



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *SCO2331*

EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *STREPTOMYCES COELICOLOR*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

IVONNE NOEMÍ ROBLEDO CASADOS



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

VOCAL: Profesor: Beatriz Ruíz Villafán

SECRETARIO: Profesor: Alba Icxih Romero Rodríguez

1er. SUPLENTE: Profesor: Aurora Lara Núñez

2° SUPLENTE: Profesor: Verónica Domínguez Valdez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Alba Icxih Romero Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

SUSTENTANTE:

Ivonne Noemí Robledo Casados

1. ÍNDICE GENERAL

1. ÍNDICE GENERAL
 - 1.1 ÍNDICE DE FIGURAS
 - 1.2 ÍNDICE DE TABLAS
 - 1.3 ÍNDICE DE GRÁFICAS
2. ABREVIATURAS
3. RESUMEN
4. INTRODUCCIÓN
 - 4.1 Características del género *Streptomyces*
 - 4.2 Metabolitos secundarios
 - 4.3 Cepa modelo *Streptomyces coelicolor*
 - 4.4 Metabolitos secundarios en *S. coelicolor*
 - 4.5 Factores del metabolismo primario involucrados en la biosíntesis de antibióticos
 - 4.5.1 Precursores de metabolitos secundarios modelo
 - 4.6 Regulación transcripcional
 - 4.7 Factores de transcripción en *Streptomyces*: estructura y clasificación
 - 4.8 Biosíntesis y regulación génica de antibióticos modelo
 - 4.9 Reguladores de la familia MarR
5. HIPÓTESIS
6. OBJETIVOS
 - 6.1 Objetivo general
 - 6.2 Objetivos particulares
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL
 - 7.1 Cepas y plásmidos
 - 7.2 Búsqueda *in silico* del gen que codifica a un regulador transcripcional tipo MarR
 - 7.3 Construcción de la mutante Δ sco2331 en *S. coelicolor*
 - 7.4 Cinéticas de crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M145 y Δ sco2331
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
9. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS
10. BIBLIOGRAFÍA
11. ANEXO DE RESULTADOS
12. ANEXO METODOLÓGICO

1.1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*. (Modificado de Liu *et al.*, 2013)

Figura 2. Unidades biosintéticas de undecilprodigiosina (Modificado de Cerdeño *et al.*, 2001).

Figura 3. Biosíntesis de actinorrodina (Fernández Moreno *et al.*, 1992; Fernández Moreno *et al.*, 1994; Modificado de Taguchi *et al.*, 2000). PKS: policétido sintasa; la numeración de las especies químicas se basa en el origen biosintético.

Figura 4. Distribución de familias de reguladores transcripcionales en genomas de *Streptomyces*, posiblemente involucrados en metabolismo primario (Grupo1) (Romero *et al.*, 2015).

Figura 5. Distribución de familias de reguladores transcripcionales en genomas de *Streptomyces*, posiblemente involucrados en la resistencia a xenobióticos y en la homeóstasis de metales (Grupo 2) (Romero *et al.*, 2015).

Figura 6. Representación del homodímero Sco5413. Las dos subunidades son distinguidas por los colores azul y amarillo, y la región de reconocimiento de DNA se muestra en magenta. Modificado de Holley *et al.*, 2013.

Figura 7. Organización típica del *locus* genómico que comprende el gen que codifica el homólogo MarR. Los genes se representan como flechas azules. La región intergénica entre los genes codificados divergentemente contiene el sitio de unión a DNA (Modificado de Grove, 2013).

Figura 8. En ausencia de ligando, el MarR (en verde) se une a la región intergénica, reprimiendo la expresión de ambos genes. En presencia del ligando, la unión al DNA es atenuada y los genes se expresan (Modificado de Grove, 2013).

Figura 9. Diagrama general del método de interrupción del genoma o PCR targetting. Modificado de Gust, *et al.*, 2002.

Figura 10. Mapa del plásmido pIJ773. Tomado de Gust *et al.*, 2002.

Figura 11. Esquema del diseño de oligonucleótidos para la amplificación del casete de resistencia a apramicina. Modificado de Gus *et al.*, 2002.

Figura 12. Gel de agarosa donde se observa las isoformas del plásmido pIJ773.

Figura 13. Comparación de la restricción de StC53 con BamHI *in silico* (izquierda) y experimental (derecha).

Figura 14. Casete de resistencia a apramicina..

Figura 15. Oligos diseñados para la amplificación del casete de resistencia a apramicina

Figura 16. Gel de agarosa donde se observa el producto de PCR de 1462 pb.

Figura 17. Digestiones *in silico* de cósmido silvestre e interrumpido en el programa ApE.

Figura 18. Gel de agarosa que muestra la digestión del cósmido mutante

Figura 19. Placa de MS con colonias resistentes a apramicina

Figura 20. Confirmación del fenotipo de las exconjugantes. Lado izquierdo de las placas corresponde a la cepa $\Delta sco2331$ y el lado derecho a la cepa M145 (silvestre).

Figura 21. PCR a partir de DNA genómico silvestre y de la posible mutante para corroborar el intercambio del gen *sco2331* por el casete de resistencia

Figura 22. Comparación después de 120 horas de incubación de la utilización de fuentes de carbono por las cepas silvestre (M145) y mutante ($\Delta sco2331$), se usaron galerías API® 20 C AUX con medio MM y púrpura de bromocresol (0.025 g /L).

Figura 23. Comparación después de 48 horas de incubación de la producción de metabolitos secundarios por las cepas silvestre (M145) y mutante $\Delta sco2331$, se usaron galerías API® 20 C AUX con medio API C.

Figura 24. Comparación de la producción de metabolitos secundarios de cepa silvestre y mutante en diferentes medios y fuentes de carbono.

Figura 25. Reacción llevada a cabo por el complejo acetilCoA deshidrogenasa.

Figura 26. Mapa metabólico donde se muestra la incorporación al metabolismo primario de las fuentes de carbono elegidas: glucosa, celobiosa, N-acetilglucosamina, glicerol, arabinosa, acetoína, glutamato. Con líneas punteadas se describe que existen más reacciones a las representadas. (Modificado de Centeno, 2014)

1.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de sistemas de regulación, factores transcripcionales y otros reguladores de respuesta en especies de *Streptomyces* como se muestra en la base de datos P2CS (<http://www.p2cs.org/>).

Tabla 2. Familias a las que pertenecen los reguladores transcripcionales en bacterias. Se describe la función que regulan generalmente mientras que en las siguientes columnas se resumen algunas funciones en *Streptomyces* y el dominio de unión a DNA.

Tabla 3. Miembros de la familia MarR descritos en *S. coelicolor* y sus funciones.

Tabla 4. Plásmidos y cepas.

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para comprobar la mutación.

Tabla 6. Fuentes de carbono y concentraciones usadas en cultivos líquidos.

Tabla 7. Lista de genes tipo MarR en el cuerpo de genoma de *S. coelicolor*, el gen que posiblemente regula y las funciones putativas.

Tabla 8. Productos de PCR secuenciados.

Tabla 9. Resultados cualitativos en producción de metabolitos en tiras **API® 20 C AUX**.

1.3 ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Rendimiento de RED en medio NMMP con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, $\Delta 2331$: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa. (mM RED/ g de biomasa)

Grafica 2. Rendimiento de RED en medio R2Y con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, $\Delta sco2331$: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa. (mM RED/ g de biomasa)

Grafica 3. Rendimiento de ACT en medio NMMP con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, $\Delta sco2331$: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa. (mM ACT/ g de biomasa)

Grafica 4. Rendimiento de ACT en medio R2Y con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, $\Delta sco2331$: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa (mM ACT/g de biomasa)

Gráfica 5. Rendimiento de RED respecto a biomasa en medio NMMP 100 mM GLC. (mM RED/g de biomasa)

Gráfica 6. Rendimiento de RED con respecto a biomasa en medio NMMP 10 mM ACET. (mM RED/g de biomasa).

Gráfica 7. Rendimiento de ACT con respecto a biomasa en medio NMMP con 100 mM GLC. (mM ACT/g de biomasa).

Gráfica 8. Rendimiento de ACT respecto a biomasa en medio NMMP 10 mM ACET. (mM ACT/g de biomasa)

2. ABREVIATURAS

ABC transportador: transportador ATP binding cassette.

AbsA2: represor global de la síntesis de antibióticos.

ACET: acetoína.

ACT: actinorrodina.

actII-ORF4: activador específico de biosíntesis de ACT.

Acetil-CoA: acetil coenzima A.

AdpA: regulador pleiotrópico del desarrollo y producción de antibióticos.

AfsQ1: activador de la respuesta a nitrógeno.

antibiótico^R: resistencia a antibiótico.

antibiótico^S: sensible a antibiótico.

ApE: Editor de plásmidos.

Apra: apramicina

ARA: arabinosa.

AtrA: activador transcripcional asociado al metabolismo de la acetil-coA

BLAST: Basic alignment search tool.

CDA: metabolito dependiente de calcio.

CEL: celobiosa.

DasR: proteína responsable en la formación del micelio aéreo y esporas.

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA (medio de cultivo): Agar nutritivo Difco.

DraR: activador de la respuesta a nitrógeno.

E. coli: *Escherichia coli*.

GLC: glucosa.

GLU: glutamato.

GLY: glicerol.

HTH: dominio de unión a DNA, hélice-giro-hélice.

Kan: kanamicina.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

LB: Medio Luria Bertani.

LexA: regulador global de la respuesta al daño del DNA.

M: molar

M145: *Streptomyces coelicolor*, cepa silvestre.

MAN: manitol.

MarR: Regulador de resistencia a antibióticos.

Mbp: Mega pares de bases.

mg: miligramo

mL: mililitro

MM: metilenomicina.

mM: milimolar

MS: Agar manitol y harina de soya.

NAC: N-acetilglucosamina.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

nm: nanómetro

NMMP: Medio mínimo líquido.

No. : número

OhR: Regulador transcripcional a las especies reactivas de oxígeno.

oriT: Origen de transferencia.

pb: pares de bases nitrogenadas.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PKS: policétido sintasa.

RED: undecilprodigiosina.

RedD: Activador de genes biosintéticos de undecilprodigiosina.

RedZ: Regulador de la síntesis de actinorrodina.

RNA: ácido ribonucleico

Rok7B7: represor del operón de xilosa.

rpm: revoluciones por minuto.

S. coelicolor: *Streptomyces coelicolor*

SARP: proteína reguladora de antibióticos.

Sav: *Streptomyces avermitilis*.

Sco: *Streptomyces coelicolor*.

SCP1 y SCP2: plásmidos.

Sg1: *Streptomyces griseus*.

TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

TSB: Medio triptona y extracto de soya.

wHTH: dominio de unión a DNA, ala hélice giro hélice.

WT: wild type, cepa silvestre.

Δsco2331: Cepa *Streptomyces coelicolor* mutante, interrupción en el gen *sco2331*.

μg: microgramo

μL: microlitro

μM: micromolar.

3. RESUMEN

Streptomyces y otras actinobacterias son reconocidas como una rica fuente de productos naturales para aplicaciones en clínica, en biotecnología y en agricultura. Han sido explotados con renovado vigor gracias a la información que ofrece la secuenciación del genoma, la cual ha revelado la capacidad de codificar metabolitos secundarios con actividades biológicas por ejemplo, antibióticos.

La secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor* A3 ha puesto de manifiesto gran cantidad de información, resaltando que 400 Kb (más de 20 clusters) están relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Y también ha resaltado la gran diversidad de moléculas reguladoras (alrededor del 12% del genoma) (Bentley *et al.*, 2002), incluyendo proteínas de familias como: LysR, LacI, ROK, GntR, TetR, IclR, AraC, AsnC y MarR. No obstante, de estos muy pocos (aproximadamente el 8%) han sido caracterizados. *Streptomyces coelicolor* contiene 42 reguladores putativos tipo MarR (Bentley *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2010), esta familia abarca proteínas críticas en el control del estrés oxidativo y el catabolismo de compuestos aromáticos, además tiene diversos roles fisiológicos como sensor los cambios ambientales (Wilkinson & Grove, 2006).

A partir de un análisis *in silico* de los reguladores transcripcionales tipo MarR, se eligió al gen *sco2331*, que podría estar involucrado en el metabolismo secundario de *S. coelicolor*. El gen *sco2331* no ha sido estudiado previamente, por lo que resulta un buen blanco para analizar el efecto de su interrupción sobre la producción de dos de los antibióticos, undecilprodigiosina y actinorrodina.

Las consecuencias fenotípicas de la mutación se evaluaron en medio mínimo (NMMP) y medio para producción de metabolitos secundarios (R2Y) con diferentes fuentes de carbono, destacando el rendimiento respecto a la biomasa de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio con glucosa y acetoína, donde la mutante (Δ *sco2331*) sobreproduce ambos antibióticos.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Características del género *Streptomyces*

Los estreptomicetos son bacterias Gram positivas, pertenecientes al orden Actynomycetales, saprófitas, estrictamente aerobias, se les puede encontrar en diversos ecosistemas y poseen un alto contenido de G-C (aproximadamente 70%) en su genoma. Al presentarse limitación de nutrientes, los estreptomicetos se diferencian formando micelio aéreo y esporas, las cuales surgen de la septación del micelio aéreo y sirven para su reproducción. Algunas señales necesarias para el ciclo de vida, son compartidas para la producción de metabolitos; el inicio de la biosíntesis está precedida por el desarrollo de la hifa aérea en medios sólidos o la fase estacionaria en cultivos líquidos (Bibb, 2005). Los estreptomicetos continúan siendo fuentes prolíficas de nuevos metabolitos, los cuales tienen una amplia gama de actividades biológicas y aplicación como agentes anti-infecciosos, agentes contra el cáncer u otros compuestos farmacéuticamente útiles (Demain & Sánchez, 2009; Sánchez & Demain, 2015; Bibb, 2005). La producción de estos productos naturales es a menudo controlada por sistemas de regulación sutiles y precisos (Bibb, 2005).

4.2 Metabolitos secundarios

Los compuestos que son producidos por bacterias generalmente se dividen en metabolitos que son esenciales para el crecimiento vegetativo (primarios) y los no esenciales (secundarios). Los metabolitos primarios son intermediarios o productos finales de las rutas del metabolismo, subunidades de macromoléculas esenciales, o coenzimas. Los metabolitos secundarios aparentemente no tienen ninguna función en el crecimiento de los microorganismos que los producen, aunque si juegan un papel importante para la supervivencia y competencia del organismo productor en la naturaleza. Los metabolitos secundarios son extremadamente importantes para la salud del ser humano, por ser un grupo que engloba fármacos, bioplaguicidas, antibióticos, etc. (Demain, 2000); de estos últimos, al menos dos tercios de los que tienen un origen natural provienen de estreptomicetos (Berdy, 2005). La búsqueda de nuevos antibióticos continúa, actualmente existe una gran corriente por estudiar no solo los metabolitos ya conocidos y sus vías de biosíntesis sino que mediante el uso de herramientas bioinformáticas se buscan nuevos clústeres que codifiquen para metabolitos desconocidos (Martin & Liras, 2010)

4.3 Cepa modelo *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor se adoptó como modelo para el estudio de los estreptomicetos por su capacidad para producir dos antibióticos pigmentados: actinorrodina [ACT] y undecilprodigiosina [RED] (Liu *et al.*, 2013). Junto con *Streptomyces avermitilis*, es el estreptomiceto mejor caracterizado a nivel bioquímico, fisiológico y genético.

La secuenciación del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* A3, reveló la presencia de un solo cromosoma lineal, cuyo tamaño de DNA es de 8.66 Mbps con un alto contenido (72.1%) de GC. Codifica para 7769 genes y 56 pseudogenes (Bentley *et al.*, 2002). El genoma contiene una región central flanqueada por dos brazos sujetos a intensa variabilidad genética. La región central (aproximadamente 6.5 Mb) está altamente conservada y los genes que están localizados en esta región son esenciales para la vida de la bacteria (Ikeda *et al.*, 2003). Hoy en día, al crecer el número de cromosomas de *Streptomyces* que han sido secuenciados, ha quedado claro que todos ellos comparten estas características en su genoma. Adicionalmente, la alta producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica son procesos complejos altamente regulados por un gran conjunto de genes reguladores. Tan sólo *S. coelicolor* contiene alrededor de 965 proteínas putativas reguladoras, que representan aproximadamente el 12.3% del total de cromosoma (Bentley *et al.*, 2002), constituyendo redes altamente reguladas que controlan la expresión génica en esta bacteria (Bentley *et al.*, 2002, Romero *et al.*, 2015)

4.4 Metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*

S. coelicolor produce cuatro antibióticos principales que han sido objeto de estudio: la actinorrodina (ACT, llamada comúnmente pigmento azul), undecilprodigiosina (RED, pigmento rojo), metilenomicina (MM, codificada en el plásmido SCP1) y un metabolito dependiente de calcio (CDA) (Ver Figura 1). De los cuatro, el más estudiado es la actinorrodina, un compuesto de color azul pH dependiente, que pertenece a una clase de policétidos aromáticos, denominados benzoisocromaquinonas. Su vía de biosíntesis se encuentra codificada en un cluster de 22 genes (Fernández Moreno *et al.*, 1992; Fernández Moreno *et al.*, 1994; Taguchi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2013). La undecilprodigiosina (RED) es otro de los mejores caracterizados, es un tripirrol hidrofóbico codificado por un cluster de 23 genes (Cerdeño *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2009)

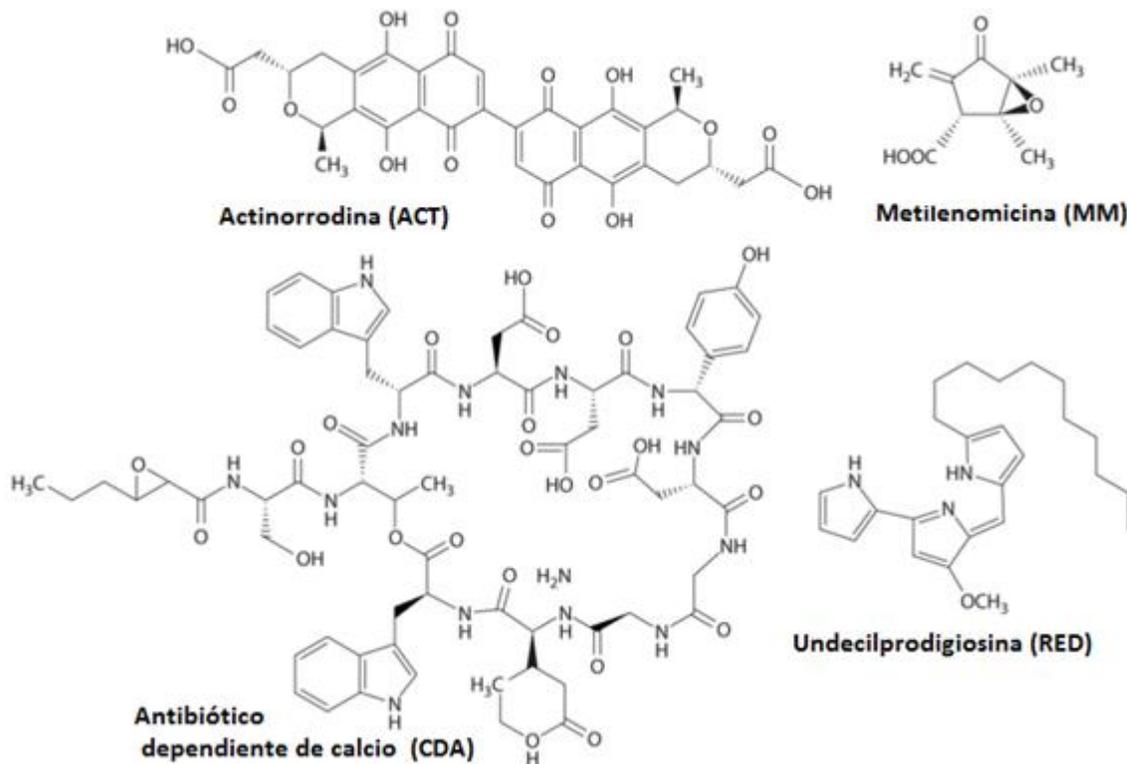


Figura 1. Principales metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*. (Modificado de Liu *et al.*, 2013)

Para el presente estudio nos enfocamos en la undecilprodigosina y la actinorrodina, que además de ser los antibióticos mejor caracterizados y estudiados, son fáciles de seguir y medir su producción en cinéticas de crecimiento, siendo la ACT la que se produce en mayor proporción (Liu *et al.*, 2013)

4.5 Factores del metabolismo primario involucrados en la biosíntesis de antibióticos

La síntesis de antibióticos es un proceso muy controlado con muchas entradas reguladas, tales como el metabolismo general, el estado nutricional (Rigali *et al.*, 2008; Hindra, 2010) y las concentraciones de las moléculas señalizadoras (γ -butirolactonas) (Takano, 2006; Park & Elliot, 2010).

En el proceso de biosíntesis de metabolitos secundarios, como la actinorrodina y la undecilprodigosina, el cambio entre la fase exponencial del crecimiento y la fase estacionaria, donde se lleva a cabo la producción de estos metabolitos, se acompaña de la intervención de una serie de interruptores transcripcíonicos y proteómicos, que conducen a la

redirección del carbono para la síntesis de estos compuestos (Nieselt *et al.* 2010; Thomas *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2010; Coze *et al.* 2013).

4.5.1 Precursores de los metabolitos secundarios undecilprodigosina y actinorrodina.

Los precursores de las vías de síntesis de metabolitos secundarios descienden del flujo metabólico primario; por ejemplo, los precursores de RED (Ver Figura 2) son: dos unidades de prolina, un derivado cíclico del glutamato, el cual tiene como precursor el α -cetoglutarato; serina que proviene del 3-fosfoglicerato; glicina, un derivado de la serina y varias unidades de acetato (Cerdeño *et al.*, 2001). Por lo anterior se deduce que los principales intermediarios provienen del ciclo de Krebs, la glucólisis y la vía del acetato/malonato (síntesis de ácidos grasos). Con esto queremos destacar el papel que juega la fuente de carbono y la influencia de esta en la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

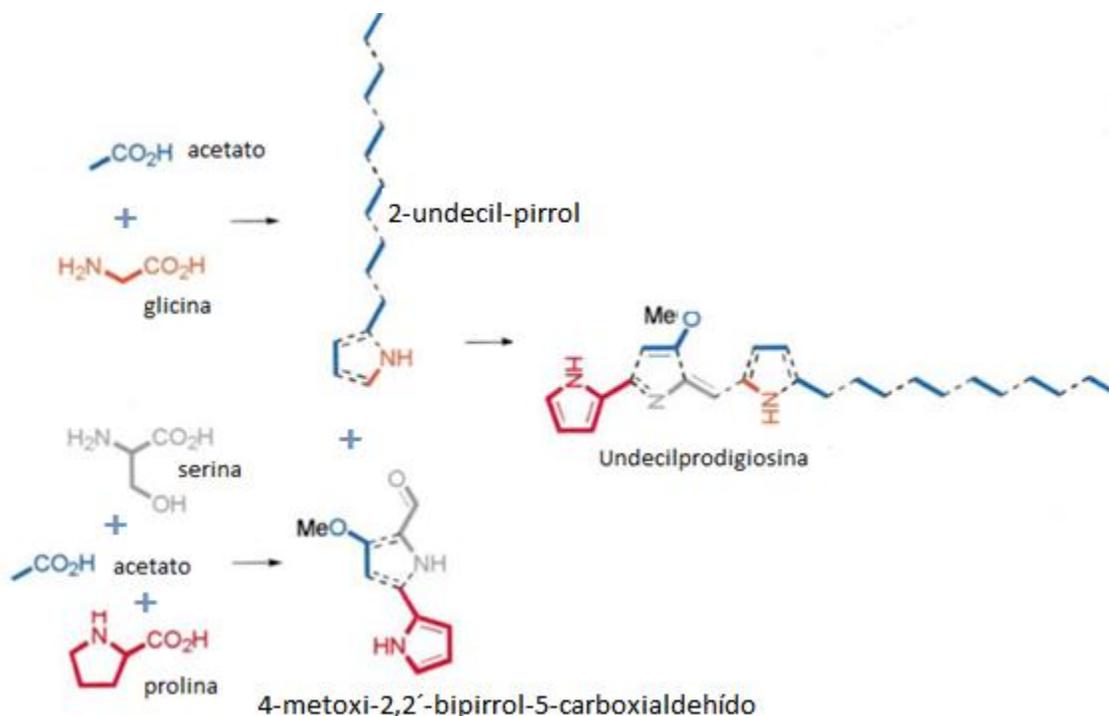


Figura 2. Unidades biosintéticas de undecilprodigosina (Modificado de Cerdeño *et al.*, 2001).

