



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

SÍNTESIS DE LÍPIDOS POLARES Y REMODELACIÓN DE LA MEMBRANA EN
Streptomyces coelicolor Y OTROS ACTINOMICETOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

L.C.G. MARIO SANDOVAL CALDERÓN

TUTOR PRINCIPAL:

DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP, CCG

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO, IBT

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ, IIB

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi madre

Agradecimientos

- A Christian Sohlenkamp, por su apoyo constante, su guía, su paciencia, por las discusiones de ciencia, las pláticas de café, y por todas las enseñanzas de una década.
- A los miembros del jurado, por sus observaciones y discusiones que me ayudaron a mejorar esta tesis. A los miembros de mi comité tutor, Guadalupe Espín Ocampo y Luis Servín González, que me acompañaron durante este doctorado y enriquecieron bastante mi experiencia.
- A todo el programa de Ecología Genómica, los grupos de Christian Sohlenkamp, Esperanza Martínez, Isabel López y Otto Geiger, que siempre estuvieron dispuestos a escuchar de mi proyecto y a apoyarme en lo que fuera necesario.
- A nuestros colaboradores Paul Herron (Strathclyde University), Ziqiang Guan (Duke University), Pieter Dorrestein, Don Nguyen y Cliff Kapon (UCSD), sin quienes habría sido imposible realizar parte de este trabajo.
- A David Romero y Susana Brom, por su apoyo constante y amistad durante la licenciatura y el doctorado.
- La realización del proyecto de doctorado que culminó en esta tesis fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al programa UC-MEXUS-CONACYT de financiamiento para proyectos de colaboración, al proyecto PAPIIT IN202413 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico – UNAM, y apoyos adicionales otorgados por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), de la UNAM.
- A mi madre, por todo.

- A Diana, por acompañarme en las frustraciones del posgrado, por su amistad y por tantas comidas y pláticas deliciosas. A Carmen y Viani por acompañarme en la vida, que nos ha alejado geográficamente pero nos mantiene tan cerca.
- A todos los amigos de la LCG, a Daniela, Citlali, los tres Fernandos, Sandra, María, Luis Pedro, Alán, Pavel, Mitzy, Carlos, Roberto, Jorge y tantos más. Comenzaron unos como compañeros y otros como alumnos, todos han sido imprescindibles para que haya llegado donde estoy.
- A los amigos de Puebla, Cuernavaca, CDMX y más allá, Ricardo, Nolberto, Luis, Alito, Fabis, Carlos, Marlen, Gaby, Edgardo, Ana Laura.

Índice General

Agradecimientos	ii
Índice General.....	iv
Índice de Figuras y Tablas.....	viii
Lista de Abreviaturas	x
Abstract	xii
Resumen.....	xiii
Introducción General	14
1.1 Características generales de <i>Streptomyces coelicolor</i>.....	14
1.1.1 Biología del desarrollo.....	15
1.1.2 Metabolismo secundario	18
1.2 Biosíntesis de lípidos polares en bacterias	19
1.2.1 Síntesis de ácido fosfatídico y difosfato de citidina-diacilglicerol	20
1.2.2 Síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina	20
1.2.3 Síntesis de fosfatidilglicerol y cardiolipina.....	22
1.2.4 Síntesis de fosfatidil- <i>mio</i> -inositol y sus derivados.....	23
1.2.5 Síntesis de lípidos de ornitina	23
1.3 Remodelación de la membrana en bacterias	24
1.3.1 Respuesta visco-elástica (adaptación homeoviscosa).....	25
1.3.2 Limitación de fósforo.....	25
1.3.3 Péptidos antimicrobianos	26
1.3.4 Estrés osmótico	27
1.3.5 Interacción con hospederos.....	27
Antecedentes	28
2.1 Síntesis de fosfolípidos en actinomicetos y <i>S. coelicolor</i>	28
2.2 Relación entre los lípidos de membrana y el desarrollo en <i>Streptomyces</i>	30

Hipótesis.....	32
Objetivos Generales.....	33
Materiales y Métodos	34
5.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	34
5.2 Cepas y plásmidos	35
5.3 Preparación de suspensiones de esporas de <i>S. coelicolor</i>	36
5.4 Mutagénesis dirigida de <i>S. coelicolor</i>	36
5.5 Aislamiento de DNA genómico de <i>S. coelicolor</i>	36
5.6 Clonación del operón <i>SCO0921-SCO0920</i> y complementación de la mutante <i>olsB</i>⁻	37
5.7 Expresión heteróloga de genes de <i>S. coelicolor</i> en <i>E. coli</i>.....	37
5.8 Extracción de lípidos.....	37
5.9 Cromatografía de capa fina	38
5.9.1 Detección y cuantificación de los lípidos	39
5.10 Espectrometría de masas.....	40
5.11 Análisis de espectros de masas mediante redes de fragmentación molecular	41
Exploración de la plasticidad en la composición de la membrana de	
<i>Streptomyces coelicolor</i>.....	42
6.1 Introducción	42
6.2 Objetivos específicos	43
6.3 Resultados.....	43
6.3.1 <i>S. coelicolor</i> presenta diferencias radicales en la composición de su membrana en medio YEME sólido vs. líquido.....	43
6.3.2 El perfil de lípidos polares de <i>S. coelicolor</i> es dependiente de la composición del medio de cultivo.....	45
6.3.3 El contenido de PE y OL en la membrana es dependiente de la concentración de fosfato inorgánico en el medio.....	49
6.3.4 La composición de la membrana es remodelada durante el desarrollo morfológico en <i>S. coelicolor</i>	51
6.3.5 La concentración de PE en la membrana está influenciada por el pH del medio de cultivo	53

6.4 Conclusiones	54
-------------------------------	-----------

Reconstrucción bioinformática de la síntesis de fosfolípidos de *Streptomyces*

<i>coelicolor</i>	55
--------------------------------	-----------

7.1 Introducción	55
-------------------------------	-----------

7.2 Objetivos específicos	56
--	-----------

7.3 Resultados	56
-----------------------------	-----------

7.3.1 Reconstrucción de la biosíntesis de los intermediarios PA y CDP-DAG.....	56
--	----

7.3.2 Genes predichos en las vías de biosíntesis de PG, CL, PS y PE.....	59
--	----

7.3.3 Predicción de los genes en la ruta biosintética de PI y PIMs.....	60
---	----

7.4 Conclusiones	61
-------------------------------	-----------

Síntesis y posibles funciones de los lípidos de ornitina en *Streptomyces*

<i>coelicolor</i>	62
--------------------------------	-----------

8.1 Introducción	62
-------------------------------	-----------

8.2 Objetivos específicos	63
--	-----------

8.3 Resultados	63
-----------------------------	-----------

8.3.1 <i>SCO0921-SCO0920</i> son homólogos a <i>olsB-olsA</i>	63
---	----

8.3.2 <i>SCO0921</i> es necesaria para la síntesis de OL.....	63
---	----

8.3.3 La mutante <i>olsB</i> ⁻ presenta desarrollo morfológico y producción de actinorrodina acelerados.....	65
--	----

8.4 Conclusiones	66
-------------------------------	-----------

Búsqueda de los genes responsables de la biosíntesis de MLCL y DLCL..... 68

9.1 Introducción	68
-------------------------------	-----------

9.2 Objetivo específico	69
--------------------------------------	-----------

9.3 Resultados	69
-----------------------------	-----------

9.3.1 Evaluación de un sistema para la expresión heteróloga de lipasas específicas de CL 69	
--	--

9.3.2 Identificación de posibles fosfolipasas en el genoma de <i>S. coelicolor</i>	70
--	----

9.3.3 Expresión heteróloga de lipasas putativas	74
---	----

9.3.4 Mutagénesis de genes candidatos	75
---	----

9.3.5 Fenotipos de la mutante MSC01.....	76
--	----

9.4 Conclusiones	78
Discusión General y Perspectivas.....	79
10.1 Discusión	79
10.2 Perspectivas	81
Referencias bibliográficas	83
Anexo 1	90
Anexo 2.....	103
Anexo 3.....	105

Índice de Figuras y Tablas

<i>Figura 1.1</i> Ciclo de vida de <i>S. coelicolor</i>	16
<i>Figura 1.2</i> Algunos metabolitos secundarios producidos por <i>S. coelicolor</i>	19
<i>Figura 1.3</i> Biosíntesis de fosfolípidos derivados de CDP-DAG.....	21
<i>Figura 1.4</i> Ruta de biosíntesis de los lípidos de ornitina.....	24
<i>Figura 2.1</i> Principales lípidos polares sintetizados por bacterias del género <i>Streptomyces</i>	29
<i>Tabla 5.1</i> Plásmidos, cósmidos y cepas utilizados	35
<i>Figura 5.1</i> Separación de estándares de lípidos mediante TLC de dos dimensiones.....	39
<i>Figura 6.1</i> Plasticidad de la composición de lípidos de membrana en <i>S. coelicolor</i>	44
<i>Figura 6.2</i> Mapa de calor de la composición de lípidos de <i>S. coelicolor</i>	46
<i>Figura 6.3</i> Espectro de MS/MS de uno de los OL identificados en muestras de <i>S. coelicolor</i>	47
<i>Figura 6.4</i> Red de fragmentación molecular de muestras de lípidos de <i>S. coelicolor</i>	48
<i>Figura 6.5</i> Subredes resaltadas de la red de fragmentación molecular de muestras de lípidos de <i>S. coelicolor</i>	49
<i>Figura 6.6</i> Perfil de lípidos de <i>S. coelicolor</i> en diferentes concentraciones de P_i	50
<i>Figura 6.7</i> La composición de la membrana de <i>S. coelicolor</i> es modificada durante el desarrollo.....	52
<i>Figura 6.8</i> El análisis de MS muestra acumulación de OL en micelio en esporulación.....	53
<i>Figura 6.9</i> El pH elevado en SMMS inhibe la acumulación de PE en <i>S. coelicolor</i>	54
<i>Figura 7.1</i> Conservación filogenética de homólogos a las diferentes proteínas que catalizan la primera acilación del G3P en actinobacterias.....	57
<i>Figura 7.2</i> Biosíntesis propuesta de PA y CDP-DAG en <i>S. coelicolor</i>	58
<i>Figura 7.3</i> El contexto genómico del gen <i>gpsA</i> está conservado en muchos actinomicetos....	59
<i>Figura 7.3</i> El operón probablemente encargado de la síntesis de PI y derivados está conservado en actinomicetos.....	61
<i>Figura 8.1</i> El operón putativo <i>olsB-olsA</i> está altamente conservado en actinomicetos.....	64
<i>Figura 8.2</i> La mutante <i>olsB⁻</i> es deficiente en la producción de OL.....	65
<i>Figura 8.3</i> Desarrollo morfológico y metabólico de la mutante <i>olsB⁻</i>	66

<i>Figura 9.1</i> La expresión de <i>CLD1</i> en <i>E. coli</i> provoca la acumulación de nuevos lípidos.....	70
<i>Figura 9.2</i> La expresión de <i>CLD1</i> causa la acumulación de MLCL, DLCL y SCL en <i>E. coli</i> .	71
<i>Tabla 9.1</i> Genes candidatos obtenidos mediante la búsqueda bioinformática de posibles fosfolipasas en el genoma de <i>S. coelicolor</i> .	72
<i>Tabla 9.2.</i> Genes candidatos obtenidos mediante la búsqueda bioinformática de posibles fosfolipasas en el genoma de <i>S. coelicolor</i> . Criterios relajados.....	72
<i>Figura 9.3</i> Composición de lípidos de <i>E. coli</i> expresando al gen <i>SCO2886</i>	74
<i>Figura 9.4</i> Porcentaje de diferentes lípidos en las cepas de <i>E. coli</i> que expresan los genes candidatos de <i>S. coelicolor</i> .	75
<i>Figura 9.5</i> <i>Southern blot</i> de tres candidatos a mutantes insercionales de <i>SCO2886</i>	76
<i>Figura 9.6</i> La mutante MSC01 presenta esporulación precoz pero menor rendimiento en la producción de esporas viables.	77
<i>Figura 9.7</i> La mutante MSC01 acumula más PE en algunas condiciones.	78

Lista de Abreviaturas

aa-PGS	Aminoacil-fosfatidilglicerol sintasa
Ac-PIM₁	Acil fosfatidilinositol monomanósido
Ac-PIM₂	Acil fosfatidilinositol dimanósido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ANS	8-Anilino 1-naftaleno ácido sulfónico
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
CAMP	Péptido catiónico antimicrobiano
c-di-GMP	Di-guanosín monofosfato cíclico
CDP-DAG	Difosfato de citidina-diacilglicerol
CdsA	Difosfato de citidina-diacilglicerol sintasa
CL	Cardiolipina
ClsA	Cardiolipina sintasa
CMP	Monofosfato de citidina
DLCL	Diliso-cardiolipina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato
GpsA	Glicerol-3-fosfato sintasa o DHAP reductasa
GDP	Guanosín difosfato
GMP	Guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
LPA	Ácido lisofosfatídico
MLCL	Monoliso-cardiolipina
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas de fragmentación
OL	Lípido de Ornitina
PA	Ácido fosfatídico

PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PGP	Fosfatidilglicerol fosfato
PgpA	Fosfatidilglicerol fosfato fosfatasa
PgsA	Fosfatidilglicerofosfato sintasa
P_i	Fosfato inorgánico
PI	Fosfatidil- <i>mio</i> -inositol o fosfatidilinositol
PIM₁	Fosfatidilinositol monomanósido
PIM₂	Fosfatidilinositol dimanósido
PimA	Fosfatidilinositol manosiltransferasa
PimB'	Fosfatidilinositol monomanósido manosiltransferasa
PIMs	Manósidos de fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol 1-fosfato
Pipp	Fosfatidilinositol 1-fosfato fosfatasa
PisA	Fosfatidilinositol 1-fosfato sintasa
PLD	Fosfolipasa D
ppGpp	3'-difosfato, 5'-difosfato Guanosina
PS	Fosfatidilserina
Psd	Fosfatidilserina descarboxilasa
PssA	Fosfatidilserina sintasa
TLC	Cromatografía de capa fina

Abstract

Streptomyces coelicolor A3(2) is a soil bacterium that belongs to the class *Actinobacteria*, and has for decades been a model for the study of secondary metabolism and morphological development in bacteria. However, our knowledge about the composition, structure, and biosynthesis of the membrane of this clade of microorganisms is limited. Furthermore, the relationship between morphological development in *Streptomyces* and its membrane composition has just begun to be investigated. Our aim in this work is to explore more deeply the composition, synthesis and turnover of the cytoplasmic membrane from *S. coelicolor*. A combined approach with thin layer chromatography techniques, mass spectrometry analysis, and molecular fragmentation networks was used to assess the diversity of lipids across different growth conditions. Our results show that *S. coelicolor* is able to drastically remodel its membrane as an adaptation to the characteristics and composition of the culture media, partly due to nutrient availability. This species also modifies its membrane composition throughout its morphological development. A bioinformatic exploration of the genome from *S. coelicolor* and related organisms was performed to fill the gaps in the metabolic pathways of polar lipid biosynthesis. Several candidate genes were found that could participate in phospholipid metabolism, and the role of an operon involved in ornithine lipid (OL) biosynthesis was corroborated experimentally. The OL-deficient mutant presented alterations in its metabolic and morphological development. The results presented here widen our knowledge about lipid diversity in actinomycetes, reveal a high degree of plasticity of the membrane composition, and provide evidence towards the relevance of membrane remodelling during morphological differentiation and stress response.

Resumen

Streptomyces coelicolor A3(2) es un actinomiceto habitante del suelo que desde hace décadas ha sido un modelo para el estudio del metabolismo secundario y el desarrollo morfológico en bacterias. Sin embargo, aún sabemos poco acerca de la estructura, composición y biosíntesis de las membranas de este clado de microorganismos. Adicionalmente, apenas comienza a ser explorada la relación entre la composición de la membrana y la diferenciación morfológica de esta bacteria multicelular. El objetivo principal de este trabajo es comprender de manera más profunda la composición, síntesis y recambio de la membrana de *S. coelicolor*. Para discernir la composición de los lípidos de *S. coelicolor* en diferentes condiciones de crecimiento, se adoptó una estrategia que involucra las técnicas de cromatografía en capa fina, espectrometría de masas y redes moleculares de espectros de fragmentación para contrastar las muestras de lípidos. Los resultados indican que *S. coelicolor* ajusta drásticamente la composición de su membrana para adaptarse al medio donde es cultivada, en parte debido a la disponibilidad de nutrientes. Esta bacteria también modifica su membrana a lo largo de su desarrollo morfológico y de manera dependiente al medio de cultivo empleado. Se llevó a cabo también una aproximación bioinformática para profundizar en el estudio de las vías metabólicas de los lípidos polares. Así mismo se corroboró experimentalmente la participación de un operón en la síntesis de lípidos de ornitina (OL). La mutante deficiente en OL presenta alteraciones en su desarrollo morfológico y metabólico. Los resultados presentados en este trabajo amplían nuestro conocimiento de la diversidad lipídica en los actinomicetos, y revelan la importancia de la dinámica en la composición de las membranas durante el desarrollo y la respuesta ante el estrés en *S. coelicolor*.

1

Introducción General

1.1 Características generales de *Streptomyces coelicolor*

Las bacterias Gram-positivas se dividen en dos grandes clados. Las Gram-positivas de bajo contenido de G+C corresponden principalmente al phylum Firmicutes, donde se encuentran organismos como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. Por otro lado se encuentran las bacterias Gram-positivas de alto contenido de G+C, conocidas actualmente como la clase *Actinobacteria*, donde se ubican patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, bacterias de uso industrial como *Corynebacterium glutamicum*, y las bacterias del género *Streptomyces*. Varios géneros dentro de las actinobacterias son de amplio interés médico e industrial por la vasta cantidad de metabolitos secundarios que producen (Demain and Adrio, 2008). Muchos de estos organismos se caracterizan por crecer en forma de micelio durante algún momento en su ciclo celular, en lugar de llevar un estilo de vida unicelular (Kieser et al., 2000).

Los organismos del género *Streptomyces* son habitantes ubicuos del suelo cuyo crecimiento en forma de micelio vegetativo les permite colonizar eficientemente el suelo relativamente seco; además, la diferenciación a esporas les otorga relativa resistencia a

algunos estreses, como desecación y limitación de nutrientes, y además permite la dispersión en este hábitat.

Los *Streptomyces* excretan una gran cantidad de enzimas digestivas que a muchas especies de estilo de vida saprofítico les permiten degradar compuestos complejos derivados de tejidos de plantas, hongos y artrópodos, como celulosa, quitina, xilanos y almidón, entre otros. Por tanto, los *Streptomyces* son miembros relevantes de los ciclos ecológicos del suelo, pues permiten el reciclaje de polímeros de difícil descomposición (McCarthy and Williams, 1992; Kieser et al., 2000). Esta amplia gama de procesos metabólicos y biotransformaciones que pueden llevar a cabo los hace de particular interés para la biotecnología.

S. coelicolor A3(2) es la especie modelo para la investigación básica en este género y la mejor caracterizada genéticamente (Hopwood, 1999), por lo cual se cuenta con diversas herramientas para su estudio genético (Gust et al., 2003; Bishop et al., 2004; Cobb et al., 2014; Tong et al., 2015). *S. coelicolor* posee un cromosoma lineal de 8.7 mega-pares de bases, un plásmido lineal y uno circular. La secuenciación de su genoma reveló que contiene más de 7,800 genes codificantes predichos, y entre estos, alrededor de 20 conjuntos o *clusters* de genes que codifican enzimas que probablemente se encargan de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Bentley et al., 2002). A partir de la conservación de la sintenia con otros actinomicetos y de la composición genética, se pueden identificar tres regiones en el cromosoma lineal de este organismo: dos brazos laterales y un núcleo central. Los genes asociados con el metabolismo primario y otras funciones esenciales se encuentran principalmente en el núcleo central, el cual está altamente conservado al compararse con los actinomicetos *M. tuberculosis* y *Corynebacterium glutamicum*. En los brazos del cromosoma se encuentran primordialmente elementos adquiridos como resultado de la transferencia genética horizontal, la duplicación genética y otros rearrreglos cromosomales (Bentley et al., 2002).

1.1.1 Biología del desarrollo

S. coelicolor presenta un ciclo de vida complejo que se asemeja al de los hongos filamentosos. Es un comportamiento multicelular que responde finamente a las condiciones nutricionales, involucra señalización extracelular, coordinación con el metabolismo central y la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios, reorganización del citoesqueleto, y participación de las

maquinarias involucradas en el ensamblaje de la pared celular y la segregación de los cromosomas (Flardh and Buttner, 2009).

Streptomyces comienza su ciclo de vida a partir de una espora haploide que, al encontrar condiciones favorables y suficientes nutrientes, da lugar a uno o dos tubos germinales que crecen apicalmente para formar hifas. Estas hifas van ramificándose periódicamente y se forman septos con múltiples copias del genoma en las partes antiguas del micelio, normalmente alejados de las puntas de las hifas, donde se encuentra concentrada la maquinaria de síntesis de la pared celular. Este micelio vegetativo crece enterrado en el sustrato, y conforme avanza el crecimiento de la colonia, señales relacionadas a la disponibilidad de nutrientes y la densidad celular, entre otras, desencadenan el comienzo de la fase de crecimiento aéreo (Figura 1.1) (Kieser et al., 2000). Esta fase está coordinada con la biosíntesis de metabolitos secundarios, la producción de varias proteínas extracelulares, y eventos de muerte celular programada en el micelio vegetativo (Manteca et al., 2006; Yagüe et al., 2013).

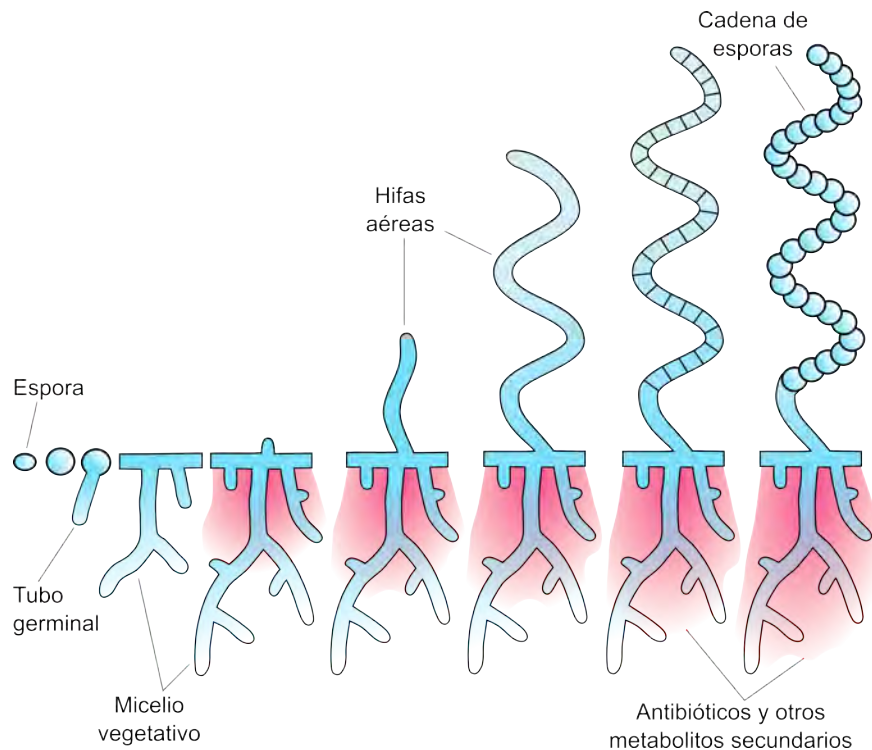


Figura 1.1 Ciclo de vida de *S. coelicolor*.

En el esquema se indican los pasos durante la diferenciación morfológica de *S. coelicolor*, mostrando la germinación de las esporas, crecimiento vegetativo, producción de metabolitos secundarios, erección de hifas aéreas y esporulación de un micelio maduro (ver detalles en el texto).

Gracias a un recubrimiento de proteínas con dominios altamente hidrofóbicos y de la producción de péptidos surfactantes (Petrus and Claessen, 2014), las hifas aéreas rompen la tensión superficial y escapan del medio acuoso donde se encuentra el micelio vegetativo. Estas hifas aéreas se segmentan de manera coordinada con la segregación de los cromosomas para formar cadenas de esporas regularmente espaciadas, cada una con una única copia del cromosoma (Flardh and Buttner, 2009). La principal función de las esporas de *Streptomyces* es permitir la dispersión cuando las condiciones ambientales y nutricionales dejan de ser favorables para el micelio sésil, pero también poseen cierta resistencia a la desecación, y se han recuperado esporas viables de muestras de suelos almacenadas durante décadas (Morita, 1985).

Esta diferenciación morfológica es un proceso altamente regulado y coordinado con la diferenciación metabólica, y responde a varias señales nutricionales, a ciertas condiciones fisiológicas y a otros estímulos ambientales y extracelulares (McCormick and Flårdh, 2012). Entre las señales relevantes para la diferenciación morfológica asociadas al estado nutricional se encuentran la disminución en las concentraciones internas de GTP (Ochi, 1986; Okamoto and Ochi, 1998) y la síntesis de la alarmona ppGpp. El desarrollo de este organismo también depende de la fuente de carbono disponible en el medio, pues el crecimiento en presencia de diversas moléculas – como glucosa, manitol, *N*-acetil glucosamina o galactosa – causan diferencias en este proceso (Champness, 1988; Pope et al., 1996; Rigali et al., 2006). Adicionalmente, el dinucleótido cíclico c-di-GMP actúa como un segundo mensajero durante el desarrollo de *Streptomyces* mediante la activación de la unión al DNA del regulador transcripcional BldD (Tschowri et al., 2014). El factor A es una molécula perteneciente a la familia de las γ -butirolactonas (Figura 1.2) que ha sido ampliamente estudiado y se conoce como un importante regulador del desarrollo en *Streptomyces griseus* (Horinouchi et al., 2001). Algunas moléculas relacionadas del grupo de las γ -butirolactonas también participan en el control del desarrollo y la producción de antibióticos en *S. coelicolor* (Takano, 2006; D'Alia et al., 2011). Los productos de la actividad proteolítica extracelular también parecen ser parte de la red de señalización que coordinan el desarrollo morfológico en este organismo (Chater et al., 2010).

1.1.2 Metabolismo secundario

Alrededor de dos tercios de los antibióticos de origen microbiano son producidos por actinomicetos, principalmente por miembros del género *Streptomyces* (Kieser et al., 2000;Chater, 2006). Adicionalmente a estos antibióticos, los actinomicetos producen muchos otros compuestos bioactivos, como inmunosupresores (Kino et al., 1987;König et al., 1997;Barreiro et al., 2012), antitumorales (Motamedi and Hutchinson, 1987;Mao et al., 1999;Du et al., 2000), antiparasitarios (MacNeil et al., 1992), antifúngicos (Brautaset et al., 2000;Campelo and Gil, 2002), herbicidas (Raibaud et al., 1991) y quelantes de hierro (Barona-Gómez et al., 2004). Además de los compuestos identificados, los genomas de diversas cepas de este género han mostrado una gran cantidad de *clusters* “crípticos” (Bentley et al., 2002;Aigle and Corre, 2011), es decir, de los cuales se desconoce su producto y que podrían expresarse sólo en condiciones muy específicas.

S. coelicolor A3(2) produce varios compuestos secundarios, como el antibiótico actinorrodina, las prodigininas, los antibióticos dependientes de calcio (CDAs), varios sideróforos, hopanoides, la geosmina –molécula volátil que le da el característico olor a tierra a estas bacterias – y el pigmento gris de las esporas, entre otros (Figura 1.2)(Bentley et al., 2002). La actinorrodina y su derivado γ -actinorrodina son pigmentos que dan el característico color azul a *S. coelicolor* en condiciones de pH alcalino, dado que la actinorrodina es de color rojo en pH menor a 8.5. Mientras que la actinorrodina es insoluble en agua, la γ -actinorrodina es excretada al medio y esta última no tiene la propiedad indicadora de pH (Bystrykh et al., 1996). La síntesis de la actinorrodina está regulada de manera coordinada con la diferenciación morfológica (van Wezel and McDowall, 2011;Gao et al., 2012;Rioseras et al., 2014), pero también responde a algunas condiciones de estrés, como la limitación de nitrógeno (Chakraborty and Bibb, 1997) y fosfato (Guerra et al., 2012). *S. coelicolor* produce principalmente dos tipos de prodigininas: la undecil-prodigiosina y la estreptorubina B (Cerdeño et al., 2001;Mo et al., 2008), pigmentos rojos con muchas propiedades bioactivas (anticancer, antimalaria, antibacterial, antimicótica), y se ha visto que en *Streptomyces* confieren protección contra estrés oxidativo y radiación UV (Stankovic et al., 2014). Estas prodigininas suelen producirse antes que la actinorrodina durante el desarrollo, pero al finalizar la fase exponencial de crecimiento (Nieselt et al., 2010;Gao et al., 2012), y siempre se mantienen asociadas al micelio, probablemente debido a su alta hidrofobicidad.

