



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Caracterización de la mutante Δ sco0204 en el
contexto de la mutante Δ sco2127 en
*Streptomyces coelicolor***

TESIS

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

Nidia Maldonado Carmona

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Víctor Hugo Tierrafría Pulido

ASESOR DE TESIS

QFB José Oscar González Moreno



Ciudad de México, 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.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitirme desarrollar mis habilidades profesionales, por brindarme la oportunidad de desarrollarme como ser humano y por permitirme conocer a maravillosas personas y profesionistas.

A la FESZ, por darme las bases científicas para llevar a cabo mi trabajo como profesionista, por permitirme desarrollar el amor al trabajo experimental y alentar mi preparación más allá de la licenciatura.

Al Doctor Sergio Sánchez Esquivel, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, ampliar mis conocimientos y concretar mis proyectos personales bajo su asesoría.

A la Doctora Beatriz Ruiz Villafán, por su invaluable apoyo durante el desarrollo del trabajo experimental de esta tesis.

Al Maestro en Ciencias Víctor Hugo, Tierrafría Pulido, por su apoyo incondicional, invaluable asesoría e inigualable amistad.

Al Q.F.B. José Oscar González Moreno, por su ayuda y asesoramiento.

Al CONACYT, por apoyarme económicamente en el desarrollo de esta tesis, mediante la beca para Ayudantes de Investigador Nacional Nivel III 11653.

Al Programa PAPIIT IN201413, por proporcionar los recursos con los cuales se pudo llevar término esta investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres, por que todos los sacrificios que ustedes han hecho, por fin han rendido un fruto. Ustedes nunca se rindieron y con su ejemplo de dedicación y perseverancia, yo no puedo más que mirar hacia adelante.

A mis compañeros del laboratorio, a Víctor, Omar, Melissa, Silvana, Betty, Sara, Hugo, Silvia, Karol, Anita, Diana Carolina, Miriam, Betty, Alexis, Diana, Mone, Kat, Berenice y Alba. Gracias por hacer de cada instante un momento especial.

A Enrique, porque el tiempo es relativo y un instante puede durar una vida.

Gracias a ti, por estar leyendo esto, por estar aquí en mi vida en este lugar y momento. Por haber permanecido en los buenos y en los malos momentos. Nada de esto es una casualidad.

Toseltika matinemikajya

Kemantika nijmachilia
tlen timaseualmej ti chiaj
se tlakatl tlen nochi ueli
tlen nochi kimati,
tlen ueliskia tech makixtia.

Ni tlakatl tlen nochi ueli
una nochi kimati
axkemaj asiki;
pampa touaya itskok
touaya nemi;
peuaya tlachia,
nojua kochtok.

Necesitamos caminar solos

Algunas veces siento que los indios
esperamos la llegada de un hombre
que todo lo puede
que todo lo sabe
que nos puede ayudar a resolver
todos nuestros problemas

Sin embargo, ese hombre que todo lo puede
y que todo lo sabe
nunca llegara;
porque vive en nosotros,
se encuentra en nosotros
camina con nosotros;
aún duerme,
pero ya está despertando.

Natalio Hernández Xocoyotzin

ÍNDICE GENERAL

I.	Introducción	2
II.	Marco teórico	3
	El descubrimiento de los antibióticos y el desarrollo de la resistencia bacteriana	3
	El género <i>Streptomyces</i> y la producción de antibióticos	4
	<i>Streptomyces coelicolor</i> como modelo de estudio	5
	Regulación catabólica por fuentes de carbono	8
	Participación de SCO2127 en la regulación catabólica por fuentes de carbono	10
	SCO0204 como ejemplo de un regulador LuxR	12
	Reducción de nitrato en <i>Streptomyces coelicolor</i>	14
III.	Planteamiento del problema	17
IV.	Objetivos	28
V.	Hipótesis	19
VI.	Metodología	20
	Material	20
	Instrumentos	20
	Equipos	21
	Medios de cultivo	21
	Reactivos	21
	DNA polimerasas	22
	Otras enzimas	22
	Cepas	22

Técnicas	23
VII. Resultados	28
Eliminación del gen <i>sco0204</i> de <i>S. coelicolor</i>	28
Evaluación de la diferenciación morfológica en medio sólido	32
Evaluación en medio líquido	33
VIII. Discusión de resultados	37
IX. Conclusiones	40
X. Perspectivas	41
XI. Apéndices	42
Apéndice 1. Oligonúcleotidos utilizados	42
Apéndice 2. Condiciones de PCR utilizadas	43
XII. Referencias	44

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace algún tiempo, el estudio del gen *sco2127* de *Streptomyces coelicolor* ha sido importante para comprender mejor el metabolismo de carbono y la diferenciación morfológica de este microorganismo. Recientemente, se observó que la eliminación del gen *sco2127* tiene como resultado una esporulación deficiente y una disminución en la producción de actinorrodina en medio de cultivo líquido, por lo que se ha propuesto que este gen podría estar participando indirectamente en dichos procesos. Para analizar el efecto a nivel molecular de la eliminación del gen *sco2127*, se analizó el transcriptoma, proteoma y metaboloma de la mutante Δ *sco2127* con respecto a su cepa parental. Al analizarse los resultados obtenidos se encontraron diferencias significativas en la expresión de hasta 179 genes. Entre estos, se encontró alterada la expresión de cinco reguladores transcripcionales, los cuales podrían formar una red subregulatoria en esta mutante, amplificando el efecto de SCO2127. Dentro de estos reguladores, destaca la inducción en la expresión de SCO0204, un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes. A través de un estudio bioinformático de los datos obtenidos se obtuvo evidencia *in silico* que permite suponer que este sistema de regulación transcripcional podría estar involucrado en la regulación de la producción y exportación de nitrito en la mutante Δ *sco2127*. Derivado de estas observaciones, se confirmó experimentalmente que la mutante Δ *sco2127* acumula nitrito. En este escenario, se elucubró que el exceso de nitrito es un desencadenante para las alteraciones negativas en el crecimiento, diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina en Δ *sco2127*.

En el presente trabajo se estudió el papel del gen *sco0204* en el metabolismo y en la producción de nitrito en *S. coelicolor*. Se reemplazó el gen *sco0204* en la mutante Δ *sco2127* y en la cepa M145. En estas cepas mutantes y en sus cepas parentales se evaluó la diferenciación morfológica en medio sólido, el crecimiento en medio líquido, la producción específica de actinorrodina y la producción específica de nitrito.

II. MARCO TEÓRICO

El descubrimiento de los antibióticos y el desarrollo de la resistencia bacteriana

Las enfermedades infecciosas han representado una amenaza para la humanidad desde el inicio de los tiempos. Hasta la fecha, las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte mundial, causando hasta 17 millones de decesos anualmente, principalmente entre infantes y ancianos⁽¹⁾. Sin embargo, antes de la primera mitad del siglo XX, los médicos difícilmente podían cambiar el curso de una enfermedad infecciosa hacia un panorama más favorable. Esta situación cambio drásticamente con el descubrimiento de los antibióticos como la sulfonamida (1936) y la penicilina (1942), lo que permitió combatir las enfermedades infecciosas más comunes, reduciendo la mortalidad (Tabla 1). Esta capacidad de prevenir y curar infecciones permitió el desarrollo de la medicina en otros ámbitos, permitiendo el uso de catéteres, ventiladores, cirugías complejas, cuidado de recién nacidos prematuros, trasplante de órganos, etc⁽²⁾.

Tabla 1. Disminución de la mortalidad de ciertas enfermedades infecciosas tras el uso de antibióticos.

Enfermedad	Tasa de disminución
Neumonía adquirida en la comunidad.	25%
Neumonía nosocomial	30%
Endocarditis	75%
Meningitis o infecciones cerebrales	60%

Sin embargo, el uso indiscriminado de los antibióticos pronto trajo a la humanidad una dura realidad: las bacterias tienen las herramientas metabólicas para hacer frente a los antibióticos⁽²⁾. Los genes que permiten la síntesis y la resistencia a los antibióticos han

evolucionado a lo largo de millones de años, sin embargo, a raíz del surgimiento de los antibióticos y de su uso desmedido en la clínica ha generado la aparición de organismos multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Enterococcus sp.* resistente a glucopéptidos, enterobacterias productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), etc⁽³⁾. Aunado al surgimiento de estas nuevas cepas con resistencias múltiples, viejos enemigos resurgen con una mayor capacidad infecciosa. Así, el agente patógeno de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, ha adquirido la capacidad para resistir al tratamiento actual contra la tuberculosis⁽⁴⁾.

Esta creciente resistencia de los microorganismos hacia los antibióticos usados en la práctica clínica, ha obligado a retomar el descubrimiento de nuevos antibióticos, retomando principalmente los antibióticos de origen natural.

El género *Streptomyces* y la producción de antibióticos

Las décadas de los años 1950 y de 1960 se consideran como la época dorada del descubrimiento de nuevos antibióticos ya que durante estos años se descubrió el mayor número de moléculas bioactivas, principalmente a partir de fuentes de origen natural⁽⁵⁾. Durante estas décadas, sobresalió el orden de los actinomicetos como principal productor de antibióticos. Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, las cuales comprenden hasta el 65% de la biomasa bacteriana del suelo⁽⁶⁾. Además, este orden bacteriano se caracteriza por un alto contenido de guanina y citosina en su material genético.

Dentro de los actinomicetos, destaca el género *Streptomyces* que incluye más de 600 especies, las cuales se han encontrado en ambientes tan diversos como el suelo, sedimentos acuáticos, plantas, etc⁽⁷⁾. En estos ambientes existe una gran competencia para la captación de los recursos del medio, por lo que los estreptomicetos se han visto obligados a desarrollar diversas estrategias para asegurar una eficiente captación de nutrientes. Una de las estrategias de *Streptomyces* ha sido la adopción de diversas vías metabólicas y secretasas, que le permiten aprovechar una amplia variedad de sustratos del medio ambiente. Sin embargo, la estrategia principal utilizada por *Streptomyces* es la síntesis de metabolitos secundarios, algunos de los cuales parecen tener una actividad antibiótica que elimina o disminuye la competencia del medio ambiente. En el ámbito clínico, estos metabolitos han demostrado un amplio espectro de actividades

farmacológicas, por ejemplo: antibióticos (ácido clavulánico), antiparasitarios (ivermectina) y anti neoplásicos (doxorubicina). Actualmente se estima que hasta el 70% de los antibióticos de origen natural con uso clínico son producidas por el género *Streptomyces*⁽⁸⁾.

Adicionalmente, la secuenciación genómica de especies como *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces avermitilis* ha revelado el potencial de estos organismos para sintetizar hasta 5 veces más metabolitos secundarios que los descritos previamente(9–12). Sin embargo, también han sido descubiertos diversos sistemas de regulación que requieren ser estudiados para explotar el potencial metabólico de los estreptomicetos⁽⁵⁾, por lo que resulta necesario comprender los mecanismos regulatorios que desencadenan la producción de estas moléculas, para optimizar su producción y obtener un mayor rendimiento del producto⁽¹³⁾.

***Streptomyces coelicolor* como modelo de estudio**

S. coelicolor es el actinomiceto más estudiado del género *Streptomyces*. La elección de este microorganismo como modelo de estudio se debe a la producción característica de dos antibióticos coloridos: actinorrodina (un policétido color azul) y undecilprodigiosina (un derivado pirrólico de color rojo)⁽¹⁴⁾. La producción de estos dos metabolitos secundarios ha facilitado el estudio de sus respectivas vías biosintéticas y regulatorias, a través de la observación de cambios en la producción de los antibióticos, en respuesta a la expresión diferencial de distintos genes de interés⁽¹⁴⁾.

S. coelicolor además produce otros tres antibióticos con una débil actividad: el antibiótico dependiente de calcio CDA (Calcium Dependant Antibiotic), el pigmento gris de espora y la metilenomicina A (Figura 1)⁽⁸⁾. Si bien estos antibióticos no son usados habitualmente para la evaluación de sus rutas biosintéticas, estos antibióticos son un ejemplo de la vasta variedad de estructuras que produce *Streptomyces*.

