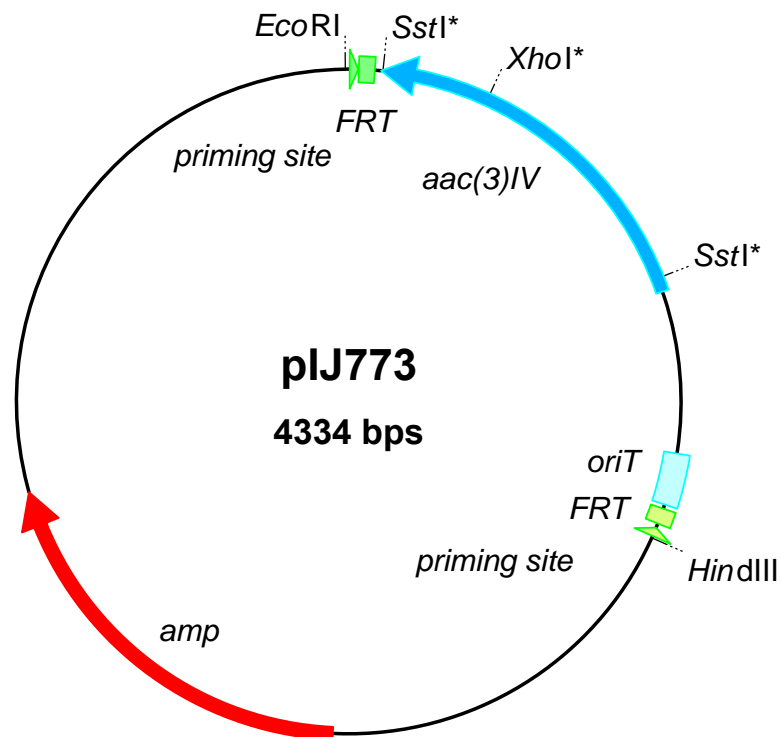
repA101ts: temperature-sensitive replication

The following digestions can be used to verify this plasmid.

*Bam*HI: 6084 bp; *Eco*RI: 2872 bp, 1703bp, 1509 bp;

*Nco*I: 3927 bp, 2157 bp; *Pst*I: 5873 bp, 247 bp

## Template plasmids

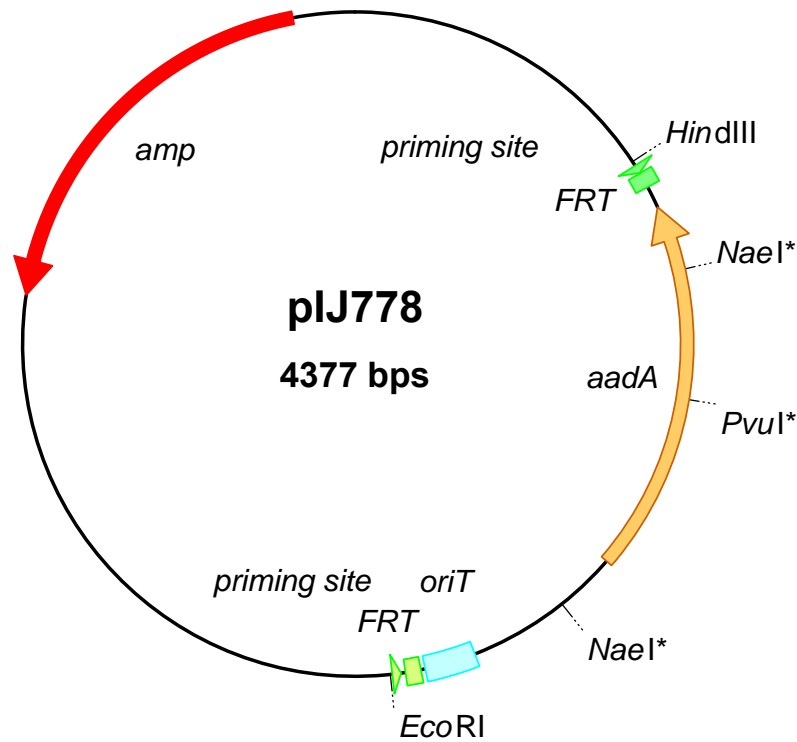


**Fig. 5:** Template plasmid pIJ773 containing the apramycin resistance gene *aac(3)IV* (AC=X99313) and the *oriT* of plasmid RP4 (=RK2) (AC=L27758), flanked by FRT sites (FLP recognition targets, see Datsenko and Wanner, 2000). The disruption cassette was cloned into the *EcoRV* site of pBluescript KS (+) allowing its isolation as a 1382 bp *EcoRI/HindIII* fragment.

\* indicates suitable restriction sites for verification of mutagenised cosmid DNA by restriction analysis (for example: *SstI* generates a 751 bp internal fragment within the disruption cassette).

LOCUS pIJ773 4334 bp DNA CIRCULAR SYN 02-AUG-2002  
 DEFINITION Ligation of Apra-oriT disruption cassette into the EcoRV site of  
 pBluescript SK(+)  
 ACCESSION pIJ773  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Unknown.  
 ORGANISM Unknown  
 Unclassified.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 4334)  
 AUTHORS Gust et al., 2003,  
 JOURNAL *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4), 1541-1546  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 CDS 2..20  
 /region="priming site 19 bp"  
 /product="TGT AGG CTG GAG CTG CTT C"  
 CDS 21..54  
 /region="FRT"  
 /product="natural FRT site"  
 CDS complement (66..851)  
 /gene="aac(3)IV"  
 /product="apramycin resistance gene"  
 CDS 1192..1301  
 /region="oriT"  
 /product="origin of transfer (RK2)"  
 CDS 1310..1343  
 /region="FRT"  
 /product="natural FRT site"  
 CDS complement (1352..1371)  
 /region="priming site 20 bp"  
 /product="ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC"  
 CDS 2200..3060  
 /gene="amp"  
 /product="b-lactamase"  
 BASE COUNT 1023 a 1137 c 1126 g 1049 t  
 ORIGIN  
 1 gtgtaggctg gagctgcttc gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcggaata  
 61 ggaacttatg agctcagcca atcgactggc gagcggcctc gcattcttcg catcccgcct  
 121 ctggcggatg caggaagatc aacggatctc ggcccagttg acccagggct gtcgcccaca  
 181 tgtcgcggga gcggatcaac cgagcaaagg catgaccgac tggaccttcc ttctgaaggg  
 241 tcttctcctt gagccacctg tccggccaagg caaagcgctc acagcagtgg tcattctcga  
 301 gataatcgac gcgtaccaac ttgccatcct gaagaatggt gcagtgtctc ggcaccccat  
 361 agggaacctt tgccatcaac tcggcaagat gcagcgtcgt gttggcatcg tgtcccacgc  
 421 cgaggagaag tacctgcccc tcgagttcat ggacacgggc gaccgggctt gcaggcgagt  
 481 gaggtgcaag gggcaatgga tcagagatga tctgctctgc ctgtggcccc gctgcccga  
 541 aggcfaatgg atgggctctg cgctttacat ttggcaggcg ccagaatgtg tcagagacaa  
 601 ctccaaggtc cgggtgtaacg ggcgacgtgg caggatcgaa cggctcgtcg tccagacctg  
 661 accacgaggg catgacgagc gtccctcccc gaccagcgc agcaccgagg gcctcgtatca  
 721 ctccaagtgg cccatctctg agggcccgga cgctacggaa ggagctgtgg accacgaca  
 781 caccgcccgg ggtaaccccc aggttgagaa gctgaccgat gagctcggct tttcgccatt  
 841 cgtattgcac gacattgcac tccaccgctg atgacatcag tcgatcatag cacgatcaac  
 901 ggcactgttg caaatagtcg gtgggtgataa acttatcatc cccttttgcg gatggagctg  
 961 ccaatgaacc cattcaagg cggcattttt cagcgtgaca tcattctgtg gggcgtacgc  
 1021 tggtaactgca aatacggcat cagttaccgt gagctgcatt ttccgctgca taaccctgct  
 1081 tcggggctcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga tatacaggat  
 1141 tttgcccagg ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag cggggcagga  
 1201 taggtgaagt agggcccacc gcgacgggtt gttccttctt cactgtccct tattcgcaac  
 1261 tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggtggcg ggaacttcga agttcctata  
 1321 ctttctagag aataggaact tcgaactgca ggtcgacgga tcccgggaat atcaagctta  
 1381 tcgataccgt cgacctcgag ggggggcccg gtacccaatt gcgccatag tgagtcgat  
 1441 tacaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa  
 1501 cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc  
 1561 accgatcgcc cttcccaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcga cgcgccctgt  
 1621 agcggcgcag taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc  
 1681 agcggccctag cgcccgtcc tttcgctttc ttcccttctt ttctcgccac gttcgccgc  
 1741 tttcccctgc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg  
 1801 cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggg gatggttcac gtagtggggc atcgccctga  
 1861 tagacggttt ttgcgccctt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcctgttc  
 1921 caaactggaa caacactcaa cctatctcgt gtctattctt ttgattata agggattttg  
 1981 ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatatt  
 2041 aacaaaatat taacgtttac aatttcccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgaggaa  
 2101 ccctattttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac  
 2161 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttcctg  
 2221 tcgcccctat tccccttttt cgggcatttt gccttctctg ttttctctac ccagaaacgc  
 2281 tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcac agtgggttac atcgactgg  
 2341 atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgcccga agaactgttt ccaatgatga  
 2401 gcacttttaa agttctgcta tgtggcggcg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc  
 2461 aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag