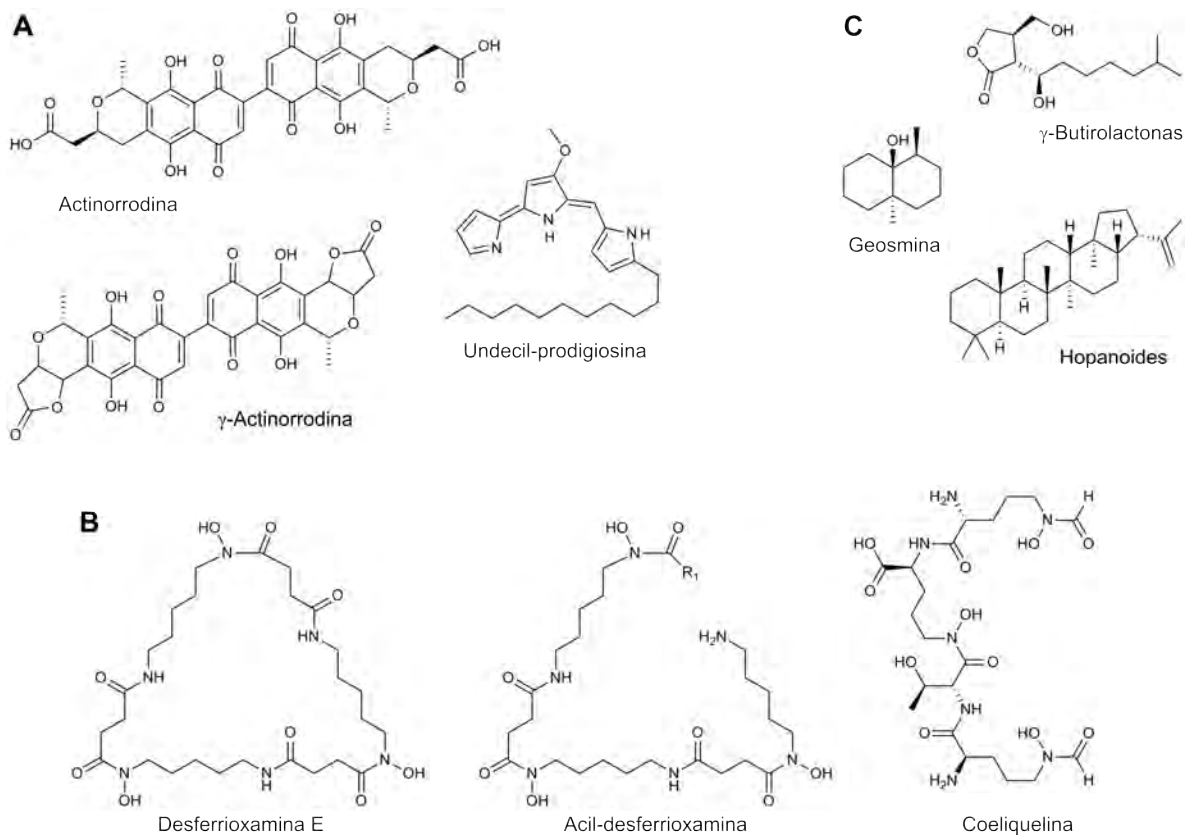


Figura 1.2 Algunos metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*.

Las moléculas están agrupadas de acuerdo a su función putativa. **(A)** Antibióticos. **(B)** Sideróforos. El grupo R_1 en las acil-desferrioxaminas corresponde a un grupo acilo de entre 8 y 14 carbonos. **(C)** Otras moléculas. La γ -butirolactona mostrada es SCB1; el hopanoide mostrado es hopeno.

1.2 Biosíntesis de lípidos polares en bacterias

Las membranas biológicas son bicapas compuestas de lípidos anfífilicos, es decir, moléculas que poseen una cabeza polar y una porción hidrofóbica. Con frecuencia, los principales componentes de las membranas en bacterias son glicerofosfolípidos. Durante décadas, el principal modelo para el estudio de la biosíntesis de lípidos de membrana en bacterias ha sido *Escherichia coli*, que acumula en su membrana principalmente fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Sin embargo, muchas otras bacterias poseen una membrana bastante más compleja, y sintetizan otros fosfolípidos, como fosfatidilcolina y lípidos polares sin fósforo, como los glicolípidos, esfingolípidos, lípidos de ornitina (OL),

hopanoides, etc. (Sohlenkamp and Geiger, 2016). Además, varias bacterias son capaces de modificar su membrana como respuesta a condiciones ambientales (ver sección 1.3).

1.2.1 Síntesis de ácido fosfatídico y difosfato de citidina-diacilglicerol

A pesar de las diferencias estructurales y en sus características bioquímicas, la síntesis de los fosfolípidos en la mayoría de las bacterias tienen intermediarios comunes en el ácido fosfatídico (PA) y el difosfato de citidina-diacilglicerol (CDP-DAG) (Figura 1.3).

El primer paso en la síntesis de glicerofosfolípidos es la transferencia de dos grupos acilo al glicerol-3-fosfato (G3P) para formar ácido fosfatídico (PA) o 1,2-diacilglicerol-*sn*-G3P. Estas dos acilaciones son realizadas por enzimas distintas en todos los organismos estudiados (Figura 1.3). La primer acilación, en el hidroxilo 1 del G3P para formar ácido lisofosfatídico (LPA), es catalizada en un solo paso mediante PlsB o en dos reacciones separadas catalizadas por las enzimas PlsX/PlsY. PlsB fue descrita originalmente en *E. coli* (Lightner et al., 1980), y sus homólogos están presentes principalmente en γ -proteobacterias y algunos otros clados. En contraste, el sistema PlsX/Y es el más ampliamente distribuido en bacterias (Lu et al., 2006). La segunda acilación del G3P, que sintetiza PA a partir del LPA, es catalizada mediante la enzima PlsC, ampliamente conservada y emparentada con otras *O*-aciltransferasas (Coleman, 1990).

En el siguiente paso biosintético, la sintasa de CDP-DAG, CdsA, cataliza la formación de CDP-DAG a partir de PA y trifosfato de citidina (CTP) (Dowhan, 1997) (Figura 1.3). El CDP-DAG es el punto de divergencia en la síntesis de la mayoría de los glicerofosfolípidos bacterianos, de donde parten las rutas biosintéticas de la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilcolina, los fosfolípidos aniónicos fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL), el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados.

1.2.2 Síntesis de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina

La PE es de los fosfolípidos más comunes en bacterias Gram-negativas y algunos otros clados, y es de los más abundantes en varias de las especies modelo mejor estudiadas. El primer paso en la síntesis de PE lo cataliza la fosfatidilserina sintasa (PssA o Pss), de la cual hay descritas dos variantes, una de la familia de la fosfolipasa D (PLD) y otra de la familia de las CDP-alcohol fosfotransferasas (Sohlenkamp et al., 2004). La PssA transfiere un grupo fosfatidilo del CDP-DAG a la L-serina, dando como productos a la fosfatidilserina (PS) y CMP

(DeChavigny et al., 1991). El siguiente paso enzimático lo cataliza la fosfatidilserina descarboxilasa (Psd) cuyo producto es la PE (Figura 1.3).

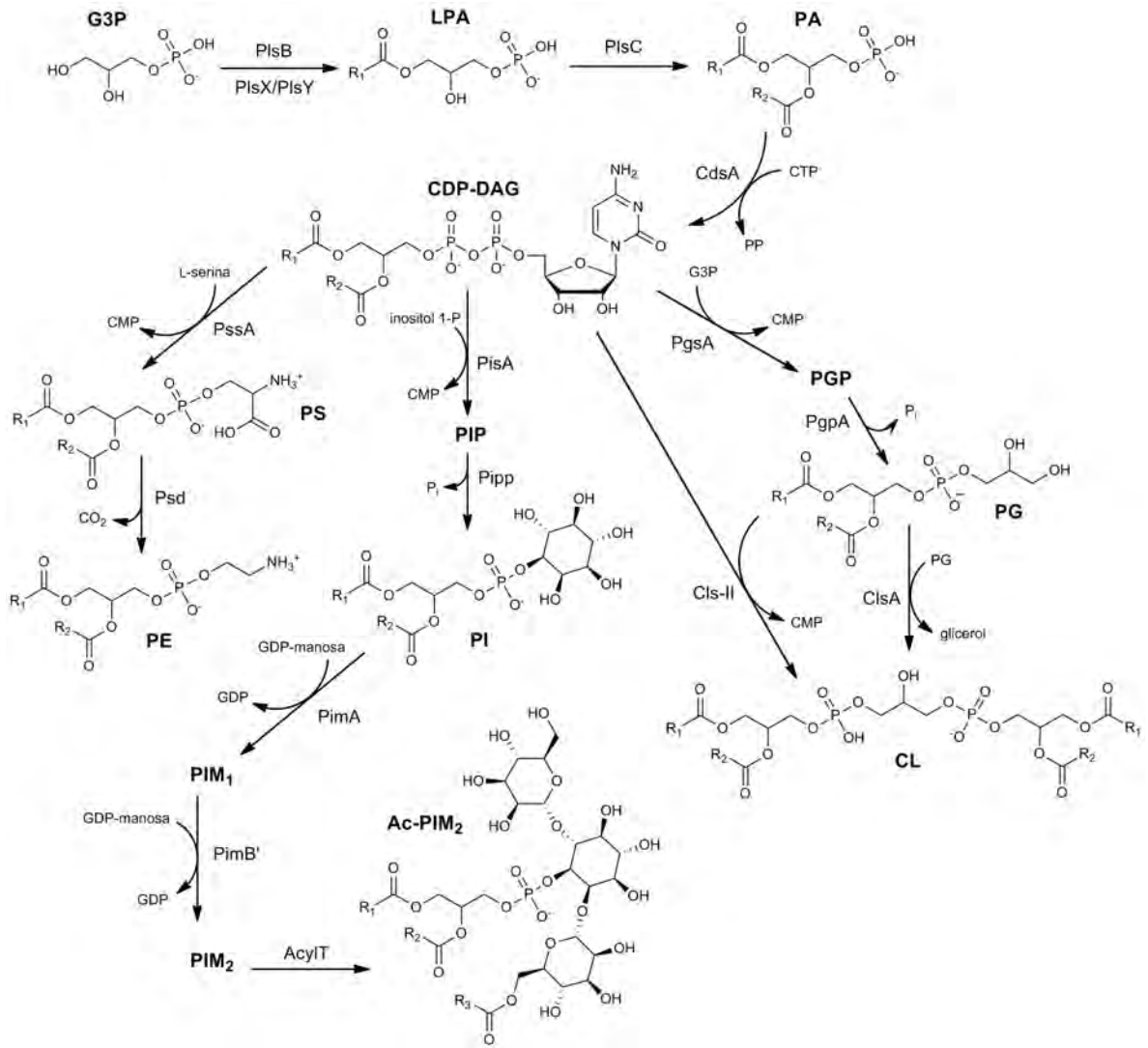


Figura 1.3 Biosíntesis de fosfolípidos derivados de CDP-DAG.

Principales rutas biosintéticas de fosfolípidos en bacterias. G3P, glicerol 3-fosfato; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, difosfato de citidina-diacilglicerol; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PIP, fosfatidilinositol 1-fosfato; PI, fosfatidilinositol; PIM₁, monomanósido de PI; PIM₂, dimanósido de PI; Ac-PIM₂, acil fosfatidilinositol dimanósido; PGP, fosfatidilglicerol fosfato; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina. PlsB o PlsX/Y, G3P aciltransferasas; PlsC, LPA aciltransferasa, CdsA, CDP-DAG sintasa; PssA, PS sintasa; Psd, PS descarboxilasa; PisA, PIP sintasa; Pipp, PIP fosfatasa, PimA, PI manosiltransferasa; PimB', PIM₁ manosiltransferasa; AcylT, PIM aciltransferasa; PgsA, PGP sintasa; PgpA, PGP fosfatasa; ClsA y Cls-II, CL sintasas.

Recientemente, se describió una sintasa bifuncional de CL y PE en la bacteria *Xanthomonas campestris*, que cataliza la síntesis de PE a partir de CDP-DAG y etanolamina. Esta es una vía completamente nueva de síntesis de estas dos moléculas, y la enzima pertenece a la familia de la fosfolipasa D (PLD) (Moser et al., 2014).

1.2.3 Síntesis de fosfatidilglicerol y cardiolipina

La biosíntesis de los fosfolípidos aniónicos fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) inicia con la fosfatidilglicerofosfato sintasa (PgsA), la cual transfiere un grupo fosfatidilo del CDP-DAG al G3P (Gopalakrishnan et al., 1986). Genes homólogos a *pgsA* se pueden encontrar en la práctica totalidad de genomas bacterianos, con pocas excepciones, como *Deinococcus radiodurans* (Makarova et al., 2001). El fosfatidilglicerol fosfato (PGP) resultante es rápidamente defosforilado mediante una PGP fosfatasa para sintetizar fosfatidilglicerol (PG). El PG es uno de los fosfolípidos más abundantes en varias bacterias modelo y está presente en la gran mayoría de las bacterias estudiadas, salvo en algunos extremófilos (Sohlenkamp and Geiger, 2016).

Otro fosfolípido aniónico – casi ubicuo en bacterias y eucariontes – es la cardiolipina (CL). Hasta la década pasada, se conocían sólo dos vías para la biosíntesis de CL, una fue originalmente descrita en bacterias, y la otra fue primero estudiada en eucariontes. En *E. coli*, se caracterizó la enzima ClsA, que sintetiza CL mediante la condensación de dos moléculas de PG, dando como productos CL y glicerol (Nishijima et al., 1988) (Figura 1.3). Esta reacción es catalizada por una enzima que pertenece a la superfamilia de la fosfolipasa D (PLD). En eucariontes, la síntesis de CL se realiza transfiriendo un grupo fosfatidilo del CDP-DAG a PG, produciendo así CL y CMP (Chang et al., 1998) (Figura 1.3). La Cls de tipo eucarionte (Cls-II) pertenece a la superfamilia de las CDP-alcohol fosfatidiltransferasas.

No obstante, la diversidad en las vías de síntesis de CL reportadas ha aumentado considerablemente en los últimos años. Se ha mostrado que *S. coelicolor* y la mayoría de actinomicetos sintetizan CL a partir de la vía tipo eucarionte (Sandoval-Calderón et al., 2009). Por otro lado, se ha visto que el parásito *Trypanosoma brucei* usa una enzima de tipo bacteriana (Serricchio and Bütikofer, 2012). Adicionalmente, se descubrieron recientemente dos nuevas enzimas capaces de sintetizar CL, la PE/CL sintasa bifuncional descrita en la sección anterior (Moser et al., 2014), y una enzima de *E. coli*, denominada ClsC, que puede

sintetizar CL a partir de PG y PE (Tan et al., 2012). Ambas enzimas pertenecen a la superfamilia de la PLD.

1.2.4 Síntesis de fosfatidil-*mio*-inositol y sus derivados

El fosfatidil-*mio*-inositol (PI) es uno de los fosfolípidos más comunes en eucariontes, pues varios de sus derivados fosforilados son esenciales para diversas funciones básicas de señalización celular. Sin embargo, el PI es una molécula relativamente rara en bacterias. Los actinomicetos son de los pocos clados que producen PI, y además varios de ellos acumulan varias moléculas derivadas en sus membranas (Brennan and Ballou, 1967; Lechevalier et al., 1977; Guerin et al., 2010).

Mientras que en los eucariontes PI se sintetiza a partir de CDP-DAG y *mio*-inositol (Nikawa et al., 1987), en actinomicetos la enzima PIP sintasa (PisA) primero utiliza CDP-DAG y *mio*-inositol 1-fosfato para formar PI-fosfato (PIP), que después es desfosforilado por una PIP fosfatasa (Pipp) para formar PI (Morii et al., 2010; Morii et al., 2014) (Figura 1.3). En *Mycobacterium*, PI es decorado con uno a seis residuos de manosa, y hasta cuatro cadenas acilo, formando una familia de moléculas denominadas PI-manósidos (PIMs) (Guerin et al., 2010). Las diversas manosilaciones son realizadas por las enzimas PimA, PimB', PimC, PimE, y otras α -manosil-transferasas aún desconocidas. De las anteriores, las enzimas PimA y PimB', encargadas de la primer y segunda manosilación de PI, respectivamente, son esenciales para *Mycobacterium smegmatis*. Se ha caracterizado una de las aciltransferasas encargadas de la síntesis de las versiones aciladas de los PIMs Ac-PIM₁ y Ac-PIM₂ (AcylIT). Algunos de estos PIMs en *Mycobacterium* sirven de ancla para moléculas más complejas, como los lipoglicanos lipomanano y lipoarabinomanano, que forman parte de la envoltura celular de este género de bacterias (Guerin et al., 2010).

1.2.5 Síntesis de lípidos de ornitina

Además de los fosfolípidos, que son constituyentes básicos de la mayoría de las membranas de bacterias y eucariontes, también hay varios lípidos polares sin fósforo que son producidos y acumulados por muchos organismos. Los glicolípidos son frecuentes en plantas y cianobacterias, por ejemplo, aunque también se encuentran en otros clados de bacterias (Semeniuk et al., 2014; Sohlenkamp and Geiger, 2016); y los genomas de casi la mitad de las

especies bacterianas poseen homólogos a genes codificantes para enzimas probablemente involucradas en la síntesis de lípidos de ornitina (OL) (Vences-Guzmán et al., 2015).

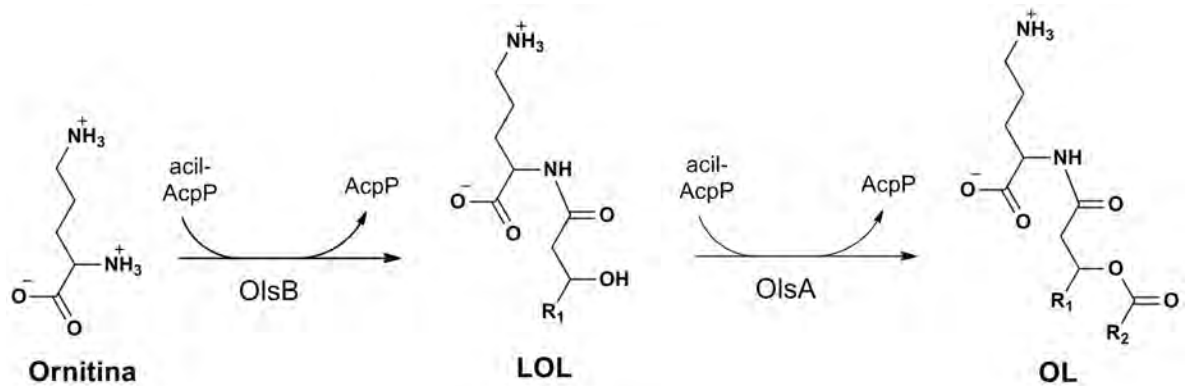


Figura 1.4 Ruta de biosíntesis de los lípidos de ornitina.

Se muestra la primer ruta descubierta para la síntesis de OL. LOL, liso-lípido de ornitina; OL, lípido de ornitina; R₁ y R₂, cadenas de ácidos grasos.

La síntesis de OL se produce a partir de dos reacciones enzimáticas. Primero ocurre la *N*-acilación del grupo α -amino de la ornitina con un ácido graso 3-hidroxilado para formar liso-OL, dada por la enzima OlsB (Gao et al., 2004); y luego la *O*-acilación del grupo 3-hidroxi del ácido graso amidificado a la ornitina del liso-OL, catalizada por la enzima OlsA (Weissenmayer et al., 2002) (Figura 1.4). Los genes codificantes para este par de enzimas con frecuencia se encuentran en un mismo operón en varios organismos (Gao et al., 2004). Recientemente se descubrió en *Serratia proteamaculans* una enzima bifuncional capaz de catalizar las dos reacciones de acilación, llamada OlsF (Vences-Guzmán et al., 2015).

1.3 Remodelación de la membrana en bacterias

La supervivencia de las bacterias depende de la capacidad de adaptar sus membranas a diferentes situaciones ambientales. Es fundamental que la bicapa lipídica pueda mantener su fluidez para que las proteínas membranales conserven sus funciones. Adicionalmente, también debe ser posible mantener el potencial de la membrana interna para llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Por otro lado, en algunas ocasiones condiciones nutricionales desfavorables hacen necesario adaptar la composición molecular de los componentes celulares para mantener la viabilidad y continuar el crecimiento (Zhang and Rock, 2008). Las bacterias

pueden modificar las propiedades de sus membranas de varias maneras, ya sea alterando los ácidos grasos esterificados en sus lípidos polares, sintetizando diferentes tipos de ácidos grasos que luego serán incorporados a los lípidos de membrana, añadiendo residuos a las cabezas polares de los lípidos de membrana, o degradando algunos de los lípidos para reemplazarlos con otros que tengan composiciones químicas o propiedades distintas (Sohlenkamp and Geiger, 2016).

1.3.1 Respuesta visco-elástica (adaptación homeoviscosa)

Las propiedades biofísicas de la membrana están en buena parte determinadas por la composición de los ácidos grasos en los lípidos polares. Varios mecanismos son capaces de mantener una fluidez adecuada de la membrana, aún ante cambios de temperatura o la presencia de solventes orgánicos. Se ha visto que en *E. coli* una mayor proporción de ácidos grasos saturados otorga mayor rigidez, mientras que una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados aumenta la fluidez de la bicapa lipídica (Sinensky, 1974). A mayores temperaturas de crecimiento, las bacterias suelen tener mayores proporciones de residuos de ácidos grasos saturados con respecto a los ácidos grasos insaturados en sus lípidos de membrana.

La mayoría de los actinomicetos (Kaneda, 1991;Li et al., 2005) y algunas otras bacterias Gram-positivas, como *Listeria monocitogenes* (Zhu et al., 2005), contienen ácidos grasos ramificados. Estas bacterias pueden controlar la fluidez de la membrana cambiando la posición del grupo metilo de la ramificación, de *iso* a *anteiso* o modificando la cantidad de ácidos grasos ramificados (Heinen and Lauwers, 1983;Kaneda, 1991;Suutari and Laakso, 1993).

1.3.2 Limitación de fósforo

Para muchas bacterias, el fósforo es un factor limitante para el crecimiento en su hábitat natural. Se ha visto que en varias especies, la composición de la membrana puede ajustarse en condiciones de limitación de fosfato en el medio ambiente para reemplazar algunas clases de fosfolípidos con lípidos polares sin fósforo, y de esta manera redirigir el fosfato a la síntesis de ácidos nucleicos y otros componentes esenciales para la supervivencia. Este proceso se ha estudiado bastante bien en α -proteobacterias como *Rhodobacter sphaeroides* y *Sinorhizobium meliloti* (Geiger et al., 1999), donde los fosfolípidos PC y PE se degradan activamente y se reemplazan con lípidos sin fósforo como *N,N,N*-trimetilhomoserina diacilglicerol,

sulfoquinovosil diacil glicerol, glicolípidos y OL (Benning et al., 1993; Benning et al., 1995; Zavaleta-Pastor et al., 2010).

1.3.3 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs) son parte de las defensas más primitivas contra infecciones bacterianas, y son producidos por todo tipo de organismos. Además de formar parte de la respuesta inmune, también pueden fungir como arsenal químico en microorganismos compitiendo por el mismo nicho ecológico (Roy, 2009). Los CAMPs atacan preferencialmente a las bacterias, principalmente debido a la carga altamente negativa de sus membranas, dada por la composición de fosfolípidos, pero también por el lípido A en Gram-negativas o por los ácidos teicoicos de algunas bacterias Gram-positivas. Los CAMPs actúan de maneras bastante diversas, formando poros en las membranas o difundiendo a través de ellas para afectar alguna otra parte de la maquinaria celular. La modificación de componentes de la envoltura celular con residuos de aminoácidos ayuda a disminuir la carga negativa de la membrana, haciéndola más positiva y de esta manera contribuyen a reducir la afinidad de los CAMPs por ésta (Roy, 2009).

Uno de los métodos que algunas especies han desarrollado para defenderse de los CAMPs es la decoración del PG, o en ocasiones de la CL, con residuos de aminoácidos cargados positivamente. Unas de las modificaciones más frecuentemente encontradas son la esterificación de uno de los grupos hidroxilo libres de la cabeza del PG con un residuo de lisina o alanina, para formar Lys-PG o Ala-PG, respectivamente.

La modificación de PG con residuos de aminoácidos es catalizada por enzimas originalmente descubiertas en *Staphylococcus aureus* como factores de virulencia, y anotadas en muchos organismos como Mprf (*multiple peptide resistance factor*). Estas enzimas, que denominaremos aminoacil-PG sintasas (aa-PGS), toman como sustrato un tRNA cargado con un aminoácido (frecuentemente Lys-tRNA o Ala-tRNA) para transferir el grupo aminoacilo al PG o a la CL (Roy, 2009; Roy and Ibba, 2009). Se ha visto que además de otorgar protección a CAMPs, las aa-PGS también son necesarias para la resistencia a algunos otros estreses, como otros péptidos antimicrobianos y condiciones de estrés por acidez (Sohlenkamp et al., 2007).

1.3.4 Estrés osmótico

Los cambios en la presión osmótica pueden llegar a afectar el funcionamiento adecuado de las células al diluir o concentrar el citoplasma mediante el flujo de agua a través de la membrana. Las bacterias pueden contrarrestar los cambios en la osmolaridad del medio al ajustar la distribución de algunos solutos en el citoplasma, como la prolina, la glicina y la glicina-betaína. Estos osmolitos orgánicos, que además ayudan a estabilizar la estructura de las proteínas en condiciones de estrés osmótico, se consideran como osmoprotectores. Varias enzimas, transportadores y canales participan en la regulación de la concentración de estos osmolitos en *E. coli* (Csonka, 1989).

En varias especies de bacterias se ha visto que la CL participa en la respuesta ante el estrés osmótico. En *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Bacillus subtilis* hay un aumento en la concentración de CL en condiciones de presión osmótica elevada (López et al., 1998; Catucci et al., 2004; Tsatskis et al., 2005). En *E. coli*, la CL está enriquecida en las regiones polares de la membrana celular, donde también se encuentra el transportador de prolina ProP, que funciona para modular la osmolaridad interna mediante la importación de este osmoprotector (Romantsov et al., 2008; Romantsov et al., 2009). La concentración de CL participa tanto en la localización de ProP, como en la modulación de su actividad. En *B. subtilis*, una mutante deficiente en síntesis de CL, generada por inactivación del gen codificante para la enzima ClsA, presenta una osmotolerancia reducida (López et al., 2006).

1.3.5 Interacción con hospederos

La fosfolipasa A de la membrana exterior de *Helicobacter pylori* (OMPLA) degrada los fosfolípidos de su membrana y genera lisofosfolípidos, esto es, fosfolípidos que carecen de alguna cadena de ácido graso. Los altos niveles de lisofosfolípidos en esta bacteria – que en otros organismos rara vez son acumulados en la membrana – parecen ayudar a la virulencia de este patógeno, pues variantes con mayor acumulación de estos lisofosfolípidos presentan mayor adherencia epitelial y mayor expresión de factores de virulencia (Tannæs et al., 2005). En adición al papel potencial en la virulencia, la expresión de OMPLA es necesaria para la resistencia a acidez de este organismo, y se ha visto que el crecimiento prolongado en pH bajo selecciona variantes con alto contenido de lisofosfolípidos (Tannæs et al., 2001).