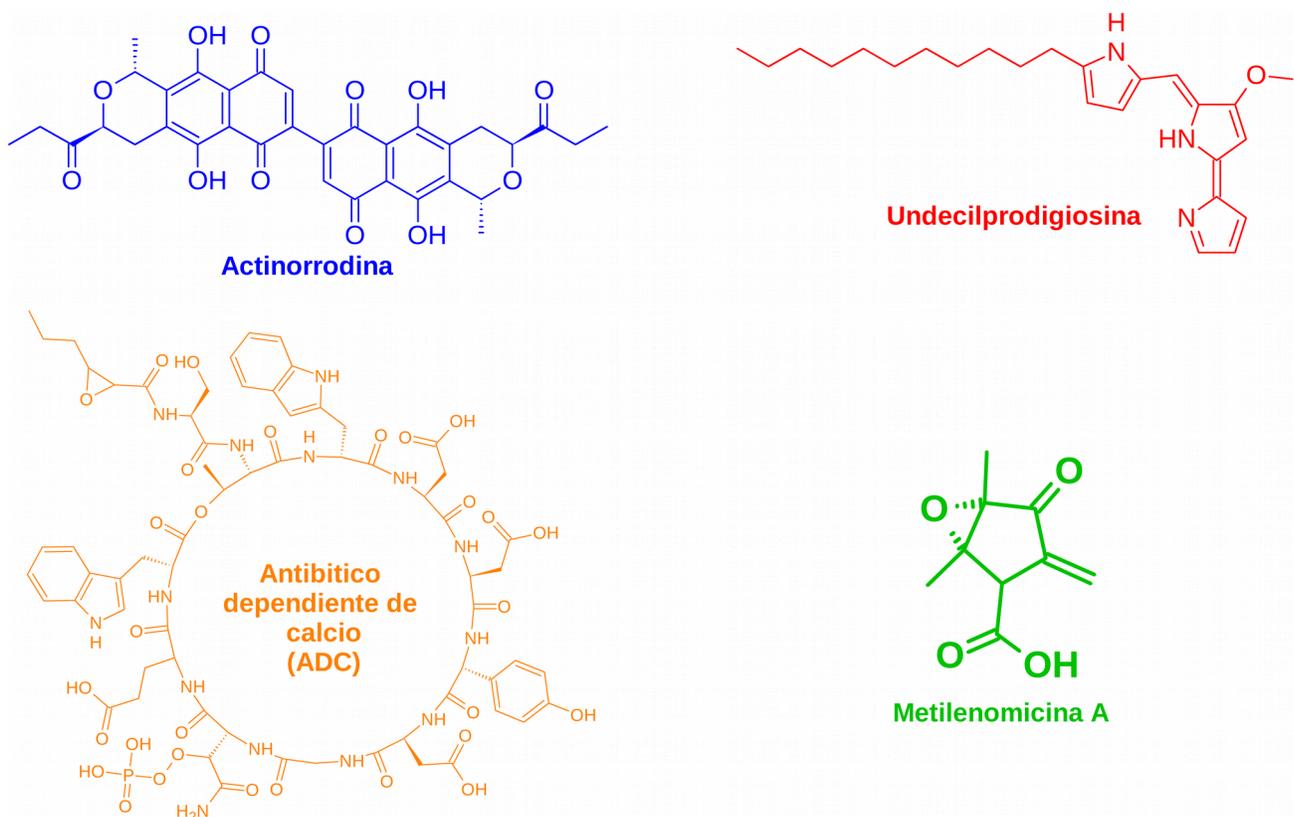


Figura 1. Estructura química de los principales antibióticos de *S. coelicolor*.

Además de la característica producción de antibióticos, la morfología filamentosa en los actinomicetos es distintiva porque involucra un complejo proceso de diferenciación morfológica en el que influyen factores celulares y externos. El ciclo de vida de *S. coelicolor* comienza con una única espora, a partir de la cual se desarrolla el micelio vegetativo, el cual crece en forma de células. Cuando los nutrientes se agotan en el medio circundante, el micelio vegetativo comienza un proceso de apoptosis, que permite la liberación de los nutrientes necesarios para la formación del micelio aéreo y la esporulación (Figura 2). Diversos estudios señalan una clara relación entre la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios, los cuales aparentemente responden a una necesidad ecológica de obtener la mayor cantidad posible de nutrientes en el medio y permitir la supervivencia de la bacteria a condiciones adversas⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Además, diversos reguladores transcripcionales que afectan a la diferenciación morfológica afectan también la producción de antibióticos y viceversa⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

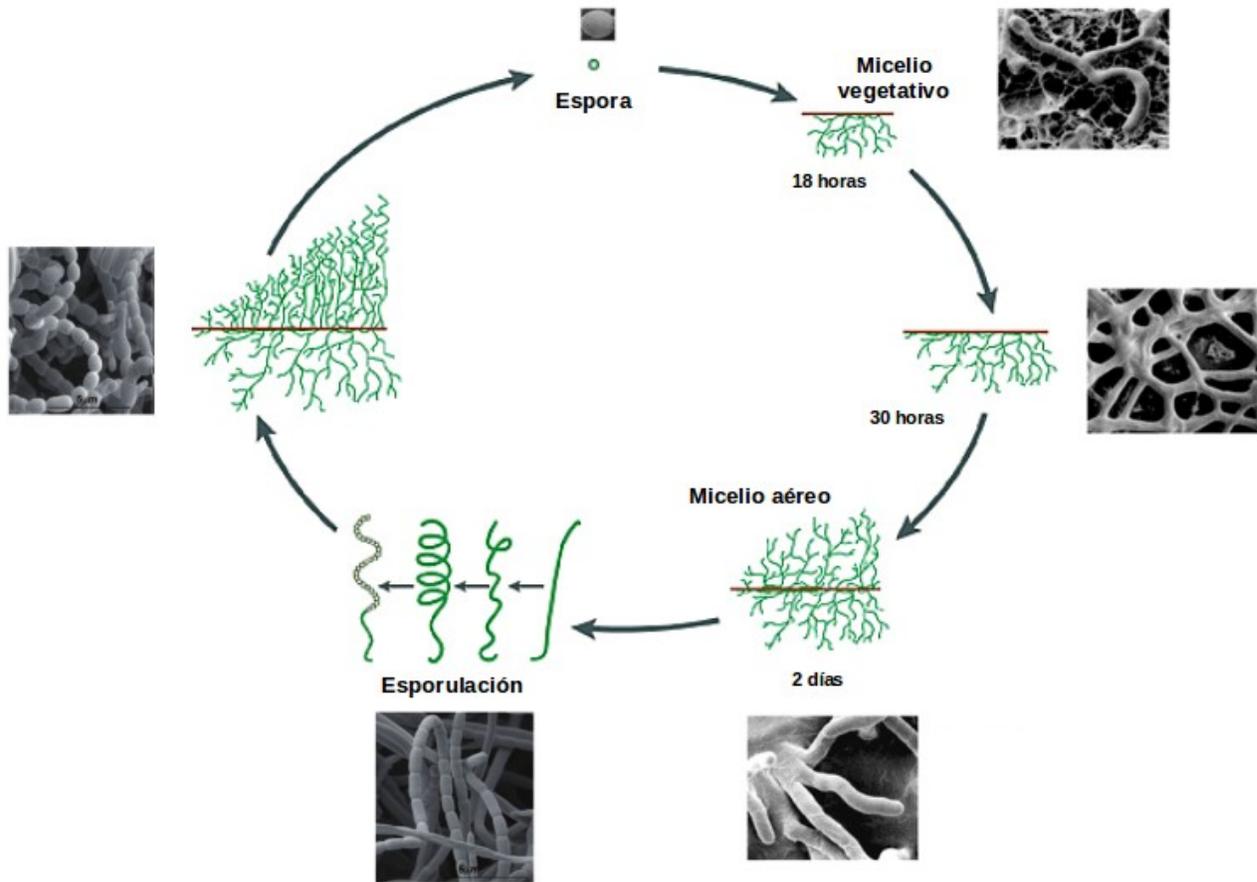


Figura 2. Ciclo de vida de *S. coelicolor*. Modificado de ^(15,16).

Con el inicio de la era genómica surgió el proyecto de la secuenciación del genoma de *S. coelicolor*, en aras de comprender mejor las vías metabólicas, regulatorias y biosintéticas de este microorganismo. Este proyecto se desarrolló en el Wellcome Trust Sanger Institute y culminó con la liberación de la secuencia del genoma en el año 2002⁽⁹⁾.

El genoma de *S. coelicolor* tiene un contenido de G+C de aproximadamente el 72.12%. Consta de un único cromosoma lineal con 8,667,507 nucleótidos y contiene aproximadamente 7,825 secuencias codificantes, lo que representa una densidad codificante del 88.9%. Mientras que los genes esenciales para la supervivencia de *S. coelicolor* se encuentran distribuidos en el centro del cromosoma, los genes necesarios para el metabolismo secundario y el aprovechamiento de fuentes de carbono no preferenciales, suelen encontrarse en los extremos del cromosoma⁽⁹⁾.

En su momento era de particular interés conocer si los cinco antibióticos tradicionales de *S. coelicolor* eran los únicos metabolitos secundarios que este organismo podía sintetizar.

Al analizarse el genoma de *S. coelicolor* se encontraron las rutas biosintéticas necesarias para la síntesis de hasta 20 metabolitos secundarios diferentes. Estos metabolitos secundarios que no se expresan en condiciones de laboratorio, se denominan crípticos, dado que su producción es desencadenada por señales o eventos que aún se deben de comprender. La capacidad de *S. coelicolor* para regular la producción de sus metabolitos secundarios en función de su entorno y la disponibilidad de nutrientes indica que las vías biosintéticas están más reguladas de lo esperado⁽²⁰⁾. Al analizarse el genoma en búsqueda de elementos regulatorios, se encontró que *S. coelicolor* cuenta con al menos 965 proteínas regulatorias (12.3%) en distintos sistemas de regulación⁽⁹⁾.

Estas proteínas regulatorias de *S. coelicolor* se clasifican de acuerdo al mecanismo de regulación (Figura 3). La mayoría de estas proteínas controlan la transcripción de proteínas efectoras u otras proteínas regulatorias⁽²¹⁾.

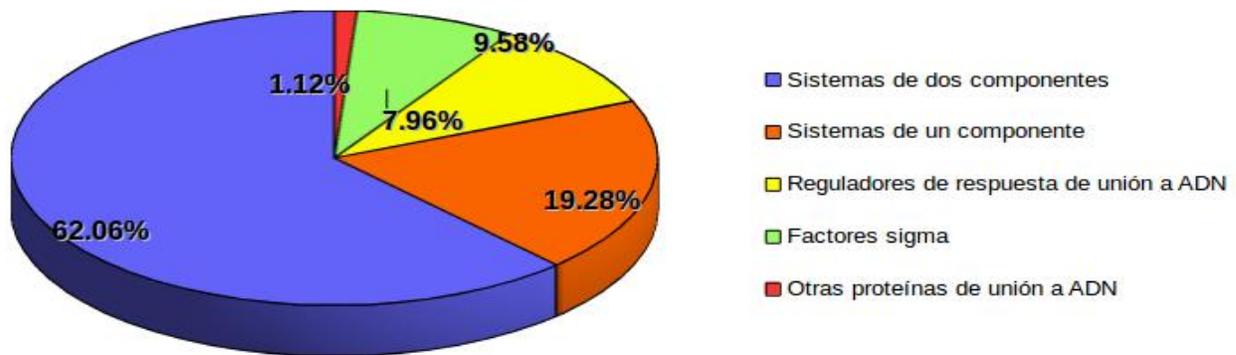


Figura 3. Clasificación de los diferentes sistemas regulatorios encontrados en el genoma de *S. coelicolor*.

Regulación catabólica por fuentes de carbono

La forma más sencilla en la que se puede regular la producción de antibióticos es la variación de los componentes y su concentración en el medio de cultivo. Se sabe que el inicio de la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos líquidos ocurre durante las etapas tempranas de la fase estacionaria, en respuesta al medio ambiente circundante, y puede ser afectada por la concentración de grupos fosfato, oxígeno, fuentes de carbono y nitrógeno, así como a la temperatura, el pH y la luz⁽²²⁾. También se sabe que en *Streptomyces* la fuente de carbono es uno de los factores más importantes para el control

del metabolismo secundario. Numerosos estudios reportan que en presencia de distintos carbohidratos, la fuente de carbono preferencial será consumida primero para la generación de biomasa y la producción de antibióticos será abatida. Posteriormente, durante la fase estacionaria, se consumirá la segunda fuente de carbono⁽²²⁾. Este efecto, denominado regulación catabólica por carbono (RCC), permite un mejor aprovechamiento de las fuentes de carbono disponibles en el momento, dando preferencia a las fuentes de carbono que se asimilan con mayor facilidad. Este efecto también depende de la concentración de la fuente de carbono preferencial, es decir, a bajas concentraciones, la fuente preferencial se agotará rápidamente y permitirá el aprovechamiento de la fuente de carbono menos favorable para la producción de antibióticos⁽²³⁾.

Se conocen varias proteínas que intervienen en la interrupción de la síntesis de antibióticos ante la presencia de glucosa, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual la glucosa afecta la síntesis de la actinorrodina y reprime el metabolismo de otras fuentes de carbono⁽²³⁻²⁵⁾.

