



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE UNA GLUCOSA CINASA
POLIFOSFATO FUNCIONAL EN EL METABOLISMO DE *Streptomyces
coelicolor*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

LUIS ANGEL CORONA ORTEGA



Ciudad de México

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: RUTH EDITH MARTÍN FUENTES

VOCAL: Profesor: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

SECRETARIO: Profesora: ALBA ICXIUH ROMERO RODRÍGUEZ

1er. SUPLENTE: Profesora: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2° SUPLENTE: Profesor: HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL DR. SERGIO SÁNCHEZ, EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Alba Icxih Romero Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

SUSTENTANTE:

Luis Angel Corona Ortega

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT, por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de este proyecto de tesis mediante el proyecto 2013-CB-219686.

Índice General

1. Resumen	1
2. Marco teórico	2
2.1 Características del género <i>Streptomyces</i>	2
2.2 Metabolitos secundarios	2
2.3 Ciclo de vida.....	4
2.4 Efecto de la glucosa sobre el proceso de diferenciación morfológica y en la producción de metabolitos secundarios.....	5
2.5 <i>Streptomyces coelicolor</i> como especie modelo	6
2.6 Represión catabólica por carbono.....	8
2.7 Definición y clasificación de las glucosa cinasas	11
2.8 Participación de las Glks durante la sobreproducción de metabolitos secundarios.....	14
2.9 Tipos de Glks en <i>S. coelicolor</i>	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Materiales y métodos	25
7. Resultados	35
8. Discusión	55
9. Conclusiones	63
10. Referencias	64
11. Anexos	70

Abreviaturas

ACT	Actinorrodina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATP-Glk	Glucosa cinasa dependiente de ATP
cm	Centímetro
DNA	Medio agar nutritivo
D.O.	Densidad óptica
Dog	2-Desoxiglucosa
g	Gramos
Glk	Glucosa cinasa
h	Hora
HK	Hexocinasa
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Medio mínimo
MS	Medio soya manitol
N	Normal
nm	Nanómetros
NMMP	Medio mínimo líquido
nmol	Nanomol
PBG	Medio púrpura de bromocresol glucosa
Pp	Polifosfato
Pp-Glk	Glucosa cinasa dependiente de polifosfato
PTS	Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato

Abreviaturas

RCC	Represión catabólica por carbono
RED	Undecilprodigiosina
RK	Ribocinasa
ROK	Represores, marcos abiertos de lectura y cinasas
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
U	Unidad de actividad enzimática (nmol producto/min*mg proteína)
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1. Resumen

Las glucosa cinasas (Glks) son enzimas que se encargan de catalizar la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato empleando ATP, ADP y/o polifosfato (Pp) como donadores de grupo fosfato. No obstante, se ha propuesto que las Glks parecen estar implicadas en otras funciones en el género *Streptomyces* como en el mecanismo de represión catabólica por carbono (RCC) o en la sobreproducción de metabolitos secundarios. Por ello, en el presente trabajo se estudió el efecto de la expresión de una Glk dependiente de polifosfato (Pp-Glk) proveniente del estreptomiceto sobreproductor de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius* sobre el metabolismo de una cepa ATP-Glk nula de *S. coelicolor*.

Se observó que la cepa complementada con la Pp-Glk recuperó la capacidad para metabolizar glucosa y se restablecieron sus niveles de crecimiento a los niveles de la cepa silvestre. Sin embargo, en dicha cepa se observó que la actividad agarolítica y amilolítica fueron total y parcialmente insensibles a represión catabólica, lo que sugiere que la Pp-Glk no participa directamente en el mecanismo de RCC en *S. coelicolor*.