2

Antecedentes

2.1 Síntesis de fosfolípidos en actinomicetos y *S. coelicolor*

Estudios quimiotaxonómicos de actinomicetos han mostrado que las actinobacterias acumulan en sus membranas principalmente CL, PI, y derivados manosilados de PI (PIMs), y, aunque no es universal, la mayoría de los géneros parecen ser capaces de producir PE (Lechevalier et al., 1977). Adicionalmente, algunos géneros dentro de este clado acumulan también PG, PC, acyl-PG (Lechevalier et al., 1977) y OL (Kimura and Otsuka, 1969;Kawanami, 1971;Lanéelle et al., 1990) (Figura 2.1). PI y algunos derivados son lípidos comunes en eucariontes y relevantes para la señalización celular, pero relativamente raros en bacterias fuera del phylum Actinobacteria.

En *S. coelicolor* se ha mostrado que – en cultivos líquidos – la membrana está principalmente compuesta de CL, PE, PI, PIMs, y pequeñas cantidades de monoliso cardiopina (MLCL) y diliso cardiopina (DLCL) (Sandoval-Calderón et al., 2009;Jyothikumar et al., 2012); y en algunas condiciones de crecimiento, también PG y PA (Jyothikumar et al., 2012). La ausencia de PG en varias condiciones es peculiar debido a que es precursor de la síntesis de CL, y suele ser de los fosfolípidos más comunes en otras

bacterias. Como ya se describió en la sección 1.2.3, *S. coelicolor* y otros actinomicetos utilizan una vía para sintetizar CL distinta a la que había sido descrita antes para otras bacterias, donde en vez de catalizar una reacción reversible de condensación de dos moléculas de PG, se usa un sustrato activado, el CDP-DAG para transferir un grupo fosfatidilo a una molécula de PG, una reacción irreversible (Sandoval-Calderón et al., 2009). Esta diferencia en la vía de síntesis de la CL es probablemente parte de la explicación de la ausencia de acumulación de PG en *Streptomyces*.

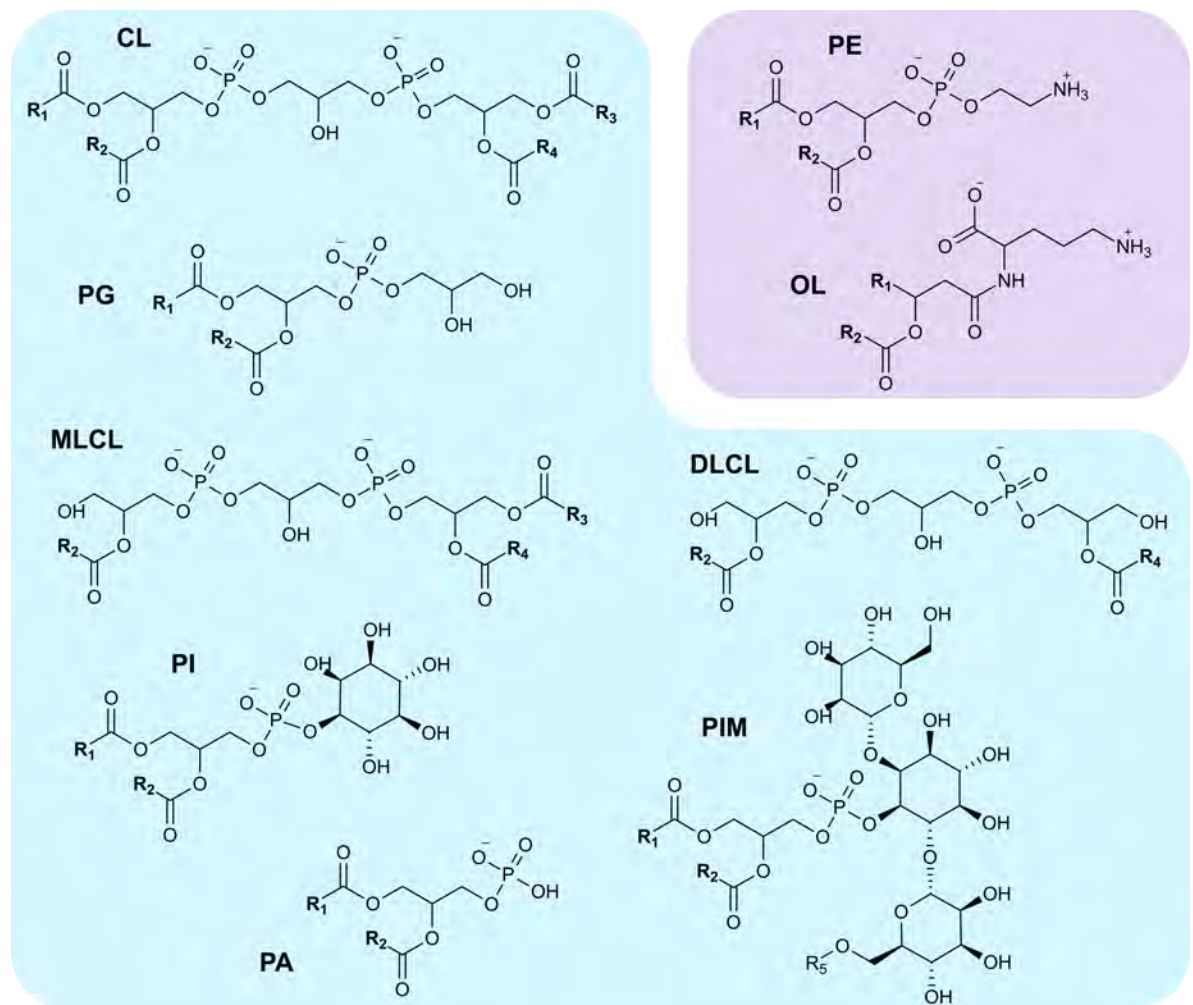


Figura 2.1 Principales lípidos polares sintetizados por bacterias del género *Streptomyces*.

Los lípidos sombreados en azul son aniónicos, los sombreados en morado son zwitteriónicos. CL, cardiolipina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; MLCL, monoliso cardiolipina; DLCL, diliso cardiolipina; PI, fosfatidil-*myo*-inositol; PIM, fosfatidilinositol manósido; PA, ácido fosfatídico; OL, lípido de ornitina. R₁₋₄ representan cadenas acilo; R₅ representa ya sea un átomo de hidrógeno o una cadena acilo. Adaptada de Sandoval-Calderón, et al. (2015).

Por otro lado, se ha mostrado que el gen que codifica para la cardiolipina sintasa de *S. coelicolor* es un gen esencial en esta bacteria, y que esta enzima (perteneciente a la familia de las CDP-alcohol fosfotransferasas) no posee una localización celular específica, aunque la CL tiende a acumularse en la parte apical de las hifas y en los sitios de ramificación en el micelio (Jyothikumar et al., 2012).

El gen *clsA* (*SCO1389*) de *S. coelicolor* tiene homólogos en la mayoría de actinobacterias, con pocas excepciones, como el clado de *Corynebacterium*, que utiliza una enzima de la familia de la PLD, que catalizaría una reacción similar a la descrita en la mayoría de las demás bacterias. El resto de los actinomicetos, entonces, se propone que usan la misma vía que *S. coelicolor* para la síntesis de CL (Sandoval-Calderón et al., 2009).

Independientemente de los trabajos centrados en la síntesis de CL, hay poca información acerca de la síntesis de lípidos polares en actinomicetos, con la mayor parte de la investigación centrada en la síntesis de PI, y sus derivados en *Mycobacterium* (ver sección 1.2.4). En *S. coelicolor*, sólo existen genes predichos como codificantes para la fosfatidilglicerol fosfato sintasa (*pgsA*, *SCO5753*), fosfatidilinositol fosfato sintasa (*pisA*, *SCO1527*), fosfatidilserina sintasa (*ppsA*, *SCO6467*), y fosfatidilserina descarboxilasa (*psd*, *SCO6468*) (Sandoval-Calderón et al., 2009); y se ha propuesto que los genes *SCO1525* y *SCO1526* podrían participar en la síntesis de los derivados manosilados y acilados de PI (Zhang et al., 2012).

2.2 Relación entre los lípidos de membrana y el desarrollo en *Streptomyces*

Como se mencionó en la sección anterior, el gen que codifica para la sintasa de CL en *S. coelicolor* es esencial y sólo puede construirse una mutante en el gen *clsA* si se complementa con una copia adicional de este gen en algún otro sitio del cromosoma (Sandoval-Calderón et al., 2009; Jyothikumar et al., 2012). En una cepa donde el gen *clsA* es expresado a partir de un promotor inducible, la composición de lípidos y el desarrollo morfológico se vuelven dependientes de la presencia del inductor, presentando incapacidad para erigir hifas aéreas y para esporular en condiciones con concentraciones sub-óptimas del inductor (Jyothikumar et al., 2012). Adicionalmente, la sobreexpresión de *clsA* provoca alteraciones en la morfología del micelio vegetativo, las hifas aéreas y las esporas, presentando mayor frecuencia de ramificaciones de las hifas, debilitación de las puntas de las hifas del micelio substrato,

presencia de hifas aéreas aberrantes y con ramificaciones, y esporas atípicas, agrandadas y frecuentemente anucleadas (Jyothikumar et al., 2012). Esto parece indicar que la síntesis de CL y su expresión a niveles adecuados son necesarios para varias etapas y procesos del desarrollo morfológico.

Por otro lado, el gen *inoA*, que codifica para una *mio*-inositol 1-fosfato sintasa, se encuentra regulado por el regulador transcripcional WhiI, que participa en varios procesos durante la esporulación en *S. coelicolor* (Tian et al., 2007; Zhang et al., 2012). Una mutante nula en el gen *inoA* se vuelve auxótrofa para inositol. En medio mínimo con glucosa o manitol como fuentes de carbono, esta mutante presenta crecimiento débil y es incapaz de formar hifas aéreas. La adición de 1 mM de inositol en el medio mínimo restablece completamente el fenotipo silvestre con respecto al desarrollo morfológico. El cultivo de esta cepa en SFM, que por estar basado en harina de soya debe contener algo de inositol, es más robusto, pero el desarrollo se queda detenido tras la erección de hifas aéreas, y la mutante es incapaz de esporular (Zhang et al., 2012). Adicionalmente, el gen *inoA* se sobreexpresa durante la esporulación, con una regulación dependiente de WhiI (Zhang et al., 2012).

El fenotipo de la mutante *inoA* podría deberse a la incapacidad de esta mutante para sintetizar PI o sus derivados, indicando un posible vínculo adicional entre la síntesis de lípidos de membrana y el desarrollo morfológico en esta bacteria. La producción de PI es esencial en *M. tuberculosis* (Jackson et al., 2000), y hay ciertos indicios de que también es el caso para *S. coelicolor* (Paul Herron, comunicación personal).

3

Hipótesis

S. coelicolor es capaz de alterar la composición de lípidos polares que conforman su membrana como respuesta a distintas condiciones de crecimiento y como parte del desarrollo morfológico.

4

Objetivos Generales

- Explorar la plasticidad en la composición de la membrana de *S. coelicolor* (capítulo 6).
- Realizar una reconstrucción bioinformática de la síntesis de fosfolípidos de *S. coelicolor* (capítulo 7).
- Estudiar la síntesis y posibles funciones de los lípidos de ornitina en *S. coelicolor* (capítulo 8).
- Buscar los genes responsables de la biosíntesis de MLCL y DLCL (capítulo 9).

5

Materiales y Métodos

5.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de *S. coelicolor* se utilizaron los medios YEME líquido y sólido, y los medios sólidos SMMS, SFM, R2YE (Kieser et al., 2000), e ISP2 (Shirling and Gottlieb, 1966). En los experimentos indicados, se utilizó R2YE sólido con 0.05 mM, 0.5 mM y 5 mM de KH_2PO_4 añadido como fosfato inorgánico (P_i). Los cultivos fueron incubados a 30 °C entre 1 y 9 días, según se especifique en la sección de resultados. ISP2 y YEME se utilizan para crecimiento de rutina de *S. coelicolor*, y SFM se utiliza para obtener esporulación abundante y rápida. SMMS y R2YE son frecuentemente utilizados para promover la producción de antibióticos. Las recetas se encuentran en el Anexo 2.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó LB líquido y sólido. La temperatura de incubación fue de 37 °C, o de 30 °C para los experimentos de expresión heteróloga. Se añadió 0.1 mM de IPTG en los cultivos líquidos en los experimentos indicados.

5.2 Cepas y plásmidos

Tabla 5.1 Plásmidos, cósmidos y cepas utilizados

Cepa o plásmido	Características	Referencia
Plásmidos		
pIJ-BS	Cointegrado del plásmido pIJ6902 y el plásmido pBlueScript II SK+	(Sandoval-Calderón et al., 2015)
pIJ- <i>olsAB</i>	pIJ-BS con el operón <i>olsBA</i> de <i>S. coelicolor</i>	(Sandoval-Calderón et al., 2015)
pET-CLD1	<i>CLD1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> clonado en pET15b	Este trabajo
pEC-2886	<i>SCO2886</i> clonado en el vector pEC-XK99E	Este trabajo
pET15b	Vector de expresión para <i>E. coli</i>	Novagen®
pET17b	Vector de expresión para <i>E. coli</i>	Novagen®
pEC-XK99E	Vector de expresión para <i>E. coli</i> y <i>Corynebacterium glutamicum</i>	(Kirchner and Tauch, 2003)
Cósmidos mutagenizados		
SCM10.1.C05	(<i>SCO0921::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
2StG1.1.E06	(<i>SCO1253::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
6E10.2.H01	(<i>SCO2123::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SCE6.1.B02	(<i>SCO2886::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SCE9.1.F02	(<i>SCO3397::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
H10.2.D02	(<i>SCO3644::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
D95A.2.E08	(<i>SCO4298::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SC6G4.1.B06	(<i>SCO4746::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SCP8.1.H04	(<i>SCO5165::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SC6G9.1.E02	(<i>SCO5322::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
6F04.2.B04	(<i>SCO6127::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
3C8.1.F04	(<i>SCO6384::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
6F7.2.A05	(<i>SCO6966::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
SC4B10.1.B06	(<i>SCO7131::Tn5062</i>)	(Bishop et al., 2004)
<i>Streptomyces coelicolor</i>		
M145	Cepa silvestre.	(Sandoval-Calderón et al., 2009)
OlsB ⁻	Mutante insercional en el gen <i>SCO0921</i> .	(Sandoval-Calderón et al., 2015)
OlsB ⁻ .pIJ-BS	Mutante insercional en el gen <i>SCO0921</i> , portadora del plásmido pIJ-BS vacío.	(Sandoval-Calderón et al., 2015)
OlsB ⁻ .pIJ- <i>olsBA</i>	Mutante insercional en el gen <i>SCO0921</i> , portadora de una copia adicional del operón <i>SCO0921-SCO0920</i> en <i>trans</i> .	(Sandoval-Calderón et al., 2015)
MSC01	Mutante insercional en el gen <i>SCO2886</i>	Este trabajo

<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>	(Hanahan, 1983)
ET12567. pUZ8002	Usada como donadora para experimentos de conjugación con <i>S. coelicolor</i>	(Gust et al., 2003)
Rosetta 2(DE3). pLysS	Vector para expresión heteróloga	Novagen®

5.3 Preparación de suspensiones de esporas de *S. coelicolor*

Las preparaciones de esporas de *S. coelicolor* fueron llevadas a cabo como se indica en Kieser et al. (2000), pero sin utilizar bomba de vacío y con algodón absorbente. La preparación de esporas se llevó a cabo a partir de cultivos densos crecidos en SFM por siete días, a menos que se indique lo contrario. La pastilla de esporas resultante de una caja de Petri es resuspendida en alrededor de 500 μ l de glicerol estéril (20% *p/v* en agua) y almacenada a -20 °C.

5.4 Mutagénesis dirigida de *S. coelicolor*

Las cepas mutantes generadas en este trabajo fueron construidas a partir de los últimos pasos de mutagénesis descritos en el protocolo de Redirect© (Gust et al., 2003). Se utilizaron los cósmidos mutagenizados mediante inserciones del transposón Tn5062 (Bishop et al., 2004) indicados en la Tabla 1. Las clonas candidatas a ser dobles recombinantes – que reemplazaron la secuencia nativa por la versión interrumpida con el transposón Tn5062 – son sensibles a kanamicina, pero resistentes a apramicina. Estas cepas candidatas se verificaron mediante PCR o *Southern Blot*.

5.5 Aislamiento de DNA genómico de *S. coelicolor*

El DNA genómico de *S. coelicolor* para realizar experimentos de PCR fue extraído mediante un kit de purificación de DNA de suelo (FastDNA® SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals), a partir de muestras de alrededor de 500 mg tomadas de cultivos en medio sólido. Las muestras de DNA fueron diluídas 1:100 antes de usarse como molde para la reacción de PCR.

5.6 Clonación del operón *SCO0921-SCO0920* y complementación de la mutante *olsB*⁻

La amplificación del operón putativo *SCO0921-SCO0920* se realizó utilizando los oligonucleótidos Op_0920-21_F y Op_0920-21_R (Anexo 3). El producto resultante de 1.8 kb contiene la secuencia de 200 pb río arriba de *SCO0921* que debería incluir las secuencias reguladoras del operón. Se utilizó la polimerasa AccuPrimeTM Pfx de InvitrogenTM con 65 °C de temperatura de alineamiento, y usando el resto de los parámetros para la reacción como están indicados en el protocolo de la enzima. El producto de PCR fue clonado en el vector pBlueScript II SK+ usando los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* incluidos en los oligonucleótidos. El plásmido resultante se cointegró con el plásmido pIJ6902 – un plásmido para expresión en *S. coelicolor* – usando el sitio *EcoRI* de ambos vectores, para obtener el plásmido pIJ-*olsBA*. La conjugación de este plásmido a *S. coelicolor* se realizó con la cepa de *E. coli* ET12567. pUZ8002 como donadora.

5.7 Expresión heteróloga de genes de *S. coelicolor* en *E. coli*

Los genes candidatos fueron amplificados con los oligonucleótidos de la tabla en el Anexo 3, utilizando AccuPrimeTM Pfx (InvitrogenTM) o GeneAmp[®] XL PCR Kit (Applied Biosystems). Los productos fueron clonados en el vector pET17b, utilizando los sitios de restricción indicados en la tabla del Anexo 3, y enzimas de New England Biolabs. La expresión se llevó a cabo usando la cepa *E. coli* Rosetta 2(DE3). pLysS, que porta un plásmido con genes de tRNA para siete codones inusuales, que puede ayudar a la expresión de proteínas de organismos con un uso de codones distinto al de *E. coli*, como es el caso de *S. coelicolor*. Se indujo la expresión de los genes añadiendo 0.1 mM de IPTG al medio de cultivo. Al mismo tiempo se añadió 1 µCi de [1-¹⁴C]acetato, y los cultivos se mantuvieron en incubación a 30 °C durante 2-4 horas.

5.8 Extracción de lípidos

Los lípidos de *E. coli* se extrajeron mediante el protocolo de Bligh y Dyer (1959) como se ha descrito previamente (Sandoval-Calderón et al., 2009).

Para obtener las muestras de lípidos de *S. coelicolor*, se utilizaron muestras sin marcaje radiactivo, provenientes de una o dos cajas de medio sólido inoculadas con 10^7 esporas. El medio sólido se recubrió primero con un disco de celofán esterilizado en agua destilada, y la preparación de esporas se esparció encima usando perlas de vidrio estériles. Tras el tiempo deseado de incubación, las muestras de micelio se recuperaron raspando el celofán con una espátula de acero (Kieser et al., 2000). La muestra de micelio obtenida de esta manera normalmente tenía un peso húmedo que se encontraban en el rango de 60 a 400 mg, según el medio de cultivo y el tiempo después de la inoculación en que se realizó la cosecha. El micelio se resuspendió en agua destilada para obtener un volumen total de 1 o 2 mL, según el volumen de la pastilla. Las muestras se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras descongelar, se añadió lisozima para llegar a una concentración final de 2 mg/mL, y las muestras se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Posteriormente se procedió con el protocolo de extracción de Bligh y Dyer (1959). Las muestras de lípidos se disolvieron en metanol/cloroformo (1:1) en un volumen proporcional a la cantidad de biomasa de donde fueron obtenidas, con alrededor de 10 μL de solvente por cada 30 mg de micelio.

5.9 Cromatografía de capa fina

Se utilizaron dos sistemas de separación de cromatografía en capa fina (TLC) de dos dimensiones. El Sistema 1 se realiza en capas finas para TLC de alto rendimiento (Silica gel 60 sobre aluminio, Merck), con una mezcla de cloroformo/metanol/agua (16:4:1, v/v) para la primera dimensión, y cloroformo/metanol/ácido acético (15:3:2, v/v) para la segunda dimensión.

Sin embargo, para tener una buena caracterización del perfil de lípidos de *S. coelicolor*, fue necesario obtener un nuevo sistema de separación de lípidos mediante cromatografía de capa fina, que permita observar de manera independiente la abundancia de cada una de las principales especies moleculares de lípidos de membrana de esta bacteria. Para el Sistema 2, se realizó una adaptación de un sistema de separación en una sola dimensión usado para analizar lípidos de levadura (Vaden et al., 2005). La capa fina es lavada en 1.8% de ácido bórico en etanol, secada por 5 minutos en una campana de extracción, y luego horneada a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por quince minutos antes de aplicar las muestras. La primera dimensión es desarrollada en cloroformo/metanol/agua (14:6:1), y cloroformo/etanol/agua/trietilamina (30:35:7:35) para la

segunda dimensión. Tras secar toda la noche, la TLC se vuelve a desarrollar en la segunda dimensión. Con el Sistema 2 fue posible separar en el mismo experimento a todas las clases mayoritarias de lípidos de membrana que habían sido identificadas previamente en *S. coelicolor* mediante espectrometría de masas (Figura 5.1).

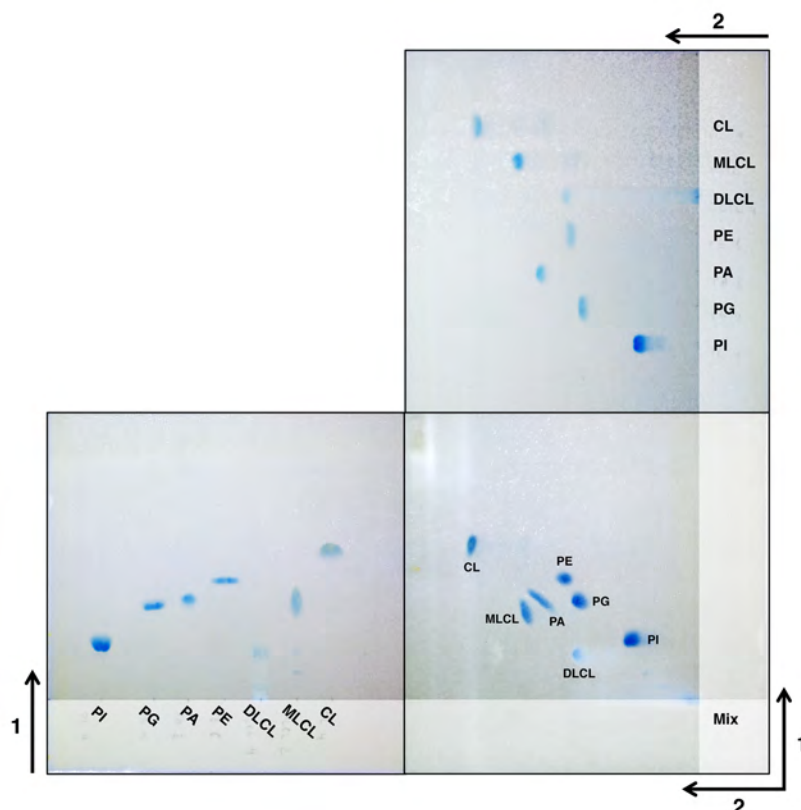


Figura 5.1 Separación de estándares de lípidos mediante TLC de dos dimensiones.

Estándares de fosfolípidos fueron separados de manera independiente en cada una de las dos mezclas de solventes usadas para el Sistema 2. **1:** cloroformo/metanol/agua (14:6:1); **2:** cloroformo/etanol/agua/ trietilamina (30:35:7:35). Los mismos estándares fueron mezclados (Mix) y separados en dos dimensiones mediante el Sistema 2. La TLC fue teñida con Phospray® (Supelco) para mostrar los fosfolípidos. PI, fosfatidil-*mio*-inositol (Sigma), 8 µg; PG, fosfatidilglicerol (Sigma), 8 µg; PA, ácido fosfatídico (Sigma), 4 µg; PE, fosfatidiletanolamina (Sigma), 6 µg; DLCL, diliso cardioplipina (Avanti Polar Lipids), 10 µg; MLCL, monoliso cardioplipina (Avanti Polar Lipids), 10 µg; CL, cardioplipina, (Sigma), 16 µg.

5.9.1 Detección y cuantificación de los lípidos

Para detectar moléculas hidrofóbicas, las capas finas fueron rociadas con el reactivo ANS (8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid, Sigma) a 0.2 % en metanol, y visualizadas bajo luz

ultravioleta a 366 nm, con lo que las manchas de lípidos fluorescen de color turquesa en la TLC (Zbierzak et al., 2011). Fotografías de las capas finas fueron procesadas con el programa ImageJ (Schneider et al., 2012) de la manera siguiente: el contraste de la imagen fue incrementado, las fotografías fueron convertidas a blanco y negro, e invertidas para facilitar su visualización. Para realizar la cuantificación relativa de los lípidos en TLC, se realizó un análisis de densitometría con ImageJ. Las manchas correspondientes a los lípidos neutros no fueron incluidas en la cuantificación. La identidad de las manchas de lípidos fue determinada al comparar la R_f de estándares de los lípidos separados en el mismo sistema (Figura 5.1), en conjunción con diferentes tinciones para detectar grupos funcionales específicos. Adicionalmente, la identificación de algunas moléculas también fue corroborada con análisis de espectrometría de masas.

En algunos experimentos, las placas de TLC fueron teñidas con ninhidrina (Sigma), Phospray® (Supelco), u orcinol (Sigma) para detectar aminolípidos, fosfolípidos, o glicolípidos, respectivamente.

5.10 Espectrometría de masas

Las muestras de lípidos de *S. coelicolor* fueron diluidas 1:100 en metanol con 1 mM de acetato de amonio para facilitar la ionización tanto de los lípidos aniónicos como los zwitteriónicos. Estas muestras fueron inyectadas directamente a un espectrómetro de masas 6.42 T Thermo LTQ-FT-ICR (*hybrid linear ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*), usando una fuente de ionización TriVersa NanoMate® (Advion Biosystems). La ionización por electrospray se realizó con un voltaje de 1.3 – 1.45 kV y una presión de 0.35 a 0.5 psi. Los espectros de masas fueron adquiridos mediante los programas Tune Plus versión 1.0 y Xcalibur versión 1.4 SR1. El instrumento primero se afinó a 816 m/z usando citocromo C ($[M+15H]^{15+}$, Sigma). Los datos fueron coleccionados usando un método dependiente de datos de la fragmentación de los iones (MS/MS) en el modo positivo. Este método consiste en un segmento de 10 minutos, durante el cual se ciclan de manera iterativa un análisis de FT-MS en un rango de 50 a 1600 m/z , con análisis de MS/MS de los iones más intensos con la trampa de iones (Yang et al., 2013).

5.11 Análisis de espectros de masas mediante redes de fragmentación molecular

Se construyó una red de fragmentación molecular (Watrous et al., 2012) de los compuestos hidrofóbicos de un conjunto de muestras de *S. coelicolor* a partir de los datos de MS/MS, obtenidos como se describe en el apartado anterior, usando las herramientas de análisis del sitio dedicado a metabolómica Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Se combinaron todos los resultados de MS/MS de muestras de *S. coelicolor* cultivado en distintas condiciones y tiempos durante el desarrollo (ver sección 6.3-6.5). Como control, también se incluyeron datos de muestras del medio de cultivo estéril, y un estándar de PE (Sigma). Todos los archivos de los datos de MS/MS correspondientes a las muestras de *S. coelicolor* fueron depositados en MassIVE, la base de datos pública de proyectos de metabolómica en GNPS (ID: MSV000078623).