La acetil-CoA es la fuente de las unidades de carbono para la biosíntesis de muchos compuestos policétidos (Banchio *et al.*, 2002, Coze *et al.*, 2013), tal es el caso de la actinorrodina, que utiliza el malonil-CoA como precursor (Figura 3), el cual es un producto de la actividad de acetil-CoA carboxilasa. Cabe mencionar que en cepas sobreproductoras de antibióticos, modificadas por ingeniería genética, existe acumulación de acetil-CoA (Ryu *et*

al., 2006; Borodina *et al.*, 2008). Por otro lado, el NADPH, un agente reductor utilizado en el proceso de biosíntesis de metabolitos secundarios parece aumentar la producción de estos (Borodina *et al.*, 2008).

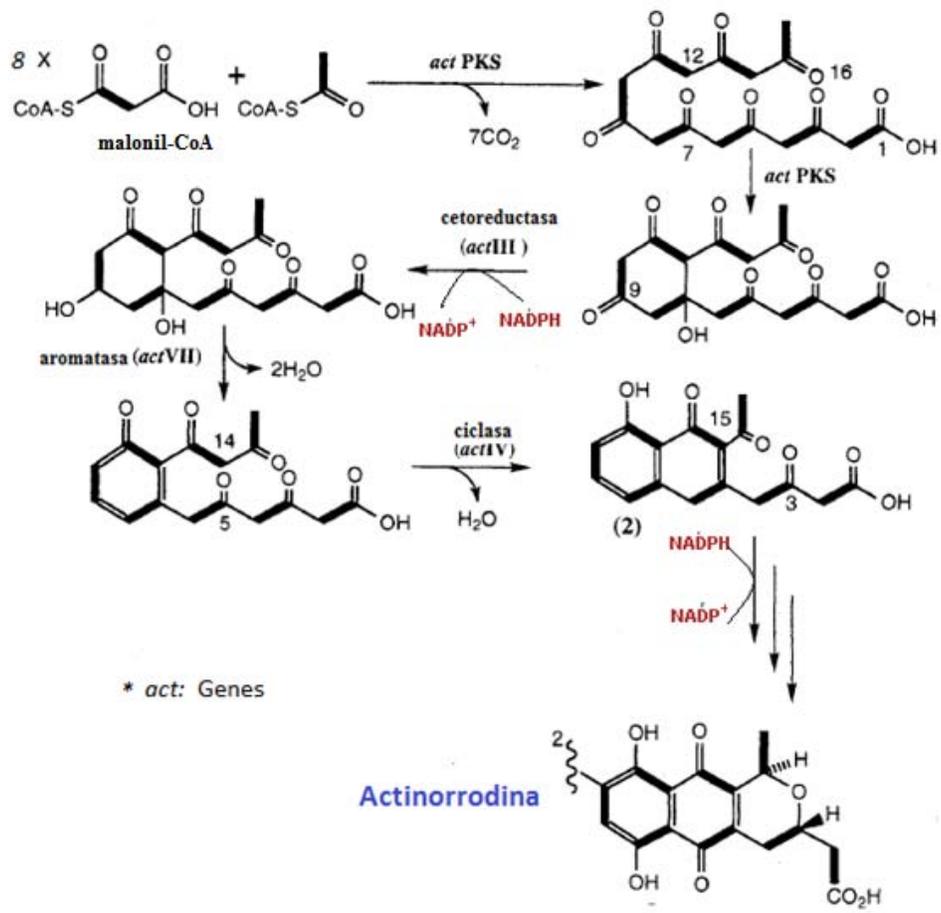


Figura 3. Biosíntesis de actinorrodina (Fernández Moreno *et al.*, 1992; Fernández Moreno *et al.*, 1994; Modificado de Taguchi *et al.*, 2000). PKS: poliketido sintasa; la numeración de las especies químicas se basa en el origen biosintético.

Un ejemplo particular es el caso de los cultivos de *S. coelicolor* en un medio con glucosa, donde se encuentran productos metabólicos como piruvato, acetato, succinato, lactato, formiato, gluconato y acetoína (Melzoch *et al.*, 1997); estos productos metabólicos son los que mantienen el flujo metabólico para el crecimiento y producción de metabolitos secundarios.

La acetoína (3-hidroxi-2-butanona) es un producto metabólico importante producido por varios organismos que crecen en un nicho que contiene glucosa u otras fuentes fermentables de carbono (Huang *et al.* 1999; Lopez *et al.* 1975; Xiao & Xu, 2007). El organismo Gram positivo en que se ha estudiado mejor el metabolismo de acetoína es *Lactobacillus*. Altas

concentraciones de piruvato son necesarias para formar acetoina. La acetoina no se acumula intracelularmente, ya que es un compuesto neutral y es permeable para la membrana (Tsau, *et al.*, 1992). La biosíntesis de acetoina también funciona como una estrategia de almacenamiento de energía (Johansen *et al.*, 1975; Mayer *et al.* 1995) ya que su producción y excreción se lleva a cabo en la fase exponencial del crecimiento. Una vez que las fuentes preferenciales de carbono se han terminado y el cultivo entra en la fase estacionaria de su crecimiento, la acetoina puede ser usada para mantener la densidad del cultivo (Xiao & Xu, 2007). Cuando el organismo crece aeróbicamente, la producción de acetoina aumenta, incluso en ausencia de piruvato exógeno (Tseng *et al.*, 1991; Tsau, *et al.* 1992).

La transformación reversible entre acetoina y piruvato implica la conversión de NAD^+/NADH . Por lo que estas reacciones son un mecanismo de destoxificación y homeostasis del pH (Tsau *et al.*, 1992). Lo anterior está reportado para *Bacillus*, en el caso de *Streptomyces* no existen reportes.

4.6 Regulación transcripcional

Las bacterias deben monitorear continuamente tanto su entorno como su estado fisiológico y reaccionar de forma apropiada al mismo. Grupos de genes involucrados en el metabolismo, incluidos los de metabolismo secundario responden a estas señales, con el fin de adaptarse con eficacia (Bibb, 2005; Camilli & Bassler, 2006).

La regulación en el inicio de la transcripción es probablemente el nivel más común en las adaptaciones metabólicas de las bacterias. En este mecanismo, los principales actores son proteínas capaces de unirse al DNA con el fin de reprimir o activar la transcripción de un gen. La unión de estas proteínas, conocidas como factores de transcripción (TFs), a un promotor específico, podría resultar en la activación o represión de la iniciación de la transcripción (Ishihama, 2010). Un activador estimula la expresión de sus genes diana, generalmente, mediante la mejora de la afinidad o reconocimiento de los promotores de la RNA polimerasa. Un factor transcripcional actúa como un represor ya sea por unión al DNA para prevenir que la RNA polimerasa inicie la transcripción o interactuando con la RNA polimerasa para prevenir la transcripción (Browning & Busby, 2004).

Generalmente se puede clasificar a los TFs como sistemas de uno o dos componentes. Los sistemas de dos componentes consisten en un sensor usualmente unido a una cinasa de membrana, y una proteína de unión a DNA conocida como regulador de respuesta, el cual generalmente es codificado por genes vecinos. La mayoría de las cinasas de membrana tienen un dominio extracelular que detecta diversos estímulos ambientales, los cuales autofosforilan una histidina, por lo que también pueden conocerse como histidina-cinasas. Una vez que la histidina cinasa está “activada”, es capaz de transferir el grupo fosforilo a su regulador de respuesta objetivo, que a su vez activa y/o reprime la transcripción de los genes objetivos (Podgornaia & Laub, 2013). En las bacterias, el número de cinasas de membrana y los reguladores de respuesta parecen estar correlacionados con el número de estímulos ambientales a los que el organismo está expuesto, así como con el tamaño de su genoma (Casino *et al.*, 2010; Cheung & Hendrickson, 2010). Por lo que los miembros del género *Streptomyces*, cuyo tamaño de genoma está en un rango entre 6 y 12 Mbp, tienen un 25% más reguladores de dos componentes que el promedio de las bacterias de vida libre no patógenas (Romero *et al.*, 2015) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de sistemas de regulación, factores transcripcionales y otros reguladores de respuesta en especies de *Streptomyces* como se muestra en la base de datos P2CS (<http://www.p2cs.org/>)

Organismo	Tamaño del genoma Mb	Factores de transcripción			
		Total	Reguladores transcripcionales	Sistemas de un componente	Reguladores de respuesta de unión a DNA*
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	9.02	688	433	129	64
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8.67	795	499	155	77
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	8.54	649	408	122	66

(* Proteína de unión a DNA que forma parte de los TF de dos componentes.)

Los sistemas de un componente parecen ser los sistemas de transducción más comunes en procariotas. Se han reportado 17,000 sistemas de un componente *versus* 4,000 miembros

con sistema de dos componentes (Ulrich *et al.*, 2005). Esta condición es posiblemente debida a que los sistemas de un componente parecen responder más rápidamente a los desafíos ambientales. Los sistemas de un componente se definen como proteínas que contienen dominios de entrada y salida, similares a los de los sistemas de dos componentes, por lo tanto pueden detectar estímulos similares y provocar respuestas celulares similares, pero que carecen de histidina cinasa y dominios de receptor (Ulrich *et al.*, 2005).

4.7 Factores de transcripción en *Streptomyces*: estructura y clasificación

De manera especial, el género *Streptomyces* es uno de los grupos de bacterias que codifica para un mayor número de reguladores que otros grupos (Yang *et al.*, 2009). No obstante, la existencia de reguladores desconocidos o putativos, su gran diversidad y complejidad son obstáculos para la plena comprensión del papel regulatorio que tienen éstos en las vías de producción de antibióticos (Yang *et al.*, 2010)

Los diferentes tipos de TFS tienen estructuras 3D distintas, con la única característica en común de unirse al DNA de doble cadena (Minezaki *et al.*, 2005). El dominio hélice-girohélice (HTH) es la estructura de unión a DNA más común en los factores de transcripción bacterianos. Los reguladores transcripcionales bacterianos se clasifican sobre la base de similitud de secuencias de sus dominios de unión al DNA, y con base en criterios estructurales y funcionales, produciendo familias (Ramos *et al.*, 2005). Cerca de 50 familias de TFs bacterianas se han reportado a la fecha (Rodionov, 2007). En lo que respecta al género *Streptomyces*, sus reguladores transcripcionales se agrupan en por lo menos 20 familias. En la Tabla 2 se enumeran algunas de las familias más importantes de TFS y los diferentes motivos de unión al DNA, también se puede distinguir si los miembros de la familia son preferentemente represores o activadores y si muestran una doble acción. Por ejemplo, la familia MarR son proteínas involucradas en vías catabólicas, resistencia a estrés y producción de antibióticos, cuyo motivo de unión a DNA es wHTH.

Tabla 2. Familias a las que pertenecen los reguladores transcripcionales en bacterias. Se describe la función que regulan generalmente, mientras que en las siguientes columnas se resumen algunas funciones en *Streptomyces* y el tipo de dominio de unión a DNA (Romero *et al.*, 2015).

Familia	Acción	Funciones que regulan generalmente	Funciones descritas de regulación en <i>Streptomyces</i>	Dominio de unión a DNA
AraC	Activador	Metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis	Metabolismo de carbon y diferenciación morfológica	HTH
AsnC	Activador/ Represor	Biosíntesis de aminoácidos	Control catabólico de tirosina	HTH
DeoR	Represor	Metabolismo de azúcares	Desarrollo morfológico y control de antibióticos	HTH
GntR	Represor	Metabolismo general	Metabolismo central del carbono, formación de micelio y control de metabolitos secundarios	HTH
IclR	Activador/ represor	Metabolismo de carbono, bombas de excreción	Esporulación	HTH
Lacl	represor	Utilización de fuentes de carbono	Metabolismo del carbono	HTH
LuxR	Activador	<i>Quorum sensing</i>	Producción de metabolitos secundarios	HTH
LysR	Activador/ represor	Metabolismo de carbono y nitrógeno	Producción de metabolitos secundarios	HTH
MarR	Activador/ represor	Resistencia a múltiples antibióticos	Vías catabólicas centrales, Resistencia a estrés oxidativo y producción de antibióticos	wHTH
MerR	represor	Resistencia y detoxificación		wHTH
PadR	represor	Respuesta a estrés por ácidos fenólicos, bombas de excreción	Diferenciación morfológica	wHTH
Rok	Activador/ represor	Metabolismo de carbono	Metabolismo del carbono	HTH
SARP	Activador	Producción de antibióticos	Metabolismo secundario	wHTH
TetR	represor	Biosíntesis de antibióticos, bombas de eflujo, estrés osmótico	Resistencia a antibióticos	HTH
WhiB	represor	Esporulación	Esporulación y segregación del cromosoma	HTH
Xre	Represor	Controla el número de copias de plásmido	Desarrollo morfológico	HTH

(HTH: hélice giro hélice; wHTH: ala hélice giro hélice)

Con la finalidad de encontrar relaciones estructura-función se realizaron análisis estadísticos y funcionales de las familias de TFs y estos fueron divididos en dos grupos. El grupo 1 se encuentra constituido por las familias AraC, AsnC, DeoR, GntR, IclR, LacI y LuxR mientras que en el grupo 2 se incluyen ArsR, MarR, MerR y Xre (Figura 4) (Romero, 2014). Por lo tanto, el primer grupo de reguladores se compone de reguladores básicos del metabolismo primario, es decir, TFs implicados mayormente en la transcripción de genes necesarios para metabolismo básico de las células, incluyendo el crecimiento, la reproducción y la comunicación. El segundo grupo comprende TFs implicados, ya sea en la homeostasis de metales en el organismo, respuesta al estrés (Santos *et al.*, 2009), resistencia a xenobióticos, producción de metabolitos secundarios y/o diferenciación morfológica.

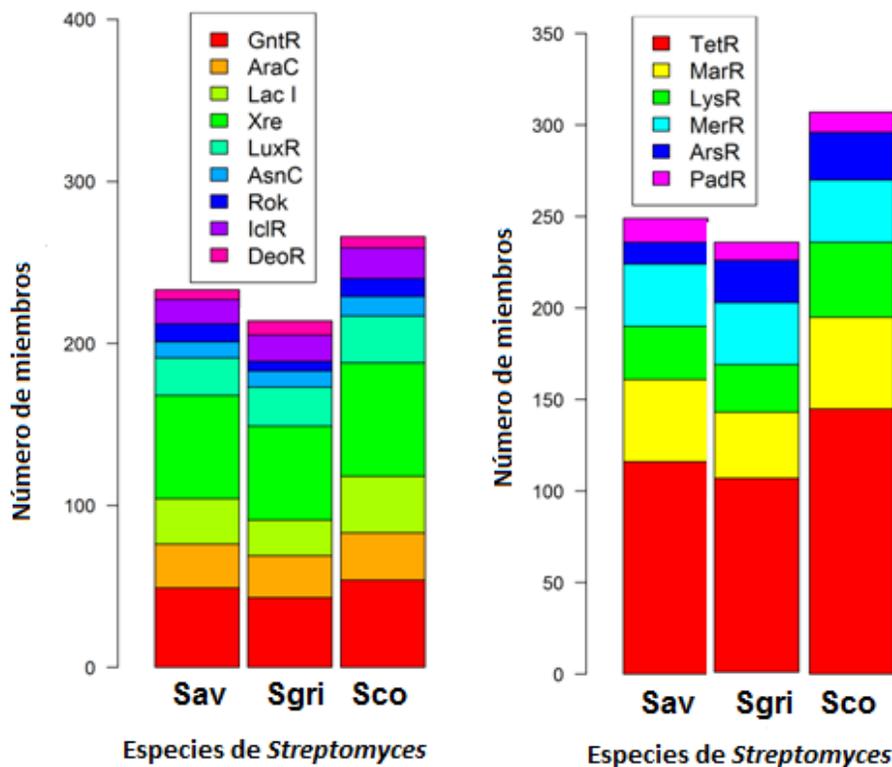


Figura 4. Distribución de familias de reguladores transcripcionales en genomas de *Streptomyces*. Izquierda: involucrados en metabolismo primario (Grupo1). Derecha: posiblemente involucrados en la resistencia a xenobióticos y en la homeóstasis de metales (Grupo 2) (Romero *et al.*, 2015).

Figura 4. Distribución de las familias de reguladores transcripcionales en genomas de *Streptomyces*.
Sav: *Streptomyces avermitilis*; Sgri: *Streptomyces griseus*; Sco: *Streptomyces coelicolor*

Los reguladores transcripcionales putativos anotados en *S. coelicolor* (965 en total) solo se clasifican en las siguientes familias: ArsR, AsnC, GntR, HxlR, IclR, Lac I, LuxR, LysR, MarR, MerR, PadR, ROK, TetR, SARP, WhiB y Xre; en la figura 5 se muestra la distribución de estos. Las familias con más miembros son: TetR, GntR y MarR y de éstas GntR y TetR son las más estudiadas.

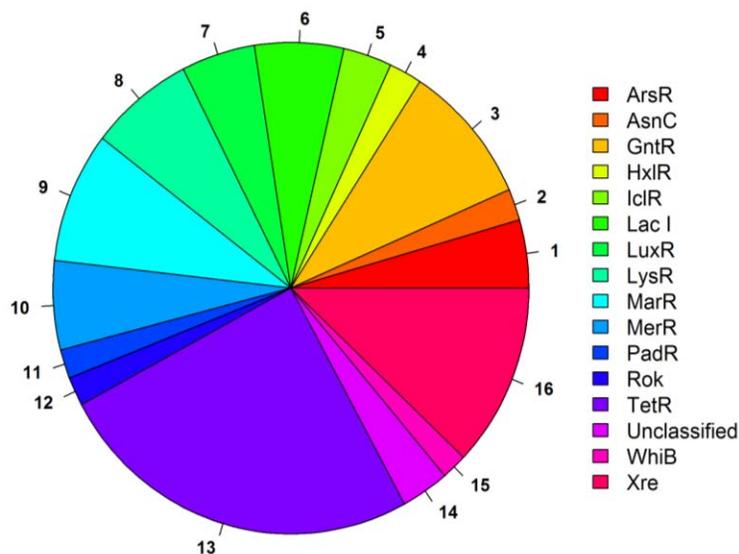


Figura 5. Distribución de familias de reguladores transcripcionales en el genoma de *S. coelicolor*.

4.8 Biosíntesis y regulación génica de antibióticos modelo

La producción de antibióticos es objeto de múltiples niveles de regulación génica. El primer nivel funciona a través de reguladores pleiotrópicos que afectan tanto el desarrollo, como la producción de metabolitos. El siguiente nivel implica a los reguladores globales de antibióticos que no afectan el desarrollo, pero si la producción de múltiples antibióticos. El tercer nivel son los reguladores de vías específicas que controlan la síntesis de un solo antibiótico, los cuales, comúnmente están junto al cluster que regulan. (Pak & Elliot, 2010; Chen *et al.*, 2008). Los efectos de muchos reguladores suelen ser indirectos, los cuales van desde el control de las pozas de los precursores o incluso hasta la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los productos finales (Shin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Generalmente los metabolitos secundarios empiezan a ser producidos después del comienzo de la diferenciación morfológica; muchos genes requeridos para la diferenciación y la producción están regulados coordinadamente. Sin embargo, la red de regulación de dichos genes permanece sin conocerse (Higo *et a.*, 2012).

El cluster para ACT está formado por 5 unidades de transcripción dependientes del regulador ActII-ORF4 (activador específico de biosíntesis de ACT), que es un miembro de la familia de proteínas reguladoras de antibióticos en *Streptomyces* (SARP). Casi toda la información de la fisiología celular que afecta la temporización y el nivel de producción de ACT se transmite a través de la proteína ActII-ORF4 y su influencia, ya sea a nivel de transcripción o traducción. La región promotora de *actII-ORF4* es blanco de regulación de por lo menos ocho proteínas: AdpA (regulador pleiotrópico del desarrollo y producción de antibióticos) (Ohnishi *et*

al., 2005), LexA (regulador global de la respuesta al daño del DNA) (Iqbal *et al.*, 2012), AbsA2 (represor global de la síntesis de antibióticos) (Sheeler *et al.*, 2005; Uguru *et al.*, 2005), DasR (proteína responsable en la formación del micelio aéreo y formación de esporas, y la respuesta a la N-acetilglucosamina) (Rigali *et al.*, 2008), DraR y AfsQ1 (activadores de la respuesta a nitrógeno) (Wang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012); AtrA (activador transcripcional asociado al metabolismo de la acetil-CoA, el cual es un precursor de la ACT) (Uguru *et al.*, 2005; Nothaft *et al.*, 2010) y Rok7B7 (represor del operón de xilosa) (Heo *et al.*, 2008). Existe un segundo regulador en el cluster de ACT que codifica para una proteína tipo TetR, la cual reprime al cluster adyacente al de ACT, que codifica para el sistema de exportación de la ACT (Fernández-Moreno 1991; Liu *et al.*, 2013). Los reguladores transcripcionales mencionados, son un ejemplo de los diferentes niveles de regulación que están afectando la síntesis de metabolitos secundarios.

La undecilprodigiosina es sintetizada por una vía mixta que involucra una enzima parecida a la sintasa de ácidos grasos y una péptido sintasa (Cerdeño *et al.*, 2001). Los genes de la ruta se regulan a través de una mini-cascada de dos reguladores pleitrópicos, RedZ (regulador de la síntesis de RED) que a su vez activa la expresión de *redD*, el gen que activa directamente los genes biosintéticos (White *et al.*, 1997). La regulación de *redZ* tiene algunas similitudes con la de *actII-ORF4*: ambos son sitios blanco de la represión por AbsA2. La unión de DasR y AfsQ al promotor de *redZ*, sugiere que tal vez responda a N-acetilglucosamina (Rigali *et al.*, 2008) y a otras señales relacionadas con glutamato (Wang *et al.*, 2012). Se presume que RedD activa directamente los genes biosintéticos de la undecilprodigiosina. En favor de esto, se ha encontrado un sitio de unión para RedD río arriba del operón de RED (Iqbal *et al.*, 2012); sorprendentemente, este motivo también ha sido encontrado río arriba de otros genes no relacionados a la biosíntesis de RED (Iqbal *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

A pesar de los muchos estudios que ya se han realizado, aún existe una gran cantidad de fenómenos y sistemas que no han sido entendidos, de aquí la importancia del estudio de los sistemas de regulación para mejorar las oportunidades de la biosíntesis combinatoria e incrementar la posibilidad de generar nuevos compuestos y permitir la optimización de los títulos de producción de los metabolitos (Chen *et al.*, 2008).

