



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DEL REGULADOR DE RESPUESTA SCO2440 EN EL  
METABOLISMO DE ARABINOSA EN *Streptomyces coelicolor*

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**NIDIA MALDONADO CARMONA**

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL  
DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA  
DR. ARMANDO MEJÍA ÁLVAREZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Instituto de Biotecnología  
Departamento de Biotecnología, UAM-I

CIUDAD UNIVERSITARIA; CD. MX. ENERO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Dra. José Adelfo Escalante Lozada	Presidente
Dr. Luis Servín González	Vocal
Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio	Vocal
Dr. Daniel Genaro Segura González	Vocal
Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja	Secretaria

Esta tesis fue desarrollada bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CB-2013-219686 del CONACYT México. También este trabajo fue financiado por el programa NUATEI (Nuevas alternativas de tratamiento de enfermedades infecciosas) del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Finalmente, agradecemos el donativo INFR-2017-279880 del CONACYT, que permitió la adquisición de un UPLC-MS.

Durante la realización de esta tesis fui beneficiada por una beca de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo obtenido para la asistencia a cursos y congresos durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Servín González, Investigador Titular “C” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el prestamo del cósmido StC42.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su tutoría, su compañerismo y por un apoyo incansable para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Armando Mejía Álvarez y al Dr. Guillermo Gosset Lagarda, por su tiempo, dedicación, sus comentarios y su apoyo a lo largo de la realización de este trabajo.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja, por sus comentarios y aportaciones que permitieron el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Ruíz Villafán, sin cuyo apoyo y dedicación, este trabajo no se podría haber realizado.

## **DEDICATORIAS**

Para Silvia, nunca dejaste de creer en mi. Y no te voy a defraudar.

Para mis padres, Reyna y Fermin, quienes me formaron y me enseñaron el valor del esfuerzo. Gracias por darme siempre su mejor esfuerzo. Cada pequeño logro es por y para ustedes.

Para Enrique, por tu apoyo constante, por tu amor inmensurable, por hacerme mirar siempre más arriba y más lejos, hasta las estrellas.

Para Mel, por tu apoyo incondicional, por convertir al laboratorio en mi hogar, por cada aventura, cada risa, cada caída, pero sobre todo, por cada vez que nos levantamos juntas.

Para mis amigos y compañeros, Suhail, Nelly, Fanny, Mike, Martín, Selene, Carlos, Brenda, Omar, Corina, Danny, Betty, Bere, Dianita Rocha, Dianita Colombiana, Alba, Victor, Mone, Sarai, Angie, Augusto, Kat, Beltran, Mike Maps, Edgar, Laura, Jessy, Danny, Cristofer, Anna. Gracias, por haber estado y por seguir aquí conmigo.

Para Christian y Berenice, por haberme enseñado más de mi misma.

A todos los que un día tuvieron una palabra de aliento para mi, gracias.

Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.

Antonio Machado

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>1   RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2   INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
2.1 Streptomyces en la medicina y en la industria.....	7
2.2 Efecto de la fuente de carbono en el metabolismo secundario.....	9
2.3 Familias de reguladores asociadas al metabolismo primario Reguladores GntR.....	12
2.4 Reguladores transcripcionales IclR.....	14
2.5 La L-arabinosa es degradada en una ruta análoga a la vía de Entner-Doudoroff.....	15
<b>3   ANTECEDENTES.....</b>	<b>20</b>
<b>4   JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>5   HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>6   OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>7   MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
7.1 Predicción de los sitios de unión de SCO2440.....	24
7.2 Medios de cultivo.....	24
7.3 Evaluación de la actividad L-arabinosa deshidrogenasa en <i>S. coelicolor M145</i> .....	25
7.4 Sustitución del gen <i>sco2440</i> .....	25
7.5 Clonación del gen <i>sco2440</i> .....	26
7.6 Evaluación del crecimiento.....	27
7.7 Evaluación del consumo de L-arabinosa.....	27



7.8 Evaluación de la producción de actinorrodina.....	27
7.9 Evaluación de la producción de undecilprodigiosina.....	27
7.10 Extracción y cuantificación de proteína.....	28
7.11 Modelaje de las proteínas SCO2402 y SCO2440.....	28
7.12 Análisis estadístico.....	29
<b>8   RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
8.1 SCO2440 posee sitios de unión en proteínas relacionadas al metabolismo del carbono.....	30
8.2 Evaluación de la actividad L-arabinosa deshidrogenasa en <i>S. coelicolor</i> M145.....	33
8.3 Eliminación y clonación de <i>sco2440</i> .....	38
8.4 Evaluación del crecimiento en medio sólido.....	39
8.5 Evaluación del crecimiento y consumo de arabinosa.....	41
8.6 Consumo de L-arabinosa.....	42
8.7 Efecto de SCO2440 en la actividad Arabinosa Deshidrogenasa.....	44
8.8 Papel de SCO2440 en la producción de metabolitos secundarios.....	49
8.9 SCO2440 une preferencialmente a un metabolito de la degradación de arabinosa.....	51
8.10 Interacciones con otras proteínas.....	53
<b>9   CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>10   PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>11   MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>58</b>
<b>12   REFERENCIAS.....</b>	<b>65</b>

# ABREVIATURAS

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACT	Actinorrodina
<i>actII-ORF4</i>	Gen que codifica para el activador de la biosíntesis de actinorrodina
ADC	Antibiótico dependiente de calcio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AllR	Regulador transcripcional del catabolismo de alantoína
Apra <sup>R</sup>	Resistencia a apramicina
AraABD	Enzimas catabólicas del metabolismo de arabinosa
AraC	Familia de reguladores transcripcionales, que lleva el nombre del regulador transcripcional AraC, activador del catabolismo de arabinosa
AraDH	Enzima arabinosa deshidrogenasa
ArgR	Regulador transcripcional relacionado con la síntesis de aminoácidos
ARN	Ácido ribonucleico
<i>att</i>	Secuencias conservadas en el genoma que son reconocidas por bacteriofagos para la inserción de su material genético
CAT	<u>C</u> iclo de los <u>Á</u> cidos <u>T</u> ricarboxílicos
CatR	Regulador de los genes catabólicos del catecol
<i>cdaPSI</i>	Gen que codifica para una enzima biosintética del ADC
<i>cdaPSII</i>	Gen que codifica para una enzima biosintética del ADC
Clm <sup>R</sup>	Resistencia a cloranfenicol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<i>cpkBC</i>	Genes que codifican para enzimas biosintéticas del policétido críptico
<i>cpkO</i>	Gen que codifica para el regulador de la biosíntesis del policétido críptico
<i>dagA</i>	Gen que codifica para la agarasa A de <i>S. coelicolor</i>
DasR	Regulador transcripcional de la familia GntR/HutR; del inglés <i>Deficient in aerial mycelium and spore formation Regulator</i>
Dog <sup>R</sup>	Resistencia a 2-deoxiglucosa
ED	Entner-Doudoroff
EDA	Enzima de la vía de ED; Entner-Doudoroff aldolasa
EDD	Enzima de la vía de ED; Entner-Doudoroff deshidratasa
EI	Enzima I del sistema PTS
EII	Enzima II del sistema PTS
GlcP1	Glucosa permeasa I de <i>Streptomyces coelicolor</i>
Glk	Glucosa cinasa
GlnR	Regulador transcripcional de los genes relacionados con la captación de nitrógeno
GntR	Familia de reguladores transcripcionales, que lleva el nombre del regulador transcripcional GntR, represor del operón de la utilización del gluconato
GylR	Regulador transcripcional del catabolismo de glicerol
HC	Histidina cinasa
HPr	Proteína histidina del sistema PTS
HrcA	Regulador transcripcional inducible por calor y por daño en el ADN
HTH	Motivo de unión a ADN tipo hélice-giro-hélice; del inglés <i>Helix-Turn-Helix</i>
IclR	Familia de reguladores transcripcionales, que lleva el nombre del regulador transcripcional IclR, represor del operón de la vía del glioxilato
Kan <sup>R</sup>	Resistencia a kanamicina
Kan <sup>S</sup>	Sensibilidad a kanamicina
KDA	2-ceto-3-deoxi-arabinonato; del inglés <i>2-keto-3-deoxy arabinonate</i>
KDG	2-ceto-3-desoxi-gluconato, intermediario del metabolismo de arabinosa; del inglés <i>2-keto-3-deoxy gluconate</i>
KdgR	Represor de los genes catabólicos de la pectina
KDPG	2-ceto-3-desoxi-fosfogluconato, intermediario del metabolismo de arabinosa; del inglés <i>2-keto-3-deoxy-phosphogluconate</i>
LacI	Familia de reguladores transcripcionales, que lleva el nombre del regulador transcripcional LacI, represor del catabolismo de lactosa

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
MarR	Familia de reguladores transcripcionales, que lleva el nombre del regulador transcripcional MarR, represor de múltiples resistencias a antibióticos
<i>metE</i>	Gen que codifica para la metionina sintasa
NAcGlc	N-acetil glucosamina
NAcGlc <sub>2</sub>	N,N'-diacetilquitobiosa
NADP	Cofactor enzimático, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Cofactor enzimático, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NadR	Regulador transcripcional relacionado con la biosíntesis de cofactores, como NAD
NdgR	Regulador transcripcional de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada
<i>pBAD</i>	Promotor inducible por arabinosa, sujeto a activación por AraC
PCR	Reacción de polimerasa en cadena; del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenglicol; el número subsecuente indica el grado de polimerización
PEP	Fosfoenol piruvato; del inglés <i>PhosphoEnolPyruvate</i>
PhoP	Regulador transcripcional de los genes relacionados con la captación de fósforo
PTS	Sistema de fosfotransferencia; del inglés <i>PhosphoTransferase System</i>
RCC	Represión catabólica por carbono
RecBCD	Sistema de recombinación de <i>E. coli</i> ; degrada el ADN lineal dentro de la célula
RED	Undecilprodigiosina
<i>redZ</i>	Gen que codifica para el activador de la biosíntesis de undecilprodigiosina
ROK	Familia de reguladores transcripcionales, con características de represores, marcos de lectura abiertos y cinasa; del inglés <i>Repressor ORF Kinase</i>
sRNA	ARN pequeños, los cuales poseen capacidades regulatorias; del inglés <i>small RNA</i>
SsgR	Regulador transcripcional involucrado en la esporulación
<i>whi</i>	Grupo de genes relacionados con la formación del micelio aéreo en <i>S. coelicolor</i>
XylA	Xilosa isomerasa, enzima catabólica de la xilosa
XylB	Xilulosa cinasa, enzima catabólica de la xilosa
λ-RED	Sistema de recombinación del fago λ de <i>E. coli</i>

# 1 | RESUMEN

El aprovechamiento de los recursos en bacterias saprofitas implica un estricto control que permite el mejor aprovechamiento de los nutrientes disponibles en un nicho ecológico complejo, como lo es el suelo. Ante la gran variedad de nutrientes disponibles en el suelo, las bacterias saprofitas poseen una amplia variedad de enzimas que les permiten degradar múltiples fuentes de carbono. Sin embargo, estos sistemas catabólicos están estrictamente regulados en las bacterias saprofitas. Por ello, el estudio de los reguladores transcripcionales que controlan estas rutas metabólicas es esencial para un mejor aprovechamiento biotecnológico de bacterias con interés industrial.

El presente trabajo estudia el metabolismo de L-arabinosa en *Streptomyces coelicolor*, la bacteria modelo del género *Streptomyces*, el cual tiene importancia médica e industrial en la producción de antibióticos y otros farmacóforos. La L-arabinosa es una aldopentosa que, de acuerdo a estudios *in silico*, es degradada a través de una ruta de degradación de pentosas tipo Entner-Doudoroff. En este trabajo se demostró la actividad de la L-arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor*, la primera enzima de la ruta enzimática propuesta, lo cual es la primera evidencia experimental de la presencia de esta ruta metabólica en actinomicetos. Por otra parte, se comprobó que el regulador transcripcional SCO2440 actúa como un modulador del metabolismo de L-arabinosa, afectando el consumo y la actividad enzimática de la L-arabinosa deshidrogenasa. Además, se demostró que el regulador afecta la producción de actinorrodina en diferentes fuentes de carbono.

## 2 | INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Streptomyces* en la medicina y en la industria

Los actinomicetos son un orden de bacterias saprofitas, habitualmente encontradas en el suelo, que se caracterizan por un ciclo de vida complejo y por su capacidad para sintetizar metabolitos secundarios de importancia médica e industrial (Hopwood, 2007)

*Streptomyces* es el género de mayor importancia industrial con el que cuenta este orden, debido a su prolífica capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad farmacéutica, como antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios y antitumorales (Tabla 1).

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios de importancia industrial producidos por el género *Streptomyces* (Barka et al., 2016)

<b>Tipos de Fármacos</b>	<b>Moléculas</b>	<b>Especie productora</b>
Antibacterianos	Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>
	Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
	Novobiocina	<i>Streptomyces niveus</i>
Antiparasitarios	Avermectina	<i>Streptomyces avermitilis</i>
	Prodiginina	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	Trioxocarcina	<i>Streptomyces bottropensis</i>
Antitumorales	Doxorrubicina	<i>Streptomyces peucetius</i>
	Daunorubicina	<i>Streptomyces peucetius</i>
	Borrelidina	<i>Streptomyces sp.</i>

Las razones por las cuales *Streptomyces* produce este arsenal de metabolitos secundarios es desconocida, pero se especula que la actividad antibacteriana es una respuesta ante la competición por nutrientes en un nicho ecológico competitivo (Pinto y Mascher, 2016). También se especula sobre la capacidad de estos metabolitos secundarios como moléculas de señalización y comunicación celular inter e intraespecies (Jones *et al.*, 2017).

La producción de los metabolitos secundarios implica un gran gasto metabólico y energético, por lo que su producción es un proceso altamente controlado. Sin embargo, los estímulos que desencadenan la producción de los metabolitos secundarios en la naturaleza son desconocidos para la mayoría de los casos. Esto genera un sesgo en las observaciones llevadas a cabo en ambientes controlados, donde usualmente se observa una capacidad metabólica restringida, con respecto a la capacidad metabólica real, contenida en sus genomas bajo estrictos controles de expresión (Gottelt *et al.*, 2017).

La verdadera capacidad metabólica de los estreptomicetos fue descubierta con el inicio de la era genómica y con la secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor*. Desde mediados de los años 90 se conocía de manera empírica su capacidad para producir al menos cuatro metabolitos secundarios: la actinorrodina, la undecilprodigiosina, la metilenomicina A y el Antibiótico Dependiente de Calcio (ADC) (Figura 1). Al analizarse el genoma de *S. coelicolor* se observó la capacidad metabólica para producir 18 metabolitos secundarios más, cuya presencia no se había detectado en condiciones de laboratorio. (Bentley *et al.*, 2002).

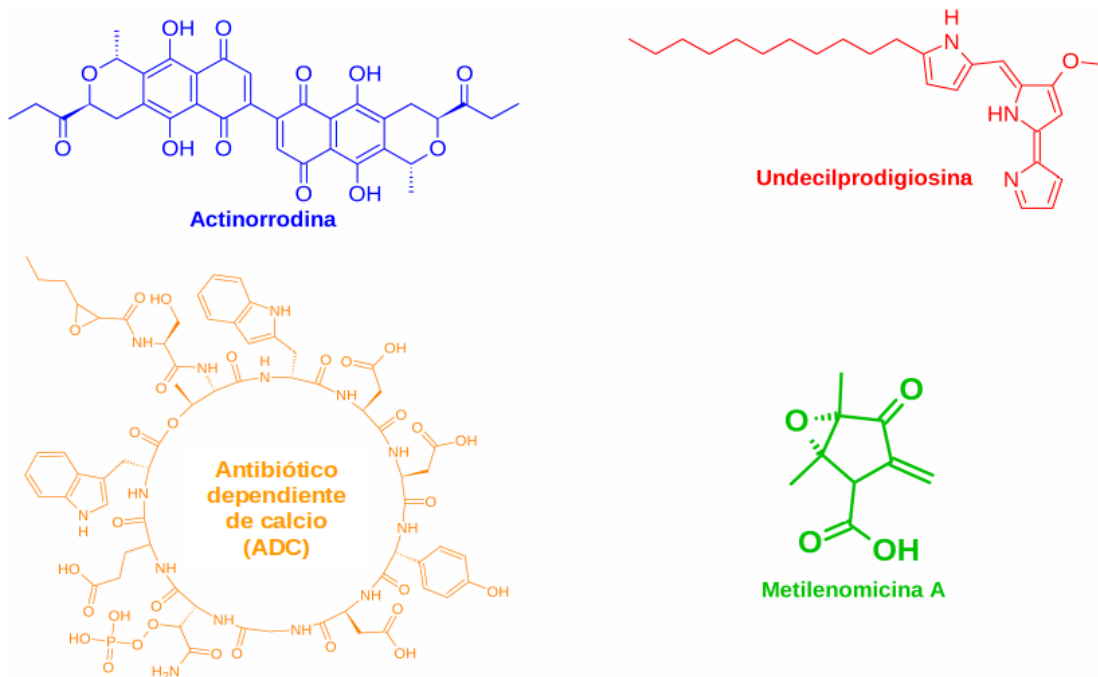


Figura 1. Antibióticos empíricamente conocidos de *S. coelicolor*.

De esta manera, se estima que en promedio cada especie de *Streptomyces* es capaz de producir 20 o más metabolitos secundarios (Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008). Esta fructífera capacidad de producir metabolitos secundarios puede resultar en un detrimento para el crecimiento celular, pues la síntesis de estos compuestos tiene un alto costo bioenergético. Por ello, la síntesis de los metabolitos secundarios se encuentra altamente regulada, en función de señales de estrés, de la disponibilidad de sustratos y de la diferenciación morfológica.

## 2.2 Efecto de la fuente de carbono en el metabolismo secundario

Desde la primera mitad del siglo XX, los actinomicetos han sido ampliamente estudiados por su capacidad para producir metabolitos secundarios (Hopwood, 2007). Conforme se estudió la capacidad metabólica de *Streptomyces*, resultó evidente que el control en la producción de metabolitos secundarios por *Streptomyces* esta asociado a la disponibilidad de nutrientes en el medio circundante, afectando sustancialmente la producción de metabolitos secundarios (Liu *et al.*, 2013). En la bacteria modelo *S. coelicolor* es conocido desde hace tiempo el efecto represor de la glucosa en la síntesis de actinorrodina (Melzoch, Joost Teixeira De Mattos y Neijssel, 1997). El mecanismo molecular mediante el cual la glucosa afecta a la síntesis de actinorrodina no ha sido dilucidado totalmente, pero se han encontrado entrecruzamientos con el metabolismo primario. En el metabolismo primario, es común observar que en presencia de fuentes de carbono preferenciales, como la glucosa, se reprimen a las enzimas catabólicas necesarias para la degradación de otras fuentes de carbono no preferenciales. Este fenómeno se denomina Represión Catabólica por Carbono (RCC) y ha sido ampliamente estudiado en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Görke y Stülke, 2008), pero que en *Streptomyces* pareciera también estar relacionado con la producción de metabolitos secundarios (Forero *et al.*, 2012).

La RCC se define como un fenómeno de regulación mediante el cual la expresión de las funciones para el uso de fuentes de carbono secundarias y las actividades de las enzimas correspondientes están reducidas en presencia de una fuente de carbono preferencial (Görke y Stülke, 2008). La RCC es un fenómeno ampliamente estudiado y comprendido en organismos como *E. coli* y *B. subtilis*. Estos organismos dependen principalmente del transporte y fosforilación de azúcares a través del sistema de fosfotransferencia (PTS, del inglés *PhosphoTransferase System*), el cual regula selectivamente la entrada y catabolismo de algunos carbohidratos, como la glucosa (Görke y Stülke, 2008).



El sistema de PTS se encuentra ampliamente distribuido en las bacterias y en las arqueas. Consta esencialmente de cuatro proteínas: Enzima I (EI), proteína histidina (HPr, *Histidine protein*) y la Enzima II, que cuenta con tres módulos (EIIA, EIIB y EIIC). El sistema PTS es un sistema de fosforelevos, que inicia con la autofosforilación de un residuo conservado de histidina de EI, usando como sustrato al fosfoenolpiruvato (PEP, *PhosphoenolPyruvate*), formando un enlace de alta energía (P~His-EI). La proteína EI transfiere su grupo fosfato a un residuo de histidina conservado de HPr (P~His-HPr), que a su vez transfiere el grupo fosfato a un residuo de histidina de la proteína EIIA (P~His-EIIA) para posteriormente transferirlo a un residuo cisteína de la proteína EIIB (P~Cys-EIIB). En el último paso, el grupo fosfato es transferido a un carbohidrato unido a la proteína EIIC; la fosforilación parece disminuir la afinidad de EIIC por el carbohidrato, lo que libera al carbohidrato fosforilado en el citosol. Este mecanismo permite la entrada de azúcares y su fosforilación simultánea, regulando la entrada de fuentes de carbono preferenciales y no preferenciales (Görke y Stülke, 2008; Deutscher *et al.*, 2014; Milton, 2015).

En *Streptomyces* se ha demostrado que la glucosa es internalizada principalmente a través de la glucosa permeasa GlcP1 (van Wezel *et al.*, 2005) y que el sistema PTS funciona preferencialmente para la internalización de N-acetilglucosamina (NAcGlc) (Nothaft *et al.*, 2003). Esta evidencia sugiere que existe un mecanismo molecular diferente al sistema PTS, descrito en *E. coli* y *B. subtilis*, que controla la RCC mediada por glucosa en el género *Streptomyces*.

Históricamente, se ha descrito que la regulación catabólica por glucosa en *S. coelicolor* tiene como participantes a dos proteínas: SCO2127 (gen *sco2127*) y la glucosa hexocinasa GlkA (gen *sco2126*). La relación de estas proteínas con la RCC surge a partir de la observación de mutantes resistentes al análogo tóxico de la glucosa, 2-desoxiglucosa (mutantes Dog<sup>R</sup>), las cuales poseen una baja actividad glucosa cinasa y son insensibles a la represión catabólica por glucosa para la internalización de arabinosa, galactosa y glicerol (Hodgson, 1982). Estas mutantes Dog<sup>R</sup> al ser complementadas con un fragmento de ADN conteniendo a los genes *sco2126* y *sco2127*, recuperaron su sensibilidad a la RCC y su actividad glucosa cinasa (Ikeda *et al.*, 1984; Angell, Schwarz y Bibb, 1992). Esta observación dio pie al inicio de una investigación más exhaustiva con respecto a la participación de GlkA en la RCC de *Streptomyces*. GlkA es la glucocinasa encargada de la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato, siendo el primer paso de la glicolisis. Sin embargo, en *S. coelicolor* también se ha observado que GlkA posee un efecto regulador en el metabolismo primario y que GlkA reprime la utilización de agarosa (Angell y Bibb, 1994). Recientemente, se demostró mediante proteómica (Gubbens *et al.*, 2012) y transcriptómica (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016) el amplio papel de GlkA en el metabolismo primario,

dependiente e independiente de la presencia de glucosa. Interesantemente, GlkA parece regular también la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario. Este efecto podría explicarse a través del control de hasta 40 reguladores transcripcionales locales, lo cual amplificaría su efecto y establecería a GlkA como un posible regulador maestro en la célula (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016).

Por otra parte, los estudios sobre la proteína SCO2127 son escasos, debido a que esta es una proteína hipotética sin dominios conocidos, de acuerdo a la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2016). Diversos estudios posteriores determinaron que GlkA es capaz de restablecer la actividad glucosa cinasa, pero falla en restablecer completamente la RCC sobre la agarosa en mutantes Dog<sup>R</sup> (Angell y Bibb, 1994), lo cual sugiere que la restauración de la RCC observada en las mutantes Dog<sup>R</sup> podría ser debido al gen SCO2127 (Ikeda *et al.*, 1984). Posteriormente, se demostró que el gen *sco2127* es capaz de revertir a las mutantes Dog<sup>R</sup> de la cepa industrial *S. peucetius* var. *caesius* (Guzman *et al.*, 2005). Además, se ha observado un efecto modulador en la biosíntesis de actinorrodina (Forero *et al.*, 2012) y su posible participación en la diferenciación morfológica, a través de la interacción de SCO2127 con un miembro de las proteínas Bld (Chávez *et al.*, 2011). Sin embargo, estos estudios no han demostrado el mecanismo molecular a partir del cual trabaja SCO2127.

Recientemente, una aproximación proteómica estudió el alcance que tiene SCO2127 en la producción de actinorrodina; sin embargo, debido a las características experimentales del estudio no es discernible si SCO2127 está relacionado con la RCC. No obstante, este estudio demuestra una amplificación del efecto de SCO2127 a través del control de algunos reguladores transcripcionales locales (Tierrafría *et al.*, 2016).