Los parámetros usados en la construcción de la red fueron: tolerancia en la masa del precursor de 2.0 Da, tamaño máximo del componente conectado de 100, TopK de la red de 10, desfase máxima de masa de 100 Da, umbral del *cosine score* de 0.7, y un mínimo de picos alineados de dos. La red resultante fue dibujada con Cytoscape, en la versión 2.8.3 (www.cytoscape.org) usando la distribución FM3. Los nodos correspondientes a iones presentes en muestras de los medios de cultivo fueron eliminados de la red para reducir el ruido de fondo de los datos.

6

Exploración de la plasticidad en la composición de la membrana de *Streptomyces coelicolor*

6.1 Introducción

En su hábitat natural, las bacterias del género *Streptomyces* crecen ya sea en superficies sólidas o en la interfase aire/agua en el suelo, y varias especies, entre ellas *S. coelicolor* son incapaces de completar su desarrollo en medio líquido. Para conseguir un crecimiento moderadamente disperso capaz de ser monitoreado mediante mediciones de absorbancia, en vez de agregados de micelio o “*pellets*”, se utilizan medios líquidos con alta viscosidad, ya sea usando altas concentraciones de sacarosa (34% en medio YEME) o polietilenglicol. Además, los matraces llevan baffles o resortes de acero inoxidable, que aumentan la turbulencia del medio en agitación, consiguiendo de esta manera la fragmentación mecánica de los *pellets* de micelio. Todo esto nos conduce a una manera de crecimiento altamente artificial, y la perturbación mecánica y osmótica podría tener efectos en la envoltura celular. Debido a que las anteriores evaluaciones del perfil de lípidos de *S. coelicolor* se habían realizado

principalmente a partir de cultivos en suspensión, deseábamos estudiar si este método de cultivo había impactado en la composición de la membrana de esta bacteria. Adicionalmente, y tomando en cuenta que en otras bacterias se sabe que existe remodelación de la membrana, pero se desconoce si *S. coelicolor* es capaz de estas alteraciones, nos propusimos comparar el perfil de lípidos en diversos medios de cultivo para evaluar las adaptaciones de la membrana a diferentes condiciones de crecimiento. Finalmente, dados los reportes que asocian a algunas moléculas de la membrana con el desarrollo morfológico de *S. coelicolor*, exploramos también las modificaciones que sufre el perfil de lípidos a lo largo de la diferenciación.

6.2 Objetivos específicos

- Describir el perfil de lípidos de membrana de *S. coelicolor* cultivado en medio sólido.
- Estudiar el efecto de diversas condiciones nutricionales en la composición de la membrana de *S. coelicolor*.
- Evaluar la respuesta en la composición de la membrana ante diversas condiciones de estrés.
- Estudiar la dinámica en el perfil de lípidos a lo largo de diversas etapas del desarrollo morfológico en *S. coelicolor*.

6.3 Resultados

6.3.1 *S. coelicolor* presenta diferencias radicales en la composición de su membrana en medio YEME sólido vs. líquido

En muestras de lípidos preparadas a partir de cultivos líquidos de *S. coelicolor* en medio YEME, observamos un perfil similar al anteriormente descrito, con PE y CL como principales componentes, pero también presencia de PI y menores cantidades de PIMs. En contraste, las muestras provenientes de medio YEME sólido presentan un perfil totalmente distinto, con DLCL y MLCL como los lípidos mayoritarios. PI y los PIMs también están presentes en esta muestra, aunque en cantidades menores, y se observa acumulación de un lípido desconocido

(UPL1) que migra muy poco en la primera dimensión y su R_f está entre PI y DLCL en la segunda dimensión (Figura 6.1).

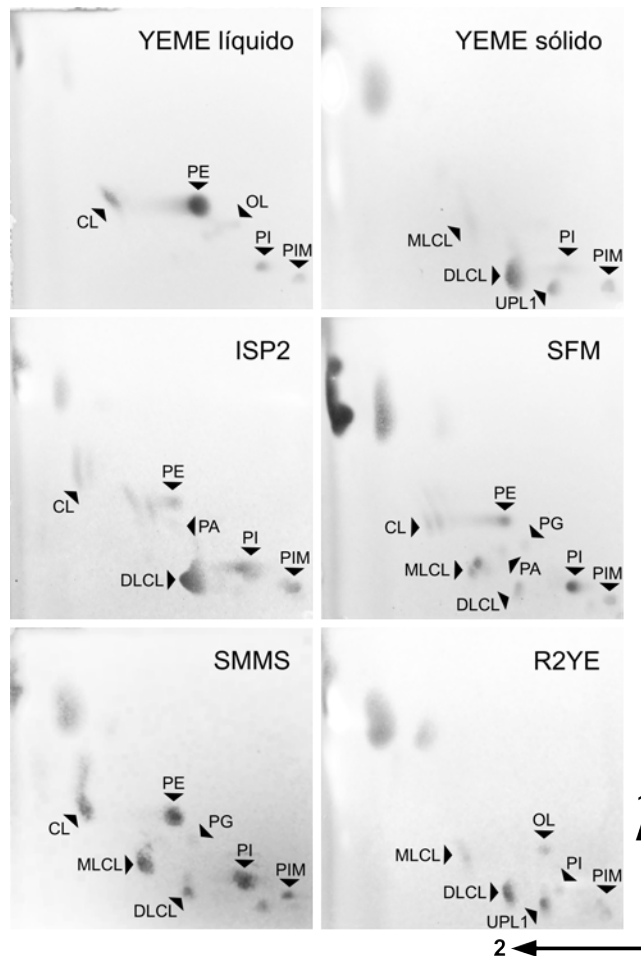


Figura 6.1 Plasticidad de la composición de lípidos de membrana en *S. coelicolor*.

Los extractos de lípidos de micelio vegetativo de *S. coelicolor* M145, cultivado en varios medios distintos, fueron analizados mediante cromatografía de capa fina. El micelio crecido en YEME líquido fue cosechado a mitad de la fase exponencial de crecimiento. El micelio vegetativo de los cultivos en los medios sólidos fue cosechado justo antes de la erección de las hifas aéreas, entre dos y cuatro días tras la inoculación (3 días para medio sólido YEME, 4 días para ISP2, 2 días para SFM, 2 días para SMMS, y 40 horas para R2YE). El desarrollo de la TLC fue realizado con el sistema 2, y los lípidos fueron teñidos con ANS. CL, cardiolipina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; MLCL, monoliso cardiolipina; DLCL, diliso cardiolipina; PI, fosfatidil-*mio*-inositol; PIM, manósidos de fosfatidilinositol; PA, ácido fosfatídico; OL, lípidos de ornitina; UPL1, fosfolípido desconocido. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

6.3.2 El perfil de lípidos polares de *S. coelicolor* es dependiente de la composición del medio de cultivo.

Además del medio YEME sólido, también se evaluó el perfil de lípidos mediante TLC en otros medios sólidos más comúnmente utilizados para el crecimiento de *S. coelicolor*: ISP2, SFM, SMMS y R2YE. Se observó gran diversidad en la composición de lípidos entre estos medios (Figura 6.1). El perfil de lípidos en SFM y SMMS fueron de los más balanceados, presentando CL, MLCL, DLCL, PE y PI en cantidades más parejas que las muestras del resto de medios utilizados en el experimento. La distribución de los lípidos en R2YE fue similar a la del YEME sólido, con altas concentraciones de DLCL y poca acumulación de PE y CL en contraste con el resto de cultivos. Una característica común al R2YE y el YEME sólido es la alta producción de prodigininas. Se intentó también la comparación con el perfil de lípidos de cultivos crecidos en medio mínimo, pero la producción de biomasa es tan limitada en esa condición, que resultó casi imposible obtener muestras de lípidos con la suficiente concentración como para ser analizadas mediante TLC.

Se evaluaron además dos puntos temporales en la toma de muestras de micelio vegetativo. El primero 24 horas después de la inoculación, y el segundo en tiempos variables, pero justo antes del inicio de la erección de hifas aéreas (Figura 6.2 A y B). Las muestras tempranas de ISP2 son más similares al perfil de SFM, como las cantidades relativas de PE y PI, pero las muestras tardías se parecen más a las de YEME sólido, con gran acumulación de DLCL y prodigininas. PG y PA se encontraron en varias muestras como lípidos minoritarios, pero aparecen en cantidades ligeramente mayores en micelio vegetativo temprano, sobre todo en SMMS y SFM.

Se había predicho que *S. coelicolor* era capaz de sintetizar OL (Sohlenkamp and Geiger, 2016), pero no existía evidencia experimental de su acumulación en esta especie. En las muestras de cultivos en R2YE y YEME se encontró un lípido en las placas de TLC con un R_f que corresponde a OL, y que de acuerdo a varias tinciones es un aminolípido sin fósforo, concordando con su identificación como un lípido de ornitina. Este lípido es abundante en las muestras de YEME líquido en fase estacionaria (Figura 6.2 A y B). Adicionalmente, datos de análisis de espectrometría de masas confirmaron la presencia de OL en varias muestras (Figura 6.3).

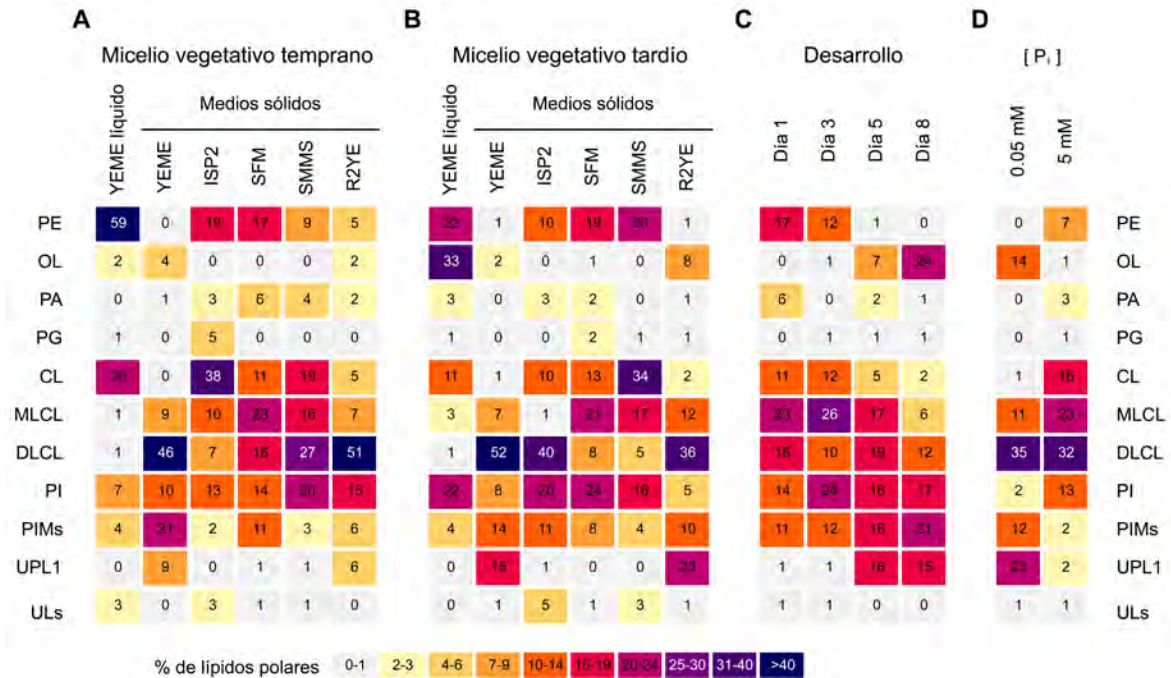


Figura 6.2 Mapa de calor de la composición de lípidos de *S. coelicolor*.

Los cultivos se crecieron en diferentes medios y las muestras se colectaron en diferentes tiempos tras la inoculación. Los extractos de lípidos del micelio fueron analizados mediante TLC. **(A)** Muestras de micelio vegetativo temprano, colectadas antes del inicio de la acumulación de prodigininas. El cultivo en YEME líquido fue cosechado a mitad de la fase exponencial. Los cultivos en los medios sólidos fueron cosechados pocos días tras la inoculación: 2 días en YEME y 1 día para ISP2, SFM, SMMS, y R2YE. **(B)** Muestras de micelio vegetativo tardío, cosechadas durante la fase estacionaria en YEME líquido, o justo antes de la erección de hifas aéreas en los cultivos en medios sólidos: 3 días en YEME, 4 días en ISP2, 48 horas en SFM y SMMS, y 40 horas en R2YE. **(C)** Composición a lo largo del desarrollo morfológico en medio SFM. Las muestras fueron tomadas 1, 3, 5 y 8 días tras la inoculación, correspondientes a micelio vegetativo, micelio produciendo hifas aéreas, micelio comenzando la esporulación, y micelio esporulando abundantemente, respectivamente. **(D)** Cultivos crecidos en medio R2YE con limitación (0.05 mM) y abundancia (5 mM) de fosfato inorgánico (P_i). Las muestras fueron colectadas 60 horas después de la inoculación. PE, fosfatidiletanolamina; OL, lípido de ornitina; PA, ácido fosfatídico; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; MLCL, monoliso cardiolipina; DLCL, diliso cardiolipina; PI, fosfatidil-*mio*-inositol; PIMs, manósidos de fosfatidilinositol; UPL1, fosfolípido desconocido; ULs, suma de varios lípidos no identificados. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

Además de los lípidos identificados, también se encontraron varias manchas de lípidos minoritarios acumulándose en algunas condiciones de crecimiento, a las que no se les pudo asignar una identidad. El más prominente, denominada UPL1 en la figura 6.1, y que migra cerca del origen, entre DLCL y PI, se acumula principalmente en los medios sólidos YEME y R2YE.

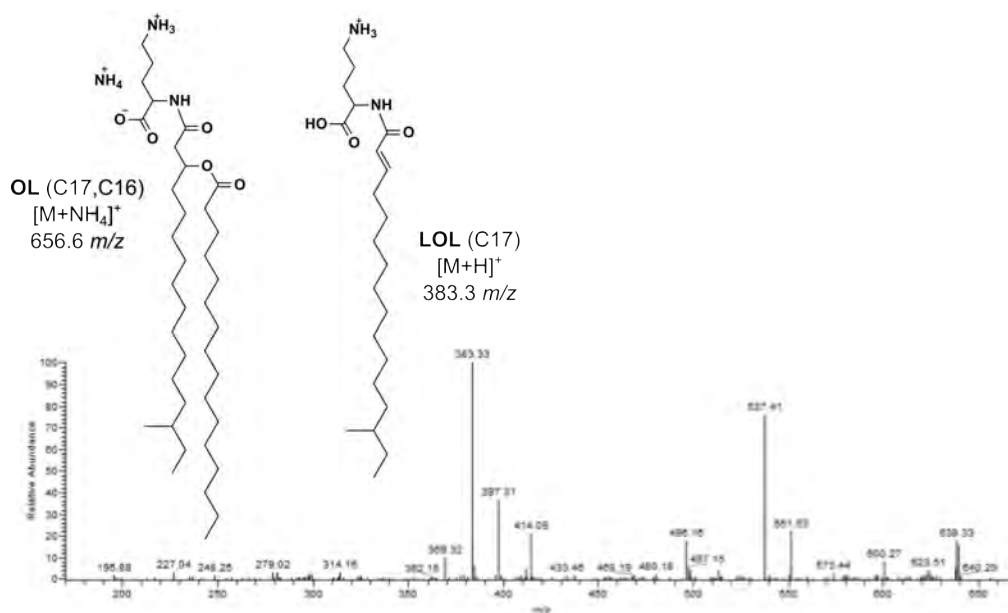


Figura 6.3 Espectro de MS/MS de uno de los OL identificados en muestras de *S. coelicolor*.

Se muestra el espectro de fragmentación de uno de los iones más abundantes en las muestras de *S. coelicolor* que fueron identificados como lípido de ornitina, el correspondiente a un OL con una cadena acilada de 17 carbonos y otra de 16 ($[M+NH_4]^+$, 656.6 m/z). El pico más abundante en la fragmentación es uno que corresponde al fragmento de LOL con la cadena acilada de 17 carbonos ($[M+H]^+$, 383.3 m/z).

Como complemento a los experimentos de cromatografía de capa fina, también se analizaron las muestras de lípidos mediante espectrometría de masas. Los datos fueron procesados usando la metodología de redes de fragmentación molecular para combinar la información de todas las muestras, junto con controles positivos y negativos. Los resultados de los análisis de MS confirman una gran diversidad en la composición de compuestos hidrofóbicos entre las muestras derivadas de cultivos crecidos en medios distintos (Figura 6.4). Se confirma también la presencia preferencial de PE en cultivos de YEME líquido, como las variantes de 664.5 m/z , que sólo se hallaron en estas condiciones, aunque otros iones, como el 678.5 m/z , sí se encontraron más ampliamente conservados.

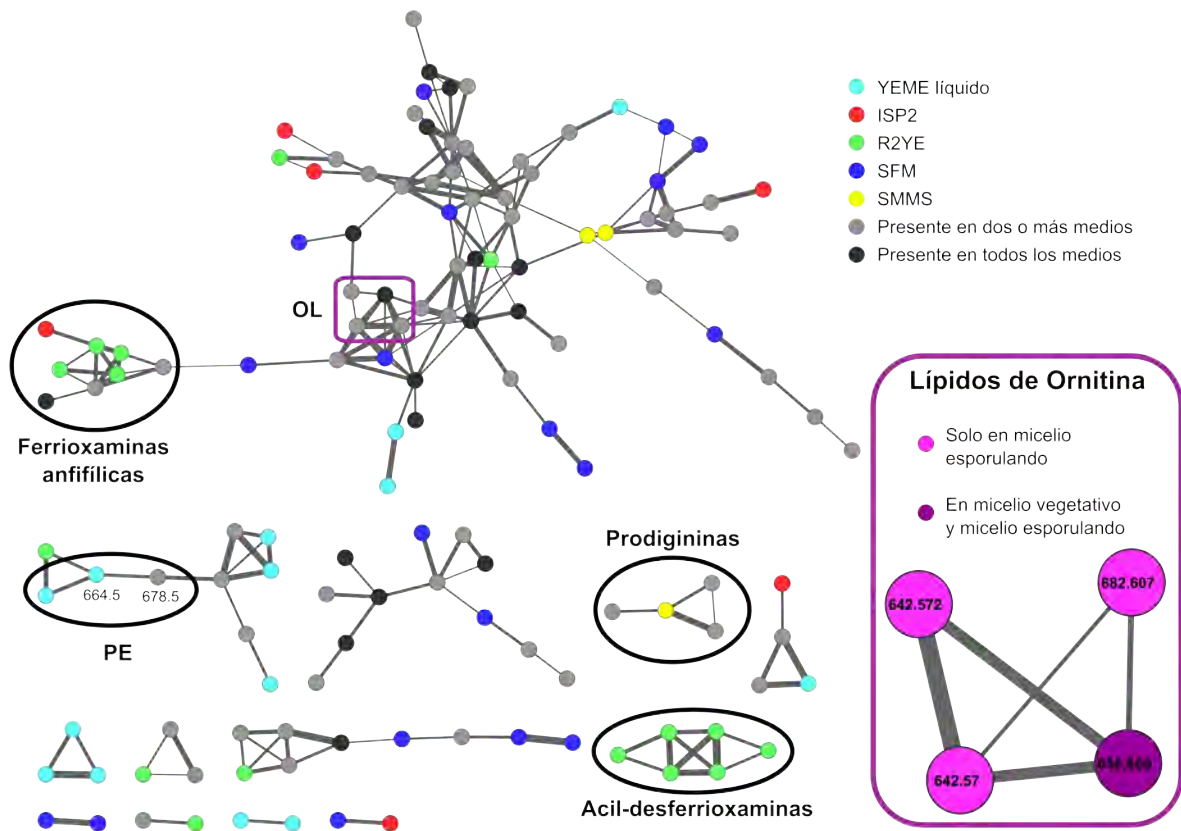


Figura 6.4 Red de fragmentación molecular de muestras de lípidos de *S. coelicolor*.

Los cultivos fueron crecidos en YEME líquido hasta mitad de la fase exponencial. Los cultivos en los medios sólidos R2YE y SMMS fueron cosechados durante el crecimiento vegetativo, y en los medios sólidos ISP2 y SFM a lo largo de las tres principales fases de crecimiento. No se incluyeron muestras de micelio aéreo o micelio esporulando crecidos en R2YE y SMMS, debido a que la alta cantidad de prodigininas y otros metabolitos secundarios que son producidos en estas condiciones opacan las señales de los lípidos polares. Cada nodo de la red representa un ion molecular presente en las muestras. El grosor de las aristas que unen a los nodos es proporcional al *score* de similitud entre los espectros de MS/MS de las moléculas a las que une. El color de los nodos representa los diferentes medios de cultivo de los que proceden las muestras donde se encontraron estos iones, o en el caso de la subred mostrada en el recuadro inferior, el tiempo durante el desarrollo durante el cual se encontró el compuesto particular. Varias subredes se destacan donde fue posible identificar a las moléculas representadas. La anotación se realizó usando las opciones de búsqueda en la biblioteca de compuestos de GNPS, y revisando manualmente los espectros de fragmentación para compararlos con los de estándares en la base de datos o con reportes de la literatura. PE, fosfatidiletanolamina; OL, lípido de ornitina. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

No fue posible identificar a la mayoría de los compuestos encontrados en las muestras, que abarcan un rango entre 200 y 1500 *m/z*. Sin embargo, algunos otros metabolitos identificados que presentaron variabilidad a través de los diferentes medios de cultivo fueron

las acil-desferrioxaminas, sideróforos anfífilicos con cadenas acilo de 10 a 14 carbonos (Traxler et al., 2013); y las prodigininas undecil-prodigiosina y estreptorubina B (Figuras 1.2 y 6.5).

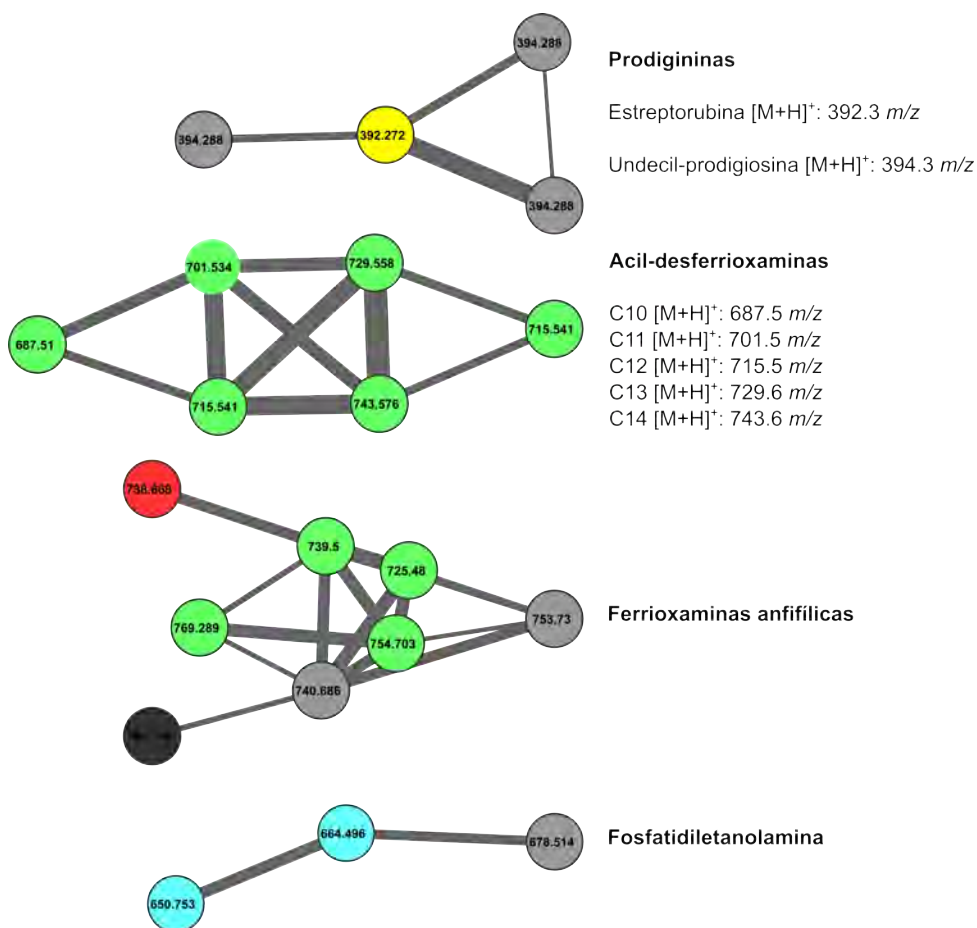


Figura 6.5 Subredes resaltadas de la red de fragmentación molecular de muestras de lípidos de *S. coelicolor*.

Se presentan detalladamente las subredes anotadas de la Figura 6.4. El color de los nodos representa los diferentes medios de cultivo de los que proceden las muestras donde se encontraron estas moléculas.

6.3.3 El contenido de PE y OL en la membrana es dependiente de la concentración de fosfato inorgánico en el medio

Como se ha descrito antes, varias especies de bacterias son capaces de sustituir algunos lípidos de membrana por lípidos sin fósforo en condiciones de limitación de fosfato en el medio. Para indagar si *S. coelicolor* también puede llevar a cabo procesos similares, se prepararon cultivos

de esta bacteria en medio sólido R2YE con diferentes concentraciones de fosfato añadido, 0.05 mM, 0.5 mM y 5 mM.

Durante crecimiento vegetativo en R2YE, con concentraciones de P_i de 0.05 mM y 0.5 mM, se acumula OL, como se había visto en la sección anterior, y PE se encuentra prácticamente ausente de las muestras. En contraste, al crecer a *S. coelicolor* en R2YE 5 mM P_i se observa acumulación de PE, pero no de OL (Figura 6.6). El perfil de lípidos en la condición de alto fosfato se asemeja más al perfil en los medios sólidos SMMS o SFM.

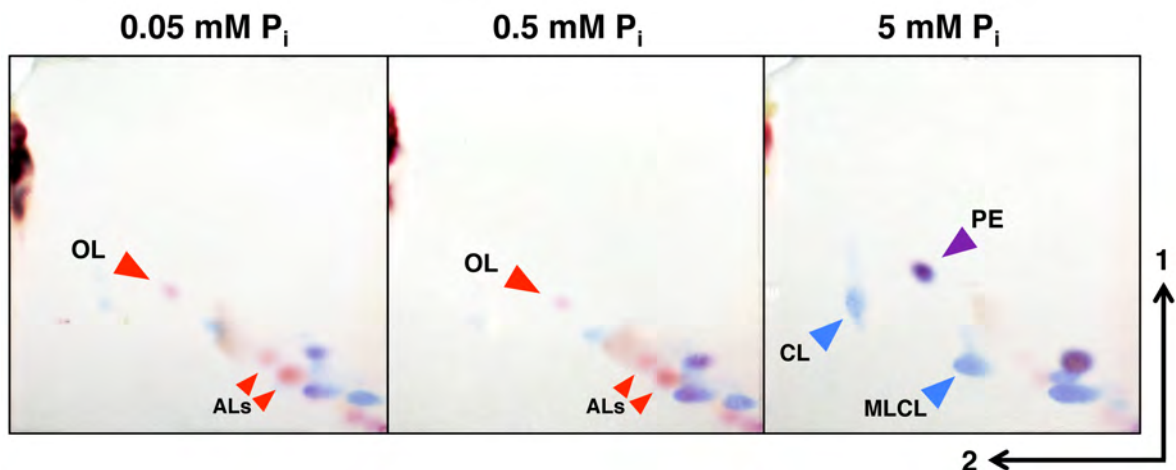


Figura 6.6 Perfil de lípidos de *S. coelicolor* en diferentes concentraciones de P_i .