4.9 Reguladores de la familia MarR

La familia de factores de transcripción tipo MarR, pertenece al segundo grupo de la clasificación, y podrían estar implicados entre muchas otras cosas, en la producción de metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2008; Holley *et al.*, 2013). Resulta ésta, un conjunto de proteínas interesantes, no solo por su función, sino además porque solo el 14% de sus genes anotados han sido estudiados (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) (Romero *et al.*, 2015); hay que destacar que gracias a algunas de sus características, su estudio es menos complejo, como explicaremos a continuación.

Los reguladores tipo MarR son un gran grupo de proteínas de un solo componente (Holley *et al.*, 2013), codificadas por >12 000 genes en los genomas disponibles de bacterias y arqueas (Davis *et al.*, 2013). Los miembros de la familia MarR en bacterias, desempeñan papeles importantes en resistencia a los antibióticos, la virulencia y el catabolismo. Los estudios de sus mecanismos moleculares tienen implicaciones para la medicina y la biotecnología (Davis *et al.*, 2013). Hasta la fecha, las funciones fisiológicas de <100 de estas proteínas bacterianas se han caracterizado en detalle (Perera & Grove, 2010). Sin embargo, la prevalencia de proteínas MarR en los estreptomicetos, que son la fuente de numerosos agentes terapéuticos, plantea la posibilidad de explotarlos para la manipulación de los perfiles de los productos naturales de estas importantes bacterias (Holley *et al.*, 2013).

Los miembros de la familia de reguladores MarR son homodímeros citoplásmicos, que se unen al DNA de doble cadena afín por su motivo HTH (Alekhshun *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2005. Kumarevel *et al.*, 2009). El residuo N y C-terminal están estrechamente entrelazados y forman un dominio de dimerización, que se estabiliza mediante interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno entre los residuos localizados dentro de estas regiones. Los residuos implicados en la dimerización juegan un papel clave en el mantenimiento de la distancia entre las hélices de reconocimiento de DNA, que puede afectar en última instancia, la fidelidad y la fuerza de la interacción proteína-DNA (Kumaravel, 2005). Las estructuras cristalinas revelan que cada monómero contiene un motivo wHTH (Alekhshun *et al.*, 2001), el motivo wHTH es una estructura alfa/beta compacta, de dos alas (W1 y W2), tres hélices (α_2 , α_3 y α_4) y tres láminas beta (β_1 , β_2 y β_3), arregladas en el orden α_2 - β_1 - α_3 - α_4 - β_2 -W1- β_3 -W2, las alas son bucles están entre β_2 y β_3 , como las alas de una mariposa (Gajiwala & Burley, 2000); cada hélice de reconocimiento se une a los surcos del DNA (ver figura 6). El

ala es vital para la interacción de DNA como se evidencia por varios estudios mutacionales (Perera & Grove, 2010).

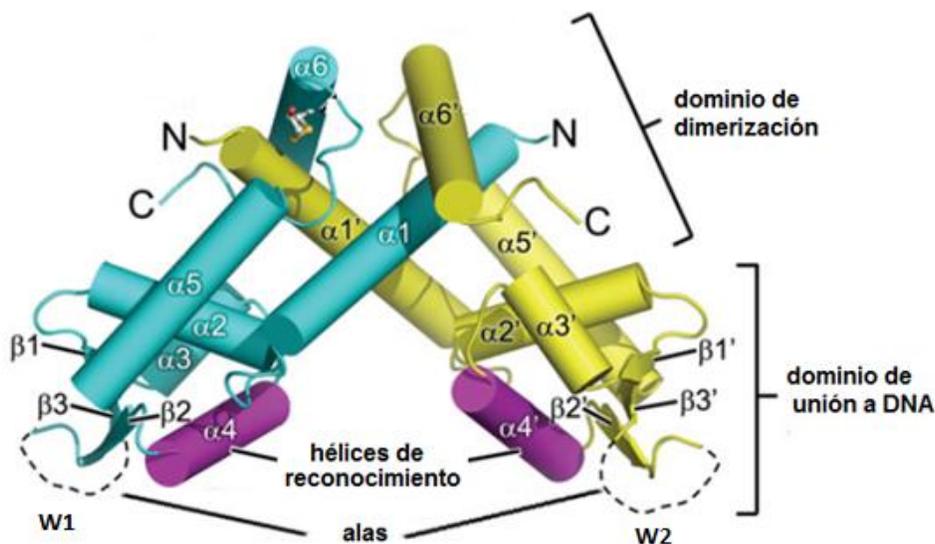


Figura 6. Representación del homodímero SCO5413 de *S. coelicolor*. Las dos subunidades son distinguidas por los colores azul y amarillo, y la región de reconocimiento de DNA se muestra en magenta. Modificado de Holley *et al.*, 2013.

Un subconjunto de miembros de la familia MarR regulan respuestas adaptativas al estrés oxidativo a través de residuos de cisteínas, cuya oxidación influye en la unión al DNA (Hong *et al.*, 2005). La mayoría de estas proteínas regulan la expresión génica a través de la atenuación mediada por ligando de unión al DNA (Davis *et al.*, 2013).

Las proteínas tipo MarR pueden ser represores o activadores transcripcionales, que se unen a regiones de inversos repetidos de 16-20 pb que por lo general son palíndromes (Martin & Rosner., 1995; Martin *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2001; Wilkinson & Grove, 2004). El locus genómico en el que se encuentra una gran proporción de los miembros de la familia, se caracteriza porque el homólogo MarR está adyacente y divergentemente transcrito al gen que regula (Ver figura 7), por lo que el sitio de unión reside en la región intergénica que contiene los promotores (Wilkinson & Grove, 2006). Gracias a que comparte el sitio de unión con el gen que regula, más de la mitad de los homólogos MarR descritos han demostrado ser autorregulados. Las localizaciones de los sitios de unión MarR a menudo se superponen a los -35 y/o -10 elementos promotores de sus genes diana, lo que sugiere que la represión se consigue mediante la inhibición alostérica de la unión de la RNA polimerasa al promotor (Wilkinson & Grove, 2006). Esto fue demostrado por primera vez para *E. coli*, donde la

proteína MarR se une a la región intergénica entre *marcC* y *marRAB* (genes responsables de la resistencia a antibióticos) en dos secuencias palindrómicas, que a diferencia de las antes mencionadas, obstruyen entre los nucleótidos -210 y -235 de los elementos promotores (Martin & Rosner, 1995). Este modo de unión impediría que se reclute la RNA polimerasa, resultando en la represión de la transcripción de *marcC* y *marRAB* (Martin *et al.*, 1995). Otros homólogos se unen a sitios río arriba, donde pueden actuar como un activador, estabilizando la RNA polimerasa o compitiendo con un represor por la unión al DNA (Oh *et al.*, 2007). Por lo tanto, la función como activador o represor depende de la posición de unión con relación a la secuencia promotora. Por ejemplo, en *S. coelicolor*, OhrR (involucrado en la resistencia al peróxido) puede actuar como un represor, así como un activador mediante su unión a la misma región del operador entre *ohrR* y *Ohra* (Oh *et al.*, 2007).

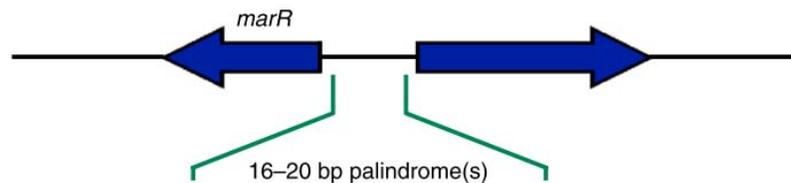


Figura 7. Organización típica del *locus* genómico que comprende el gen que codifica el homólogo MarR. Los genes se representan como flechas azules. La región intergénica entre los genes codificados divergentemente contiene el sitio de unión a DNA (Modificado de Grove, 2013).

Otra característica definitoria de homólogos MarR y que les permite responder a cambios en el medio ambiente, por ejemplo la disponibilidad de sustratos para una vía metabólica o la presencia de compuestos nocivos para la célula, es que reconocen y se unen a ligandos específicos. En ausencia de ligando, se produce la unión específica al DNA, lo que resulta más a menudo en la represión del gen. En presencia del ligando, la unión al DNA se ve abrogada, dando como resultado la inducción de la transcripción (ver figura 8) (Wilkinson & Grove, 2006; Perera & Grove, 2010).



Figura 8. En ausencia de ligando, el MarR (en verde) se une a la región intergénica, reprimiendo la expresión de ambos genes. En presencia del ligando, la unión al DNA es atenuada y los genes se expresan (Modificado de Grove, 2013).

Existen grandes variedades de ligandos para las proteínas MarR. Muchos homólogos se unen a compuestos fenólicos pequeños, lo que resulta en un cambio conformacional que hace que la proteína sea incapaz de unirse al DNA. Los homólogos MarR que regulan las vías metabólicas entran en esta categoría, al igual que muchas proteínas que regulan bombas de expulsión, ya que a menudo comparte preferencias de sustrato con otras enzimas. La otra variedad de ligando interactúa transitoriamente con el objetivo de efectuar una modificación covalente, específicamente la oxidación de cisteína; esta modificación covalente asimismo causa una unión atenuada al DNA debido a cambios conformacionales. Este mecanismo tiene una función importante en las respuestas al estrés oxidativo, incluyendo la producción de factores de virulencia (Perera & Grove, 2010).

Los reguladores MarR están ampliamente distribuidos en el género *Streptomyces*, tal es el caso de *S. coelicolor*, el cual contiene 50 reguladores putativos tipo MarR (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) (Romero *et al.*, 2015), de los cuales siete han sido ya reportados (Davis *et al.*, 2013; Davis & Sello, 2010; Iwagami *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2013; Holley *et al.*, 2013; Huang & Grove, 2013; Huang *et al.*, 2013). En la tabla 3, se reportan los reguladores estudiados, como podemos ver algunos están implicados en el metabolismo primario como *absC*, *tamR* los cuales regulan la expresión de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo de Krebs, respectivamente. Resulta interesante como el *sco5413* está involucrado tanto en el metabolismo primario como en el secundario, reforzando el hecho de que ambos están íntimamente relacionados, entre otros fenómenos, gracias a la acción de reguladores transcripcionales.

Tabla 3. Miembros de la familia MarR descritos en *S. coelicolor* y sus funciones.

Gen	Descripción	Referencias	Localización del gen blanco	Tipo de metabolismo
pcaV sco6704	Controla el operón <i>pca</i> que codifica para las enzimas de la vía de β -cetoacil-CoA, ruta de degradación de compuestos aromáticos.	Davis <i>et al.</i> , 2013; Davis & Sello, 2010; Iwagami <i>et al.</i> , 2000.	Divergente	Primario
absC sco5405	Controla la expresión de la piruvato deshidrogenasa	Stevenson <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2010.	No divergente	Primario
ohrR sco2987	Controla la expresión de <i>ohrA</i> y <i>ohR</i> , involucrados en la resistencia a peróxido.	Oh <i>et al.</i> , 2007.	Divergente	Resistencia
sco3205	Función desconocida	Stevenson <i>et al.</i> , 2013.	Divergente	
sco5413	Posible rol en el crecimiento y producción de antibióticos	Holley <i>et al.</i> , 2013.	No divergente	Primario y secundario
tamR sco3133	Función putativa en el ciclo de Krebs	Huang & Grove, 2013.	Divergente	Primario
pecS sco2647	Regulador de <i>pecM</i> posiblemente involucrado en la resistencia a especies reactivas de oxígeno.	Huang <i>et al.</i> , 2013.	Divergente	Resistencia

Gracias a la presión evolutiva, se conservan las secuencias que son importantes para la regulación, esto aunado al auge de la disponibilidad de más de un centenar de secuencias del genoma de actinomicetos, que permiten que la utilización de herramientas bioinformáticas, como la comparación de secuencias río arriba de los ortólogos, resulten en predicciones sólidas de los genes a regular y de los sitios de unión de estos factores de transcripción (Stevenson *et al.*, 2013); por esta razón el caracterizar la función de un regulador de este tipo resulta más sencillo debido a la predicción de los sitios blanco.

5. HIPÓTESIS

La interrupción del regulador transcripcional *sco2331* tipo MarR, tendrá un efecto sobre la síntesis de los metabolitos secundarios modelo (actinorrodina y undecilprodigiosina) como consecuencia de cambios en el metabolismo primario.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Estudiar el papel de un regulador transcripcional tipo MarR en la síntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina.

6.2 Objetivos particulares

- Identificar un TF cuya modulación del metabolismo primario pueda afectar el metabolismo secundario.
- Interrupción del gen elegido y caracterización del efecto fenotípico.
- Evaluar el efecto de la interrupción sobre la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en *Streptomyces coelicolor*.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Cepas y plásmidos

En la tabla 4 se enlistan los plásmidos y cepas empleados en el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 4. Plásmidos y cepas.

Nombre	Descripción	Referencia
PLÁSMIDOS		
pIJ773 (plásmido)	pBluescript KS (+), <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> (RK2), sitios FRT.	Gust <i>et al.</i> , 2003.
pIJ790 (plásmido)	Contiene el sistema λ RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>) para recombinación homóloga, además del marcador de resistencia a cloranfenicol. El plásmido es sensible a temperatura. <i>[oriR101]</i> , <i>[repA101(ts)]</i> , <i>araBp-gam-be-exo</i> .	Gust <i>et al.</i> , 2003.
pUZ8002 (plásmido)	Contiene el sistema para conjugación (<i>tra</i> , <i>neo</i> , <i>RP4</i>) y resistencia a kanamicina.	Gust <i>et al.</i> , 2003.
StC53 (cósmido)	Contiene el gen de interés (<i>sco2331</i>) y resistencia a kanamicina.	http://strepdb.streptomyces.org.uk/
StC53apra	Cósmido interrumpido. Resistencia a apramicina.	Este estudio.
CEPAS MICROBIANAS		
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa comercial no patógena, utilizada para procedimientos rutinarios de clonación y almacenamiento de vectores.	Gust <i>et al.</i> , 2003.
<i>E. coli</i> BW25113	(Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-4</i>), <i>lacI</i> p-4000(<i>lacIQ</i>), λ -, <i>rpoS</i> 369(Am), <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Datsenko & Wanner, 2000 Gust <i>et al.</i> , 2003.
<i>E. coli</i> ET12567	Cepa deficiente en sistemas de metilación. (<i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i>)	Gust <i>et al.</i> , 2003.
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ , Δ SCP2 ⁻ .	John Innes Centre
<i>S. coelicolor</i> Δ <i>sco2331</i>	M145 Δ <i>sco2331</i> Apramicina ^R Kanamicina ^S	Este estudio.

7.2 Búsqueda *in silico* del gen que codifica a un regulador transcripcional tipo MarR.

Se hizo una búsqueda bioinformática en la base de datos (<http://www.p2tf.org/>) de los reguladores transcripcionales tipo MarR anotados en el genoma de *S. coelicolor*, posteriormente se eliminó a los que se encontraban en los brazos del genoma ya que la región central (aproximadamente 6.5 Mb) está altamente conservada y los genes que están localizados en esta región son esenciales para la vida de la bacteria (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003); de esta selección se eliminaron los reguladores cuyas funciones ya han sido reportadas. A los posibles candidatos se les buscó el gen objetivo el cual estaría divergentemente transcrito y se utilizaron diferentes bases de datos (<http://biocyc.org/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.genome.jp/kegg/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para localizar las posibles funciones de los genes en diferentes vías metabólicas. Con base en estos resultados, se seleccionó el gen que podría tener mayor interacción con vías metabólicas primarias y secundarias.

7.3 Construcción de la mutante Δ sco2331 en *S. coelicolor*

Una de las maneras de caracterizar la función de un regulador transcripcional es eliminar el gen de interés y monitorear las diferencias que se producen en el fenotipo, en este caso comparando la producción de antibióticos entre la cepa silvestre (WT) y la cepa mutante en diversas fuentes de carbono.

Para interrumpir el gen *sco2331* se utilizó la metodología PCR targetting (Gus *et al.*, 2002) basada en la recombinación homóloga. Como se puede observar en la figura 9, la técnica requiere de una librería de cósmidos de *S. coelicolor*, un casete de resistencia y el diseño de oligonucleótidos que amplificarán el casete de resistencia adicionándole regiones homólogas necesarias para la primera recombinación en *E. coli* BW25113. Posteriormente el cósmido mutado es transformado a *E. coli* ET12567, la cual tiene deficientes algunos sistemas de metilación además de llevar a cabo la conjugación intergenérica con *Streptomyces*.

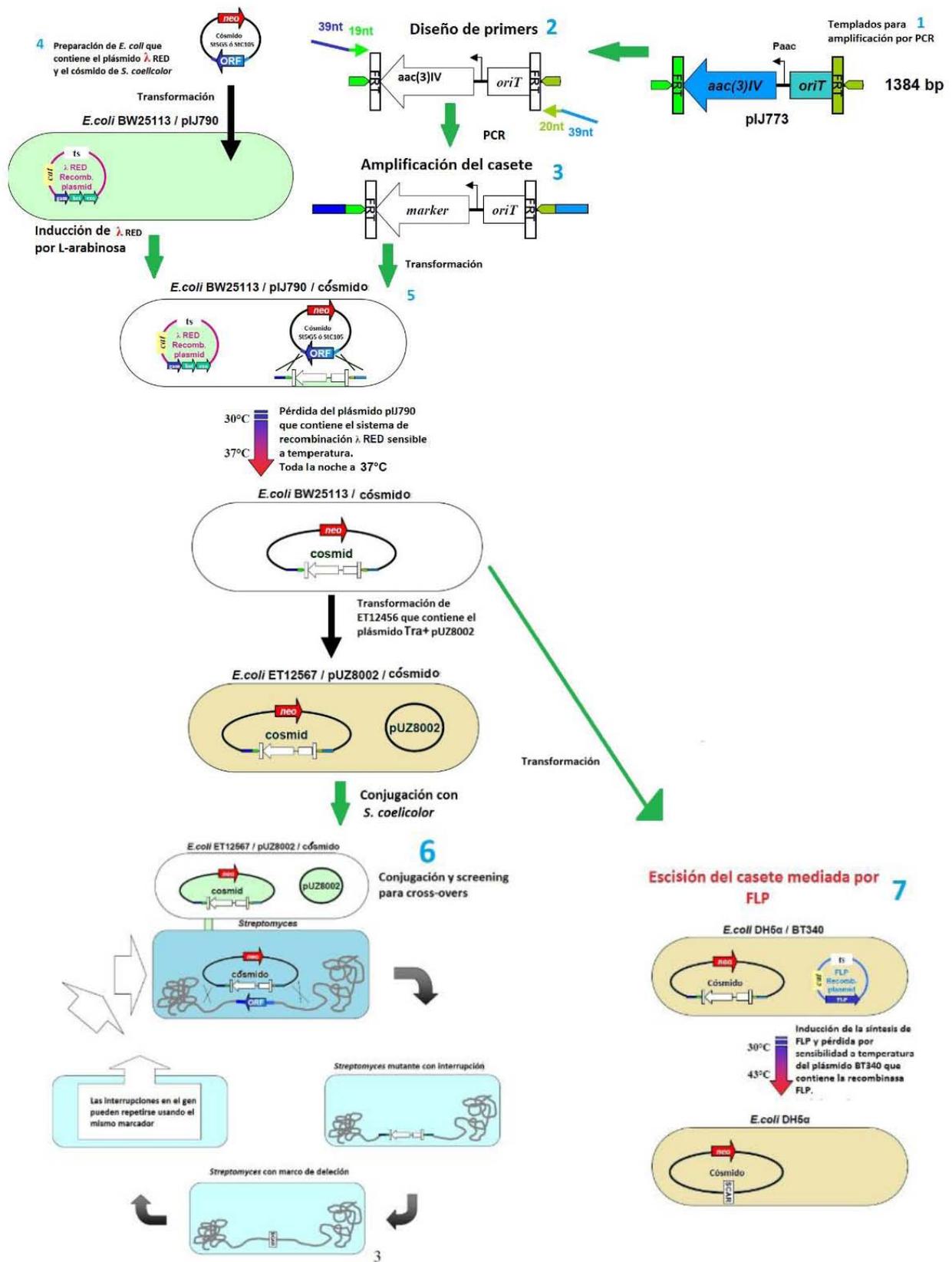


Figura 9. Diagrama general del método de interrupción del genoma o PCR targeting. Modificado de Gust, et al., 2002.

1. Obtención del casete templado de amplificación.

El plásmido pIJ773 (Figura 10) fue extraído mediante lisis alcalina de una cepa de *E. coli* DH5 α , fue seleccionado por la resistencia a ampicilina (100 μ g/mL). Fue digerido con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III. El fragmento obtenido (en verde) contiene el casete del gen de resistencia a apramicina (*aac*(3)/IV), el *oriT*, esencial para la conjugación intergenérica y las secuencias FRT.

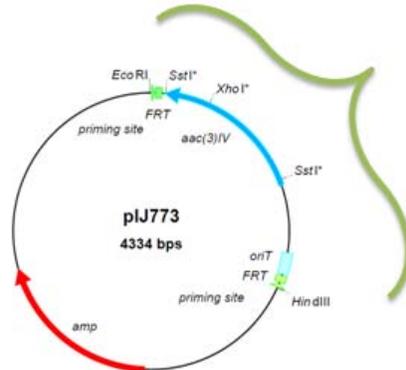


Figura 10. Mapa del plásmido pIJ773. Tomado de Gust *et al.*, 2002.

2. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del casete de resistencia a apramicina.

Estos oligonucleótidos se diseñaron para contener una región homóloga con el cósmido StC53 de la librería de *S. coelicolor* que contiene el gen *sco2331* y resistencia a kanamicina; los extremos 5' de ambos oligonucleótidos son complementarias a las regiones río arriba y río abajo de *sco2331*; mientras que los extremos 3', complementan con los extremos del casete de resistencia, ver figura 11. El producto de esta amplificación se le denominó casete extendido.

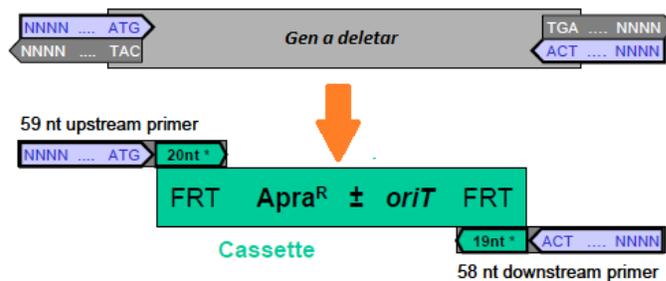


Figura 11 Esquema del diseño de oligonucleótidos para la amplificación del casete de resistencia a apramicina. Modificado de Gus *et al.*, 2002.

Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del casete de resistencia a apramicina.

Oligonucleótidos (100 pmol/μL)	0.5 μL de cada uno
Templado de DNA (100 ng/μl)	1 μL
Buffer (10x) Expand High Fidelity PCR system, Roche	5 μL
dNTP's (10 μM) dNTP set, Invitrogen	8 μL
DMSO (100%)	2.5 μL
DNA polimerasa (2.5 U/μL) Expand High Fidelity PCR system, Roche	1 μL
Agua	32 μL
Total	50 μL

Condiciones para la amplificación del casete

1. Desnaturalización	94°C	2 min	
2. Desnaturalización	94°C	45 s	} 10 ciclos
3. Alineamiento de oligonucleótidos	50°C	45 s	
4. Extensión	72°C	90 s	
5. Desnaturalización	94°C	45 s	} 15 ciclos
6. Alineamiento de oligonucleótidos	55°C	45 s	
7. Extensión	72°C	90 s	
8. Extensión final	72°C	5 min	
9. Enfriamiento	4°C	∞	

El casete extendido tiene regiones homólogas al cósmido y un tamaño de 1462 pb, fue observado en un gel de agarosa y posteriormente purificado de gel por kit Qiagen.