Los diferentes estudios para comprender los mecanismos moleculares de la RCC llevaron a buscar cepas resistentes a este mecanismo. En 1982, Hodgson obtuvo distintas mutantes resistentes a 2-deoxiglucosa (Dog), un análogo tóxico a la glucosa. Las mutantes resistentes a Dog (mutantes Dog^R) eran insensibles a la RCC, siendo capaces de utilizar glicerol, arabinosa, galactosa y fructosa como fuente de carbono en presencia de altas concentraciones de glucosa. Debido a que el 85% de estas mutantes eran incapaces de crecer utilizando a la glucosa como única fuente de carbono, se concluyó que los mecanismos moleculares por los cuales estas cepas eran resistentes a la RCC les impedía el consumo de glucosa, siendo factible la afectación de alguna enzima indispensable para el metabolismo de glucosa⁽²³⁾. Al analizarse la actividad de la glucosa cinasa (GK) se encontró un decremento en su actividad⁽²⁶⁾, por lo que se cree que la incapacidad de las mutantes Dog^R para asimilar glucosa pudiera ser una deficiencia en la expresión de la GK. Para corroborar esta hipótesis se complementó a una mutante Dog^R con un fragmento de ADN, el cual contiene a los genes *gk* y *sco2127*, lo que ocasionó una recuperación de la actividad de GK, permitió el consumo de glucosa y recuperó el efecto de la RCC. Sin embargo, en estudios posteriores se comprobó que la complementación exclusiva con el gen *sco2126 (gk)* no implica la recuperación total de la RCC, por lo que se elucubra acerca de la importancia del gen *sco2127* en la RCC⁽²⁷⁾.

Participación de SCO2127 en la regulación catabólica por fuentes de carbono

El gen que codifica para la proteína SCO2127 se localiza en el fragmento mencionado anteriormente, por lo tanto, se ha sugerido que su presencia es esencial para la RCC por glucosa. En mutantes Dog^R de la cepa productora de doxorubicina, *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, se restableció completamente el transporte y consumo de glucosa sólo cuando se complementó con la proteína SCO2127 de *S. coelicolor*⁽²⁸⁾. Sin embargo, la proteína SCO2127 (191 aminoácidos) no cuenta con dominios de unión a ADN y carece de una función conocida. En la base de datos UniProt⁽²⁹⁾ SCO2127 aparece como una proteína no caracterizada y su secuencia de aminoácidos solamente posee similitud con sus ortólogos del género *Streptomyces*.

La baja identidad de secuencia que exhibe SCO2127 con cualquier proteína caracterizada hasta el momento dificulta la formulación de una hipótesis acerca de su funcionamiento, por lo que para conocer las implicaciones de esta proteína en el metabolismo de glucosa y en la regulación de la síntesis de antibióticos se eliminó el gen *sco2127* de *S. coelicolor*⁽³⁰⁾. El análisis de la mutante Δ *sco2127* reveló afectaciones en el crecimiento y en la producción de antibióticos, lo que sugiere que SCO2127 regula positivamente la producción de antibióticos. Sin embargo, estos estudios no han revelado el mecanismo molecular de SCO2127 y hasta el momento se desconoce cómo la ausencia del gen puede provocar un efecto pleiotrópico en la célula.

Adicionalmente, se realizó una comparación entre la mutante Δ *sco2127* y la cepa silvestre M145 usando distintos acercamientos a escala genómica, que incluyen transcriptómica y proteómica. En este estudio se encontraron cambios en la expresión de 179 transcritos y 208 proteínas (Figura 4) los cuales confirmaron que SCO2127 tiene un efecto pleiotrópico sobre el metabolismo de *S. coelicolor*⁽³¹⁾.

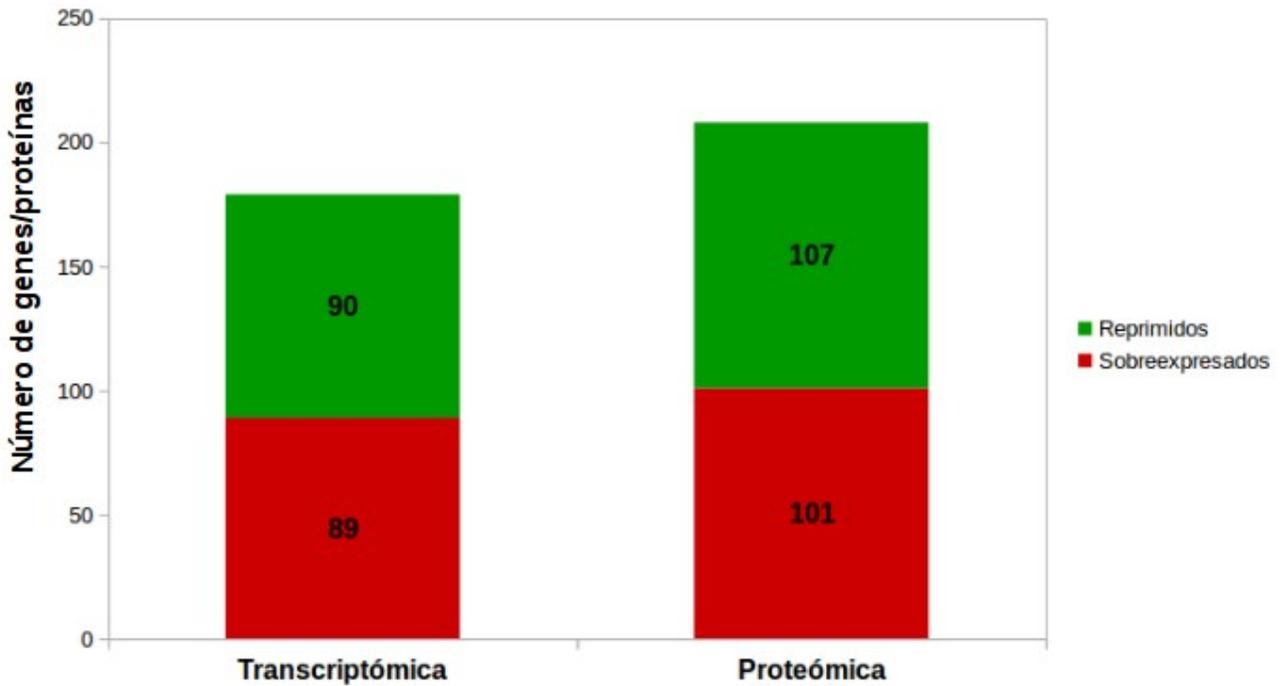


Figura 4 Proporción de transcritos y proteínas cuya expresión se vio alterada en la mutante Δ sco2127 con respecto a la cepa silvestre M145. En ambos casos se observa una proporción similar en la represión y la sobreexpresión de los genes.

Las proteínas expresadas diferencialmente entre la cepa silvestre y la mutante Δ sco2127 se agruparon de acuerdo a su función y se identificaron cinco proteínas con dominios de unión a ADN (Tabla 2), lo que advierte la presencia de redes subregulatorias en la mutante Δ sco2127 que estarían amplificando el efecto de SCO2127 en la célula. Entre estas proteínas destaca SCO0204, un posible regulador de respuesta de la familia LuxR, cuya expresión mostró un aumento significativo en la mutante Δ sco2127 con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere un papel protagónico de SCO0204 en la mutante Δ sco2127 e invita a profundizar en el estudio de este regulador de respuesta en dicha mutante.

Tabla 2. Proteínas con dominios de unión a ADN que cambiaron su expresión en la mutante Δ sco2127.

Gen	Proteína	Cambios en la expresión	
		Transcriptómica	Proteómica
<i>sco0204</i>	Posible regulador LuxR	+14.7	+3.36
<i>sco2440</i>	Posible regulador IclR	+3.38	+3.95
<i>sco2792</i>	AdpA, regulador transcripcional AraC		+3.30
<i>sco4158</i>	Posible regulador LacI		-2.15
<i>sco4493</i>	Posible regulador AsnC		-1.7

SCO0204 como ejemplo de un regulador LuxR

Generalmente, un regulador de respuesta forma parte de un sistema de dos componentes (TCS, del inglés *Two Components System*), integrado por una histidina cinasa (HK, del inglés *Histidine Kinase*) y un regulador de respuesta (RR). Estos elementos transcripcionales suelen encontrarse juntos en el genoma, pero también se ha observado la presencia de algunos RR sin una HK contigua, a estos RR se les denomina huérfanos⁽³²⁾. Ante cierto estímulo químico, la HK se auto fosforila y posteriormente transfiere su grupo fosfato al RR, el cual sufre cambios conformacionales que le permiten unirse al ADN y regular positiva o negativamente la transcripción de sus genes blanco⁽³³⁾.

El extremo C-terminal de la proteína codificada por el gen *sco0204* posee un dominio de unión a ADN característico de la familia de proteínas LuxR, caracterizado por su estructura terciaria hélice-giro-hélice (HTH, *Helix-Turn-Helix*). Los reguladores pertenecientes a esta familia, controlan genes blanco que participan en procesos tan diversos como la autoinducción (*quorum sensing*), síntesis de antibióticos, movilidad, nodulación, transferencia de plásmidos, bioluminiscencia y formación de biopelícula⁽³³⁾. En el otro extremo de SCO0204 (extremo N-terminal) se encuentra la región regulatoria, en donde se encuentra un residuo conservado de aspartato que funciona como receptor del grupo fosfato de la HK.

En 2009, Wang y colaboradores demostraron que la histidina cinasa codificada por el gen *sco0203*, localizado río abajo de *sco0204*, fosforila al regulador de respuesta SCO0204 así como al regulador de respuesta huérfano SCO3818, el cual carece de una histidina cinasa contigua⁽³²⁾. Estos autores además observaron que la eliminación del gen *sco0203* así como del sistema de dos componentes *sco0203/sco0204* tienen un efecto positivo en la producción de actinorrodina. Sin embargo no se ahonda acerca de los posibles genes blanco de SCO0204.

En otro estudio se observó la sobre expresión de SCO0204 en una cepa carente del gen *tdd8*, un gen que suele sobre expresarse cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés oxidativo⁽³⁴⁾. El análisis transcripcional de la mutante $\Delta tdd8$ también mostró la sobre expresión de dos grupos de genes, el primero, comprendido entre *sco0161* y *sco0181* y el segundo entre *sco0197* y *sco0220*. Estos genes contienen en su promotor una secuencia

de 15 nucleótidos conservados que forman un inverso repetido, separado por 2 nucleótidos no conservados (Figura 5). Este motivo es similar al del regulador DosR de *Mycobacterium tuberculosis*, un regulador transcripcional que se activa en condiciones de hipoxia, y que permite la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior del hospedero. La semejanza de SCO0204 con DosR permitió teorizar que SCO0204 estaría actuando como un regulador del estrés en condiciones de microaerobiosis, las cuales suelen hallarse en suelos poco ventilados^(35,36).

A pesar de haber realizado un acercamiento bioinformático distinto, Tierrafría y colaboradores encontraron el mismo sitio de unión del regulador SCO0204 (Figura 5b)⁽³¹⁾. Estos investigadores encontraron que al menos 23 genes, localizados entre *sco0167* y *sco0268*, podrían estar regulados por SCO0204, ya que poseen el posible sitio de unión en su región promotora (Tabla 3). Estas proteínas incluyen a SCO0204, lo que significaría un proceso de autorregulación, característico de los reguladores transcripcionales LuxR⁽³³⁾. Además, se encontraron proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrato, como el transportador de nitrato/nitrito NarK (*sco0213*) y el complejo de la nitrato reductasa NarG2H2I2J2 (*sco0216-19*). Este sistema ha sido descrito en otros modelos biológicos, principalmente en *Escherichia coli* K12 en donde el complejo de la nitrato reductasa (NarG) y el transportador de nitrato/nitrito (NarK) son controlados por el sistema de dos componentes NarL/NarX. Cabe señalar que NarL posee un 36% de identidad con respecto a SCO0204⁽³⁷⁾.

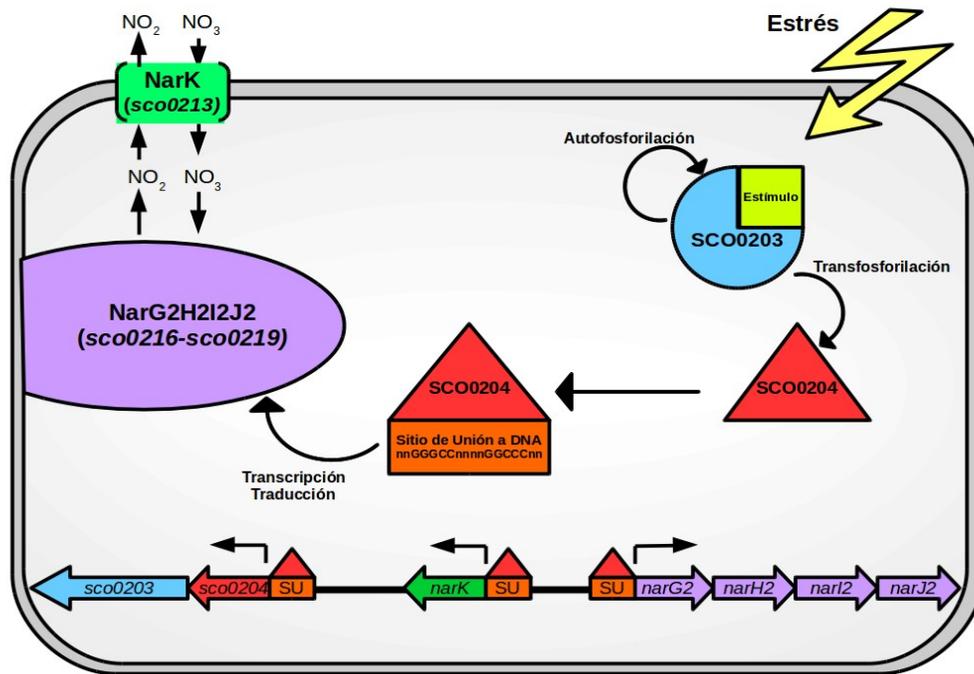


Figura 6. Mecanismo sugerido para la participación de SCO204 en la reducción de nitrato a nitrito. Las flechas negras indican el sentido de la transcripción.