Análisis de TLC de dos dimensiones de muestras de lípidos de cultivos de *S. coelicolor* M145 crecidos en R2YE con 0.05 mM, 0.5 mM o 5 mM de P_i añadido. Las muestras fueron cosechadas 60 horas después de la inoculación. Se utilizó el Sistema 1 para la separación mediante TLC. Se realizaron tinciones con ninhidrina para mostrar lípidos con grupos amino primario (manchas rojas, indicadas con puntas de flecha rojas). También se hicieron tinciones con Phospray para revelar fosfolípidos (manchas azules, indicadas con puntas de flecha azules). Imágenes de las dos tinciones fueron superpuestas para mostrar amino-fosfolípidos (manchas moradas, indicadas con puntas de flecha moradas). PE, fosfatidiletanolamina; OL, lípido de ornitina; CL, cardiolipina; MLCL, monoliso cardiolipina; ALs, aminolípidos sin identificar.

Además de la acumulación de OL en los medios con bajo fosfato, también se observa una mayor cantidad relativa de aminolípidos sin fósforo desconocidos en las condiciones con bajo y medio P_i , y una menor cantidad de fosfolípidos en estas muestras al compararlas con las derivadas del medio con alto fosfato.

6.3.4 La composición de la membrana es remodelada durante el desarrollo morfológico en *S. coelicolor*.

Se compararon muestras de lípidos provenientes de cultivos en distintos medios, cosechados en diferentes puntos durante el desarrollo morfológico: en micelio vegetativo, micelio produciendo hifas aéreas y micelio esporulando. Las técnicas usadas para el análisis de las muestras fueron TLC y MS. Los medios que fueron utilizados son R2YE, SMMS, ISP2 y SFM. Sin embargo, los resultados de cultivos tardíos de R2YE y SMMS mostraron una señal bastante reducida a causa de la saturación de las TLCs y de los espectros de masas con prodigininas y otros metabolitos secundarios, por lo cual se limitó el análisis a las muestras de SFM e ISP2.

Los resultados de los análisis de MS mediante redes de fragmentación molecular sugieren una acumulación preferencial de OL en muestras tardías de cultivos en SFM e ISP2 (Figura 6.4, recuadro inferior). El análisis mediante TLC de extractos de lípidos de cultivos crecidos en SFM muestra claramente la acumulación paulatina de OL conforme los cultivos avanzan en el desarrollo morfológico, y la concurrente disminución de PE hasta el punto en que PE está prácticamente ausente de las muestras (Figuras 6.2C y 6.7). Estos resultados fueron corroborados mediante la comparación de los espectros de masas de muestras de micelio vegetativo y micelio esporulando (Figura 6.8). En este análisis se observa que efectivamente hay acumulación de OL en la fase de esporulación durante el desarrollo de esta bacteria.

Otras diferencias observadas en las muestras crecidas en SFM fueron la disminución de CL y MLCL en las muestras tardías, la acumulación de los derivados manosilados de PI, y la acumulación de un fosfolípido desconocido que migra cerca del origen, con un R_f intermedio entre DLCL y PI (Figuras 6.2C y 6.7).

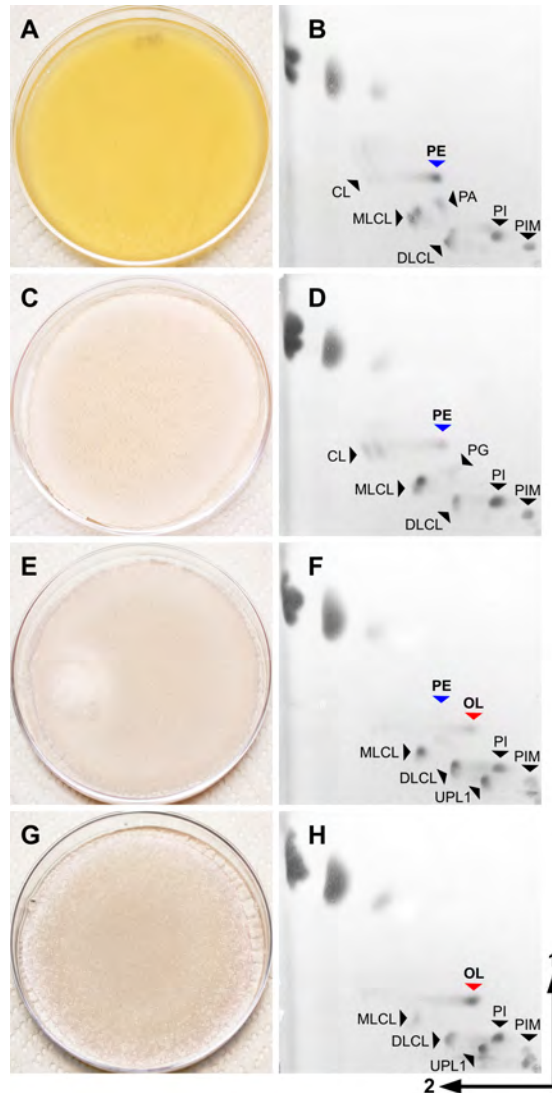


Figura 6.7 La composición de la membrana de *S. coelicolor* es modificada durante el desarrollo.

Todos los cultivos se crecieron en medio sólido SFM (A, C, E y G). Los perfiles de lípidos fueron analizados mediante TLC de dos dimensiones (B, D, F y H). La TLC fue realizada con el Sistema 2, y las capas finas fueron teñidas con ANS. (A, B) 1 día después de la inoculación, los cultivos se encontraban en fase vegetativa. (C, D) 3 días después de la inoculación comienza la erección de hifas aéreas. (E, F) 5 días tras la inoculación, los micelios comienzan la fase de esporulación. (G, H) 8 días después de la inoculación se observa abundante esporulación en la mayor parte de la superficie de la caja. PE, fosfatidiletanolamina; OL, lípido de ornitina; PA, ácido fosfatídico; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; MLCL, monoliso cardiolipina; DLCL, diliso cardiolipina; PI, fosfatidil-*mio*-inositol; PIM, manósidos de fosfatidilinositol; UPL1, fosfolípido desconocido. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

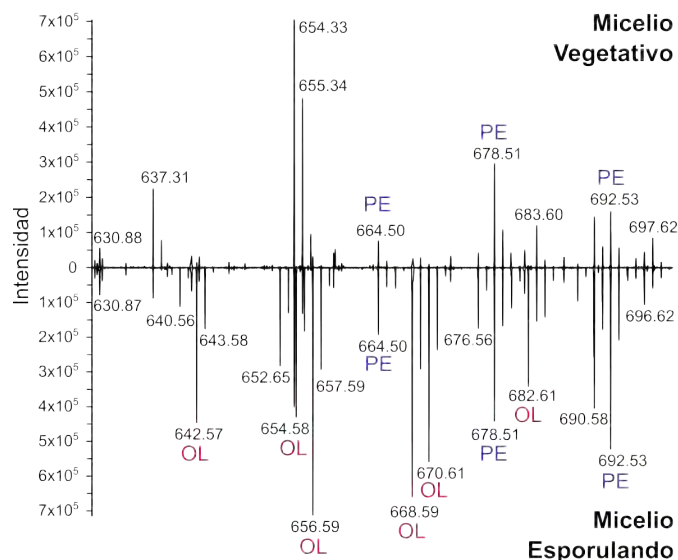


Figura 6.8 El análisis de MS muestra acumulación de OL en micelio en esporulación.

Los cultivos de *S. coelicolor* M145 fueron realizados en SFM y se tomaron muestras en dos diferentes tiempos tras la inoculación, antes de la erección de hifas aéreas (2 días) y después del comienzo de la esporulación (7 días). Se muestra el intervalo de 630-700 m/z donde se detectan los iones correspondientes a OL y PE. En el micelio vegetativo sólo se detectan iones correspondientes a PE (Parte superior de la gráfica). En el micelio esporulando se detectan iones de OL, adicionalmente a los iones de PE (Parte inferior de la gráfica). La identidad de los compuestos fue determinada por comparación de los espectros de MS/MS con los espectros de fragmentación de estándares o los reportados en la literatura (Vences-Guzmán et al., 2011). Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

6.3.5 La concentración de PE en la membrana está influenciada por el pH del medio de cultivo

Adicionalmente a la concentración de P_i en el medio R2YE, que es considerablemente menor que la contenida en otros medios de cultivo normalmente utilizados, otra diferencia de este medio con los otros utilizados es su pH ligeramente elevado (entre 7.5 y 8), debido a la adición de hidróxido de sodio al final de la preparación del medio. Para explorar si el pH del medio pudiera estar contribuyendo a la atípica composición de lípidos en las muestras obtenidas en estas condiciones de crecimiento, comparamos el perfil de lípidos de muestras en SMMS, un medio más definido, en pH 7.2 y pH 8.0.

En tiempos cortos de crecimiento, durante la fase de micelio vegetativo, observamos que las muestras crecidas en pH 8.0 no acumulan PE (Figura 6.9), a pesar de que en SMMS no se observó la desaparición de PE en etapas tardías de crecimiento, a diferencia de lo observado

en otros medios de cultivo como SFM o ISP2 (ver sección anterior). También en contraste con lo observado durante la esporulación en SFM o ISP2, no se observó la acumulación de OL ni alteraciones radicales en otros lípidos polares, lo que nos indica que la relación entre el pH y la acumulación de PE puede ser más específica que otras de las adaptaciones estudiadas.

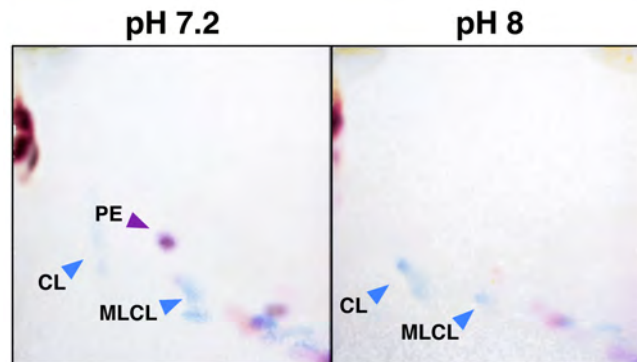


Figura 6.9 El pH elevado en SMMS inhibe la acumulación de PE en *S. coelicolor*.

TLC de dos dimensiones de extractos de lípidos de cultivos de *S. coelicolor* M145 cultivado en diferentes pH. Los cultivos de donde se tomaron las muestras fueron crecidos durante dos días en SMMS pH 7.2 o pH 8.0. La TLC fue desarrollada con el Sistema 1. Se realizaron tinciones con ninhidrina para mostrar lípidos con grupos amino primario (manchas rojas, indicadas con puntas de flecha rojas). También se hicieron tinciones con Phospray para revelar fosfolípidos (manchas azules, indicadas con puntas de flecha azules). Imágenes de las dos tinciones fueron superpuestas para mostrar amino-fosfolípidos (manchas moradas, indicadas con puntas de flecha moradas). PE, fosfatidiletanolamina; CL, cardiolipina; MLCL, monolisocardiolipina.

6.4 Conclusiones

En *S. coelicolor* observamos una gran plasticidad de la composición de la membrana, con prácticamente el reemplazo total de los lípidos polares al contrastar varias condiciones de crecimiento. Estos cambios parecen responder a una multitud de factores, desde el tipo de cultivo, si se realiza en suspensión o sobre un sustrato sólido; factores de estrés abiótico, como variaciones en el pH; y disponibilidad de nutrientes como el fosfato inorgánico. Además de las grandes variaciones encontradas en las muestras provenientes de diferentes medios de cultivo, también observamos remodelación de la composición de los lípidos polares dependiente de la fase del desarrollo en que se cosecharon las muestras, lo que nos indica además que diferentes momentos dentro del ciclo de vida de *S. coelicolor* pueden requerir de distintos componentes de la membrana.

7

Reconstrucción bioinformática de la síntesis de fosfolípidos de *Streptomyces coelicolor*

7.1 Introducción

A pesar de que *S. coelicolor* ha sido por décadas un modelo de estudio para genética y regulación del desarrollo en *Streptomyces*, y para la investigación acerca de la bioquímica de metabolismo secundario en actinobacterias, particularmente de policétidos y péptidos no ribosomales, hay relativamente muy poca investigación acerca de la síntesis de los componentes de la envoltura celular en esta especie bacteriana.

Sin embargo, aprovechando estrategias de genómica comparativa es posible profundizar en el conocimiento faltante de la bioquímica de fosfolípidos de esta bacteria. En *M. tuberculosis* se ha trabajado más en la investigación de las rutas biosintéticas de fosfolípidos, y a pesar de la distancia evolutiva, algunos componentes del metabolismo de lípidos en *Streptomyces* podrían estar conservados con bacterias de clados bastante más alejados, como *Bacillus subtilis* y algunas bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Sinorhizobium meliloti*.

7.2 Objetivos específicos

- Realizar la identificación en el genoma de *S. coelicolor* de homólogos de los genes conocidos en otras especies bacterianas que participan en la biosíntesis de fosfolípidos.
- Localizar pasos en las vías metabólicas sin genes asignados, y utilizar estrategias bioinformáticas, como conservación de contexto genómico, predicción de motivos y dominios estructurales en las proteínas, y perfiles filogenéticos, para proponer genes candidatos que puedan codificar para las enzimas faltantes.
- Comparar la reconstrucción bioinformática de *S. coelicolor* con otros genomas de actinomicetos.

7.3 Resultados

7.3.1 Reconstrucción de la biosíntesis de los intermediarios PA y CDP-DAG

En el genoma de *S. coelicolor* no existe ningún gen que codifique para un homólogo a la enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de PA, la glicerol-3P aciltransferasa, que sintetiza liso-PA. Como se describió en la sección 1.2.1, existen dos sistemas conocidos en otras bacterias que llevan a cabo este paso enzimático, PlsB y el sistema PlsX/PlsY, y en la mayoría de los actinomicetos no existen homólogos probables a ninguno de los genes codificantes para estas enzimas (Figura 7.1). Sólo en el clado al que pertenecen los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Gordonia* se encontraron homólogos a PlsB, mientras que homólogos a PlsX/PlsY sólo fueron hallados fuera de los *Actinomycetales*, en actinobacterias de los órdenes *Coriobacteriales* y *Rubrobacterales*.

Para localizar algún posible candidato que codifique a la enzima que cataliza esta reacción enzimática esencial, se identificó primero el homólogo al gen responsable del paso anterior en la vía de síntesis del PA (Figura 7.2). El gen *SCO5559* está predicho como codificante para la dihidroxiacetona fosfato reductasa (GpdA o GpsA), que sintetiza G3P a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). *SCO5559* es bastante similar (42% de identidad y 58% de similitud) a la GpdA de *B. subtilis* (Morbidoni et al., 1995), y a dos genes parálogos anotados

como *gpdA* en *M. tuberculosis* (43% de identidad con GpdA1 y 56% con GpdA2). Al lado de este gen en *S. coelicolor* se encuentra el gen *SCO5558*, y la proteína codificada por esta secuencia contiene un dominio de *O*-aciltransferasa. Este gen parece estar bastante conservado en muchos otros actinomicetos, y sus homólogos siempre se encuentran al lado de los homólogos a *gpsA* (Figura 7.3).

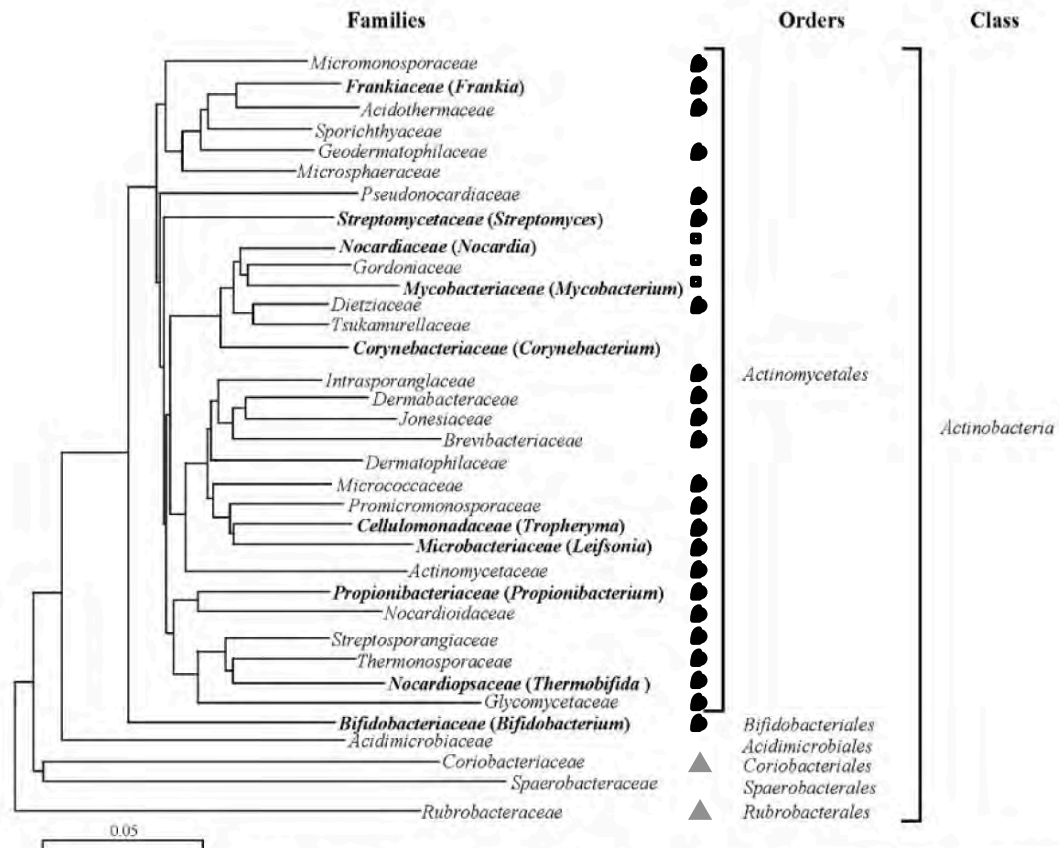


Figura 7.1 Conservación filogenética de homólogos a las diferentes proteínas que catalizan la primera acilación del G3P en actinobacterias.

Se muestra un árbol filogenético de las diferentes familias en la clase *Actinobacteria*. Las familias en las que se encontró al menos un homólogo a PlsB están indicadas con cuadrados abiertos. Aquellas familias donde hay homólogos al sistema PlsX/PlsY están marcados con triángulos grises. Las familias donde se encuentran homólogos al gen *SCO5558* están marcados con círculos negros. La filogenia fue adaptada de Ventura et al. (2007).

En consecuencia, se propone que el gen *SCO5558* codifica para la G3P aciltransferasa. Como evidencia adicional a favor de esta hipótesis, se puede observar una clara correlación inversa en la distribución filogenética de homólogos a *SCO5558* con respecto a la presencia de

homólogos a *plsB* o *plsX/plsY* en las actinobacterias (Figura 7.1). Esto quiere decir que los homólogos a *SCO5558* sólo se encuentran en especies que no poseen homólogos a los otros genes que llevan a cabo esta función. Esta enzima, de corroborarse su actividad, representaría una familia novedosa involucrada en la síntesis de liso-PA, pues *SCO5558* está más cercanamente emparentada con *PlsC* (30% idéntica a la *PlsC* de *B. subtilis*), y sólo existe un caso reportado de este tipo de enzima participando en esta reacción, la enzima *PlsD* de *Clostridium butyricum* (Heath et al., 1997).

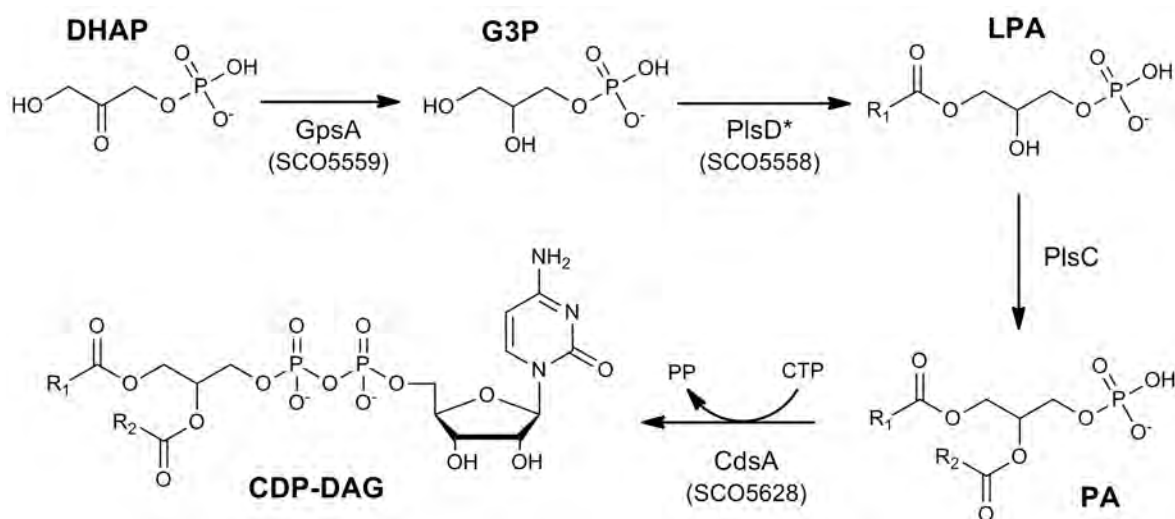


Figura 7.2 Biosíntesis propuesta de PA y CDP-DAG en *S. coelicolor*.

El homólogo más probable a la enzima DHAP reductasa, que sintetiza G3P (*GpsA*) es *SCO5559*. Se propone que *SCO5558* (*PlsD**) es responsable de la primera acilación de G3P para sintetizar LPA. Hay varios genes en el genoma de *S. coelicolor* homólogos a secuencias codificantes para la sintasa de PA (*PlsC*). El homólogo más cercano a la CDP-DAG sintasa (*CdsA*) es *SCO5628*. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, glicerol 3-fosfato; LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, difosfato de citidina-diacilglicerol.

El siguiente paso de la síntesis de PA es una segunda reacción de acilación al G3P para formar PA. Este paso está catalizado por la enzima *PlsC*. Existen cinco aciltransferasas similares a *PlsC* en *S. coelicolor*, *SCO1085*, *SCO1759*, *SCO2122*, *SCO1566* y *SCO1228*. Todos estos genes están bien conservados entre actinomicetos, pero *SCO2122* es el mejor conservado entre ellos.

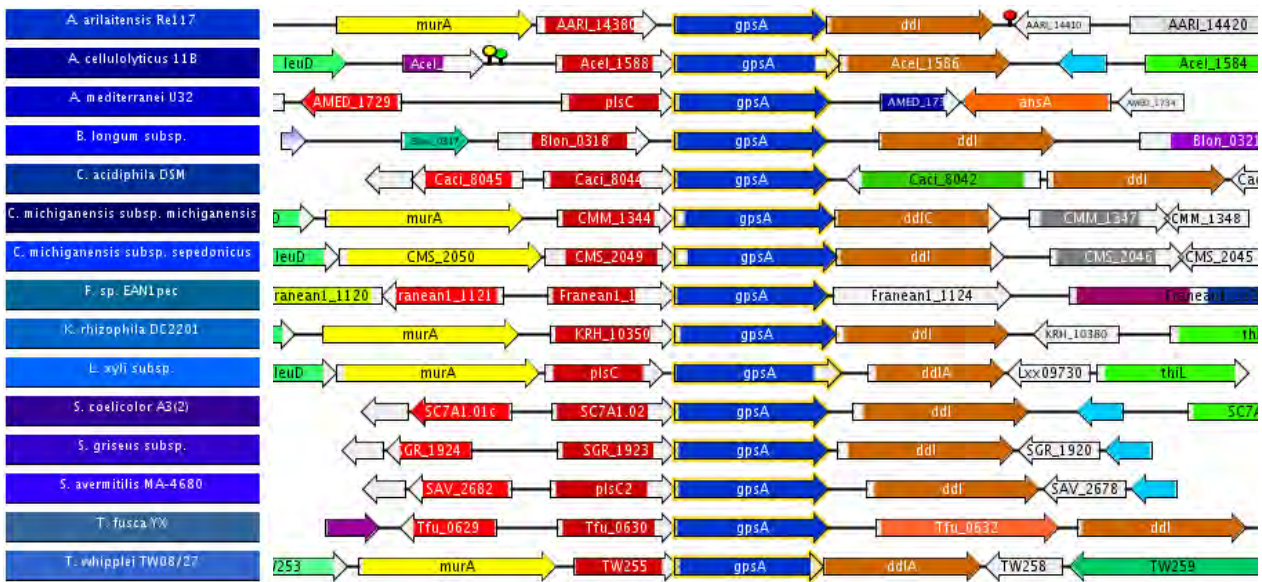


Figura 7.3 El contexto genómico del gen *gpsA* está conservado en muchos actinomicetos.

Las flechas azules corresponden a homólogos a *gpsA*, y las flechas rojas río arriba de este gen codifican para la aciltransferasa SCO5558 en *S. coelicolor* y sus homólogos en otros actinomicetos. Las especies incluidas en la comparación fueron *Arthrobacter arilaitensis*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Amycolatopsis mediterranei*, *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*, *Catenulispora acidiphila*, *Clavibacter michiganensis*, *Frankia* sp., *Kocuria rhizophila*, *Leifsonia xyli*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces avermitilis*, *Thermobifida fusca*, y *Tropheryma whipplei*. Este análisis de contexto genómico fue realizado con la herramienta Gene Context Tool III (<http://operons.ibt.unam.mx/gct3/>). Los genes están coloreados de acuerdo a su COG.

El siguiente paso en la síntesis de fosfolípidos es la producción de CDP-DAG, el intermediario a partir del cual divergen las vías de síntesis de los demás fosfolípidos. La síntesis de CDP-DAG se lleva a cabo por la enzima CdsA, y hay un homólogo claro al gen codificante para esta proteína en *S. coelicolor*, SCO5628 (Figura 7.2), que es 40 % idéntico en la secuencia traducida a proteína con CdsA de *E. coli*.

7.3.2 Genes predichos en las vías de biosíntesis de PG, CL, PS y PE

El homólogo a PgsA en *S. coelicolor*, que es la PGP sintasa, está codificado por el gen SCO5756 (Sandoval-Calderón et al., 2009), que es ortólogo del gen *pgsA3* de *M. tuberculosis*, del cual existe evidencia experimental de su participación en la síntesis de PG (Jackson et al., 2000). Por otro lado, no fue posible encontrar homólogos claros para la PGP fosfatasa en esta bacteria. La síntesis de CL en *S. coelicolor* fue ya discutida en las secciones 1.2.3 y 2.1.

Los genes predichos que participan en la síntesis de PE, *SCO6467* y *SCO6468* (Sandoval-Calderón et al., 2009), codificarían para PssA y Psd, respectivamente. Estos genes aparentemente se encuentran en un operón, y están ampliamente conservados en actinomicetos. Aunque no hay corroboración experimental de sus funciones, la evidencia bioinformática es suficientemente fuerte como para proponer su anotación de esta manera.

7.3.3 Predicción de los genes en la ruta biosintética de PI y PIMs

Otros lípidos característicos en *S. coelicolor* son PI y sus derivados manosilados. La síntesis de PI ha sido ampliamente estudiada en *Mycobacterium* (ver sección 1.2.4). El gen *pgsA1*, que codifica para la PIP sintasa en *M. tuberculosis* es un gen esencial (Jackson et al., 2000), y tiene un homólogo cercano en *S. coelicolor* (*SCO1527*) (Sandoval-Calderón et al., 2009), que además presenta una gran conservación del contexto genómico. Aparentemente formando parte del mismo operón, se encuentra el gen codificante para una probable glicosiltransferasa (*SCO1526*) homóloga a PimA de *M. tuberculosis*, la enzima encargada de catalizar la primera manosilación de PI en la posición 2 del inositol para producir PIM₁ (Korduláková et al., 2002). También adyacente se encuentra el gen codificante para una aciltransferasa (*SCO1525*) homóloga a la enzima (AcylIT) en *M. tuberculosis* que cataliza la transferencia de un residuo de palmitato a la posición 6 de ese residuo de manosa para sintetizar Ac-PIM₁ o Ac-PIM₂ (Korduláková et al., 2003) (Figura 7.3).

También se encuentra en el genoma de *S. coelicolor* un ortólogo (*SCO2132*) al gen que codifica para PimB', la enzima que en *M. smegmatis* cataliza la segunda transferencia de manosa para producir PIM₂ (Guerin et al., 2009). Aún no se conocen las enzimas encargadas de la síntesis de PIM₃ y PIM₄ en *Mycobacterium*, pero la enzima PimE, que sintetiza PIM₅ no tiene homólogos claros en *S. coelicolor*, lo que es consistente con la ausencia aparente de PIM₅ y PIM₆ en este organismo.