En conjunto, estos estudios aportan evidencia de que Glk y SCO2127 de *S. coelicolor* actúan principalmente a través de la modulación de reguladores transcripcionales, los cuales a su vez estarían modificando el metabolismo primario y secundario. En las últimas décadas, con el desarrollo de técnicas de genómica y bioinformática, se han estudiado más reguladores transcripcionales locales, aumentando el conocimiento en la regulación del metabolismo de carbono.

Uno de los mejores ejemplos hasta el momento, es el del regulador transcripcional DasR, perteneciente a la familia GntR. Este regulador transcripcional se encuentra presente en *Streptomyces griseus* (Seo *et al.*, 2002) y en *S. coelicolor*, pero es en este último organismo donde se han llevado a cabo la mayoría de los avances relacionados a este regulador transcripcional. Se ha descrito que DasR controla la internalización del monómero del biopolímero quitina, NAcGlc, el cual es el segundo biopolímero más abundante en el planeta, siendo encontrado habitualmente en el exoesqueleto de los insectos (Nazari *et al.*, 2013). DasR regula su entrada, como monómero (Nothaft *et al.*, 2010) o como el

dímero N,N'-diacetilquitobiosa (NAcGlc<sub>2</sub>) (Saito *et al.*, 2007). Además, controla los genes necesarios para la degradación de NAcGlc hasta fructosa-6-fosfato y su posterior incorporación a la glicolisis (Colson *et al.*, 2007). También se ha observado que DasR participa en la regulación de la diferenciación morfológica, pues detecta a la NAcGlc, la cual es un producto de la degradación de la pared celular de *Streptomyces*, proceso de apoptosis que permite el reciclaje del micelio vegetativo para la formación de micelio aéreo (Świątek *et al.*, 2012). Se ha observado que la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios son fenómenos intrínsecamente relacionados, por lo que no resulta sorprendente que DasR controla a los reguladores específicos para la biosíntesis de la actinorrodina (*actII-ORF4*), la undecilprodigiosina (*redZ*) y el policétido críptico (*cpkO*), así como los genes biosintéticos del antibiótico dependiente de calcio (*cdaPSI* y *cdaPSII*) y del policétido críptico (*cpkBC*), lo que convierte a DasR en el único regulador transcripcional que controla a los cuatro metabolitos secundarios clásicos de *S. coelicolor*, además de servir como un nexo entre el metabolismo primario, el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica (Świątek-Połatyńska *et al.*, 2015).

Por ello, se considera a DasR como uno de los reguladores globales en *Streptomyces*; sin embargo, se sospecha la presencia de más reguladores que controlen de manera conjunta el metabolismo primario y secundario, permitiendo un estricto control de la expresión de metabolitos secundarios, dependiendo de las condiciones halladas en un entorno tan competitivo como lo es el suelo.

## **2.3 Reguladores transcripcionales asociados al metabolismo de carbono**

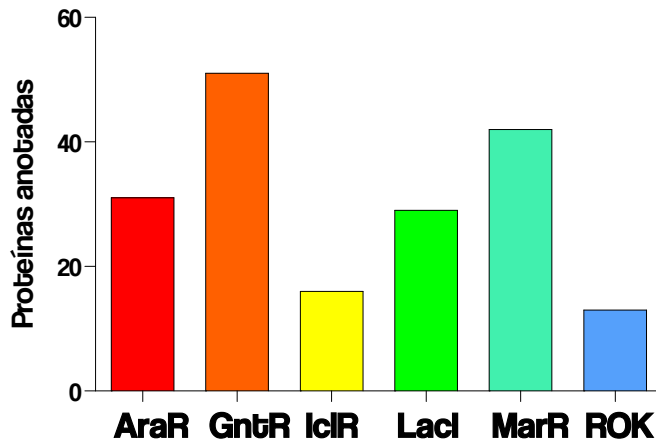
Los reguladores transcripcionales son proteínas que regulan positiva o negativamente la transcripción de otros genes, a través de la unión al ADN de su región promotora, permitiendo el cambio en el perfil transcripcional a partir de cambios en el medio ambiente celular. Un regulador transcripcional puede actuar como un activador o como un represor, dependiendo del efecto que tenga sobre su gen blanco. Así, un activador generalmente se une en la secuencia río arriba de la región promotora, facilitando la unión de la ARN polimerasa al ADN o facilitando la apertura del ADN que inicia la transcripción. Por otra parte, los represores se unen generalmente sobre la región promotora, impidiendo el inicio o la elongación de la transcripción de sus genes blanco (Snyder y Champness, 2007).

La afinidad de la unión del regulador transcripcional hacia el ADN, puede cambiar en virtud de los estímulos circundantes y de la disponibilidad de nutrientes en el medio. En el caso de ser reguladores transcripcionales de un sistema de dos componentes, el estímulo es detectado por una histidina cinasa (HC), la cual suele ser una proteína transmembranal que detecta cambios en la temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, etc. Esta proteína al ser expuesta a un estímulo específico, es autofosforilada en un residuo conservado de histidina; luego, la HC transfosforila al regulador de respuesta en un residuo conservado de asparagina, lo cual cambia su conformación tridimensional y en consecuencia, modifica la afinidad del regulador transcripcional por su secuencia de unión en el ADN. Este mecanismo de dos componentes está ampliamente conservado entre las bacterias y supone el mecanismo principal mediante el cual se detectan los cambios en el medio ambiente (Romero-Rodríguez, Robledo-Casados y Sánchez, 2015).

Además de los sistemas de dos componentes, existen reguladores transcripcionales con dominios de entrada que les permiten determinar cambios en el medio ambiente intracelular. Los dominios de entrada permiten la unión de moléculas pequeñas, generalmente metabolitos relacionados con el regulon que controla el regulador transcripcional; esta unión cambia la conformación de la proteína, modificando su afinidad al ADN. Es importante remarcar que sean sistemas de uno o dos componentes, el cambio conformacional desencadenado por la presencia o ausencia del efector, puede aumentar o disminuir la afinidad al ADN (Snyder y Champness, 2007; Romero-Rodríguez, Robledo-Casados y Sánchez, 2015)

El dominio efector de los reguladores transcripcionales es el dominio de unión a ADN, el cual típicamente es del tipo hélice-giro-hélice (HTH, del inglés *helix-turn-helix*). Con base a la semejanza de este dominio, los reguladores transcripcionales se agrupan en 50 familias, las cuales no están representadas homogéneamente en los genomas bacterianos (Rodionov, 2007). Se ha observado que estas familias tienen un nicho regulatorio particular, controlando aspectos bien delimitados del metabolismo celular. Así, hay reguladores transcripcionales que controlan la síntesis de aminoácidos (ArgR), la respuesta al estrés de calor (HrcA) o a la biosíntesis de cofactores (NadR). No es sorprendente que existan familias de reguladores transcripcionales relacionados con el catabolismo de fuentes de carbono, describiéndose principalmente 6 familias: AraC, GntR, IclR, LacI, MarR y ROK, las cuales se encuentran distribuidas heterogeneamente en el genoma de *S. coelicolor* (Figura 2).

El estudio de un miembro de cualquiera de estas familias promete ampliar el panorama del conocimiento en la regulación del metabolismo de la fuente de carbono, con implicaciones en la represión catabólica por carbono.



**Figura 2.** Distribución de las familias de reguladores transcripcionales relacionadas con el metabolismo del carbono, en el genoma de *S. coelicolor*, de acuerdo a PATRIC (Wattam *et al.*, 2017).

## 2.4 Reguladores transcripcionales IclR

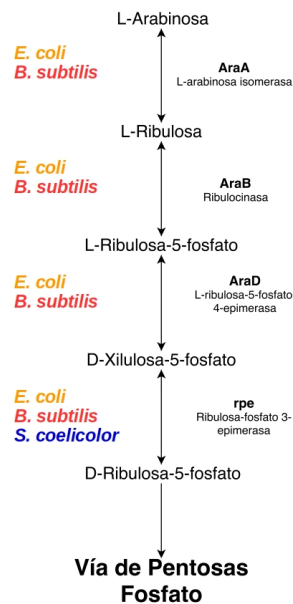
La familia de reguladores IclR esta conformada por proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, con un dominio de unión a ADN tipo HTH y que pueden actuar como reguladores positivos, negativos o duales, a través de la formación de homodímeros u homotetrámeros (dímero de dímeros). El nombre de la familia deriva del primer miembro estudiado, el Regulador de la Isocitrato liasa (IclR) en *E. coli* (Brice y Kornberg, 1968). Se ha observado que los miembros de esta familia controlan una gran diversidad de funciones como la resistencia a antibióticos, la degradación de xenobióticos, la percepción de *quórum*, la patogenicidad en plantas y la esporulación (Molina-Henares *et al.*, 2006). Además, controlan el metabolismo de distintas fuentes de carbono, como el glioxilato, glicerol, acetato, xilulosa y más recientemente xilosa (Johnsen *et al.*, 2014). Este carácter los hace un excelente blanco para el estudio de la regulación del metabolismo de fuentes de carbono.

En *S. coelicolor* existen 16 genes que codifican para posibles reguladores IclR (Romero-Rodríguez, Robledo-Casados y Sánchez, 2015). De estos, solo cuatro reguladores han sido estudiados hasta el momento y el perfil de sus genes blanco coincide con el de la familia IclR. Uno de estos es GylR en *S. coelicolor*, el cual controla la degradación de glicerol hasta gliceraldehído-3-fosfato; además, participa en la RCC a través de la represión del catabolismo de glicerol en presencia de glucosa (Hindle y Smith, 1994). Por otra parte, el regulador SsgR controla el inicio de la esporulación, a través de un mecanismo independiente de los genes *whi*, reconocidos como los encargados de desencadenar la esporulación en los actinomicetos (Traag, Kelemen y van Wezel, 2004). Recientemente se ha

estudiado que el regulador AllR reprime al catabolismo de la alantoína, una fuente de carbono y nitrógeno que es un producto de degradación de las purinas en mamíferos y suele encontrarse en el suelo; además de activar la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina (Navone *et al.*, 2015). Así mismo, el regulador NdgR parece controlar indirectamente el metabolismo de nitrógeno y controlar directamente la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada; también se ha descrito el control directo en la producción de doxorubicina en *S. peuceitius* (Yang *et al.*, 2009). La función de los otros 12 reguladores IclR es desconocida, pero el regulador transcripcional IclR SCO2440 podría estar relacionado con el metabolismo de arabinosa (Comunicación personal, V. Tierrafría, 2015).

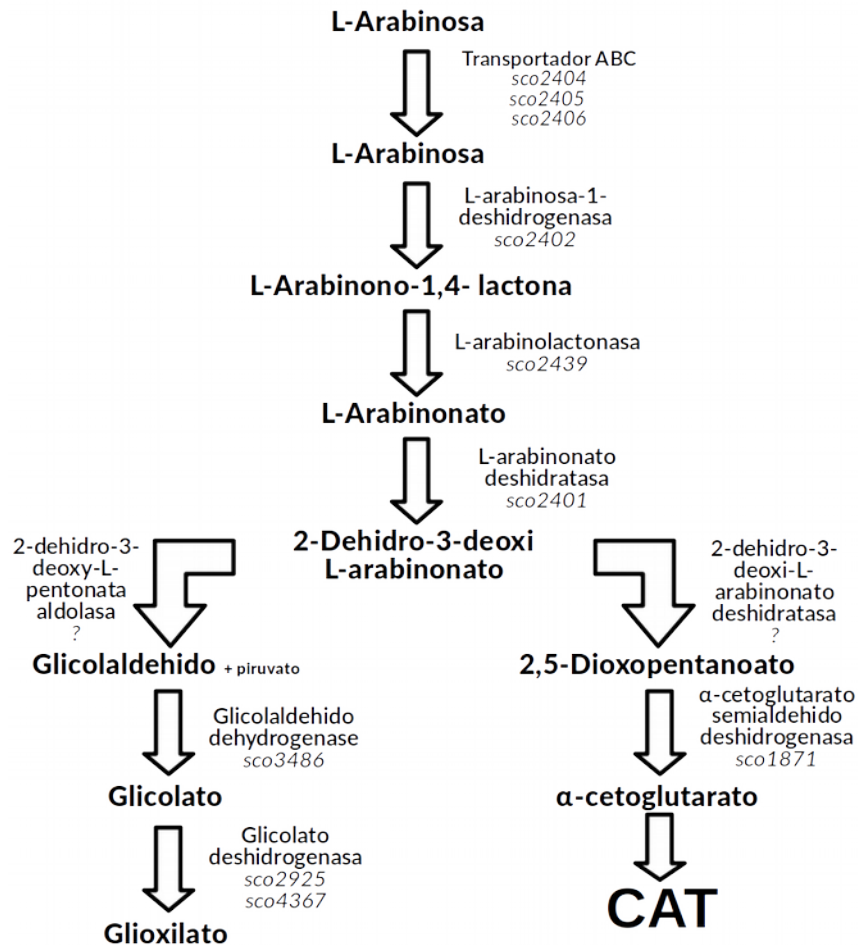
## 2.5 La L-arabinosa podría ser degradada en una ruta análoga a la vía de Entner-Doudoroff, en *Streptomyces coelicolor*

La L-arabinosa es una aldopentosa, que se encuentra normalmente en biopolímeros como la pectina y la hemicelulosa, los cuales constituyen hasta un tercio del peso seco de las paredes de las células vegetales de plantas dicotiledoneas y algunas monocotiledoneas (Water, 2012). Para el caso de los organismos modelos *E. coli* y *B. subtilis* su ruta de degradación es fosforilativa y a través de la ruta de las pentosas fosfato (Figura 3); sin embargo, en el genoma de *S. coelicolor* los genes AraABD no han sido encontrados por aproximaciones *in silico* ni experimentales, por lo que es posible que la arabinosa no sea degradada de esta manera.



**Figura 3.** Genes que codifican las enzimas para la degradación de L-arabinosa, a través de la Vía de las Pentosas Fosfato. En *E. coli* y en *B. subtilis* la ruta esta completa y permite la degradación de arabinosa. Sin embargo, en *S. coelicolor* no se encuentran los genes *araABD*.

En la base de datos BioCyc, la degradación de arabinosa en el genoma de *S. coelicolor* se encuentra anotada a través de una ruta de degradación no fosforilativa y que es análoga a la vía de Entner-Doudoroff (ED). Esta ruta permitiría la degradación de arabinosa hasta  $\alpha$ -cetoglutarato, el cual sería incorporado al ciclo de Krebs para la respiración celular y la adquisición de energía (Figura 4). Sin embargo, no hay evidencia experimental de que la degradación de arabinosa en *S. coelicolor* se lleve a cabo a través de esta ruta.



**Figura 4.** Ruta de degradación para la L-arabinosa para *S. coelicolor*, como está anotada en la base de datos BioCyc. CAT; Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos.

La vía de ED para pentosas identificada en *S. coelicolor*, si bien no ha sido descrita en actinomicetos, ha sido estudiada en otros organismos. Se han caracterizado a las enzimas de esta vía metabólica en las arqueas *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius* (Nunn *et al.*, 2010), en la arquea *Haloferax volcanii* (Johnsen *et al.*, 2014) y en la bacteria Gram negativa *Azospirillum brasiliense* (Watanabe *et al.*, 2006). Las rutas descritas en estos organismos son una modificación de la vía

Entner-Doudoroff (ED), la cual tradicionalmente se asocia con el catabolismo de glucosa en condiciones anaerobias, pero que es muy versátil y se encuentra ampliamente distribuida en las bacterias.

La vía de ED fue descrita por primera vez en *Pseudomonas saccharophila*, en donde se observó que el consumo de glucosa y gluconato en bajas concentraciones de oxígeno da como producto a dos moléculas de piruvato (Entner y Doudoroff, 1951). La utilización de glucosa y gluconato a través de esta nueva vía involucra la fosforilación de glucosa a 6-fosfogluconato, la formación del intermediario 2-ceto-3-desoxi-fosfogluconato (KDPG, del inglés *2-keto-3-deoxy-phosphogluconate*) y por último la escisión de esta molécula de seis carbonos en una molécula de piruvato y otra de 3-fosfogliceraldehído, la cual es transformada posteriormente a piruvato.

Esta ruta, principalmente catabólica, se encuentra ampliamente distribuida en todos los reinos de la vida y es considerada una de las primeras rutas asimilatorias entre los seres vivos. La amplia distribución de esta vía corresponde con una amplia variabilidad entre los metabolitos intermediarios, pero con la constante aparición de dos enzimas: 6-fosfogluconato deshidratasa (EDD, Entner-Doudoroff deshidratasa) y la KDPG aldolasa (EDA, Entner-Doudoroff aldolasa). Los sustratos y productos de estas enzimas, así como el carácter cíclico o lineal de la vía y el perfil de expresión, son variables que han sido observadas en distintos organismos. Las distintas vías encontradas han sido agrupadas de distintas maneras y un ejemplo es el agrupamiento descrito en (Conway, 1992):

i) *Vía constitutiva lineal*

El organismo modelo para este mecanismo de ED es el anaerobio facultativo *Zymomonas mobilis*, el cual carece de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, lo que impide la asimilación de gluconato a través de la vía de las pentosas fosfato, siendo la vía de ED la única forma de asimilar glucosa. La expresión de EDD y EDA no cambian cuando la cepa es crecida en otras fuentes de carbono, por lo que su expresión se considera constitutiva. La vía se considera lineal, debido a que no recicla metabolitos de sí misma ni de otras vías. La degradación de glucosa es llevada a cabo en anaerobiosis y la fermentación es finalizada con la oxidación de piruvato a etanol y CO<sub>2</sub>.

ii) *Vía inducible lineal*

En organismos entéricos, como *Escherichia coli*, la vía lineal es inducible en la presencia de gluconato, el cual es fosforilado por una gluconocinasa para producir 6-fosfogluconato, sustrato de EDD. A diferencia de lo observado en *Z. mobilis*, esta variante de ED se puede llevar a cabo en aerobiosis, en conjunto con el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) o en anaerobiosis, con la consecuente fermentación hacia etanol y CO<sub>2</sub>.



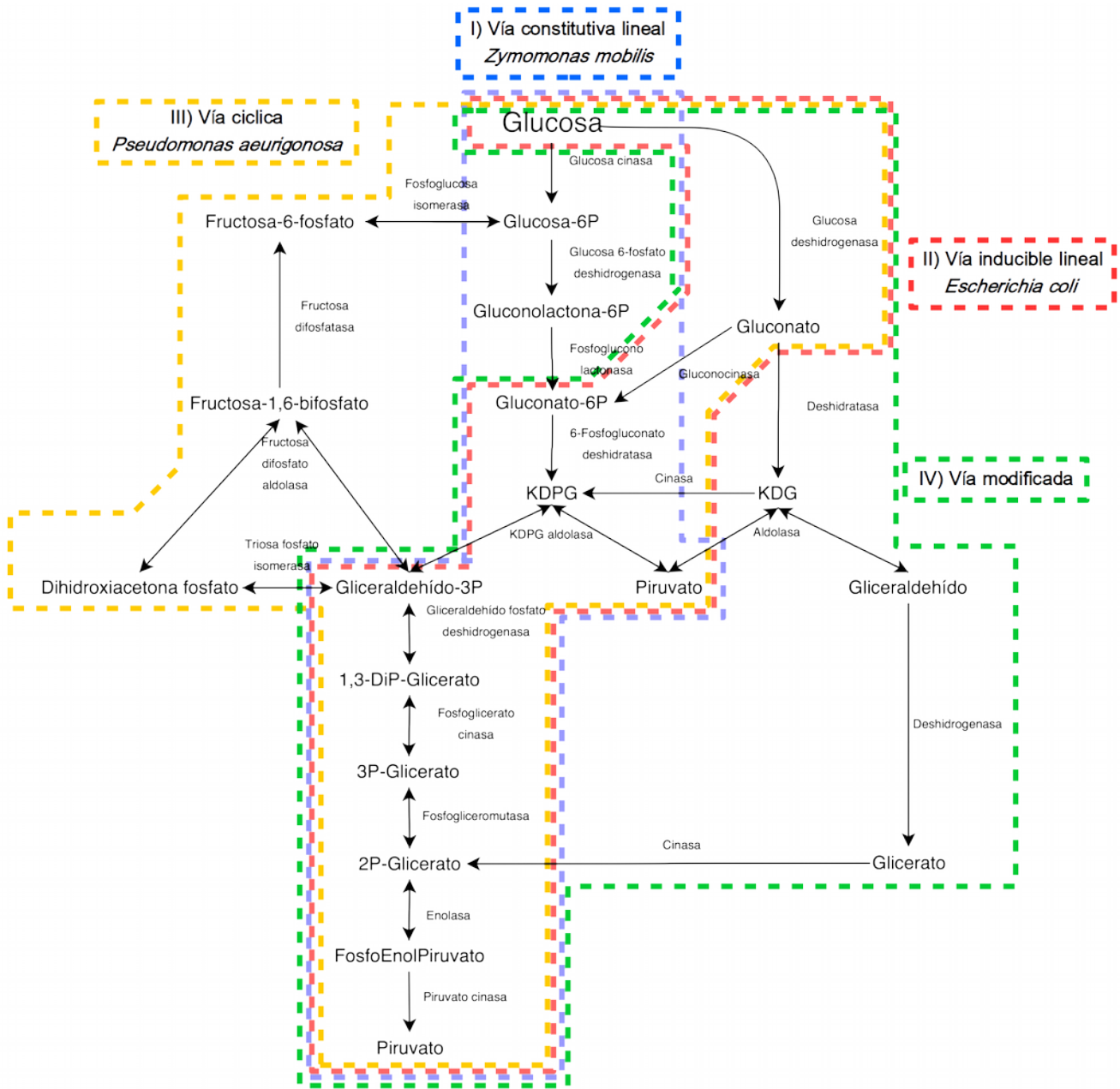
iii) *Vía cíclica*

En general, el género *Pseudomonas* carece de la enzima 6-fosfofructocinasa, por lo que les resulta imposible la degradación de carbohidratos mediante glicolisis, dependiendo de la vía de ED y de otras enzimas anabólicas para la generación de precursores metabólicos. Dadas estas condiciones, es normal el reciclaje de compuestos tricarbonados, mediante el uso de enzimas gluconeogénicas, por lo que además de ser la ruta principal para la degradación de glucosa, provee de sustratos para otras rutas metabólicas.

iv) *Vía modificada*

Diversos organismos difieren en la ruta de ED no solo en la expresión de las enzimas EDD y EDA, sino también difieren en los sustratos utilizados, por ejemplo la arabinosa. Otros organismos usan un paso de reducción previo a la fosforilación i.e. glucosa a gluconolactona; mientras que en otros organismos se prescinde completamente de la fosforilación, para ser escindido de 2-ceto-3-desoxi-gluconato (KDG, del inglés *2-keto-3-deoxy gluconate*) a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato.

La vía descrita en BioCyc para la degradación de arabinosa en *S. coelicolor* correspondería a esta última clasificación, la más general de todas y que no se encuentra anotada en la base de datos KEGG (Watanabe *et al.*, 2006; Nunn *et al.*, 2010). Resulta interesante la observación de que en la arquea *S. sulfataricus* el metabolismo de D-xilosa y L-arabinosa se lleva a cabo a través de la misma vía, pues ambos difieren en un solo centro quiral, lo que los convierte en epimeros. Se sabe que en *Streptomyces* la degradación de D-xilosa se lleva a cabo a través de la vía de las pentosas fosfato, observándose además que la expresión de los genes de la xilosa isomerasa (*xylA*, *sco1169*) y de la xilulosa cinasa (*xylB*, *sco1170*) son inducidos por la presencia de xilosa y reprimidos por la presencia de glucosa (Wong *et al.*, 1991).



**Figura 5.** Variaciones de la vía de Entner-Doudoroff encontradas en la naturaleza. Pese a la variación resulta común el rompimiento de las moléculas KDPG y KDG a moléculas tricarbonadas.

## 3 | ANTECEDENTES

En un estudio de transcriptómica (Comunicación personal, Tierrafría V, 2015) y proteómica (Tierrafría *et al.*, 2016) de la mutante nula del gen *sco2127* con respecto a su cepa parental M145, se observó que el regulador transcripcional SCO2440, de la familia IclR, se encuentra cotranscrito con los genes que parecen codificar para el catabolismo de L-arabinosa, lo que sugeriría un control transcripcional de SCO2440 sobre estos genes.

## 4 | JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan el catabolismo de las fuentes de carbono es esencial en organismos con importancia industrial, como el género *Streptomyces*.