En cuanto al metabolismo secundario se observó que los niveles de producción de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa complementada fueron inferiores a los niveles de la cepa nula ATP-Glk pero similares a los de la cepa silvestre, lo que demuestra que la actividad de la Pp-Glk ayuda a restablecer los niveles de producción de ambos antibióticos a los niveles de la cepa silvestre. En cuanto a la morfología macroscópica, se observó que la cepa complementada presentaba un fenotipo semejante al de la cepa silvestre y distinto al de la cepa nula ATP-Glk, lo que demuestra que al restablecer el metabolismo de glucosa también se restablecen los efectos regulatorios negativos que dicho carbohidrato ejerce sobre la producción de antibióticos y en el proceso de diferenciación morfológica en *S. coelicolor*, evidenciando que dicha regulación depende únicamente del catabolismo de la glucosa y no del tipo Glk que participe en su metabolismo.

2. Marco teórico

2.1 Características del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece al filo Actinobacteria y está formado por bacterias Gram-positivas, aerobias estrictas, con un DNA rico en guaninas y citosinas (aproximadamente 70%). Su genoma tiene un tamaño entre 8-10 Mb dependiendo la especie y se encuentra ordenado de manera lineal (Hwang *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2010).

Los estreptomicetos son organismos saprófitos principalmente aislados del suelo, desempeñando un papel fundamental en la reutilización del carbono en la naturaleza, ya que tienen la capacidad de metabolizar varios polisacáridos complejos como el almidón, xilosa o celulosa mediante la secreción de una gran cantidad de enzimas extracelulares (α -amilasas, α -glucosidas, celulasas, proteasas y agarasas) que les permiten degradar dichos polisacáridos hasta obtener mono y/o disacáridos para su posterior internalización y consumo (Bertram *et al.*, 2004; Hodgson, 2000).

2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios se definen como metabolitos de bajo peso molecular, producidos durante el metabolismo secundario, no esenciales para el crecimiento o reproducción del organismo que los produce pero que en muchas ocasiones le otorgan ventajas para sobrevivir (Keller *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2010). Usualmente, son producidos durante la fase estacionaria de crecimiento (idiofase) del microorganismo productor, derivándose a partir de ciertos precursores formados durante el metabolismo primario (Martin y Demain, 1980; Ruiz *et al.*, 2010). Se caracterizan por ser compuestos con estructuras químicas complejas, sintetizados a través de un gran número de rutas metabólicas distintas (Martin y Demain, 1980).

El género *Streptomyces* se caracteriza por producir una gran cantidad de metabolitos secundarios bioactivos comercialmente importantes y ampliamente utilizados por el ser humano en diferentes campos como la agricultura o la medicina debido a que presentan actividad como antifúngicos, herbicidas, antivirales, antitumorales, antihipertensivos, inmunosupresores y antibióticos (Barka *et al.*, 2016; de Lima *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2003). En la tabla 1 se muestran algunos de los metabolitos secundarios más importantes producidos por algún miembro de este género.

Tabla 1. Metabolitos secundarios de importancia producidos por el género *Streptomyces*

Microorganismo	Compuesto	Función
<i>S. venezuelae</i>	Cloranfenicol	Antibiótico
<i>S. peuceitius</i> var. <i>caesius</i>	Doxorrubicina	Antitumoral
<i>S. nodosus</i>	Anfotericina B	Antifúngico
<i>S. avermitilis</i>	Avermectina	Herbicida
<i>S. aureofaciens</i>	Clortetraciclina	Antibiótico
<i>S. hygroscopicus</i>	Rapamicina	Inmunosupresor

*Adaptado de Barka *et al.*, 2016

Se estima que el género *Streptomyces* produce aproximadamente el 34% de todos los metabolitos secundarios bioactivos derivados de los microorganismos (Bérdy, 2005). Aunque esta cifra podría parecer insignificante, si consideramos que los estreptomicetos generan más de la mitad de todos los antibióticos y antitumorales conocidos (Liu *et al.*, 2013) nos damos cuenta de la importancia y del impacto que tienen en nuestra sociedad.

Se ha observado que la producción de metabolitos secundarios en este género puede verse influenciada en gran medida por las condiciones de laboratorio utilizadas para su producción, siendo la concentración de oxígeno, pH, temperatura y cantidad de luz algunas de las variables a considerar (Ruiz *et al.*, 2010).