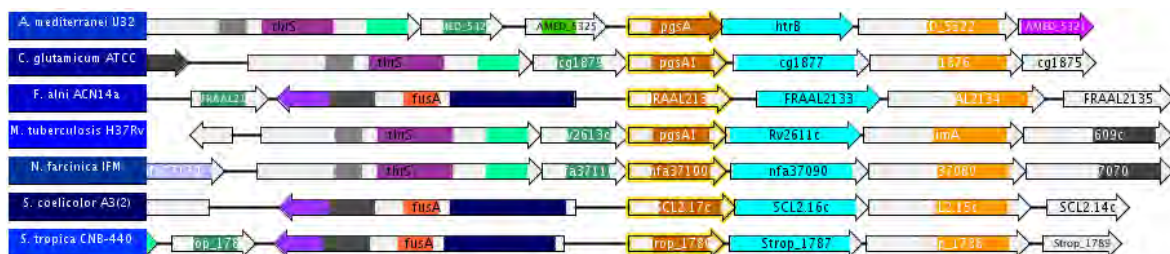


Figura 7.3 El operón probablemente encargado de la síntesis de PI y derivados está conservado en actinomicetos.

El primer gen del operón putativo está anotado como pgsA1 (en color café), pero es en realidad el que codifica para la PIP sintasa (PisA); el segundo gen (flecha color turquesa) es homólogo a la manosiltransferasa PimA; el tercer gen (flecha gris con naranja) codifica para una aciltransferasa homóloga a AcylT. Las especies representadas son *Amycolatopsis mediterranei*, *Corynebacterium glutamicum*, *Frankia alni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia farcinica*, *S. coelicolor*, y *Salinispora tropica*. Este análisis de contexto genómico fue realizado con la herramienta Gene Context Tool III (<http://operons.ibt.unam.mx/gct3/>). Los genes están coloreados de acuerdo a su COG.

7.4 Conclusiones

A pesar del amplio conocimiento que se tiene del metabolismo secundario de *S. coelicolor* y de muchos otros actinomicetos, aún quedan varios pasos centrales por descubrir en las vías de síntesis de moléculas esenciales del metabolismo primario. Resaltamos que para la gran mayoría de los actinomicetos no se conoce cuál gen está codificando para la enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los glicerofosfolípidos, pero mediante la convergencia de varias herramientas bioinformáticas logramos proponer un gen candidato, que representaría una familia de enzimas novedosa, y que está ampliamente conservado en la mayoría de las bacterias de este clado.

8

Síntesis y posibles funciones de los lípidos de ornitina en *Streptomyces coelicolor*

8.1 Introducción

Habiendo corroborado experimentalmente la presencia de OL en *S. coelicolor*, surge la necesidad de explorar la ruta de biosíntesis de este compuesto, que no se ha estudiado en ningún otro actinomiceto. Además, OL parece ser de los compuestos más variables en la membrana de *Streptomyces*, y podría tener algún papel en la respuesta a la limitación de fosfato inorgánico en el medio y en etapas tardías del desarrollo morfológico, puesto que son condiciones donde estos lípidos sin fósforo se acumulan preferencialmente.

8.2 Objetivos específicos

- Identificar los genes responsables de la síntesis de OL en *S. coelicolor*.
- Corroborar experimentalmente la función de estos genes mediante la construcción de cepas mutantes.
- Estudiar el fenotipo de estas cepas mutantes para ampliar la comprensión de la función de los lípidos de ornitina en *S. coelicolor*.

8.3 Resultados

8.3.1 *SCO0921-SCO0920* son homólogos a *olsB-olsA*

Como se describió en la sección 1.2.5, la síntesis de OL ha sido bien caracterizada en varios clados de bacterias Gram-negativas. Se encontró un gen codificante para una proteína hipotética en *S. coelicolor* (*SCO0921*) con un dominio de *N*-aciltransferasa y con considerable similitud a *OlsB* de *Sinorhizobium meliloti* (35% de identidad, 42% de similitud y 82% de cobertura). Río abajo de este gen, en un operón aparente se encuentra una *O*-aciltransferasa, enzima de la misma familia que *OlsA* (33% de identidad, 44% de similitud y 81% de cobertura) y que podría catalizar la segunda reacción de acilación para sintetizar OL. El arreglo de estos dos genes se encuentra ampliamente conservado en otras actinobacterias (Figura 8.1).

Como evidencia adicional del posible papel de estos genes en la síntesis de OL, estos genes se han encontrado sobre expresados en *S. coelicolor* en condiciones de limitación de P_i (Martín et al., 2012).

8.3.2 *SCO0921* es necesaria para la síntesis de OL

Se construyó una mutante en el gen *SCO0921* mediante el reemplazo de la copia silvestre de este gen con una versión interrumpida con el transposón *Tn5062*, como se describe en la sección de métodos. Si en efecto *SCO0921* y *SCO0920* se encuentran en el mismo operón, esta mutante por inserción debería además tener abatida la expresión del gen *SCO0920*.

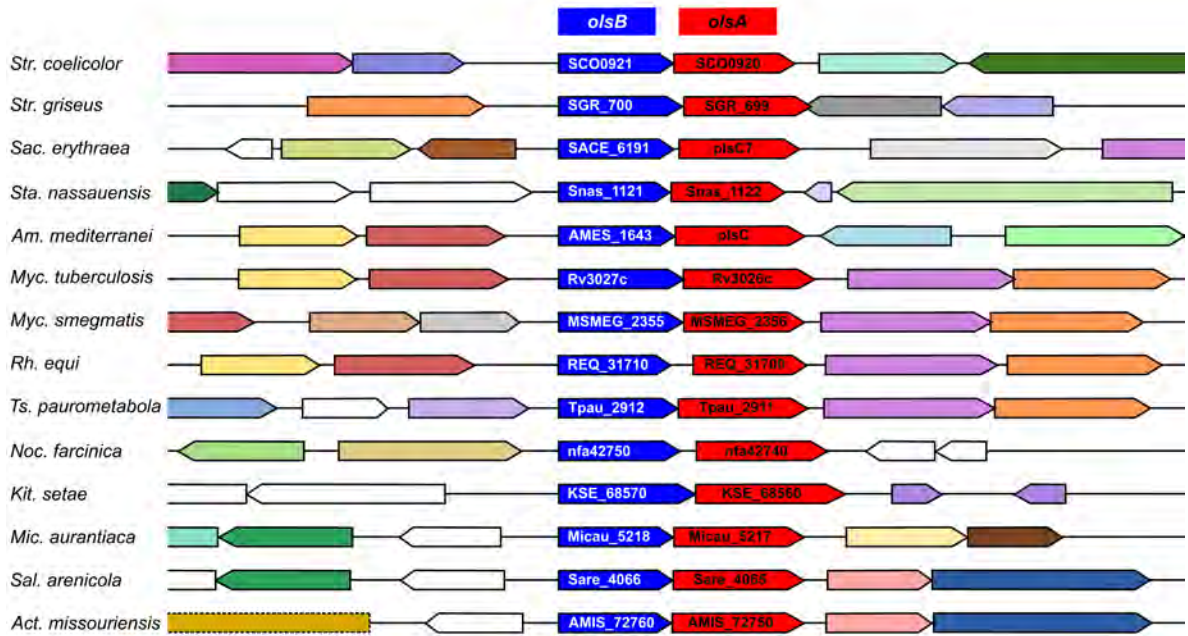


Figura 8.1 El operón putativo *olsB-olsA* está altamente conservado en actinomicetos.

Homólogos a *SCO0921* están resaltados en azul. Homólogos a *SCO0920* están resaltados en rojo. Los organismos comparados son *S. coelicolor* A3(2), *S. griseus* NBRC13350, *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338, *Stackebrandtia nassauensis* DSM44728, *Amycolatopsis mediterranei* S699, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium smegmatis* MC2155, *Rhodococcus equi* 103S, *Tsukamurella paurometabola* DSM20162, *Nocardia farcinica* IFM10152, *Kitasatospora setae* KM-6054, *Micromonospora aurantiaca* ATCC27029, *Salinispora arenicola* CNS-205, *Actinoplanes missouriensis* 431. Este análisis de contexto genómico fue realizado con la herramienta Gene Context Tool III (<http://operons.ibt.unam.mx/gct3/>). Los genes están coloreados de acuerdo a su COG. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

Como se esperaba, la cepa mutante es incapaz de producir OL, pero el resto del perfil de lípidos es similar entre la mutante y la cepa silvestre (Figura 8.2). A la cepa mutante se le integró el operón completo *SCO0921-SCO0920*, incluyendo 200 pares de bases de la región río arriba de *SCO0921*, para ser expresado en *trans*, y la cepa resultante mostró complementación de la acumulación de OL. Por los resultados anteriores, se renombraron estos dos genes como *olsB* y *olsA*.

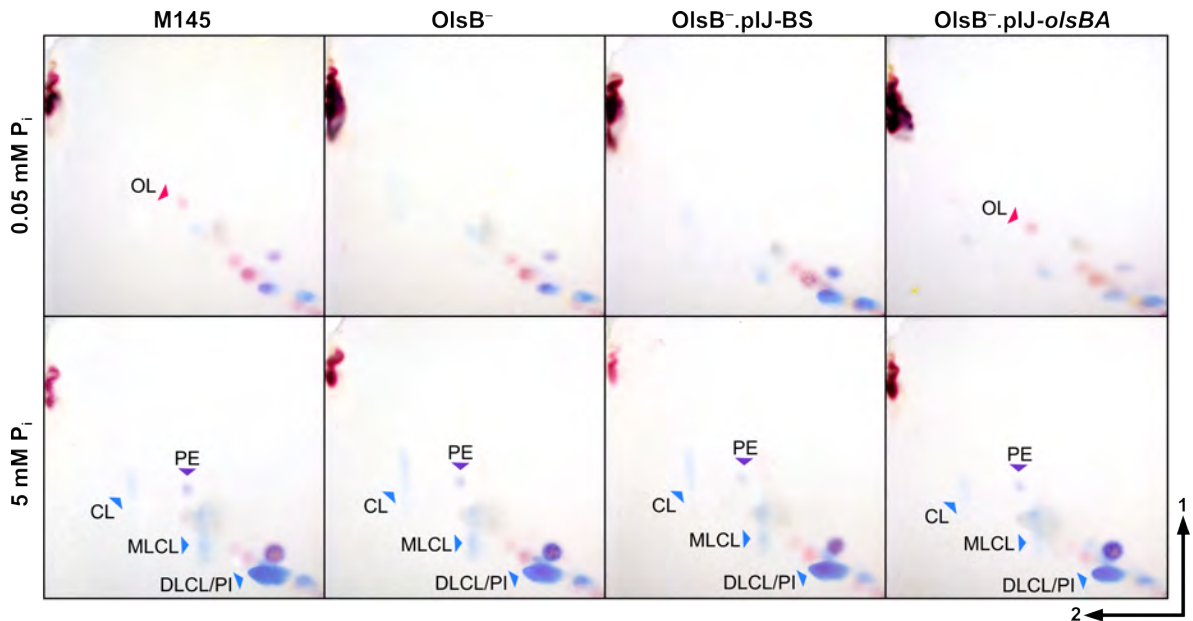


Figura 8.2 La mutante *olsB*⁻ es deficiente en la producción de OL.

TLCs de dos dimensiones de extractos de lípidos de diferentes cepas de *S. coelicolor*. Los paneles superiores corresponden a los perfiles de lípidos de cepas crecidas en limitación de fosfato (0.05 mM P_i), y los inferiores corresponden a muestras provenientes de medio con alto fosfato (5 mM P_i). Las cepas comparadas son la cepa silvestre (M145), la mutante en *SCO0921* (*olsB*⁻), la mutante con el vector vacío (*olsB*⁻.pIJ-BS), y la mutante complementada con el operón *SCO0921-SCO0920* en *trans* (*olsB*⁻.pIJ-*olsBA*). Las TLC fueron desarrolladas con el Sistema 1. Se realizaron tinciones con ninhidrina para mostrar lípidos con grupos amino primario (manchas rojas, indicadas con puntas de flecha rojas). También se hicieron tinciones con Phospray para revelar fosfolípidos (manchas azules, indicadas con puntas de flecha azules). Imágenes de las dos tinciones fueron superpuestas para mostrar amino-fosfolípidos (manchas moradas, indicadas con puntas de flecha moradas). OL, lípido de ornitina; PE, fosfatidiletanolamina; CL, cardiolipina; MLCL, monolisocardiolipina; DLCL, dilisocardiolipina; PI, fosfatidilinositol. Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

8.3.3 La mutante *olsB*⁻ presenta desarrollo morfológico y producción de actinorrodina acelerados

Además del fenotipo en la composición de lípidos, se exploraron otras características de la mutante *olsB*⁻. Esta cepa presenta una producción precoz del pigmento azul actinorrodina al crecerla en medio R2YE en condiciones de limitación de P_i, y mantiene una mayor producción de este metabolito secundario a lo largo del desarrollo (Figura 8.3A). No hay una gran diferencia aparente entre la mutante y la cepa silvestre en R2YE con altas concentraciones de P_i (Figura 8.3B).

La mutante *olsB*⁻ también muestra una aceleración del desarrollo morfológico en medio sólido R2YE, comenzando la erección de hifas aéreas y la esporulación antes que en la cepa M145. Esta diferencia fenotípica se observa tanto en los medios con alto y bajo P_i, aunque es más pronunciada en limitación de fósforo (Figura 8.3 A y B). Este fenotipo es complementado en la cepa mutante portadora del operón *olsBA*.

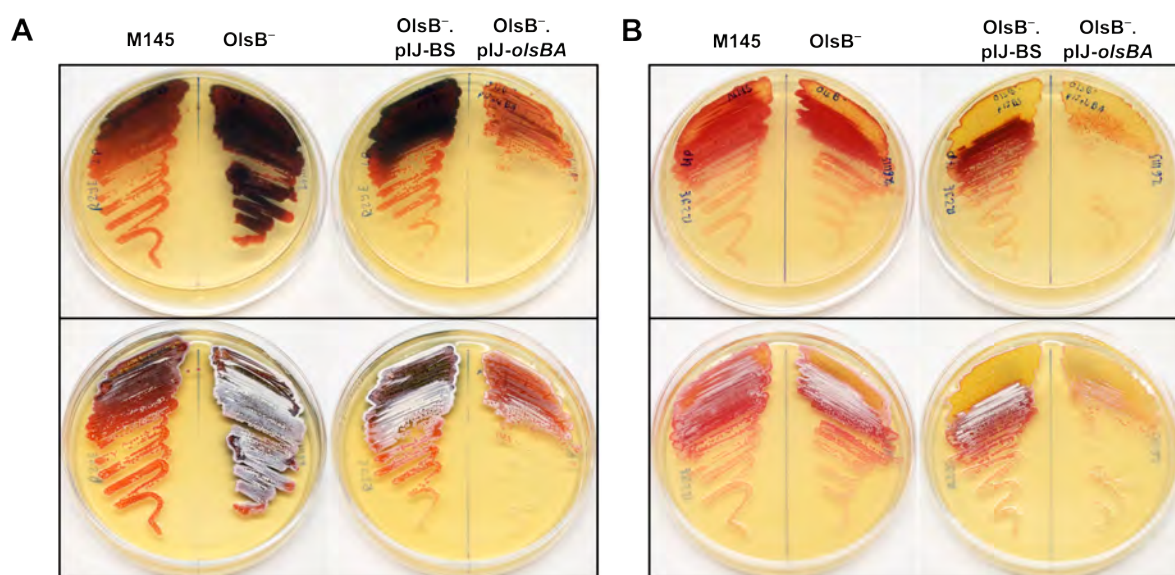


Figura 8.3 Desarrollo morfológico y metabólico de la mutante *olsB*⁻.

(A y B) Cajas con cultivos de las cepas M145, *olsB*⁻, *olsB*⁻.pIJ-BS, y *olsB*⁻.pIJ-*olsBA*, crecidas en medio sólido R2YE con 0.05 mM P_i (A) o 5 mM P_i (B). En la fila superior de (A) y (B), se presentan fotografías de la parte inferior de las cajas para mostrar la producción de actinorrodina (visible como el pigmento azul oscuro), mientras que en la fila inferior se observan fotografías desde arriba de las cajas, para mostrar el inicio de la erección de las hifas aéreas (la parte blanca sobre el micelio vegetativo de color rojo). Imagen adaptada de Sandoval-Calderón et al. (2015) (Anexo 1).

8.4 Conclusiones

Identificamos exitosamente los genes que participan en la síntesis de OL en *S. coelicolor*, y homólogos a estos genes están ampliamente distribuidos en otras actinobacterias. Además de corroborar que *SCO0921* es necesario para la producción de OL, descubrimos que la mutante en este gen presenta un desarrollo metabólico y morfológico anormal, mostrando producción precoz de actinorrodina y adelantando también el proceso de diferenciación. Estos efectos podrían ser consecuencia de una dificultad para responder a condiciones limitantes de fósforo en el medio de cultivo, pero también podrían indicar papeles adicionales de los lípidos de

ornitina en varios procesos celulares de *Streptomyces*. La verificación experimental de la función de *olsA*, y de la regulación transcripcional del operón putativo *olsB-olsA* aún está pendiente.

Búsqueda de los genes responsables de la biosíntesis de MLCL y DLCL

9.1 Introducción

En *S. coelicolor*, CL y sus derivados, monoliso-cardiolipina (MLCL) y diliso-cardiolipina (DLCL), pueden llegar a conformar más del 50% de todos los fosfolípidos (Figura 6.2). Esta concentración elevada de CL es una característica conservada en bacterias del mismo género (Batrakov and Bergelson, 1978; Hoischen et al., 1997) que contrasta con otros modelos bacterianos estudiados, pues en la mayoría de los procariontes la cardiolipina no se encuentra en porcentajes por encima de 15% (Nishijima et al., 1988; Kawai et al., 2004). Como se mencionó previamente, la síntesis de CL es esencial para el apropiado desarrollo de *S. coelicolor* (Jyothikumar et al., 2012) y este resultado podría deberse también a la incapacidad de sintetizar MLCL y DLCL si estas moléculas son derivados metabólicos de la CL.

Dado que la acumulación de MLCL y DLCL parece estar conservada en diferentes especies de *Streptomyces* (Hoischen et al., 1997) – aunque no en otros actinomicetos como *Corynebacterium glutamicum* (Özcan et al., 2007) – es posible que exista algún requerimiento funcional para la presencia de este par de derivados de la cardiolipina.

En bacterias no se ha descrito ninguna fosfolipasa específica de cardiolipina, aunque existe una enzima con esta actividad reportada en *Saccharomyces cerevisiae*, codificada por el gen *CLDI*, la cual participa en el proceso de remodelación de los ácidos grasos de la CL (Beranek et al., 2009).

Por los motivos expuestos, nos planteamos investigar la síntesis de estas moléculas en bacterias del género *Streptomyces*, comenzando por la identificación del gen o los genes que codifican a las enzimas encargadas de la producción de MLCL y DLCL.

9.2 Objetivo específico

- Identificar a los genes codificantes de las enzimas responsables de la acumulación de MLCL y DLCL en la membrana de *S. coelicolor*.

9.3 Resultados

9.3.1 Evaluación de un sistema para la expresión heteróloga de lipasas específicas de CL

El gen *CLDI* de *S. cerevisiae* se clonó en el plásmido pET17b y la cepa *E. coli* BL21 (DE3).pLysS fue transformada con esta construcción. Se realizó el análisis de los lípidos de la cepa de *E. coli* que expresa a Cld1p mediante TLC y los resultados muestran disminución de la mancha que corresponde a la CL y la aparición de nuevas manchas cerca del origen, lo que indica que son lípidos más polares (Figura 9.1).

Estos resultados fueron complementados mediante análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de muestras de lípidos sin marcar, para confirmar la presencia de MLCL y/o DLCL. Los resultados de MS indican que en la cepa que expresa al gen *CLDI* hay un aumento en el contenido de algunas clases de ácidos grasos, una disminución en la cantidad de PG y, principalmente, confirman la presencia de MLCL (Figura 9.2B) y DLCL (Figura 9.2D). Adicionalmente, se puede observar la aparición de un nuevo compuesto con una masa mayor que CL, y que puede ionizarse con una carga de -3, al cual se denominó super-CL (SCL) (Figura 9.2F). Estos resultados nos indican que *E. coli* es un buen sistema para la expresión de la actividad que estamos buscando – una fosfolipasa específica de CL –.

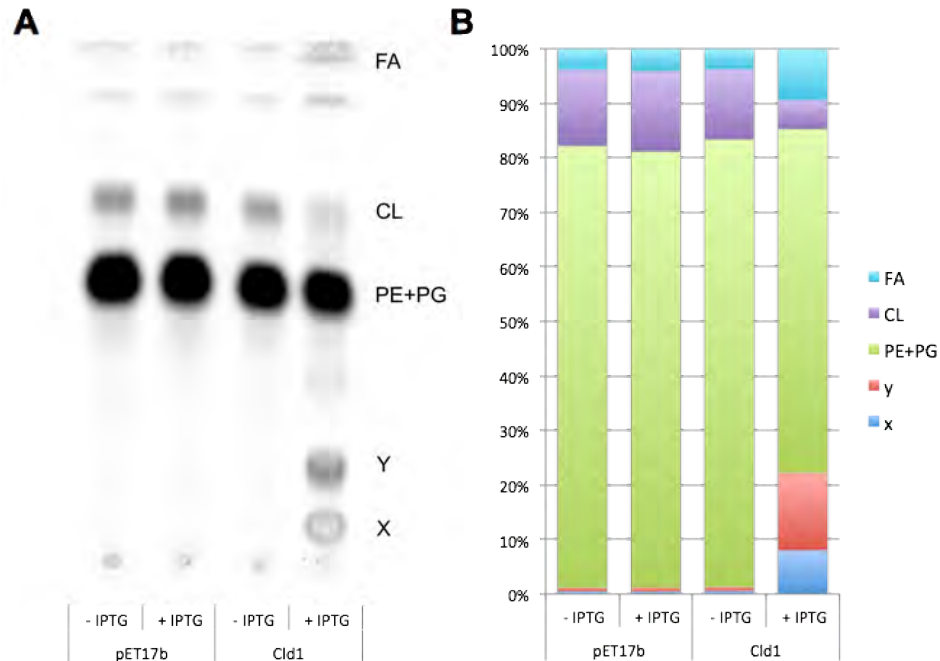


Figura 9.1 La expresión de *CLD1* en *E. coli* provoca la acumulación de nuevos lípidos.

(A) TLC de una dimensión de muestras de lípidos marcados con $[^{14}\text{C}]$, donde se comparan la cepa que porta el plásmido vacío con la cepa que porta el gen *CLD1* clonado en pET17b, en cultivos con y sin IPTG. La TLC fue realizada con los solventes de la segunda dimensión del Sistema 1. (B) Cuantificación de los lípidos mostrados en (A), realizada con el software ImageQuant.

9.3.2 Identificación de posibles fosfolipasas en el genoma de *S. coelicolor*

Se realizó una búsqueda de similitud de secuencia (BLAST, PSI-BLAST) tomando como punto de partida las secuencias de aminoácidos de diversas fosfolipasas conocidas, y se eligieron los mejores resultados de estas búsquedas. De manera paralela, se realizó la identificación de dominios característicos de acil hidrolasas (dominios de alfa/beta hidrolasas, lipasas y carboxilesterasas) en todas las secuencias de proteínas que se encuentran codificadas en el genoma de *S. coelicolor*. La búsqueda se llevó a cabo mediante el programa HMMER, que usa modelos ocultos de Markov para identificar dominios conservados (Mistry et al., 2013). Los modelos de los dominios se obtuvieron de la base de datos de Pfam (Bateman et al., 2004).

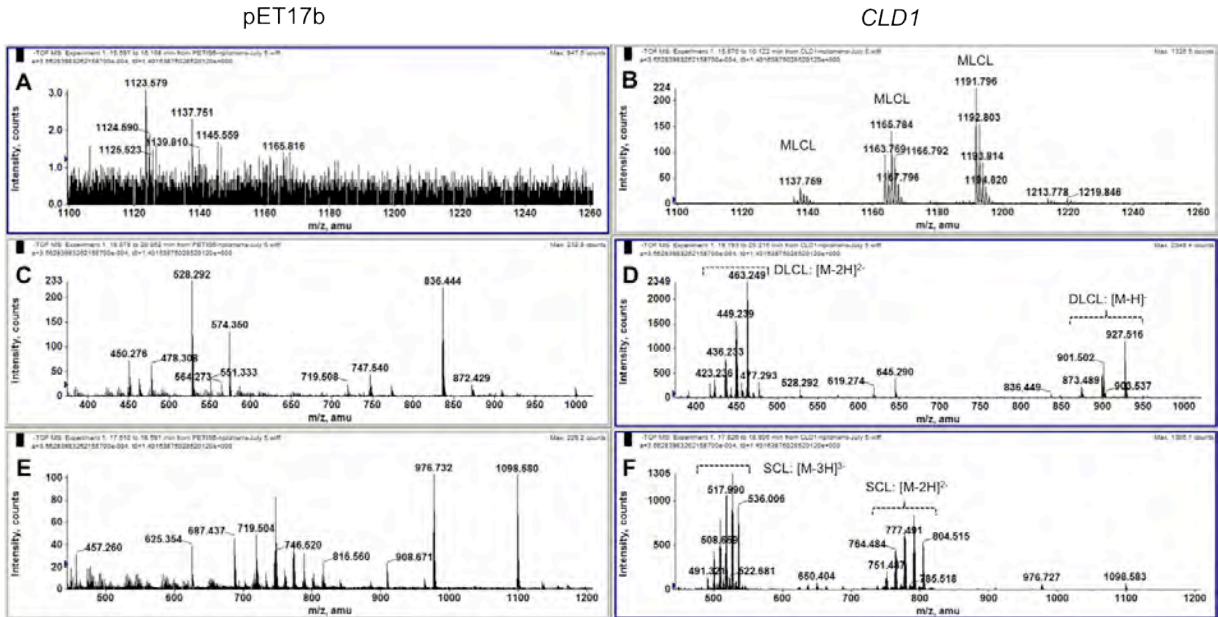


Figura 9.2 La expresión de *CLD1* causa la acumulación de MLCL, DLCL y SCL en *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en LB líquido a 30 °C. Se añadió 0.1 mM de IPTG al llegar a una OD_{620 nm} de 0.4 y se cosecharon las muestras dos horas después. Los extractos de lípidos fueron analizados mediante espectrometría de masas en modo negativo. En (A), (C) y (E) se muestran los espectros correspondientes a la cepa que porta al plásmido vacío, en (B), (D) y (F) se muestran los correspondientes a la cepa donde se indujo la expresión del gen *CLD1*. Las especies moleculares monoliso cardiolipina (MLCL), diliso cardiolipina (DLCL) y super cardiolipina (SCL) se encuentran únicamente en la cepa que expresa a *CLD1*.

En el resto de los genomas de actinobacterias se buscaron marcos abiertos de lectura (ORFs) homólogos a cada uno de los elementos de esta primer lista de secuencias y, con base en sus perfiles filogenéticos, se redujo la amplitud de la lista de candidatos. Finalmente, se revisó cada uno de los candidatos de manera manual para evaluar otras evidencias, como la conservación de sitios catalíticos o del contexto genómico, que pudieran servir para discriminar entre todos a los más prometedores. Se construyeron dos listas de genes candidatos, con diferentes puntos de corte en los parámetros contemplados durante la búsqueda, principalmente los criterios de conservación en otros actinomicetos.

Tabla 9.1 Genes candidatos obtenidos mediante la búsqueda bioinformática de posibles fosfolipasas en el genoma de *S. coelicolor*.