A través de estudios bioinformáticos se sugiere que el catabolismo de L-arabinosa en *S. coelicolor* se lleva a cabo a través de una vía catabólica novedosa en actinomicetos. Así mismo, se ha sugerido que el regulador transcripcional SCO2440 controla a los genes necesarios para la degradación de L-arabinosa, pero en ambos casos se carece de evidencia que sustente estas hipótesis.

Por ello, el estudio de SCO2440 y de sus genes blanco, aportará evidencia de la regulación transcripcional del metabolismo de L-arabinosa; así mismo, aportará evidencia de una ruta metabólica novedosa en actinomicetos.

## 5 | HIPÓTESIS

SCO2440 es un regulador transcripcional que modula a los genes catabólicos de una ruta no fosforilativa para la degradación de L-arabinosa en *Streptomyces coelicolor*.

# 6 | OBJETIVOS

## **Objetivo General**

Estudiar el papel del regulador transcripcional SCO2440 en el metabolismo de L-arabinosa en *Streptomyces coelicolor*.

## **Objetivos particulares**

- Identificar *in silico* los sitios de unión del regulador transcripcional SCO2440 *in silico*
- Identificar la actividad L-arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor*
- Evaluar el efecto de la presencia y/o ausencia del gen *sco2440* en el consumo de L-arabinosa, en la hipotética actividad L-arabinosa deshidrogenasa y en la producción de metabolitos secundarios

# 7 | MATERIALES Y MÉTODOS

## 7.1 Predicción de los sitios de unión de SCO2440

La predicción de los sitios de unión de SCO2440 se realizó bajo la presunción de que en la región promotora del gen *sco2440* se encuentra un sitio de unión de la proteína SCO2440, dado que muchos reguladores transcripcionales se regulan a si mismos. En la base de datos KEGG (Kanehisa *et al.*, 2017) se buscaron los 50 mejores ortólogos de SCO2440 y se analizó la secuencia río arriba +400 hasta -50, a partir del codón de inicio, en el programa MEME suite (Bailey y Elkan, 1994). El motivo de unión a ADN obtenido se introdujo en el programa PREDetector (Hiard *et al.*, 2007), en donde se encontraron los genes con el motivo de unión a ADN.

## 7.2 Medios de cultivo

*E. coli* fue crecida habitualmente en medio LB (extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%, triptona 1%); se suplemento con apramicina (50 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) o ampicilina (200 µg/mL), dependiendo de las necesidades del cultivo.

Para esporular a *S. coelicolor*, se usó el medio MS (agar 2%, harina de soya 2%, manitol 2%). Para la selección de las candidatas de la mutante del gen *sco2440*, se usó el medio agar nutritivo DNA (Difco), suplementado con apramicina (50 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y/o ácido nalidixico (20 µg/mL). Para la evaluación del crecimiento en medio sólido, las cepas fueron crecidas en cajas Petri con medio químicamente definido NMMP ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%, Difco casaminoácidos 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.06%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.015 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.015 M, agar 1.5%, 1 µg/mL ZnSO<sub>4</sub>, 1µg/mL FeSO<sub>4</sub>, 1 µg/mL MnCl<sub>2</sub>, 1 µg/mL CaCl<sub>2</sub>), suplementado con una fuente de carbono a una concentración de 30 mM. Para la evaluación del crecimiento en medio líquido se uso medio químicamente definido NMMP (Kieser *et al.*, 2000) ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%, Difco casaminoácidos 0.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.06%, polietilenglicol (PEG) 8000 5%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.015 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.015 M, 1 µg/mL ZnSO<sub>4</sub>, 1µg/mL FeSO<sub>4</sub>, 1 µg/mL MnCl<sub>2</sub>, 1 µg/mL CaCl<sub>2</sub>) suplementado con una fuente de carbono a una concentración de 30 mM.

Para las cinéticas de crecimiento, las cepas fueron crecidas en matraces bafleados de 250 mL, con 50 mL de medio NMMP con 30 mM de glucosa y cosechadas a las 36 horas de incubación a 29 °C, 200 rpm. Se centrifugó el micelio (8,000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se desechó el sobrenadante. El micelio se lavó dos veces con solución salina, para eliminar cualquier producto metabólico indeseable. Posteriormente, se inocularon matraces con 50 mL de medio NMMP fresco, suplementado con la fuente de carbono a evaluar, hasta una densidad óptica de 0.05 (OD<sub>600 nm</sub>).

### **7.3 Evaluación de la actividad L-arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor* M145**

Se evaluó la actividad arabinosa deshidrogenasa (AraDH) mediante la observación de la reducción de NADP a 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante tres minutos, en un espectrofotómetro Thermo GENESYS 10S UV-Vis. La actividad arabinosa deshidrogenasa se determinó en una mezcla de reacción Tris 50 mM pH 8.1, NADP 0.5 mM, arabinosa 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 25 mM a una temperatura constante de 50 °C y realizando mediciones cada 20 segundos.

Se colocaron 12 µL de extracto de proteína con 438 µL de la mezcla de reacción y 50 µL de arabinosa 100 mM, para un total de 500 µL. Como blanco, se midió el extracto proteico con 488 µL de agua destilada. Para evitar la interferencia de otras deshidrogenasas cuyo sustrato no es la arabinosa, se midió la reducción de NADP en ausencia de arabinosa y la absorbancia obtenida se resto al resultado obtenido en presencia de arabinosa. Los resultados se expresaron en unidades por mg de proteína, donde una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.

### **7.4 Sustitución del gen *sco2440***

El gen *sco2440* fue sustituido por un *cassette* de resistencia a apramicina, utilizando la metodología de recombinación direccionada por PCR (reacción de polimerasa en cadena, del inglés *Polymerase Chain*



*Reaction*) (Gust *et al.*, 2003). Esta metodología se basa en el trabajo de (Datsenko y Wanner, 2000), en donde se reemplazan secuencias de ADN, aprovechando al sistema fágico de recombinación  $\lambda$ -RED, que permite la recombinación homóloga con secuencias de hasta 30 nucleótidos. Este sistema se encuentra en el plásmido pIJ790, el cual contiene a los genes *exo*, *bet* y *gam*, los cuales codifican para la exonucleasa  $\lambda$ , la recombinasa  $\beta$  y un inhibidor del sistema RecBCD, el cual degrada el ADN lineal dentro de la célula. Estos genes se encuentran bajo el control promotor inducible por arabinosa *pBAD* y del inductor AraC.

Se diseñaron los oligonucleótidos d2440F y d2440R (Tabla S3), los cuales permiten amplificar al inserto de resistencia a apramicina (Tabla S4), a la vez que permiten la recombinación homóloga. La mutación se llevó a cabo en *E. coli*, en el cósmido StC42, el cual contiene al gen *sco2440* y el cual fue proporcionado por el Doctor Luis Servín González, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Se realizó la PCR usando al plásmido pIJ773 como molde. Se transformaron 400 ng del producto de PCR en células electrocompetentes BW25113/pIJ790/StC42, inducidas con arabinosa 10 mM. Se seleccionaron colonias resistentes a apramicina (Apra<sup>R</sup>) y se verificó por PCR (Tabla S5) el reemplazo del gen *sco2440* por el *cassette* de resistencia a apramicina.

El cósmido mutado (StC42 *sco2440::apra*) se transformó en células electrocompetentes de ET12567/pUZ8002 y se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina, apramicina y cloranfenicol (Kan<sup>R</sup> Apra<sup>R</sup> Clm<sup>R</sup>). Estas células se usaron para realizar la conjugación con *S. coelicolor* M145, de acuerdo a lo descrito en la literatura (Gust *et al.*, 2003).

Se seleccionaron colonias Apra<sup>R</sup> y se comprobó la doble recombinación mediante la sensibilidad a kanamicina (Kan<sup>S</sup>), por lo que colonias Apra<sup>R</sup> y Kan<sup>S</sup> se comprobaron por PCR y se verificó el fenotipo mutante.

## 7.5 Clonación del gen *sco2440*

Se amplificó el gen *sco2440* con la región intergénica río arriba (Tabla S5), usando a los oligonucleótidos Bam2440F y Eco2440R (Tabla S2). El producto de PCR y el plásmido se digirieron con las enzimas *Bam*HI (Thermo) y *Eco*RV (NEB). Adicionalmente, el plásmido se defosforiló con CIP (NEB). Se ligaron 60 ng de plásmido con 60 ng del inserto y se transformó en células electrocompetentes de DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron colonias Apra<sup>R</sup> y se extrajo plásmido mediante lisis alcalina (Sambrook y W Russell, 2001). Se comprobó la inserción del producto de PCR mediante la

digestión con *SacI* (Thermo). Este plásmido se conjugó con células de M145 y se seleccionaron candidatas Apra<sup>R</sup>, las cuales fueron verificadas posteriormente por PCR.

## **7.6 Evaluación del crecimiento**

El crecimiento en medio sólido se evaluó en placas de agar con medio mínimo NMMP suplementado con arabinosa o glucosa 30 mM. Se depositaron 10<sup>6</sup> esporas resuspendidas en 10 µL de agua y se dejó secar la placa. El crecimiento se monitoreó mediante fotografías cada 24 horas.

El crecimiento en medio líquido se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo, a una longitud de onda de 595 nm, en un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus.

## **7.7 Evaluación del consumo de L-arabinosa**

El consumo de arabinosa se determinó a través de la medición del carbohidrato residual en el medio de cultivo, utilizando una derivatización con floroglucinol, de acuerdo a la literatura (Kiszonas, Courtin y Morris, 2012). Cotidianamente se añadieron 100 µL de muestra a un mililitro de reactivo (1.63 % floroglucinol, 90% ácido acético glacial, 8 % etanol, 1.6% HCl), se hirvió la muestra durante 25 minutos y se comparó con la respuesta dada por una curva estándar de arabinosa a 535 nm en un espectrofotómetro Thermo GENESYS 10S UV-Vis.

## **7.8 Evaluación de la producción de actinorrodina**

La producción de actinorrodina se evaluó con 500 µL de cultivo, a los cuales se les añadió 250 µL de KOH 3 N. Se incubó a 4 °C con agitación continua durante 16 horas. Se centrifugó (10,000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro de luz visible Thermo GENESYS 10S UV-Vis y se calculó la concentración de actinorrodina (ACT) de acuerdo a su coeficiente de absorción ( $\epsilon = 25320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## **7.9 Evaluación de la producción de undecilprodigiosina**

La producción de undecilprodigiosina se evaluó con 500 µL de cultivo, los cuales se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. Al botón celular se añadieron 500 µL de metanol acidificado a pH 2. Se incubó a 4 °C con agitación continua durante 16 horas. Se centrifugó (10,000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro de luz visible

Thermo GENESYS 10S UV-Vis y se calculó la concentración de undecilprodigiosina (RED) de acuerdo a su coeficiente de absorción ( $\epsilon = 100500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 7.10 Extracción y cuantificación de proteína

Habitualmente, se tomó un mililitro de cultivo, se centrifugó (8,000 x g, 10 minutos, 4 °C) y se retiró el sobrenadante. Se lavó el botón celular con un mililitro de solución salina y se centrifugó nuevamente. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se congeló a -20 °C hasta la continuación del procesamiento.

Para extraer las proteínas, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de solución Tris 100 mM pH 8.1 con glicerol al 20%. Se resuspendió el botón celular y se sonicó (Amplitud 60, durante un minuto en lapsos de 5 segundos). Se centrifugó (10,000 x g, 15 minutos, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante.

Se cuantificó la proteína mediante la técnica de Bradford, usando el sistema de BioRad *Protein Assay*. Se diluyó el reactivo con agua MiliQ, en una proporción 1 a 5. Se realizó una curva estándar con albumina de suero bovino (ASB) en el rango de 0.05 a 0.5 mg/mL de proteína. En una microplaca de 96 pozos, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  del estándar o de la muestra y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo diluido, mezclando con la micropipeta multicanal. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, en un espectrofotómetro para placa de 96 pozos Thermo Scientific Multiscan FC.

## 7.11 Modelaje de las proteínas SCO2402 y SCO2440

Se modelaron las proteínas SCO2402 y SCO2440, mediante modelado por homología, usando el algoritmo de Modeller (Webb y Sali, 2014). Se obtuvo la secuencia FASTA de la secuencia aminoacídica y se buscaron homologos en BLAST, usando la base de datos de PDB, para proteínas previamente cristalizadas. Se seleccionó el molde para el modelado de acuerdo a: i) Porcentaje de identidad; ii) Porcentaje de cobertura; iii) Número de mutaciones. Una vez determinada la mejor secuencia FASTA para el molde, se alimentó al programa Modeller con ellas y se solicitó el modelado de 1000 estructuras. Una vez obtenidas las 1000 estructuras, se evaluaron mediante el programa PDBeFold (Krissinel y Henrick, 2004), en donde se seleccionaron a las mejores 100, con base a su índice RMSD y a su *Q-score*. Las coincidencias para ambas proteínas se analizaron en el programa PROSA (Sippl, 1993), en donde se evaluó su *Z-score*. Se seleccionó a la mejor proteína con base a su índice RMSD, su *Q-score* y su *Z-score*.

Una vez seleccionada la proteína se validó la estructura tridimensional mediante el algoritmo de HMMER (Eddy, 2011) en conjunto con Rosetta (Conchúir *et al.*, 2015).

Con la estructura tridimensional de la proteína se evaluó la afinidad de esta a moléculas pequeñas modeladas con Spartan 10 (Wavefunction, 2006), mediante cálculos de mecánica molecular con el programa AutoDockTools (Morris *et al.*, 2009).

Habitualmente, la visualización se llevó a cabo con Pymol (Schrödinger, sin fecha), UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) y con VMD (Humphrey, Dalke y Schulten, 1996), por lo que las imágenes presentadas en este trabajo se realizaron con uno o con otro software.

## **7.12 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por duplicado, con respecto al tiempo, por lo que los resultados presentados en este trabajo son el resultado de dos experimentos independientes.

Para el análisis estadístico y la presentación gráfica de los resultados, se usó el programa GraphPad Prism 5. Habitualmente se usó el análisis de ANOVA de una vía, con el *post test* de Bonferroni, para determinar las diferencias significativas en los resultados obtenidos.

# 8 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 8.1 SCO2440 posee sitios de unión en proteínas relacionadas al metabolismo del carbono

En el genoma de *S. coelicolor* se encuentran anotados 16 genes que codifican para reguladores transcripcionales de la familia IclR; de estos, solo cuatro han sido estudiados. Dado el tamaño del genoma de *S. coelicolor*, es común encontrar duplicaciones de genes, por lo que se decidió comparar la secuencia de los reguladores transcripcionales ya descritos con la secuencia de SCO2440.

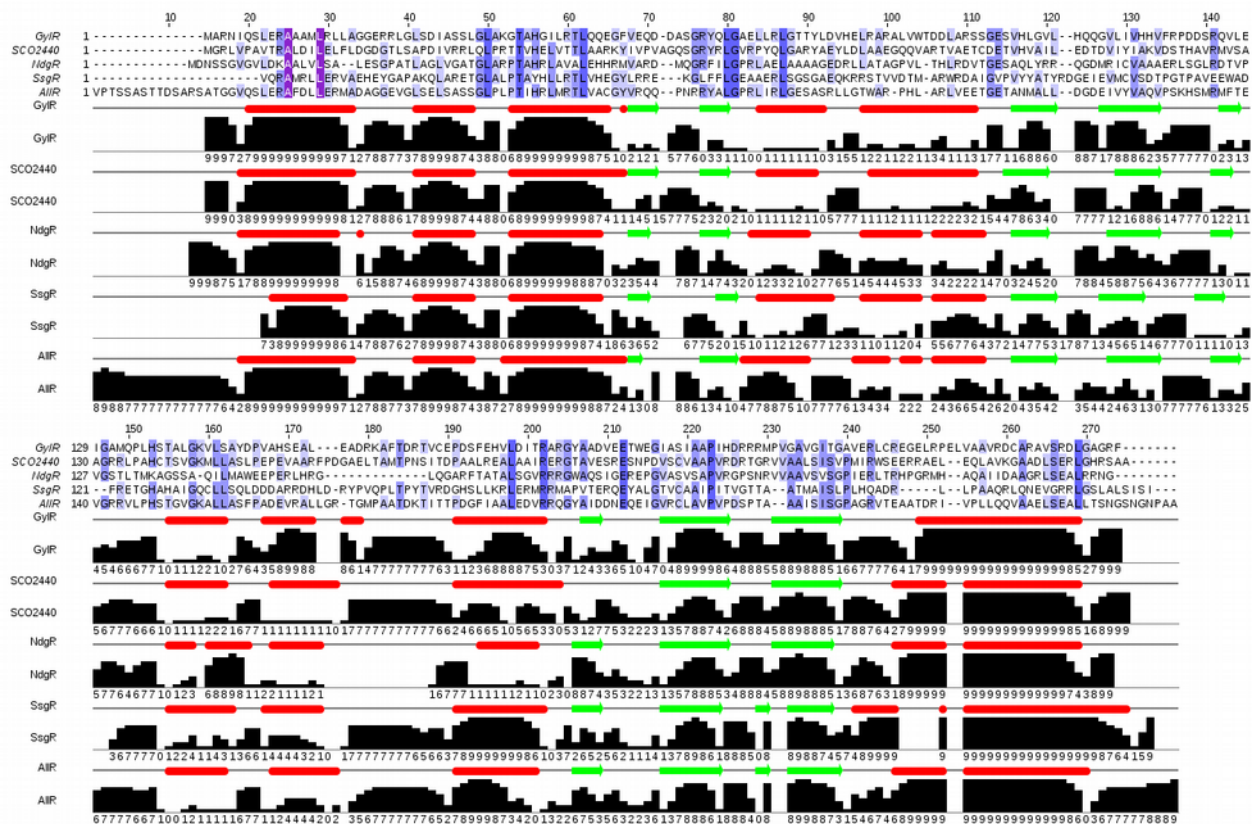
La secuencia aminoacídica de SCO2440 se comparó con la secuencia de los otros reguladores IclR que ya han sido estudiados en *S. coelicolor* (AllR, GylR, NdgR, SsgR), y se alinearon usando el algoritmo MUSCLE (McWilliam *et al.*, 2013). Se encontró que la secuencia de aminoácidos no está conservada, observándose identidades por debajo del 35%, lo que indicó que difícilmente SCO2440 sea un parálogo de algún regulador transcripcional previamente estudiado.

**Tabla 2.** Resultados del alineamiento entre SCO2440 y las proteínas de la familia IclR estudiadas previamente en *S. coelicolor*.

Gen	Función	Identidad (%)
AllR	Catabolismo de alantoína	32.80
GylR	Metabolismo de glicerol	29.37
NdgR	Metabolismo de aminoácidos	29.24
SsgR	Regulador de la esporulación	22.88

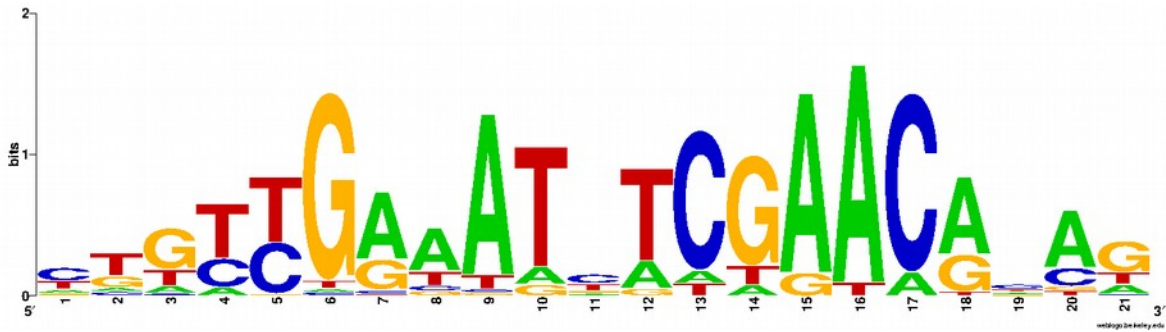
Se analizó la estructura secundaria de SCO2440, a través de la comparación con los otros reguladores previamente estudiados.

Mediante alineamientos con el algoritmo ClustalO (Sievers *et al.*, 2011) y la predicción de estructuras secundarias ( $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$ ) en el visualizador JalView (Waterhouse *et al.*, 2009) se observó que si bien la conservación en la secuencia aminoácídica es baja, la localización y frecuencia de las  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  se encuentra conservada. Esto refuerza el que SCO2440 sea un miembro de la familia IclR, pero que posiblemente tenga regule a un grupo diferente de genes blanco (Figura 6).



**Figura 6.** Predicción y alineamiento de las estructuras secundarias de los reguladores IclR estudiados en *S. coelicolor*, en comparación con SCO2440. Las barras negras y los números indican el nivel de conservación del aminoácido, mientras que las barras rojas representan hélices alfa, y las barras verdes representan hojas beta.

Por otra parte, se sabe que los reguladores transcripcionales tienden a regularse a si mismos y esta característica puede utilizarse para conocer la secuencia a la que es afín el sitio de unión a ADN. Se buscó la posible secuencia de unión a su propia región promotora, mediante el análisis con MEME suite (Bailey y Elkan, 1994) de una base de datos conformada por las regiones -400 a +50, a partir del codón de inicio, de los 50 mejores ortólogos de *sco2440* (Tabla S1), tras lo cual el programa arroja una secuencia consenso de 21 nucleótidos (Valor E  $6.1 \times 10^{-114}$ ) (Figura 4).



**Figura 6.** Secuencia consenso para el sitio de unión de SCO2440, generado en MEME suite.

Esta secuencia nucleotídica se buscó en el genoma de *S. coelicolor* mediante el programa PREDetector (Tocquin *et al.*, 2016). Se encontró un regulón putativo en 95 regiones promotoras, controlando la expresión de 127 genes distribuidos a lo largo del cromosoma, pero muchas de ellas (43%) se encuentran anotados como proteínas hipotéticas (Tabla S2). Destacablemente, se encontró la presencia de sitios de unión de SCO2440 en genes anotados para la degradación de xilanos y genes catabólicos del metabolismo de arabinosa, lo cual corrobora los resultados previamente encontrados en nuestro laboratorio (Comunicación personal, V. Tierrafría, 2015). Así mismo, se encontró el posible sitio de unión de SCO2440 en el activador de la biosíntesis de la actinorrodina *actII-ORF4* (Tabla 3), lo que sugeriría un control transcripcional en la biosíntesis de actinorrodina, un pigmento de origen policetídeo de color azul. Es necesario hacer notar que estas son predicciones *in silico* y deben de ser verificadas experimentalmente.

**Tabla 3.** Genes representativos del regulón de SCO2440. La posición indica el inicio de la secuencia del posible sitio de unión de SCO2440, con respecto al codón de inicio del gen indicado. La puntuación indica el parecido con la secuencia consenso, siendo el máximo 25.

Operón	Función	Secuencia	Posición	Puntuación
<i>sco2440</i>	Regulador transcripcional IclR putativo	ATATGTTTCGAGATTCAACAA	-39	25
<i>sco2439</i>	L-arabinonolactonasa	CGATCGGAATAACGAACACAG	-61	17.3
<i>sco2401</i>	L-arabinonato deshidratasa	GTGACGAAATATCGAACACAG	-36	19.2
<i>sco2402</i>	L-arabinosa deshidrogenasa			
<i>sco2427</i>	Arabinonasa secretada putativa	TGTTTCAGAAATTTTCGAACAACA	-123	15.9
<i>sco5931</i>	Xilanasa A	TGTTTCGATATTGCGAACATGT	-336	15.1
<i>sco5932</i>	Arabinofuranosidasa putativa	TGTTTCGATATTGCGAACATGT	-75	15.1
<i>sco1871</i>	$\alpha$ -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa	AGTTGTTCGATATACTGAACG	-50	13.6
<i>sco5085</i>	Activador de la biosíntesis de actinorrodina	CTGATTAATTTTTGATCAATA	-114	11.9

## 8.2 Evaluación de la actividad L-arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor* M145

La demostración de la actividad de la ruta metabólica no fosforilativa para la degradación de arabinosa, implica un avance en el conocimiento del metabolismo primario de *S. coelicolor* y otros actinomicetos. Además, el conocimiento de más rutas metabólicas aumentaría el arsenal de herramientas metabólicas disponibles, pudiendo a la larga ser aprovechada para redirigir el flujo metabólico, aumentando la reserva de algunos metabolitos primarios (i.e.  $\alpha$ -cetoglutarato), lo cual podría tener como efecto un aumento en la producción de compuestos de interés (i.e. policétidos). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si ésta ruta es esencial para la degradación de la arabinosa o si acaso *S. coelicolor* posee una ruta más adecuada y que aún no ha sido deducida.