2521 aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgccc ataaccatga  
2581 gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg  
2641 cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcggtgggaa cgggagctga  
2701 atgaagccat accaaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt  
2761 tgcgcaaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact  
2821 ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgctcgc ggcccttccg gctggctggt  
2881 ttattgtctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg  
2941 ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta  
3001 tggatgaacg aatagacag atcgcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac  
3061 tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta  
3121 aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt  
3181 ttctggtcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt  
3241 tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtggttt  
3301 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc  
3361 agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg  
3421 tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg  
3481 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg  
3541 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac  
3601 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaaggcg  
3661 acaggtatcc ggtaagcggc agggctcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg  
3721 gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat  
3781 ttttgtgatg ctgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt  
3841 tacggttcct ggcttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgcg ttatccctg  
3901 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa  
3961 cgaccgagcg cagcagatca gtgagcaggg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc  
4021 ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacagggtt cccgactgga  
4081 aagcgggcag tgagcgcac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg  
4141 ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc  
4201 acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct cactaaaggg  
4261 aacaaaagct ggagctccac cgcggtggcg gccgctctag aactagtgga tccccgggc  
4321 tgcaggaatt cgat



**Fig. 6:** Template plasmid pIJ778 containing the streptomycin and spectinomycin resistance gene *aadA* (AC=M60473) and the *oriT* of plasmid RP4 (=RK2) (AC=L27758), flanked by FRT sites (FLP recognition targets, see Datsenko and Wanner, 2000). The disruption cassette was cloned into the *EcoRV* site of pBluescript KS (+) allowing its isolation as a 1425 bp *EcoRI/HindIII* fragment.

\* indicates suitable restriction sites for verification of mutagenised cosmid DNA by restriction analysis (for example: *NaeI* generates a 782 bp internal fragment within the disruption cassette).

LOCUS pIJ778 4377 bp DNA CIRCULAR SYN 02-AUG-2002

DEFINITION Ligation of Spec,Strep-oriT disruption cassette into the EcoRV site of pBluescript SK(+)

ACCESSION pIJ778

KEYWORDS .

SOURCE Unknown.

ORGANISM Unknown  
Unclassified.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4377)

AUTHORS Gust et al., 2003

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4), 1541-1546

FEATURES Location/Qualifiers

CDS 699..717  
/region="priming site 19 bp"  
/product="TGT AG complement (718.  
/region="FRT"  
/product="natural FRT site"

CDS complement (798..1590)  
/gene="aadA"  
/product="spectinomycin,streptomycin adenylyltransferase gene"

CDS 1931..2040  
/region="oriT"  
/product="origin of transfer (RK2)"

CDS 2049..2082  
/region="FRT"  
/product="natural FRT site"

CDS complement (2091..2110)  
/region="priming site 20 bp"  
/product="A . CC"

CDS complement (2111..2120)  
/gene="amp"  
/product="b-lactamase"

BASE COUNT 1065 a 1120 c 1108 g 1084 t

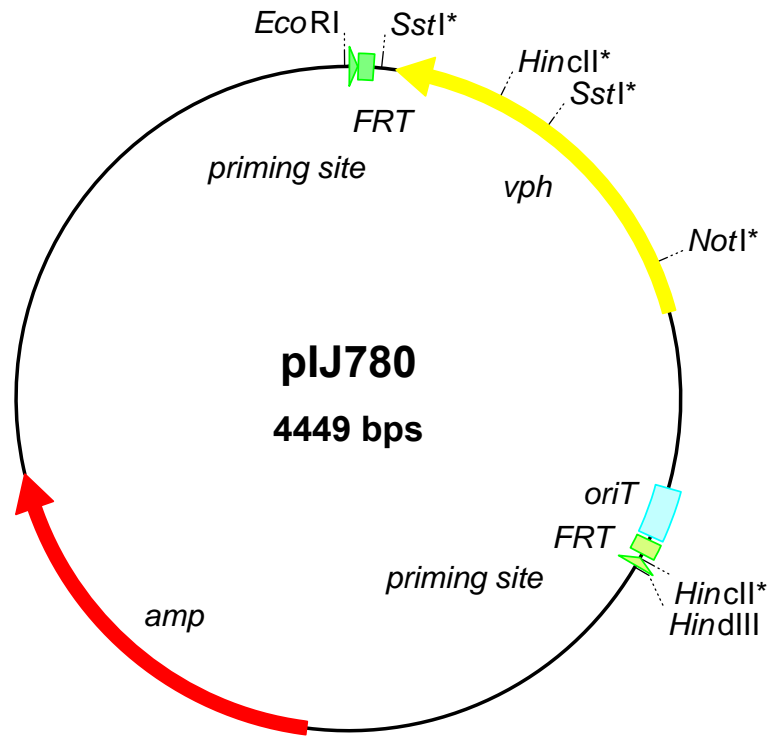
ORIGIN

1 GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC  
61 ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAG AATAGACCGA  
121 GATAGGGTTG AGTGTGTTC CAGTTTGGA CAAGAGTCCA CTATTAAGA ACGTGGACTC  
181 CAACGTCAA GGCAGAAA CCGTCTATCA GGCAGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC  
241 CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG  
301 CCCCATTGAC AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA  
361 AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC  
421 CACACCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGGTCG CGCCATTCGC CATTAGGCT  
481 GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCCTCTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA  
541 AGGGGATGT GCTGCAAGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTCCC AGTCACGACG  
601 TTGTAACACG ACGGCCAGTG AATTGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT TGGGTACCGG  
661 GCCCCCCTC GAGGTCGACG GTATCGATAA GCTTGATGTG TAGGCTGGAG CTGCTCGAA  
721 GTTCTATAC TTTCTAGAGA ATAGGAACCT CGGAATAGGA ACTTCATGAG CTCAGCCAAT  
781 CGACTGGCGA GCGCATCTT ATTTGCCGAC TACCTTGGTG ATCTCGCTT TCACGTAGTG  
841 GACAAATCT TCCAATGAT CTGCGCGCGA GGCCAAGCGA TCTTCTTCTT GTCCAAGATA  
901 AGCCTGTCTA GCTCAAGTA TGACGGGCTG ATACTGGGCC GGCAGGCGCT CCATTGCCCA  
961 GTCGGCAGC ACATCCTTCG GCGGATTTT GCGGTTACT GCGCTGTACC AAATGCGGGA  
1021 CAACGTAGC ACTACATTC GCTCATGCC AGCCAGTCG GCGGGCGAGT TCCATAGCGT  
1081 TAAGTTTTCA TTTAGCGCCT CAAATAGATC CTGTTCAAGG ACCGGATCAA AGAGTTCTCT  
1141 CGCCGCTGGA CCTACCAAG CAACGCTATG TTCTCTTCTT TTTGTACGCA AGATAGCCAG  
1201 ATCAATGTCG ATCGTGGCTG GCTCGAAGAT ACCTGCAAGA ATGTCAATTC GCTGCCATTC  
1261 TCCAAATTCG AGTTCGCGCT TAGCTGGATA ACGCCACGGA ATGATGTCGT CGTGACAAAC  
1321 AATGGTGACT TCTACAGCGC GGAGAATCTC GCTCTCTCCA GGGGAAGCCG AAGTTTCCAA  
1381 AAGTTCGTTG ATCAAAGCTC GCCGCTTGT TTCATCAAGC CTTACGGTCA CCGTAACCAG  
1441 CAAATCAATA TCACTGTGTG GCTTCAGGCC GCCATCCACT GCGGAGCCGT ACAAATGTAC  
1501 GGCCAGCAAC GTCGGTTCGA GATGGCGCTC GATGACGCCA ACTACCTCTG ATAGTTGAGT  
1561 CGATACTTCG GCGATCACCG CTTCCCTCAT GACATTGCAC TCCACCGCTG ATGACATCAG  
1621 TCGATCATAG CACGATCAAC GGCAGTGTG CAAATAGTCG GTGGTGATAA ACTTATCATC  
1681 CCCTTTTGCT GATGGAGCTG CACATGAACC CATTCAAAGG CCGGCATTTT CAGCGTGACA  
1741 TCATTCTGTG GCGGTACGC TGGTACTGCA AATACGGCAT CAGTTACCGT GAGCTGCATT  
1801 TTCCGTGCA TAACCTGCT TCGGGTTCAT TATAGCGATT TTTTCGGTAT ATCCATCCTT  
1861 TTTCGCACGA TATACAGGAT TTTGCCAAAG GGTTCGTGTA GACTTTCCTT GGTGTATCCA  
1921 ACGGCGTCA CCGGGCAGGA TAGGTGAAGT AGGCCACCC CCGAGCGGGT GTTCTTCTT  
1981 CACTGTCCCT TATTGCGACC TGGCGGTGCT CAACGGGAAT CCTGCTCTGC GAGGCTGGCG  
2041 GAGCCCTCGA AGTTCCTATA CTTTCTAGAG AATAGGAAT TCGAACTGCA GGTTCGACGGA  
2101 TCCCCGGAAT ATCGAATTC TGCAGCCCGG GGGATCCACT AGTTCCTAGAG CCGCCGCCAC  
2161 CGCGGTGGAG CTCAGCTTT TGTCCCTTT AGTGAGGGTT AATTCAGGAG TTGGCGTAAT  
2221 CATGGTCATA GCTGTTTCCT GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATFCCA CACAACATAC  
2281 GAGCCGGAAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTA  
2341 TTGCGTTGCG CTCAGTCCC GCTTTCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG CTGCATTAAT  
2401 GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGCGGGT TCGGTATTGG GCGCTCTCC GCTTCTCCG