Gen	Dominio Pfam	Notas
SCO1253	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	Similar a <i>lipC</i> de <i>Bacillus subtilis</i> . Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , conservado en actinomicetos
SCO2123	Alpha/beta hydrolase 1	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> y algunos otros actinomicetos
SCO2886	Alpha/beta hydrolase 1	Relacionado de manera distante a <i>cld1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
SCO3644	Alpha/beta hydrolase 3	Conservado entre las actinobacterias
SCP4298	Carboxylesterase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> y actinomicetos
SCO4746	Alpha/beta hydrolase 1	Posible hélice transmembranal. Altamente conservado en actinobacterias
SCO5165	Alpha/beta hydrolase 1	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> y algunos otros actinomicetos
SCO5322	Patatin	Homólogos en muchos otros actinomicetos, sin homólogos en <i>Corynebacterium</i>
SCO6127	Carboxylesterase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> y actinomicetos
SCO6966	Putative lysophospholipase	Homólogos cercanos en <i>Streptomyces</i> y otros actinomicetos, posibles homólogos en algunos <i>Corynebacterium</i>
SCO7131	Alpha/beta hydrolase 3	Conservado entre las actinobacterias

Tabla 9.2. Genes candidatos obtenidos mediante la búsqueda bioinformática de posibles fosfolipasas en el genoma de *S. coelicolor*. Criterios relajados.

Gen	Dominio Pfam	Notas
SCO1175	Esterase/lipase	Conservación modesta en <i>Streptomyces</i> y actinomicetos
SCO1228	Acyltransferase	Altamente conservado en actinomicetos

SCO1264	Hydrolase/ acyltransferase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación modesta en el resto de actinomicetos
SCO1566	Acyltransferase	Altamente conservado en actinomicetos
SCO1735	Secreted lipase	Altamente conservado en actinomicetos
SCO1759	Acyltransferase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , buena conservación en actinomicetos
SCO1881	Esterase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación modesta en el resto de actinomicetos
SCO2392	Lipoprotein/ esterase/ lipase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO2622	Acyltransferase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , ausente de la mayoría de otros actinomicetos
SCO2892	Esterase/lipase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO2961	Acyltransferase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación en el resto de actinomicetos restringida a clados cercanos
SCO3078	Esterase/lipase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , buena conservación en actinomicetos
SCO3171	Hydrolase/ acyltransferase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , buena conservación en actinomicetos
SCO3305	Acyltransferase	Conservación modesta en <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO3325	Acyltransferase	Altamente conservado en actinomicetos
SCO3642	Acyltransferase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación modesta en el resto de actinomicetos
SCO4368	Lipase / phospholipase	Buena conservación en algunos <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO4392	Hydrolase/ acyltransferase	Pobrementemente conservado
SCO4555	Acyltransferase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO4799	Lipase/ acyltransferase	Buena conservación en <i>Streptomyces</i> , conservación pobre en el resto de actinomicetos
SCO5067	carboxylesterase	Conservación modesta en actinomicetos

<i>SCO5172</i>	Hydrolase/ acyltransferase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , conservación modesta en el resto de actinomicetos
<i>SCO5215</i>	Esterase/lipase	Altamente conservado en <i>Streptomyces</i> , conservación modesta en el resto de actinomicetos
<i>SCO6774</i>	Esterase/lipase	Altamente conservado en actinomicetos

9.3.3 Expresión heteróloga de lipasas putativas

Tras la expresión de la primer lista de once genes candidatos en *E. coli* Rosetta 2, sólo se observaron diferencias en el perfil de lípidos de la cepa que expresa a *SCO2886*, donde parece haber un aumento en el contenido de CL y una disminución de PG. El experimento se repitió tres veces para verificar que estos cambios sean consistentes y significativos (Figura 9.3).

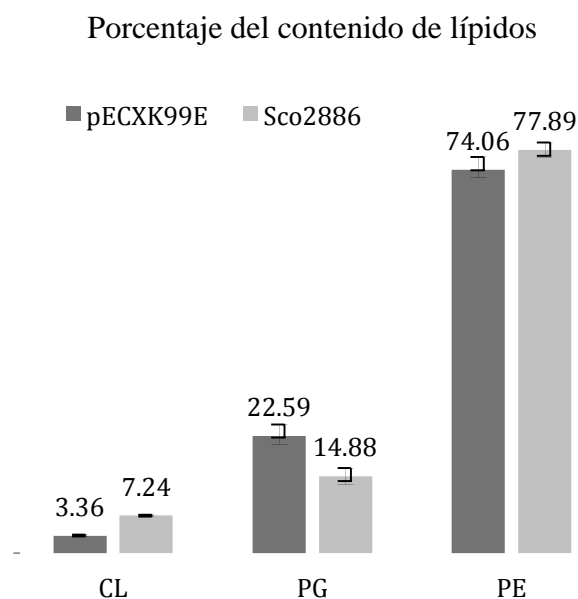


Figura 9.3 Composición de lípidos de *E. coli* expresando al gen *SCO2886*.

Cuantificación de extractos de lípidos marcados con $[^{14}\text{C}]$ de la cepa de *E. coli* que expresa al gen *SCO2886*, en comparación con la cepa que porta el plásmido vacío (pECXK99E). La cuantificación de los lípidos fue realizada con el software ImageQuant, a partir de una TLC desarrollada con los solventes de la segunda dimensión del Sistema 1. CL, cardiolipina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina.

Se realizaron tres réplicas de la expresión en *E. coli* Rosetta 2 de la segunda lista de genes candidatos y se observaron algunas de diferencias en la composición de los fosfolípidos de

varias de las cepas (Figura 9.4), como el aumento de la cantidad de cardiolipina en las que expresan a los genes *SCO1566*, *SCO1759* y *SCO2961*, o el incremento en la cantidad de ácidos grasos en las que expresan a los genes *SCO2392* y *SCO6774*. Sin embargo, no fue posible identificar si la expresión de alguno de estos genes provoca la acumulación de MLCL o DLCL en *E. coli*.

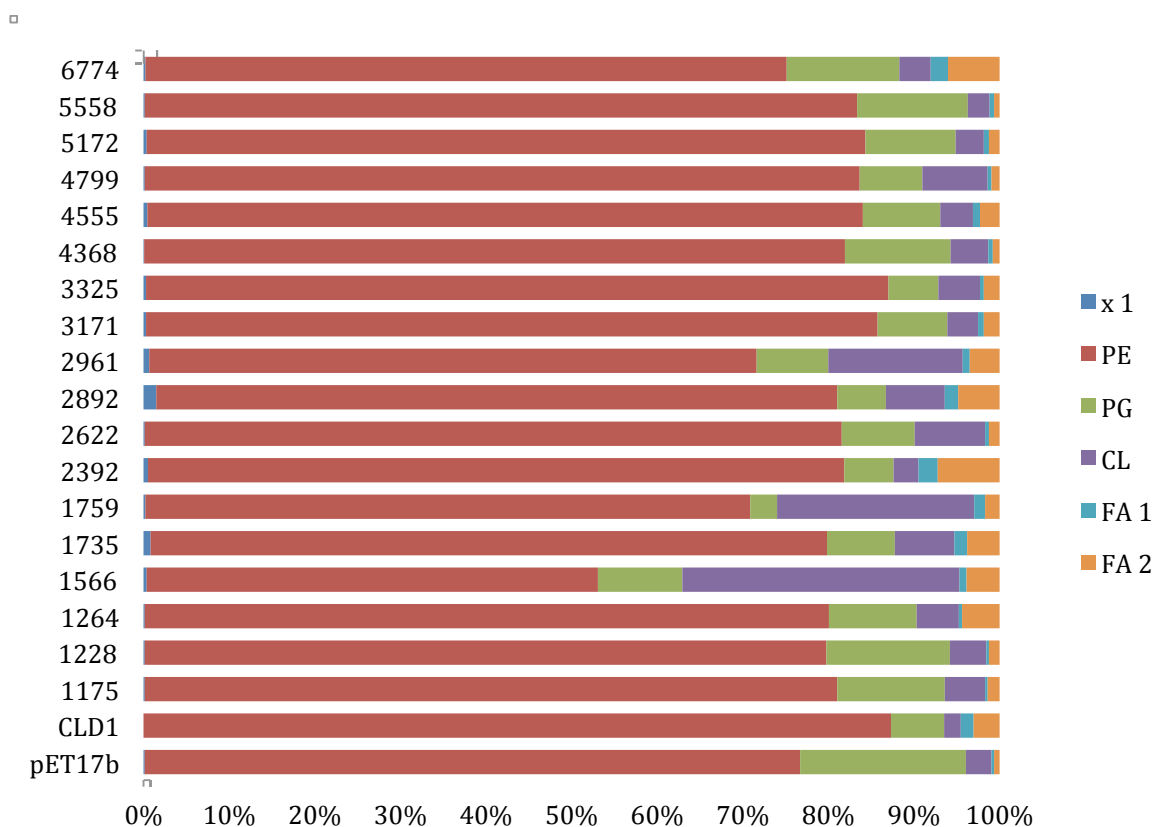


Figura 9.4 Porcentaje de diferentes lípidos en las cepas de *E. coli* que expresan los genes candidatos de *S. coelicolor*.

Se comparan diferentes cepas que expresan los respectivos genes de *S. coelicolor*, clonados en el vector pET17b, incluyendo a la cepa con el vector vacío como comparación. La cuantificación de los lípidos fue realizada con el software ImageQuant, a partir de TLCs desarrollada con los solventes de la segunda dimensión del Sistema 1. X1 es un lípido sin identificar; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; FA1 y FA2, ácidos grasos.

9.3.4 Mutagénesis de genes candidatos

Cabe la posibilidad de que los resultados negativos de los experimentos de expresión heteróloga de los candidatos se deban a que nuestros sistemas de expresión no hayan sido los

adecuados. Para descartar la posibilidad anterior, se construyeron las mutantes por inserción de algunos de los genes candidatos (*SCO1253*, *SCO2123*, *SCO2886*, *SCO4298*, *SCO4746*, *SCO5322*) con base en los últimos pasos de la estrategia descrita por Gust *et al.* (2003) y utilizando cósmidos que portan una inserción del transposón Tn5062 dentro de la secuencia de cada uno de nuestros genes de interés.

Se realizó la confirmación de las mutaciones de las cepas *SCO1253::Tn5062* y *SCO2123::Tn5062* mediante la amplificación por PCR de un fragmento de DNA con un oligonucleótido que es específico para una región interna del transposón insertado (resultados no mostrados). No fue posible confirmar la inserción del transposón en el gen *SCO2886* utilizando este método, así que utilizamos la técnica de *Southern blot*. El DNA genómico de la cepa silvestre y tres posibles mutantes fue digerido con la enzima de restricción *Bgl*III, y se utilizó una sonda de DNA complementaria a una región río abajo del gen *SCO2886*. Los resultados del *Southern blot* (Figura 9.5) son consistentes con lo esperado, que era un fragmento de 4613 pares de bases (pb) en la cepa silvestre, y un fragmento de 8055 pb en la cepa que porta el transposón Tn5062 insertado en el gen. A esta cepa mutante se le denominó MSC01.

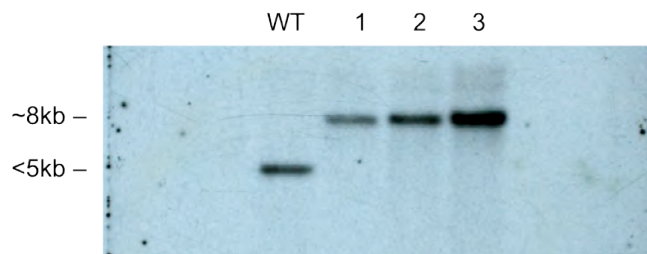


Figura 9.5 Southern blot de tres candidatos a mutantes insercionales de *SCO2886*.

Se muestran candidatos a mutantes (líneas 1, 2 y 3), en comparación con la cepa silvestre (WT). A la izquierda se indica el tamaño inferido de las bandas.

9.3.5 Fenotipos de la mutante MSC01

La mutante con el gen *SCO2886* interrumpido presenta un desarrollo morfológico anormal, comenzando la producción del pigmento gris característico de las esporas hasta dos días antes que la cepa silvestre (Figura 9.6). Sin embargo, a pesar de que la esporulación parece comenzar con anticipación en la cepa MSC01, la cantidad de unidades formadoras de colonia

de preparaciones de esporas de muestras tomadas a diferentes tiempos durante el cultivo en SFM no alcanzan los niveles que en la cepa silvestre (Figura 9.6).

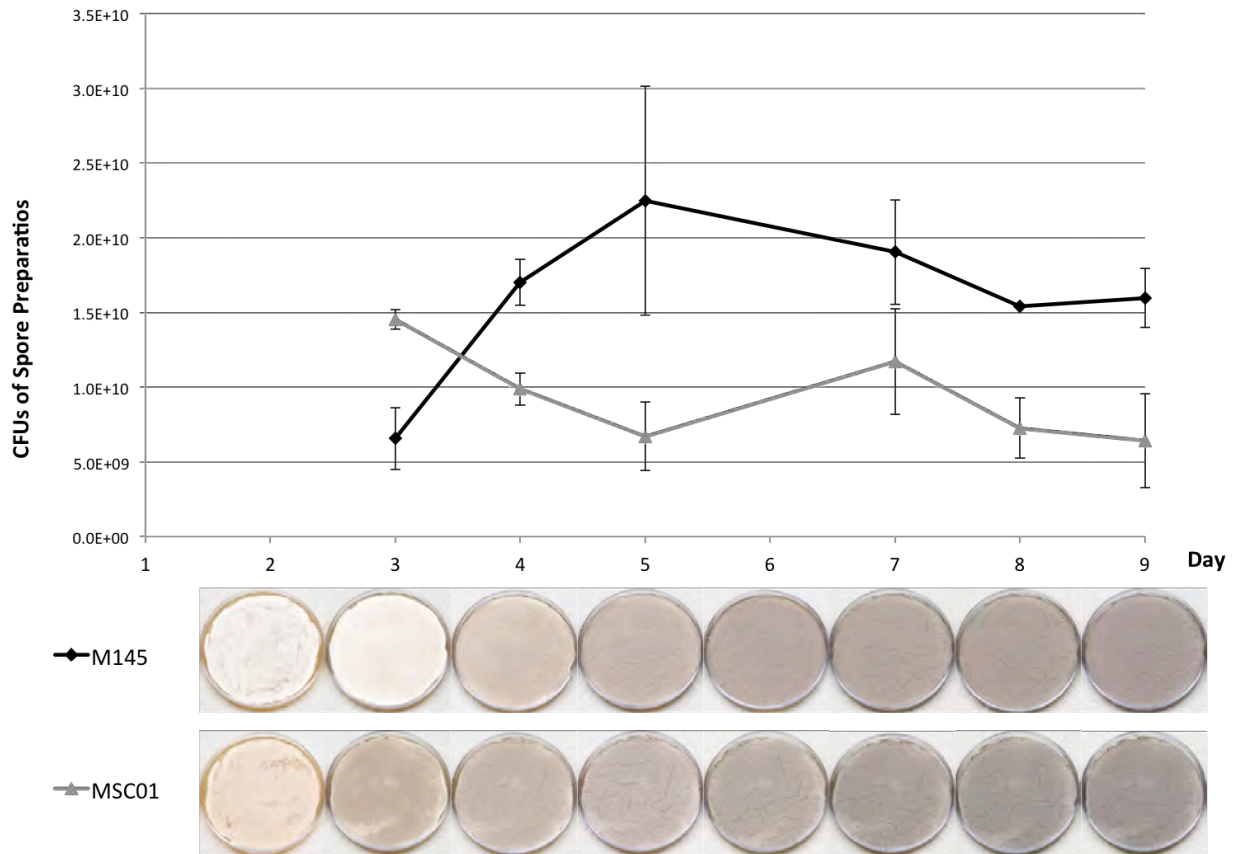


Figura 9.6 La mutante MSC01 presenta esporulación precoz pero menor rendimiento en la producción de esporas viables.

En la gráfica se indica la cuantificación de unidades formadoras de colonias a partir de preparaciones de esporas tomadas a diferentes intervalos tras la inoculación de cultivos en SFM. Debajo de la gráfica, se observan fotos de las cajas de cultivo en los tiempos correspondientes y la progresión en la producción de esporas.

Por otro lado, el perfil de lípidos de esta mutante no presentó diferencias radicales con respecto a la cepa silvestre, sólo una mayor cantidad de PE en ciertos tiempos tras la inoculación de cultivos en medio sólido (Figura 9.7).

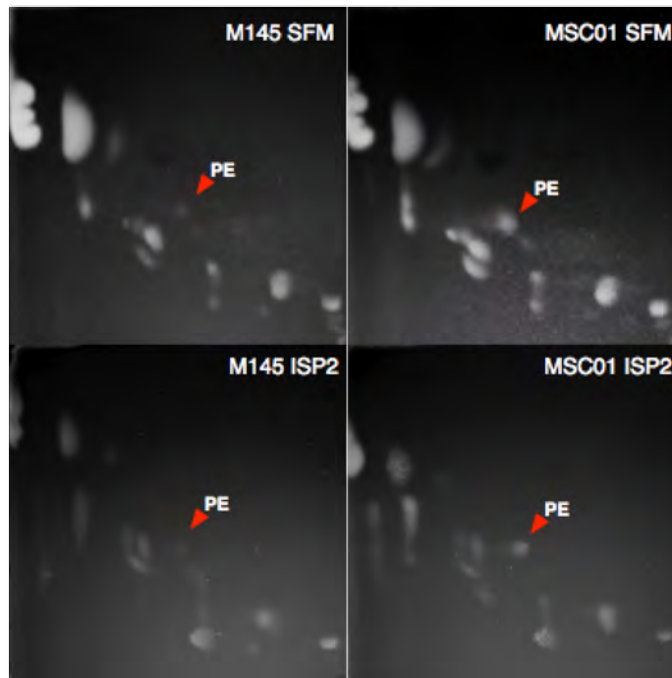


Figura 9.7 La mutante MSC01 acumula más PE en algunas condiciones.

En los paneles superiores se observan los perfiles de lípidos de cultivos en SFM cosechados al inicio de la esporulación (cuatro días después de la inoculación). En los inferiores se observan cultivos tras 30 horas en ISP2. En ambos casos, el perfil de la mutante (derecha) presenta una mancha que corresponde a PE, de mayor intensidad que en el control (izquierda). Las TLC fueron desarrolladas con el Sistema 2 y teñidas con ANS.

9.4 Conclusiones

Ninguno de los genes candidatos parece estar involucrado en la síntesis de MLCL o de DLCL, pues la expresión heteróloga de éstos en *E. coli* no mostró evidencia de acumulación de estos compuestos, ni las mutantes generadas perdieron la capacidad de producir MLCL o DLCL. Sin embargo, se identificó una lipasa putativa (SCO2886) que podría estar involucrada en el metabolismo de fosfolípidos, pues su expresión en *E. coli* altera el perfil de lípidos de membrana, y la mutante deficiente en este gen acumula más PE que la silvestre. Aún más interesante resulta el fenotipo de esta mutante en la diferenciación morfológica, puesto que el programa de desarrollo parece estar alterado, con esporulación precoz, pero deficiente. Los datos anteriores nos sugieren que esta enzima podría estar participando en la remodelación de las membranas de *S. coelicolor* durante el desarrollo.

10

Discusión General y Perspectivas

10.1 Discusión

La composición lipídica de las membranas bacterianas ha sido históricamente utilizada como parte de la descripción y clasificación de nuevas especies y linajes bacterianos (Shaw, 1974; Lechevalier et al., 1977; Tindall et al., 2010; Zhang et al., 2011). Esto está basado en la suposición de que organismos relacionados deberían de tener perfiles de lípidos similares, pues las actividades del metabolismo central estarían compartidas. El problema de esta aproximación es que el perfil de lípidos tendría que mantenerse estable en diversas condiciones de crecimiento, lo cual claramente no va a ser el caso para una gran cantidad de organismos, pues las membranas juegan en realidad un papel bastante activo en el metabolismo y la fisiología celular. Se ha visto que en muchos organismos hay varios procesos de remodelación de este compartimento celular, y *S. coelicolor* es un ejemplo radical dentro de este grupo.

Hay varias posibles explicaciones para la gran diversidad de perfiles lipídicos presentados por esta bacteria. Lo más obvio es la diferencia en contenido nutricional de varios medios, que impondrá restricciones a la tasa de crecimiento en unos medios más que en otros, lo cual

podría requerir diferentes características fisicoquímicas de la membrana. Adicionalmente, el carecer de algunos sustratos esenciales en ciertas condiciones de crecimiento también obligaría a suplir algunos lípidos por otros que impongan una menor demanda nutricional, como producir lípidos sin fósforo en vez de fosfolípidos cuando este elemento es escaso. Otra posible razón para algunas diferencias podría ser el estrés mecánico provocado al forzar el crecimiento disperso en un medio líquido de esta bacteria cuyo hábitat son los sustratos sólidos o semi-sólidos, y que puede requerir de características especiales en la membrana al forzarse la fragmentación continua del micelio. Varios tipos de estrés ambiental también pueden estar afectando el perfil de lípidos, con variaciones en el pH y la osmolaridad entre varios medios de cultivos utilizados.

Algunas otras características del metabolismo de este organismo podrían estar jugando un papel relevante en la remodelación de la membrana. En fase estacionaria, *S. coelicolor* suele producir una amplia gama de metabolitos secundarios, como las prodigininas y la actinorrodina. Las prodigininas en particular se acumulan en cantidades abrumadoras, tanto que en varios análisis inhibían las señales de los lípidos de membrana y dificultaban el procesamiento de las muestras. Las prodigininas son muy hidrofóbicas, tanto que se extraen junto con los lípidos de membrana en nuestros experimentos y se quedan asociadas al micelio en vez de difundirse al medio. Estas moléculas, que tienen muchas propiedades citotóxicas (Stankovic et al., 2014), podrían estar imponiendo estreses en la membrana que requieren un reajuste de la composición de la envoltura celular.

S. coelicolor es atípica entre las bacterias en tanto que acumula lípidos de almacenamiento energético en ciertas etapas del ciclo de vida, en forma de gotitas de triglicéridos dentro de la célula (Olukoshi and Packter, 1994). Esta producción de material hidrofóbico quizá también requiera del reajuste del metabolismo de lípidos polares para ayudar a la compartimentalización celular de las reservas de energía.

Por otro lado, el desarrollo morfológico de *S. coelicolor* requiere de la producción de diferentes tejidos donde la envoltura celular tiene diferentes constricciones geométricas, diferentes tasas de biosíntesis, propiedades superficiales bastante contrastantes, y seguramente también distintas proteínas integrales de membrana. Cualquiera de estas variables, o todas ellas, podrían requerir de distintos componentes para llevar a cabo de manera óptima las funciones de la membrana citoplasmática.

El caso de los lípidos de ornitina muestra cómo varios de estos procesos pueden estar actuando simultáneamente en la remodelación de la membrana de *Streptomyces*. Por un lado, parece ser claro que OL juega un papel en la respuesta a la limitación de fósforo en el ambiente. Sin embargo, también presentamos indicios de un posible rol en los procesos de diferenciación morfológica y metabólica de este organismo.

Finalmente, nuestra exploración de las rutas biosintéticas de los lípidos de membrana en actinomicetos arrojó resultados interesantes, como la aparente ausencia de homólogos encargados del primer paso de la síntesis de fosfolípidos en *S. coelicolor* y la mayoría de los actinomicetos, que refuerza nuestro interés en estudiar no solamente el metabolismo secundario de este clado de organismos, sino también las vías metabólicas centrales, puesto que hay bastante química novedosa aún por ser descubierta hasta en estos organismos modelo.

10.2 Perspectivas

A partir del trabajo presentado nos surgen bastantes posibles líneas de investigación. Habiendo descrito la gran plasticidad de la composición de las membranas de *S. coelicolor*, resta aún explicar por qué se requieren algunos lípidos en específico para ciertas condiciones de crecimiento, además de que aún se desconocen los procesos regulatorios que controlan la remodelación de la membrana.

Con respecto a las predicciones bioinformáticas de las rutas biosintéticas de fosfolípidos, la continuación obligada es obtener evidencia experimental que nos permita corroborar nuestras hipótesis. La comprobación de las funciones predichas de varios de estos genes sería de gran relevancia no sólo para la bioquímica de lípidos de *S. coelicolor*, sino para la fisiología general de muchos actinomicetos de los que se desconocen los mismos procesos.

Se construyeron dos cepas mutantes que presentan alteraciones en la diferenciación morfológica (*olsB*⁻ y la deficiente en la lipasa putativa SCO2886), pero desconocemos cuál es el efecto a nivel estructural de las membranas y la envoltura celular de estas mutantes, y el proceso celular que está provocando estas alteraciones. Sería bastante enriquecedor profundizar en el estudio de la morfología de estas cepas a nivel microscópico y estructural. ¿Existe remodelación de otras partes de la envoltura celular? ¿Hay alteraciones en la forma y estructura de las esporas entre estas cepas mutantes? ¿Hay diferencias en la resistencia a estrés

de estas esporas? ¿La distribución de la maquinaria de síntesis de peptidoglicano se ve afectada en estas mutantes?

Con respecto a la síntesis de MLCL y DLCL, aún desconocemos cuál o cuáles son los genes responsables, y es necesario proponer una estrategia diferente para la determinación de las secuencias encargadas de estos pasos enzimáticos. Habiendo identificado varias condiciones donde *S. coelicolor* acumula grandes cantidades de estos metabolitos, podrían compararse experimentos de transcriptómica y proteómica para obtener una lista de genes que se expresan preferencialmente en estas condiciones, y a partir de ahí filtrar aquellos que pudieran participar en el metabolismo de lípidos a partir de los dominios estructurales de las proteínas que codifiquen. Realizar una mutagénesis aleatoria también sería una posibilidad para resolver este problema, pero sería necesario utilizar métodos de análisis que permitan comparar de manera paralela los perfiles metabólicos de decenas de cepas mutantes en poco tiempo para realizar el tamizaje del banco de mutantes. Análisis de MS con inyección automatizada de muestras pequeñas sería una excelente posibilidad, pero desafortunadamente carecemos del equipo necesario para llevar a cabo este tipo de enfoque experimental.

Referencias bibliográficas

- Aigle, B., and Corre, C. (2011). Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods in enzymology* 517, 343-366.
- Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A.E., Derrick, P.J., and Challis, G.L. (2004). Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society* 126, 16282-16283.
- Barreiro, C., Prieto, C., Sola-Landa, A., Solera, E., Martínez-Castro, M., Pérez-Redondo, R., García-Estrada, C., Aparicio, J.F., Fernández-Martínez, L.T., and Santos-Aberturas, J. (2012). Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Journal of bacteriology* 194, 3756-3757.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., and Sonnhammer, E.L. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* 32, D138-D141.
- Batrakov, S., and Bergelson, L. (1978). Lipids of the streptomycetes. Structural investigation and biological interrelation: A review. *Chemistry and physics of lipids* 21, 1-29.
- Benning, C., Beatty, J.T., Prince, R.C., and Somerville, C.R. (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 1561-1565.
- Benning, C., Huang, Z.-H., and Gage, D.A. (1995). Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 317, 103-111.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.
- Beranek, A., Rechberger, G., Knauer, H., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., and Leber, R. (2009). Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene CLD1 (YGR110W) in yeast. *J Biol Chem* 284, 11572-11578.
- Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., and Herron, P. (2004). Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome research* 14, 893.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Brautaset, T., Sekurova, O.N., Sletta, H., Ellingsen, T.E., Strøm, A.R., Valla, S., and Zotchev, S.B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry & biology* 7, 395-403.
- Brennan, P., and Ballou, C.E. (1967). Biosynthesis of mannophosphoinositides by *Mycobacterium phlei*. The family of dimannophosphoinositides. *Journal of Biological Chemistry* 242, 3046-3056.
- Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A., and Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology* 178, 2238-2244.
- Campelo, A.B., and Gil, J.A. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology* 148, 51-59.
- Catucci, L., Depalo, N., Lattanzio, V.M., Agostiano, A., and Corcelli, A. (2004). Neosynthesis of cardiolipin in *Rhodobacter sphaeroides* under osmotic stress. *Biochemistry* 43, 15066-15072.