Para ello, se estudiará a la primera enzima catabólica: la L-arabinosa deshidrogenasa. La actividad de la arabinosa deshidrogenasa (AraDH) ha sido descrita en arqueas y en bacterias Gram negativas (Watanabe, Kodak y Makino, 2005; Nunn *et al.*, 2010; Johnsen *et al.*, 2013). En *S. coelicolor*, el gen *sco2402* codifica para la enzima L-1-arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor*, por lo que su estudio representaría el primero de esta enzima en actinomicetos y en Gram positivos.

La AraDH cataliza la oxidación de L-arabinosa a L-arabinonolactona, en una reacción dependiente de NADP (Figura 8).

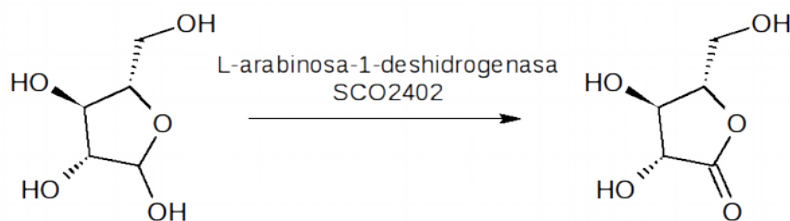


Figura 8. Oxidación de la arabinosa a arabinonolactona, catalizada por SCO2402.

Al analizarse la secuencia aminoácida de SCO2402 se encontraron cuatro dominios conservados, de acuerdo con la base de datos KEGG (Tabla 4).

**Tabla 4.** Dominios del gen *sco2402*, de acuerdo a la base de datos KEGG

Dominio	Función	Inicio	Fin	Valor E
ADH_N	Dominio alcohol deshidrogenasa parecido a GroES	25	133	$2.7 \times 10^{-25}$
Glu_dehyd_C	Glucosa deshidrogenasa C-terminal	159	317	$3.1 \times 10^{-9}$
ADH_zinc_N	Sitio de deshidrogenasa de unión a zinc	176	288	$1.9 \times 10^{-13}$
ADH_zinc_N_2	Sitio de deshidrogenasa de unión a zinc	211	332	$2.3 \times 10^{-08}$



Los dominios corresponden al de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP, con un dominio de unión a zinc; en los reportes de la actividad AraDH existentes, no se utiliza ningún ión divalente en la mezcla de reacción. Para evaluar la similitud entre las secuencias aminoacídicas de SCO2402 y otras arabinosa deshidrogenasas encontradas, se alinearon las secuencias aminoacídicas en un alineamiento global con el programa MUSCLE. Al alinearse las secuencias aminoacídicas, se observó que la secuencia de SCO2402 no se encuentra conservada con respecto a alguna otra arabinosa deshidrogenasa previamente estudiada (Tabla 5). Sin embargo, es importante resaltar que las diferencias en las secuencias aminoacídicas podrían ser un reflejo de las diferencias entre los tipos de organismos.

**Tabla 5.** Resultados del alineamiento entre SCO2402 y otras L-1-arabinosa deshidrogenasas previamente estudiadas

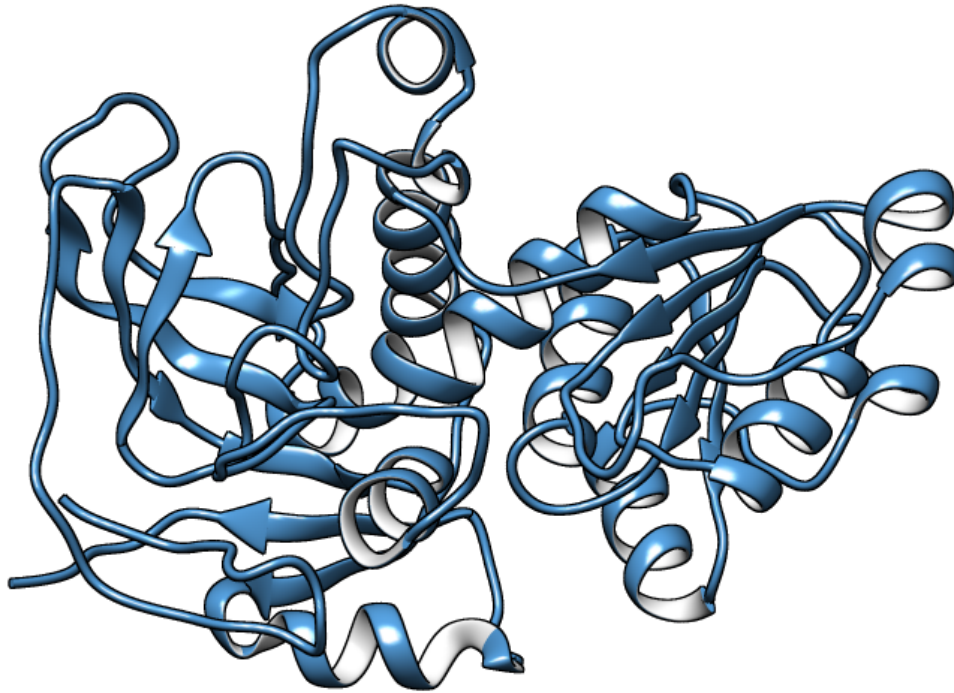
<b>Organismo</b>	<b>Identidad (%)</b>
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	23.01
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	22.46
<i>Azospirillum brasiliense</i>	23.66
<i>Haloferax volcanii</i>	15.29

Mediante una aproximación diferente, se trató de evaluar el potencial de SCO2402 como una arabinosa deshidrogenasa. Por tanto, se llevó a cabo *in silico* una evaluación de la afinidad de SCO2402 por su sustrato y su producto predicho.

Para ello, se inició con el modelado de la estructura tridimensional de SCO2402, la arabinosa deshidrogenasa putativa. Para este fin, se usó la estructura cristalizada de la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de *Bacillus stearothermophilus* cepa LLD-R (código de acceso en PDB, 1RJW; identidad 34%, cobertura 64%).

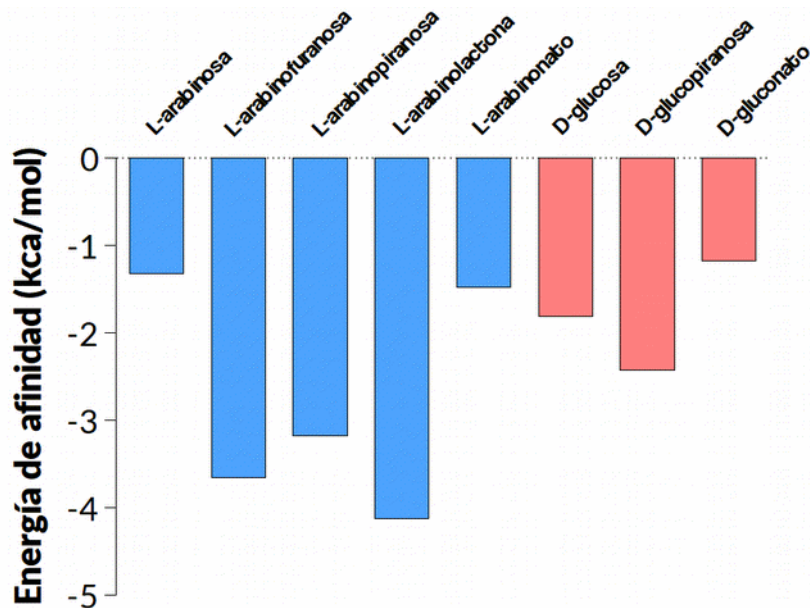
La proteína modelada (Figura 9) se validó mediante el algoritmo de HMMER (Eddy, 2011). Esta proteína al ser reparada y recuperada su secuencia coincidió con la de la secuencia de SCO2402, lo que sugiere que la estructura tridimensional de la proteína modelada no es un falso positivo y podría ser una representación de su forma natural.

Con la estructura tridimensional de la proteína, se llevaron a cabo cálculos de mecánica molecular para determinar la afinidad teórica *in silico* entre SCO2402 y moléculas pequeñas (Morris *et al.*, 2009). Los metabolitos seleccionados para ser evaluados fueron L-arabinosa, L-arabinofuranosa, L-arabinopiranososa, L-arabinonolactona y L-arabinonato. Como control negativo se usaron metabolitos de la vía de ED para glucosa (D-glucosa, D-glucopiranososa, D-gluconato).



**Figura 9.** Proteína SCO2402 modelada por homología con base a la alcohol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  de *Bacillus stearothermophilus* (PDB 1RJW).

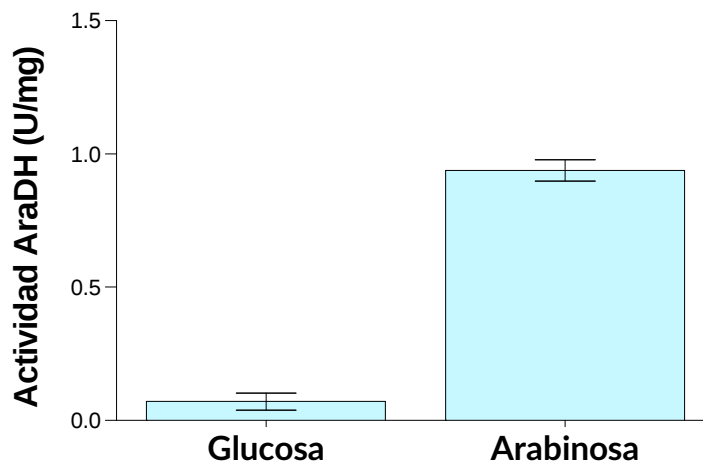
Interesantemente, se predijo una mayor afinidad entre SCO2402 y los compuestos cíclicos derivados de la arabinosa, mientras que se observó una baja afinidad por compuestos lineales como la arabinosa y el arabinonato (Figura 10).



**Figura 10.** Energía hipotética de unión de diferentes sustratos a SCO2402. A menor energía de unión, se considera más estable la interacción. De acuerdo a estos resultados, los compuestos cíclicos son más estables al unirse a SCO2402.

Estos resultados podrían sugerir que para que SCO2402 pueda actuar sobre la arabinosa, esta debe de encontrarse en una forma cíclica de hemiacetal, lo cual facilitaría la oxidación del grupo hidroxilo a un compuesto tipo lactona. Esta observación también corresponde con el hecho de que en una solución acuosa los azúcares tienden a ciclarse espontáneamente, lo que asegura que en el medio citosólico la L-arabinosa se encuentre en forma de hemiacetal. Estas predicciones *in silico* concuerdan con nuestra suposición de que SCO2402 tiene como sustrato a arabinosa y como producto a arabinonolactona. No obstante, es interesante observar que la L-arabinonolactona posee una mayor afinidad que su sustrato, lo cual no permitiría un nuevo ciclo enzimático, sin embargo, esto podría deberse a que el análisis se llevó a cabo con mecánica molecular, una aproximación que considera que a la proteína como un elemento inmóvil, lo cual no es cercano a la realidad. Para una mejor aproximación se requiere del uso de dinámica molecular, una aproximación que requiere el uso de un gran poder computacional.

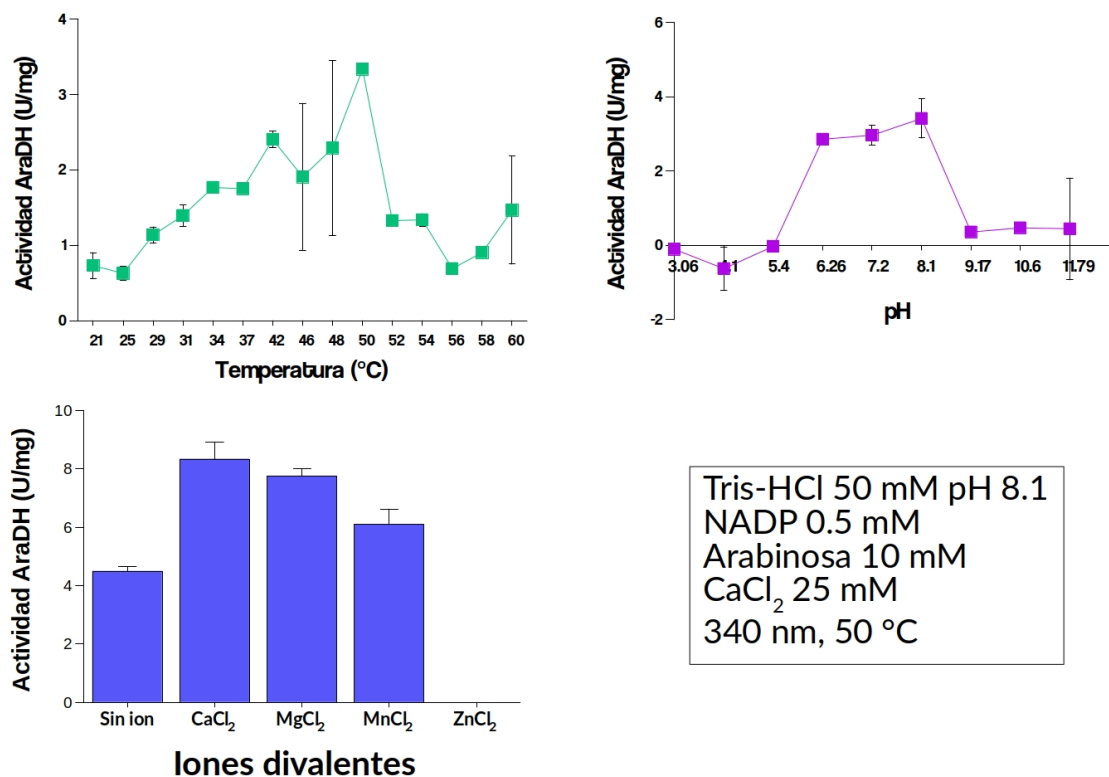
Para confirmar experimentalmente que *S. coelicolor* posee actividad AraDH se utilizó una adaptación del método descrito para la xilosa deshidrogenasa de *S. sulfataricus* (Nunn *et al.*, 2010) y el ensayo para la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius* (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014), habitualmente llevado a cabo en este laboratorio. Se decidió realizar el ensayo a temperatura ambiente, midiendo la reducción de NADP a NADPH a una longitud de onda de 340 nm, en buffer Tris-HCl pH 7.2 50 mM, NADP 50  $\mu$ M y arabinosa 10 mM. Para medir la actividad se usaron extractos celulares de la cepa M145 crecidas en medio mínimo NMMP (Kieser *et al.*, 2000) suplementado con glucosa o arabinosa 30 mM (Figura 11). Los resultados de actividad se muestran como unidades por miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.



**Figura 11.** Actividad arabinosa deshidrogenasa en *S. coelicolor* M145, a partir de cultivos en medio mínimo con glucosa o arabinosa 30 mM. La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.

Con este resultado se determinó la presencia de actividad AraDH, la cual parece ser inducible por la presencia de arabinosa, por lo que el presente trabajo es el primer reporte de esta actividad en actinomicetos y en bacterias Gram positivas.

Si bien se logró determinar la actividad AraDH en las condiciones probadas, difícilmente estas condiciones son las óptimas para la actividad enzimática. En aras de hacer esta determinación lo más eficiente posible, se optimizaron las condiciones de temperatura y pH. Además, se evaluó si la actividad AraDH se ve modificada por la presencia de iones divalentes, dado que la proteína SCO2402 parece tener un dominio de unión a zinc ( $Zn^{2+}$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Pruebas para determinar las condiciones óptimas para la actividad AraDH. Se probaron condiciones de temperatura (verde), pH (morado) y la actividad en presencia de iones divalentes (azul). La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.

La mayor actividad AraDH en los extractos celulares se obtuvo en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8.1, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, NADP 50 μM, arabinosa 10 mM a 50 °C; estas condiciones se usaron habitualmente para determinar la actividad AraDH en los estudios subsecuentes.

Dado que la actividad AraDH esta siendo determinada a partir de un extracto proteico crudo en donde puede haber más de una deshidrogenasa que reduzca el NADP, en cada extracto proteico analizado se hizo una reacción blanco en ausencia de arabinosa, con el fin de restar laa reducción de

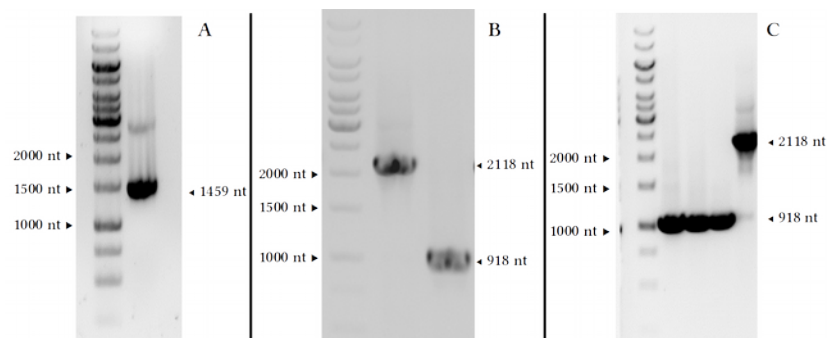
NADP inespecífica en ausencia de arabinosa. De esta manera aseguramos que la reducción de NADP es causada solo por deshidrogenasas que utilizan a arabinosa como sustrato. Sin embargo, no es posible asegurar que la actividad AraDH observada es producto de la expresión solamente por la proteína SCO2402, si bien este gen no parece tener duplicados en el genoma de *S. coelicolor*.

### 8.3 Eliminación y clonación de *sco2440*

La verificación de la actividad AraDH nos da evidencia de que la arabinosa podría estar siendo degradada a través de una vía modificada de ED para pentosas y es posible que SCO2440 participa en el metabolismo de arabinosa a través del control de los genes para la degradación de la misma.

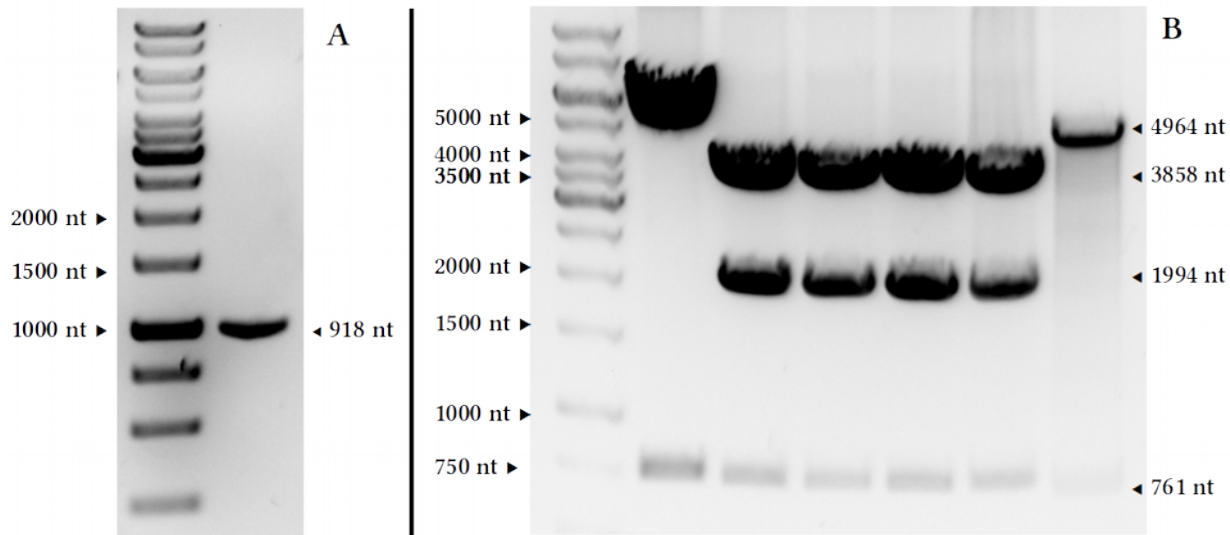
Para evaluar el papel de SCO2440 como modulador del metabolismo de arabinosa, se realizaron dos aproximaciones experimentales. En la primera, se reemplazó parcialmente al gen *sco2440*, buscando evaluar el efecto de la ausencia de un regulador transcripcional funcional, siguiendo el método de (Gust *et al.*, 2003). En la segunda aproximación se clonó al gen *sco2440* con su posible región promotora en el plásmido integrativo pSET152, el cual se integra selectivamente en los sitios *att* del fago  $\phi$ C31 en el genoma de *S. coelicolor* (Flett, Mersinias y Smith, 1997). Esta aproximación nos permitió evaluar el efecto de una sobreexpresión en el sistema regulatorio.

Para el reemplazo del gen *sco2440*, se amplificó el inserto de resistencia a apramicina (Figura 13A) y el producto de amplificación fue usado para eliminar el gen *sco2440* en el cósmido StC42. La eliminación de este gen se verificó por digestión y por PCR (Figura 13B). El cósmido mutado se usó para conjugar con *S. coelicolor* M145 y posteriormente se analizaron diferentes colonias  $\text{Apra}^R \text{Kan}^S$  mediante PCR (Figura 13C). Se seleccionó a una sola candidata y esta cepa con la doble recombinación homóloga que reemplaza al gen *sco2440* con el inserto de apramicina, se denominó *2440::apra* y fue usada para los experimentos posteriores.



**Figura 13.** Interrupción del gen *sco2440*. A, PCR de amplificación del inserto de resistencia a apramicina (1459 nt); B, PCR de verificación del cósmido mutado, el producto de 918 nt corresponde al gen *sco2440* integro, mientras que el producto de 2118 nt corresponde al gen interrumpido con el inserto de resistencia a apramicina; C, PCR de verificación de cuatro candidatas  $\text{Apra}^R \text{Kana}^S$ . Los productos de PCR son idénticos a los de la figura 13B

Para la integración de una copia extra del gen *sco2440*, se amplificó al gen *sco2440* con su región promotora (Figura 14A). El producto de PCR y el plásmido pSET152 se digirieron con las enzimas *BamHI* y *EcoRV*, tras lo cual se ligaron y transformaron en células DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Se seleccionaron posibles colonias candidatas y se extrajo el plásmido por lisis alcalina; se comprobó la construcción por digestión y este plásmido se denominó pSET152-*sco2440* (Figura 14B). El plásmido se conjugó con células de M145 y se seleccionaron colonias Apra<sup>R</sup>. Esta cepa se denominó 2x2440 y fue usada en los experimentos posteriores.

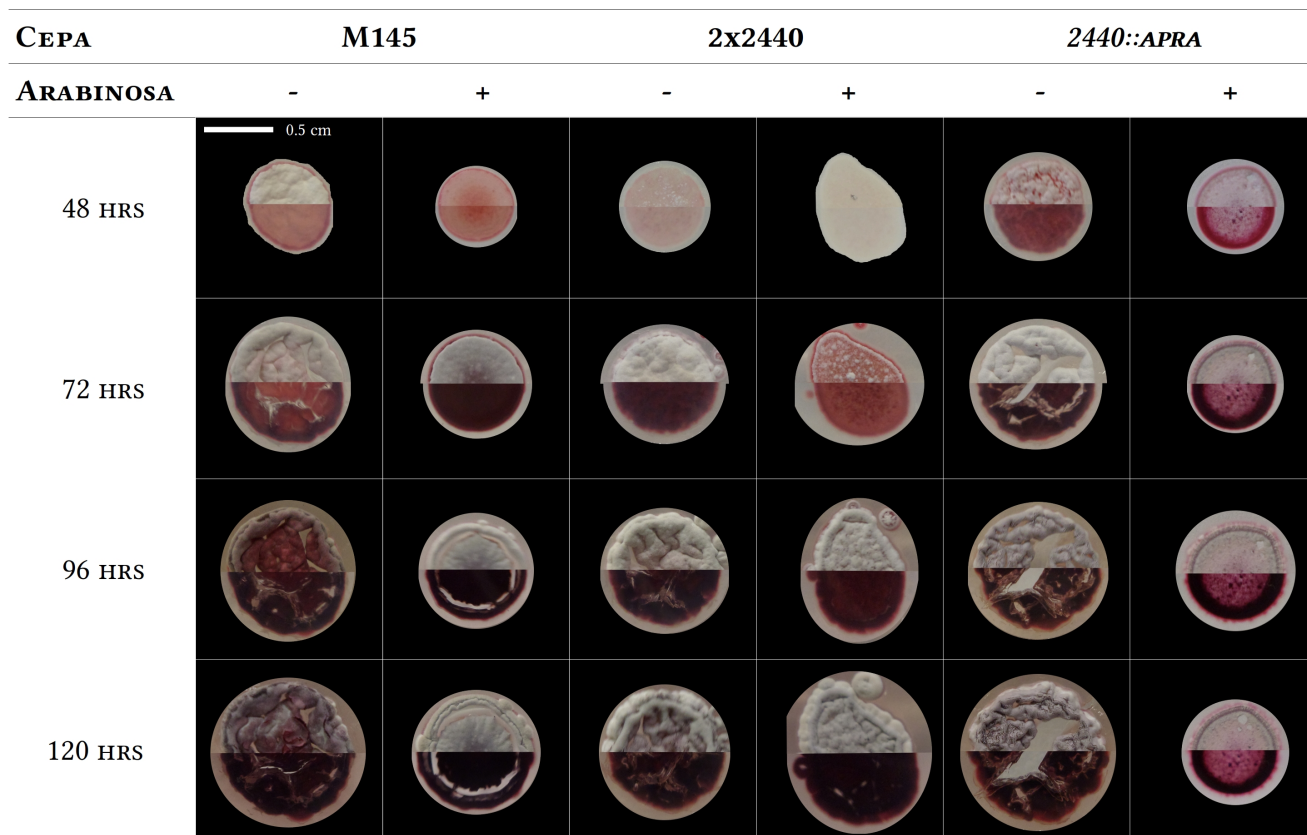


**Figura 14.** Clonación del gen *sco2440* en el plásmido pSET152. A, PCR de amplificación del gen *sco2440* con su región promotora; B, Digestión de plásmido con la posible construcción pSET152-*sco2440* con la enzima *SacI*, el plásmido con el gen *sco2440* dará un patrón de 3858, 1994 y 761 nt, mientras que el plásmido vacío dará un patrón de 4964 y 761 nt.