Aunque *S. coelicolor* es un organismo aerobio, su genoma contiene tres complejos nitrato reductasa (NarGHI *sco6532-35*, NarG2H2I2 *sco0216-19* y NarG3H3I3 *sco4947-50*), de manera similar a las bacterias anaerobias o microaerobias. La presencia de estos complejos suponen para *S. coelicolor* una ventaja evolutiva que permite a la espora entrar en un estado de latencia en condiciones desfavorables, como la hipoxia.

Si bien *S. coelicolor* es incapaz de crecer en condiciones anaerobias, las esporas mantienen su viabilidad aún después de largos períodos de hipoxia. Fischer y colaboradores demostraron que esta viabilidad depende de la presencia de los complejos de la nitrato reductasa, al obtener una triple mutante (*nar1 nar2 nar3*), cuyas esporas son incapaces de sobrevivir a la hipoxia⁽³⁹⁾. En un estudio posterior, estos mismos investigadores demostraron, que la expresión de los tres complejos depende del estadio fisiológico de *S. coelicolor*. Ellos observaron que en esporas unicelulares se expresan los complejos Nar1 y Nar2, mientras que en micelio se observa la acción de los complejos Nar2 y Nar3. Sin embargo, también demostraron que Nar2 (*sco0216-0219*) es el complejo que está encargado de la reducción de nitrato a nitrito en condiciones de laboratorio.

Tabla 3. Expresión de distintos genes que contienen probables sitios de unión de SCO0204. En el caso del estudio realizado por Tierrafría y colaboradores se indica si la evidencia es transcriptómica (T) o proteómica (P).

Gen	Proteína	Cambios en la expresión	
		Tierrafría y colaboradores	Daigle y colaboradores
<i>sco0162</i>	Nitroreductasa		5.92
<i>sco0167</i>	Proteína hipotética	4.5 (T)	19.71
<i>sco0168</i>	Proteína regulatoria	28.7 (T)	27.13
<i>sco0169</i>	Proteína hipotética	16.2 (T)	18.07
<i>sco0170</i>	Cistationina β -sintasa		8.40
<i>sco0171</i>	Nicotinato fosforibosiltransferasa		4.93
<i>sco0172</i>	Proteína de estrés universal		3.47
<i>sco0173</i>	OsmC, regulador de la formación de puentes disulfuro		6.94
<i>sco0174</i>	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa		16.85
<i>sco0177</i>	Proteína de membrana	12.2 (T)	
<i>sco0179</i>	Alcohol deshidrogenasa	9.7 (T), 4.25 (P)	4.25
<i>sco0194</i>	Factor Sigma	-3.5 (T)	
<i>sco0195</i>	Lipoproteína	-2.3 (T)	
<i>sco0196</i>	Proteína hipotética		
<i>sco0197</i>	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa		7.10
<i>sco0200</i>	Proteína de estrés universal	5.0 (T)	13.49
<i>sco0199</i>	Alcohol deshidrogenasa		10.90
<i>sco0198</i>	Proteína de estrés universal		6.07
<i>sco0201</i>	Tiosulfato deshidrogenasa	5.0 (T)	10.24
<i>sco0204</i>	Regulador de respuesta LuxR	14.7 (T), 3.36 (P)	12.63
<i>sco0203</i>	Histidina cinasa		2.38
<i>sco0208</i>	Piruvato fosfato dicinasa		3.48
<i>sco0209</i>	Proteína hipotética	3.2 (T)	9.32
<i>sco0210</i>	Cistationina β -sintasa		4.00
<i>sco0211</i>	Similar a DosT		2.93
<i>sco0213</i>	Exportador de nitrito/nitrato	5.8 (T)	15.82
<i>sco0212</i>	Proteína hipotética	19.5 (T)	21.77
<i>sco0214</i>	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa	8.2 (T)	8.03
<i>sco0215</i>	Nitroreductasa		2.93
<i>sco0216</i>	Nitrato reductasa cadena α	7.2 (T), 4.16 (P)	4.16
<i>sco0217</i>	Nitrato reductasa cadena β	4.6 (T)	
<i>sco0218</i>	Nitrato reductasa cadena γ		
<i>sco0219</i>	Nitrato reductasa cadena δ	5.5 (T)	
<i>sco0268</i>	Proteína hipotética	5.1 (T)	
<i>sco3146</i>	Proteína secretada	-2.2 (T)	
<i>sco4183</i>	Transposasa	-2.1 (T)	
<i>sco4182</i>	D-tirosil-tRNA deacilasa		

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mutante $\Delta sco2127$ de *S. coelicolor* presenta afectaciones en su diferenciación morfológica y producción de actinorrodina. Así mismo, en esta mutante se encuentra elevada hasta 4 veces la concentración de nitrito en el medio de cultivo, con respecto a la cepa parental M145. Este nitrito parece ser producto de la reducción del nitrato por el complejo nitrato reductasa Nar2. Mediante un estudio bioinformático se propone que este complejo reductor se encuentra controlado por la proteína SCO0204, cuya expresión también se encuentra inducida en la mutante $\Delta sco2127$. Sin embargo, es necesaria evidencia experimental que demuestren la validez de nuestra hipótesis.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La proteína SCO0204 funciona como un activador transcripcional de los genes que permiten el transporte (NarK, *sco0213*) y la reducción (Nar2, *sco0216-0219*) del nitrato a nitrito en *S. coelicolor*, por lo que la eliminación del gen *sco0204* en el contexto genómico de la mutante Δ *sco2127* evitará la expresión de los genes NarK y Nar2, por lo que se reducirá significativamente la concentración de nitrito en el medio de cultivo y mejorará la diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina con respecto a la mutante sencilla Δ *sco2127*.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del regulador de respuesta SCO0204 en la formación de nitritos en *S. coelicolor* Δ sco2127.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir la mutante sencilla Δ sco0204::*aac(3)IV* de *S. coelicolor*.
- Construir la doble mutante Δ sco2127 Δ sco0204::*aac(3)IV* de *S. coelicolor*.
- Medir la concentración de nitritos y de actinorrodina, así como evaluar la diferenciación morfológica en las mutantes construidas y en sus cepas parentales

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

- Asas de cultivo.
- Cajas petri de plástico .
- Tubos de 600 μ L y 1.5 mL (Axygen).
- Tubos de 15 y 50 mL (Corning).
- Frascos de vidrio.
- Matraces Erlenmeyer 250 mL (Pyrex).
- Matraces bafleados de 250 y 500 mL (Sigma).
- Puntas de micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L (Axygen).
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 mL (Pyrex)

INSTRUMENTOS

- Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L (Eppendorf).
- Espectrofotómetro Genesis 10S UV-Vis (Thermo).
- Balanza analítica (Ohaus)
- Balanza semianalítica (Ohaus)

EQUIPOS

- Campana de flujo laminar (Veco)
- Agitadoras circulares G10 Gyrotory (New Brunswick Scientific)
- Microcentrifuga 5424 (Eppendorf)
- Macrocentrifuga Megafuge 16R (Thermo)
- Microscopio (Zeizz)
- Vortex Sybron (Thermolyne)
- Estufa Model 5851 (National Appliance Company)
- Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Cámaras de electroforesis con fuente de poder (BioRad)
- Electroporador ECM399 (BTX)

MEDIOS DE CULTIVO

- Luria-Bertani (LB)⁽⁴⁰⁾.
- R5⁽⁴¹⁾.
- 2xYT⁽⁴²⁾.
- YENB⁽⁴³⁾.
- Agar manitol harina de soya (MS)⁽⁴⁴⁾.
- Agar nutritivo Difco

REACTIVOS

- Geles de agarosa 0.8%
- Buffer de corrida TAE (Tris 48.4 g/L, ácido acético 11.42 mL/L, Na₂EDTA.2H₂O 7.44 g/L)
- Bromuro de etidio

- Solución I para miniprep (Sacarosa 103 g/L, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Tris 50 mM)⁽⁴⁵⁾.
- Solución II para miniprep (NaOH 0.2N, SDS 2%)⁽⁴⁵⁾.
- Solución III para miniprep (Acetato de sodio 3M, pH 4.5)⁽⁴⁵⁾.
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Solución de corrida SDS-PAGE (Tris 3 g/L, glicina 14.4 g/L, SDS 1 g/L)
- Solución de transferencia (glicina 28.8 g/L, Tris 6.04 g/L, metanol 100 mL/L)
- Solución TBS pH 7.5 (NaCl 43.8 g/L, Tris 30.25 g/L, Tween 20 1 g/L)
- RNAasa 20 mg/mL
- Fenol : cloroformo 1:1

DNA POLIMERASAS

- *Phire Hot Start II Polymerase* (Thermo)
- *Taq DNA Polymerase* (Thermo)
- *Expand High Fidelity PCR System* (Roche)
- *Pfu DNA Polymerase* (Thermo)

OTRAS ENZIMAS

- *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) (Invitrogen)
- *T4 DNA Ligase* (Promega)
- Enzima de restricción *SacI* (Thermo)

CEPAS

- *S. coelicolor* M145⁽⁹⁾.
- *S. coelicolor* Δ*sco2127*⁽³¹⁾.
- *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002⁽⁴²⁾.

- *E. coli* DH5 α ⁽⁴⁵⁾.
- *E. coli* BW25113/pIJ790⁽⁴⁶⁾.

TÉCNICAS

Eliminación del gen *sco0204* en la mutante Δ *sco2127* de *S. coelicolor*

Para la interrupción de genes en *S. coelicolor* se utiliza una adaptación del método descrito por Datsenko y Wanner en el año 2000⁽⁴⁶⁾. En este método, se aprovecha la capacidad del sistema de recombinasas del fago λ , compuesto por las recombinasas Gam, Bet y Exo (γ , β y *exo*), que permiten la integración de secuencias lineales de ADN con sitios de homología cortos. Este proceso se lleva a cabo en cósmidos, en donde se hace el reemplazo del gen deseado por un cassette, que contiene un gen de resistencia a un antibiótico y un origen de transferencia (*oriT*), que permite la transformación en *S. coelicolor* por medio de su conjugación con *E. coli*⁽⁴²⁾.

1. Diseño de oligómeros

La metodología inicia con el diseño de un par de oligómeros cuyo extremo 3' permite la amplificación de un cassette de resistencia, con el cual se reemplazará la región deseada. Por otra parte, el extremo 5' de los oligómeros posee una secuencia de 39 nucleótidos que permite la recombinación homóloga en el sistema de recombinasas λ -RED⁽⁴⁶⁾.

En el presente estudio se diseñaron los oligómeros d0204F y d0204R (Apéndice 1), los cuales permiten la amplificación del cassette de resistencia de apramicina del plásmido pIJ773, a la par que permite el reemplazo de 616 nucleótidos de los 702 nucleótidos que conforman al gen *sco0204*, lo que representa la eliminación del 87% del gen, respetando la posible secuencia promotora, así como la secuencia de inicio y de final de la transcripción.

Tras la verificación de la secuencia amplificada se purificó el producto de PCR con el sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) y se verificó su concentración.

2. Introducción del cósmido que contiene al gen *sco0204* en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790

Para llevar a cabo la recombinación homóloga, se utiliza el sistema de recombinación λ -RED, contenido en el plásmido pIJ790. Este plásmido tiene un promotor inducible con arabinosa, un carbohidrato que no puede metabolizar la cepa BW25113. Para lograr la correcta expresión del sistema, la inducción debe realizarse antes de la transformación del ADN que se desea recombinar, por lo que usualmente se añade la arabinosa en el cultivo utilizado para obtener las células electrocompetentes.

Un cósmido es un fragmento del genoma de *S. coelicolor* de alto peso molecular (aproximadamente 40 kb), circularizado por medio de un vector de 6,852 nucleótidos. Este conector permite la selección del cósmido nativo ya que contiene dos genes de resistencia que no se encuentran en el genoma de *S. coelicolor*: el gen de resistencia a kanamicina (*neo*) y el gen de resistencia a ampicilina (*bla*). El cósmido que contiene al gen *sco0204* es el cósmido StJ12 y contiene la región genómica comprendida entre los genes *sco0184* hasta *sco0221*.