2461 TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG  
2521 CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG  
2581 GCCAGCAAAA GGCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC  
2641 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG  
2701 GACTATAAAG ATACCAGGCG TTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA  
2761 CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC  
2821 ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG GTAGGTGCT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG  
2881 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT CGTCTTGAGT  
2941 CCAACCCGCT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA  
3001 GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA  
3061 CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG  
3121 TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA  
3181 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG  
3241 GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA  
3301 AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA  
3361 TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG  
3421 CGATCTGTCT ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA  
3481 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC  
3541 CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC  
3601 CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA  
3661 GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTCCAC  
3721 GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTACGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT  
3781 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTACAGAA  
3841 GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG  
3901 TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG  
3961 AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC  
4021 CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT  
4081 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT  
4141 CTTACGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG  
4201 CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTTC  
4261 AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA  
4321 TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTG

//





**Fig. 7:** Template plasmid pIJ780 containing the viomycin resistance gene *vph* (AC=X99314) and the *oriT* of plasmid RP4 (=RK2) (AC=L27758), flanked by FRT sites (FLP recognition targets, see Datsenko and Wanner, 2000). The disruption cassette was cloned into the *EcoRV* site of pBluescript KS (+) allowing its isolation as a 1497 bp *EcoRI/HindIII* fragment.

\* indicates suitable restriction sites for verification of mutagenised cosmid DNA by restriction analysis (for example: *HincII* generates a 1137 bp internal fragment within the disruption cassette).

LOCUS pIJ780 4449 bp DNA CIRCULAR SYN 02-AUG-2002  
 DEFINITION Ligation of Vio-oriT disruption cassette into the EcoRV site of  
 pBluescript SK(+)  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Unknown.  
 ORGANISM Unknown  
 Unclassified.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 4449)  
 AUTHORS Gust et al., 2003  
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4), 1541-1546  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 CDS 2..20  
 /region="priming site 19 bp"  
 /product="TGT AGG CTG GAG CTG CTT C"  
 CDS 21..54  
 /region="FRT"  
 /product="natural FRT site"  
 CDS complement (102..925)  
 /gene="vph"  
 /product="viomycin resistance gene"  
 CDS 1306..1415  
 /region="oriT"  
 /product="origin of transfer (RK2)"  
 CDS 1424..1457  
 /region="FRT"  
 /product="natural FRT site"  
 CDS complement (1466..1485)  
 /region="priming site 20 bp"  
 /product="ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC"  
 CDS 2314..3174  
 /gene="amp"  
 /product="b-lactamase"  
 BASE COUNT 977 a 1241 c 1194 g 1037 t  
 ORIGIN  
 1 GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC GAAGTTCCTA TACTTTCTAG AGAATAGGAA CTTCCGAATA  
 61 GGAACTTCAT GAGCTCAGCC AATCGACTGG CGAGCGGCAT CCTACCGGTA GCCGCTGAGG  
 121 CCGTCGGCGA GTTCTCCTC GTCGCCGTCG CGCTGCGCGT AGAGGGCCTG CTGGAGTGGC  
 181 AAGGTGCCTC GGATCGCCGA GATCCGCTCG GCCGTTCCGT TGTCGGCCCA GCCGCCGAGC  
 241 GCGAGCACTC GGCCAGCAG TTCCTCGCCG TAGCTCGCCC CGATGGCGGC CAGGTCCTCA  
 301 GCCGGGTGCG CGATGCCGAC CTCGTCCCAG TCGACGACGC CGTCAATGCG CGGCACCTCG  
 361 TCCACCGTCT CCCACAGGAC GTTCTCGCCG CCGAGGTCAC CGTGGACCAC CGCGGAGGTG  
 421 AGATGGGGCA GGGCGTGCAG CGCGCGGAGC TCGCGCTCGG CACGCTCCCG GCCCGCTCG  
 481 GACATCAGCG GGAACAGTTC GGTACGCACC CCCGTGGCGA ACTCCTGCCA CTCGTTGCGG  
 541 GGAGCCTCCG GCAGCGCGGC GCGCACCTTC TCCTCGTCGC CCGCCCGCCG GAGCCCGGAC  
 601 AGCAGGGTCG CGTACTGTCG GCGCAGCGCC TCCGCCACCT CCGGGCTGGT GAGCACATCG  
 661 TCCTCCAACG GTGCTCCGGG AATGCGGCTC AGCACCAAGT ACGGCGGCTC GTCCGTCGCC  
 721 TGGGCGCCGC CCTCGGACAG CGGCTGCGGC GTGCGAAACC CGAGGTGCGT CCCGGCAAGA  
 781 GCGCGCAGGA CGTCCGCCCT GCCGGGCGA CGGTGCGCGG CCGCCCGGGT GCGGGCGAAG  
 841 CAGACCACCC GGTGCGATCC GATCACCACA TGGTGGAACT GCCCTCGTG GACGGCGAGT  
 901 CCGCCACCGG TGTCGCCCGG CAGGAGCCGG CTCAGCAGAT CGCGGTGCGT CTCAAATGATT  
 961 CTCATGACAT TGCACTCCAC CGCTGATGAC ATCAGTTCGAT CATAGCACGA TCAACGGCAC  
 1021 TGTTGCAAAT AGTCGGTGGT GATAAACTTA TCATCCCTTT TTGCTGATGG AGCTGCACAT  
 1081 GAACCCATTC AAAGGCCGGC ATTTTCAGCG TGACATCATT CTGTGGGCCG TACGCTGGTA  
 1141 TCGCAAATAC GCATCAGTT ACCGTGAGCT GCATTTTCCG CTGCATAACC CTGCTCGGG  
 1201 GTCATTATAG CGATTTTTTC GGTATATCCA TCCTTTTTTC CACGATATAC AGGATTTTTG  
 1261 CAAAGGGTTC GTGTAGACTT TCCTTGGTGT ATCCAACGGC GTCAGCCGGG CAGGATAGGT  
 1321 GAAGTAGGCC CACCCGCGAG CGGGTGTTC TTCTTCACTG TCCCTTATTC GCACCTGGCG  
 1381 GTGCTCAACG GGAATCCTGC TCTGCGAGGC TGCGCGGAAC TTCGAAGTTC CTATACTTTC  
 1441 TAGAGAATAG GAACTTCGAA CTGCAGGTCG ACGGATCCCC GGAATATCAA GCTTATCGAT  
 1501 ACCGTCGACC TCGAGGGGGG GCCCGGTACC CAATTGCGCC TATAGTGAGT CGTATACAAA  
 1561 TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTGA CCCAACTTAA  
 1621 TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA  
 1681 TCGCCCTTCC CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCGACGCGC CCTGTAGCGG  
 1741 CGCATAAAGC GCGCGGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC  
 1801 CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCTTTTCTC GCCACGTTTC CCGGCTTTTC  
 1861 CCGTCAAAGCT CTAATCCGGG GGCTCCCTTT AGGGTTCGGA TTTAGTGCTT TACGCGACCT  
 1921 CGACCCAAA AAACCTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC  
 1981 GGTTTTTCCG CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC  
 2041 TGGAACAACA CTCACCCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGGCCAT  
 2101 TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA ATTTTAAACA  
 2161 AATATTAACG TTTACAATTT CCCAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT  
 2221 ATTTGTTTTT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCTGTA  
 2281 TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCGG  
 2341 CTTATTCCCT TTTTTCGCGC ATTTTGCCTT CCGTGTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTC  
 2401 AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC

2461 AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTTCGC CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT  
2521 TTTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAAATC  
2581 GGTCCGCCGA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG  
2641 CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT  
2701 AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT  
2761 TTGCACAACA TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAAACCGGA GCTGAATGAA  
2821 GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGCGC  
2881 AAACATTTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCAGC AACAAATTAAT AGACTGGATG  
2941 GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGTCGGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT  
3001 GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA  
3061 GATGGTAAGC CCTCCCCTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT  
3121 GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAAGTGTCA  
3181 GACCAAGTTT ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTTAAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAAGG  
3241 ATCTAGGTGA AGATCCTTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAAAC TGAGTTTTTCG  
3301 TTCACCTGAG CGTCAGACCC GTAGAAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT  
3361 TTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAAACAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTTTTTG  
3421 CCGATCAAG AGTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAACG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA  
3481 CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA  
3541 CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG  
3601 TCGTGCTTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC  
3661 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA  
3721 TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG  
3781 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGAAAC  
3841 GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG  
3901 TGATGCTCGT CAGGGGGCGG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG  
3961 TTCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGTCTAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT  
4021 GTGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATAACG CTCGCCGAG CCGAACGACC  
4081 GAGCGCAGCG AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC  
4141 CCCGCGGTT GCGCGATTCA TTAATGCAGC TGGCACGACA GGTGTTCCGA CTGGAAGCG  
4201 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TAGCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA  
4261 CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACA  
4321 GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGGAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACAA  
4381 AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCG TCTAGAATA GTGGATCCCC CGGGCTGCAG  
4441 GAATTCGAT

//

## Strains:

### Strain designation: BW25113/pIJ790

Plasmid: pIJ790 [*oriR101*], [*repA101(ts)*], *araBp-gam-be-exo*

Chromosome: ( $\Delta$ (*araD-araB*)567,  $\Delta$ *lacZ4787(::rrnB-4)*, *lacIp-4000(lacI<sup>Q</sup>)*,  $\lambda$ , *rpoS369(Am)*, *rph-1*,  $\Delta$ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*; Datsenko and Wanner, 2000);

this strain should be grown on rich medium containing chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml) at 30°C.