## 8.4 Evaluación del crecimiento en medio sólido

Si bien SCO2440 podría modular el metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor*, se desconoce si este control es positivo o negativo. En una primera aproximación se evaluó si la presencia de arabinosa limita el crecimiento de la colonia.

Las cepas 2x2440 (la cepa parental con el plásmido pSET152-*sco2440*) y la cepa mutante *2440::apra* (cepa sin el gen *sco2440*) se inocularon en medio sólido NMMP suplementado con arabinosa (+) o con glucosa (-) 30 mM (Figura 15).



**Figura 15.** Comparación del crecimiento en medio sólido con glucosa (-) y con arabinosa(+) a lo largo del tiempo. En la imagen se presenta una sola colonia en donde la parte superior de la imagen muestra la interfase aérea, mientras que en la parte inferior nos muestra el envés de la colonia, a través del agar.

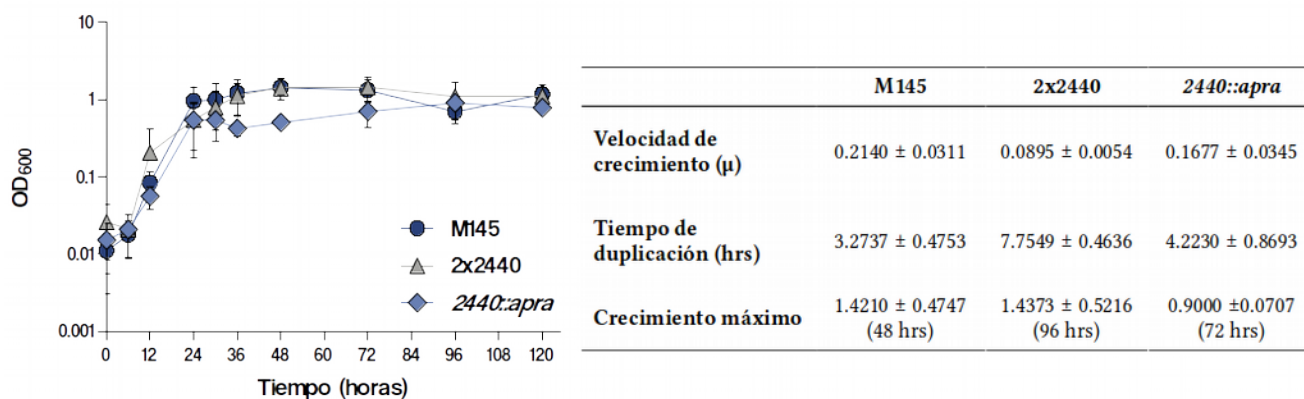
Se observó una disminución en el crecimiento en la cepa *2440::apra*, en la cual hay una disminución en el diámetro de la colonia crecida en arabinosa (0.8 cm de diámetro) con respecto a la cepa crecida en presencia de glucosa (1.15 cm de diámetro) a las 120 horas de crecimiento. Por otra parte, la cepa *2440::apra* también presentó una disminución en el tamaño de la colonia con respecto a la cepa parental M145 cuando crece en arabinosa (1 cm de diámetro). Por otra parte, la cepa 2x2440 demostró su capacidad para crecer en presencia de arabinosa, sin observarse cambios en el tamaño de la colonia al compararse con el crecimiento de la misma en ausencia de arabinosa.

Con este experimento se demuestra que las cepas 2x2440 y *2440::apra* son capaces de crecer en presencia de arabinosa.

## 8.5 Evaluación del crecimiento en medio líquido

Para una mejor evaluación de las afectaciones en el crecimiento en presencia de arabinosa, se evaluó el crecimiento de las cepas *2x2440* y *2440::apra* en medio líquido, con arabinosa como fuente de carbono en un medio químicamente definido.

Se usó el medio NMMP (Kieser *et al.*, 2000) suplementado con 30 mM de arabinosa y se midió la OD<sub>600</sub> a tiempos determinados (Figura 16).



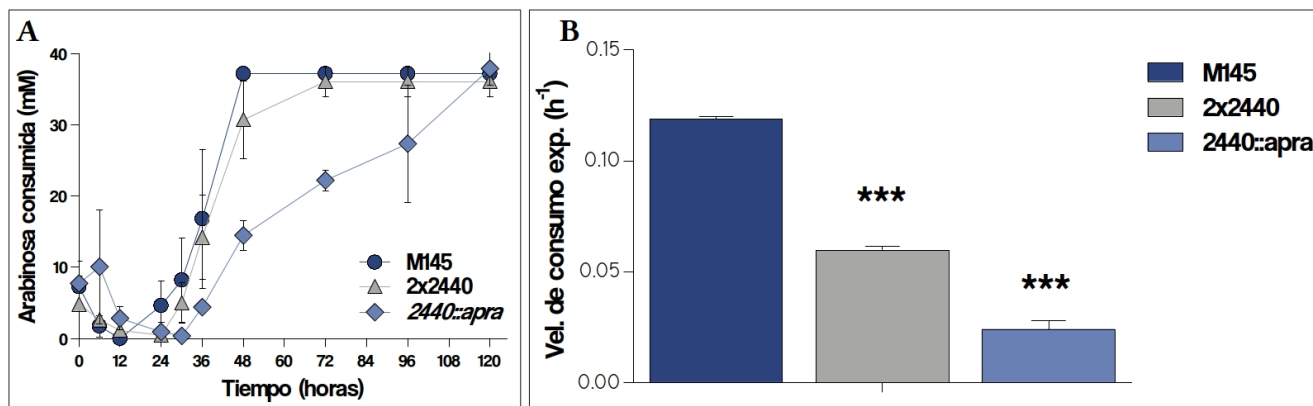
**Figura 16.** Cinética de crecimiento de las distintas cepas en medio NMMP con arabinosa 30 mM. Se presentan los parámetros cinéticos calculados, pero no se observan diferencias significativas entre ellos.

Se observó un ligero retraso en el crecimiento de la cepa *2440::apra* y al analizarse las velocidades de crecimiento no se encontraron diferencias significativas entre las cepas. Además, todas las cepas alcanzan un crecimiento máximo parecido. Este resultado parece indicar que independientemente de la ausencia o sobreexpresión de *sco2440*, el crecimiento en presencia de arabinosa no se ve afectado. Sin embargo, este resultado se debe de complementar con el consumo de arabinosa a lo largo de la cinética.



## 8.6 Consumo de L-arabinosa

Se evaluó el consumo de arabinosa, midiendo el carbohidrato residual en el medio de cultivo y calculando el carbohidrato consumido (Figura 17A) Además, se calculó la velocidad máxima de consumo (Figura 17B).

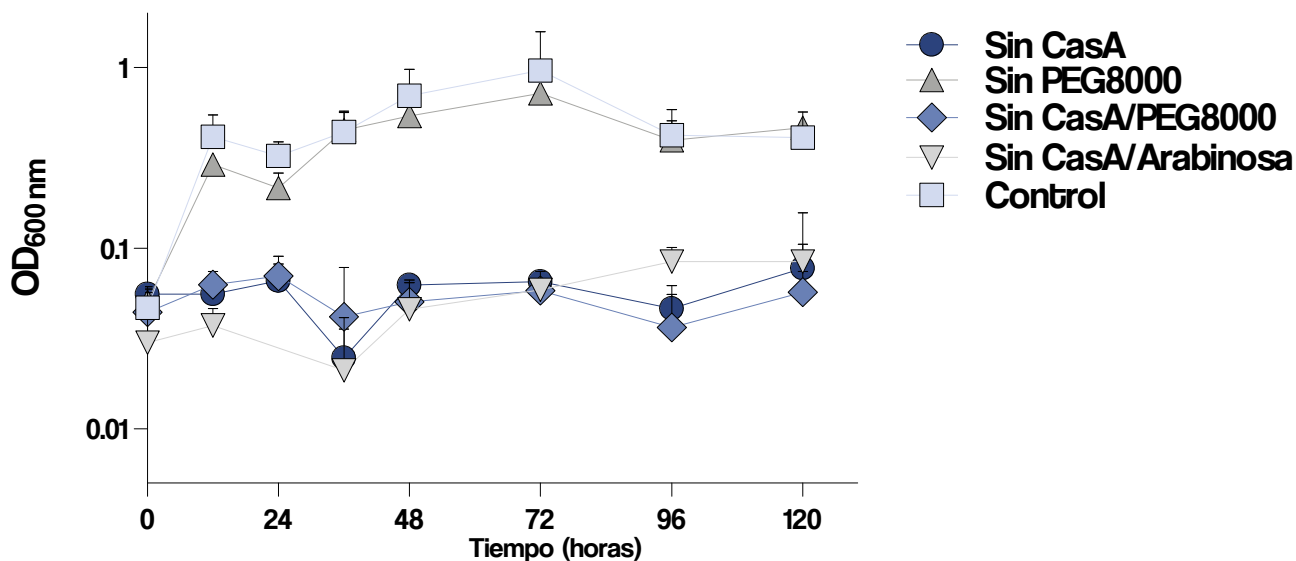


**Figura 17.** Consumo de arabinosa. A. Cinética de consumo de arabinosa en medio mínimo con arabinosa 30 mM. B. Velocidad máxima de consumo \*\*\*  $P < 0.001$ , ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni; la diferencia se calculó con respecto a la cepa M145.

En las cepas evaluadas se observó una disminución significativa en el consumo de arabinosa, con respecto a la cepa parental M145. Esto resulta interesante, porque en principio, el fenotipo de estas cepas debería ser opuesto, dado que la cepa 2x2440 tendría una mayor abundancia de la proteína SCO2440 que la cepa parental, mientras que la cepa 2440::apra carece de SCO2440. Así, si SCO2440 fuera un activador, observaríamos un aumento en la velocidad de consumo de arabinosa en la cepa 2x2440 y una disminución en la cepa 2440::apra. Por otra parte, si SCO2440 actuara como un represor, observaríamos una disminución en el consumo de arabinosa en la cepa 2x2440, mientras que el consumo de la mutante 2440::apra debería verse aumentado. Sin embargo, se observa una disminución significativa en el consumo de arabinosa en ambos casos. Al analizar el comportamiento de la cinética completa nos permite concluir que si bien la velocidad de consumo esta disminuida en ambos casos, la tendencia de la cepa 2x2440 es parecida a la observada en M145.

Es interesante no observar concordancia entre el crecimiento y el consumo de arabinosa en la cepa 2440::apra. La cepa 2440::apra tiene su fase exponencial de crecimiento a partir de las 12 horas de incubación, mientras que el consumo de arabinosa inicia a partir de las 30 horas de crecimiento, lo que sugiere el uso de otra fuente de carbono para el crecimiento de la célula. ¿Qué fuente de carbono está utilizando para la formación de biomasa?

El medio de cultivo NMMP tiene casaminoácidos (0.5%) como fuente de nitrógeno y de aminoácidos esenciales y PEG 8000 (5%) como agente dispersante, así que se evaluó la capacidad de la cepa *2440::apra* para crecer en ausencia de casaminoácidos y de PEG 8000 en presencia de arabinosa (Figura 18).



**Figura 18.** Evaluación del crecimiento de la cepa *2440::apra* en medio NMMP. El medio carece de los componentes indicados y, a excepción de la condición Sin CasA/arabinosa, el medio se encontraba suplementado con arabinosa 30 mM. En los cultivos sin casaminoácidos, la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  usada fue de 0.4%. El control se refiere al medio comúnmente preparado, como se encuentra en Materiales y Métodos.

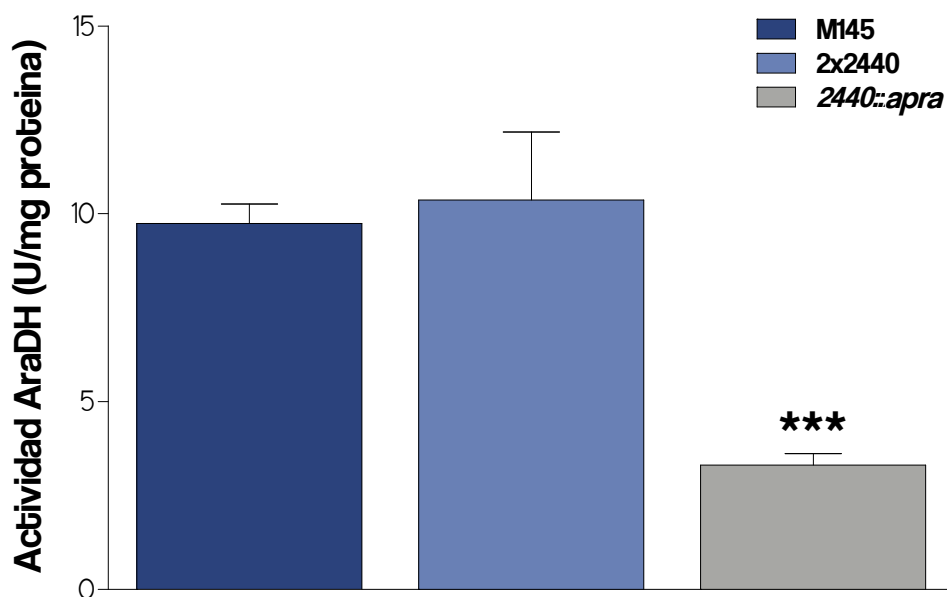
Se observó que la cepa *sco2440::apra* es incapaz de crecer en ausencia de casaminoácidos y que la presencia de PEG 8000 no influye en el crecimiento de la cepa. Con base en estos resultados se puede hipotetizar que la formación de biomasa en la cepa *2440::apra* se lleva a cabo usando los esqueletos carbonados de los casaminoácidos como fuente de carbono en lugar de la arabinosa.

El papel que SCO2440 tiene en el consumo de arabinosa es debatible. La velocidad de consumo de arabinosa no aporta evidencia clara acerca de si SCO2440 participa en el metabolismo de arabinosa y como es que actúa SCO2440 en el metabolismo de arabinosa. Por otra parte, el consumo de arabinosa disminuido en ausencia del regulador transcripcional, así como la incapacidad para crecer con esta pentosa como única fuente de carbono, parece colocar a SCO2440 como un modulador del metabolismo de arabinosa. El control del metabolismo de arabinosa puede ser directo, a través del control transcripcional de los genes que codifican para la degradación de arabinosa o a través de la regulación de genes codificantes para el transporte de carbohidratos, pues de acuerdo a la predicción de sitios de unión de SCO2440, este regulador transcripcional tiene sitios de unión en hasta seis genes putativos para el transporte de carbohidratos (Tabla S2).

## 8.7 Efecto de SCO2440 en la actividad Arabinosa Deshidrogenasa

Se evaluó el efecto que SCO2440 tiene en la actividad AraDH, con el objetivo de observar si la ausencia o presencia de SCO2440 afectan la actividad AraDH y como estas afectaciones podrían estar relacionadas con la disminución en el consumo de arabinosa.

Se evaluó la actividad AraDH de las cepas modificadas en medio NMMP, a las 56 horas de cultivo, momento en el cual las cepas se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento y la cepa M145 ha terminado de consumir la arabinosa (Figura 19).

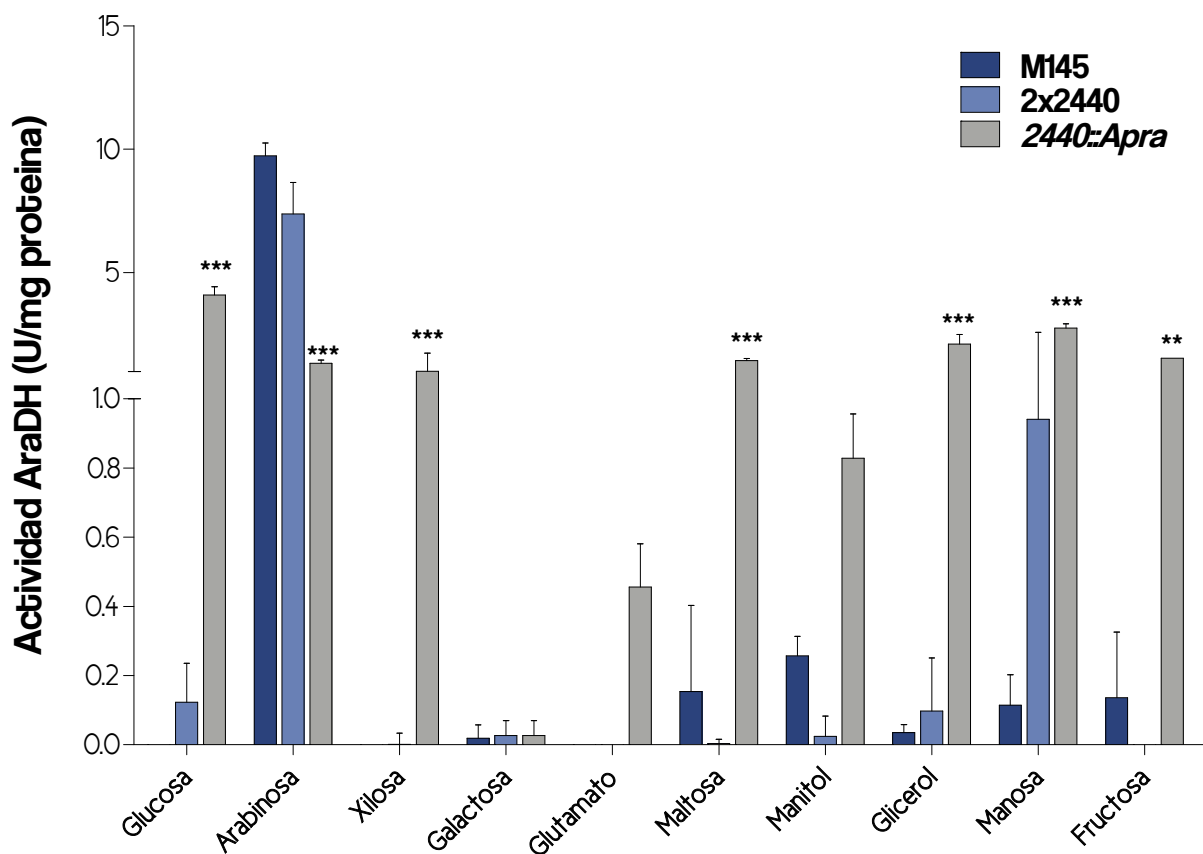


**Figura 19.** Actividad AraDH en medio mínimo NMMP con arabinosa. La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto\*\*\*  $P < 0.001$ , ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni; la diferencia se calculó con respecto a la cepa M145.

Se observó una disminución en la actividad AraDH solo en la cepa *2440::apra*, mientras que en M145 y 2x2440 se observaron los mismos niveles de actividad. Este resultado sugiere en primera instancia que la inactivación de SCO2440 tiene como resultado la disminución en la actividad AraDH, lo que sugiere que SCO2440 estaría actuando como un activador del gen *sco2402*. Sin embargo, si SCO2440 es un activador del gen *sco2402* ¿Por qué se observa actividad AraDH? Si la expresión de *sco2402* depende de la activación por parte de SCO2440 la actividad AraDH debería verse disminuida. En cambio, si SCO2440 actúa como un represor, la transcripción del gen podría ser constitutiva y estar desregulada a la presencia de arabinosa en el medio de cultivo.

Para confirmar esta hipótesis, se midió la actividad AraDH en medio NMMP suplementado con diferentes fuentes de carbono (Figura 20), con el fin de observar si la actividad AraDH se podía

detectar en otras fuentes de carbono. Este experimento nos permitió conocer si la actividad AraDH es inducible solo en presencia de arabinosa en la cepa parental M145 o si la actividad podría responder a otros carbohidratos, como por ejemplo a la D-xilosa, el epimero de la L-arabinosa.



**Figura 20.** Actividad AraDH en diferentes fuentes de carbono, a las 56 horas de cultivo en medio mínimo de NMMP. La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto \*\*\*  $P < 0.001$ , ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni; la diferencia se calculó con respecto a la cepa M145 en cada condición.

Se observó que la actividad AraDH se expresa únicamente en presencia de arabinosa en la cepa silvestre M145, observándose una actividad AraDH nula o muy baja en presencia de otros carbohidratos. Es interesante observar que, concordante con lo observado previamente, el comportamiento de la cepa 2x2440 es muy parecido al de la cepa parental M145, en donde la actividad AraDH es nula o muy baja en ausencia de arabinosa. La ausencia de cambios en la cepa 2x2440 con respecto a la cepa parental puede ser el resultado de que la expresión de la copia de *sco2440* en el plásmido pSET152-*sco2440* esta sujeta a la misma regulación que *sco2440* genómico. Sin embargo, es interesante que en el consumo de arabinosa si se observa un cambio significativo.

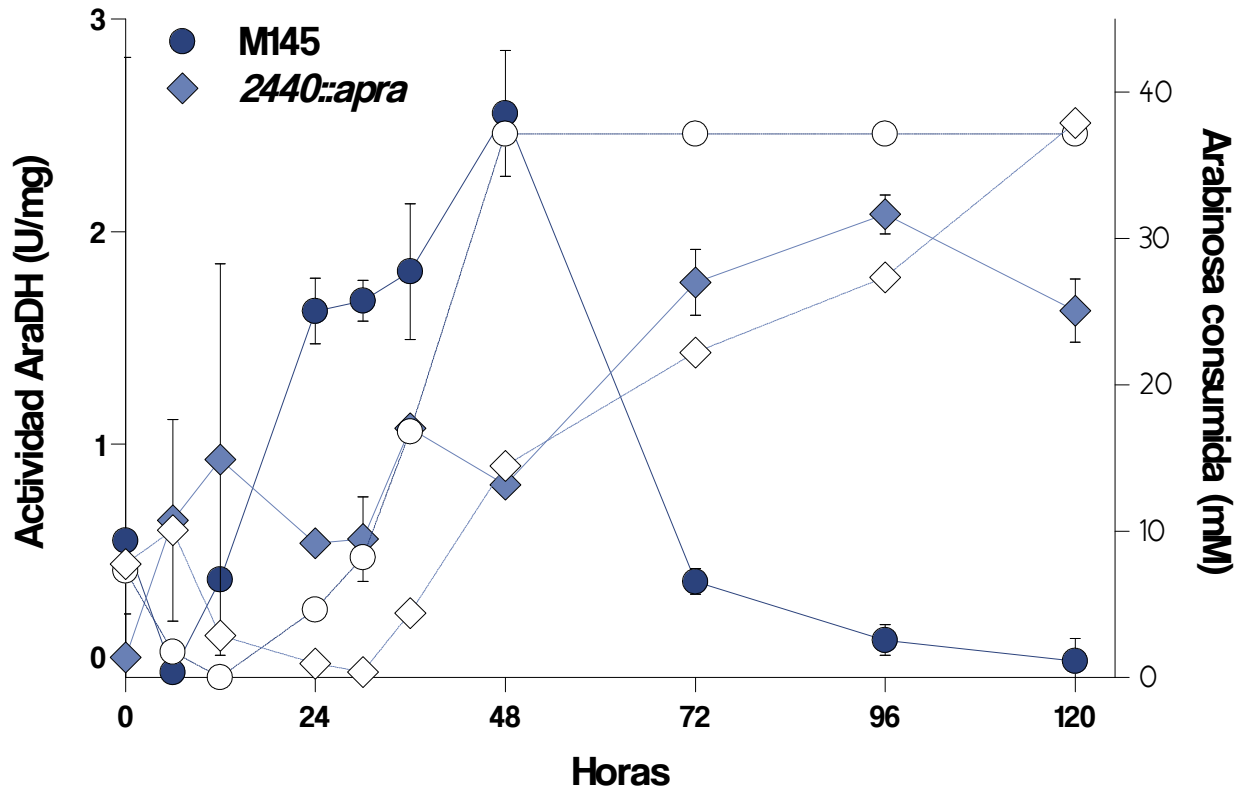
También resalta que en el caso de D-xilosa no se observa actividad AraDH. La D-xilosa y la arabinosa son pentosas que difieren solamente en la orientación del centro quiral del carbono 4, por lo que se

consideran epimeros. En algunos organismos i.e. *E. coli*, la degradación de estos azúcares se llevan a cabo por rutas similares pero que no comparten enzimas. De esta manera, la xilosa es degradada a xilulosa por la vía de las pentosas fosfato, a través de la conversión de D-xilosa a D-xilulosa-5-fosfato por las enzimas XylA (xilosa isomerasa) y XylB (xilulosa cinasa) (Lawlis *et al.*, 1984); mientras que la arabinosa es transformada a D-xilulosa-5-fosfato mediante la actividad de las enzimas AraA (L-arabinosa isomerasa), AraB (ribulocinasa) y AraD (L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa) (Fritz *et al.*, 2014). Por otra parte, en el caso de la arquea *S. sulfataricus* se ha descrito que la xilosa y la arabinosa son metabolizadas a través de la vía de ED modificada para pentosas, usando las mismas enzimas catabólicas (Nunn *et al.*, 2010). A diferencia de *S. sulfataricus*, se sabe que *S. coelicolor* degrada la xilosa usando la vía de las pentosas fosfato, a través de la conversión de xilosa a xilulosa-5-fosfato por las enzimas XylA (SCO1169) y XylB (SCO1170) (Świątek *et al.*, 2013), de idéntica manera a lo observado en *E. coli*. El presente resultado nos indicaría que la actividad AraDH no es inducida por xilosa, por lo que es poco probable que la xilosa sea degradada por la misma vía que la arabinosa.