Se transformaron 100 ng del cósmido StJ12, en una alícuota de células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790. Se colocaron en una celda para electroporación y se aplicó un voltaje de 1230 V durante cinco milisegundos. Las células se resuspendieron en un mililitro de medio LB frío y se incubaron a 30 °C por una hora. Las células se seleccionaron en agar LB con ampicilina (100 μ g/mL), kanamicina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL). Las colonias resistentes, se inocularon en cinco mililitros de medio YENB con ampicilina (100 μ g/mL), kanamicina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (25 μ g/mL) y se incubaron 16 horas a 30° con agitación constante. A partir de este preinóculo, se inoculó un cultivo de 50 mL de medio YENB adicionado con arabinosa 10 mM y con los antibióticos correspondientes, para realizar células electrocompetentes de acuerdo con protocolos conocidos⁽⁴⁵⁾.

3. Recombinación homóloga

Se transformaron 100 ng del producto de PCR purificado en una alícuota de células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790/StJ12. Se les aplicó un voltaje de 1230 V durante 5 milisegundos. Se añadió un mililitro de medio LB frío y se incubaron a 37°C

durante una hora. Las candidatas recombinantes se seleccionaron en placas de agar LB con apramicina (50 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas. Una colonia resistente se inoculó en cinco mililitros de medio LB con apramicina (50 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL), los cuales se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación constante. De este cultivo se extrajo el cósmido mutado usando el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

4. Verificación del cósmido mutado

El genotipo del cósmido mutado se confirmó por patrón de restricción enzimática con la enzima *SacI* y se comparó con el patrón de restricción del cósmido nativo StJ12. El cósmido mutado fue nombrado StJ12 Δ *sco0204::aac(3)IV*.

5. Transformación del cósmido mutado en *S. coelicolor*

S. coelicolor posee un potente sistema de restricción por metilación, por lo que el cósmido a conjugarse debe ser desmetilado antes de transformarse en *S. coelicolor*. Para ello se usa la cepa no metilante *E. coli* ET12567, la cual contiene además el plásmido pUZ8002, el cual codifica un pili sexual que permite llevar a cabo el intercambio del material genético entre *E. coli* y *S. coelicolor* mediante la conjugación. Una vez transferido el ADN entre *E. coli* y *S. coelicolor*, se lleva a cabo una recombinación homóloga entre el cósmido StJ12 interrumpido y el genoma de *S. coelicolor*. Esta recombinación homóloga se ve favorecida por la presencia de MgCl₂ 10 mM, debido a que la excesiva presencia de este ión favorece la promiscuidad de la ADN polimerasa.

Se transformaron 900 ng del cósmido mutado con una alícuota de células electrocompetentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 y se les aplicó un voltaje de 1230 V durante cinco milisegundos. Se recuperaron en un mililitro de medio LB y se incubaron a 37 °C durante una hora. Se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y apramicina (µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. A partir de colonias aisladas, se inocularon 5 mL de medio LB con cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y apramicina (µg/mL). Con uno de estos preinoculos se inoculó un cultivo de 50 mL de LB con cloranfenicol (25 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y apramicina (50 µg/mL). Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0.4. El cultivo se cosechó, se lavó y finalmente se resuspendió en un mililitro de medio LB.

Por otro lado, se suspendieron 200×10^6 esporas de *S. coelicolor* en 500 μ L de medio 2xYT y fueron sometidas a un shock térmico a 50°C durante 10 minutos, tras lo cual se enfriaron y se mezclaron con 500 μ L de las células obtenidas previamente *E. coli* ET12567/pUZ8002/StJ12 Δ sco0204::aac(3)IV. La mezcla de células se centrifugó brevemente a 6,800 x g y se desechó el sobrenadante, las células se suspendieron en un mililitro de agua y se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-4} en un mililitro de agua. Cada una de las diluciones se colocó en una placa de MS con $MgCl_2$ 10 mM y se incubaron 16 horas a 29°C. A las 16 horas de incubación, cada placa se inundó con un mililitro de agua con apramicina (50 μ g/mL) y ácido nalidixico (20 μ g/mL) y se prosiguió la incubación a 29 °C hasta observarse colonias en las placas.

6. Selección de exconjugantes

Tras la conjugación, se seleccionaron las candidatas con un fenotipo resistente a apramicina ($Apra^R$) y sensible a kanamicina (Kan^S), en donde se buscó la integración del cassette de resistencia a apramicina y la eliminación del adaptador de *E. coli* con la resistencia a kanamicina. Se verificó su resistencia estriándolas en placas de agar DNA con apramicina (50 μ g/mL) y en placas de agar DNA con kanamicina (50 μ g/mL). Se seleccionaron candidatas $Apra^R$ y Kan^S y se estriaron en medio MS con apramicina y ácido nalidixico. Una colonia sencilla se propagó en placas de MS con apramicina, para formar un cultivo coalescente y a partir de un fragmento de este cultivo se realizó PCR de colonia.

Tras verificarse el genotipo de la cepa deseada, se cosecharon las esporas para la evaluación posterior de la cepa.

Evaluación de las cepas mutantes en medio de cultivo sólido

Para el análisis de la diferenciación morfológica de las diferentes cepas, se uso el medio R5 adicionado con arabinosa. Se colocaron 50×10^6 esporas en la placa y se esparcieron con un cotonete estéril. Se tomaron fotografías cada 24 horas hasta las 120 horas.

Cinéticas de crecimiento

Para el análisis del crecimiento de cada cepa también se usó el medio R5 suplementado con arabinosa⁽⁴¹⁾. Se colocaron 50 mL del medio en un matraz de bafle chico de 250 mL y

se inoculó cada matraz con 200×10^6 esporas. Se incubaron a $29\text{ }^\circ\text{C}$, con agitación constante a 200 rpm.

1. Cuantificación de biomasa

La biomasa se cuantificó por el método de peso seco. Se secaron círculos de papel filtro de cinco centímetros de diámetro a $80\text{ }^\circ\text{C}$, los cuales se pesaron cada 24 horas hasta observar una variación menor a 0.5 mg. Se filtraron dos mililitros de cultivo y la biomasa retenida se enjuagó con 5 mL de agua destilada. El papel se secó nuevamente a $80\text{ }^\circ\text{C}$ y se peso cada 24 horas durante tres días hasta llevarse a peso seco.

2. Cuantificación de actinorrodina

Un mililitro de muestra se colocó en un tubo de 15 mililitros. Se añadieron 500 μL de KOH 3N, se agitó en vortex y se dejó en agitación constante durante 16 horas a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras se centrifugaron a $16,000 \times g$ durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. La absorbancia del sobrenadante se midió en un espectrofotómetro de luz visible a 640 nm, usando KOH 1N como blanco.

3. Cuantificación de nitritos

Para la cuantificación de nitritos se usó una adaptación de la técnica de Griess-Ilosvay⁽⁴⁷⁾. Se tomaron 658 μL de muestra y se añadieron 282 μL de nitrito de sodio 100 μM para obtener una concentración conocida de nitrito de sodio de 30 μM . Se añadieron 30 μL del reactivo 1 (ácido sulfanílico 10% en ácido acético 5 N) y la reacción se incubó durante 5 minutos a $45\text{ }^\circ\text{C}$. Después se añadieron 30 μL del reactivo 2 (N,N-1-dimetil naftilamina 10%, en ácido acético 5 N) y la mezcla se incubó 10 minutos a $43\text{ }^\circ\text{C}$. La absorbancia de la muestra se cuantificó a 530 nm en un espectrofotómetro de luz visible, usando como blanco 940 μL de medio R5 suplementado con arabinosa.

VII. RESULTADOS

ELIMINACIÓN DEL GEN *sco0204* de *S. coelicolor*

Se amplificó el cassette de resistencia a apramicina con los oligomeros d0204F y d0204R (Apéndice 1), usando como templado al plásmido pIJ773⁽⁴²⁾. Se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla A2.1 (Apéndice 2), usando el sistema *Expand High Fidelity PCR System de Roche*. El producto de PCR resultante fue de aproximadamente 1447 nucleótidos (Figura 7).

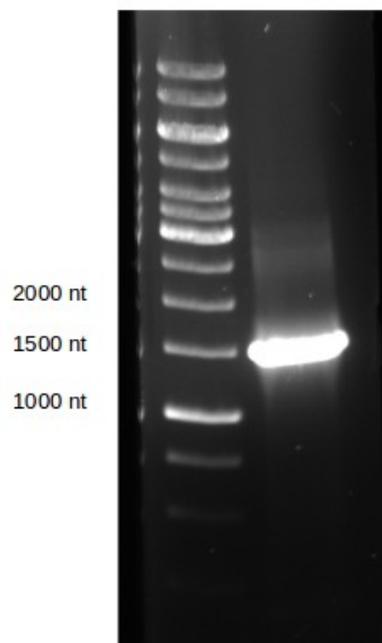


Figura 7. PCR de amplificación del cassette de resistencia a apramicina con los oligomeros d0204F y d0204R. Se observan el marcador de peso molecular (izquierda) y el cassette de resistencia amplificado (derecha).

El cósmido StJ12 se transformó en la cepa BW25113/pIJ790, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Así mismo, el producto de PCR purificado se transformó en la cepa

BW25113/pIJ790/StJ12 y se seleccionaron las candidatas resistentes a apramicina. Se extrajo el cósmido y este se digirió con la enzima de restricción *SacI*. Al compararse el cósmido mutado (StJ12 Δ sco0204::*aac(3)IV*) con el cósmido nativo (StJ12) se observó un patrón de digestión que muestra diferentes bandas, destacando las bandas con pesos moleculares de 9,836 y 6,158 en el cósmido mutado, las cuales indican el reemplazo del gen *sco0204* con el cassette de resistencia a apramicina (Figura 8).

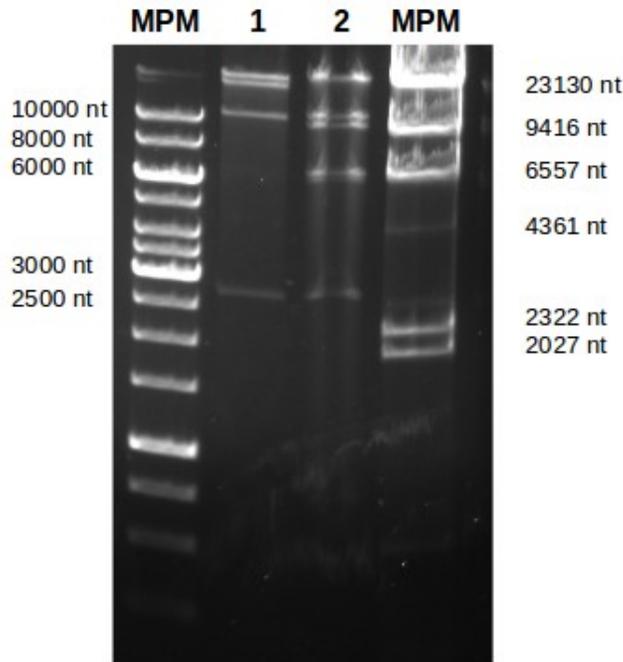


Figura 8. Digestión con *SacI* del cósmido nativo (1) y del cósmido con el reemplazo del cassette de resistencia a apramicina (2).

El cósmido mutado se transformó en la cepa ET12567/pUZ8002 para su posterior conjugación con las cepas Δ sco2127 y M145. Se seleccionaron dos candidatas con el fenotipo Apra^R Kana^S y se analizaron por PCR con los oligomeros cp0204F y cp0204R (Apéndice 1), de acuerdo a las condiciones de la Tabla A2.2 (Apéndice 2).

Esta PCR amplificó un producto de 1221 nucleótidos en el caso de las cepas que conservaron el gen *sco0204*, mientras que las candidatas con el reemplazo adecuado mostraron un producto de 1921 nucleótidos (Figura 9). Las cuatro candidatas probadas tuvieron el reemplazo del gen *sco0204* por el gen de resistencia a apramicina.

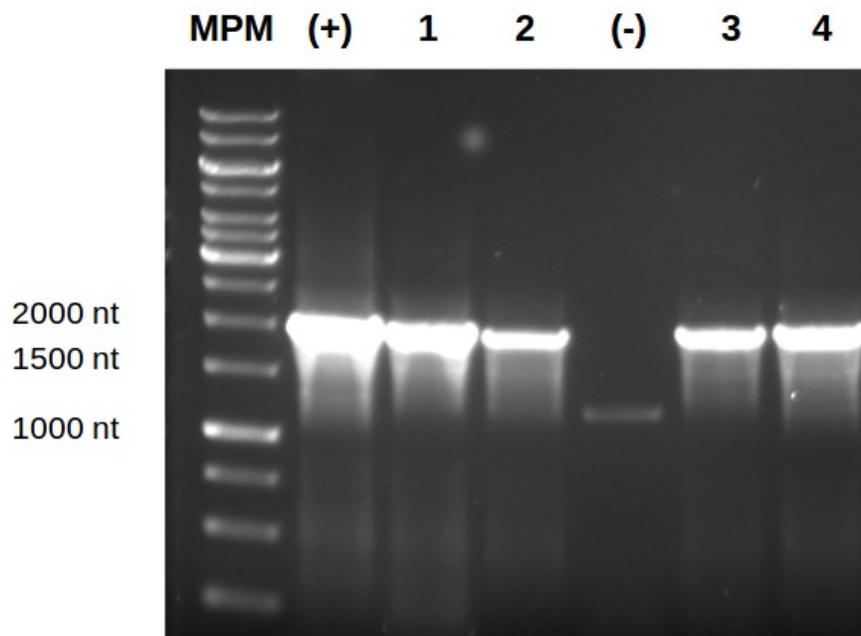


Figura 9. Comprobación por PCR de las candidatas con el reemplazo del gen *sco0204* en la mutante Δ *sco2127* (Carriles 1 y 2) y en la cepa silvestre M145 (Carriles 3 y 4). Como control positivo se usó el cósmido mutado StJ12 Δ *sco0204::aac(3)IV* y como control negativo se usó ADN cromosómico de M145.