3. Transformación del cósmido StC53 en *E. coli* BW25113/pIJ790

El cósmido StC53 se extrajo de células de *E. coli* DH5-α y por ensayos de restricción con la enzima *Bam*HI se verificó su identidad. Fue introducido por electroporación a células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790 para que se lleve a cabo la recombinación. El plásmido pIJ790, contiene un inicio de replicación sensible a temperatura, por lo que la cepa fue incubada a 29°C, un gen de resistencia a cloranfenicol (25 μg/mL) y los genes que codifican para la maquinaria de recombinación del bacteriófago λ: *gam*, *exo* y *beta*.

4. Transformación del casete de resistencia a apramicina y recombinación en *E. coli*

La cepa con fenotipo cloranfenicol^R, kanamicina^R fue utilizada para la producción de células competentes (*E. coli* BW25113/pIJ790/StC53), el cultivo se llevó a cabo en medio SOB con ampicilina (100 μg/ml), kanamicina (50 μg/ml), cloranfenicol (25 μg/ml) y 10 mM de L-arabinosa a 29°C. Por electroporación se les introdujo el casete extendido y se incubaron a 37°C para favorecer la pérdida del plásmido sensible a temperatura y las células con fenotipo

cloranfenicol^S, apramicina^R y kanamicina^R fueron probadas por digestiones con enzimas de restricción para confirmar el correcto intercambio del casete extendido el gen *sco2331*.

5. Comprobación del intercambio del gen en el cósmido StC53.

Por medio de lisis alcalina se extrajo el cósmido de las clonas de *E. coli* BW25113 StC53 con el genotipo buscado, y se realizó una digestión con la enzima *SacI*. Los patrones de restricción del cósmido silvestre y mutante fueron comparados.

In silico se construyó el cósmido mutante, donde se hizo el intercambio de la secuencia del gen *sco2331* por la secuencia del casete. Con el programa ApE (A plasmid editor), se realizaron las digestiones de ambos cósmidos (mutante y silvestre) y se compararon los resultados *in silico* y experimental.

6. Transformación del cósmido mutante en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002.

La transferencia de material genético de *E. coli* a *Streptomyces* presenta un inconveniente, si el material genético se encuentra metilado, éste se degrada y no se lleva a cabo la recombinación, ya que *Streptomyces* tiene sistemas que degradan el DNA metilado por *dam-13*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdS*. La cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 además de ser una cepa no metilante, contiene el plásmido no transmisible pUZ8002, que codifica las proteínas necesarias para la conjugación intergenérica; dicha conjugación permitirá que se transfiera el DNA para que se lleve a cabo la recombinación homóloga, es decir, el gen *sco2331* del cromosoma, es reemplazado por la resistencia a apramicina.

Una vez que se confirmó por restricción el intercambio del gen de resistencia por el *sco2331*, el cósmido mutante se extrajo por lisis alcalina. El producto purificado se electroporó en células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002. De las colonias de *E. coli* ET12567 con fenotipo cloranfenicol^S, apramicina^R y kanamicina^R, se verificó la identidad del cósmido mutante y se prosiguió a realizar la conjugación intergenérica.

7. Conjugación intergenérica

La conjugación intergenérica se lleva a cabo entre células *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contienen el cósmido mutante y que se encuentran en fase exponencial y esporas de *S. coelicolor* M145, las cuales se someten a un choque térmico de 50°C por diez minutos.

Una vez que se ponen en contacto las dos cepas se siembran y distribuyen en agar MS con MgCl₂ 10 mM, se incuban sin antibióticos a 29°C por 16 horas. Una vez transcurrido este

tiempo, a las placas se les agrega una concentración de 25 µg/mL de ácido nalidíxico para contrarrestar el crecimiento de *E. coli* y apramicina 50 µg/mL para seleccionar la selección de las exconjugantes. Se continuó la incubación a 29°C por tres días.

Las colonias de exconjugantes obtenidas fueron sembradas en placas con medio DNA-ácido nalidíxico (25 µg/ml) y DNA-apramicina (50 µg/mL) o DNA-kanamicina (50 µg/mL) para confirmar el fenotipo apramicina^R y kanamicina^S. Las colonias con sensibilidad a kanamicina fueron resembradas en medio MS con los mismos antibióticos y para confirmar se sembraron en medio MS-apramicina además de medios líquidos de TSB con apramicina 50 µg/ml, donde después de 48 h se extrajo el DNA genómico (ver anexo metodológico).

8. Comprobación de la mutante *S. coelicolor* Δsco2331

Diseño de oligos, ciclo de PCR y secuenciación.

Se diseñaron oligos para determinar el correcto reemplazo del casete de resistencia utilizando como referencia los tamaños de fragmento generados por la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 y la cepa mutante *S. coelicolor* Δsco2331.

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo empleando oligonucleótidos específicos (Tabla 5) y se estandarizaron las condiciones para cada amplificación. Los fragmentos obtenidos fueron purificados por el kit (Qiagen) y secuenciados para corroborar su identidad.

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para comprobar la mutación.

Nombre del oligonucleótido.	Objetivo	pb en <i>S. coelicolor</i> M145 (silvestre)	pb en <i>S. coelicolor</i> Δsco2331
Fw2331	Oligonucleótido diseñado fuera del gen <i>sco2331</i> .		
Rv2331	Oligonucleótido fuera del gen <i>sco2331</i> .	456 pb	1434 pb
FwApra	Oligonucleótido diseñado dentro del gen <i>aac(3)IV</i>		
RevApra	Oligonucleótido diseñado dentro del gen <i>aac(3)IV</i>	Sin amplicón	223 pb
FwGlk	Control positivo. Oligo diseñado fuera del gen de la glucosacinasasa.		
RevGlk	Control positivo. Oligo diseñado 0 pb fuera del gen de la glucosacinasasa.	951 pb	951 pb

7.4 Cinéticas de crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M145 y Δ sco2331.

S. coelicolor fue cultivada a 29°C en medio sólido MS, hasta observar la formación de esporas en la superficie de la placa, se cosecharon las esporas (Ver apéndice) y se almacenaron.

Se tomó una alícuota de las esporas antes cosechadas y se inocularon matraces con los medios R2Y (para producción de antibióticos) y NMMP (medio mínimo) suplementados con diferentes fuentes de carbono, descritos en la tabla 6. Se cultivaron a 29°C, 250 rpm por 48 horas; transcurrido este tiempo se tomaron muestras para cuantificar biomasa, actinorrodina y undecilprodigiosina.

Tabla 6. Fuentes de carbono y concentraciones usadas en cultivos líquidos.

Fuente de Carbono	Abreviatura	Concentración
Glucosa	GLC	100 mM
Glutamato	GLU	100 mM
Arabinosa	ARA	100 mM
Manitol	MAN	100 mM
Glicerol	GLY	100 mM
N-acetilglucosamina	NAC	100 mM
Celobiosa	CEL	100 mM
Acetoína	ACET	10 mM

Cinéticas de crecimiento en glucosa y acetoína.

En matraces bafleados de 250 mL que contenían 50 mL de medio 2xYT, se inocularon con esporas y se incubaron a 29°C, a 200 rpm por 10 horas. Los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con un volumen de medio NMMP, se resuspendieron en 10 mL de medio de NMMP y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Se inoculó el volumen de preinóculo necesario para obtener una concentración equivalente inicial de 3×10^6 esporas pregerminadas (ver apéndice metodológico). Se utilizaron matraces de 250 mL bafleados con medio NMMP con glucosa 100 mM y se tomaron muestras a las 0, 10, 12, 24, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 horas; se realizó lo mismo con medio NMMP con acetoína 10 mM como fuente de carbono.

Determinación de crecimiento por peso seco

Para las determinaciones de crecimiento se tomaron muestras de 5 mL del cultivo microbiano a intervalos determinados, se filtraron al vacío sobre discos de papel filtro Whatman no. 1, previamente llevados a peso constante y pesados. La biomasa recuperada fue secada y pesada.

Determinación de metabolitos secundarios.

Actinorrodina

1. Tomar 1 mL de muestra (medio y micelio) y adicionar 500 μ L de KOH 3 M.
2. Incubar en agitación constante por 12 horas.
3. Centrifugar a 8000 rpm por 5 min.
4. Recuperar 500 μ L en un tubo de vidrio.
5. Medir absorbancia a 640 nm.

El coeficiente de extinción molar es de $25320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Bystrykh *et al.*, 1996).

Undecilprodigiosina

1. Tomar 1 mL de muestra
2. Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos.
3. Tirar sobrenadante
4. Evaporar el líquido restante.
5. Añadir 1 mL de metanol ácido (pH 2, con H_2SO_4) a los pellets.
6. Macerar el micelio con palillos.
7. Incubar en agitación constante por 12 horas.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos.
9. Recuperar sobrenadante.
10. Leer absorbancia a 530 nm.

El coeficiente de extinción molar es de $100150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kang, *et al.*, 1998).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Búsqueda *in silico* del gen que codifica a un regulador transcripcional tipo MarR.

Se realizó una búsqueda de reguladores putativos tipo MarR en el genoma de *S. coelicolor* usando la base de datos p2tf (<http://www.p2tf.org/>). Se tomaron en cuenta solamente los genes del cuerpo del genoma, es decir, que están dentro del rango de *sco2000* y *sco6999*, ya que los genes que no están en los brazos del genoma generalmente son los involucrados en el metabolismo primario y los más conservados (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). De la búsqueda se encontraron 20 genes que se describen en la primer columna de la tabla 7. En la segunda columna se enlista el gen objetivo de los posibles reguladores tipo MarR, los cuales se encuentran divergentemente transcritos, cabe aclarar que los genes que no tienen un gen divergente fueron eliminados de esta lista. Posteriormente a cada gen objetivo se buscó su anotación en la base de datos de *Streptomyces* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) y de las bases de datos: BIOCYC, KEGG y de alineaciones en BLAST se tomaron la función, vía metabólica y posible reacción donde podrían estar participando.

Tabla 7. Lista de genes tipo MarR en el cuerpo de genoma de *S. coelicolor*, el gen que posiblemente regula y las funciones putativas.

Gen MarR	Gen objetivo	Anotación en strepdb	BLAST / BIOCYC/ KEGG	Vía metabólica	Posible reacción que cataliza
sco2209	<i>sco2208</i>	carboxilesterasa	carboxilesterasa		
sco2331	<i>sco2332</i>	hidrolasa	Acetoin deshidrogenasa, componente E2 Piruvato deshidrogenasa, componente E2	Glucólisis/Gluconeo génesis Ciclo del TCA Biosíntesis de metabolitos secundarios.	Oxidación de acetoína, NADH => acetil-CoA Oxidación de piruvato, Piruvato => acetil-CoA
sco2398	<i>sco2397</i>	oxidorreductasa	Polipeptidoxirreductasa		
sco2647	<i>sco2646</i>	Proteína integral de membrana	Proteína integral de membrana		
sco2928	<i>sco2927</i>	4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa putativa	4-hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa putativa		
sco2987	<i>sco2986</i>	Proteína hipotética conservada.	Proteína hipotética conservada.		
sco3414	<i>sco3415</i>	Esterasa	Alfa/beta hidrolasa		

sco3632	sco3633	Proteína de unión a transportador tipo ABC	Proteína de union a transportador tipo ABC		
sco3914	sco3915	Proteína transmembranal de eflujo.	Transportador		
sco4032	sco4033	Proteína hipotética	Proteína hipotética de membrana		
sco4122	sco4121	Proteína de membrana	Proteína de membrana		
sco4197	sco4196	Anhidrasa ácida de organofosfato.	Anhidrasa ácida de organofosfato		
sco4336	sco4335	Proteína hipotética	Proteína hipotética		
sco4375	sco4373	Proteína mut-like	Proteína mut-like		
sco4407	sco4406	Proteína hipotética	Proteína hipotética		
sco4961	sco4962	Treonin deshidratasa	Treonin deshidratasa/deaminasa	Vía de síntesis de leucina, valina, alanina e isoleucina.	
sco5287	sco5286	Hidrolasa	Lisozima		
sco5323	sco5404	Cinasa sensor de dos componentes	Histidina cinasa		
sco6620	sco6619	Deshidrogenasa	Deshidrogenasa/oxidoreductasa		
sco6704	sco6703	Subunidad A de 3-oxoadipato coA-transferasa	Succinil-coA: 3-cetoacido-coA transferasa	Vía de glucólisis y variante VIII del TCA	Succinil-coA + acetoacetato <=> succinato + acetoacetyl-coA

De los 20 genes enlistados, los que resultaron más interesantes por estar posiblemente involucrados en la regulación de genes implicados en la producción de los precursores para las vías de biosíntesis de antibióticos fueron: *sco2331* y *sco6704*. El *sco2331* podría estar regulando al gen *sco2332* el cual podría tener un papel importante en glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en una reacción que tiene como uno de los productos acetyl-CoA, el cual es un precursor para policétidos, el NADH que es el poder reductor para la síntesis de ambos antibióticos modelo y el TCA que provee precursores para la producción de undecilprodigiosina. Por otro lado *sco6704*, estaría regulando a *sco6703*, el cual también estaría involucrado en la glucólisis y TCA a través de una reacción de succinil CoA transferasa.

Con base al análisis de estos dos posibles candidatos, se decidió estudiar el regulador tipo MarR *sco2331*, el cual tiene un tamaño de 414 pb, debido a que es el candidato que podría estar involucrado en la producción de importantes precursores para la síntesis de los dos antibióticos: undecilprodigiosina y actinorrodina, lo anterior reforzado con diferentes reportes donde se demuestra el papel importante de la acetil-CoA y el NADH en la biosíntesis de antibióticos (Banchio *et al.*, 2002, Coze *et al.*, 2013, Borodina *et al.*, 2008).

B. Construcción de la mutante Δ *sco2331* en *S. coelicolor*

La mutante Δ *sco2331* se construyó utilizando la técnica de PCR targeting que se basa en la recombinación homóloga que permite la sustitución del gen blanco por un gen de resistencia, en este caso, apramicina. Para ello se requiere de la secuencia homóloga, que en este caso se obtuvo por una biblioteca de cósmidos cuyas secuencias se encuentran depositadas en la base de datos Strepdb (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>).

El primer paso fue buscar en Strepdb el cósmido que contiene el gen de interés. Por otro lado, para obtener el gen de resistencia se aisló el plásmido pIJ773, el cual contiene el gen de resistencia a apramicina.

Aislamiento del plásmido pIJ773

El plásmido pIJ773 contiene el casete con el gen de resistencia a apramicina, se extrajo de *E. coli* DH5 α . En la figura 12 se muestra el resultado de dicho aislamiento en los carriles 1 y 2.

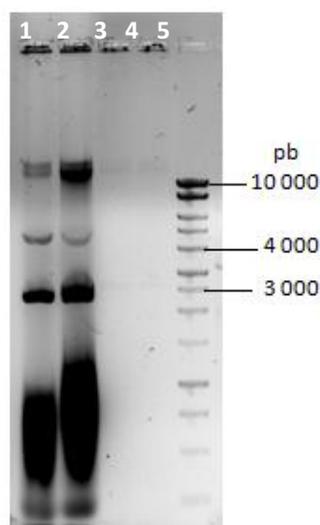


Figura 12 Gel de agarosa al 0.8% donde se observa las isoformas del plásmido pIJ773.

Carril 1 y 2 : plásmido pIJ773

Carril 5: Marcador de peso molecular 1 Kb.

Aislamiento y caracterización del cósmido StC53

Con el fin de corroborar la identidad del cósmido StC53, éste se aisló y digirió con *Bam*HI, ya que el patrón *in silico* resultó ser el más fácil de identificar. El patrón de digestión experimental se comparó con el obtenido *in silico* en (strepdb.streptomyces.org.uk), el resultado se observa en la figura 13, donde la digestión del cósmido StC53 se muestra en el carril 1 del gel de agarosa, lo que observamos en un patrón de digestión igual al obtenido *in silico*, comprobando la identidad del cósmido.

El siguiente paso fue el aislamiento del casete de resistencia a apramicina *aac(3)/IV* conteniendo el origen de transferencia *oriT*, indispensable para la movilización del cósmido durante la conjugación intergenérica. En la figura 14 se muestra la localización del casete de resistencia a apramicina, que en el mapa del plásmido pIJ773 podemos observar que las enzimas *Eco*RI y *Hind*III liberan el fragmento que contiene el casete, con el gen *aac(3)/IV* y el *oriT*.

Una vez comprobada la identidad del cósmido StC53, se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790, generando la cepa BW25113pIJ790/StC53, las cuales se almacenaron en glicerol al 20%.

Digestión del plásmido pIJ773

El plásmido pIJ773 (figura 10) fue digerido entonces con *Eco*RI y *Hind*III y se obtuvo un fragmento de 1384 pb que contiene el gen de resistencia a apramicina *aac(3)/IV* y el *oriT* como se muestra en la figura 14. El fragmento de 1384 pb fue purificado del gel de agarosa

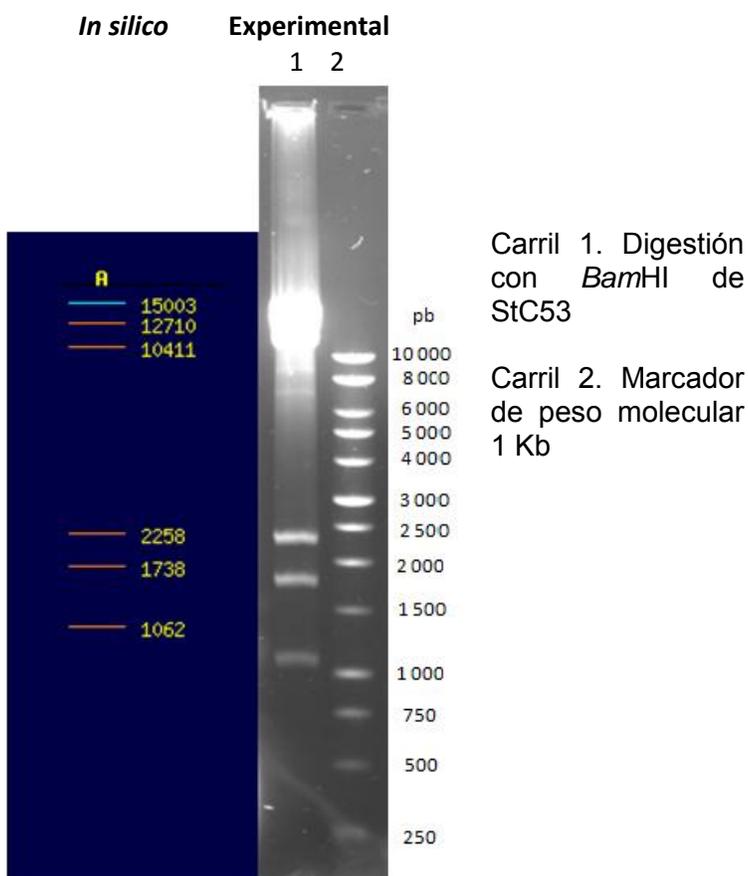
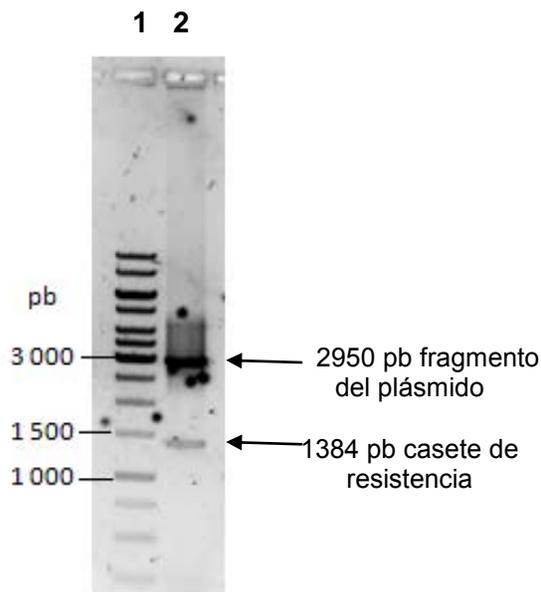


Figura 13. Comparación de la restricción de StC53 con *Bam*HI *in silico* (izquierda) y experimental (derecha).

(kit Qiagen), el producto fue usado como molde para la amplificación del casete de resistencia a apramicina.

Figura 14. Gel de agarosa al 0.8% de la digestión del plásmido pIJ773.
 Carril 1. Marcador de peso molecular 1 Kb
 Carril 2 Digestión del plásmido pIJ773



Diseño de oligonucleótidos para amplificación del casete de interrupción

El diseño de los oligonucleótidos, como ya se mencionó en material y métodos (ver figura 11), se llevó a cabo de acuerdo a Gust *et al.*, 2003. Se tomaron las secuencias de la región intergénica y 6 pb del gen a los que se les agregó la secuencia FRT contenida en el casete de apramicina. Lo anterior con el fin de que al amplificar el casete de resistencia, éste adquiera la región homóloga para que se lleve a cabo la recombinación (Figura 15)

Azul: Gen *sco2331*

Rojo: región intergénica río arriba y río abajo del gen *sco2331*

Verde: secuencia del casete de resistencia

Subrayado: secuencia de oligonucleótido.

Oligo Forward: ATGTTTATATACGAGTGTTGATACGCTAACACCATGGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC

Gen *sco2331*:

ATGTTTATATACGAGTGTTGATACGCTAACACCATGGCGACCGACCTGGAAGTCCTCGGGCAGGCGATCAA
 GCGTGCCAGTACCGCAACCACCGCGCGATGGACGCAGCGCTGCGCGAGACCGGGGTCAGCCTCGTCCA
 GTGGGACGCGCTGCGCGCCATCGAGCGGATGCCCGGAGCCTCTGGGCACGAACTGGCCGTGCGACGTT
 CCAGAGCGACCAAGGCGTTCGGCACCCCTCGCGAACC GGCTCGTGGAGCGCGGGCTCATCACCCGGTCCGC
 AGGCCGTGGGCGACGCTCGATCACGCGCTCACCGAGTCGGGGCGGGCGGCACTCGCGGAAGGGCGGC
 AGTTGGCGACCGGTGTCCTGCGGGACCTCTTCGCACCTCTCGGCGAGGAGCAGCGGGCGCAACTGCTGC
 GCGCGCTCCGGGACCTGACCGAGGGCCCTAGGTCAGGGACTCCTGCGACGGCACGACGACCCCG

Oligo Reverso: GAAGCAGCTCCAGCCTACACCCTAGGTCAGGGACTCCTGCGACGGCACGACGACCCCG

Figura 15. Oligos diseñados para la amplificación del casete de resistencia a apramicina.

Amplificación por PCR del casete de interrupción

Después de la purificación del casete generado por la restricción, éste fue amplificado con los oligos diseñados, los cuales añadieron al casete secuencias homólogas río arriba y río abajo del gen *sco2331* necesarias para la recombinación homóloga en el cósmido StC53. La banda que se esperaba era de 1462 pb que observamos en la figura 16, que corresponde a 1384 del casete y 78 nucleótidos de la región que delimita al gen.