Por otra parte, en el caso de la cepa *2440::apra* se observa un aumento significativo en la actividad AraDH con respecto a M145, exceptuando cuando la cepa es crecida en manitol, galactosa y glutamato. En galactosa es la única fuente de carbono en donde se observa un abatimiento total de la actividad AraDH en la cepa *2440::apra*. Ambos sácaridos son aldosas, con una estructura estereo química parecida, donde la arabinosa es una aldopentosa (conformación estereo química 2R, 3S, 4S) mientras que la galactosa es una aldohexosa (conformación estereo química 2R, 3S, 4S, 5R). El abatimiento de la actividad en todas las cepas en presencia de galactosa podría indicar la presencia de un mecanismo represor de la arabinosa deshidrogenasa en presencia de galactosa. Otra de las fuentes de carbono en donde se observa una disminución en la actividad AraDH en la cepa *2440::apra* es en glutamato. El glutamato puede ser utilizado en la célula como fuente de carbono y/o como fuente de nitrógeno, por lo que la observación de una disminución en la actividad AraDH podría indicar un control adicional en la expresión de SCO2402, relacionado con el metabolismo de nitrógeno.

Es interesante observar que en glucosa es en donde se observa la mayor actividad (~4 U/mg), mientras que en los otros carbohidratos la actividad se mantiene constante (~ 1.7 U/mg). Este resultado sugiere que la actividad AraDH es insensible a la presencia de arabinosa en ausencia de SCO2440, lo que indica que SCO2440 podría actuar como un represor de la transcripción del gen *sco2402*. Sin embargo, en ningún caso se observa una mayor actividad que la observada en M145 en presencia de arabinosa. Si SCO2440 es un represor ¿por qué la actividad AraDH no es mayor que en presencia de arabinosa?

Para responder a esta última pregunta, se evaluó la actividad AraDH a lo largo del tiempo de cinética, en M145 y en *2440::apra* (Figura 21). No se incluyó a *2x2440* al no observarse cambios en el consumo ni en la actividad AraDH relevantes.

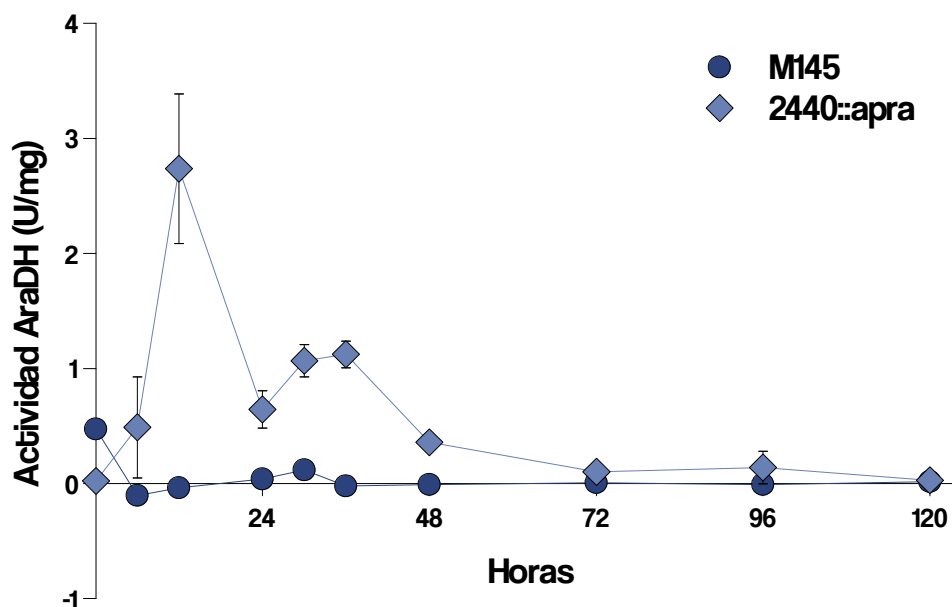


**Figura 21.** Actividad AraDH (símbolos llenos) y consumo de arabinosa (símbolos vacíos) en medio NMMP con arabinosa. En círculos se presenta a M145, mientras que los rombos representan a la cepa *2440::apra*. La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.

Se observó que la actividad AraDH es muy baja durante las primeras horas de crecimiento, lo cual correspondería a una fase de adaptación al medio circundante, recordando que las cinéticas se llevan a cabo a partir de un inóculo crecido en medio NMMP con glucosa. A partir de las 12 horas se observa un aumento en la actividad AraDH; tras este aumento en la actividad enzimática se observa el inicio del consumo de arabinosa, a las 24 horas. La actividad AraDH alcanza su punto máximo a las 48 horas, momento en el que la arabinosa se agota en el medio de cultivo. Posterior a este punto, la actividad AraDH disminuye drásticamente. Este resultado indica que la actividad AraDH en la cepa silvestre es afectada por la presencia de arabinosa en el medio de cultivo, lo que sugiere que la vía de arabinosa es inducible ante la presencia de este carbohidrato.

Por otra parte, la actividad AraDH de la cepa *2440::apra* aumenta lentamente, a partir de niveles de actividad superiores a los observados en M145 en los mismos tiempos. La actividad AraDH aumenta

hasta alcanzar su máximo a las 96 horas para posteriormente disminuir a las 120 horas. Es interesante observar que en la cepa *2440::apra* a las 72 horas se alcanzan los mismo niveles de actividad que a las 36 horas en M145, donde 12 horas después se agota el carbohidrato. Sin embargo, es hasta 48 horas después que el carbohidrato se agota en la cepa *2440::apra*, lo que sugeriría que la vía se encuentra desregulada y/o que el consumo de arabinosa en la mutante *2440::apra* se esta llevando a cabo por otra vía, menos efectiva y que resulta en una menor velocidad de consumo. Además, este resultado parece indicar que la actividad AraDH en la cepa *2440::apra* esta desregulada con respecto a la presencia de arabinosa, un efecto consecuente de la ausencia de SCO2440 en la cepa. Sin embargo, este resultado se debe de contrastar con la actividad AraDH en otra fuente de carbono, i.e. glucosa (Figura 22).



**Figura 22.** Actividad AraDH en medio NMMP con glucosa. La actividad se expresó como unidades por cada miligramo de proteína, donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un mmol de NADPH por minuto.

No se observa actividad AraDH en presencia de glucosa en la cepa M145, mientras que en la cepa *2440::apra* se observa actividad AraDH hasta las 48 horas, para posteriormente disminuir hasta los niveles observados en la cepa M145. Este comportamiento contrasta con lo observado en la actividad determinada en presencia de arabinosa, en donde posterior a las 48 horas se observa una mayor actividad. Es interesante observar que el perfil de actividad no coincide en la cepa *2440::apra* cuando es crecida en arabinosa o glucosa. La disminución en la actividad AraDH posterior a las 48 horas en presencia de glucosa sugeriría un control adicional en la expresión de esta enzima. Que el cambio en

la tendencia de la actividad AraDH se lleve a cabo durante la fase estacionaria, no ha pasado desapercibido y podría sugerir un control condicionado al crecimiento o a la diferenciación celular.

## 8.8 Papel de SCO2440 en la producción de metabolitos secundarios

Entre los sitios de unión a ADN predichos para SCO2440 se encuentra el sitio de unión en la región promotora del gen *actII-ORF4*, el cual es un activador de la biosíntesis de actinorrodina (ACT) (Fujii *et al.*, 1996). Por otra parte, las afectaciones nutricionales tienen un efecto directo en la producción de metabolitos secundarios, por lo que la medición en la producción de otros metabolitos secundarios se puede ver afectada, como es el caso de la undecilprodigiosina (RED), el segundo metabolito secundario mejor conocido de *S. coelicolor*.

Se determinó la producción de ACT y RED en medio NMMP con arabinosa. La producción se expresó en nmol/mL de cultivo (Figura 23).

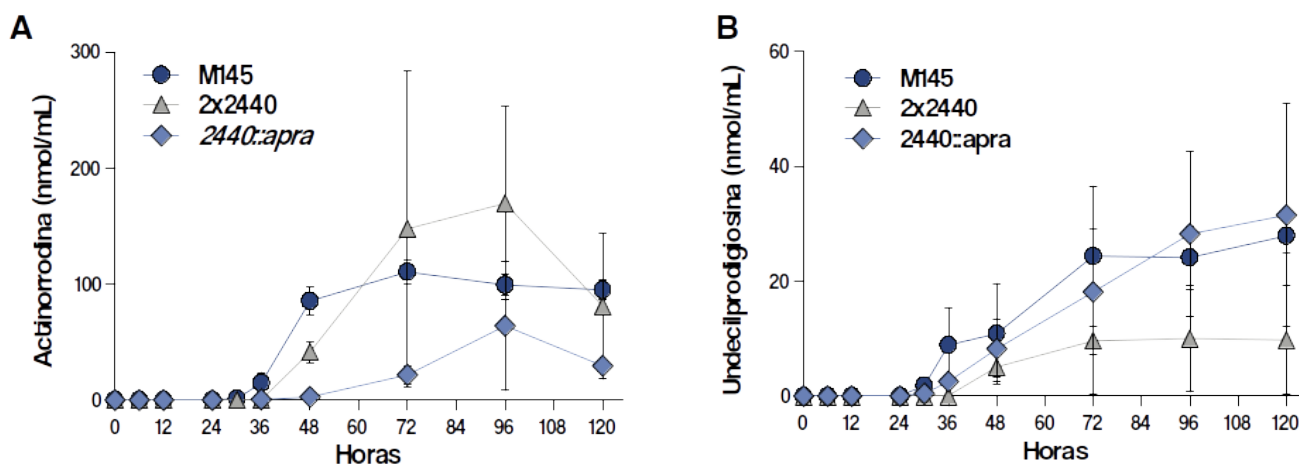


Figura 23. Producción de ACT (A) y RED (B) en medio mínimo NMMP con arabinosa 30 mM. La producción se expresó como nmol/mL de cultivo.

En el caso de la producción de actinorrodina, se observó una disminución en la cepa *2440::apra*, mientras que la cepa *2x2440* posee niveles parecidos a los de la cepa silvestre a las 120 horas de cultivo. Por otra parte, se observaron cambios en la producción de undecilprodigiosina en la cepa *2440::apra*, mientras que la cepa *2x2440* disminuyó su producción. Este efecto es observado también en la cepa con el plásmido vacío pSET152, por lo que no es consecuente de la presencia del gen *sco2440* (M145 pSET152; resultados no mostrados).

La disminución en la producción de ACT en la cepa *2440::apra* podría estar relacionado al hecho de que uno de los genes cuyo control estaría bajo SCO2440 es el activador de la biosíntesis de actinorrodina, *actII-ORF4*. Si SCO2440 actúa como un activador de *actII-ORF4*, este efecto se vería no



solo en presencia de arabinosa, sino en otras fuentes de carbono. Para este fin, se evaluó la producción de actinorrodina en diferentes fuentes de carbono (Figura 24).

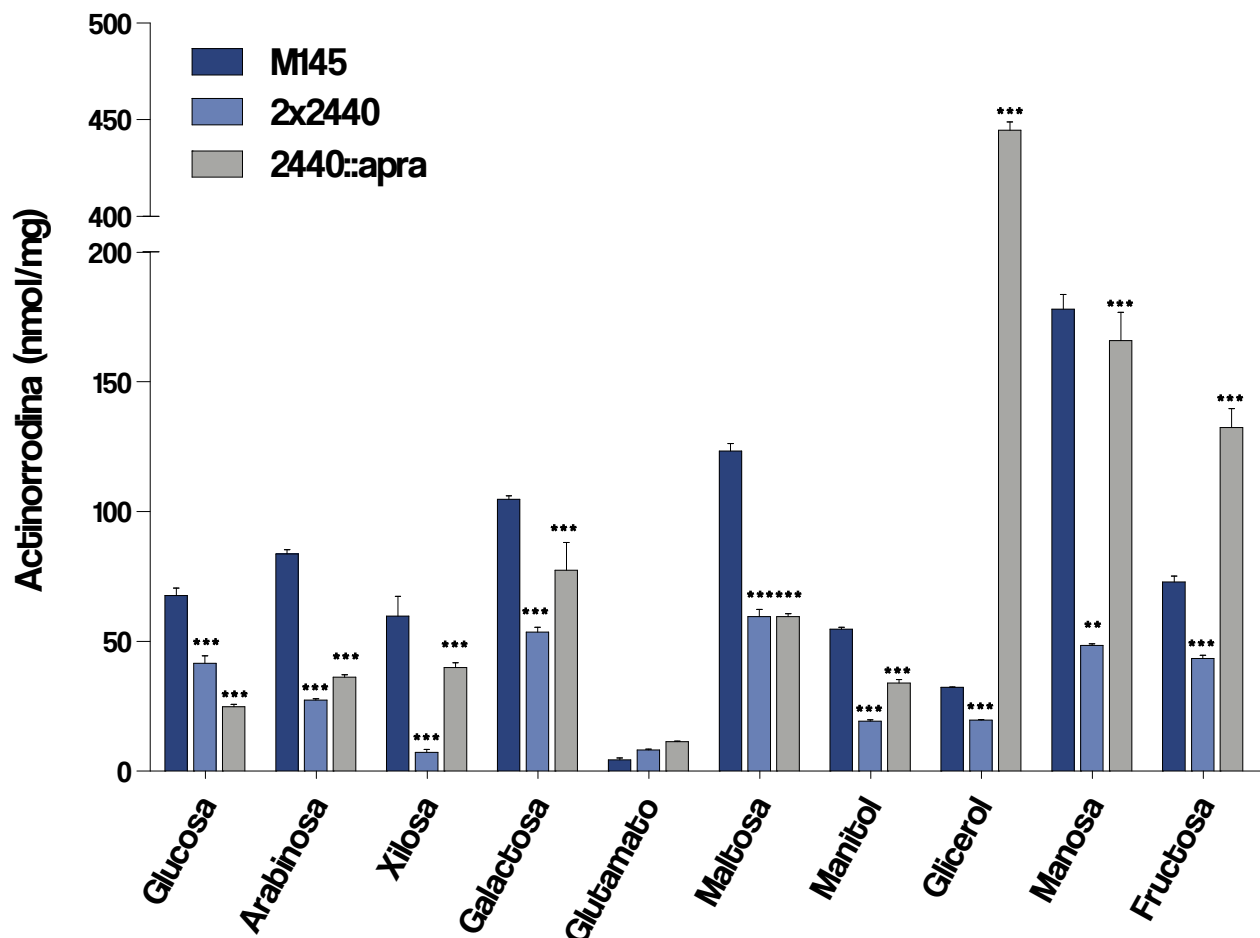


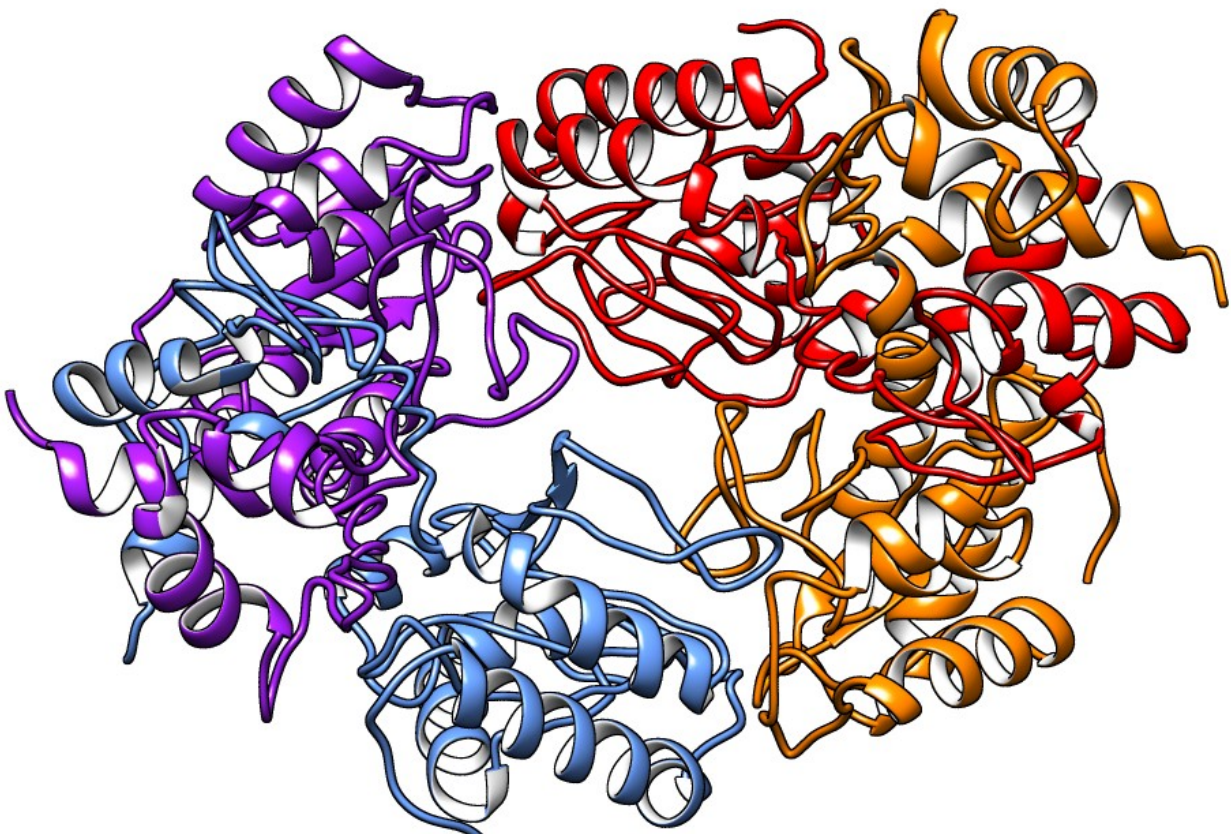
Figura 24. Producción de actinorrodina en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono, a las 96 horas de cultivo. La producción de actinorrodina se expresó como nmol por miligramo de peso seco. La diferencia significativa se calculó con respecto a la cepa parental. \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni.

Se observa una disminución significativa en la producción de actinorrodina en la cepa *2440::apra* en el medio de cultivo suplementado con glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa, maltosa, manitol y manosa; en el medio suplementado con glutamato no se observaron cambios, mientras que en el medio suplementado con glicerol y fructosa se observó un aumento en la producción de actinorrodina. Se observa una disminución en la producción de actinorrodina, aún en ausencia de arabinosa, lo que sugiere que este efecto negativo si bien esta relacionado con la interrupción del SCO2440, parece ser independiente a la presencia de arabinosa en el medio de cultivo.

## 8.9 SCO2440 une preferencialmente a un metabolito de la degradación de arabinosa

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se ha podido determinar que SCO2440 controla al metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor* M145. SCO2440 forma parte de los llamados sistemas de un componente, los cuales tienen en una sola molécula al dominio de entrada y al dominio de salida. Es decir, SCO2440 tiene un dominio que recibe una señal y un dominio que lleva a cabo el efecto. La pregunta inmediata que surge es ¿qué molécula detecta SCO2440?

Para responder parcialmente a esta pregunta, se modeló a la proteína SCO2440, en forma de homotetramero. Para ello se utilizó a la proteína CatR (identidad 32%), un regulador transcripcional de la familia IclR, que controla al operón para la degradación de catecol en *Rhodococcus* sp. RHA1 (PDB 2G7U), el cual es un regulador transcripcional cristalizado en forma de homotetramero (Figura 25).



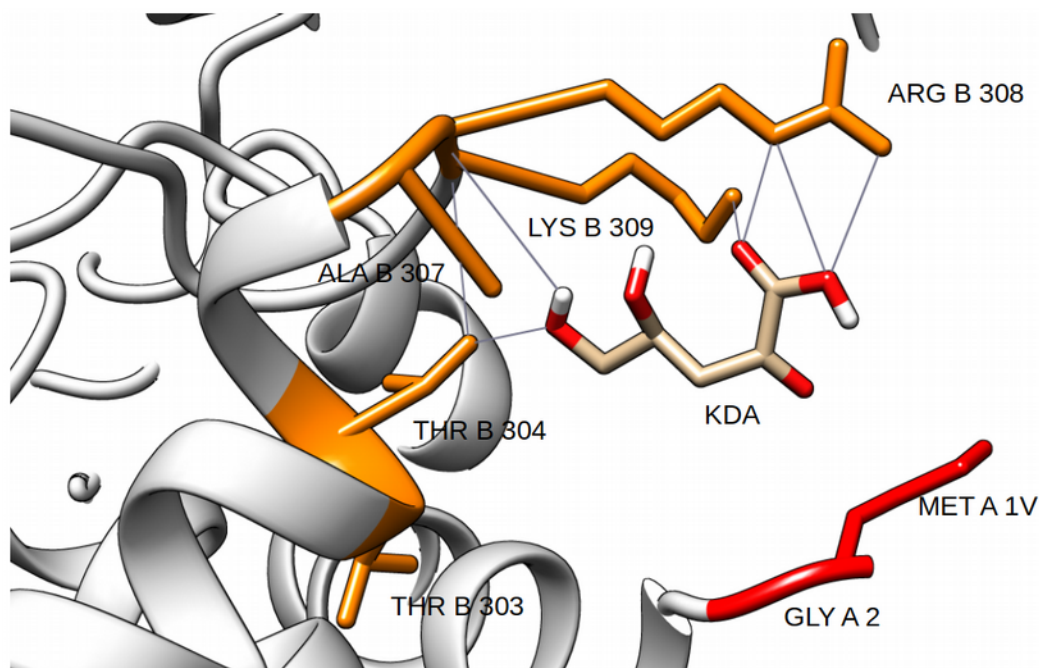
**Figura 25.** Modelo tridimensional de SCO2440 como homotetramero. El modelado se hizo con base al regulador CatR, un regulador para la degradación de catecol en *Rhodococcus* sp. RHA1 (PDB 2G7U).

Se evaluó la afinidad de la proteína modelada contra todos los metabolitos de la ruta de degradación de arabinosa putativa. Se evaluó la afinidad y la representatividad de la conformación encontrada (Tabla 5).

**Tabla 5.** Afinidad de SCO2440 por diferentes sustratos. El % de representatividad indica cuantas veces esta conformación fue encontrada por la simulación, de entre 1000 simulaciones.