Se seleccionó a una de las candidatas con el fenotipo y el genotipo deseado, para verificar la ausencia del gen *sco0204*. Esta verificación se realizó con el objetivo de descartar una recombinación sencilla, en la que se observaría la presencia del cassette de resistencia y del gen *sco0204*. Para ello se seleccionaron los oligomeros cp0204F e in0204R, alineados dentro del gen *sco0204* (Apéndice 1). Esta reacción se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla A2.3 (Apéndice 2). En ausencia del gen *sco0204* del genoma, se esperaría la ausencia de cualquier producto de amplificación, mientras que en presencia del gen *sco0204* se espera un producto de 818 nucleótidos. En el caso de las dos candidatas seleccionadas previamente se observó la ausencia del gen *sco0204* (Figura 10), por lo que, en conjunto con la evidencia de la PCR que verificó la integración del cassette de resistencia, se pudo aseverar el correcto reemplazo del gen *sco0204* por el cassette de resistencia a apramicina.

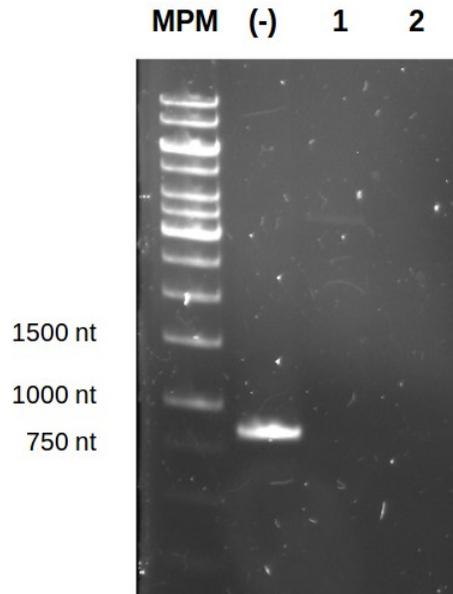


Figura 10. Comprobación de la eliminación del gen *sco0204* en la mutante Δ *sco2127* (Carril 1) y en la cepa parental M145 (Carril 2). Como control negativo se uso ADN cromosómico de M145.

La mutante del gen *sco0204* en la cepa mutante Δ *sco0204* se denominó a partir de este punto como Δ *sco2127* Δ *sco0204*, mientras que la cepa con la eliminación en M145 se denominó como Δ *sco0204*. Después se cosecharon esporas de estas cepas para su evaluación en medio sólido y líquido.

EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA EN MEDIO SÓLIDO

La mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ y la mutante sencilla $\Delta sco0204$ se evaluaron en medio sólido, para apreciar los cambios en la diferenciación morfológica, con respecto a sus cepas parentales $\Delta sco2127$ y M145, respectivamente (Figura 11).

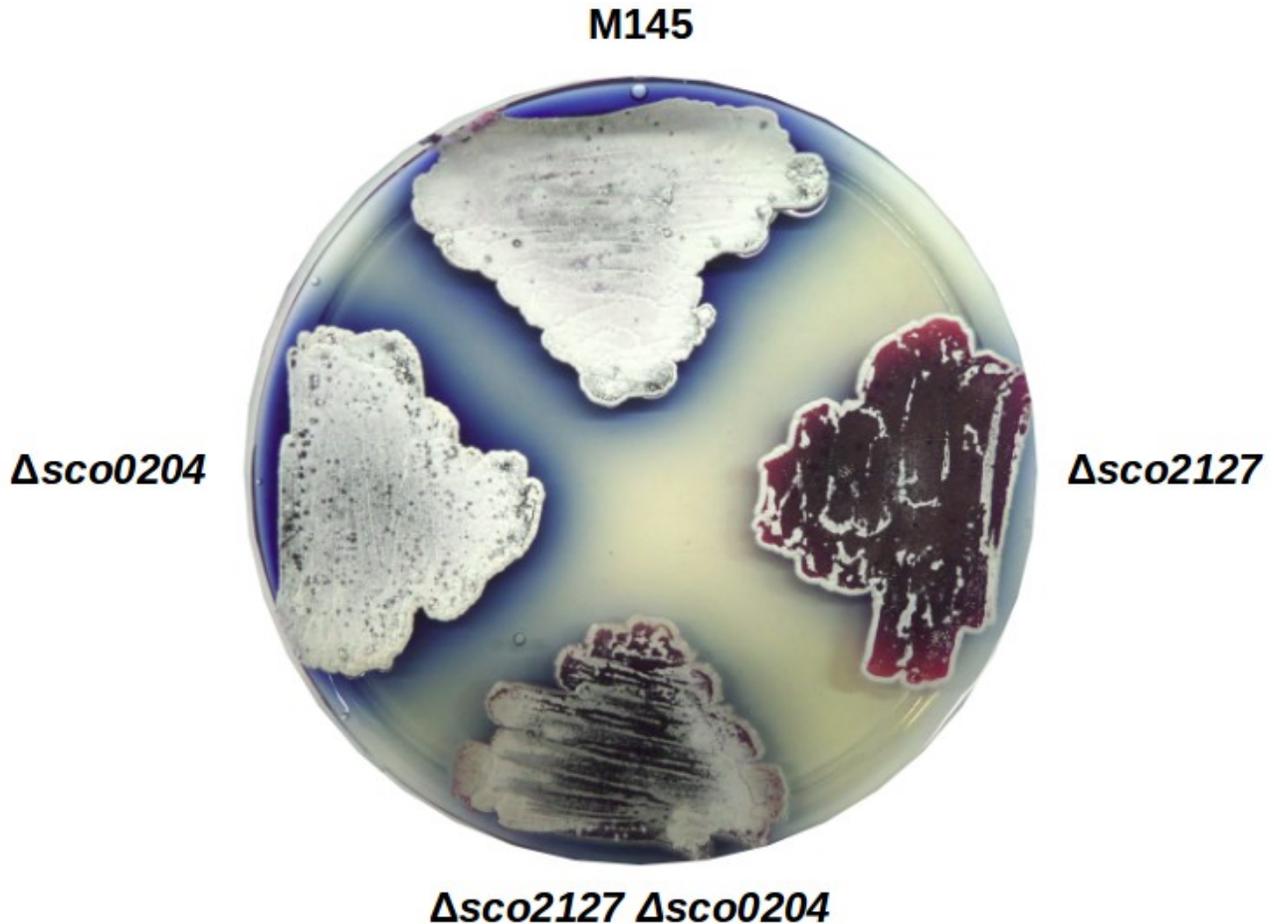


Figura 11. Evaluación de la diferenciación morfológica de las cepas mutantes $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ y $\Delta sco0204$, con sus cepas parentales $\Delta sco2127$ y M145, respectivamente.

Esta evaluación se realizó por triplicado y en todos los casos se observó una evidente mejora en la diferenciación morfológica en la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ con respecto a su cepa parental. En esta doble mutante se observa la presencia de micelio aéreo, el cual se observa como una superficie blanquecina, a diferencia del micelio vegetativo, de color rojo oscuro, observado en la vasta mayoría de la superficie de la mutante $\Delta sco2127$. Además, se evidencia la presencia de actinorrodina en la forma de un

halo de color azul alrededor de la estría de la doble mutante, sin embargo, no es un halo significativamente más grande que el observado para la mutante $\Delta sco2127$. Por otra parte, en la mutante $\Delta sco0204$ no se observaron diferencias en la formación de micelio aéreo ni en la formación de actinorrodina con respecto a la cepa parental M145.

EVALUACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Se evaluó el crecimiento de las diferentes cepas en medio líquido R5 suplementado con arabinosa, estos cultivos se realizaron por triplicado y se presenta su promedio con su desviación estándar (Figura 12).

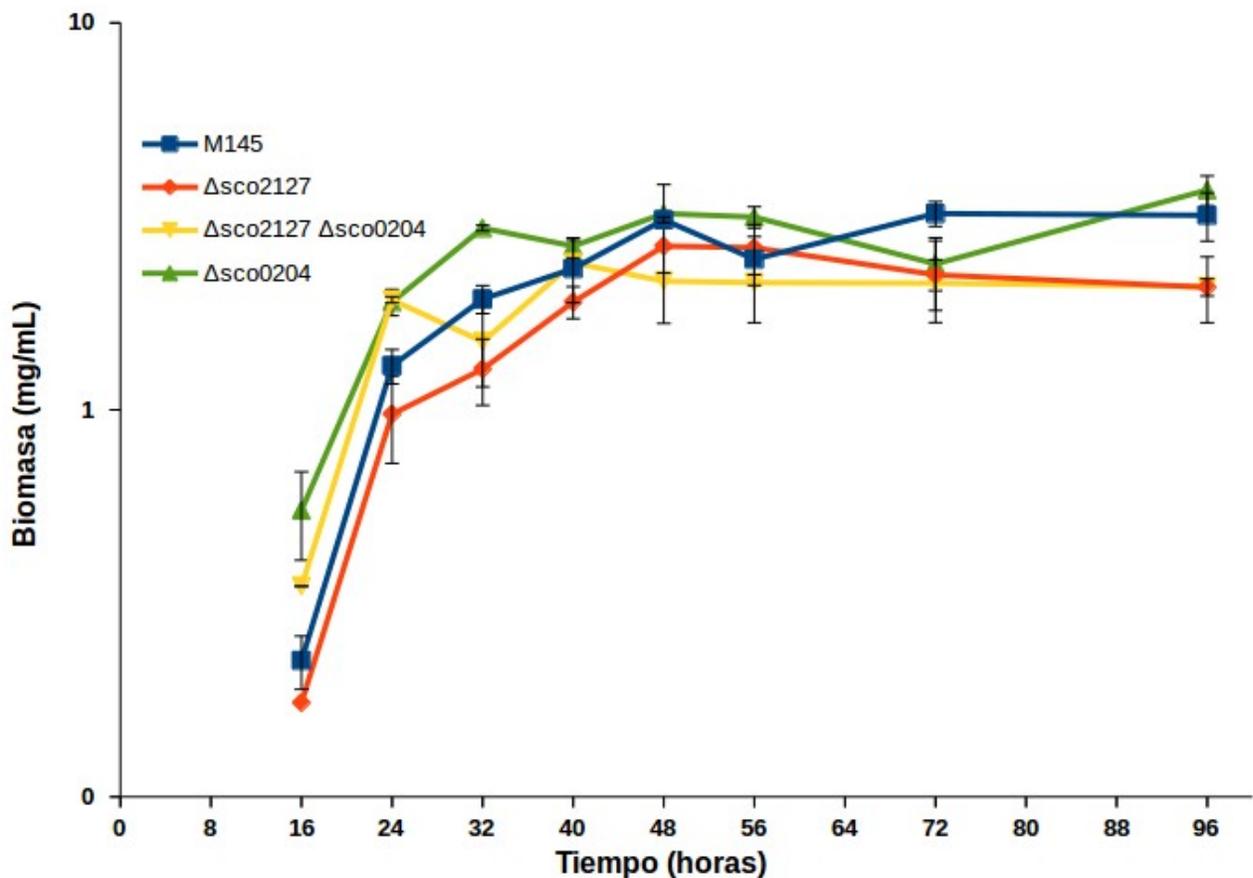


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ y $\Delta sco0204$, en comparación con sus cepas parentales $\Delta sco2127$ y M145.

Con base en los promedios y desviaciones estándar obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento en la fase exponencial, la duración de la misma y la máxima biomasa alcanzada para cada cepa (Tabla 4).

La curva de crecimiento de la mutante $\Delta sco2127$ presentó una disminución en la tasa de crecimiento, con respecto a la cepa silvestre, de hasta el 58% ($p < 0.05$, Prueba de Tukey para múltiples variables). Sin embargo, la biomasa máxima alcanzada no presentó afectaciones.

Al eliminarse el gen *sco0204* de la mutante $\Delta sco02127$ no se observaron cambios en la tasa de crecimiento con respecto a su cepa parental, pero si se observó una disminución en la duración de la fase exponencial, de al menos 8 horas. Cabe señalar que la biomasa máxima alcanzada en la doble mutante tampoco se vio aumentada con respecto a $\Delta sco2127$.

Por otra parte, la mutante sencilla $\Delta sco0204$ no mostró cambios en la tasa de crecimiento ni en la cantidad de biomasa alcanzada en su punto máximo, con respecto a su cepa parental M145.