Además, el tipo y la concentración de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato son factores cruciales que tienen gran impacto en la producción de dichos metabolitos (Ruiz *et al.*, 2010).

2.3 Ciclo de vida

Otra característica de este género es que tienen un ciclo de vida bastante complejo que incluye un proceso de diferenciación morfológica (McCormick y Flärndn, 2012). El ciclo de vida comienza (figura 1) cuando una o más esporas encuentran las condiciones adecuadas de nutrimentos, humedad y temperatura para germinar, lo que da paso a la formación del micelio vegetativo. En condiciones adversas, como la escasez de nutrimentos, se generan una serie de estímulos moleculares que provocan la formación del micelio aéreo y la subsecuente lisis del micelio vegetativo, mediante la cual se liberan diversos compuestos (aminoácidos, nucleótidos, lípidos, etc.) que sirven como nutrimentos durante el crecimiento del micelio aéreo. Subsecuentemente el micelio aéreo comienza a formar septos, permitiendo así la formación de cadenas de esporas que posteriormente serán liberadas y esparcidas por el medio en un estado de latencia hasta que encuentren las condiciones ideales para germinar y repetir el ciclo (Barka *et al.*, 2016; de Lima *et al.*, 2012; McCormick y Flärndn, 2012).

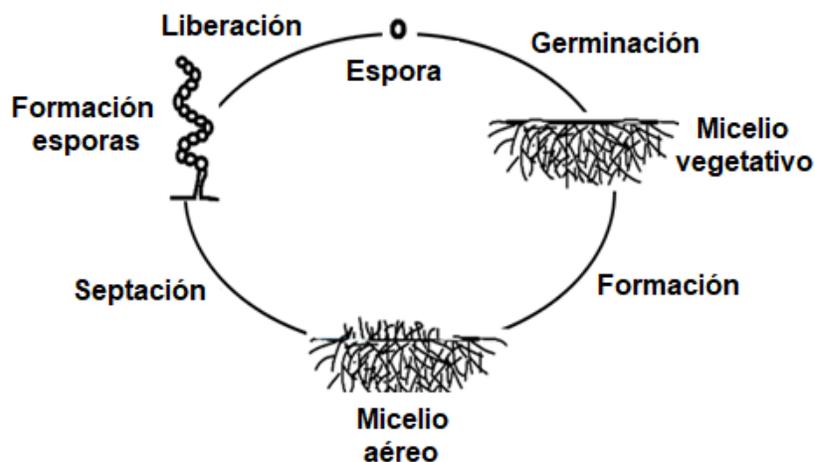


Figura 1. Ciclo de vida del género *Streptomyces*. Tomado y modificado de Lo Grasso *et al.*, 2016

En el género *Streptomyces*, la formación de micelio aéreo y la producción de metabolitos secundarios son fenómenos que inician casi al mismo tiempo, lo que sugiere que ambos fenómenos están intrínsecamente relacionados (Ruiz-Villafán *et al.*, 2010). En el caso de los antibióticos, se ha propuesto que su producción durante la formación del micelio aéreo tiene como finalidad proteger de otros microorganismos las sustancias que son liberadas durante la lisis del micelio vegetativo (Barka *et al.*, 2016).

2.4 Efecto de la glucosa sobre el proceso de diferenciación morfológica y en la producción de metabolitos secundarios

Se ha visto que la utilización de ciertas fuentes de carbono tales como la glucosa, es uno de principales factores que retrasa o inhibe el proceso de diferenciación morfológica y/o la producción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* (Martin y Demain, 1980; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016b; Ruiz-Villafán *et al.*, 2010).

En el caso de la diferenciación morfológica se ha reportado por ejemplo, que la glucosa en altas concentraciones tiene un efecto negativo en el proceso de esporulación en *S. albidoflavus* (Kang y Lee, 1997) y en el proceso de formación del micelio aéreo en la cepa NP4 de *S. griseus*, observándose además que dicho efecto solo es generado por la glucosa, ya que en presencia de otras fuentes de carbono como la maltosa, galactosa, manitol o glicerol no se afecta la formación de micelio aéreo en esta cepa (Seo *et al.*, 2002). Sin embargo, en ambos casos, se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual la glucosa ejerce dicha regulación negativa en el proceso de diferenciación morfológica.