Metabolito	Energía de unión mínima (kcal/mol)	Energía de unión promedio (kcal/mol)	% Representatividad
L-arabinosa	-2.21	-1.14	3.2
L-arabinofuranosa	-3.21	-2.48	6.0
L-arabinonolactona	-3.42	-2.65	8.2
KDA	-3.38	-1.87	23

En este análisis se encontró que la molécula que mostró una mayor afinidad, con una mayor representación, fue la 2-ceto-3-desoxi-arabinonato (KDA), el producto de oxidación del L-arabinonato por la enzima L-arabinonato deshidratasa (SCO2401). Este resultado concuerda con lo encontrado en otros reguladores transcripcionales, como es el caso de KdgR de *Erwinia chrysanthemi* 3937, un represor del catabolismo de pectina, el cual suelta a su sitio de unión en presencia de 2-ceto-desoxi gluconato (KDG) (Rodionov, Gelfand y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004), análogo a KDA. Se analizó el sitio en donde interactúa KDA con SCO2440 y se encontró una posible interacción con los aminoácidos Thr304, Ala307, Arg308 y Ala307, a través de puentes de hidrógeno (Figura 26).



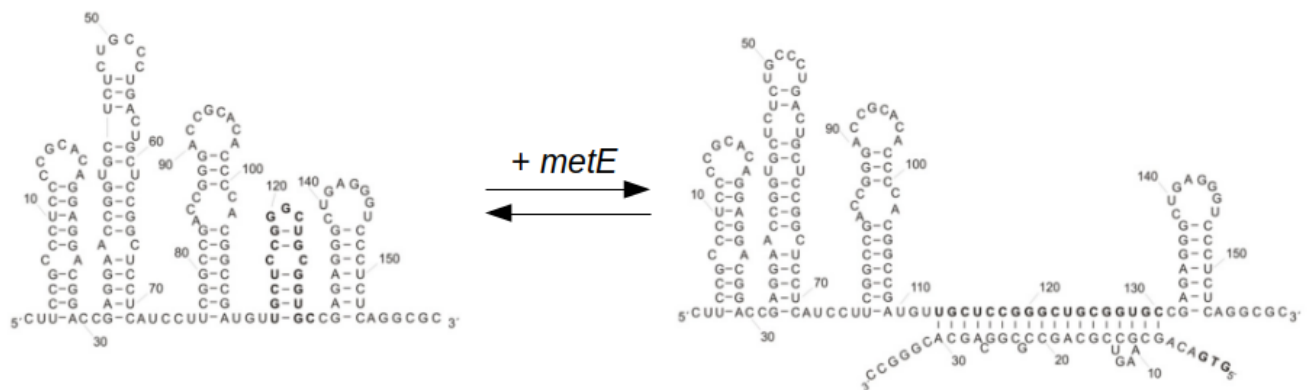
**Figura 26.** Sitio de unión de KDA en la proteína SCO2440. Las líneas grises representan puentes de hidrógeno ( $< 0.4 \text{ \AA}$ ). Los aminoácidos están indicados por el nombre, la cadena a la que pertenecen y el número de residuo.

Sin embargo, este sitio de unión corresponde al dominio HTH y no al dominio IclR, reconocido como el dominio de reconocimiento del efector de esta familia de reguladores transcripcionales. Sin embargo, esta es una aproximación *in silico* que necesita ser verificada mediante resultados experimentales. No obstante, es destacable la unión específica de KDA a SCO2440, unión que no se logra con su análogo KDG (Tabla S6). En conclusión, la selección de KDA como efector implica la activación específica del regulón de SCO2440 solo en presencia de arabinosa, asegurando una expresión controlada solo en presencia de los metabolitos específicos de su metabolismo, lo cual implica un cuidadoso ahorro de energía y recursos.

## 8.10 Interacciones con otras proteínas

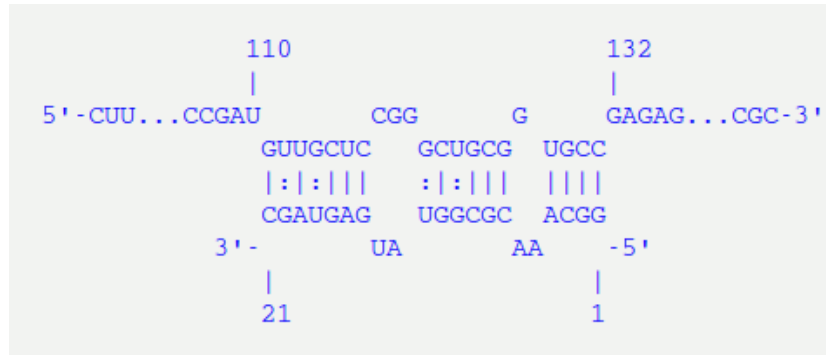
A través de una comunicación personal reciente con el Dr. Michael Vockenhuber, se encontró que SCO2440 es controlado negativamente por el ARN pequeños (sRNA; del inglés *small RNA*) *scr5239*. En esta breve comunicación, se hizo saber que mediante proteómica se encontró que la eliminación de *scr5239* exagera la abundancia de SCO2440.

*scr5239* es un ARN pequeño no codificante que controla negativamente la expresión de los genes de la agarasa *dagA* (Vockenhuber y Suess, 2012) y de la metionina sintasa *metE* (Vockenhuber, Heueis y Suess, 2015), pero se especula un papel pleiotrópico en el metabolismo celular. Este RNA cuenta con una estructura secundaria compleja, formada por cinco bucles en ausencia de su secuencia blanco. En presencia de su secuencia blanco, el bucle 4 se abre y se una a la región codificante del ADN de su gen blanco, impidiendo la transcripción (Figura 27).



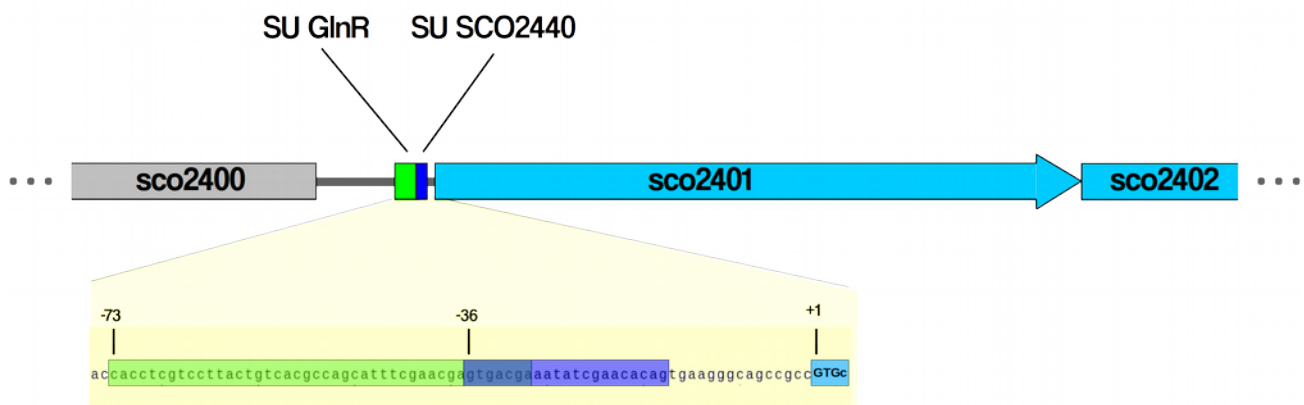
**Figura 27.** Mecanismo de represión de *scr5239* con el promotor de *metE*. Se observa la complementación casi perfecta entre la secuencia de *scr5239* y de la región codificante de *metE*. Tomada y modificada de (Vockenhuber, Heueis y Suess, 2015).

Al analizarse la secuencia de la región promotora de SCO2440, se observa una posible interacción con *scr5239*, al haber similitud entre la secuencia del bucle 4 y la región del promotor (región promotora -55 a -76, con respecto al codón de inicio) (Figura 28). Esta evidencia sugiere que el metabolismo de arabinosa se encuentra bajo el control de este RNA no codificante, cuya expresión es constitutiva en condiciones de estrés pero que es dependiente de la concentración de nitrógeno, observándose una disminución en su expresión a bajas concentraciones de nitrato (Vockenhuber y Suess, 2012).



**Figura 28.** Unión del bucle 4 de *scr5239* y la región promotora de SCO2440.

Por otra parte, difícilmente los genes del metabolismo primario están sometidos al control de un solo regulador transcripcional. En un estudio del regulador global del metabolismo de nitrógeno GlnR (Tiffert *et al.*, 2008) se encontró que este regulador tiene dos sitios de unión confirmados experimentalmente en la región intergénica entre *sco2400* y *sco2401*; además, de un sitio de unión a ADN en la región río arriba de *sco2404*. En este mismo estudio, se observó que GlnR reprime la expresión de *sco2404* pero en la expresión de *sco2400* no cambia (Tiffert *et al.*, 2008). Este resultado es de interés para el presente estudio, dado que *sco2401* cotranscribe con *sco2402*, siendo ambos genes participantes del metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor* M145 (Figura 29).



**Figura 29.** Sitios de unión de GlnR (SU GlnR) y posibles sitios de unión de SCO2440 (SU SCO2440) en la región promotora del operón *sco2401/2402*. Se observa el solapamiento entre los sitios de unión de SCO2440 y de GlnR.

La posible interacción entre GlnR y SCO2440 podría explicar el abatimiento de la actividad AraDH en presencia de glutamato en la cepa *2440::apra*, pudiendo estar sujeta la expresión de SCO2402 a la disponibilidad de nitrógeno. Este no es el primer caso en el que se observa regulación cruzada en el metabolismo de nitrógeno y carbono; existen reportes de una regulación cruzada en el metabolismo de carbono, nitrógeno y fósforo (Xu *et al.*, 2016). En este reporte, los autores analizan el control transcripcional directo de GlnR y PhoP, reguladores maestros del nitrógeno y el fósforo, en la transcripción de genes relacionados con la degradación de almidón. Los autores elucubran respecto a que el nitrógeno y el fósforo son nutrientes más escasos que las fuentes de carbono; para mantener a la célula saludable se requiere de un equilibrio en los niveles nutricionales de estos tres elementos, por lo que un exceso de carbono carece de beneficio si no hay nitrógeno o fósforo. Con esta evidencia, se sugiere que SCO2440 representa un nuevo nodo entre el metabolismo de nitrógeno y carbono en los actinomicetos

## 9 | CONCLUSIONES

El regulador transcripcional SCO2440 modula al metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor*.

Se identificaron *in silico* los posibles sitios de unión a ADN de SCO2440 en genes relacionados al metabolismo de arabinosa, la degradación de polímeros de arabinosa (pectina y hemicelulosa), transporte de carbohidratos y reguladores locales para la biosíntesis de actinorrodina.

La cepa *S. coelicolor* M145 posee la actividad enzimática de L-arabinosa deshidrogenasa. Esta actividad es inducible en presencia de L-arabinosa y no se observa en presencia de otros carbohidratos.

La actividad L-arabinosa deshidrogenasa es afectada por la ausencia del regulador transcripcional SCO2440, observándose una insensibilidad a la presencia de L-arabinosa en el medio de cultivo. Así mismo, la ausencia del regulador transcripcional SCO2440 provoca una disminución en la velocidad de consumo de arabinosa.

La ausencia de SCO2440 afecta negativamente a la producción de actinorrodina, independientemente de la fuente de carbono utilizada

# 10 | PERSPECTIVAS

- Verificar la unión de SCO2440 a las regiones promotoras de genes blanco como *sco2440* (auto regulación), *sco2401* (operón de L-arabinonato deshidratasa y L-arabinosa deshidrogenasa), *actII-ORF4* (activador de la biosíntesis de actinorrodina) y *sco1871* ( $\alpha$ -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa), verificando el control directo de SCO2440 sobre la vía de degradación de arabinosa.
- Cuantificar los niveles de transcripción para los genes *sco2440* y *sco2402*, a través de qRT-PCR.



# 11 | MATERIAL

## SUPLEMENTARIO

**Tabla S1.** Ortólogos de SCO2440 usados para determinar su secuencia consenso de unión a ADN. El porcentaje de identidad es con respecto a SCO2440

Gen	Organismo	Anotación	Identidad (%)
SLIV_25500	<i>Streptomyces lividans</i>	Regulador transcripcional	100
NI25_26895	<i>Streptomyces</i> sp. CCM MD2014	Regulador transcripcional IclR	98.4
SAM23877_2497	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Regulador transcripcional	94.9
Spa2297_10290	<i>Streptomyces parvulus</i>	Regulador transcripcional IclR	93.8
ASR50_11805	<i>Streptomyces</i> sp. 4F	Regulador transcripcional IclR	93.4
sle_47700	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	Regulador transcripcional tipo HTH YagI	93.4
TU94_10525	<i>Streptomyces cyaneogriseus</i>	Regulador transcripcional IclR	93.4
TUE45_03014	<i>Streptomyces reticuli</i>	Regulador transcripcional KdgR	92.2
A4E84_12650	<i>Streptomyces</i> sp. S10(2016)	Regulador transcripcional IclR	91.8
BN159_5921	<i>Streptomyces davawensis</i>	Regulador transcripcional IclR	91.1
SGLAU_11185	<i>Streptomyces glaucescens</i>	Regulador transcripcional IclR	91.4
AVL59_39245	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Regulador transcripcional IclR	91.4
SHJGH_3675	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>jinggangensis</i> TL01	Regulador transcripcional IclR	91.0
SHJG_3910	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>jinggangensis</i> 5008	Regulador transcripcional IclR	91.0

<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>	<b>Anotación</b>	<b>Identidad (%)</b>
AS200_30445	<i>Streptomyces</i> sp. CdTB01	Regulador transcripcional IclR	90.3
SCAB_63721	<i>Streptomyces scabiei</i>	Regulador transcripcional putativo	90.3
A8713_09475	<i>Streptomyces</i> sp. SAT1	Regulador transcripcional IclR	89.5
SAV_5741	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Regulador transcripcional IclR putativo	89.4
B446_12620	<i>Streptomyces collinus</i>	Regulador transcripcional IclR	91.6
SLINC_2780	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Regulador transcripcional IclR	87.9
SPRI_6587	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Regulador transcripcional IclR	84.0
SL103_16290	<i>Streptomyces lydicus</i>	Regulador transcripcional IclR	83.5
M271_33195	<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	Regulador transcripcional IclR	81.9
BV401_15425	<i>Streptomyces autolyticus</i>	Regulador transcripcional IclR	81.9
SACTE_5709	<i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E	Regulador transcripcional IclR	81.8
Sfla_0876	<i>Streptomyces pratensis</i>	Regulador transcripcional IclR	81.0
F750_5978	<i>Streptomyces</i> sp. PAMC 26508	Regulador transcripcional	81.0
Strvi_7588	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	Regulador transcripcional IclR	80.7
SBI_07392	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	Regulador transcripcional IclR	81.4
SVEN_6641	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Regulador transcripcional IclR	76.4
SXIM_13590	<i>Streptomyces xiamenensis</i>	Regulador transcripcional IclR	79.7
AA958_08260	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-509	Regulador transcripcional IclR	77.2
SACE_3534	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Regulador transcripcional IclR	61.5
CDG81_04930	<i>Actinopolyspora erythraea</i>	Regulador transcripcional IclR	61.7
AHOG_03695	<i>Actinoalloteichus hoggarensis</i>	Regulador transcripcional KdgR	60.3
trd_A0594	<i>Thermomicrobium roseum</i>	Regulador transcripcional IclR	57.9
UA74_03865	<i>Actinoalloteichus</i> sp. ADI127-7	Regulador transcripcional IclR	59.1
UA75_03965	<i>Actinoalloteichus</i> sp. GBA129-24	Regulador transcripcional IclR	59.1
AFR_12585	<i>Actinoplanes friuliensis</i>	Regulador transcripcional IclR putativo	56.8
TL08_03885	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>	Regulador transcripcional IclR	58.3
AMIS_27880	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Regulador transcripcional IclR putativo	55.3
AMETH_6877	<i>Amycolaptosis methanolica</i>	Regulador transcripcional IclR	55.5
Caci_4994	<i>Catenulispora acidiphila</i>	Regulador transcripcional IclR	46.1

**Tabla S2.** Regulón predicho de SCO2440, de acuerdo al programa PREDetector. La puntuación esta indicada de acuerdo a la similitud con la secuencia consenso, siendo 25 la máxima puntuación

Operón	Función	Sitio	Posición	Puntuación
<i>sco2440</i>	Regulador transcripcional IclR	ATATGTTTCGAGATTTC AACAA	-39	25
<i>sco2439</i>	L-arabinolactonasa	CGATCGGAATAACGAACACAG	-61	17.3
<i>sco2441</i>	Proteína hipotética	ATATGTTTCGAGATTTC AACAA CGATCGGAATAACGAACACAG	-108 -86	25 17.3
<i>sco2400</i>	Proteína putativa de membrana	GTGACGAAATATCGAACACAG	-199	19.2
<i>sco2401</i> <i>sco2402</i>	L-arabinonato deshidratasa arabinosa deshidrogenasa	GTGACGAAATATCGAACACAG	-36	109.3
<i>sco3177</i>	Proteína putativa de membrana	TGGCTGATATTTCGAAC TTTT	-85	16.3
<i>sco2427</i>	Arabinasa secretada putativa	TG TTCAGAATTTCGAACAACA	-123	15.9
<i>sco2428</i>	Proteína secretada de unión a hierro putativa	TG TTCAGAATTTCGAACAACA	-239	15.9
<i>sco2403</i>	Proteína hipotética	CTTCGTCGGACATATCGAACAA	-34	15.3
<i>sco5931</i>	Xilanas A	TG TTCGATATTGCGAACATGT	-336	15.1
<i>sco5932</i>	Arabinofuranosidasa putativa	TG TTCGATATTGCGAACATGT	-75	15.1
<i>sco5266</i>	Proteína putativa de membrana	TTGTCGATATGTCGACCGAAG	-8	14
<i>sco2334</i>	Proteína putativa integral de membrana	TTCCGTTTCGAATTATCGTCTT	-74	13.7
<i>sco6158</i>	Proteína hipotética	ATATGTTTCGGGATTTGAACTG	-82	13.7
<i>sco6159</i>	Regulador transcripcional GntR	ATATGTTTCGGGATTTGAACTG	-107	13.7
<i>sco1871</i>	$\alpha$ -cetoglutarao semialdehído deshidrogenasa	AGTTGTTTCGATATACTGAACG	-50	13.6
<i>sco1872</i> <i>sco1873</i>	Regulador transcripcional IclR Acetiltransferasa putativa	AGTTGTTTCGATATACTGAACG	-93	13.6
<i>sco0823</i> <i>sco0824</i> <i>sco0825</i>	Regulador transcripcional GntR Proteína de unión a ATP; transportador ABC Proteína transmembranal de transportador ABC	CTAATGAATTAATGAAAGCAT	-19	13.5
<i>sco7313</i>	Proteína hipotética	CTGATGACTTTTCGAAAAGCG	443	13.3
<i>sco2207</i>	Proteína secretada putativa	CGTTCGGTATCTCGTACATAG	-56	13.2
<i>sco2434</i> <i>sco2433</i> <i>sco2432</i> <i>sco2431</i>	Proteína de unión a carbohidratos; transportador Proteína transmembranal; transportador Proteína de transportador; transportador $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa	GATCGTTCGATATTTCGGATG	-50	13
<i>sco2435</i> <i>sco2436</i>	Proteína hipotética Proteína putativa integral de membrana	GATCGTTCGATATTTCGGATG	-239	13
<i>sco0055</i>	Oxidoreductasa asociada a membrana	AGCTGTTTCGTTATCTCGATCG	337	12.8
<i>sco3053</i>	Esterasa secretada putativa	ACG TTCACA ACTCGAACACAG	-257	12.8
<i>sco7554</i>	Regulador transcripcional LacI	TTGCTTTCAAGTTATTGACAG	-157	12.8
<i>sco7555</i>	Lipoproteína de unión a soluto putativa	TTGCTTTCAAGTTATTGACAG	-200	12.8

<b>Operón</b>	<b>Función</b>	<b>Sitio</b>	<b>Posición</b>	<b>Puntuación</b>
<i>sco3590</i> <i>sco3589</i>	Regulador de respuesta de sistema de dos componentes Histidina cinasa de sistema de dos componentes	TCGTCGGCATATCGAAAACCG	-48	12.7
<i>sco1845</i> <i>sco1846</i>	Proteína transportadora de fosfato de baja afinidad Proteína de membrana putativa	CGTTTGATTTACGAACGGTT	49	12.5
<i>sco4346</i>	Proteína hipotética	TAATGTTCTTGATTTCCGCAT	397	12.5
<i>sco6382</i> <i>sco6381</i>	Proteína secretada hipotética Lipoproteína putativa	CTTATGGATTTTCTCACAAAG	-119	12.5
<i>sco7726</i>	Hidrolasa putativa	AGGTGTTTCGAGGTTCCGACCA	157	12.3
<i>sco7771</i>	Pseudogen	CTGTGCGAAAACCTGACGGCA	-154	12.1
<i>sco5085</i>	Activador de la biosíntesis de actinorrodina	CTGATTAATTTTTGATCAATA	-114	11.9
<i>sco0361</i>	Proteína hipotética	CTATCGATAGCGCTAACAAACA	-125	11.8
<i>sco0362</i> <i>sco0363</i> <i>sco0364</i> <i>sco0365</i> <i>sco0366</i>	Racemasa putativa Proteína integral de membrana Enoil-CoA hidratasa putativa Oxidoreductasa putativa Proteína hipotética	CTATCGATAGCGCTAACAAACA	-35	11.8
<i>sco6468</i>	Proteína hipotética	TTGTTGAAAGCGGGAACGAAG	377	11.8
<i>sco6487</i>	Aminoacilasa putativa	CGGTCGACATGAAGAACATGG	358	11.8
<i>sco7654</i>	Oxidoreductasa putativa	TGGCCGGGATCTCGAACGCCG	460	11.8
<i>sco1659</i>	Proteína del facilitador de glicerol putativo	TAACGATCGTGCTTTCGATAA	-215	11.7
<i>sco6096</i> <i>sco6095</i> <i>sco6094</i> <i>sco6093</i>	Lipoproteína putativa Proteína de unión a ATP; transportador ABC Proteína integral de membrana de transportadora Proteína secretada putativa	TGATGTTCTGATCACGAACT	718	11.7
<i>sco1251</i> <i>sco1252</i>	Proteína integral de membrana putativa Proteína integral de membrana	AGGTTGAAGGCTTGAACATCG	-66	11.6
<i>sco5458</i>	Lipoproteína putativa	TCTTCGAGAACTCGATCATCG	1084	11.6
<i>sco0051</i>	Transposasa putativa	ATGTTTCTGTAATACCGATGA	-166	11.4
<i>sco0053</i>	Transposasa putativa	ATGTTTCTGTAATACCGATGA	-290	11.4
<i>sco1583</i>	Arabinosidasa secretada putativa	CGTTCGGGATATCGGACATTG	-49	11.4
<i>sco1584</i>	Proteína hipotética	CGTTCGGGATATCGGACATTG	-49	11.4
<i>sco1794</i>	Proteína hipotética	TGGTGTTCGACATCCCGGCCT	235	11.4
<i>sco7572</i>	Oxidoreductasa putativa	AGTACGAGATCAAGAACACCA	736	11.4
<i>sco4560</i>	Polipéptido deformilasa putativa	AGGTGTCCGACATGTCGGACA	272	11.2
<i>sco2181</i>	Dihidrolipoamida succiniltransferasa putativo	AGACTTCCGCAATTTTCGTAAG	-35	11.1
<i>sco5511</i>	Fosfodiesterasa asociada a membrana putativa	TTGTGATCGAGCTGTCGGACA	2746	11.1
<i>sco3809</i>	Proteína transmembranal; transportador	CCATGTTCTGATCCCGGACG	1081	11
<i>sco4755</i>	Regulador transcripcional putativo	GTTTCAATAATTCGGACTTAT	-44	11