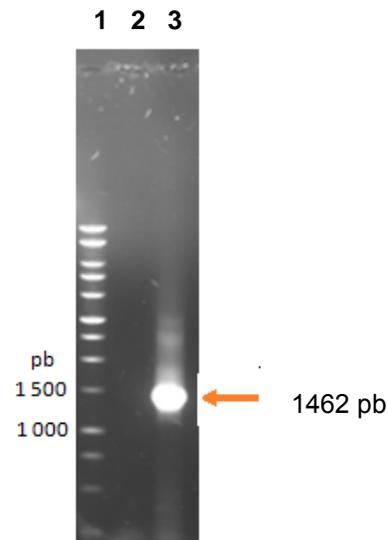


Figura 16. Gel de agarosa donde se observa el casete extendido.

Carril 1. Marcador de peso molecular 1 Kb

Carril 3 Amplificación del casete.

Una vez que se obtuvo el fragmento esperado, se purificó la banda con el kit de Qiagen. La cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/StC53, se creció en medio con L-arabinosa para inducir la expresión del sistema λ RED y por consiguiente la recombinación. Posteriormente se seleccionaron las colonias de *E. coli* por la resistencia a apramicina, esta adquisición evidencia la recombinación del casete de resistencia por el gen *sco2331*.

Verificación del reemplazo del gen *sco2331* en el cósmido StC53.

Con el fin de obtener un patrón de digestión con el cual poder comparar el cósmido silvestre con el cósmido interrumpido, se realizó la construcción *in silico* del cósmido StC53apra donde se hizo el intercambio del gen *sco2331* por el casete de resistencia, ésta construcción y la secuencia del cósmido silvestre se sometieron a digestiones *in silico* en el programa ApE (A plasmid Editor). Comprobamos que en el caso del cósmido interrumpido se liberó un fragmento de 751 pb que corresponde al gen *aac(3)/IV*, en tanto que el cósmido silvestre digerido con *SacI* no libera dicho fragmento. En la figura 17 se muestran las digestiones *in silico* de ambos cósmidos.

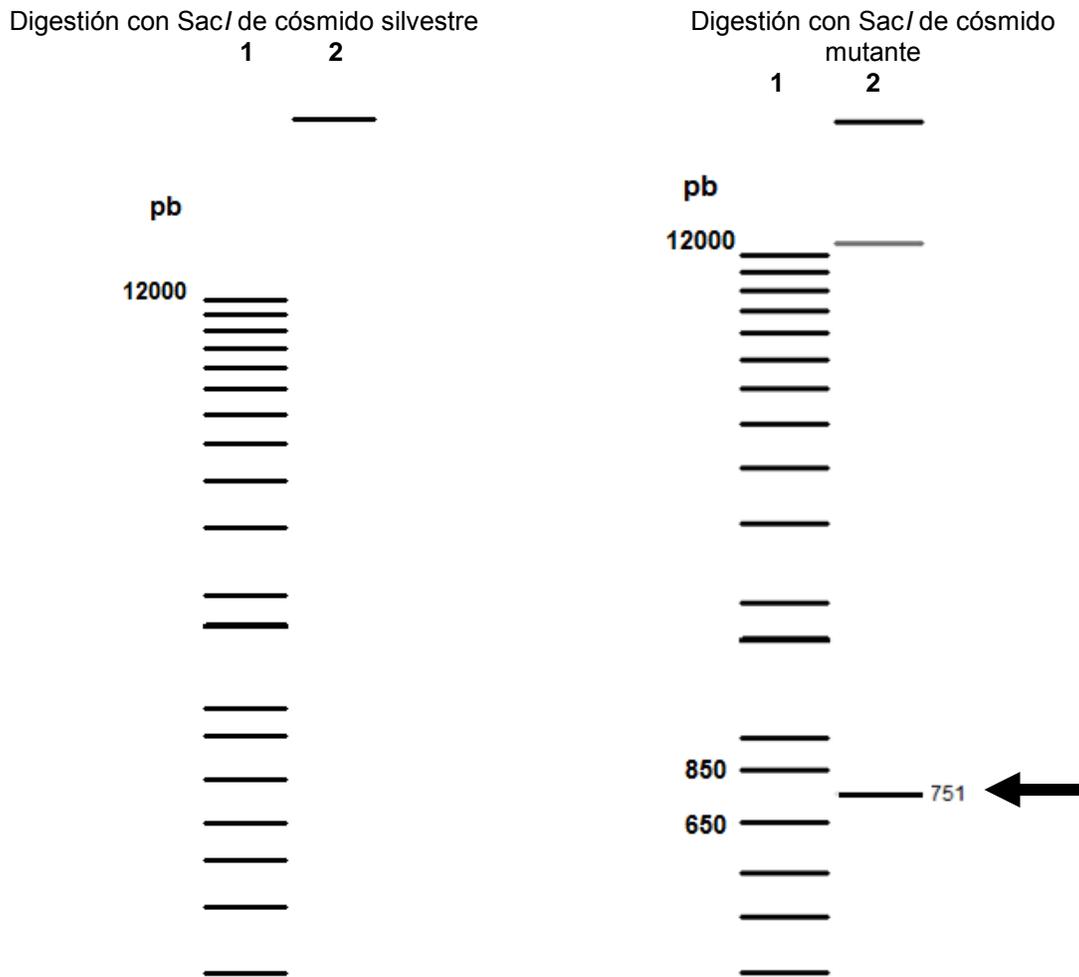


Figura 17. Digestiones *in silico* de cósmido silvestre (izquierda) e interrumpido (derecha) en el programa ApE. Carril 1 Marcador de peso molecular del programa ApE; carril 2 digestión *in silico*.

Después de obtener las colonias de *E. coli* BW25113 con el fenotipo de resistencia a apramicina, se extrajo el cósmido presuntamente interrumpido y se realizó la digestión con la enzima *SacI* con el fin de comprobar el reemplazo del gen *sco2331* por el casete de resistencia a apramicina en el cósmido. En la figura 18 el carril 3 muestra la digestión del cósmido StC53apra que liberó 751 pb correspondiente a un fragmento del casete de apramicina.

Figura 18.
Gel de agarosa al 0.8% que muestra la
digestión del cósmido mutante.
Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb.
Carril 2 y 3. Digestión de cósmido mutante.

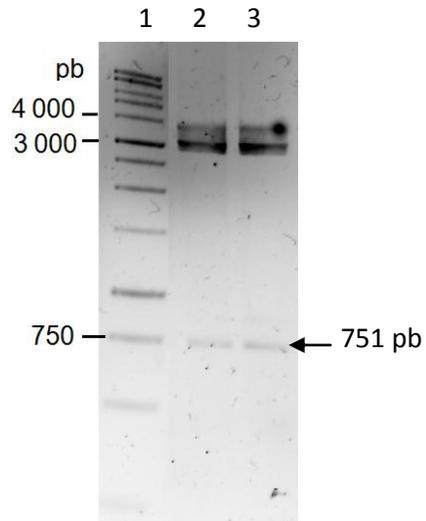


Figura 18. Digestión del cósmido mutante.

Conjugación intergenérica

Después de comprobar el intercambio del gen en *E. coli* BW25113, se aisló el cósmido mutante y se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* ET12567. Posteriormente si la conjugación y la recombinación fueron exitosas el cósmido StC53apra recombinó con el genoma de *S. coelicolor* generando un fenotipo de resistencia a apramicina gracias al gen *aac(3)/V* y de sensibilidad a kanamicina, ya que el cósmido contiene esta resistencia y se pierde después de la recombinación. De no llevarse a cabo una recombinación exitosa, las mutantes tendrían el fenotipo de resistencia a apramicina y kanamicina. En la figura 19 se muestran colonias resistentes a apramicina, de estas colonias que mostraron resistencia, se tomaron 300 colonias al azar y se resembraron en medios MS y DNA solo con apramicina y estos mismos medios sólo con kanamicina; las colonias que resultaron tener un fenotipo apramicina^R y kanamicina^S fueron diez y se resembraron de nuevo. Después de las resiembras y aislamientos secuenciales en los medios de selección, en la figura 20 se tomó una colonia con el fenotipo deseado apra^R y kan^S ($\Delta sco2331$) y la cepa M145 (silvestre) cuyo fenotipo es apra^S y kan^S, ambas cepas fueron sembradas en medio DNA con diferentes antibióticos, tomando como control negativo la placa sin antibiótico.

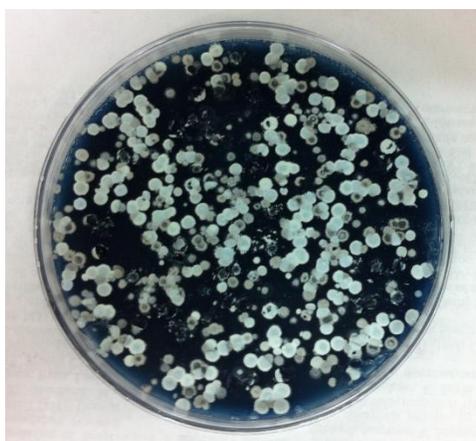


Figura 19. Placa de MS con colonias resistentes a apramicina



Figura 20. Confirmación del fenotipo de las exconjugantes. Lado izquierdo de las placas corresponde a la cepa $\Delta sco2331$ y el lado derecho a la cepa M145 (silvestre).

Comprobación de la mutante *S. coelicolor* $\Delta sco2331$

A las colonias aisladas que presentaron el fenotipo esperado se les realizó un PCR para confirmar el reemplazo. Para ello se aisló DNA genómico y se usaron oligonucleótidos que amplificaban el gen *sco2331* (Tabla 5, Fw2331 y Rv2331) con los cuales se esperaba un amplicón de 456 pb para la cepa silvestre y 1434 pb si el gen había sido reemplazado por el casete de resistencia. Los oligonucleótidos FwApra y RevApra (Tabla 5) amplificaban un fragmento de 223 pb del gen *aac(3)/V*, el cual sólo debe estar presente en la cepa mutante. Como control positivo se usaron los oligonucleótidos FwGlk y RevGlk (Tabla 5) que amplifican el gen de la glucosacinasasa (951 pb), la cual está presente en ambas cepas.

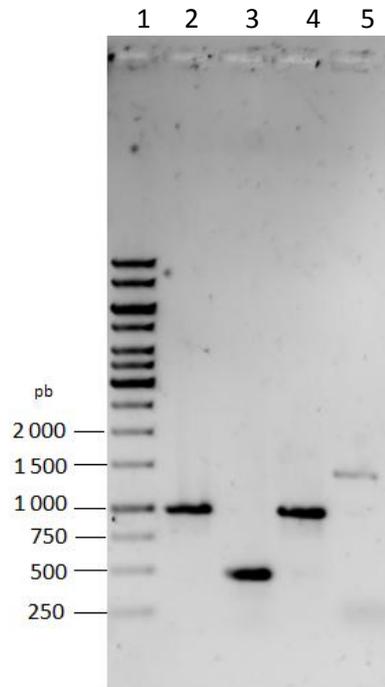


Figura 21. Gel de agarosa al 0.8% del PCR a partir de DNA genómico silvestre y de la posible mutante para corroborar el intercambio del gen *sco2331* por el casete de resistencia

Carril 1 Marcador de peso molecular de 1 Kb.

Carril 2 Cepa WT, control +, oligos gen *glk*

Carril 3 Cepa WT, oligos 2331

Carril 4 Cepa Δ *sco2331*, oligos gen *glk*

Carril 5 Cepa Δ *sco2331*, oligos 2331

Como se observa en el gel de agarosa de la figura 21, la reacción de PCR para amplificar el gen *sco2331* en la cepa WT corresponde a un fragmento de 456 pb que es la suma del gen (414 pb) y los nucleótidos fuera de este. En cambio el fragmento de la cepa Δ *sco2331* es de 1434 pb que es la suma del tamaño del gen de resistencia a apramicina (1382 pb) y los nucleótidos fuera. Las reacciones para amplificar la glucosacinasasa (951 pb) fungieron como controles positivos de la reacción de PCR. Además, se realizó una PCR para amplificar una región de 221 pb del gen *aac3(IV)*, que se purificó y secuenció. Con esto podemos concluir que la cepa, cuyo fenotipo corresponde al de resistencia a apramicina y sensibilidad a kanamicina, tiene el gen *sco2331* intercambiado por el gen de resistencia a apramicina *aac3(IV)*.

Secuenciación

Los productos de PCR que se muestran en la figura 21 fueron extraídos del gel, purificados (Qiagen) y secuenciados. Las secuencias obtenidas (anexo de resultados) fueron alineadas con las esperadas utilizando BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), se muestra un resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Productos de PCR secuenciados.

Fragmento amplificado	DNA genómico molde	Oligonucleótidos	Amplicón esperado	Resultados del BLASTn
Gen <i>sco2331</i>	<i>S. coelicolor</i> M145	2331	Gen <i>sco2331</i> , 456 pb	Identidad: 99% Cobertura 94%
Casete de apramicina	<i>S. coelicolor</i> Δ <i>sco2331</i>	2331	Casete de resistencia, 1434 pb.	Identidad: 99% Cobertura: 98%
Región de 221 pb del gen <i>aac(3)IV</i>	<i>S. coelicolor</i> Δ <i>sco2331</i>	apra	Fragmento del gen <i>aac(3)IV</i> , 221pb.	Identidad: 97% Cobertura: 59%

La secuencia del fragmento correspondiente a la reacción de PCR de DNA genómico de la cepa silvestre con los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *sco2331*, fue alineada con el gen *sco2331* con BLAST, teniendo como resultado una identidad del 99% y una cobertura del 94%, lo cual soporta que el resultado de la secuenciación fue el gen *sco2331*. El resultado de la secuenciación tiene un tamaño cercano a los 456 pb que son los esperados.

El resultado de la secuenciación se alineó con la secuencia del casete de apramicina, obteniendo una identidad del 99% y una cobertura del 98%; estos resultados además del tamaño del fragmento, nos indicaron que el gen *aac(3)IV* está insertado en el genoma en lugar del gen *sco2331*.

La secuencia del fragmento correspondiente a la reacción de PCR de DNA genómico de la cepa mutante con los oligos diseñados para amplificar una región de 221 pb del gen de resistencia a apramicina, fue alineada con el fragmento del gen *aac(3)IV*, que sería amplificada con los oligos si la mutación fuera exitosa; de este alineamiento se obtuvo un 97% de identidad y 59% de cobertura.

C. Caracterización de la cepa mutante

Caracterización bioquímica

Una vez comprobado el genotipo de la exconjugante seleccionada, se procedió a realizar una caracterización metabólica usando pruebas API® 20 C AUX (Figuras 22 y 23) con diversas fuentes de carbono para comparar su utilización por la cepa WT y la mutante $\Delta sco2331$ (Ver apéndice).

En las tira API 20 C AUX (Figura 22) con medio mínimo (MM) se agregó púrpura de bromocresol que es un indicador cuyo intervalo de transición de pH oscila entre 5.2 y 6.8. El color amarillo indica acidificación del medio debido a la presencia de los ácidos orgánicos producidos por la utilización de la fuente de carbono. La cepa M145 (silvestre) fue capaz de utilizar glutamato, glicerol, arabinosa y celobiosa, mientras que la cepa $\Delta sco2331$ viró el color en los pozos con glutamato, glicerol, arabinosa, xilitol, N-acetilglucosamina, celobiosa y rafinosa. Todo esto se llevó a cabo para realizar un primer acercamiento y observar si existen cambios en el metabolismo primario en la cepa mutante respecto a la silvestre y para comprobar si estos afectan la producción de metabolitos secundarios se realizó el siguiente experimento.



Figura 22. Comparación después de 120 horas de incubación de la utilización de fuentes de carbono por las cepas silvestre (M145) y mutante (Δ sco2331), se usaron galerías API® 20 C AUX con medio MM y número de bromocresol (0.025 g/l)



Fig.ura 23 Comparación después de 48 horas de incubaicónde la producciónde metabolitos secundarios por las cepas silvestre (M145) y mutante Δ sco2331, se usaron galerías API® 20 C AUX con medio API C.

0 Ninguno; GLU glucosa; 2KG 2-ceto-Gluconato cálcico; ARA L-arabinosa; XYL D-xilosa; ADO adonito; XLT xilitol; GAL D-galactosa; INO inositol; SOR D-sorbitol; MDG Metil- α D-glucopiranosida; NAG N-acetilglucosamina; CEL D-celobiosa; LAC D-lactosa; MAL D-maltosa; SAC D-sacarosa; TRE D-trehalosa; MLZ

Con el objetivo de identificar una diferencia en la producción de metabolitos secundarios de la cepa $\Delta sco2331$ respecto a la silvestre, se utilizó el medio API C, ya que al ser un medio complejo y tener lo necesario para el crecimiento de la bacteria, se esperaría favorecer la producción de metabolitos secundarios. En la Figura 23 podemos observar a la cepa silvestre (M145) y la cepa mutante ($\Delta sco2331$) con diferentes fuentes de carbono. El color se debe a la producción de metabolitos secundarios en ambas cepas. Los resultados de manera cualitativa se muestran en la tabla 8, donde (-) significa que no se observa producción y mayor producción (+). De los resultados que se muestran en la tabla 9, los que nos parecieron más interesantes, por observarse una producción mayor de antibióticos en la cepa mutante, como ocurre con N-acetilglucosamina (NAG) y glucosa (GLU) como fuente de carbono.

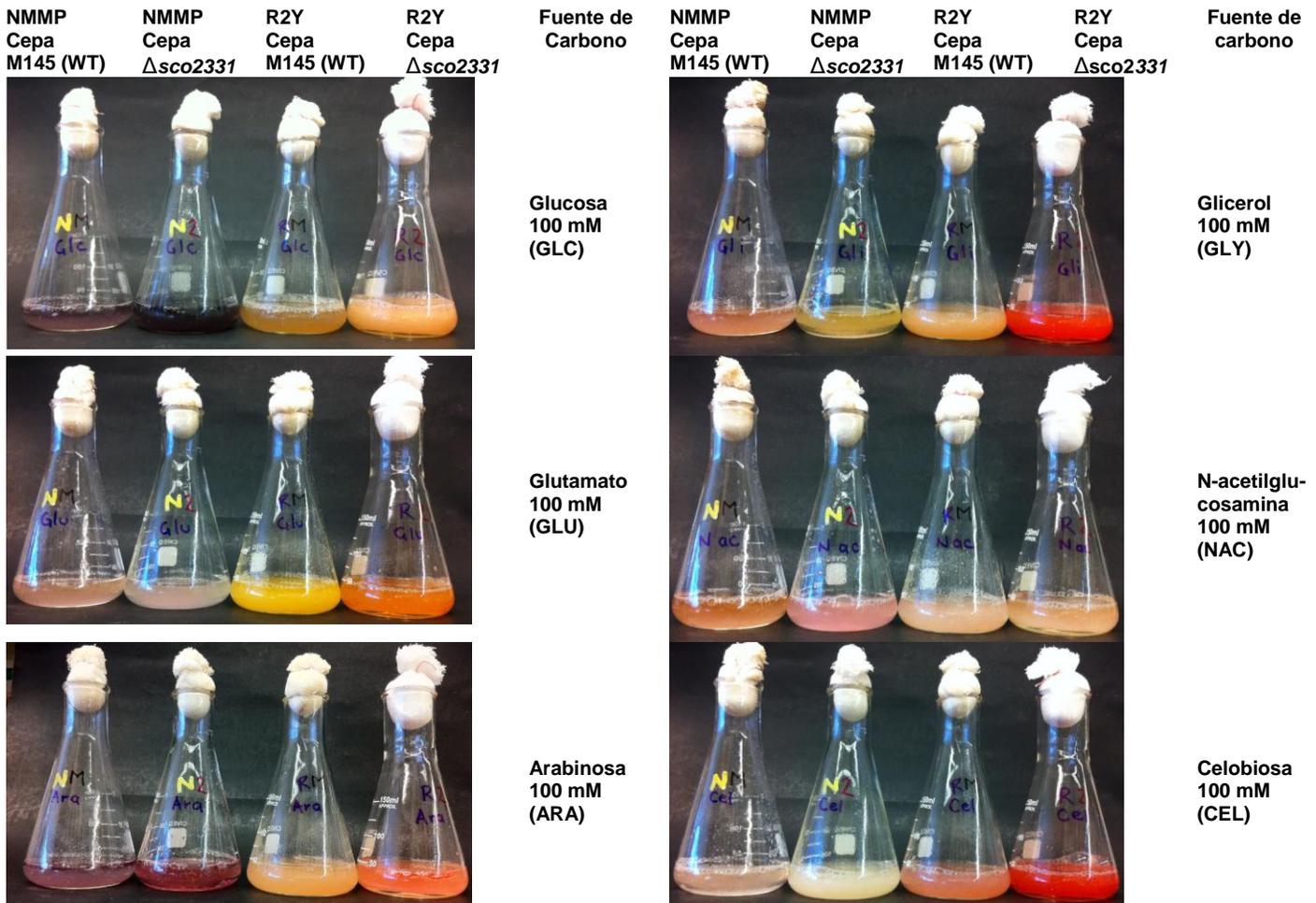
Tabla 9. Resultados cualitativos en producción de metabolitos secundarios en galerías API® 20 C AUX.

Fuente de Carbono	Cepa silvestre (M145)	Cepa Mutante ($\Delta sco2331$)	Fuente de Carbono	Cepa silvestre (M145)	Cepa Mutante ($\Delta sco2331$)
Sin fuente	+	-	SOR	+	-
GLU	-	+	MDG	+	-
GLY	+	+	NAG	+	++
2KG	-	-	CEL	++	+
ARA	+	+	LAC	++	+
XYL	+	+	MAL	++	-
ADO	+	-	SAC	-	-
XLT	+	-	TRE	++	+
GAL	+	+	MLZ	-	-
INO	+	-	RAF	-	-

Debido a que se observaron diferencias cualitativas en la producción de metabolitos secundarios mediante el sistema API 20 C AUX. Se realizaron cultivos en medio mínimo NMMP para evaluar la utilización de la fuente de carbono y en medio R2Y para evaluar la producción de metabolitos secundarios utilizando diferentes fuentes de carbono. La producción de metabolitos se realizó respecto a la biomasa. En la figura 24 se muestran los resultados de los cultivos a las 48 h de fermentación que es cuando comienza la producción de los antibióticos y la fase estacionaria del cultivo. Las fuentes de carbono se seleccionaron

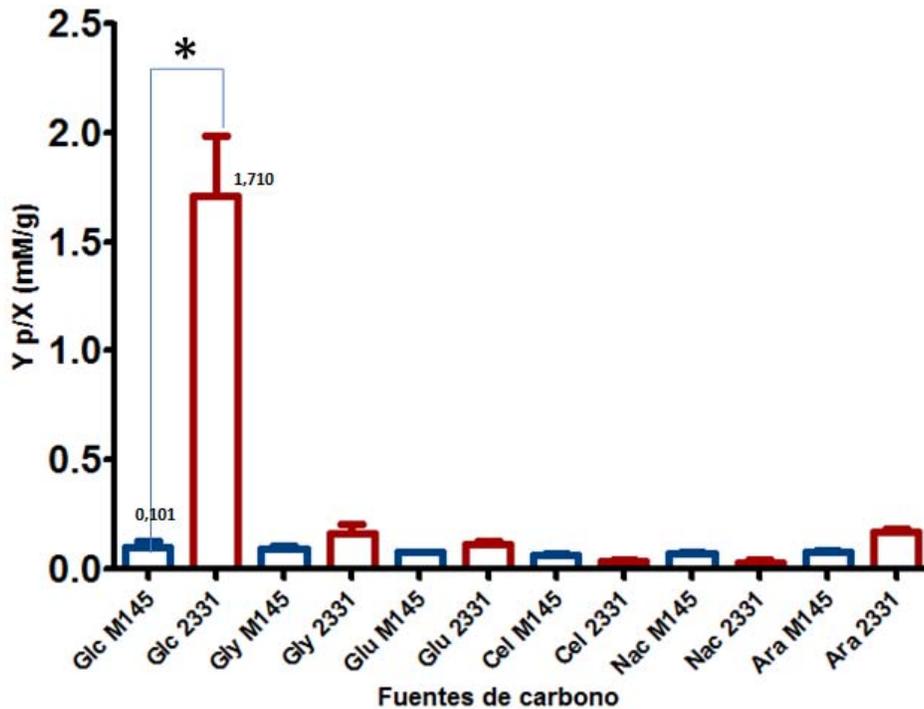
tomando en cuenta los resultados de las tiras API 20 C AUX y la vía catabólica de las fuentes de carbono.