Así mismo, también se ha reportado que la glucosa tiene un efecto negativo en la producción de varios metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* (Ruiz *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010). No obstante, en algunos casos se ha observado que la glucosa también tiene un efecto supresor, como en el caso de *S. lividans*, ya que se ha visto que la producción de actinorrodina (ACT) no se lleva a cabo si

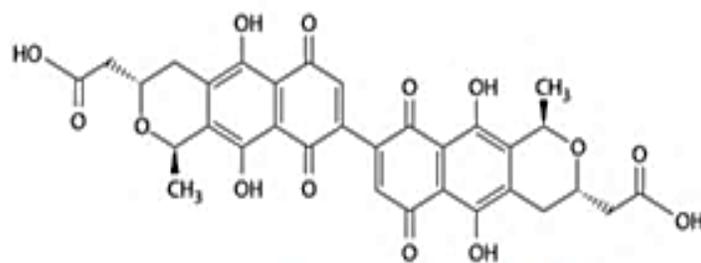
hay presencia de glucosa en el medio debido a que se reprime la expresión del gen *afsR2* que se encarga de codificar una proteína regulatoria necesaria para poder llevar a cabo la producción de ACT en este microorganismo (Kim *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000).

En el laboratorio del Dr. Sergio Sánchez se ha observado que la glucosa ejerce un efecto negativo en el proceso de esporulación y en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina (RED) en *S. coelicolor* (Romero-Rodríguez *et al.*, 2017). En un estudio de transcriptoma realizado por Romero-Rodríguez *et al.*, se reveló que en este microorganismo la glucosa reprime la expresión de una gran cantidad de genes participantes en el proceso de formación del micelio aéreo y/o en la esporulación del mismo. Así mismo, se puso de manifiesto que la glucosa reprime la expresión de 16 de los 23 genes del clúster biosintético de la undecilprodigiosina y 9 de los 22 genes del clúster biosintético de la actinorrodina, siendo los genes más afectados en ambos casos, los que participan durante los primeros pasos de la ruta biosintética de dichos antibióticos (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016b). Por último, también se encontró que la glucosa es capaz de inducir y/o reprimir la expresión de una gran cantidad de genes que no han sido todavía caracterizados por completo pero que han sido identificados como probables reguladores transcripcionales y algunos de ellos han sido asociados directamente con la producción de metabolitos secundarios o con el proceso de diferenciación morfológica (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016b).

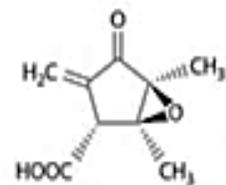
2.5 *Streptomyces coelicolor* como especie modelo

S. coelicolor es la especie modelo del género y una de las mejor caracterizadas genéticamente (Liu *et al.*, 2013). En el 2002, Bentley *et al.*, lograron secuenciar todo su genoma y observaron que éste tiene un tamaño de 8.6 Mb y tiene un contenido de guaninas y citosinas del 72.12%. También predijeron que dicho genoma contiene 7,825 genes y puede codificar hasta 819 proteínas extracelulares como amilasas o proteasas, lo que demuestra su gran capacidad para degradar moléculas complejas (Bentley *et al.*, 2002).