<b>Operón</b>	<b>Función</b>	<b>Sitio</b>	<b>Posición</b>	<b>Puntuación</b>
<i>sco1905</i>	Proteína hipotética	AGCTCGAAATCCCGAACATTT	-45	10.9
<i>sco1904</i>	Regulador transcripcional putativo			
<i>sco7015</i>	Glicosil hidrolasa secretada putativa	TGTTGGAGAAGTCGAACACCT	3448	10.9
<i>sco3594</i>	D-lactato deshidrogenasa putativa	CTGCCTTAATTTTCGGAAGCAG	977	10.8
<i>sco3595</i>	D-alanina-D-lactato ligasa putativa			
<i>sco3596</i>	D-alanina-D-alanina dipeptidasa putativa			
<i>sco3678</i>	Desoxinucleótido trifosfato deaminasa putativa	TAGTTTAATGGTAGAACATCA	-537	10.8
<i>sco3677</i>	Purina fosforibosiltransferasa putativa			
<i>sco3679</i>	Proteína hipotética	TAGTTTAATGGTAGAACATCA	-416	10.8
<i>sco6280</i>	Proteína regulatoria putativa	CTGTTTCAGTCTCGAAAACCG	-263	10.8
<i>sco1445</i>	Proteína hipotética	TGGTCTACATCTCGATCGTCG	265	10.7
<i>sco2397</i>	Oxidoreductasa putativa	ATTCAGCTTGTCAAAACAAAT	-31	10.6
<i>sco2398</i>	Regulador transcripcional MarR	ATTCAGCTTGTCAAAACAAAT	-37	10.6
<i>sco2705</i>	Proteína de membrana putativa	CGGCGTTCACAAATCCAACAC	-104	10.6
<i>sco2706</i>	Transferasa putativa	CGGCGTTCACAAATCCAACAC	-130	10.6
<i>sco2707</i>	Transferasa putativa			
<i>sco2708</i>	Proteína de membrana integral putativa			
<i>sco3023</i>	Adenosilhomocisteinasa	AGTTGGACATCACGAACGACG	1219	10.6
<i>sco5578</i>	Transportador de azúcar relacionado con glucosa	TTCTCAAGACTTGAACACAT	-180	10.6
<i>sco1573</i>	Oxidoreductasa putativa	AGTCGTTTCGAGATGTGAGCGA	1321	10.5
<i>sco2388</i>	B-ceto acil sintasa (acarreador de grupo acilo)	CCGTGTTTCGAGATGGCGAAGG	718	10.5
<i>sco5900</i>	Proteína de membrana putativa	CCCTGTTTCGCGATTCGACGT	511	10.4
<i>sco0095</i>	Proteína hipotética	GTCTGTTCAAGATTTTCATCA	-37	10.4
<i>sco0967</i>	Reductasa putativa	AGGTGTTGGAGATGTGATGA	259	10.4
<i>sco3856</i>	Peptidil proilil <i>cis trans</i> isomerasa putativa	TCTTGTTTCGCAACTTCATCAC	-183	10.4
<i>sco3857</i>	Proteína regulatoria putativa	TCTTGTTTCGCAACTTCATCAC	-158	10.4
<i>sco7037</i>	Proteína secretada putativa	GCATCGACAAGTCGAACAACG	3250	10.4
<i>sco5542</i>	Proteína hipotética	CTCCGTCAGAGCTTTCGAAGT	383	10.3
<i>sco6797</i>	Proteína de unión a ATP/ADP putativa	TCGACGGAATCGAGAACAAAC	112	10.3
<i>sco4755</i>	Regulador transcripcional putativo	ATCTGTTCCAGTTTCAATAAT	-54	10.2
<i>sco1583</i>	Arabinosidasa secretada putativa	AGTCGTTTCGGGATATCGGACA	-46	10.1
<i>sco1584</i>	Proteína hipotética	AGTCGTTTCGGGATATCGGACA	-111	10.1
<i>sco1929</i>	Proteína integral de membrana; transportador	CCGCTGGGAGTAAGAACACAT	797	10.1
<i>sco1930</i>	Proteína integral de membrana; transportador	CCGCTGGGAGTAAGAACACAT	-19	10.1
<i>sco3981</i>	Regulador transcripcional GntR	TGATCGGAATCTCGTACACGA	727	10.1
<i>sco4061</i>	Proteína hipotética	TGATCGAGATGTCTGACGTCT	7	10.1
<i>sco5326</i>	Proteína hipotética	TGATCGAGATGTCTGACGTCT	-127	10.1
<i>sco5327</i>	Transposasa putativa	TGATCGAGATGTCTGACGTCT	-51	10.1
<i>sco5328</i>	Transposasa putativa; pseudogen	AGACGTCAGACATCTCGATCA	-45	10.1

Operón	Función	Sitio	Posición	Puntuación
<i>sco5329</i>	Proteína hipotética	AGACGTCAGACATCTCGATCA	-175	10.1
<i>sco7383</i>	Proteína hipotética	CTTCGTTTCGAGAAGTTGATGG	343	10.1
<i>sco0440</i> <i>sco0439</i>	Proteína integral de membrana; transportador Proteína hipotética	TCGTTGAACGATCTAACAAGA	-139	10
<i>sco0441</i> <i>sco0442</i> <i>sco0443</i>	Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética	TCGTTGAACGATCTAACAAGA	-148	10
<i>sco4939</i>	Proteína hipotética	GGGCGTTCGCTAAATCAATAG	-74	10
<i>sco4940</i>	Regulador transcripcional TetR	GGGCGTTCGCTAAATCAATAG	-48	10
<i>sco5293</i>	Subunidad de oxigenasa putativa	AGATGTTTCATCATGCCGACGT	616	10
<i>sco5439</i>	Proteína hipotética	GAGTGGAATTGTCAAACACCG	10	10
<i>sco7050</i>	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa putativa	TGGTGTTCATGATCCCGTACG	793	10
<i>sco7258</i>	Proteína hipotética	ACGTTAGAGTCTCTAACAGAA	-105	10
<i>sco7259</i>	Proteína hipotética	ACGTTAGAGTCTCTAACAGAA	-58	10

**Tabla S3.** Oligómeros diseñados en el presente estudio, con su secuencia y función

Nombre	Función	Secuencia
d2440F	Eliminación del gen <i>sco2440</i>	gtgaccgggctctcgacatactggagctcttctctcgaccatgATTCCGGGG ATCCGTCGACC
d2440R	Eliminación del gen <i>sco2440</i>	ctccaggatgccacgtgcaccgtctcgtcgcaggcttcCATATGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
Bam2440F	Amplificación del gen <i>sco2440</i> ; sitio <i>BamHI</i>	cgggatccCGCGGACGCAGTGGACCA
Eco2440R	Amplificación del gen <i>sco2440</i> ; sitio <i>EcoRI</i>	cgggatatcCCCAGGTGGGGCCCTCGCC

**Tabla S4.** PCR de amplificación para el inserto de resistencia a apramicina

Reactivo	Cantidad	Concentración	Paso	Temperatura	Tiempo
10X Accuprime PCR Buffer I	5 µL	1x	Desnaturalización inicial	94 °C	30 segundos
d2440F (10 µM)	1 µL	0.2 µM	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
d2440R (10 µM)	1 µL	0.2 µM	Alineamiento	64 °C	30 segundos x 25
DNA (30 ng/µL)	1 µL		Extensión	68 °C	90 segundos
Accuprime Taq High Fidelity	0.2 µL		Extensión final	68 °C	3 minutos
H <sub>2</sub> O	41.8 µL		Fin	4 °C	∞

**Tabla S5. PCR de amplificación del gen *sco2440***

Reactivo	Volumen	Conc. Final	Paso	Temperatura	Tiempo
10X Accuprime PCR Buffer II	5 $\mu$ L	1x	Desnaturalización inicial	94 °C	30 segundos
Bam2440F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
Eco2440R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M	Alineamiento	64 °C	30 segundos x 25
DNA (213 <sup>ng</sup> / $\mu$ L)	1 $\mu$ L		Extensión	68 °C	90 segundos
DMSO 100%	2.5 $\mu$ L	5%	Extensión final	68 °C	3 minutos
Accuprime Taq High Fidelity	0.2 $\mu$ L		Fin	4 °C	$\infty$
H <sub>2</sub> O	41.8 $\mu$ L				

**Tabla S6. Afinidad de SCO2440 por análogos al metabolismo de arabinosa.**

Metabolito	Energía de unión mínima (kcal/mol)	Energía de unión promedio (kcal/mol)	% Representatividad
D-glucosa	-0.97	-0.12	2.1
D-glucopiranososa	-2.93	-2.45	6.6
D-gluconolactona	-3.23	-2.71	6.6
D-gluconato	-0.98	0.22	2.9
KDG	-2.27	-0.78	6.7

# 12 | REFERENCIAS

Angell, S. y Bibb, M. J. (1994) “Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase”, *Molecular And General Genetics*, (244), pp. 135–143.

Angell, S., Schwarz, E. y Bibb, M. J. (1992) “The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression”, *Mol Microbiol*, 6(19), pp. 2833–2844.

Bailey, T. L. y Elkan, C. (1994) “Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Bipolymers”, *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28–36.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, 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. y Hopwood, D. A. (2002) “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).”, *Nature*, 417(6885), pp. 141–147. doi: 10.1038/417141a.

Brice, C. B. y Kornberg, H. L. (1968) “Genetic control of isocitrate lyase activity in *Escherichia coli*.”, *Journal of Bacteriology*, 96(6), pp. 2185–2186. doi: 10.1073/pnas.211569798.

Chávez, A., Forero, A., Sánchez, M., Rodríguez-Sanoja, R., Mendoza-Hernández, G., Servín-Gonzalez, L., Sánchez, B., García-Huante, Y., Rocha, D., Langley, E., Ruiz, B. y Sánchez, S. (2011) “Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological



differentiation in *Streptomyces coelicolor*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), pp. 799–806. doi: 10.1007/s00253-010-2905-8.

Colson, S., Stephan, J., Hertrich, T., Saito, A., van Wezel, G. P., Titgemeyer, F. y Rigali, S. (2007) “Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of streptomycetes are DasR-responsive elements”, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12(1–2), pp. 60–66. doi: 10.1159/000096460.

Conchúir, S., Barlow, K. A., Pache, R. A., Ollikainen, N., Kundert, K., O’Meara, M. J., Smith, C. A. y Kortemme, T. (2015) “A Web resource for standardized benchmark datasets, metrics, and rosetta protocols for macromolecular modeling and design”, *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0130433.

Conway, T. (1992) “The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology”, *FEMS Microbiology Letters*, 103(1), pp. 1–27. doi: [http://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90334-K](http://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90334-K).

Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. (2000) “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), pp. 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.

Deutscher, J., Aké, F. M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E. y Joyet, P. (2014) “The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), pp. 231–256. doi: 10.1128/MMBR.00001-14.

Eddy, S. R. (2011) “Accelerated profile HMM searches”, *PLoS Computational Biology*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195.

Entner, N. y Doudoroff, M. (1951) “Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*”, *Journal of Biological Chemistry*, 196(2), pp. 853–862.

Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J. y Bateman, A. (2016) “The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future”, *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp. D279–D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344.

Flett, F., Mersinias, V. y Smith, C. P. (1997) “High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes”, *FEMS Microbiology Letters*, 155(2), pp. 223–229. doi: 10.1016/S0378-1097(97)00392-3.

Forero, A., Sánchez, M., Chávez, A., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R., Servín-González, L. y Sánchez, S. (2012) “Possible involvement of the sco2127 gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*.”, *Canadian journal of microbiology*, 58(10), pp. 1195–201. doi: 10.1139/w2012-100.

- Fritz, G., Megerle, J. A., Westermayer, S. A., Brick, D., Heermann, R., Jung, K., Rädler, J. O. y Gerland, U. (2014) “Single cell kinetics of phenotypic switching in the arabinose utilization system of *E. coli*”, *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0089532.
- Fujii, T., Gramajo, H. C., Takano, E. y Bibb, M. J. (1996) “reD and actII-oRF4, Pathway-Specific Regulatory Genes for Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed in vitro by an RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma_{hrdD}$ ”, 178(11), pp. 3402–3405.
- Görke, B. y Stülke, J. (2008) “Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients”, *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), pp. 613–624. doi: 10.1038/nrmicro1932.
- Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M. y Takano, E. (2017) “Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, 3(2010), pp. 2343–2353. doi: 10.1099/mic.0.038281-0.
- Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S. y van Wezel, G. P. (2012) “Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics”, *Molecular Microbiology*, 6(86), pp. 1490–1507. doi: 10.1111/mmi.12072.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. y Chater, K. F. (2003) “PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp. 1541–6. doi: 10.1073/pnas.0337542100.
- Guzman, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., López, R., Servín-González, L., Sánchez, S. y Langley, E. (2005) “Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*”, *Microbiology*, 151(5), pp. 1717–1723. doi: 10.1099/mic.0.27557-0.
- Hiard, S., Marée, R., Colson, S., Hoskisson, P. A., Titgemeyer, F., van Wezel, G. P., Joris, B., Wehenkel, L. y Sébastien Rigali (2007) “PREDetector: A new tool to identify regulatory elements in bacterial genomes”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(4), pp. 861–864. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.180.
- Hindle, Z. y Smith, C. P. (1994) “Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein”, *Mol Microbiol*, 12(5), pp. 737–745. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01061.x.
- Hodgson, D. A. (1982) “Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose”, *Journal of General Microbiology*, 128(10), pp. 2417–2430. doi: 10.1099/00221287-128-10-2417.
- Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces in nature and medicine*. 1a ed, Oxford University Press. 1a ed. Oxford: Oxford University Press.

- Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. (1996) “VMD: Visual molecular dynamics”, *Journal of Molecular Graphics*, pp. 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. y Ōmura, S. (2003) “Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*”, *Nature Biotechnology*, 21(5), pp. 526–531. doi: 10.1038/nbt820.
- Ikeda, H., Seno, E. T., Bruton, C. J. y Chater, K. F. (1984) “Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*”, *Molecular & general genetics: MGG*, 196(3), pp. 501–507. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6094978>.
- Johnsen, U., Sutter, J.-M., Schulz, A.-C., Tästensen, J.-B. y Schönheit, P. (2014) “XacR - a novel transcriptional regulator of D-xylose and L-arabinose catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*”, *Environmental microbiology*, 17, pp. 1–35. doi: 10.1111/1462-2920.12603.
- Johnsen, U., Sutter, J. M., Zaiß, H. y Schönheit, P. (2013) “L-Arabinose degradation pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of l-arabinose dehydrogenase”, *Extremophiles*, 17(6), pp. 897–909. doi: 10.1007/s00792-013-0572-2.
- Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R. y Elliot, M. A. (2017) “*Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals”, *eLife*, 6, pp. 1–21. doi: 10.7554/eLife.21738.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. y Morishima, K. (2017) “KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs”, *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D353–D361. doi: 10.1093/nar/gkw1092.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. y Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. 2a ed. The John Innes Foundation.
- Kiszonas, A. M., Courtin, C. M. y Morris, C. F. (2012) “A critical assessment of the quantification of wheat grain arabinoxylans using a phloroglucinol colorimetric assay”, *Cereal Chemistry*, 89(3), pp. 143–150. doi: 10.1094/CCHEM-02-12-0016-R.
- Krissinel, E. y Henrick, K. (2004) “Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions”, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 60(12 I), pp. 2256–2268. doi: 10.1107/S09074444904026460.
- Lawlis, V. B., Dennis, M. S., Chen, E. Y., Smith, D. H. y Henner, D. J. (1984) “Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose genes of *Escherichia coli*”, *Appl Environ Microbiol*, 47(1), pp. 15–21.

- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G. y Tan, H. (2013) “Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*”, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(1), pp. 112–143. doi: 10.1128/MMBR.00054-12.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. y Lopez, R. (2013) “Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI.”, *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue), pp. 597–600. doi: 10.1093/nar/gkt376.
- Melzoch, K., Joost Teixeira De Mattos, M. y Neijssel, O. M. (1997) “Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in chemostat culture”, *Biotechnology and Bioengineering*, 54(6), pp. 577–582. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970620)54:6<577::AID-BIT8>3.0.CO;2-G.
- Milton, H. S. J. (2015) “The Bacterial Phosphotransferase System: New frontiers 50 Years After Its Discovery”, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 25, pp. 73–78. doi: 10.1159/000381215.The.
- Molina-Henares, A. J., Krell, T., Guazzaroni, M. E., Segura, A. y Ramos, J. L. (2006) “Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors”, *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), pp. 157–186. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00008.x.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. y Olson, A. J. (2009) “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility”, *Journal of computational chemistry*, 30(16), pp. 2785–2791. doi: 10.1002/jcc.21256.AutoDock4.
- Navone, L., Macagno, J. P., Licon-Cassani, C., Marcellin, E., Nielsen, L. K., Gramajo, H. y Rodriguez, E. (2015) “AllR Controls the Expression of *Streptomyces coelicolor* Allantoin Pathway Genes”, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), pp. 6649–6659. doi: 10.1128/AEM.02098-15.
- Nazari, B., Kobayashi, M., Saito, A., Hassaninasab, A., Miyashita, K. y Fujii, T. (2013) “Chitin-Induced Gene Expression in Secondary Metabolic Pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown in Soil”, 79(2), pp. 707–713. doi: 10.1128/AEM.02217-12.
- Nothaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M. y Titgemeyer, F. (2003) “The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism.”, *Journal of bacteriology*, 185(23), pp. 7019–23. doi: 10.1128/JB.185.23.7019.
- Nothaft, H., Rigali, S., Boomsma, B., Świątek, M. A., McDowall, K. J., van Wezel, G. P. y Titgemeyer, F. (2010) “The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control”, *Molecular Microbiology*, 75(5), pp. 1133–1144. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07020.x.
- Nunn, C. E. M., Johnsen, U., Schönheit, P., Fuhrer, T., Sauer, U., Hough, D. W. y Danson, M. J. (2010) “Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*”, *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp. 33701–33709. doi: 10.1074/jbc.M110.146332.

- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. y Horinouchi, S. (2008) “Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350”, *Journal of Bacteriology*, 190(11), pp. 4050–4060. doi: 10.1128/JB.00204-08.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004) “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis”, *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084.
- Pinto, D. y Mascher, T. (2016) “(Actino)Bacterial ‘intelligence’: using comparative genomics to unravel the information processing capacities of microbes”, *Current Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 62(3), pp. 487–498. doi: 10.1007/s00294-016-0569-3.
- Rodionov, D. A. (2007) “Comparative Genomic Reconstruction of Transcription Regulatory Networks in Bacteria”, *Chemical Reviews*, 107(8), pp. 3467–3497. doi: 10.1021/cr068309.
- Rodionov, D. A., Gelfand, M. S. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004) “Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria”, *Microbiology*, 150(11), pp. 3571–3590. doi: 10.1099/mic.0.27041-0.
- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I. y Sánchez, S. (2015) “An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1849(8), pp. 1017–1039. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.06.007.
- Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D. y Sánchez, S. (2016) “Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*”, *BMC Microbiology*. BMC Microbiology, 16(77). doi: 10.1186/s12866-016-0690-y.
- Ruiz-Villafán, B., Rodríguez-Sanoja, R., Aguilar-Osorio, G., Gosset, G. y Sanchez, S. (2014) “Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), pp. 6061–6071. doi: 10.1007/s00253-014-5662-2.
- Saito, A., Shinya, T., Miyamoto, K., Yokoyama, T., Kaku, H., Minami, E., Shibuya, N., Tsujibo, H., Nagata, Y., Ando, A., Fujii, T. y Miyashita, K. (2007) “The *dasABC* Gene Cluster, Adjacent to *dasR*, Encodes a Novel ABC Transporter for the Uptake of N,N'-Diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, 73(9), pp. 3000–3008. doi: 10.1128/AEM.02612-06.
- Sambrook, J. y W Russell, D. (2001) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, p. 999.
- Schrödinger, L. (sin fecha) “The PyMOL Molecular Graphics System Version 2.0”.
- Seo, J., Ohnishi, Y., Hirata, A. y Horinouchi, S. (2002) “ATP-Binding Cassette Transport System Involved in Regulation of Morphological Differentiation in Response to Glucose in *Streptomyces griseus*”, 184(1), pp. 91–103. doi: 10.1128/JB.184.1.91.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., Thompson, J. D., Higgins, D. G., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. y Higgins, D. G. (2011) “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega”, *Molecular Systems Biology*, 7(539). doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Sippl, M. J. (1993) “Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, pp. 355–362. doi: 10.1002/prot.340170404.
- Snyder, L. y Champness, W. C. (2007) *Molecular genetics of bacteria*, American Society for Microbiology Press. Washington, USA.
- Świątek-Połatyńska, M. A., Bucca, G., Laing, E., Gubbens, J., Titgemeyer, F., Smith, C. P., Rigali, S. y Van Wezel, G. P. (2015) “Genome-wide analysis of in vivo binding of the master regulator DasR in *Streptomyces coelicolor* identifies novel non-canonical targets”, *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0122479.
- Świątek, M. A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y.-H., Laing, E., Kim, B.-G., Smith, C. P. y van Wezel, G. P. (2013) “The ROK Family Regulator Rok7B7 Pleiotropically Affects Xylose Utilization, Carbon Catabolite Repression, and Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*”, *Journal of Bacteriology*, 195(6), pp. 1236–1248. doi: 10.1128/JB.02191-12.
- Świątek, M. A., Tenconi, E., Rigali, S. y van Wezel, G. P. (2012) “Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production”, *Journal of Bacteriology*, 194(5), pp. 1136–1144. doi: 10.1128/JB.06370-11.
- Tierrafría, V. H., Licona-Cassani, C., Maldonado-Carmona, N., Romero-Rodríguez, A., Centeno-Leija, S., Marcellin, E., Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Nielsen, L. K. y Sánchez, S. (2016) “Deletion of the hypothetical protein SCO2127 of *Streptomyces coelicolor* allowed identification of a new regulator of actinorhodin production”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (100), pp. 9229–9237.
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R. y Reuther, J. (2008) “The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes”, *Molecular Microbiology*, 67(4), pp. 861–880. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06092.x.
- Tocquin, P., Naômé, A., Jourdan, S., Anderssen, S., Hiard, S., van Wezel, G. P., Baurain, D. y Rigali, S. (2016) “PREDetector 2.0: Online and Enhanced Version of the Prokaryotic Regulatory Elements Detector Tool”, *bioRxiv*, (i), pp. 1–9. doi: 10.1101/084780.
- Traag, B. A., Kelemen, G. H. y van Wezel, G. P. (2004) “Transcription of the sporulation gene *ssgA* is activated by the IclR-type regulator SsgR in a *whi*-independent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, *Molecular Microbiology*, 53(3), pp. 985–1000. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04186.x.

- Vockenhuber, M. P., Heueis, N. y Suess, B. (2015) "Identification of metE as a second target of the sRNA scr5239 in *Streptomyces coelicolor*", *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0120147.
- Vockenhuber, M. P. y Suess, B. (2012) "Streptomyces coelicolor sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the dagA coding region", *Microbiology*, 158(2), pp. 424–435. doi: 10.1099/mic.0.054205-0.
- Watanabe, S., Kodak, T. y Makino, K. (2005) "Cloning, Expression, and Characterization of Bacterial L-Arabinose 1-Dehydrogenase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism", *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), pp. 2612–2623. doi: 10.1074/jbc.M506477200.
- Watanabe, S., Shimada, N., Tajima, K., Kodaki, T. y Makino, K. (2006) "Identification and characterization of L-arabonate dehydratase, L-2-Keto-3-deoxyarabonate dehydratase, and L-arabinolactonase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism: Novel evolutionary insight into sugar metabolism", *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp. 33521–33536. doi: 10.1074/jbc.M606727200.
- Water, R. H. (2012) *The chemistry and technology of pectin*. 1a ed. Editado por R. H. Walter. San Diego: Academic Press.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. y Barton, G. J. (2009) "Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench", *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wattam, A. R., Davis, J. J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E. M., Disz, T., Gabbard, J. L., Gerdes, S., Henry, C. S., Kenyon, R. W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E. K., Olsen, G. J., Murphy-Olson, D. E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H. y Stevens, R. L. (2017) "Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center", *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D535–D542. doi: 10.1093/nar/gkw1017.
- Wavefunction (2006) "Spartan'10". Irvine, CA.
- Webb, B. y Sali, A. (2014) *Comparative protein structure modeling using MODELLER*, *Current Protocols in Bioinformatics*. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s47.
- van Wezel, G. P., Mahr, K., König, M., Traag, B. a., Pimentel-Schmitt, E. F., Willimek, A. y Titgemeyer, F. (2005) "GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2)", *Molecular Microbiology*, 55(2), pp. 624–636. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04413.x.
- Wong, H. C., Ting, Y., Lin, H. C., Reichert, F., Myambo, K., Watt, K. W. K., Toy, P. L. y Drummond, R. J. (1991) "Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*", *Journal of Bacteriology*, 173(21), pp. 6849–6858.

Xu, Y., Liao, C. H., Yao, L. L., Ye, X. y Ye, B. C. (2016) “GlnR and PhoP directly regulate the transcription of genes encoding starch-degrading, amylolytic enzymes in *Saccharopolyspora erythraea*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23), pp. 6819–6830. doi: 10.1128/AEM.02117-16.

Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Lee, K., Kim, W. S., Park, S. S., Hahn, J. S. y Kim, B. G. (2009) “NdgR, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), pp. 501–511. doi: 10.1007/s00253-008-1802-x.