### Strain designation: DH5 $\alpha$ /pIJ773

Plasmid: pBluescript KS (+), *aac(3)IV*, *oriT* (RK2), FRT sites

chromosomal marker : see Stratagene,

this strain should be grown on rich medium containing carbenicillin (100  $\mu$ g/ml) and apramycin (50  $\mu$ g/ml) at 37°C.

### Strain designation: DH5 $\alpha$ /pIJ778

Plasmid: pBluescript KS (+), *aadA*, *oriT* (RK2), FRT sites

chromosomal marker : see Stratagene,

this strain should be grown on rich medium containing carbenicillin (100  $\mu$ g/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/ml) and spectinomycin (50  $\mu$ g/ml) at 37°C.

### Strain designation: DH5 $\alpha$ /pIJ780

Plasmid: pBluescript KS (+), *vph*, *oriT* (RK2), FRT sites

chromosomal marker : see Stratagene,

this strain should be grown on DNA (Difco Nutrient Agar), 2XYT broth or DNB (Difco Nutrient broth) containing carbenicillin (100  $\mu$ g/ml) and viomycin (30  $\mu$ g/ml) at 37°C.

**Strain: DH5 $\alpha$ /BT340** (Datsenko and Wanner, 2000) can be ordered from:

*E. coli* Genetic Stock Center

830 Kline Biology Tower

MCD Biology Department

266 Whitney Ave. Box 208103

Yale University

New Haven, CT 06520-81033

Tel. (0044) (203) 432-9997 Fax –6161

email: [berlyn@cgsc.biology.yale.edu](mailto:berlyn@cgsc.biology.yale.edu)

webpage: <http://cgsc.biology.yale.edu>

**Strains DH5 $\alpha$ /pIJ779 and DH5 $\alpha$ /pIJ781 will be send separately on request,**

**please contact:**

Plant Bioscience Limited, Dr Karin Schofield

Technology Acquisition & Technology Manager Norwich Research Park, Colney,

Norwich, NR4 7UH, UK Email: [karin@plantbioscience.com](mailto:karin@plantbioscience.com)

Tel: +44 (0) 1603 456500; Fax: +44 (0) 1603 456552

[www.plantbioscience.com](http://www.plantbioscience.com)

**Media:** for more detailed information see:

**Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF and Hopwood DA (2000)**

Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich Research Park,

Colney, Norwich NR4 7UH, England

## Agar Media

**Note:** MS medium (Mannitol Soya flour Medium) is also known as SFM medium (Kieser *et al.*, 2000).

### **R2 Medium** (Okanishi *et al.*, 1974; Hopwood and Wright, 1978)

Make up the following solution:

Sucrose	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10.12 g
Glucose	10 g
Difco Casaminoacids	0.1 g
Distilled water	800 ml

Pour 80 ml of the solution into 250 ml Erlenmeyer flasks each containing 2.2 g Difco Bacto agar. Close the flasks and autoclave. At time of use, remelt the medium and add to each flask the following autoclaved solutions in the order listed:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (3.68%)	8 ml
L-proline (20%)	1.5 ml
TES buffer (5.73%, adjusted to pH7.2)	10 ml
<sup>1</sup> Trace element solution	0.2 ml
NaOH (1N) (unsterilised is OK)	0.5 ml
Required growth factors for auxotrophs	0.75 ml each

(For stock solutions, see Kieser *et al.*, 2000)

<sup>1</sup>Trace element solution (l<sup>-1</sup>):

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	10 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg

### **R2YE Medium**

Make up in the same way as R2, but add 5 ml of Difco yeast extract (10%) to each 100 ml flask at time of use

### **R5 Medium**

This is an alternative way of making R2YE. It obviously saves time at the bench. For most purposes it seems satisfactory, but there is some folklore suggesting that R2YE made by the traditional process gives more reproducible results.

Make up the following solution:

Sucrose	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10.12 g
Glucose	10 g
Difco Casaminoacids	0.1 g
<sup>1</sup> Trace element solution	2 ml
Difco yeast extract	5 g
TES buffer	5.73 g
Distilled water to	1000 ml

<sup>1</sup> The same as in R2 and R2YE.

Pour 100 ml of the solution into 250 ml Erlenmeyer flasks each containing 2.2 g Difco Bacto agar. Close the flasks and autoclave. At time of use, re-melt the medium and add to each flask in the order listed:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (5M)	0.4 ml
L-proline (20%)	1.5 ml
NaOH (1N)	0.7 ml
Any required growth factors for auxotrophs (see Kieser <i>et al.</i> , 2000)	0.75 ml each



**Mannitol Soya flour Medium (MS)** Hobbs *et al.* (1989). Sometimes referred to as “SFM”.

Agar	20 g
Mannitol	20 g
<sup>1</sup> Soya flour	20 g
Tap water	1000 ml

<sup>1</sup>Use soya flour from a health food shop or supermarket, not the expensive material from a laboratory supplier.

Dissolve the mannitol in the water and pour 200 ml into 250 ml Erlenmeyer flasks each containing 2 g agar and 2 g soya flour. Close the flasks and autoclave *twice* (115 °C , 15 min), with gentle shaking between the two runs.

#### **Difco nutrient agar (DNA)**

Place 4.6 g Difco Nutrient Agar in each 250 ml Erlenmeyer flask and add 200 ml distilled water. Close the flasks and autoclave.

#### **L agar**

Agar	10 g
Difco Bacto tryptone	10 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Distilled water	up to 1000 ml

Dissolve the ingredients, except agar, in the distilled water and pour 200 ml into 250 ml Erlenmeyer flasks each containing 2 g agar. Close the flasks and autoclave.

## Liquid media

### Yeast extract-malt extract medium (YEME)

Difco yeast extract	3 g
Difco Bacto-peptone	5 g
Oxoid malt extract	3 g
Glucose	10 g
Sucrose	340 g (34% final)
Distilled water	up to 1000 ml

After autoclaving, add:

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (2.5M)	2 ml/litre (5mM final)
---	------------------------

For preparing protoplasts, also add:

<sup>1</sup> Glycine (20%)	25 ml/litre (0.5% final)
----------------------------	--------------------------

<sup>1</sup>Different *Streptomyces* strains may need different concentrations of glycine; 0.5% is best for *S. lividans* and *S. coelicolor*.

### Tryptone soya broth (TSB)

Oxoid Tryptone Soya Broth powder (CM129)	30 g
Distilled water	1000 ml

### Difco nutrient broth (DNB)

Difco Nutrient Broth powder	8 g
Distilled water	1000 ml

### L (Lennox) broth (LB)

Difco Bacto tryptone	10 g
Difco yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Distilled water	1000 ml

## **2 X YT medium**

Difco Bacto tryptone	16 g
Difco Bacto yeast extract	10 g
NaCl	5 g
Water	1000 ml

## **Buffers**

### **P (protoplast) buffer**

Make up the following basal solution:

Sucrose	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.02 g
<sup>1</sup> Trace element solution	2 ml
Distilled water to	800 ml

<sup>1</sup> The same as in R2 and R2YE.

Dispense in 80 ml aliquots and autoclave. Before use, add to each flask in order:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (3.68%)	10 ml
TES buffer (5.73%, adjusted to pH7.2)	10 ml

### **T (transformation) buffer**

Mix the following sterile solutions:

Sucrose (10.3%)	25 ml
Distilled water	75 ml
<sup>1</sup> Trace element solution	0.2 ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.5%)	1 ml

<sup>1</sup> The same as in R2 and R2YE.

To 9.3 ml of the above solution add:

CaCl <sub>2</sub> (5M)	0.2 ml
<sup>1</sup> Tris-maleic acid buffer	0.5 ml

<sup>1</sup>Make up a 1M solution of Tris and adjust to pH8.0 by adding maleic acid. For use, add 3 parts by volume of the above solution to 1 part by weight of PEG 1000, previously sterilised by autoclaving.

**L (lysis) buffer** (Thompson *et al.*, 1982)

Mix the following sterile solutions:

Sucrose (10.3%)	100 ml
TES buffer (5.73%, adjusted to pH7.2)	10 ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2.5%)	1 ml
<sup>1</sup> Trace element solution	0.2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%)	1 ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (2.5M)	0.1 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.25M)	1 ml

<sup>1</sup> The same as in R2 and R2YE.

This stock solution keeps indefinitely. Just before use dissolve lysozyme in a sample of the solution at a concentration of 1 mg/ml and sterilise by filtration.