Figura 24. Comparación de la producción de metabolitos secundarios de cepa silvestre y mutante en diferentes medios y fuentes de carbono a las 48 horas.



Cualitativamente observamos diferencias en los resultados de las galerías API respecto a los mostrados en la figura 24, esto se debe a que son medios de cultivo distintos y que el tiempo de la toma de muestra es desigual. Además, se observaron diferencias tanto en cantidad de biomasa como de producción de antibióticos en los cultivos en medio NMMP y R2Y en las diferentes fuentes de carbono, comparando la cepa silvestre y la mutante. Por ello, se decidió comparar estos resultados cuantitativamente, por lo que después de 48 horas de cultivo a 29°C y 250 rpm, se tomaron muestras de los cultivos para medir producción de biomasa, actinorrodina y undecilprodigosina respecto a la biomasa.

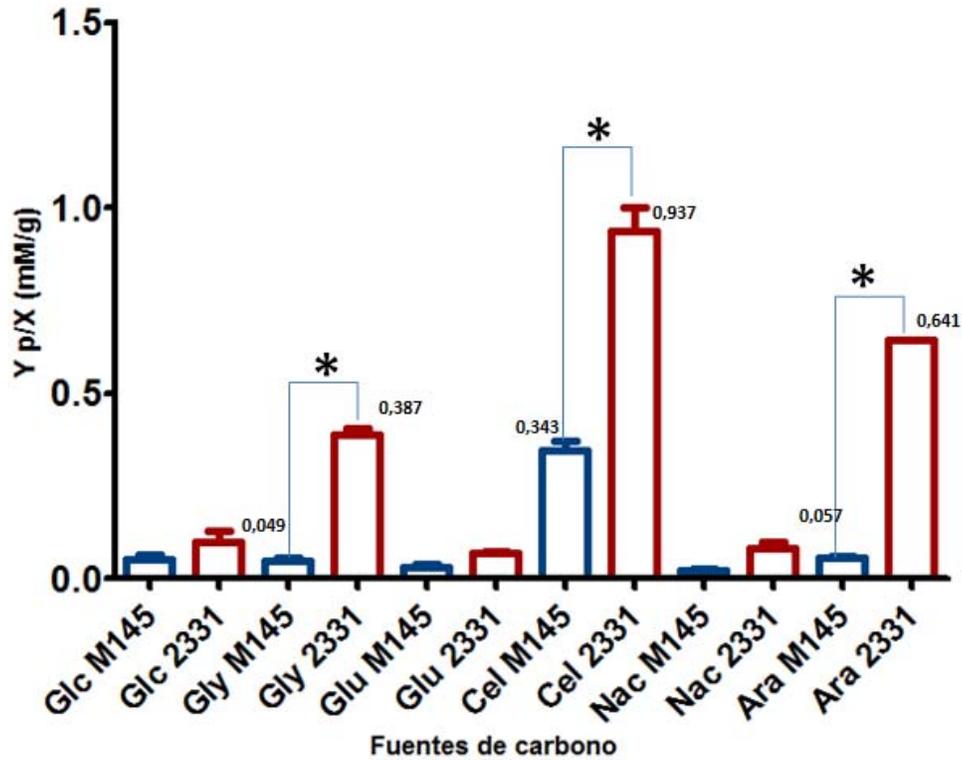
Los resultados (Ver anexo de resultados) obtenidos fueron graficados y procesados estadísticamente (ANOVA seguido de prueba de Tukey) para saber si existen diferencias significativas en los cultivos con el mismo medio y fuente de carbono pero inoculados con cepa silvestre o mutante.



Grafica 1. Rendimiento de RED en medio NMMP a las 48 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, Δ2331: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa. (mM RED/ g de biomasa)

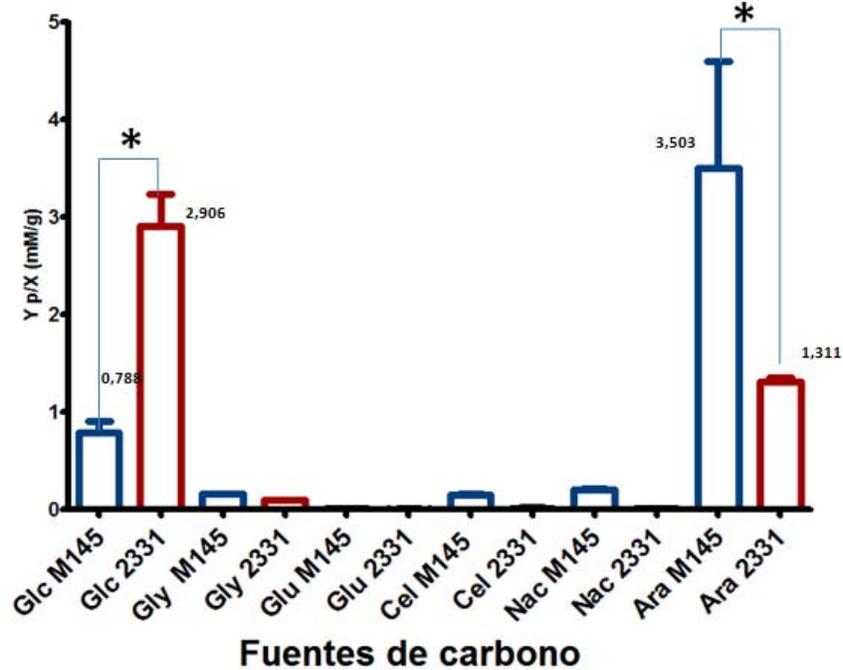
GLC Glucosa; GLY glicerol; GLU glutamato; CEL celobiosa; NAC N-acetilglucosamina; ARA arabinosa.

En la gráfica 1 observamos el rendimiento de RED respecto al crecimiento en medio NMMP con diferente fuente de carbono, los medios NMMP suplementados con glucosa son los únicos que tienen diferencias significativa entre ellos ya que la cepa mutante tiene mayor rendimiento en la producción de RED (1,710 mM/g).



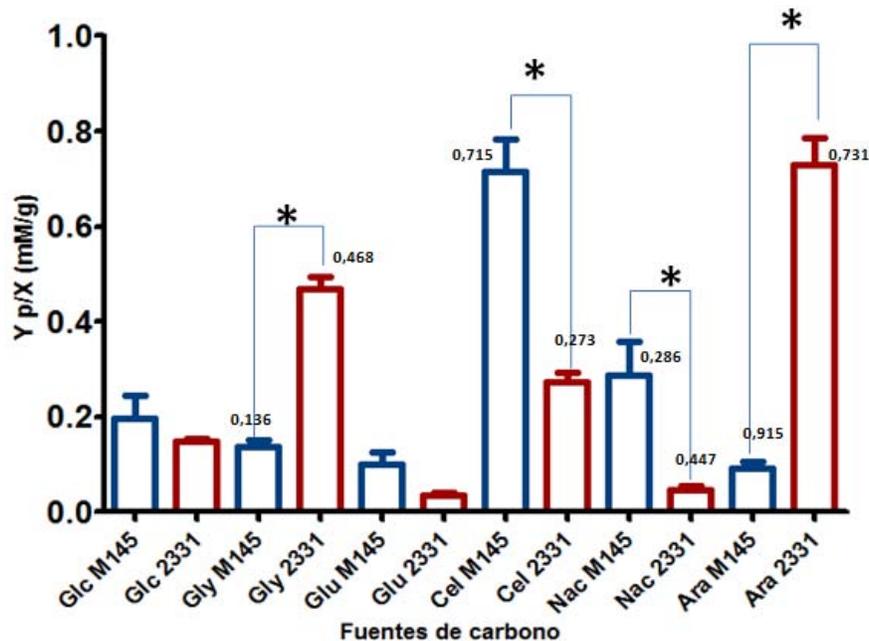
Grafica 2. Rendimiento de RED en medio R2Y a las 48 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, Δ sco2331: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa. (mM RED/ g de biomasa)
 GLC Glucosa; GLY glicerol; GLU glutamato; CEL celobiosa; NAC N-acetilglucosamina; ARA arabinosa.

La gráfica 2 muestra el rendimiento de RED respecto al crecimiento con diferentes fuentes de carbono en medio R2Y. Los cultivos con diferencias significativas son los suplementados con celobiosa, glicerol y arabinosa; en los tres casos la cepa mutante (Δ sco2331) tiene un mayor rendimiento respecto a la silvestre. También podemos notar que el cultivo con un mayor rendimiento es el suplementado con celobiosa, la cual es un disacárido formado por dos glucosas unidas por un enlace $1\beta\rightarrow4$, seguido de la arabinosa y el glicerol.



Grafica 3. Rendimiento de ACT en medio NMMP a las 48 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, Δ sco2331: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa.
 (mM ACT/ g de biomasa)
 GLC Glucosa; GLY glicerol; GLU glutamato; CEL celobiosa; NAC N-acetilglucosamina; ARA arabinosa.

En la gráfica 3 se muestra el rendimiento en la producción de ACT respecto a crecimiento en el medio NMMP, donde los únicos cultivos con diferencia significativa son los suplementados con arabinosa y glucosa. En el caso de la glucosa la cepa mutante tiene un mayor rendimiento en la producción de ACT, fenómeno contrario observado en arabinosa donde la cepa silvestre presenta un mayor rendimiento.



Grafica 4. Rendimiento de ACT en medio R2Y a las 48 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono. M145: cepa silvestre, Δ sco2331: cepa mutante. (*) Diferencia estadísticamente significativa (mM ACT/g de biomasa)
 GLC Glucosa; GLY glicerol; GLU glutamato; CEL celobiosa; NAC N-acetilglucosamina; ARA arabinosa.

Los rendimientos de ACT con respecto al crecimiento en cultivos de R2Y con diferentes fuentes de carbono, se presentan en la gráfica 4. Los medios con glicerol, celobiosa, N-acetilglucosamina y arabinosa son los que presentan diferencias estadísticamente significativas. Mientras que los cultivos que contienen CEL y NAC, el rendimiento de ACT es mayor en la cepa silvestre, en los medios con GLY y ARA la cepa mutante tiene un mayor valor de rendimiento.

Los metabolismos primario y secundario de *Streptomyces*, como ya se ha mencionado son afectados por los nutrientes, como lo son otros eventos celulares (Rigali *et al.*, 2006, Rokem *et al.*, 2007) que implican muchos reguladores ya sea directamente y/o indirectamente (Yang *et al.*, 2009). A este respecto, existen reguladores que afectan el metabolismo primario sólo bajo un estado de nutrientes específico, sin alterar dramáticamente la producción de antibióticos o teniendo un efecto pequeño. Las funciones de estos son fácilmente enmascaradas por los numerosos nutrientes en los medios complejos, que son la elección convencional para el cultivo de estreptomicetos (Yang *et al.*, 2010). Para superar estos obstáculos, en el presente trabajo se usaron los medios NMMP en el que se podía conocer y controlar la fuente de carbono y el medio R2Y que se considera un medio complejo, ya que

tiene como objetivo la producción de antibióticos, en especial de RED por contener prolina, que es un precursor de antibiótico, además de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

En medio NMMP *S. coelicolor* A3(2) produce actinorrodina y undecilprodigiosina solo cuando el cultivo entra en fase estacionaria de crecimiento (Takano *et al.*, 1992). En cultivos líquidos se ha encontrado que la producción de RED está asociada a la acumulación de biomasa (Hobs *et al.* 1990) y frecuentemente precede a la síntesis de ACT (Strauch *et al.*, 1991).

Se sabe que algunas fuentes de carbono regulan la biosíntesis de antibióticos, como la glucosa, y la N-acetilglucosamina. En el caso de la glucosa se sabe que su presencia, reprime la producción de antibióticos, pero los mecanismos no han sido clarificados. Se sabe que la glucosacinasasa tiene un papel importante en la represión de la utilización de fuentes de carbono alternativas (Hodgson *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 2013).

La N-acetilglucosamina (NAC) se transporta y fosforila por PTS, una vez fosforilada sirve como una molécula señalizadora que se une al regulador DasR (Deficient in aerial mycelium and spore formation), reprimiendo la expresión de *actII-ORF* y *redZ*, modificando la producción de ambos metabolitos (Hoskisson & Rigali, 2009). Por el contrario la adición de NAC a cultivos con medio mínimo estimula la producción de antibióticos y el desarrollo, esta observación es difícil de explicar debido a las actividades reportadas para DasR (Liu *et al.*, 2013).

El gen que posiblemente este regulando el *sco2331*, es el *sco2332*, el cual se encuentra divergentemente transcrito a la proteína MarR y que tiene identidad con el componente E2 de la acetilCoA deshidrogenasa y acetoina deshidrogenasa; las cuales catalizan una reacción de oxidación (Ver figura 25) cuyo producto es la AcetilCoA, provocando variaciones en la poza de este producto metabólico, que como se ha descrito tiene importantes efectos en la producción de metabolitos secundarios y podría explicar los efectos descritos anteriormente; ya que no solo es el precursor del malonil-CoA. También alimenta al ciclo de Krebs, el cual aportaría los otros precursores necesarios para la síntesis tanto de RED y ACT.

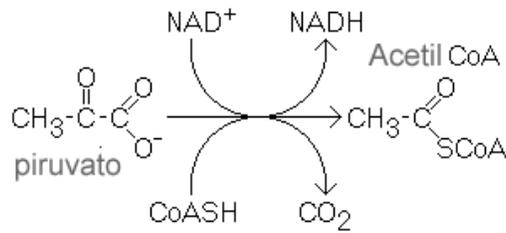


Figura 25 Reacción llevada a cabo por el complejo acetilCoA deshidrogenasa.

La interrupción del gen *sco2331* no parece afectar el metabolismo general de la célula; respecto al crecimiento en las condiciones probadas, se observó que la producción de biomasa de la cepa $\Delta\text{sco2331}$ es ligeramente menor en todos los medios, sin embargo, no se realizó un análisis estadístico para corroborar esta diferencia.

En el caso de la producción de RED en cultivo NMMP (Gráfica 1), en todos los cultivos con las diferentes fuentes de carbono hubo producción de RED, pero los únicos que presentaron diferencia significativa entre si fueron los suplementados con GLC, donde el título de antibiótico es mayor para la cepa mutante. Como ya se mencionó, la glucosa ejerce un efecto negativo en la producción de antibióticos, por lo que la sobreproducción podría explicarse de manera que la mutante podría estar salvándose de este efecto o que de alguna forma la poza de acetil-CoA incrementara lo que afectaría la cantidad de precursores para la biosíntesis de RED. Además comparando el rendimiento de RED en NMMP con glucosa y los rendimientos obtenidos en medio R2Y, en medio mínimo es mucho mayor; una explicación a esto podría ser el estrés al que se somete la célula en un medio con fuentes limitadas de nutrientes.

El medio R2Y es un medio complejo, por contener entre otras cosas, extracto de levadura como fuente de nitrógeno, además se adicionó prolina para favorecer la producción de antibióticos, sobre todo RED, como se demuestra en algunos estudios (Hobs *et al.*, 1990), por lo que se esperaría un mayor título de antibióticos, efecto que no se se observa en los cultivos realizados. Lo anterior podría deberse a que al ser un medio rico, el cultivo tardaría más tiempo en llegar la fase estacionaria y por tanto en la producción de metabolitos secundarios; hay que tomar en cuenta que los datos reportados son para las 48 horas, tal vez a tiempos mayores de fermentación veríamos un mayor rendimiento en medio R2Y. Se observa diferencia significativa en la producción de RED en los medios R2Y suplementados con glicerol, celobiosa y arabinosa; en los tres casos la cepa $\Delta\text{sco2331}$ tiene mayor rendimiento que la cepa silvestre. El glicerol puede incorporarse a la glucólisis y obtener acetil-CoA, la arabinosa también podría incorporarse a esta vía, siendo catabolizada

hasta 3-P-gliceraldehído, que se incorpora en la glucólisis. Con celobiosa se presentó el mayor rendimiento en cultivo, y por ser un dímero de glucosa se pensaría que es metabolizada vía glucólisis (ver figura 26).

Las tres fuentes de carbono que presentaron diferencias estadísticamente significativas en medio R2Y para la producción de RED son: GLY, CEL y ARA, algunos de sus productos de degradación podrían incorporarse a la glucólisis, por lo que se afectarían la poza de acetil-CoA; a diferencia de otras como el glutamato en cuyo rendimiento no se obtuvieron diferencias significativas cuyos productos catabólicos alimenta al ciclo de Krebs. Lo anterior nos lleva a pensar la hipótesis de que la mutante, gracias al efecto del gen *sco2331* tiene afectado el gen que se presume como objetivo (*sco2332*) y por consiguiente tiene un cambio en el equilibrio de la reacción por lo que acumularía acetil-CoA.

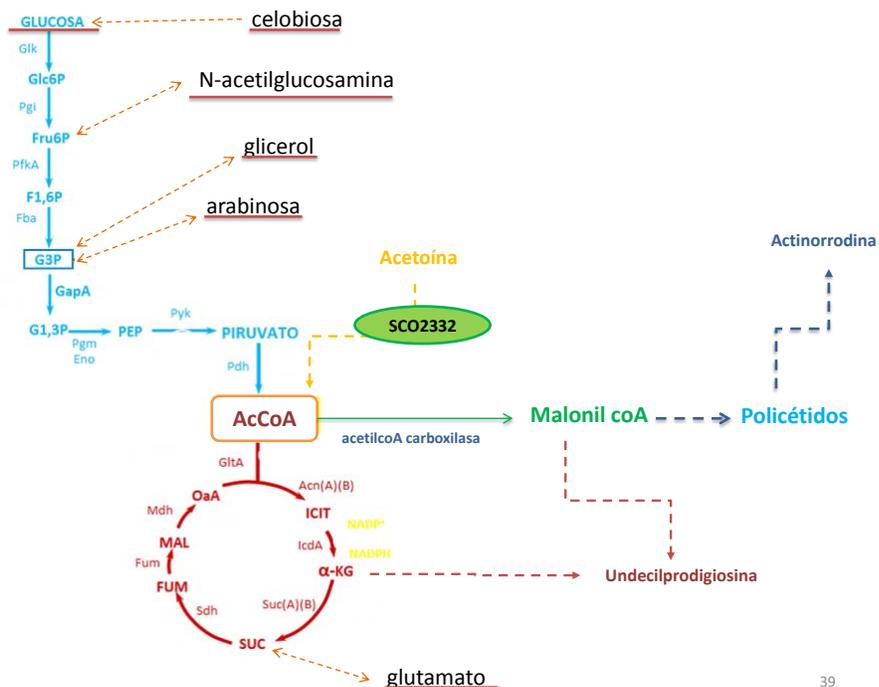


Figura 26. Mapa metabólico donde se muestra la incorporación al metabolismo primario de las fuentes de carbono elegidas: glucosa, celobiosa, N-acetilglucosamina, glicerol, arabinosa, acetoína, glutamato. Las líneas punteadas representan más de un paso en la incorporación de moléculas a la glucólisis. (Modificado de Centeno, 2014)

Sabiendo que el principal precursor de la actinorrodina es el malonil-CoA, que proviene de la acetil-CoA por acción de la acetilCoA-carboxilasa, además del poder reductor (NADH), podría explicarse que las fuentes de carbono que se metabolizan por glucólisis, como la glucosa, arabinosa, N-acetilglucosamina y celobiosa tuvieron un impacto favorable en la

producción de ACT en medio NMMP, pero solo lo observamos en el rendimiento de la producción en el cultivo con glucosa y arabinosa. Se ha reportado el efecto represor de la glucosa sobre la producción de ACT, el cual se observa en la cepa silvestre pero no en la mutante, lo que podría contribuir a la sobreproducción en la cepa $\Delta sco2331$. El fenómeno contrario observamos en arabinosa, en donde la producción de ACT en la cepa mutante fue menor respecto a la silvestre en medio NMMP, esto podría deberse a que los intermediarios catabólicos de la arabinosa si bien pueden incorporarse a la glucólisis, la arabinosa también puede generar por ejemplo, nucleótidos.

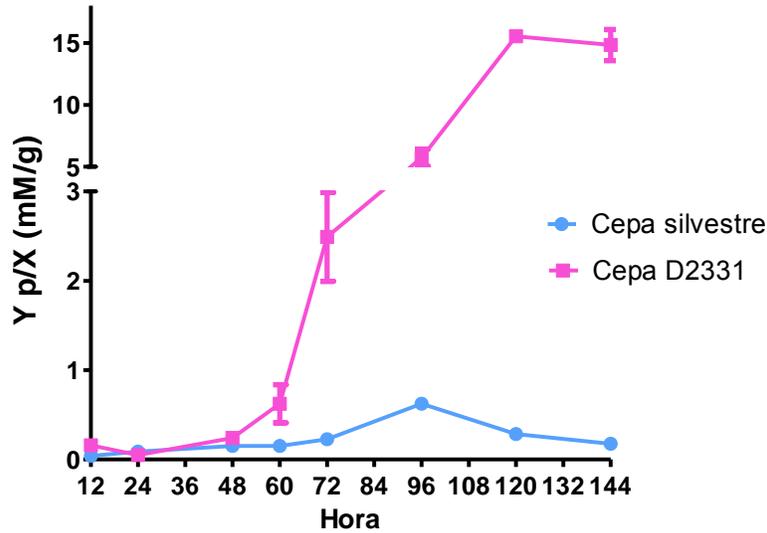
En el medio R2Y, la producción de actinorrodina fue estadísticamente significativa en los medios con glicerol, celobiosa, arabinosa y N-acetilglucosamina. En el caso de la NAC y la CEL, el rendimiento fue mayor para la cepa silvestre. Como ya se mencionó, esto podría explicarse por el retardamiento en la producción de este antibiótico ya que se muestreó a las 48 horas, por lo que no se sabe si a tiempos más prolongados la producción habría sido mayor, implicando que no necesariamente la producción estuviera disminuida. En cambio los cultivos con ARA y GLY favorecieron la sobreproducción de ACT en la cepa $\Delta sco2331$, una explicación a esto es que el catabolismo de estas fuentes podría estar favoreciendo la poza de acetil-CoA.

Siguiendo la idea que el gen objetivo del $sco2331$, podría estar involucrado en una reacción de oxidación cuyo principal producto es la acetil-CoA, partiendo de piruvato o acetoína; debería haber variaciones en la poza de acetilCo-A, y esto a su vez, afectar la poza de los precursores. Es por ello que se decidió realizar una cinética de crecimiento de ambas cepas (silvestre y mutante), en medio mínimo (NMMP), ya que el R2Y al ser un medio completo podría enmascarar los efectos del gen. En el experimento se siguió el incremento de la biomasa, undecilprodigiosina y actinorrodina a través del tiempo; de nueva cuenta, con el fin de comparar los perfiles de producción.