Tabla 4. Características cinéticas del crecimiento de las mutantes analizadas en este estudio en medio líquido R5 modificado con arabinosa.

Cepa	Velocidad de crecimiento (h^{-1})	Duración de fase exponencial (horas)	Biomasa máxima (mg/mL)
M145	0.1028 ± 0.0063	16	3.2167 ± 0.2363
$\Delta sco2127$	0.0437 ± 0.0056^a	24	2.65 ± 0.3905
$\Delta sco2127$ $\Delta sco0204$	0.0595 ± 0.0185^a	16	2.4 ± 0.0707^a
$\Delta sco0204$	0.0824 ± 0.0133^b	16	3.7 ± 0.3279^{bc}

^a Significativo con respecto a M145 (Prueba de Tukey para múltiples variables, $p < 0.01$)

^b Significativo con respecto a $\Delta sco2127$ (Prueba de Tukey para múltiples variables, $p < 0.01$)U+0020

^c Significativo con respecto a $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ (Prueba de Tukey para múltiples variables, $p < 0.01$)

Además del crecimiento, se evaluó la producción del antibiótico colorido actinorrodina en el punto álgido de la producción de actinorrodina, a las 96 horas de crecimiento (Figura 13). Tomando como producción basal la observada en la cepa M145, se observó una disminución de hasta el 89% en la cepa $\Delta sco2127$. Al eliminar el gen *sco0204* de la cepa mutante $\Delta sco2127$ no se observó un cambio en la producción de actinorrodina. Por otra parte, al eliminarse el gen *sco0204* de la cepa silvestre M145 se observó una disminución en la producción de actinorrodina del 54% ($p < 0.05$, Prueba de Tukey para múltiples variables).

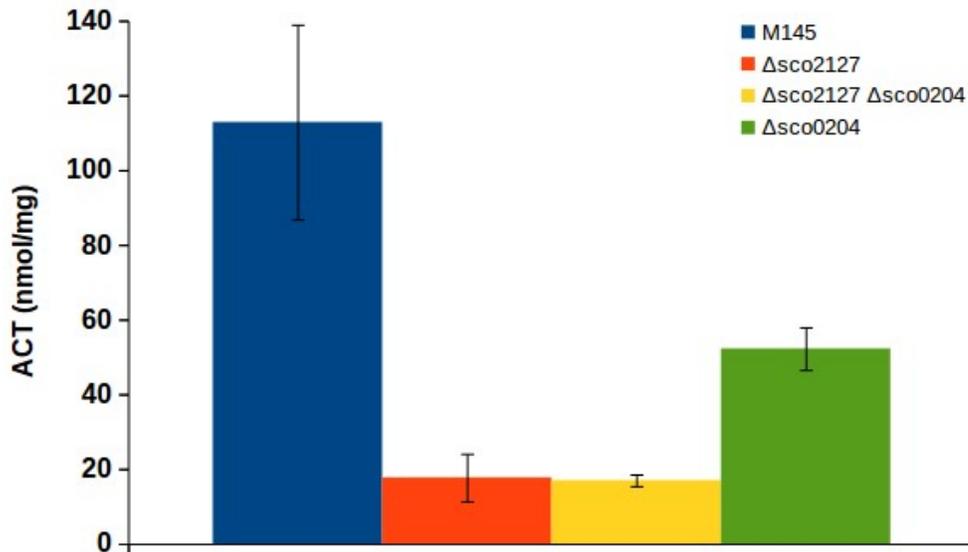


Figura 13. Producción específica de actinorrodina a las 96 horas de crecimiento. La actinorrodina se determinó por espectrofotometría de luz visible en medio alcalino.

Como parte central de este estudio se evaluó la presencia de nitritos en el medio de cultivo a las 40 horas de cultivo. La medición se realizó en este tiempo para permitir la comparación con el estudio previo, realizado por Tierrafría y colaboradores (Figura 14).

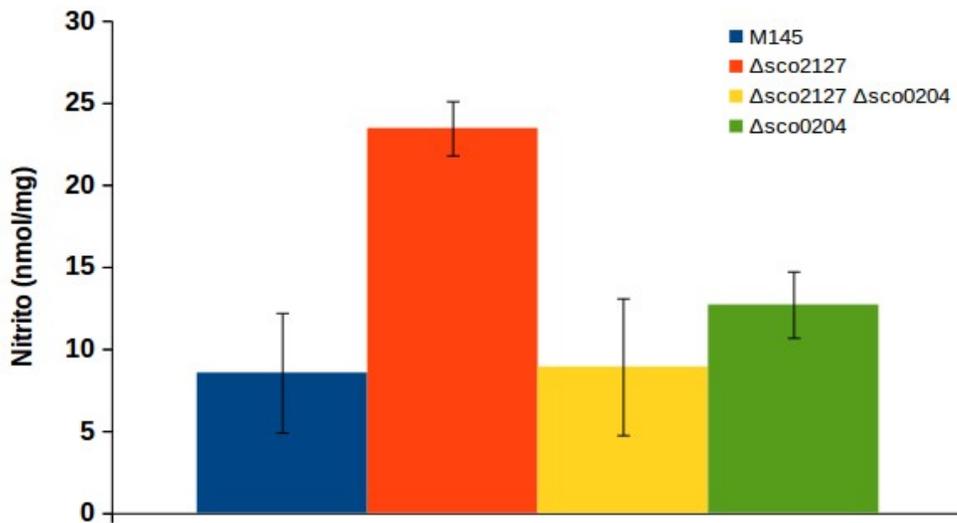


Figura 14. Producción específica de nitrito a las 40 horas de crecimiento. El nitrito se determinó por una adaptación del método de Griess-Ilosvay

Se observó un incremento en la producción de nitrito en la mutante $\Delta sco2127$ de hasta el 64% ($p < 0.05$, Prueba de Tukey para múltiples variables), con respecto a la cepa silvestre M145. Al eliminar el gen *sco0204* de la mutante $\Delta sco2127$ se abatió la producción de nitrito hasta los niveles basales, comparables con los de la cepa silvestre M145 ($p < 0.05$, Prueba de Tukey para múltiples variables). Por otra parte, la mutante sencilla $\Delta sco0204$ no mostró diferencia con respecto a la cepa silvestre M145.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados descritos en este estudio dan pie a un estudio más profundo de la producción y los efectos del nitrito en este organismo unicelular.

Por una parte, se observa que la mutante $\Delta sco0204$ presenta una concentración basal de nitrito, equiparable a la concentración observada en M145. Si bien, es conocido que sólo se logra un abatimiento total de la reducción de nitrato al eliminarse los tres complejos de nitrato reductasa presentes en *S. coelicolor*⁽³⁹⁾, al no encontrarse cambios en la expresión en los complejos Nar1 (*sco6532-35*) y Nar3 (*sco4947-50*) en la mutante $\Delta sco2127$, se asumió la ausencia de actividad por parte de estos complejos al inicio del estudio. Con la observación realizada en el presente estudio se puede concluir que aún existe una actividad nitrato reductasa presente en la célula. Esta actividad podría ser causada por el complejo Nar2, indicando que el control de este complejo no depende completamente de SCO0204. Sin embargo, este nitrito también podría ser resultado de la actividad de los complejos Nar1 y Nar3, cuya actividad podría dar lugar a una formación mínima del ión nitrito.

También, se observó una disminución en la producción de nitrito en la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$, con respecto a su parental $\Delta sco2127$, por lo que se puede concluir que SCO0204 regula la producción de nitrito a través de su reducción y de su exportación en la mutante $\Delta sco2127$. Para obtener una cuantificación más sensible y poder estudiar a mayor detalle los efectos de la eliminación del gen *sco0204* sobre el crecimiento y la producción de actinorrodina de la mutante $\Delta sco2127$, se sugiere la realización de cinéticas en un medio de cultivo líquido, adicionado con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Estos experimentos permitirán la apreciación de las capacidades reductoras de *S. coelicolor* en presencia de nitrato de sodio, un componente común de los medios de

cultivo⁽⁴⁴⁾, así como si un aumento en la concentración de nitrito de sodio implica un deterioro en el crecimiento en las distintas cepas obtenidas en el presente estudio.

El nitrito es un ión inorgánico que resulta tóxico para las células⁽⁴⁸⁾ y en la mutante $\Delta sco2127$ podría ser un indicador de estrés oxidativo en la célula. Este estrés oxidativo podría tener como consecuencia afectaciones en la diferenciación morfológica, el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios⁽³⁹⁾, efectos observados en la mutante $\Delta sco2127$. En estudios previos, se observó que al añadir nitrito de sodio al medio de cultivo se afectó la diferenciación morfológica (formación de micelio aéreo y esporulación), así como la producción de actinorrodina en medio sólido⁽⁴⁹⁾.

Al eliminar el gen *sco0204* de la mutante $\Delta sco2127$ se esperaba una desregulación del complejo nitrato reductasa, una disminución de la concentración de nitrito y un mejoramiento en la diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina. Acorde con esta hipótesis, la diferenciación morfológica se ve ligeramente mejorada en la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$, con respecto a la mutante $\Delta sco2127$. Sin embargo, a simple vista no se observan diferencias en la producción de actinorrodina, evidenciada como un halo de color azul alrededor de la estría. Por otra parte, al quitar el gen *sco0204* de la cepa silvestre M145 no se observan cambios en la esporulación ni en la producción de actinorrodina. Considerando que no hay cambios significativos en la producción de nitrito ni en la diferenciación morfológica de la mutante $\Delta sco0204$ con respecto a la cepa silvestre, puede pensarse que *SCO0204* actúa sólo como un regulador del estrés oxidativo de la célula y no desempeña un papel importante en la regulación de la esporulación ni de la producción de actinorrodina. De esta manera, se puede concluir que el efecto positivo observado en la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ se debe a la disminución del nitrito en el medio de cultivo y que este efecto no está relacionado con la regulación de algún gen involucrado directamente con la diferenciación morfológica.

Al evaluar el crecimiento en medio líquido, no se observaron cambios en la velocidad de crecimiento ni en la cantidad de biomasa máxima alcanzada, al compararse las mutantes M145 contra $\Delta sco0204$ y la mutante $\Delta sco2127$ contra $\Delta sco2127 \Delta sco0204$. En consonancia con las observaciones en medio sólido, la falta de cambios en las tasas de crecimiento y en el rendimiento de biomasa observado, indica que *SCO0204* no está implicado en procesos celulares que afecten directamente el desarrollo. Así mismo, la disminución en el nitrito extracelular, no parece afectar el crecimiento. En estudios previos,

se ha observado que concentraciones de nitrito superiores a 25 mM de nitrito de sodio afectan el crecimiento de *S. coelicolor*⁽³⁹⁾. Sin embargo, las concentraciones encontradas en nuestro medio de cultivo se encuentran en el orden de nmol/mL, por lo que no se observó el efecto deletéreo del nitrito sobre el crecimiento en medio líquido.

Al analizarse la producción de actinorrodina, no se observaron cambios significativos en la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ con respecto a la mutante $\Delta sco2127$. En contraste, la producción de actinorrodina en la mutante $\Delta sco0204$ se observa disminuida en un 50%, con respecto a la cepa M145. Este resultado contrasta con los resultados encontrados por otros investigadores, quienes eliminaron los genes *sco0203/sco0204* y observaron una acumulación de actinorrodina en comparación con la cepa silvestre M145⁽³²⁾. Esta diferencia en la producción de actinorrodina con respecto a nuestros resultados puede deberse al papel regulatorio que la histidina cinasa SCO0203 ejerce sobre SCO0204 y sobre otros reguladores transcripcionales que no se encuentran cerca de su entorno genómico, como SCO3818⁽³²⁾.

El sistema de dos componentes SCO0204/SCO0203 es análogo al sistema de dos componentes DosR/DosS en *M. tuberculosis*. Este sistema ha sido ampliamente estudiado en *M. tuberculosis*, en donde, ante la hipoxia generada por el sistema inmune de los organismos hospederos de esta bacteria, el sistema DosR/DosS desencadena la expresión de diversos genes encargados de contrarrestar el efecto de la hipoxia y de los radicales libres de oxígeno⁽⁵⁰⁾. De manera similar, se ha teorizado que el sistema de dos componentes SCO0204/SCO0203 de *S. coelicolor* se activaría como respuesta a condiciones de hipoxia, consecuencia de las condiciones encontradas en un medio hostil como el suelo, donde habitan regularmente⁽⁵¹⁾. La regulación ejercida por SCO0204, y de su ortólogo DosR en *M. tuberculosis*, permitiría a estos actinomicetos aerobios estrictos sobrevivir a las condiciones de hipoxia que habitualmente se encuentran en sus nichos ecológicos respectivos .