### **The CD-ROM includes:**

1. Manual as Microsoft Word document and Adobe Acrobat document (X:/Protocol/)
2. Sequences of template plasmids as plain sequence files and as EMBL files (X:/Template plasmids/)
3. Sequences of the *S. coelicolor* real cosmids (X:/S\_coelicolor/cosmid inserts)

### **Literature**

- Bennett, P.M., Grinsted, J. and Richmond, M.H. (1977) *Mol.Gen.Genet.*, 154, 205-211**
- Cherepanov, P.P and Wackernagel, W. (1995) *Gene*, 158, 9-14**
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645**
- Flett, F., Mersinias, V. and Smith, C.P. (1997) *FEMS Microbiol.Lett.*, 155, 223-229**
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG (1989) *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 31, 272-277.**
- Hodgson DA (1982) *J.Gen.Microbiol.*,128, 2417-2430.**
- Hopwood DA (1967) *Bacteriol.Rev.*, 31, 373-403.**
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CJ, Ward JM, and Schrepf H. (1985) Norwich: The John Innes Foundation**
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*: John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK**
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H. and MacNeil, T. (1992) *Gene*, 111, 61-68**
- Matsushima ,P., Broughton, M.C., Turner, J.R. and Baltz, R.H. (1994) *Gene*, 146, 39-45**
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D.A. (1996) *Mol. Microbiol.*, 21, 77-96**
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.**
- Strauch E, Takano E, Baylis H, Bibb MJ (1991) *Mol.Microbiol.*, 5, 289-298.**

ILL: 96914484



TN: 620817



Borrower: DRU

Group: ATLA

Source Title: Canadian journal of microbiology Revue canadienne de microbiologie.

Vol: 58 Issue: 10

Year/Month: October 2012/ Pages: 1195-1201

Location: MyMo

Call #:

Article/Chapter Title: Angelo Forero et al. ; Possible involvement of the sco2127 gene product in glucose repression of actinorhodin production in Streptomyces coelicolor

Author:

Patron: Demain, Arnold

Print session: 11/6/2012 4:27:09 PM

Lender String: TXH,\*YU,ERE,WCM,HTM

Borrowing Notes: Billing Notes; We are free if you are free

**Borrowing Library: Drew University Library**

**Odyssey: 192.107.39.202**



**Ariel:**



**E-Mail:**

**FAX:**

Comments:

Supplied by Baylor University

Contact us:

Ph: 254-710-3054

E-Mail: [BU\\_ILS@baylor.edu](mailto:BU_ILS@baylor.edu)

# Possible involvement of the *sco2127* gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*

Angela Forero, Mauricio Sánchez, Adán Chávez, Beatriz Ruiz, Romina Rodríguez-Sanoja, Luis Servín-González, and Sergio Sánchez

**Abstract:** *Streptomyces coelicolor* mutants resistant to 2-deoxyglucose are insensitive to carbon catabolite repression (CCR). Total reversion to CCR sensitivity is observed by mutant complementation with a DNA region harboring both glucose kinase *glkA* gene and the *sco2127* gene. The *sco2127* is located upstream of *glkA* and encodes a putative protein of 20.1 kDa. In *S. coelicolor*, actinorhodin production is subject to glucose repression. To explore the possible involvement of both SCO2127 and glucose kinase (Glk) in the glucose sensitivity of actinorhodin production, this effect was evaluated in a wild-type *S. coelicolor* A3(2) M145 strain and a *sco2127* null mutant ( $\Delta$ *sco2127*) derived from this wild-type strain. In comparison with strain M145, actinorhodin production by the mutant was insensitive to glucose repression. Under repressive conditions, only minor differences were observed in glucose utilization and Glk production between these strains. SCO2127 was detected mainly during the first 36 h of fermentation, just before the onset of antibiotic production, and its synthesis was not related to a particular carbon source. The glucose sensitivity of antibiotic production was restored to wild-type phenotype by transformation with an integrative plasmid containing *sco2127*. Our results support the hypothesis that SCO2127 is a negative regulator of actinorhodin production and suggest that the effect is independent of Glk.

**Key words:** carbon catabolite repression, actinorhodin production, *Streptomyces coelicolor*.

**Résumé :** Les mutants de *Streptomyces coelicolor* résistants au 2-désoxyglucose sont insensibles à la répression catabolique (CCR). La réversion totale de la sensibilité à la CCR est observée quand les mutants sont complétés avec une région d'ADN qui contient le gène *sco2127* et la glucose kinase (*glkA*). *sco2127* est situé immédiatement avant *glkA*, et code une protéine présumée de 20,1 kDa. Chez *S. coelicolor*, la production d'actinorhodine est sujette à une répression par le glucose. Afin d'explorer l'implication possible de SCO2127 et de Glk sur la répression observée sur la production d'actinorhodine, l'effet du glucose a été évalué chez *S. coelicolor* A3(2) M145 (souche sauvage) et chez un mutant nul dépourvu du gène *sco2127* ( $\Delta$ *sco2127*) construit à partir de la souche native. Comparativement à la souche M145, la production d'actinorhodine par le mutant était insensible à la répression par le glucose. Sous des conditions répressives, seules de petites différences entre les souches étaient trouvées sur le plan de l'utilisation du glucose et de la production de Glk. Par ailleurs, SCO2127 était principalement détectée au cours des premières 36 h de fermentation, juste avant le début de la production d'antibiotiques, et sa synthèse n'était pas liée à une source particulière de carbone. Le phénotype natif était restauré par une transformation de la souche mutante (production d'antibiotique résistant à l'effet glucose) avec un plasmide intégratif contenant *sco2127*. Nos résultats montrent que SCO2127 agit comme un régulateur négatif de la production actinorhodine et suggèrent que l'effet n'est pas dépendant de la glucose kinase.

**Mots-clés :** répression catabolique carbonée, production d'actinorhodine, *Streptomyces coelicolor*.

[Traduit par la Rédaction]

## Introduction

Streptomycetes are bacteria with high G+C content and a complex life cycle. They are important decomposers of organic material and often inhabit soil or decaying vegetation. Most streptomycetes produce secondary metabolites and are well-known for their distinctive "earthy" odor, which results from the production of the volatile metabolite geosmin. Pro-

duction of microbial secondary metabolites can be observed during growth on different carbon sources, and the production of most of these metabolites has been reported to be subject to carbon catabolite repression (CCR) (Sánchez et al. 2010).

*Streptomyces coelicolor* mutants resistant to growth inhibition exerted by 2-deoxyglucose (Dog<sup>r</sup>) are unable to utilize D-glucose and exhibit low or no glucose kinase (Glk) activity, and their synthesis of agarase and glycerol kinase is insensitive

Received 14 February 2012. Revised received 2 July 2012. Accepted 3 July 2012. Published at [www.nrcresearchpress.com/cjm](http://www.nrcresearchpress.com/cjm) on 10 October 2012.

A. Forero, M. Sánchez, A. Chávez, B. Ruiz, R. Rodríguez-Sanoja, L. Servín-González, and S. Sánchez. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, México.

**Corresponding author:** Sergio Sanchez (e-mail: [sersan@biomedicas.unam.mx](mailto:sersan@biomedicas.unam.mx)).

to CCR (Hodgson 1982; Kwakman and Postma 1994; Angell et al. 1992). This Dog<sup>r</sup> phenotype can be restored to wild type by transforming the mutant with a 2.9 kb *Bcl*I DNA fragment containing the *glkA* and *sco2127* genes (Ikeda et al. 1984). A derivative of the temperate phage  $\phi$ C31 containing *glkA* alone partially restores the wild-type phenotype when used to lysogenize a *S. coelicolor glk* null mutant with the Dog<sup>r</sup> phenotype. Complete restoration to the wild-type phenotype is observed with the temperate phage  $\phi$ C31 KC896 containing both *glkA* and *sco2127* genes (Angell et al. 1992), supporting the idea that both genes are involved in CCR.

In addition to the repression by glucose observed in the synthesis of agarase and glycerol kinase (Kwakman and Postma 1994), a lack of aerial mycelium formation is observed when *S. coelicolor* A3(2) is grown in the presence of elevated glucose concentrations (100 mmol·L<sup>-1</sup>) (Ueda et al. 2000). It has also been suggested that the *sco2127* gene product may be involved in this process (Chávez et al. 2011). Furthermore, in *S. coelicolor*, synthesis of the blue pigmented antibiotic actinorhodin is subject to glucose repression (Ates et al. 1997). The aim of this study was to explore the possible involvement of SCO2127 in catabolite regulation of actinorhodin production in *S. coelicolor*. The glucose repression of actinorhodin production was measured and compared in both a wild-type *S. coelicolor* strain and a *sco2127* null mutant ( $\Delta$ *sco2127*) derived from the wild-type strain. The glucose effect on antibiotic production was also correlated with Glk activity and glucose consumption levels in these strains. Finally, SCO2127 production was measured in cultures grown in the presence of repressive and nonrepressive carbon sources.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

*Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 (SCP1<sup>-</sup>, SCP2<sup>-</sup>, prototroph) was obtained from the John Innes Centre (Norwich, UK). The *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127* mutant was previously constructed from the wild-type strain (Chávez et al. 2011), using the PCR targeting procedure reported by Gust et al. (2002). The plasmid pSET2127 resulted from *sco2127* ligation to the pSET152 (Bierman et al. 1992) polylinker region. Previously, *sco2127* and its promoter were amplified using the cosmid St6E10 (John Innes Centre) as a template, using the oligonucleotides 5'-GGGGGCGATGGAACCCGCGGATCCCCG GAGCGCGGGCCCGTT-3' (forward) and 5'-CAGTCCAGG TCGATGCGCTGCCCCGGGCC-3' (reverse).