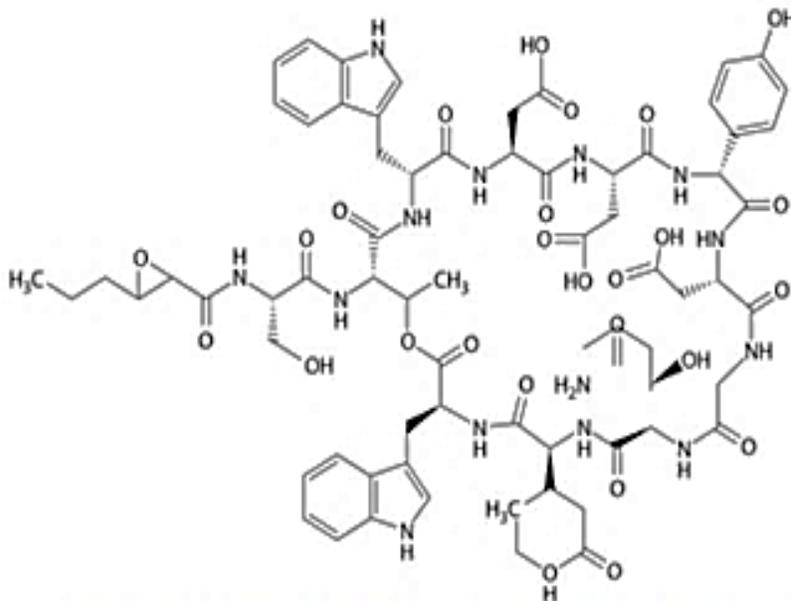
Por otro parte, *S. coelicolor* se adoptó inicialmente como especie modelo de los estreptomicetos por su capacidad para producir dos antibióticos pigmentados: ACT y RED (Liu *et al.*, 2013) los cuales han sido ampliamente estudiados y utilizados como marcadores genéticos. Además, este microorganismo también es capaz de producir otros antibióticos (figura 2) como la metilenomicina (MM) o el antibiótico dependiente de calcio (CDA), los cuales también han sido motivo de estudio.



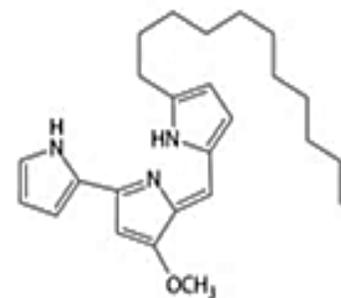
Actinorrodina (ACT)



Metilenomicina (MM)



Antibiótico dependiente de Calcio (CDA)



Undecilprodigiosina (RED)

Figura 2. Antibióticos producidos por *S. coelicolor*. Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2013

De todos ellos, el más estudiado es la actinorrodina, que es un antibiótico pigmentado que cambia de color rojo/azul según el pH y pertenece a una clase de policétidos aromáticos conocidos como benzoisocromanaquinonas. Es formada en una ruta biosintética codificada por un clúster de 22 genes [*sco5071-sco5092*] (Liu *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2009).

Por su parte, la undecilprodigiosina es un tripirrol hidrofóbico de color rojo formado a través de una ruta biosintética codificada por un clúster de 23 genes [*sco5877-sco5898*] (Cerdeño *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2006).

2.6 Represión catabólica por carbono

Se ha visto que la mayoría de los microorganismos cuando se encuentran en presencia de dos o más fuentes de carbono disponibles en el medio consumen de manera jerárquica cada una, priorizando el consumo de aquella fuente que sea más fácil de metabolizar y que les proporcione un crecimiento más rápido, lo que se convierte en una ventaja al momento de competir contra otros microorganismos por los recursos disponibles y aumenta sus probabilidades de supervivencia (Görke y Stülke, 2008). Dicho fenómeno se conoce como represión catabólica por carbono (RCC) (Görke y Stülke, 2008) y se ha reportado que entre el 5-10% de todos los genes bacterianos están regulados de esta forma (Romero-Rodríguez *et al.*, 2017).

Se ha reportado que este mecanismo puede actuar a distintos niveles en los microorganismos. A nivel transcripcional, puede reprimir parcial o totalmente la expresión de genes responsables de codificar proteínas relacionadas con el consumo o transporte de fuentes de carbono alternativas en presencia de otras fuentes “preferenciales” mediante la exclusión o expulsión de los inductores (Görke y Stülke, 2008). Por su parte, a nivel traduccional este mecanismo también puede interrumpir la síntesis de proteínas. De esta manera, se generan un conjunto de señales que regulan directa o indirectamente la actividad de las enzimas y/o de los transportadores sensibles a represión catabólica por carbono (Brückner y Titgemeyer, 2002; Kwakman y Postma, 1994).

Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en *Escherichia coli*, que es una bacteria Gram negativa y en *Bacillus subtilis*, que es una bacteria Gram positiva con bajo contenido de guaninas y citosinas. En ambos microorganismos se ha identificado que el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) tiene un papel fundamental en el funcionamiento del fenómeno de RCC. Interesantemente, se ha visto que el mecanismo molecular mediante el cual se ejerce el fenómeno de RCC en *E. coli* y *B. subtilis* presenta diferencias entre sí, pero genera el mismo efecto global en ambos microorganismos (Brückner y Titgemeyer, 2002; Görke y Stülke, 2008).

En el caso de las bacterias Gram positivas con alto contenido de guaninas y citosinas como los miembros del género *Streptomyces*, poco se sabe sobre su funcionamiento (Görke y Stülke, 2008). Sin embargo, en *S. coelicolor* se ha identificado que la enzima glucosa cinasa (Glc) tiene una función regulatoria muy importante para el adecuado funcionamiento del mismo (Angell *et al.*, 1994; Kwakman y Postma, 1994).

El hallazgo anterior surgió a partir de las observaciones de que las colonias de *S. coelicolor* resistentes al análogo no metabolizable de la glucosa 2-Desoxiglucosa (Dog^R) eran insensibles a represión catabólica en presencia de glucosa e incapaces de metabolizar dicho carbohidrato (Glu⁻) a pesar de que no presentar ninguna alteración en el transporte de la misma (Hodgson, 1982). Posteriormente se observó que dichas cepas Dog^R a diferencia de la cepa parental, presentaban una disminución importante en la actividad de la Glc dependiente de ATP (ATP-Glc), por lo que se correlacionó la alteración en el mecanismo RCC en dicha cepa con la baja actividad ATP-Glc observada (Seno y Chater, 1983).

Por otra parte, al complementar la cepa Dog^R con un fragmento Bc/I de DNA de 2.9 kb de *S. coelicolor* se observó que se restablecía en ella la capacidad para consumir glucosa (Glu⁺), el mecanismo de represión catabólica y la actividad de la ATP-Glc (Ikeda *et al.*, 1984). El análisis posterior de la secuencia de nucleótidos

de dicho fragmento de DNA de 2.9 kb revelo que contenía 3 diferentes marcos abiertos de lectura, de los cuales uno estaba incompleto, mientras que los otros dos marcos correspondían al gen *sco2126*, que codifica una ATP-Glk de 33.1 kDa y al gen *sco2127*, que codifica una proteína de función aún desconocida de 20.1 kDa (Angell *et al.*, 1992). Con lo anterior, se evidenció que existía una estrecha relación entre el adecuado funcionamiento del mecanismo RCC y la presencia de la ATP-Glk en este microorganismo.

Posteriores estudios demostraron que la ATP-Glk en *S. coelicolor* ejerce una función regulatoria esencial en el mecanismo RCC de manera independiente de su función cinasa. Lo anterior se comprobó al evidenciar que la cepa Dog^R recuperaba la capacidad para metabolizar glucosa y la sensibilidad a represión catabólica por carbono al ser complementada con el gen *sco2126* (Angell *et al.*, 1992); Sin embargo, al expresar una Glk proveniente de *Zimomonas mobilis*, que es un microorganismo Gram negativo no relacionado, se observó que la cepa Dog^R únicamente recuperaba su capacidad para metabolizar glucosa pero aún era insensible a represión catabólica (Angell *et al.*, 1994), lo que reveló que la regulación del mecanismo RCC no depende del catabolismo de la glucosa o de la formación de alguno de sus derivados metabólicos.