Cinéticas de crecimiento en glucosa y acetoína

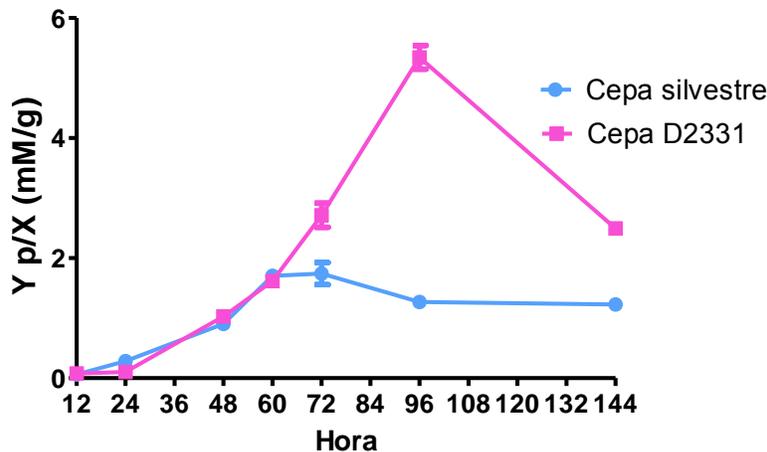
Durante las cinéticas de crecimiento, se siguió la producción de biomasa, undecilprodigiosina y de actinorrodina, en medios NMMP suplementados con 100 mM de glucosa o 10 mM de acetoína. A cada tiempo muestreado se calculó el rendimiento del antibiótico respecto a la biomasa para cada condición; en las siguientes gráficas se reportan los resultados obtenidos.

La producción de RED en medio NMMP con glucosa 100 mM (gráfica 5) se encontró favorecida 25 veces más en la cepa mutante.



Gráfica 5. Rendimiento de RED respecto a biomasa en medio NMMP 100 mM GLC. (mM RED/g de biomasa)

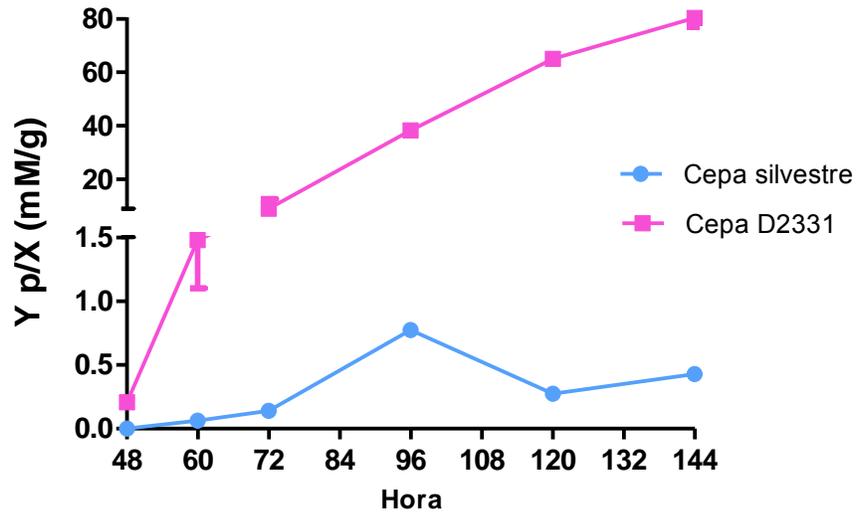
El rendimiento de RED en acetoina (gráfica 6) fue mayor tre veces en la cepa $\Delta sco2331$, teniendo la producción máxima a las 96 horas, en contraste con la cepa silvestre que apareció a las 60 horas. En ambas cepas el rendimiento fue mayor en medio con glucosa que con acetoina.



Gráfica 6. Rendimiento de RED con respecto a biomasa en medio NMMP 10 mM Acetoina. (mM RED/g de biomasa).

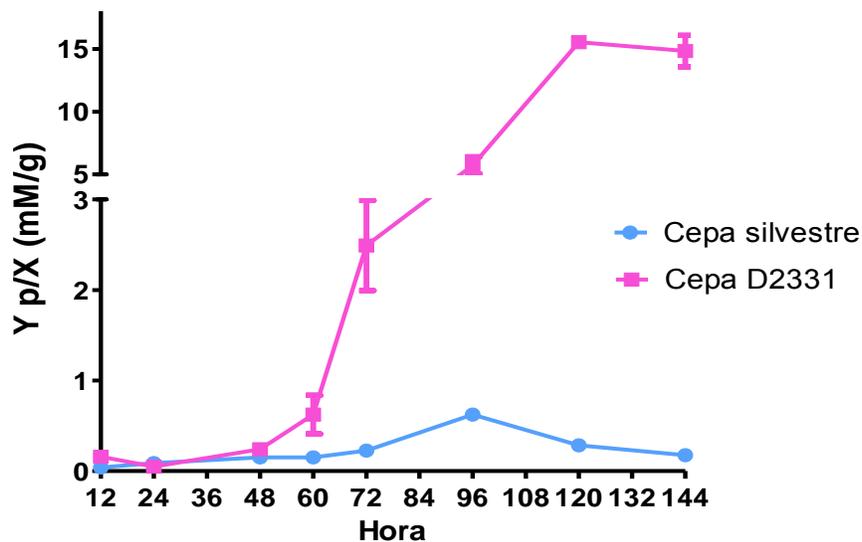
Los rendimientos de actinorrodina en medio NMMP con glucosa (gráfica 7) con relación a la biomasa fueron mayores 104 veces en la cepa mutante. Es lógico pensar que la ACT al

producirse después que la RED, tendría que empezar su producción a tiempos mayores que la undecilprodigosina, es por eso que el primer muestreo se llevó a cabo a las 48 horas.



Gráfica 7. Rendimiento de ACT con respecto a biomasa en medio NMMP con 100 mM GLC. (mM ACT/g de biomasa).

En la gráfica 8, se encuentra el rendimiento en la producción de actinorrodina en medio NMMP con acetoina. Al igual que con la producción de RED en acetoina, la cepa mutante tuvo 35 veces mayor rendimiento; además con glucosa hubo mayor producción de ACT respecto al cultivo adicionado con acetoina.



Gráfica 8. Rendimiento de ACT respecto a biomasa en medio NMMP 10 mM Acetoina. (mM ACT/g de biomasa).

En todas las condiciones evaluadas, la producción de RED y ACT en la cepa mutante fue mayor que en la cepa silvestre. En los cultivos con acetoína (gráficas 6 y 8), la mayor producción de metabolitos secundarios por parte de la mutante fue notable, esto podría explicarse ya sea por el cambio en las pozas de precursores, tanto por el estrés, ya que la acetoína es un compuesto muy tóxico para la célula, se ha reportado que numerosos microorganismos no son capaces de crecer en cultivos cuya fuente de carbono es la acetoína (Xiao & Xu, 2007). Debido a los resultados obtenidos, es evidente que tanto la cepa silvestre como la mutante fueron capaces de crecer y producir antibióticos en medios cuya única fuente de carbono es la acetoína; respecto a esto, no hay estudios en donde se reporte el crecimiento de *Streptomyces* en presencia de esta. Por estas razones antes de afirmar que la cepa mutante es capaz de aprovechar mejor la acetoína como fuente de carbono, debido a la hipótesis del incremento de la poza de acetil-CoA para la producción de antibióticos, haría falta estudiar las vías por la que de manera silvestre el organismo es capaz de usar esta fuente de energía.

Por otro lado, con la concentración de 100 mM de glucosa en el medio (gráficas 5 y 7) se esperaría el efecto negativo en la producción; que como ya se ha discutido no parece observarse en la cepa $\Delta sco2331$. La ausencia de este efecto negativo podría ser por dos factores ya expuestos, que el incremento de las pozas de precursores contienda con este efecto o que la mutación por medio de complejas redes de interacciones, que involucren otras proteínas reguladoras, esté afectando la producción.

9. CONCLUSIONES

Después de la búsqueda, se eligió el gen *sco2331* para analizar el efecto de su interrupción en *Streptomyces coelicolor*.

El gen *sco2331* que codifica para un regulador tipo MarR fue intercambiado por un gen de resistencia en el genoma de *S. coelicolor* M145.

La interrupción parece afectar favorablemente la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina en medio NMMP con glucosa (100 mM) y acetoína (10 mM). El rendimiento respecto a biomasa en medio con GLC es mayor al de ACET para ambos metabolitos secundarios.

Además, en cultivos de R2Y, la producción de RED se ve favorecida en la cepa mutante en cultivos con celobiosa, glicerol y arabinosa. En medio mínimo suplementado con arabinosa, la producción de ACT se ve desfavorecida en la cepa mutante respecto a la silvestre; ocurre lo mismo pero en cultivos de R2Y con celobiosa y N-acetilglucosamina. Mientras que en cultivos con glicerol y arabinosa la producción se ve favorecida.

PERSPECTIVAS

- Ensayos de EMSA para corroborar que la proteína *sco2331* se une al DNA.
- Ensayos de gen reportero para saber si la proteína *sco2331* es un TF.
- Mediciones de RNAm del posible gen blanco (*sco2332*) del TF tipo MarR.
- Dilucidar con ayuda de herramientas bioinformáticas, la vía catabólica de la acetoína en *Streptomyces coelicolor*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, M. T., Merlo, M. E., Hodgson, D. A., Wellington, E. M., Takano, E., & Breitling, R. (2010). Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC genomics*, 11(1), 202.
- Alekshun, M. N., Levy, S. B., Mealy, T. R., Seaton, B. A., & Head, J. F. (2001). The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(8), 710-714.
- Arias, P., Fernández-Moreno, M. A., & Malpartida, F. (1999). Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) as a DNA-binding protein. *Journal of bacteriology*, 181(22), 6958-6968.
- Banchio, C., & Gramajo, H. (2002). A stationary-phase acyl-coenzyme A synthetase of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) is necessary for the normal onset of antibiotic production. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4240-4246.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885), 141-147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbiological metabolites. *The Journal of antibiotics*, (58), 1-26.
- Bibb M. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8 (2), 208-15.
- Borodina, I., Siebring, J., Zhang, J., Smith, C. P., van Keulen, G., Dijkhuizen, L., & Nielsen, J. (2008). Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) mediated by phosphofructokinase deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25186-25199.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57-65.
- Bystrykh, L. V., Fernández-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., & Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology*, 178(8), 2238-2244.
- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current opinion in structural biology*, 20(6), 763-771.
- Cerdeño, A. M., Bibb, M. J., & Challis, G. L. (2001). Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & biology*, 8(8), 817-829.
- Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E., & Shen, B. (2008). Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *Journal of bacteriology*, 190(16), 5587-5596.

- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 116-123.
- Coze, F., Gilard, F., Tcherkez, G., Virolle, M. J., & Guyonvarch, A. (2013). Carbon-Flux Distribution within *Streptomyces coelicolor* Metabolism: A Comparison between the Actinorhodin-Producing Strain M145 and Its Non-Producing Derivative M1146. *PLoS one*, 8(12).
- Davis, J. R., & Sello, J. K. (2010). Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(3), 921-929.
- Davis, J. R., Brown, B. L., Page, R., & Sello, J. K. (2013). Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic acids research*, 41(6), 3888-3900.
- Demain A. L. (2000) Microbial biotechnology. *TIBTECH*, 18, 89-93.
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Evans, K., Adewoye, L., & Poole, K. (2001). MexR Repressor of the mexAB-oprMMultidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR Binding Sites in the mexA-mexRIntergenic Region. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 807-812.
- Fernández-Moreno, M. A., Martínez, E., Boto, L., Hopwood, D. A., & Malpartida, F. (1992). Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19278-19290.
- Fernández-Moreno, M. A., Martínez, E., Caballero, J. L., Ichinose, K., Hopwood, D. A., & Malpartida, F. (1994). DNA sequence and functions of the actVI region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Biological Chemistry*, 269(40), 24854-24863.
- Gajiwala, K. S., & Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current opinion in structural biology*, 10(1), 110-116.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1541-1546.
- Gust, B., Kieser, T., & Chater, K. F. (2002). REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. *The John Innes Centre, Norwich, United Kingdom*.
- Guthrie EP, Flaxman CS, White J, Hodgson DA, Bibb MJ, Chater KF. (1998). A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket. *Microbiology* 144:727–738.
- Heo, G. Y., Kim, W. C., Joo, G. J., Kwak, Y. Y., Shin, J. H., Roh, D. H., & Rhee, I. K. (2008). Deletion of xylR gene enhances expression of xylose isomerase in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Microbiologic and Biotechnology*, 18(5), 837-844.

- Higo, A., Hara, H., Horinouchi, S., & Ohnishi, Y. (2012). Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network. *DNA research*, 19(3), 259-274.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C., Flett, F., & Oliver, S. G. (1990). Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2): kinetics and the influence of nutrients. *Journal of general microbiology*, 136(11), 2291-2296.
- Holley, T. A., Stevenson, C. E., Bibb, M. J., & Lawson, D. M. (2013). High resolution crystal structure of sco5413, a widespread actinomycete MarR family transcriptional regulator of unknown function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(1), 176-182.
- Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D., & Brennan, R. G. (2005). Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Molecular cell*, 20(1), 131-141.
- Huang, H., & Grove, A. (2013). The transcriptional regulator TamR from *Streptomyces coelicolor* controls a key step in central metabolism during oxidative stress. *Molecular microbiology*, 87(6), 1151-1166.
- Huang, H., Mackel, B. J., & Grove, A. (2013). *Streptomyces coelicolor* encodes a urate-responsive transcriptional regulator with homology to PecS from plant pathogens. *Journal of bacteriology*, 195(21), 4954-4965.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F. B., & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and Molecular Characterization of the *Bacillus subtilis* Acetoin Catabolic Pathway. *Journal of bacteriology*, 181(12), 3837-3841.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., & Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*, 21(5), 526-531.
- Iqbal M, Mast Y, Amin R, Hodgson DA, Wohlleben W, Burroughs NJ. 2012. Extracting regulator activity profiles by integration of de novo motifs and expression data: characterizing key regulators of nutrient depletion responses in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*. 40:5227– 5239.
- Ishihama, A. (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS microbiology reviews*, 34(5), 628-645.
- Iwagami, S. G., Yang, K., & Davies, J. (2000). Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1499-1508.
- Johansen, L., Bryn, K., & Stormer, F. C. (1975). Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in *Aerobacter (Enterobacter) aerogenes*. *Journal of bacteriology*, 123(3), 1124-1130.
- Kang SG, Jin W, Bibb M, Lee KJ. 1998. Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and relA mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *Fems Microbiology Letters*, 168(2), 221-226.

Kumarevel, T. (2012). *The MarR family of transcriptional regulators-a structural perspective*. INTECH Open Access Publisher.

Kumarevel, T., Tanaka, T., Umehara, T., & Yokoyama, S. (2009). ST1710–DNA complex crystal structure reveals the DNA binding mechanism of the MarR family of regulators. *Nucleic acids research*, 37(14), 4723-4735.

Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112-143.

López, J. M., Thomas, B., & Rehbein, H. (1975). Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. *European Journal of Biochemistry*, 57(2), 425-430.

Magee, R. J., & Kosaric, N. (1987). The microbial production of 2, 3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 32, 89-161.

Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., & Hopwood, D. A. (1990). Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene*, 93(1), 91-99.

Martín, J. F., & Liras, P. (2010). Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology*, 13(3), 263-273.

Martin, R. G., & Rosner, J. L. (1995). Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5456-5460.

Martin, R. G., Jair, K. W., Wolf, R. E., & Rosner, J. L. (1996). Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 178(8), 2216-2223.

Mayer, D., Schlenz, V., & Böck, A. (1995). Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *Journal of bacteriology*, 177(18), 5261-5269.

Melzoch, K., De Mattos, M. T., & Neijssel, O. M. (1997). Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) grown in chemostat culture. *Biotechnology and bioengineering*, 54, 577-582.

Minezaki, Y., Homma, K., & Nishikawa, K. (2006). Genome-wide survey of transcription factors in prokaryotes reveals many bacteria-specific families not found in archaea. *DNA Research*, 12(5), 269-280.

Nieselt, K., Battke, F., Herbig, A., Bruheim, P., Wentzel, A., Jakobsen, O. M., & Wellington, E. M. (2010). The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC genomics*, 11(1), 10.

Nothaft H, Rigali S, Boomsma B, Swiatek M, McDowall KJ, van Wezel GP, Titgemeyer F. 2010. The permease gene nagE2 is the key to N- acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Molecular Microbiology*. 75:1133–1144.

- O'Rourke, S., Wietzorrek, A., Fowler, K., Corre, C., Challis, G. L., & Chater, K. F. (2009). Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 71(3), 763-778.
- Oh, S. Y., Shin, J. H., & Roe, J. H. (2007). Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 189(17), 6284-6292.
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, Tomono A, Horinouchi S. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69:431-439.
- Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., & Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster. *Chemistry & biology*, 16(2), 226-236.
- Pak, P., & Elliot, M. A. (2010). Regulation of a novel gene cluster involved in secondary metabolite production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 192(19), 4973-4982.
- Perera, I. C., & Grove, A. (2010). Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *Journal of molecular cell biology*, 2(5), 243-254.
- Pérez-Rueda, E., Collado-Vides, J., & Segovia, L. (2004). Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea. *Computational biology and chemistry*, 28(5), 341-350.
- Podgornaia, A. I., & Laub, M. T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current opinion in microbiology*, 16(2), 156-162.
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 326-356.
- Rigali, S., Nothhaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., & van Wezel, G. P. (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. *Molecular microbiology*, 61(5), 1237-1251.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), 670-675.
- Rodionov, D. A. (2007). Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chemical reviews*, 107(8), 3467-3497.
- Rokem, J. S., Lantz, A. E., & Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural product reports*, 24(6), 1262-1287.
- Romero, A., Robledo, I., Tierrafría, V. & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. (Submitted).

- Ryu, Y. G., Butler, M. J., Chater, K. F., & Lee, K. J. (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7132-7139.
- Sánchez, S. & Demain, L. (2015). Antibiotics. Current innovations and future trends. *Caister Academic Press*
- Santos, C. L., Tavares, F., Thioulouse, J., & Normand, P. (2009). A phylogenomic analysis of bacterial helix–turn–helix transcription factors. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 411-429.
- Sevcikova, B., & Kormanec, J. (2004). Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Archives of microbiology*, 181(5), 384-389.
- Sheeler NL, MacMillan SV, Nodwell JR. 2005. Biochemical activities of the absA two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*. 187:687–696.
- Shin, J. H., Singh, A. K., Cheon, D. J., & Roe, J. H. (2011). Activation of the SoxR regulon in *Streptomyces coelicolor* by the extracellular form of the pigmented antibiotic actinorhodin. *Journal of bacteriology*, 193(1), 75-81.
- Stevenson, C. E., Kock, H., Mootien, S., Davies, S. C., Bibb, M. J., & Lawson, D. M. (2007). Crystallization and preliminary X-ray analysis of AbsC, a novel regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), 233-235.
- Strauch, E., Takano, E., Baylts, H. A., & Bibb, M. J. (1991). The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology*, 5(2), 289-298.
- Taguchi, T., Itou, K., Ebizuka, Y., Malpartida, F., Hopwood, D. A., Surti, C. M., & Ichinose, K. (2000). Chemical characterisation of disruptants of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) *actVI* genes involved in actinorhodin biosynthesis. *The Journal of antibiotics*, 53(2), 144-152.
- Takano, E. (2006). γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 287-294.
- Takano, E., Gramajo, H. C., Strauch, E., Andres, N., White, J., & Bibb, M. J. (1992). Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular microbiology*, 6(19), 2797-2804.
- Thomas, L., Hodgson, D. A., Wentzel, A., Nieselt, K., Ellingsen, T. E., Moore, J., & Smith, M. C. (2012). Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and phoP mutant grown in batch culture. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(2), M111-013797.
- Tsau, J. L., Guffanti, A. A., & Montville, T. J. (1992). Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*, 58(3), 891-894.

Tseng, C. P., Tsau, J. L., & Montville, T. J. (1991). Bioenergetic consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in environmental oxygen and pH in chemostat cultures. *Journal of bacteriology*, 173(14), 4411-4416.

Uguru GC, Stephens KE, Stead JA, Towle JE, Baumberg S, McDowall KJ. 2005. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 58(1), 131-150.

Ulrich, L. E., Koonin, E. V., & Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in microbiology*, 13(2), 52-56.

Wang R, Mast Y, Wang J, Zhang W, Zhao G, Wohlleben W, Lu Y, Jiang W. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 87(1), 30-48.

White J, Bibb M (1997) bldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology*. 179:627–633.

Wilkinson, S. P., & Grove, A. (2004). HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51442-51450.

Wilkinson, S. P., & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current issues in molecular biology*, 8(1), 51.

Xiao, Z., & Xu, P. (2007). Acetoin metabolism in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 33(2), 127-140.

Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Lee, K., Kim, W. S., Park, S. S., & Kim, B. G. (2009). NdgR, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 501-511.

Yang, Y. H., Song, E., Lee, B. R., Kim, E. J., Park, S. H., Kim, Y. G., ... & Kim, B. G. (2010). Rapid functional screening of *Streptomyces coelicolor* regulators by use of a pH indicator and application to the MarR-like regulator AbsC. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3645-3656.

Yu Z, Zhu H, Dang F, Zhang W, Qin Z, Yang S, Tan H, Lu Y, Jiang W. 2012. Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*. 85:535–556.

11. ANEXO DE RESULTADOS

Resultados de secuenciación

1. Amplificación del gen *sco2331*

DNA genómico molde: *S. coelicolor* M145
Oligonucleótidos: 2331
Amplicón esperado: Gen *sco2331*, 456 pb.