For seed cultures, approximately 10<sup>9</sup> spores (maintained in 20% glycerol) were used to inoculate 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of NMMP medium (Kieser et al. 2000) supplemented with 50 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol (M50). The seed cultures were incubated for 48 h at 29 °C under agitation (180 r·min<sup>-1</sup>; 1 r = 2πrad). The cells were collected by centrifugation (10 400g for 10 min), washed twice, and resuspended in 5 mL of saline solution (0.85% NaCl). For actinorhodin production, 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of sucrose-free R5 liquid medium (R5A) (Kieser et al. 2000) supplemented with various glucose concentrations were inoculated with 1 mL of the washed seed culture and incubated under similar conditions.

For studies of Glk synthesis, 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL NMMP medium supplemented with 2 different glucose concentrations were inoculated with 1 mL of

the washed seed culture and incubated under similar conditions. At desired incubation times, cells were collected in triplicate; cells grown in M50, a nonrepressive condition, were used as controls (van Wezel et al. 2007).

### Growth and glucose determination

At desired times, mycelium was collected by filtration (through Whatman No. 1 filters) from 5 mL fermentation samples and dried at 60 °C for 8 h before weighing. The glucose remaining in the culture medium was measured enzymatically, as previously described by Escalante et al. (1999).

### Enzyme assays

Glk activity was determined in cell-free extracts prepared from mycelial cultures of *S. coelicolor* M145 and  $\Delta$ *sco2127* strains. Enzyme activity was measured by monitoring the reduction of NADP in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-coupled reaction at pH 7.5 and 35 °C, as previously reported (Imriskova et al. 2005; Ramos et al. 2004).

### Actinorhodin and undecylprodigiosin determinations

Antibiotics were extracted from the R5A culture (2 mL). Total actinorhodin (blue pigment) was isolated with 2 mL of 3 mol·L<sup>-1</sup> KOH during a 12 h period under vigorous agitation (100 r·min<sup>-1</sup>) at 4 °C, as reported by Bystrykh et al. (1996). Extracted actinorhodin was read at 640 nm, and its concentration was calculated using an extinction coefficient of 25 320 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (Bystrykh et al. 1996). Undecylprodigiosin (red pigment) was extracted with methanol from acidified mycelium (1 mol·L<sup>-1</sup> HCl); its absorption was measured at 530 nm, and its concentration was calculated using an extinction coefficient of 100 500 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, as reported by Strauch et al. (1991).

### Immunoblotting

Supernatant samples of the crude extracts containing 15 μg of protein were subject to SDS-PAGE. The proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon P, Millipore), incubated with anti-SCO2127 antibodies and finally developed, as previously described by Chávez et al. (2011).

### Reproducibility of results

The experiments reported here were repeated at least once (2 independent experiments) in duplicate, and the results are given as the mean values. The observed variations were consistently <10%.

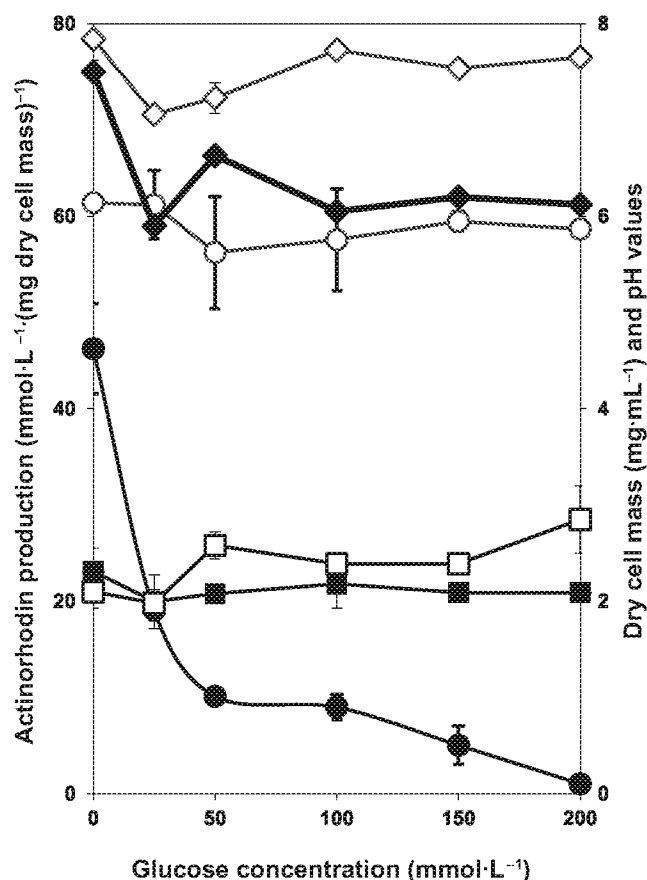
## Results

### Influence of glucose on actinorhodin production

*Streptomyces coelicolor* M145 wild-type strain and its  $\Delta$ *sco2127* mutant grew well and produced actinorhodin in R5A medium in the absence of glucose (Fig. 1). However, while actinorhodin production by the wild-type strain was strongly decreased in all glucose concentrations, antibiotic production by the mutant was insensitive to most of the glucose concentrations tested. Glucose (G50, 50 mmol·L<sup>-1</sup>) exerted almost 80% inhibition of actinorhodin production in the wild-type strain, and total inhibition was observed at a sugar concentration of 200 mmol·L<sup>-1</sup>. While these results were observed in 72 h cultures, similar results were observed in 48 and 96 h fermentations (not shown). At 72 h a 25% lower antibiotic production was visualized in the wild-type strain in



**Fig. 1.** Effect of different D-glucose concentrations on the specific production of actinorhodin (●, ○), growth (■, □), and final pH values (◆, ◇) in *Streptomyces coelicolor* M145 strain (solid symbols) and its  $\Delta sco2127$  mutant derivative (open symbols). Both strains were grown in R5A medium for 72 h at 29 °C.



the absence of glucose. This seems to be an intrinsic ability of the mutant to maintain its production for larger fermentation periods since at early fermentation times both, the wild-type strain and the mutant produced the same actinorhodin levels.

In addition, under the experimental conditions tested, no significant pH variations were observed in the wild-type strain when cultivated at various glucose concentrations, thereby eliminating decreases in pH as possible causes of the inhibition in actinorhodin production. Furthermore, the mutant growth was slightly better than the wild-type strain at all glucose concentrations. In contrast, undecylprodigiosin was not influenced by the presence of glucose in both strains (not shown).

#### Influence of SCO2127 on growth, glucose consumption, and Glk activity

To search for any correlation of the above phenotype with Glk and glucose utilization, both parameters were evaluated in the wild-type and mutant strains grown in a chemically defined NMMP medium (Kieser et al. 2000). The use of this medium was intended to avoid interference of the R5A medium components in glucose consumption and Glk activity. As shown in Figs. 2A and 2B, both strains grew well in this medium supplemented with M50, G50, or 100 mmol·L<sup>-1</sup> glucose (G100) concentrations, reaching stationary growth phase after 12 h of fermentation.

Rapid glucose consumption was observed in both strains (Figs. 2A and 2B) during the first 12 h, followed by a slower uptake phase. No significant pH variations were observed under these experimental conditions, eliminating pH decrease as a cause of CCR (not shown). As shown in Figs. 2C and 2D, Glk activity exhibited similar profiles in both strains under the tested conditions. The highest Glk activity was observed when the strains were grown in G100, with a maximum peak at 24 h incubation. Lower Glk values were observed in both strains grown in M50, and no significant variations were observed in enzyme activity levels during the course of fermentation. In a negative control experiment, a range of 6.0%–6.8% of the wild-type Glk activity value was detected in a  $\Delta glk$  null mutant, demonstrating the assay specificity.

#### Dynamics of SCO2127 synthesis and effect of different carbon sources on its production

To look for a possible specificity between glucose and SCO2127 production, the *S. coelicolor* M145 wild-type strain was grown in NMMP medium individually supplemented with G50, 50 mmol·L<sup>-1</sup> arabinose (A50), or M50. As shown in Fig. 3A, in all tested conditions, the strain reached the stationary growth phase after 12 h fermentation, and the particular carbon sources were mostly consumed. Figure 3B shows the actinorhodin produced in these carbon sources. In all conditions, antibiotic production initiated after 24 h, although higher levels were observed in the mannitol cultures. In contrast, lower antibiotic levels were observed in the glucose and arabinose fermentations. Figures 3C, 3D, and 3E shows the Western blot assay bands of SCO2127 (31 kDa) with their loading controls (Figs. 3C', 3D', and 3E') from cell extracts grown in glucose, mannitol and arabinose, respectively. Signals for SCO2127 were detected in all carbon sources tested at the various fermentation times, although only faint bands were observed in the glucose and mannitol cultures after 36 h incubation. Purified SCO2127 and extracts of a  $\Delta sco2127$  mutant were used as positive and negative controls (Fig. 3F).