IX. CONCLUSIONES

- A través de los resultados obtenidos en la determinación de nitrito en las distintas cepas, se confirmó nuestra hipótesis, en la cual se teorizaba acerca del papel del regulador SCO0204 como activador en la reducción del nitrato a nitrito llevada a cabo por el complejo de la nitrato reductasa Nar2 (NarG2H2I2J2)⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, las razones por las que este regulador se encuentra inducido en la mutante $\Delta sco2127$ aún son desconocidas.
- Así mismo, se ha obtenido evidencia experimental, que confirma que el sitio de unión predicho *in silico* es válido para los genes NarG2H2I2. Sin embargo, hace falta evidencia experimental de la regulación de SCO0204 sobre los otros posibles genes blanco, como NarK, SCO0177 y SCO0179, por lo que se sugiere el uso de qRT-PCR para evaluar la expresión de estos y otros genes, validando los resultados obtenidos en el presente estudio. Además, se sugiere la realización de un EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*, ensayo de cambio de la movilidad electroforética), en donde se confirmaría la unión precisa de SCO0204 a los sitios de unión predichos mediante el análisis bioinformático.
- Respecto a las afectaciones en el crecimiento celular por nitrito, se concluye que las concentraciones observadas en el presente estudio no bastan para desencadenar un efecto deletéreo en el crecimiento y en la formación de actinorrodina. Sin embargo, en medio sólido si se observan cambios en la diferenciación morfológica, por lo que se concluye que SCO0204 afecta a la diferenciación morfológica en condiciones de estrés oxidativo, ya sea directa o indirectamente a través de la producción de nitrito.

X. PERSPECTIVAS

- Determinar la actividad o expresión de los complejos Nar1, Nar2 y Nar3 en la mutante sencilla $\Delta sco0204$ con respecto a su cepa parental M145
- Realizar cinéticas en medio mínimo con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, para evaluar la capacidad reductora de las cepas carentes de *sco0204*, así como de la cepa mutante $\Delta sco2127$.
- Evaluar la expresión de los genes blanco, como NarK, SCO177 y SCO179, mediante qRT-PCR para confirmar los hallazgos descritos en el presente trabajo.
- Evaluar los sitios de unión de los genes blanco, como NarK, SCO177 y SCO179 mediante ensayos tipo EMSA.

XI. APÉNDICE

APÉNDICE 1. OLIGÓMEROS USADOS

Oligómeros	Secuencia*	Observaciones
d0204F	ttccgacacgggcccgagacatcgcgaggagcatccgatgA TTCCGGGGATCCGTCGACC	Amplificación del cassette de resistencia a apramicina, a partir del plásmido pIJ773
d0204R	ccggaatcgtcagttctggccttcggtgcgcatccggtcTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	Amplificación del cassette de resistencia a apramicina, a partir del plásmido pIJ773
cp0204F	ACGTCAGCTGGCTGCTGGATGTCAAGTCC T	Amplificación del gen <i>sco0204</i> . Hibrida desde la región intergénica.
cp0204R	ACGTCAGCTGGAGACGATGAGAGATCGGC G	Amplificación del gen <i>sco0204</i> . Hibrida desde la región intergénica.
in0204R	CCTGGATCTGCTTCAGGACG	Amplificación del gen <i>sco0204</i> . Hibrida dentro del gen <i>sco0204</i>

**En mayúsculas se encuentra la secuencia idéntica al respectivo templado, mientras que en minúsculas se encuentra una secuencia diferente al templado.*

APÉNDICE 2. CONDICIONES DE PCR UTILIZADAS

Tabla A2.1. Condiciones de reacción para la amplificación del cassette de resistencia a apramicina con los oligómeros d0204F y d0204R

Mezcla de reacción			Ciclos de amplificación			
Reactivo	Concentración final	Volumen		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Agua		35 µL	Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	1 x
Buffer sin MgCl ₂	1x	5 µL	Desnaturalización	94 °C	30 seg	
dNTP's (10 mM)	0.1 mM	0.5 µL	Alineamiento	65 °C	30 seg	30 x
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	3 µL	Elongación	72°	2 min	
d0204F (10 µM)	0.2 µM	1 µL	Desnaturalización	94 °C	15 seg	
d0204R (10 µM)	0.2 µM	1 µL	Alineamiento	68 °C	30 seg	15x
DMSO (100%)	5%	2.5 µL	Elongación	72°C	2 min	
Templado	100 ng/reacción	2 µL	Elongación final	72 °C	7 min	x1
High Expand (5 U/µL)		0.5 µL	Enfriamiento	4°C		

Tabla A2.2. Condiciones de reacción para la verificación del reemplazo del gen *sco0204* por el cassette de resistencia en el cromosoma de *S. coelicolor*, usando los oligómeros cp0204F y cp0204R.

Mezcla de reacción			Ciclos de amplificación			
Reactivo	Concentración	Volumen		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Agua		6.2 µL	Desnaturalización inicial	98 °C	5 min	1 x
Buffer Phire 2x	1x	10 µL	Desnaturalización	98 °C	1 seg	
cp0204F (10 mM)	0.5 µM	1 µL	Alineamiento	72 °C	41 seg	40 x
cp0204R (10 mM)	0.5 µM		Elongación final	72 °C	1 min	x1
DMSO (100%)	5%	1 µL	Enfriamiento	4°C		
Dilution Protocol		0.5 µL				
Phire Plant		0.3 µL				

Tabla A2.3. Condiciones de reacción para la verificación de la ausencia de *sco0204* en el cromosoma de *S. coelicolor*, usando los oligómeros cp0204F e in0204R

Reactivo	Concentración	Volumen		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Agua		6.2 µL	Desnaturalización inicial	98 °C	5 min	1 x
Buffer Phire Plant 2x	1x	10 µL	Desnaturalización	98 °C	1 seg	
cp0204F (10 mM)	0.5 µM	1 µL	Alineamiento	69 °C	5 seg	40 x
in0204R (10 mM)	0.5 µM		Elongación	72 °C	20 seg	
DMSO (100%)	5%	1 µL	Elongación final	72 °C	1 min	x1
Dilution Protocol		0.5 µL	Enfriamiento	4°C		
Phire Plant		0.3 µL				

XII. REFERENCIAS

1. De Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Brazilian J Infect Dis [Internet]. Elsevier Editora Ltda; 2012;16(5):466–71. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867012001341>
2. Spellberg B. The future of antibiotics. Crit Care [Internet]. 2014;18:228. Recuperado a partir de: <http://ccforum.com/content/18/3/228>
3. Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Microorganismos multirresistentes, ¿adquisición nosocomial o comunitaria? Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2004;22(9):505–6. Recuperado a partir de: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.fulltext?pidet=13067616>
4. Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of drug resistance in tuberculosis: Recent progress and implications for diagnosis and therapy. Drugs. 2014;74(10):1063–72.
5. Watve M, Tickoo R, Jog M, Bhole B. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch Microbiol [Internet]. 2001;176(5):386–90. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/s002030100345>
6. Battistuzzi FU, Hedges SB. A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. Mol Biol Evol. 2009;26(2):335–43.
7. Santhanam R, Rong X, Huang Y, Andrews B a., Asenjo J a., Goodfellow M. *Streptomyces bullii* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2013;103(2):367–73.
8. Van Keulen G, Dyson PJ. Chapter Six – Production of Specialized Metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2) [Internet]. 1a ed. Vol. 89, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Inc.; 2014. 217-266 p. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002599000068>
9. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga a-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature. 2002;417(6885):141–7.

10. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nat Biotechnol [Internet]. 2003;21(5):526–31. Recuperado a partir de: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt820>
11. Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2013;97(1):87–98. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4551-9>
12. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, et al. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J Bacteriol [Internet]. 2008;190(11):4050–60. Recuperado a partir de: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00204-08>
13. Bibb M, Hesketh A. Chapter 4 Analyzing the Regulation of Antibiotic Production in Streptomyces [Internet]. 1a ed. Vol. 458, Methods in Enzymology. Elsevier Inc.; 2009. 93-116 p. Recuperado a partir de: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04804-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04804-6)
14. Hopwood DA. *Streptomyces* in nature and medicine. 1a ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
15. Angert ER. Alternatives to binary fission in bacteria. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2005;3(3):214–24. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738949>
16. Dalton KA, Thibessard A, Hunter JIB, Kelemen GH. A novel compartment, the “subapical stem” of the aerial hyphae, is the location of a sigN-dependent, developmentally distinct transcription in *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 2007;64(3):719–37.
17. Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato J-Y, Tomono A, Horinouchi S. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;69(3):431–9.
18. Pope MK, Green B, Westpheling J. The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 1998;180(6):1556–62.
19. Świątek MA, Tenconi E, Rigali S, van Wezel GP. Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production. J Bacteriol [Internet]. 2012;194(5):1136–44. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3294797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

20. Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters [Internet]. 1a ed. Vol. 517, Methods in Enzymology. Elsevier Inc.; 2012. 279-300 p. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404634-4.00014-0>
21. Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;1849(8):1017–39. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939915001303>
22. Sánchez S, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, et al. Carbon source regulation of antibiotic production. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 2010;63(8):442–59. Recuperado a partir de: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ja.2010.78>
23. Hodgson DA. Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. J Gen Microbiol. 1982;128(10):2417–30.
24. Kim D, Chater K, Lee K, Hesketh A. Changes in the Extracellular Proteome Caused by the Absence of the *blcA* Gene Product, a Developmentally significant tRNA, Reveal a New Target for the Pleiotropic Regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 2005;9(187):2957–66.
25. Lee H-N, Im J-H, Lee M-J, Lee SY, Kim E-S. A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. Process Biochem. 2009;44(3):373–7.
26. Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ, Chater KF. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. Mol Gen Genet [Internet]. 1984;196(3):501–7. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6094978>
27. Angell S, Bibb MJ. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. Mol Gen Genet. 1994;(244):135–43.
28. Guzman S. Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. caesius. Microbiology [Internet]. 2005;151(5):1717–23. Recuperado a partir de: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27557-0>
29. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res [Internet]. 2014;43(Database issue):D204-12. Recuperado a partir de: <http://nar.oxfordjournals.org/content/43/D1/D204%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4384041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

30. Forero A, Sánchez M, Chávez A, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Servín-González L, et al. Possible involvement of the *sco2127* gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Can J Microbiol* [Internet]. 2012;58(10):1195–201. Recuperado a partir de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84867860038&partnerID=tZOtx3y1>
31. Tierrafría VH, Licona-Cassani C, Maldonado-Carmona N, Centeno-Leija S, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz-Villafán B, et al. Deletion of the hypothetical protein SCO2127 of *Streptomyces coelicolor* allowed identification of a new regulator of actinorhodin production. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016;100(21):9229–37. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7811-2>
32. Wang W, Shu D, Chen L, Jiang W, Lu Y. Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2009;294(2):150–6. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341396>
33. Chen J, Xie J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011;112(10):2694–702. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.23219>
34. Daigle F, Lerat S, Bucca G, Sanssouci É, Smith CP, Malouin F, et al. A *terD* Domain-Encoding Gene (SCO2368) Is Involved in Calcium Homeostasis and Participates in Calcium Regulation of a DosR-Like Regulon in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* [Internet]. 2015;197(5):913–23. Recuperado a partir de: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.02278-14>
35. Harper CJ, Hayward D, Kidd M, Wiid I, van Helden P. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol*. 2010;10:138.
36. Traag BA, Kelemen GH, Van Wezel GP. Transcription of the sporulation gene *ssgA* is activated by the lclR-type regulator SsgR in a whi-independent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* [Internet]. 2004;53(3):985–1000. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2004.04186.x>
37. Nohn T, Noji S, Taniguchi S, Saito T. The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(8):2947–57.
38. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;97:55–74. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523415300039>

39. Fischer M, Alderson J, Van Keulen G, White J, Sawers RG. The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology*. 2010;156(10):3166–79.
40. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1951;62:293–300.
41. Fernández E, Weißbach U, Reillo CS, Braña AF, Méndez C, Rohr J, et al. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol*. 1998;180(18):4929–37.
42. Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ, Chater KF. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* [Internet]. 2004;54:107–28. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216404540042>
43. Ganesan K. Dark-Recovery Processes in *Escherichia coli* Irradiated with Ultraviolet Light. *Microbiology*. 1970;102(2):404–10.
44. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. 2a ed. The John Innes Foundation; 2000.
45. Sambrook J, W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY [Internet]. 2001;999.
46. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(12):6640–5. Recuperado a partir de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=10829079%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.120163297
47. Wallace GI, Neave SL. The Nitrite Test As Applied To Bacterial. *J Bacteriol*. 1927;16(6):377–84.
48. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1998;25(4–5):434–56. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998000926%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998000926/pdf?md5=fae15e54e050f704aa8cf23930ac0da2&pid=1-s2.0-S0891584998000926-main.pdf>
49. Fischer M, Falke D, Pawlik T, Sawers RG. Oxygen-Dependent Control of Respiratory Nitrate Reduction in Mycelium of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*

[Internet]. 2014;196(23):4152–62. Recuperado a partir de:
<http://jcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.02202-14>

50. Chen T, He L, Deng W, Xie J. The *Mycobacterium* DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis. *J Cell Biochem*. 2013;114(1):1–6.
51. Urem M, van Rossum T, Bucca G, Moolenaar GF, Laing E, Swiatek-Polatynska MA, et al. OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the Dormancy Regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* Control Overlapping Regulons. *Mol Biol Physiol*. 2016;1(3):1–21.