BLAST de nucleótidos: resultado de secuenciación vs *sco2331*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

Identidad: 99%

Cobertura 94%

Resultado de secuenciación

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNGNNTCCTCGGGCAGGCGATCAAGCGTGCCCAGTACCGCAACCACCGCG  
CGATGGACGCAGCGCTGCGCGAGACCGGGGTCAGCCTCGTCCAGTGGGACGCGCTGCGCGCC  
ATCGAGCGGATGCCCGGAGCCTCTGGGCACGAACTGGCCGTCGCGACGTTCCAGAGCGACCAG  
GCGTTCGGCACCCCTCGCGAACC GGCTCGTGGAGCGCGGGCTCATCACCCGGTCCGCAGGCCG  
TGGGCGACGCCTCGATCACGCGCTCACCGAGTCGGGGCGGGCGGCACTCGCGGAAGGGCGGC  
AGTTGGCGACCGGTGTCCTGCGGGACCTCTTCGCACCTCTCGGCGAGGAGCAGCGGGCGCAAC  
TGCTGCGCGCGCTCCGGGACCTGACCGAGGGCCCCTAGGTCAG  
AGCTCCCTGCGACAGNACGA
```

Gen *sco2331* <http://strepdb.streptomyces.org.uk/>

```
ATGGCGACCGACCTGGAAGTCTCGGGCAGGCGATCAAGCGTGCCCAGTACCGCAACCACCGC  
GCGATGGACGCAGCGCTGCGCGAGACCGGGGTCAGCCTCGTCCAGTGGGACGCGCTGCGCGC  
CATCGAGCGGATGCCCGGAGCCTCTGGGCACGAACTGGCCGTCGCGACGTTCCAGAGCGACCA  
GGCGTTCGGCACCCCTCGCGAACC GGCTCGTGGAGCGCGGGCTCATCACCCGGTCCGCAGGCC  
GTGGGCGACGCCTCGATCACGCGCTCACCGAGTCGGGGCGGGCGGCACTCGCGGAAGGGCGG  
CAGTTGGCGACCGGTGTCCTGCGGGACCTCTTCGCACCTCTCGGCGAGGAGCAGCGGGCGCAA  
CTGCTGCGCGCGCTCCGGGACCTGACCGAGGGCCCCTAG
```

2. Amplificación del casete de apramicina

DNA genómico molde: *S. coelicolor* Δ *sco2331*
Oligonucleótidos: 2331
Amplicón esperado: Casete de resistencia, 1434 pb

BLAST de nucleótidos: resultado de secuenciación vs casete de resistencia a apramicina.
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Identidad: 99%

Cobertura: 98%

Resultado de secuenciación

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNCGACTGCAGTTCGAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTTCGAAGTCCC  
GCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCTGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATANNGGACAGTGAAGAAGGAACA  
CCCGCTCGCGGGTGGGCCTACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAGTCT  
ACACGAACCCTTTGGCAAAATCCTGTATATCGTGCGAAAAGGATGGATATACCGAAAAAATCGCTATAATG
```

ACCCGAAGCAGGGTTATGCAGCGGAAAATGCAGCTCACGGTAACTGATGCCGTATTTGCAGTACCAGCGT
ACGGCCACAGAATGATGTCACGCTGAAAATGCCGGCCTTTGAATGGGTTTCATGTGCAGCTCCATCAGCAA
AAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGTGCCGTTGATCGTGCTATGATCGACTGATGT
CATCAGCGGTGGAGTGCAATGTCGTGCAATACGAATGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGTGAGCTTCTCAAC
CTTGGGGTTACCCCGGCGGTGTGCTGCTGGTCCACAGCTCCTTCCGTAGCGTCCGGCCCTCGAAGATG
GGCCACTTGGACTGATCGAGGCCCTGCGTGCTGCGCTGGGTCCGGGAGGGACGCTCGTCATGCCCTCGT
GGTCAGGTCTGGACGACGAGCCGTTTCGATCCTGCCACGTGCCCCGTTACACCGGACCTTGGAGTTGTCTC
TGACACATTCTGGCGCCTGCCAAATGTAAGCGCAGCGCCCATCCATTTGCCCTTTCGCGCAGCGGGGCCA
CAGGCAGAGCAGATCATCTCTGATCCATTGCCCTGCCACCTCACTCGCCTGCAAGCCCGGTGCCCCGTG
TCCATGAACTCGATGGGCAGGTAATCTCCTCGGCGTGGGACACGATGCCAACACGACGCTGCATCTTGC
CGAGTTGATGGCAAAGTTCCCTATGGGGTGCCGAGACACTGCACCATTCTTCAGGATGGCAAGTTGGTAC
GCGTCGATTATCTCGAGAATGACCACTGCTGTGAGCGCTTTCCTTGGCGGACAGGTGGCTCAAGGAGAA
GAGCCTTCAGAAGGAAGTCCAGTCGGTCATGCCTTTCGCTCGGTTGATCCGCTCCCGCGACATTGTGGCG
ACAGCCCTGGGTCAACTGGGCCGAGATCCGTTGATCTTCTGCATCCGCCAGAGGCGGGATGCCAAGAAT
GCGATGCCGCTCGCCAG

Casete de resistencia a apramicina Gus *et al.*, 2003.

AAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTATGAGCTCAGCCAATCGACTGGCGAG
CGGCATCGCATTCTTCGCATCCCGCCTCTGGCGGATGCAGGAAGATCAACGGATCTCGGCCAGTTGACC
CAGGGCTGTGCCACAATGTCGCGGGAGCGGATCAACCGAGCAAAGGCATGACCGACTGGACCTTCTTTC
TGAAGGCTCTTCTCCTTGGAGCCACCTGTCCGCCAAGGCAAAGCGCTCACAGCAGTGGTCATTCTCGAGATA
ATCGACGCGTACCAACTTGCATCCTGAAGAATGGTGCAGTGTCTCGGCACCCCATAGGGAACCTTTGCCA
TCAACTCGGCAAGATGCAGCGTCGTGTTGGCATCGTGTCCACGCGGAGGAGAAGTACCTGCCCATCGAG
TTCATGGACACGGGCGACCGGGCTTGCAGGCGAGTGAGGTGGCAGGGGCAATGGATCAGAGATGATCTG
CTCTGCCTGTGGCCCCGCTGCCGCAAAGGCAAATGGATGGGCGCTGCGCTTACATTTGGCAGGGCGCCAG
AATGTGTGACAGACAACCTCAAGGTCCGGTGTAAACGGGCGACGTGGCAGGATCGAACGGCTCGTCGTCCA
GACCTGACCACGAGGGCATGACGAGCGTCCCTCCCGGACCCAGCGCAGCACGAGGGCCCTCGATCAGTC
CAAGTGGCCCATCTTCGAGGGGCGGACGCTACGGAAGGAGCTGTGGACCAGCAGCACACCGCCGGGGG
TAACCCCAAGGTTGAGAAGCTGACCGATGAGCTCGGCTTTTCGCCATTTCGTATTGCACGACATTGCACTCC
ACCGCTGATGACATCAGTCGATCATAGCACGATCAACGGCACTGTTGCAAATAGTCGGTGGTGATAAACTTA
TCATCCCCTTTTGTGATGGAGCTGCACATGAACCCATTCAAAGGCCGGCATTTCAGCGTGACATCATTCT
GTGGGCGGTACGCTGTTACTGCAAATACGGCATCAGTTACCGTGAGCTGCATTTTCGCTGCATAAACCCTG
CTTCGGGGTCAATTATAGCGATTTTTTCGGTATATCCATCCTTTTTTCGCACGATACAGGATTTTGCCAAAGG
GTTTCGTGTAGACTTTTCTTGGTGTATCCAACGGCGTCAGCCGGGCGAGGATAGGTGAAGTAGGCCACCCG
CGAGCGGGTGTTCCTTCTTCACTGTCCCTTATTCGCACCTGGCGGTGCTCAACGGGAATCCTGCTCTGCGA
GGCTGGCGGGAACCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGAAGTTCGA

3. Amplificación del gen *aac(3)/IV*

DNA genómico: *S. coelicolor* Δ *sco2331*

Oligonucleótidos: *apra*

Amplión: Fragmento del gen *aac(3)/IV*, 221pb.

BLAST de nucleótidos: Resultado de secuenciación vs fragmento del gen *aac(3)/IV*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Identidad: 97%

Cobertura: 59%

Resultado de secuenciación

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTNNNNNNNTGCAGNNNGTNNNNNNNTGTNCATGAACTCGATGGGCAGGTAC
TNCNCTCGGCGTGGGACACGATGCCAACACGACGCTGCATCTTCCGAGTTGATGGCAAAGGTTCCCTA
TGGGGTGCCGAGACACTGCACCATTCTTCNGGATGGGNCCNNNNNATACGCA

Fragmento del gen *aac(3)IV* Gus *et al.*, 2003

GCGTACCAACTTGCCATCCTGAAGAATGGTGCAGTGTCTCGGCACCCCATAGGGAACCTTTGCCATCAACT
 CGGCAAGATGCAGCGTCGTGTTGGCATCGTGTCCCACGCCGAGGAGAAGTACCTGCCCATCGAGTTCATG
 GACACGGGCGACCGGGCTTGCAGGCGAGTGAGGTGGCAGGGGCAATGGATCAGAGATGATCTGCTCTGC
 CTGTGGCCCCG

Rendimiento de RED en medio NMMP

	Cepa M145 (silvestre) Promedio	Cepa Δ <i>sco2331</i> Promedio
GLU	0,074	0,115
CEL	0,064	0,033
GLC	0,101	1,710
GLY	0,092	0,163
ARA	0,077	0,169
NAC	0,068	0,028

Análisis de varianza

P value < 0.0001

Diferencia significativa (P < 0.05) Si

F 32,93

R squared 0,9679

ANOVA

Test de multiple comparación

Tukey	Dif significativa	q	Significancia P < 0.05?	Resuman	95% CI de dif
GLU M145 vs GLU 2331	-4,086	0,4991	No	ns	-50.05 to 41.88
CEL M145 vs CEL 2331	3,121	0,3813	No	ns	-42.84 to 49.09
GLC M145 vs GLC 2331	-160,8	19,65	Yes	***	-206.8 to -114.9
GLY M145 vs GLY 2331	-7,081	0,8651	No	ns	-53.05 to 38.88
ARA M145 vs ARA 2331	-9,239	1,129	No	ns	-55.20 to 36.73
NAC M145 vs NAC 2331	3,965	0,4844	No	ns	-42.00 to 49.93

Rendimiento de RED en medio R2Y

	Cepa M145 (silvestre) Promedio	Cepa Δ <i>sco2331</i> Promedio
GLU	0,033	0,070
CEL	0,343	0,937
GLC	0,051	0,099
GLY	0,049	0,387
ARA	0,057	0,641
NAC	0,020	0,083

Análisis de varianza One-way

P value < 0.0001

Diferencia significativa (P < 0.05) Si

F 156,9

R cuadrada 0,9931

ANOVA

Test de múltiple comparación	Dif significativa	q	Significancia P < 0.05?	Resumen	95% CI de dif
Tukey					
Glu M145 vs Glu 2331	-3,784	1,614	No	ns	-16.94 to 9.376
Cel M145 vs Cel 2331	-59,31	25,31	Yes	***	-72.47 to -46.16
GLC M145 vs GLC 2331	-4,852	2,070	No	ns	-18.01 to 8.308
GLY M145 vs GLY 2331	-33,78	14,41	Yes	***	-46.94 to -20.62
ARA M145 vs ARA 2331	-58,42	24,93	Yes	***	-71.58 to -45.26
NAC M145 vs NAC 2331	-6,339	2,705	No	ns	-19.50 to 6.821

Rendimiento de ACT en medio NMMP

	Cepa M145 (silvestre) Promedio	Cepa Δ sco2331 Promedio
GLC	0,788	2,906
GLY	0,162	0,098
GLU	0,015	0,005
CEL	0,149	0,020
NAC	0,204	0,018
ARA	3,503	1,311

Análisis de varianza

P value < 0.0001

Diferencia significativa (P < 0.05) Si

F 13,28

R squared 0,9241

ANOVA

Test de multiple comparación	Dif significativa	q	Significancia? P < 0.05?	Resumen	95% CI de dif
Tukey					
GLC M145 vs GLC 2331	-211,8	6,373	Yes	*	-398.4 to -25.18
GLY M145 vs GLY 2331	6,422	0,1932	No	ns	-180.2 to 193.0
GLU M145 vs GLU 2331	0,9904	0,02980	No	ns	-185.6 to 187.6
CEL M145 vs CEL 2331	12,89	0,3877	No	ns	-173.7 to 199.5
NAC M145 vs NAC 2331	18,57	0,5589	No	ns	-168.0 to 205.2
ARA M145 vs ARA 2331	219,3	6,597	Yes	*	32.63 to 405.9

Rendimiento de ACT en medio R2Y

	Cepa M145 (silvestre) Promedio	Cepa $\Delta sco2331$ Promedio
GLC	0,197	0,147
GLY	0,136	0,468
GLU	0,100	0,035
CEL	0,715	0,273
NAC	0,286	0,045
ARA	0,092	0,731

Análisis de varianza One-way

P value < 0.0001

Diferencia significativa
(P < 0.05)

Si

F 40,94

R squared 0,9740

ANOVA SS df MS

Test de multiple comparación

Tukey	Dif significativa	q	Significancia? P < 0.05?	Resumen	95% CI de dif
GLC M145 vs GLC 2331	5,011	1,315	No	ns	-16.39 to 26.41
GLY M145 vs GLY 2331	-33,25	8,725	Yes	**	-54.65 to -11.85
GLU M145 vs GLU 2331	6,509	1,708	No	ns	-14.89 to 27.91
CEL M145 vs CEL 2331	44,14	11,58	Yes	***	22.74 to 65.54
NAC M145 vs NAC 2331	24,10	6,324	Yes	*	2.702 to 45.50
ARA M145 vs ARA 2331	-63,90	16,77	Yes	***	-85.30 to -42.50

12. ANEXO METODOLÓGICO

Las distintas cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C o en el caso de las que contenían plásmidos termosensibles a 29°C, en agitación a 200 rpm.

Para *Streptomyces coelicolor* se emplearon medios NMMP, TSB, 2xYT, DNA agar y MS agar, temperatura de 29°C y agitación a 250 rpm.

Todas las cepas se almacenaron en stocks a -70°C, 4% de glicerol.

MEDIOS DE CULTIVO

LB

Difco Bactotripton	10 g
Difco extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

2xYT

Difco Bactotripton	16 g
Difco extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Agua	1000 mL

TSB Hopwood, 1985.

Tripton de soya	30 g
Agua destilada	1000 mL

MS Hobbs *et al.* (1989).

Agar	20 g
Manitol	20 g
Harina de soya	20 g
Agua destilada	1 L

SOB

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
MgSO ₄	2.4 g
KCl	186 mg
Agua	1000 mL

NMMP (Hopwood, 1985).

(NH ₄ SO ₄)	2 g
Difco casaaminoácidos	5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.6 g
PEG6000	50 g
Agua destilada	800 mL

Añadir 50 µL de solución estéril de elementos menores por cada 50 mL.

FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.13 g
Agua destilada	100 mL

Agar Nutritivo Difco(DNA)

Agar nutritivo Difco	23 g
Agua	1000 mL

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

Sacarosa	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	10.12 g
Difco casaminoácidos	0.1 g
Agua destilada	800 ml

Por cada 80 mL de la solución en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenga 2.2 g de agar, agregar en orden:

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1 mL
CaCl ₂ 2 H ₂ O (3.68%)	8 mL
L-prolina (20%)	1.5 mL
Buffer TES (5.73%, pH 7.2)	10 mL
Solución de elementos traza	0.2 mL
NaOH (1N)	0.5 mL
Factores auxótrofos	0.75 mL de cada uno

Solución de elementos traza

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10 mg
Agua destilada	100 mL

R2Y

Realizar de la misma forma que R2, pero añadir 5 mL de una solución al 10% de extracto de levadura por cada 100 mL.

Medio Mínimo (MM) (Hopwood, 1967).

L-asparagina	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
Glucosa (añadir después de esterilizar)	10 g
Agar	10 g
Agua destilada	1000 ml

En estudios de utilización de carbono la glucosa puede ser reemplazada por una fuente alternativa de carbono y la L-asparagina por (NH₄)₂SO₄ (1 g/L).

Buffer P, Hopwood, 1985.

Sacarosa	103 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂ 6H ₂ O	2.02 g/L
Elementos traza	2 mL/L
Agua	800 mL

Por cada 100 mL agregar:

KH ₂ PO ₄ 0.5%	1 mL
CaCl ₂ 2 H ₂ O 3.68%	10 mL
	10 mL
Buffer TES 5.73% pH 7.2	

API 20 C AUX

MEDIO API C

Sulfato amónico	5 g
Fosfato monopotásico	0,31 g
Fosfato dipotásico	0,45 g
Fosfato disódico	0,92 g
Cloruro sódico	0,1 g
Cloruro cálcico	0,05 g
Sulfato magnésico	0,2 g
L-Histidina	0,005 g
L-Triptófano	0,02 g
L-Metionina	0,02 g
Agente gelificante	0,5 g
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de oligo-elementos	10 ml
Agua desmineralizada	csp 1000 ml
pH final : 6,4-6,8 (a 20-25°C)	

Fuentes de Carbono

ENSAYOS	SUBSTRATOS	QTE (mg/cúp.)
0	Ninguno	-
GLU	D-GLUcosa	1,2
GLY	GLYcerol	1,2
2KG	2-ceto-Gluconato cálcico	1,2
ARA	L-ARAbinosa	1,2
XYL	D-XYLosa	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XyLiTol	1,2
GAL	D-GALactosa	1,9
INO	INOsitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Metil- α -D-Glucopiranosida	1,2
NAG	N-Acetil-Glucosamina	1,2
CEL	D-CELlobiosa	1,2
LAC	D-LACTosa (origen bovino)	1,2
MAL	D-MALTosa	1,2
SAC	D-SACarosa	1,2
TRE	D-TREhalosa	1,2
MLZ	D-MeLeZitosa	1,2
RAF	D-RAFInosa	1,9

METODOLOGÍAS

Extracción de DNA plasmídico y genómico

Para todas las extracciones de plásmidos y cósmidos de *E. coli* se utilizó la técnica de lisis alcalina. La extracción de DNA genómico de *S. coelicolor* se realizó con solventes orgánicos mediante la técnica de fenol-cloroformo a partir de medios líquidos.

Minipreparaciones de DNA plasmídico.

1. En un tubo Falcon se colocan 10 mL de cultivo LB inoculado con *E. coli*, se centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos.
2. Resuspender el paquete de células o el micelio en 200 μ L de Tris 25 mM, EDTA 25 mM, pH 8. En el caso de *Streptomyces* TE 25 mM debe contener lisozima 2 mg/mL.
3. Para *E. coli* incubar 5 min en hielo. Para *Streptomyces* al menos de 1 a 3 horas de 37°C o hasta la formación de protoplastos.
4. Añadir 400 μ L de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar por inversión vigorosa los tubos, hasta que el contenido se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las preparaciones de *Streptomyces*, por lo tanto, los tubos deben mezclarse de manera invertida en vórtex durante varios segundos, hasta que no se vea rastro de micelio. Incubar 10 minutos en hielo.
5. Añadir 300 μ L de acetato de potasio 3M, pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo.
6. Añadir al tubo 400 μ L de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos en la microfuga.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 600 μ L de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm en la microfuga. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dando un segundo pulso en la microfuga para eliminar todo el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 50 μ L de TE(Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Añadir 150 μ L de acetato de sodio 4 M, pH 6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.
10. Centrifugar 10 minutos en la microfuga a 13000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ L de isopropanol, mezclar muy bien y precipitar 10 minutos en hielo.
11. Centrifugar 10 minutos en la microfuga a 13000 rpm. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ L de TE, mezclar bien, dar un pulso en la microfuga y añadir 5 μ L de acetato de sodio 3 M pH 6 y 125 μ L de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.

12. Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet y resuspenderlo en 20-25 μL de TE.

Extracción de cósmido

1. Centrifugar los 5 mL de medio LB previamente inoculados con *E. coli* transformada con pIJ773.
2. Resuspender en 100 μL en solución 1 (50 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA)
3. Inmediatamente añadir 200 μL de solución 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) Invertir 10x
4. Añadir 150 μL de solución de acetato de potasio (3 M, pH 5.5) invertir 5x.
5. Centrifugar 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Quedarse con el sobrenadante, añadir 400 μL de fenol/cloroformo, colocar en vortex por 2 minutos y centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente.
7. Transferir el sobrenadante y añadir 600 μL de isopropanol.
8. Dejar 10 minutos en hielo, centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
9. Transferir la fase acuosa y lavar el pellet con 200 μL de etanol al 70%.
10. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.
11. Mezclar por inversión, dejar el tubo abierto por 15 minutos para secar el pellet.
12. Resuspender en 50 μL de agua estéril.

Extracción de DNA genómico.

1. Inocular dos matraces de 250 ml con 50 ml de medio TSB e incubar por 48 horas con glicina 0.5%
2. Cosechar el micelio a 9000 rpm por 10 minutos, lavar una vez con un volumen de sacarosa al 10.3%.
3. Resuspender el micelio en 5 mL de buffer P con lisozima 20 mg/ml.
4. Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos, resuspender en 10 mL de sacarosa 10.3%, adicionar 200 μL de EDTA 500 mM pH8 y 4 mL de SDS 10%.
5. Mezclar y adicionar 15 mL de NaCl 6 M, volver a mezclar e incubar por 60 minutos a 4°C u overnight.
6. Centrifugar por 30 minutos a 10000 rpm.
7. Recuperar el sobrenadante, añadir un volumen de isopropanol y precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente.

8. Centrifugar por 15 minutos a 10000 rpm.
9. Lavar el pellet con etanol al 70%.
10. Resuspender en agua y agregar RNAsa.
11. Lavar con fenol, resuspender en isopropanol y precipitar.

Secuencia de oligonucleótidos usados para comprobar la interrupción.

Nombre del oligonucleótido.	Secuencia
Fw2331	5'-GGATCCCATCAGCACGACGTCGCGGC
Rv2331	5'-CAGATCCACCCGAGCGTCGCCCGGTC
FwApra	5'-GGC CAC AGG CAG AGC AGA TC
RevApra	5'-GCG TAC CAA CTT GCC ATC CTG AA
FwGfk	5'-ACTCTAGAACATATGGGTCTGACCATCGGCGTCGACATCGG
RevGfk	5'-GTCGCTCGAGGATCCTCACATGATCGGGTCGGGTTC

MANEJO DE CEPAS

Producción de células de *E. coli* electrocompetentes

1. Se inocula 400 mL de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37°C con agitación continua a 200 rpm por 3 h hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C.
3. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en un volumen de agua mega pura estéril y fría, después se centrifuga como en el paso 2.
4. El sobrenadante se retira y resuspende en ½ del volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15 minutos.
4. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 8 mL de glicerol estéril al 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15 minutos.
5. Por último se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en un volumen final de 1.2 mL de glicerol al 10% frío, se alícuota la muestra en tubos Eppendorf con 50 µL cada uno, almacenándolos a -70°C.

Electro-Transformación

1. A 50 μL de células competentes se les adiciona de 1-2 μg de plásmido y se incuba en hielo por 1 minuto.
2. La mezcla de DNA y células se colocan en una cubeta de electroporación fría de 0.1 cm.
3. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5 ms y 12.5 kV/cm, y se le da un pulso de 1.25 V. Inmediatamente después se le adicionan 950 μL de medio SOC y rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta.
4. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y para su recuperación se incuban a 37°C en agitación continua a 200 rpm por 1 h, después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico (ampicilina y kanamicina) marcador del plásmido.

Obtención de preparaciones densas de esporas

1. Inocular cajas Petri con medio MS en forma confluyente e incubar hasta esporulación.
2. Agregar a cada caja 10 mL de agua estéril. Con ayuda de un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.
3. Recuperar los 10 mL de agua y pasarlos por un filtro de algodón para esporas.
4. Agregar 5 mL de agua al filtro para recuperar la mayor cantidad de esporas.
5. Centrifugar el filtrado de esporas a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
6. Eliminar sobrenadante y lavar una vez con 10 mL de agua para eliminar los restos del medio. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete de esporas en 1 mL de glicerol al 20%. Colocar en viales pequeños y almacenar a -20°C.

Pregerminado de esporas.

1. Pregerminar esporas de *S. coelicolor* en 50 mL de medio 2xYT por 10 horas.
2. Centrifugar por 10 minutos a 8000 rpm.
3. Lavar las células una vez con medio 2xYT.
4. Leer densidad óptica a 490 nm.
5. Calcular la concentración y el volumen requerido para inocular 3×10^6 esporas pregerminadas.

$$C = \left(\frac{OD_{490}}{0.04} \right)^4 \left(10^6 \frac{gs}{mL} \right) = OD_{490} \times 10^8 \text{ gs/mL}$$

gs (esporas germinadas)

$$V = \left(\frac{3 \times 10^6}{C} \right) 1000 \mu L$$

Protocolo para rompimiento celular de *Streptomyces* por sonicación

1. Tomar una alícuota del medio y cultivo.
2. Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos y tirar el sobrenadante.
3. Agregar 1 ml de la muestra de cultivo a 500 μ l de PED en un tubo de 15 mL.
4. Sonicar 5 veces durante 30 segundos con descansos de 60 segundos a una amplitud de 60 A.
5. Hacer alícuotas de 1 mL en tubos de 1.5 mL y agregarles 1 μ l de inhibidor de proteasas.
6. Centrifugar las muestr-as en el cuarto frío a 13000 rpm durante 30 minutos.
7. Congelar muestras.
8. Cuantificar por Bradford (Protocolo de Bio-Rad).