#### Mutant complementation

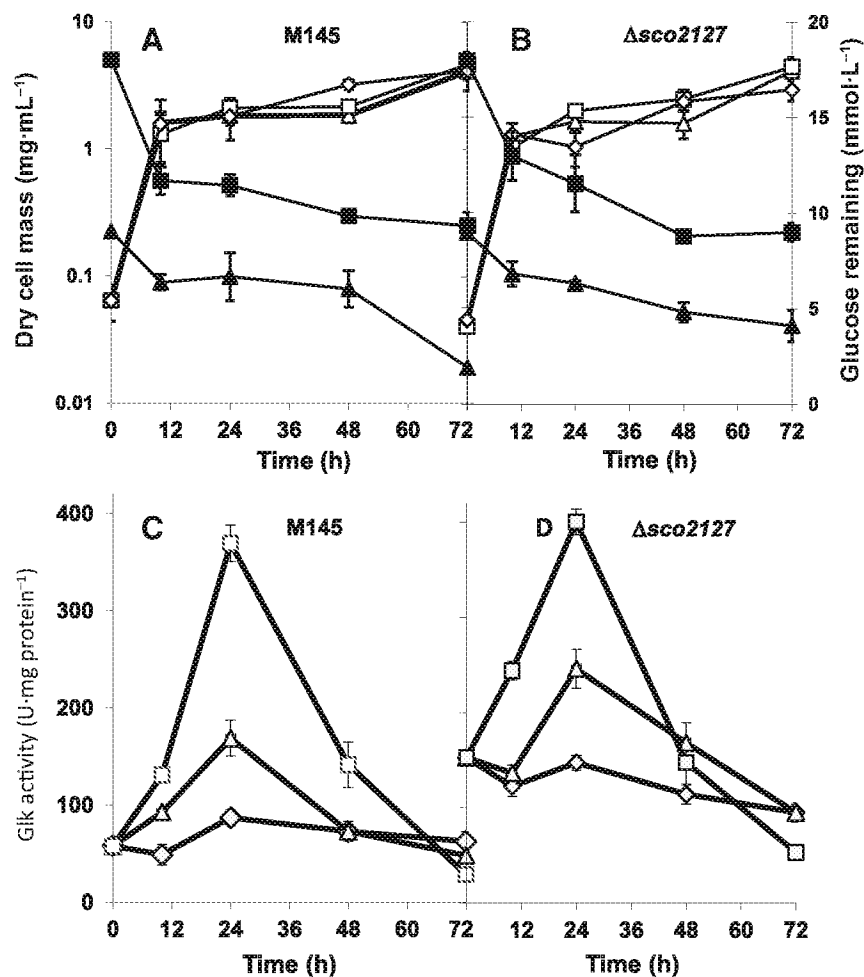
To verify that the glucose insensitivity of actinorhodin production by the mutant was solely due to the deletion of *sco2127*, the mutant was transformed with an integrative plasmid (pSET127) containing the *S. coelicolor* *sco2127* gene. In Table 1, as shown by the quantitative analysis of pigment production exhibited by  $\Delta sco2127$  in R5A medium with 2 glucose concentrations, the complemented mutant demonstrated fully restored sensitivity of antibiotic formation to these glucose concentrations, confirming that differences in the  $\Delta sco2127$  phenotype were indeed due to the deletion of *sco2127*.

#### Discussion

Previous studies in our (Guzmán et al. 2005; Chávez et al. 2011) and other laboratories (Kwakman and Postma 1994; Angell et al. 1992) have suggested the possible involvement of the *sco2127* gene product in CCR of various catabolic enzymes and aerial mycelium formation in *S. coelicolor*.

In the present work, actinorhodin production was found to be strongly suppressed by the presence of high glucose concentrations in the *S. coelicolor* wild-type strain grown in R5A medium. Conversely, antibiotic biosynthesis by the  $\Delta sco2127$  mutant was insensitive to glucose concentration, supporting a

**Fig. 2.** (A and B) Growth (open symbols) and remaining glucose (solid symbols) in *Streptomyces coelicolor* M145 and its  $\Delta sco2127$  mutant derivative, grown in NMMP medium containing 50 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol ( $\diamond$ ), 50 mmol·L<sup>-1</sup> glucose ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ), and 100 mmol·L<sup>-1</sup> ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) glucose. (C and D) Glucose kinase (Gik) activity values in *S. coelicolor* M145 and  $\Delta sco2127$  mutant grown in NMMP medium containing 50 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol ( $\diamond$ ), 50 mmol·L<sup>-1</sup> glucose ( $\triangle$ ), and 100 mmol·L<sup>-1</sup> ( $\square$ ) glucose.



**Table 1.** Effect of glucose on growth and antibiotic production in the complemented *Streptomyces coelicolor*  $\Delta sco2127$  mutant.

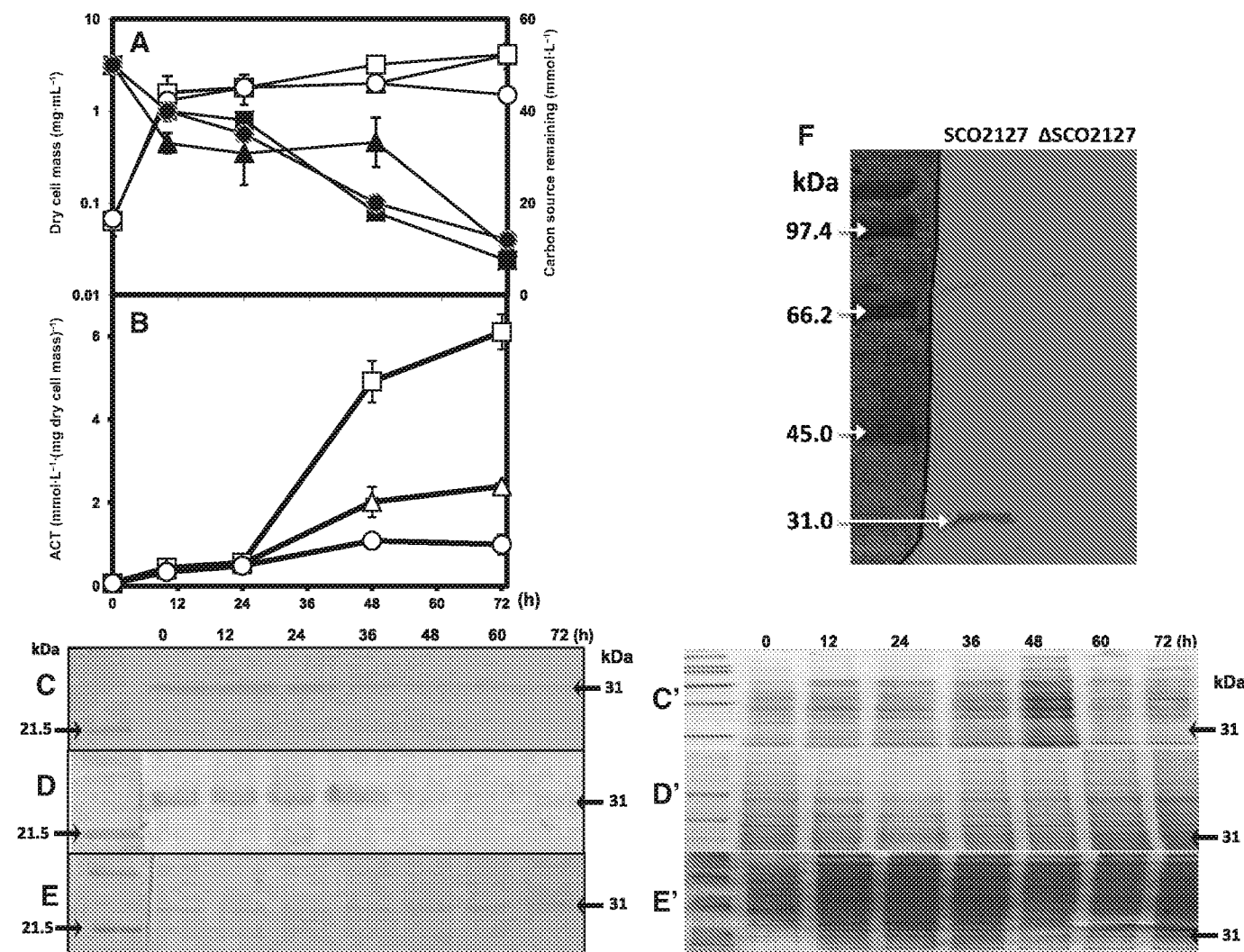
Strain	Glucose (mmol·L <sup>-1</sup> )	Final pH	Dry cell mass (mg·mL <sup>-1</sup> )	Actinorhodin (mmol·L <sup>-1</sup> ·(mg dry cell mass) <sup>-1</sup> )
M145	0	7.50±0.03	2.30±0.24	46.20±1.25
	50	6.60±0.04	2.00±0.06	10.10±0.23
	100	6.00±0.02	2.20±0.25	9.00±0.38
$\Delta sco2127$	0	7.30±0.22	2.10±0.17	61.40±0.03
	50	7.00±0.16	2.58±0.14	56.23±5.80
	100	6.90±0.00	2.39±0.09	57.56±0.38
$\Delta sco2127$ +pSET2127	0	6.80±0.18	1.48±0.40	46.50±0.39
	50	5.80±0.57	1.84±0.17	20.30±0.17
	100	5.30±0.06	2.58±0.00	14.20±0.00