- Cerdeño, A.M., Bibb, M.J., and 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, 817-829.
- Chakraborty, R., and Bibb, M. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology* 179, 5854-5861.
- Champness, W.C. (1988). New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *Journal of bacteriology* 170, 1168-1174.
- Chang, S.C., Heacock, P.N., Mileykovskaya, E., Voelker, D.R., and Dowhan, W. (1998). Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 14933-14941.
- Chater, K.F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 361, 761-768.
- Chater, K.F., Biró, S., Lee, K.J., Palmer, T., and Schrepf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews* 34, 171-198.
- Cobb, R.E., Wang, Y., and Zhao, H. (2014). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS synthetic biology* 4, 723-728.
- Coleman, J. (1990). Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry* 265, 17215-17221.
- Csonka, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* 53, 121-147.
- D'alia, D., Eggle, D., Nieselt, K., Hu, W.S., Breitling, R., and Takano, E. (2011). Deletion of the signalling molecule synthase *ScbA* has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbial biotechnology* 4, 239-251.
- Dechavigny, A., Heacock, P.N., and Dowhan, W. (1991). Sequence and inactivation of the *pss* gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* 266, 10710.
- Demain, A.L., and Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* 38, 41-55.
- Dowhan, W. (1997). CDP-diacylglycerol synthase of microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1348, 157-165.
- Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D.J., and Shen, B. (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & biology* 7, 623-642.
- Flardh, K., and Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 7, 36-49.
- Gao, C., Mulder, D., Yin, C., and Elliot, M.A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *MBio* 3, e00407-00412.
- Gao, J.L., Weissenmayer, B., Taylor, A.M., Thomas-Oates, J., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2004). Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Molecular Microbiology* 53, 1757-1770.
- Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., and Thomas-Oates, J.E. (1999). The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-*N, N, N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Molecular Microbiology* 32, 63-73.
- Gopalakrishnan, A.S., Chen, Y.C., Temkin, M., and Dowhan, W. (1986). Structure and expression of the gene locus encoding the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 261, 1329-1338.
- Guerin, M.E., Kaur, D., Somashekar, B.S., Gibbs, S., Gest, P., Chatterjee, D., Brennan, P.J., and Jackson, M. (2009). New insights into the early steps of phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in mycobacteria: PimB' is an essential enzyme of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* 284, 25687-25696.
- Guerin, M.E., Korduláková, J., Alzari, P.M., Brennan, P.J., and Jackson, M. (2010). Molecular Basis of Phosphatidyl-*myo*-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33577.

- Guerra, S.M., Rodríguez-García, A., Santos-Aberturas, J., Vicente, C.M., Payero, T.D., Martín, J.F., and Aparicio, J.F. (2012). LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* 7, e31475.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1541-1546.
- Heath, R.J., Goldfine, H., and Rock, C.O. (1997). A gene (*plsD*) from *Clostridium butyricum* that functionally substitutes for the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (*plsB*) of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 179, 7257.
- Heinen, W., and Lauwers, A. (1983). Changes in enzyme stability and fatty acid composition of *Streptomyces* sp., a facultative thermophilic actinomycete. *Archives of microbiology* 134, 247-250.
- Hoischen, C., Gura, K., Luge, C., and Gumpert, J. (1997). Lipid and fatty acid composition of cytoplasmic membranes from *Streptomyces hygroscopicus* and its stable protoplast-type L form. *J. Bacteriol.* 179, 3430-3436.
- Hopwood, D.A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* 145 (Pt 9), 2183-2202.
- Horinouchi, S., Ohnishi, Y., and Kang, D. (2001). The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27, 177-182.
- Jackson, M., Crick, D.C., and Brennan, P.J. (2000). Phosphatidylinositol Is an Essential Phospholipid of Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 275, 30092-30099.
- Jyothikumar, V., Klanbut, K., Tiong, J., Roxburgh, J.S., Hunter, I.S., Smith, T.K., and Herron, P.R. (2012). Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology*.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological reviews* 55, 288-302.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., and Matsumoto, K. (2004). Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J. Bacteriol.* 186, 1475-1483.
- Kawanami, J. (1971). Lipids of *Streptomyces toyocaensis* on the structure of siolipin. *Chemistry and physics of lipids* 7, 159-172.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation Norwich, UK.
- Kimura, A., and Otsuka, H. (1969). The changes of lysine- and ornithine-lipids in *Streptomyces sioyaensis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 33, 781-784.
- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of antibiotics* 40, 1249-1255.
- Kirchner, O., and Tauch, A. (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 104, 287-299.
- König, A., Schwecke, T., Molnár, I., Böhm, G.A., Lowden, P.A., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1997). The Pipecolate Incorporating Enzyme for the Biosynthesis of the Immunosuppressant Rapamycin—Nucleotide Sequence Analysis, Disruption and Heterologous Expression of Rap P from *Streptomyces Hygroscopicus*. *European Journal of Biochemistry* 247, 526-534.
- Korduláková, J., Gilleron, M., Mikusová, K., Puzo, G., Brennan, P.J., Gicquel, B., and Jackson, M. (2002). Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* 277, 31335-31344.
- Korduláková, J., Gilleron, M., Puzo, G., Brennan, P.J., Gicquel, B., Mikusová, K., and Jackson, M. (2003). Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of *Mycobacterium* species. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36285-36295.
- Lanéelle, M.-A., Promé, D., Lanéelle, G., and Promi, J.-C. (1990). Ornithine lipid of *Mycobacterium tuberculosis*: its distribution in some slow- and fast-growing mycobacteria. *Journal of general microbiology* 136, 773-778.
- Lechevalier, M.P., De Bievre, C., and Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology* 5, 249-260.
- Li, Y., Florova, G., and Reynolds, K.A. (2005). Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *Journal of bacteriology* 187, 3795-3799.

- Lightner, V., Larson, T., Tailleur, P., Kantor, G., Raetz, C., Bell, R., and Modrich, P. (1980). Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Cloning of a structural gene (*plsB*) of the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 255, 9413-9420.
- López, C.S., Alice, A.F., Heras, H., Rivas, E.A., and Sánchez-Rivas, C. (2006). Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* 152, 605-616.
- López, C.S., Heras, H., Ruzal, S.M., Sánchez-Rivas, C., and Rivas, E.A. (1998). Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Current microbiology* 36, 55-61.
- Lu, Y.-J., Zhang, Y.-M., Grimes, K.D., Qi, J., Lee, R.E., and Rock, C.O. (2006). Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. *Molecular cell* 23, 765-772.
- Macneil, D.J., Occi, J.L., Gewain, K.M., Macneil, T., Gibbons, P.H., Ruby, C.L., and Danis, S.J. (1992). Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase. *Gene* 115, 119-125.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., and Daly, M.J. (2001). Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 44-79.
- Manteca, A., Fernandez, M., and Sanchez, J. (2006). Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Research in microbiology* 157, 143-152.
- Mao, Y., Varoglu, M., and Sherman, D.H. (1999). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chemistry & biology* 6, 251-263.
- Martín, J.F., Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Smith, M.C., Ellingsen, T.E., Nieselt, K., Burroughs, N.J., and Wellington, E.M. (2012). Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* 95, 61-75.
- Mccarthy, A.J., and Williams, S.T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene* 115, 189-192.
- Mccormick, J.R., and Flärdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS microbiology reviews* 36, 206-231.
- Mistry, J., Finn, R.D., Eddy, S.R., Bateman, A., and Punta, M. (2013). Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic acids research*, gkt263.
- Mo, S., Sydor, P.K., Corre, C., Alhamadsheh, M.M., Stanley, A.E., Haynes, S.W., Song, L., Reynolds, K.A., and Challis, G.L. (2008). Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chemistry & biology* 15, 137-148.
- Morbidoni, H.R., De Mendoza, D., and Cronan Jr, J.E. (1995). Synthesis of *sn*-glycerol 3-phosphate, a key precursor of membrane lipids, in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 177, 5899.
- Morii, H., Ogawa, M., Fukuda, K., and Taniguchi, H. (2014). Ubiquitous distribution of phosphatidylinositol phosphate synthase and archaetidylinositol phosphate synthase in Bacteria and Archaea, which contain inositol phospholipid. *Biochemical and biophysical research communications* 443, 86-90.
- Morii, H., Ogawa, M., Fukuda, K., Taniguchi, H., and Koga, Y. (2010). A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in Mycobacteria. *Journal of biochemistry* 148, 593-602.
- Morita, Y.S. (1985). "Starvation and miniaturisation of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state," in *Bacteria in their Natural Environments*, eds. M. Fletcher & G.D. Floodgate. (London: Academic Press), 111-130.
- Moser, R., Aktas, M., Fritz, C., and Narberhaus, F. (2014). Discovery of a bifunctional cardiolipin/phosphatidylethanolamine synthase in bacteria. *Molecular microbiology* 92, 959-972.
- Motamedi, H., and Hutchinson, C.R. (1987). Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 4445-4449.
- Nieselt, K., Battke, F., Herbig, A., Bruheim, P., Wentzel, A., Jakobsen, Ø.M., Sletta, H., Alam, M.T., Merlo, M.E., and Moore, J. (2010). The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC genomics* 11, 1.
- Nikawa, J., Kodaki, T., and Yamashita, S. (1987). Primary structure and disruption of the phosphatidylinositol synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 4876-4881.

- Nishijima, S., Asami, Y., Uetake, N., Yamagoe, S., Ohta, A., and Shibuya, I. (1988). Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis. *J. Bacteriol.* 170, 775-780.
- Ochi, K. (1986). A decrease in GTP content is associated with aerial mycelium formation in *Streptomyces* MA406-A-1. *Journal of general microbiology* 132, 299-305.
- Okamoto, S., and Ochi, K. (1998). An essential GTP binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* 30, 107-119.
- Olukoshi, E.R., and Packter, N.M. (1994). Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140, 931-943.
- Özcan, N., Ejsing, C.S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S., and Kramer, R. (2007). Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 189, 7485-7496.
- Petrus, M.L., and Claessen, D. (2014). Pivotal roles for *Streptomyces* cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 127-139.
- Pope, M.K., Green, B.D., and Westpheling, J. (1996). The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Molecular Microbiology* 19, 747-756.
- Raibaud, A., Zalacain, M., Holt, T., Tizard, R., and Thompson, C. (1991). Nucleotide sequence analysis reveals linked *N*-acetyl hydrolase, thioesterase, transport, and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of bacteriology* 173, 4454-4463.
- Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E.E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H.K., Hopwood, D.A., and Titgemeyer, F. (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, 1237-1251.
- Rioseras, B., López-García, M.T., Yagüe, P., Sánchez, J., and Manteca, Á. (2014). Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource technology* 151, 191-198.
- Romantsov, T., Guan, Z., and Wood, J.M. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788, 2092-2100.
- Romantsov, T., Stalker, L., Culham, D.E., and Wood, J.M. (2008). Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 12314-12323.
- Roy, H. (2009). Tuning the properties of the bacterial membrane with aminoacylated phosphatidylglycerol. *IUBMB life* 61, 940-953.
- Roy, H., and Ibba, M. (2009). Broad range amino acid specificity of RNA-dependent lipid remodeling by multiple peptide resistance factors. *Journal of Biological Chemistry* 284, 29677-29683.
- Sandoval-Calderón, M., Geiger, O., Guan, Z., Barona-Gómez, F., and Sohlenkamp, C. (2009). A eukaryote-like cardiolipin synthase Is present in *Streptomyces coelicolor* and in most Actinobacteria. *J Biol Chem* 284, 17383-17390.
- Sandoval-Calderón, M., Nguyen, D.D., Kapono, C.A., Herron, P., Dorrestein, P.C., and Sohlenkamp, C. (2015). Plasticity of *Streptomyces coelicolor* membrane composition under different growth conditions and during development. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.
- Semiñuk, A., Sohlenkamp, C., Duda, K., and Hölzl, G. (2014). A bifunctional glycosyltransferase from *Agrobacterium tumefaciens* synthesizes monoglucosyl and glucuronosyl diacylglycerol under phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 289, 10104-10114.
- Serricchio, M., and Bütikofer, P. (2012). An essential bacterial-type cardiolipin synthase mediates cardiolipin formation in a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E954-E961.
- Shaw, N. (1974). Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Advances in applied microbiology* 17, 63-108.
- Shirling, E.T., and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology* 16, 313-340.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 522-525.

- Sohlenkamp, C., De Rudder, K.E., and Geiger, O. (2004). Phosphatidylethanolamine is not essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* on complex culture media. *Journal of bacteriology* 186, 1667-1677.
- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K.A., Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., Raetz, C.R., and Geiger, O. (2007). The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 1421-1430.
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews* 40, 133.
- Stankovic, N., Senerovic, L., Ilic-Tomic, T., Vasiljevic, B., and Nikodinovic-Runic, J. (2014). Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 3841-3858.
- Suutari, M., and Laakso, S. (1993). Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. *Archives of microbiology* 159, 119-123.
- Takano, E. (2006). γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current opinion in microbiology* 9, 287-294.
- Tan, B.K., Bogdanov, M., Zhao, J., Dowhan, W., Raetz, C.R., and Guan, Z. (2012). Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16504-16509.
- Tannæs, T., Bukholm, I.K., and Bukholm, G. (2005). High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44, 17-23.
- Tannæs, T., Dekker, N., Bukholm, G., Bijlsma, J.J., and Appelmelk, B.J. (2001). Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infection and immunity* 69, 7334-7340.
- Tian, Y., Fowler, K., Findlay, K., Tan, H., and Chater, K.F. (2007). An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 189, 2873-2885.
- Tindall, B.J., Rosselló-Mora, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., and Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 249-266.
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., and Lee, S.Y. (2015). CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS synthetic biology* 4, 1020-1029.
- Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., and Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* 4, e00459-00413.
- Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W., and Wood, J.M. (2005). The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *Journal of Biological Chemistry* 280, 41387-41394.
- Tschowri, N., Schumacher, M.A., Schlimpert, S., Babu Chinnam, N., Findlay, K.C., Brennan, R.G., and Buttner, M.J. (2014). Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces development*. *Cell* 158, 1136-1147.
- Vaden, D., Gohil, V., Zhiming, G., and Greenberg, M. (2005). Separation of yeast phospholipids using one-dimensional thin-layer chromatography. *Analytical biochemistry* 338, 162-164.
- Van Wezel, G.P., and McDowall, K.J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports* 28, 1311-1333.
- Vences-Guzmán, M.Á., Guan, Z., Ormeño Orrillo, E., González Silva, N., López Lara, I.M., Martínez Romero, E., Geiger, O., and Sohlenkamp, C. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular microbiology* 79, 1496-1514.
- Vences Guzmán, M.Á., Guan, Z., Escobedo Hinojosa, W.I., Bermúdez Barrientos, J.R., Geiger, O., and Sohlenkamp, C. (2015). Discovery of a bifunctional acyltransferase responsible for ornithine lipid synthesis in *Serratia proteamaculans*. *Environmental microbiology* 17, 1487-1496.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., and Van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 495-548.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B.S., Yang, J.Y., Kersten, R.D., Van Der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., and Raaijmakers, J.M. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E1743-E1752.
- Weissenmayer, B., Gao, J.-L., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2002). Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Molecular Microbiology* 45, 721-733.

- Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J., and Manteca, Á. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS microbiology letters* 342, 79-88.
- Yang, J.Y., Sanchez, L.M., Rath, C.M., Liu, X., Boudreau, P.D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., De Felicio, R., and Fenner, A. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. *Journal of natural products* 76, 1686-1699.
- Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2010). *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 302-307.
- Zbierzak, A.M., Dörmann, P., and Hölzl, G. (2011). "Analysis of lipid content and quality in *Arabidopsis* plastids," in *Chloroplast Research in Arabidopsis*. Springer), 411-426.
- Zhang, G., Tian, Y., Hu, K., Zhu, Y., Chater, K.F., Feng, C., Liu, G., and Tan, H. (2012). Importance and regulation of inositol biosynthesis during growth and differentiation of *Streptomyces*. *Molecular Microbiology* 83, 1178-1194.
- Zhang, J.I., Talaty, N., Costa, A.B., Xia, Y., Tao, W.A., Bell, R., Callahan, J.H., and Cooks, R.G. (2011). Rapid direct lipid profiling of bacteria using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 301, 37-44.
- Zhang, Y.-M., and Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 222-233.
- Zhu, K., Bayles, D.O., Xiong, A., Jayaswal, R., and Wilkinson, B.J. (2005). Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *Microbiology* 151, 615-623.

Anexo 1

Sandoval-Calderón, M., Nguyen, D.D., Kaponó, C.A., Herron, P., Dorrestein, P.C., and Sohlenkamp, C. (2015). Plasticity of *Streptomyces coelicolor* membrane composition under different growth conditions and during development. *Frontiers in Microbiology* 6.

Anexo 2

Recetas de medios de cultivo de *S. coelicolor*

ISP2 sólido

4 g	Extracto de Levadura
10 g	Extracto de Malta
4 g	Dextrosa
20 g	Agar
1 L	Agua destilada

YEME líquido

3 g	Extracto de levadura
5 g	Bacto-peptona
3 g	Extracto de malta
10 g	Glucosa
340 g	Sacarosa
1 L	Agua destilada

Después de autoclavar, añadir:
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.5M) 2 mL/L (5mM final)

Para preparar YEME sólido, se añade 20 g/L de agar antes de esterilizar.

SFM sólido

20 g	Harina de soya
20 g	Manitol
20 g	Agar
1 L	Agua de la llave

Autoclavar una vez, agitar ligeramente el medio mientras sigue líquido y volver a autoclavar.

SMMS

2 g	Casaminoácidos
5.96 g	Buffer HEPES (25 mM final)
1 L	Agua destilada

Vaciar 200 mL de la solución en matraces de 250 mL con 3 g de agar cada uno. Tapar los matraces y autoclavar. Al momento de usarse, fundir el medio y añadir a cada matraz:

2 mL	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (50 mM cada uno)
1 mL	MgSO_4 (1 M)
3.6 mL	Glucosa (50 % p/v)
0.2 mL	Solución de elementos traza ¹

¹Solución de elementos traza:

0.1 g/L	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.1 g/L	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.1 g/L	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0.1 g/L	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0.1 g/L	NaCl

Preparada fresca cada 2-4 semanas, esterilizada por filtración. Almacenar a 4 °C.

R2YE sólido

Preparar la solución siguiente:

103 g	Sacarosa
0.25 g	K ₂ SO ₄
10.12 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O
10 g	Glucosa
0.1 g	Casaminoácidos
800 mL	Agua destilada

Verter 80 mL de la solución en matraces de 250 mL, cada uno con 2.2 g de agar. Tapar los matraces y autoclavar. Al momento de usarse, fundir el medio y añadir a cada frasco las siguientes soluciones esterilizadas en el orden indicado:

1 mL	KH ₂ PO ₄ (0.5%)
8 mL	CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%)
1.5 mL	L-prolina (20%)
10 mL	Buffer HEPES (5.96%) ajustado a pH 7.2 (25 mM final)
0.2 mL	Solución de elementos traza ²
0.5 mL	NaOH (1N) (no es necesario esterilizar)
5 mL	Extracto de levadura (10 %)

²Solución de elementos traza:

40 mg/L	ZnCl ₂
200 mg/L	FeCl ₃ ·6H ₂ O
10 mg/L	CuCl ₂ ·2H ₂ O
10 mg/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O
10 mg/L	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
10 mg/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O

Anexo 3

Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Sitios de restricción
Op_0920-21_F	5'-atatggatccgcgttcagtgaaacgttcgc-3'	BamHI
Op_0920-21_R	5'-attagaattcatccagcggatggaacggc-3'	EcoRI
Sco6966_EcoRI_F	5'-acaagaattcatggccgaggcccgagcac-3'	EcoRI
Sco6966_BamHI_R	5'-aaaaggatccacaaaccccgggacccc-3'	BamHI
Cld1_NcoI_F	5'-aaaaccatggcctcaagtcaacttaaactcc-3'	NcoI
Cld1_BamHI_R	5'-aaaaggatccataagaagaaaatagcggcg-3'	BamHI
cld1_BamHI_R2	5'-tattggatcctatatttttgatttcttcg-3'	BamHI
Sco5322_EcoRI_F	5'-acaagaattcgtggtcccgttacggagg-3'	EcoRI
Sco5322_BamHI_R	5'-aaaaggatccacgcctggctgattccgc-3'	BamHI
Sco2886_EcoRI_F	5'-acaagaattcatgaccacgcagcggccgc-3'	EcoRI
Sco2886_BamHI_R	5'-aaaaggatcccgcgatgtgacaggccgcgc-3'	BamHI
sco1253_BamHI_R	5'-tataggatccgtcggagcctacgaacgg-3'	BamHI
sco1253_EcoRI_F	5'-tatagaattcatgcagacgaaccccgctac-3'	EcoRI
sco2123_EcoRI_F	5'-tatagaattcatgctgctcctcccggagc-3'	EcoRI
sco2123_XbaI_R	5'-tttatctagatcgtgctcagccacctgc-3'	XbaI
sco3397_NdeI_F	5'-aaaacatatgctggcgagggtccgacg-3'	NdeI
sco3397_XhoI_R	5'-tatactcgagacggaccgggctgctcacg-3'	XhoI
sco3644_BamHI_R	5'-ataaggatccgctcaccaggccaactgc-3'	BamHI
sco3644_EcoRI_F	5'-tatagaattcatccggacgcccgcag-3'	EcoRI
sco4298_EcoRI_F	5'-tatagaattcatgacgatccctggacctgcc-3'	EcoRI
sco4298_XbaI_R	5'-tttatctagaagtcacgccttcgggtcc-3'	XbaI
sco4746_BamHI_R	5'-aataggatccggacgactcagccggg-3'	BamHI
sco4746_EcoRI_F	5'-taaagaattcatgcacgtgagcgagagcaac-3'	EcoRI
sco5165_BamHI_R	5'-atatggatcctcagcgcacgtacggtcgg-3'	BamHI
sco5165_EcoRI_F	5'-taaagaattcatgagcaggaacccgccttc-3'	EcoRI
sco6127_BamHI_R	5'-taaaggatccacatccgcgactccaaag-3'	BamHI
sco6127_EcoRI_F	5'-tatagaattcatgctcaggccagacgaac-3'	EcoRI
sco6384_NdeI_F	5'-aaaacatatggggcatagtcgaggatgg-3'	NdeI
sco6384_XhoI_R	5'-atatctcaggtggccgtaccggcagg-3'	XhoI
sco7081_BamHI_R	5'-tataggatccgcctggcagcagacc-3'	BamHI
sco7081_NdeI_F	5'-aaaacatatgacctcgtgaaccgac-3'	NdeI
sco7131_EcoRI_F	5'-taaagaattcatgagcgacatcgttctcg-3'	EcoRI

sco7131_XbaI_R	5'-tttatctagagtggccctccggatcag-3'	XbaI
sco5558_NcoI_F	5'-aatgcatgtgccccgccgagatcggc-3'	NcoI
sco5558_HindIII_R	5'-accggaagcttgaccggctgtcacgtgc-3'	HindIII
sco2886_probe_F	5'-tagctgtgtacgaccacacgg-3'	N/A
sco2886_probe_R	5'-tcaaggagcacctggccttcg-3'	N/A
Sco1175_NdeI_F	5'-gttgcataatgtgcccgatgctcgacgacc-3'	NdeI
Sco1175_BamHI_R	5'-tataggatccgttccccctgctcctccagg-3'	BamHI
Sco1228_NdeI_F	5'-cccccatatgttctactacgtgctcaagtacg-3'	NdeI
Sco1228_BamHI_R	5'-tataggatccgcatgtgtcatacggcgac-3'	BamHI
Sco1264_NdeI_F	5'-gtcccatatgctgacaagctgtctacc-3'	NdeI
Sco1264_BamHI_R	5'-atatggatcctcaggacatcgaccgg-3'	BamHI
Sco1566_NdeI_F	5'-ggcccatatgtcccgttcgtgtc-3'	NdeI
Sco1566_BamHI_R	5'-atatggatccgcatcgctggggg-3'	BamHI
Sco1735_NdeI_F	5'-tcaccatagctgccctggagccgagtg-3'	NdeI
Sco1735_BamHI_R	5'-aataggatccgtcagccgaagaccgaggc-3'	BamHI
Sco1759_NdeI_F	5'-tatacatatgaccgcatcctccgccg-3'	NdeI
Sco1759_BamHI_R	5'-cggggatccactactcaagtgtcactcagc-3'	BamHI
Sco1881_NdeI_F	5'-gacccatagctcactcagccgaagacag-3'	NdeI
Sco1881_EcoRI_R	5'-tctcgaattctcggggtgctgtgagg-3'	EcoRI
Sco2122_NdeI_F	5'-cactcatatgtgtacggcgcatgaag-3'	NdeI
Sco2122_BamHI_R	5'-tataggatccgtgcccgtccgaactacg-3'	BamHI
Sco2392_NdeI_F	5'-gacacatagggctgagggacgaccag-3'	NdeI
Sco2392_BamHI_R	5'-gtatggatccgggtcagggattcttcgc-3'	BamHI
Sco2622_NdeI_F	5'-gggacatagtagctcgtcgatcc-3'	NdeI
Sco2622_EcoRI_R	5'-ccacgaattctagacggagaccttctcg-3'	EcoRI
Sco2892_NdeI_F	5'-acatcatatgacccgggtcgtgacggg-3'	NdeI
Sco2892_BamHI_R	5'-atatggatccgtgctacgccttgacc-3'	BamHI
Sco2961_NdeI_F	5'-cacgcatatgggcacggacaccgacgtac-3'	NdeI
Sco2961_BamHI_R	5'-atatggatccgacacacgtcagccccgg-3'	BamHI
Sco3078_NdeI_F	5'-gctacatagcagcatgtcgagggcgag-3'	NdeI
Sco3078_BamHI_R	5'-ataaggatccagcccccttccgctgg-3'	BamHI
Sco3171_NdeI_F	5'-taatcatatgagccgctgctgctgctg-3'	NdeI
Sco3171_EcoRI_R	5'-cgtagaattccaggctcaccctgctcatg-3'	EcoRI
Sco3305_NdeI_F	5'-gagccatagcgaataggaaaggcgtcc-3'	NdeI
Sco3305_EcoRI_R	5'-gctagaattcgtcaccagacaccggac-3'	EcoRI
Sco3325_NdeI_F	5'-tgtacatagcgggacgccaaggtcattc-3'	NdeI
Sco3325_BamHI_R	5'-catcggatcctcagaagaacaccgacctc-3'	BamHI
Sco3642_NdeI_F	5'-gtgacatagcctgacctgacccgacc-3'	NdeI
Sco3642_EcoRI_R	5'-tcacgaattccaccctagacatggcgtg-3'	EcoRI
Sco4368_NdeI_F	5'-cctacatagcaccggcagatcacgacc-3'	NdeI

Sco4368_BamHI_R	5'-ctatggatccgggttgagtgacggttgcg-3'	BamHI
Sco4392_NdeI_F	5'-aacgcatatgtccacatttctgctgatacacg-3'	NdeI
Sco4392_BamHI_R	5'-atatggatcctggctaggggagcttgagg-3'	BamHI
Sco4555_NdeI_F	5'-atatcatatggggcgccacagcaggggc-3'	NdeI
Sco4555_EcoRI_R	5'-ctacgaattcaggaagcgcgggtcacg-3'	EcoRI
Sco4799_NdeI_F	5'-tcagcatatgaaggtcaccacggcagcac-3'	NdeI
Sco4799_BamHI_R	5'-ataaggatccgtgtttgggggacggcg-3'	BamHI
Sco5067_NdeI_F	5'-acaacatatgaaccaccaccccgagccc-3'	NdeI
Sco5067_EcoRI_R	5'-actcgaattcagctccacacctccggttc-3'	EcoRI
Sco5172_NdeI_F	5'-ttaacatatgccttcgaccgagccgccc-3'	NdeI
Sco5172_BamHI_R	5'-tataggatcccacgtcgcgcctcagcctc-3'	BamHI
Sco5215_NdeI_F	5'-agagcatatgacagaggcggtcgagacgg-3'	NdeI
Sco5215_BamHI_R	5'-taatggatcccagggcgttcagccgagtg-3'	BamHI
Sco6774_NdeI_F	5'-cagacatatgatcgggtcgtacgtggcg-3'	NdeI
Sco6774_BamHI_R	5'-atatggatcctcgggataccggcccctc-3'	BamHI
Sco5558_NdeI_F	5'-tatacatatgccccgccgagaatcggc-3'	NdeI
Sco5558_BamHI_R	5'-cccaggatccggtgccgaagacc-3'	BamHI
Sco2886_NdeI_F	5'-gagacatatgaccacgcagcgcgccccc-3'	NdeI