**Note:** Strains were grown in R5A medium with 2 glucose concentrations and incubated for 72 h.

contribution of SCO2127 to the glucose suppressive effect on antibiotic production. In contrast, although calcium-dependent antibiotic levels were not determined, undecylprodigiosin was not influenced by the presence of glucose in M145 and the

$\Delta sco2127$  mutant. Previously, several research groups have demonstrated that undecylprodigiosin production is not influenced by the presence of glucose in culture media (Hobbs et al. 1990; Kang et al. 1998). Actinorhodin production insensitivity

**Fig. 3.** Dynamics of SCO2127 synthesis and its relation to growth and actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* M145. (A) Growth (open symbols), remaining carbon source (closed symbols) and (B) actinorhodin (ACT) production were determined in cells grown in NMMP medium containing 50 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol (□, ■), 50 mmol·L<sup>-1</sup> glucose (△, ▲), and 50 mmol·L<sup>-1</sup> arabinose (○, ●). (C, D, and E) Western blot assays showing 31 kDa SCO2127 bands obtained from crude extracts of *S. coelicolor* M145 grown in NMMP medium at 50 mmol·L<sup>-1</sup> glucose (C), 50 mmol·L<sup>-1</sup> mannitol (D), and 50 mmol·L<sup>-1</sup> arabinose (E) at different fermentation times and electrophoresed on SDS-PAGE (10%). Adjacent to the Western blot are the corresponding Coomassie-stained gels, used as loading controls (C', D', and E'). In panel F, the SCO2127 positive and negative controls are included.



to the presence of glucose by the  $\Delta sco2127$  mutant was also observed in a chemically defined NMMP medium. Under these growth conditions, the mutation does not seem to affect the overall metabolism of the cell, as no significant differences were found in the biomass produced by both strains when cultured in NMMP medium supplemented with M50, G50, or G100. Glucose consumption was similar when both strains were grown in the presence of this carbohydrate and exhibited a biphasic pattern. Thus, an early active uptake phase was observed, followed by low carbohydrate incorporation. In agreement with glucose utilization, a similar profile of Glk production was observed in both strains grown in the glucose concentrations tested.

Considering that both strains exhibited similar Glk production but only the mutant showed insensitivity to glucose repression, a role for this enzyme in the mechanism of

actinorhodin suppression can be ruled out. This role is different from the role of Glk in the glucose repression reported for agarase and glycerol kinase production (Kwakman and Postma 1994).

Unexpectedly, SCO2127 production was not exclusively related to glucose, and its synthesis was detected in the various carbon sources tested. In addition, SCO2127 was present mainly during the first 36 h in cells growing in G50 and M50, just before the onset of antibiotic production, suggesting that SCO2127 likely prevents actinorhodin formation during the earliest fermentation times. In contrast, only low actinorhodin production was detected in arabinose as the only carbon source, and this production correlated with the presence of SCO2127.

Analysis of the predicted SCO2127 amino acid sequence does not suggest the presence of DNA binding motifs. There-

fore, the mechanism underlying glucose suppression of actinorhodin production likely involves the binding of SCO2127 to other protein(s). We have previously reported that SCO2127 binds to SCO5113 (BldKB) (Chávez et al. 2011), a lipoprotein ABC-type permease (~66 kDa) involved in mycelium differentiation and potentially in actinorhodin production (Meng et al. 2011).

A regulatory protein involved in CCR of actinorhodin production has also been reported in *Streptomyces lividans*. In this microorganism, glucose inhibits antibiotic production by repressing the synthesis of *afsR2* mRNA, which encodes a global regulatory protein involved in the stimulation of secondary metabolite biosynthesis (Kim et al. 2001). As expected, no repression is observed when glycerol is substituted for glucose in this microorganism (Kim et al. 2001). As in *S. lividans*, this gene is necessary in *S. coelicolor* for actinorhodin production. Using 2-dimensional gel electrophoresis, it has recently been demonstrated that AfsR2 binds to SCO6569, suggesting that this protein is an AfsR2-dependent downregulator for actinorhodin biosynthesis in *S. coelicolor* (Lee et al. 2009). Searching for interactions or similarities between AfsR2 and SCO2127, we attempted either to detect binding between these proteins or to align their amino acid sequences using different programs. However, binding between SCO2127 and AfsR2 (by pull-down experiments) was not found (not shown), and no identity between these proteins was detected when their amino acid sequences were aligned using different programs (Clustal W, BL2seq, CLC Workbench, T-Coffee, and Muscle). Furthermore, homology between *sco2127* and *sco6569* was not detected when their DNA sequences were aligned, suggesting that SCO2127 is a new protein likely involved in glucose catabolite repression of actinorhodin production.

## Acknowledgements

We thank Marco Antonio Ortíz for strain preservation studies. We also thank Laura Escalante and Teresa Andrade for technical assistance. This work was supported by grant CB2008-100564-IIBO from CONACYT, Mexico, and PAPIIT, and grant IN209210 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México. Angela Forero is a doctoral student in "Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México."

## References

- Angell, S., Schwarz, E., and Bibb, J.M. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* **6**(19): 2833–2844. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb01463.x. PMID:1435260.
- Ates, S., Elibol, M., and Mavituna, F. 1997. Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* in batch and fed-batch cultures. *Process Biochem.* **32**(4): 273–278. doi:10.1016/S0032-9592(96)00071-4.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., and Schoner, B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, **116**(1): 43–49. doi:10.1016/0378-1119(92)90627-2. PMID:1628843.
- Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A., and Dijkhuizen, L. 1996. Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**(8): 2238–2244. PMID:8636024.
- Chávez, A., Forero, A., Sanchez, M., Rodríguez-Sanoja, R., Mendoza-Hernández, G., Servín-Gonzalez, L., et al. 2011. Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**(3): 799–806. doi:10.1007/s00253-010-2905-8. PMID:20922376.
- Escalante, L., Ramos, I., Imriskova, I., Langley, E., and Sanchez, S. 1999. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**(4): 572–578. doi:10.1007/s002530051562.
- Gust, B., Kieser, T., and Chater, K.F. 2002. REDIRECT<sup>®</sup> Technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. John Innes Centre, Norwich, England.
- Guzmán, S., Carmona, A., and Escalante, L. 2005. Pleiotropic effect of the *sco2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*, **151**(5): 1717–1723. doi:10.1099/mic.0.27557-0.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, C.J., Flett, F., and Oliver, S.G. 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol.* **136**(11): 2291–2296. doi:10.1099/00221287-136-11-2291.
- Hodgson, D.A. 1982. Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2417–2430.
- Ikeda, H., Seno, E.T., Bruton, C.J., and Chater, K.F. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**(3): 501–507. doi:10.1007/BF00436199. PMID:6094978.
- Imriskova, I., Arreguín-Espinosa, R., Guzmán, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., and Sanchez, S. 2005. Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* **156**(3): 361–366. doi:10.1016/j.resmic.2004.11.001. PMID:15808940.
- Kang, S.G., Jin, W., Bibb, M., and Lee, K.J. 1998. Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**(2): 221–226. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13277.x. PMID:9835032.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Kim, E.S., Hong, H., Choi, C.Y., and Cohen, S.N. 2001. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *J. Bacteriol.* **183**(7): 2198–2203. doi:10.1128/JB.183.7.2198-2203.2001. PMID:11244057.
- Kwakman, J.H., and Postma, P.W. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **176**(9): 2694–2698. PMID:8169219.
- Lee, H.N., Im, J.H., Lee, M.J., Lee, S.Y., and Kim, E.S. 2009. A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Process Biochem.* **44**(3): 373–377. doi:10.1016/j.procbio.2008.12.002.
- Meng, L., Yang, S.H., Palaniyandi, S.A., Lee, S.-K., Lee, I.-A., Kim, T.-J., and Suh, J.-W. 2011. Phosphoprotein affinity purification identifies proteins involved in S-adenosyl-L-methionine-induced enhancement of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*.

- J. Antibiot. **64**(1): 97–101. doi:10.1038/ja.2010.148. PMID: 21139623.
- Ramos, I., Guzmán, S., Escalante, L., Imriskova, I., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S., and Langley, E. 2004. The glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesi*us. Res. Microbiol. **155**(4): 267–274. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.004. PMID:15142624.
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., et al. 2010. Carbon source regulation of antibiotic formation. J. Antibiot. **63**(8): 442–459. doi:10.1038/ja.2010.78. PMID:20664603.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H.A., and Bibb, M.J. 1991. The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. **5**(2): 289–298. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb02109.x. PMID:1710311.
- Ueda, K., Endo, K., Takano, H., Nishimoto, M., Kido, Y., Tomaru, Y., et al. 2000. Carbon-source-dependent transcriptional control involved in the initiation of cellular differentiation in *Streptomyces griseus*. Antonie Van Leeuwenhoek, **78**(3–4): 263–268. doi: 10.1023/A:1010220614293. PMID:11386348.
- van Wezel, G., König, M., Mahr, K., Nothhaft, H., Thomae, A., Bibb, M., and Titgemeyer, F. 2007. A new piece of an old Jigsaw: glucose kinase is activated post-translationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **12**(1–2): 67–74. doi:10.1159/000096461. PMID:17183213.