Se ha visto que la glucosa gracias al mecanismo RCC es capaz de reprimir la expresión y/o traducción de varias proteínas relacionadas con la utilización de la fructosa, glicerol, arabinosa, agar y/o galactosa en *S. coelicolor* (Hodgson, 1982). Además, también se ha reportado que la glucosa es capaz de reprimir el consumo de almidón en *S. coelicolor* (Virolle y Bibb, 1987) y en *S. peucetius* var. *caesius* (Rocha *et al.*, datos sin publicar). No obstante, Kwakman y Postma observaron que la cepa Dog^R de *S. coelicolor* no solo era insensible a represión catabólica por glucosa, sino que también era insensible a la represión catabólica ejercida por otras fuentes de carbono distintas a pesar de que algunas de ellas se metabolizan de manera independiente de la Glk (como el citrato o la arabinosa), lo que

evidenció aún más el papel regulatorio de la ATP-Glk sobre el mecanismo RCC (Kwakman y Postma, 1994).

Se sabe que la ATP-Glk de *S. coelicolor* no presenta en su secuencia de aminoácidos un motivo de unión a DNA, por lo que se descartó que dicha enzima pueda regular directamente la expresión de genes sujetos a represión catabólica, por lo que se ha propuesto que para ejercer dicha función es probable que se una a otras proteínas o a ciertos reguladores transcripcionales (Angell *et al.*, 1992). No obstante, a pesar de los numerosos estudios realizados hasta hoy, aún se desconoce la forma en como la ATP-Glk ejerce su función regulatoria en el mecanismo RCC y únicamente se ha evidenciado la probable interacción entre la ATP-Glk y la proteína GlcP (una permeasa para el transporte de glucosa), que se cree permite formar un complejo para transportar glucosa de manera más eficiente (Van Wezel *et al.*, 2007). Sin embargo, trabajos recientes han aportado evidencia que señala que la glucosa parece desempeñar un papel regulatorio que no depende exclusivamente de la ATP-Glk (Gubbens *et al.*, 2012; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a).

2.7 Definición y clasificación de las glucosa cinasas

Las Glks son enzimas que se encargan de catalizar la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato, que es un producto que puede ser metabolizado subsecuentemente a través de distintas rutas metabólicas como la glucólisis. Para llevar a cabo su función, las Glks utilizan como donadores de grupo fosfato el ATP, ADP o el polifosfato inorgánico (Pp) (Kawai *et al.*, 2005; Romero-Rodríguez *et al.*, 2015; Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

La clasificación más aceptada de las Glks (tabla 2) fue hecha por Kawai *et al.*, quienes clasificaron las Glks de los organismos eucariontes y procariontes de acuerdo a su estructura primaria en 2 grandes familias no homologas: la familia hexocinasa (HK) y la familia ribokinasa (RK) (Kawai *et al.*, 2005).

Los miembros de la familia RK han sido caracterizados por su homología en su estructura primaria y terciaria. En cambio, los miembros de la familia HK presentan homología en sus sitios de unión a glucosa y al donador de fosfato en su estructura primaria y terciaria. Sin embargo, esta familia se encuentra subdividida a su vez en 3 grupos distintos: el grupo HK, A y B (Kawai *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación de las Glks

Clasificación de las Glks				
Familias	Ribocinasa (RK)	Hexocinasa (HK)		
Subgrupos	Sin subgrupos	HK	A	B
Organismos	Mamíferos eucariontes y arqueas del filo Euryarchaeota	Eucariontes	Bacterias Gram negativas, cianobacterias y protistas amitocondriados	Bacterias Gram positivas y arqueas del filo Crenarchaeota.
Donador de fosfato	ADP	ATP	ATP	Pp/ATP
Peso aproximado	50 kDa	52 o 100 kDa	38 kDa	33 kDa
Característica particular	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Presentan homología con la familia de proteínas ROK

*Tomado de Kawai *et al.*, 2005

Se ha identificado además que los miembros del grupo B presentan homología en su estructura primaria con la familia de proteínas ROK (del inglés Represor, Open Reading Frame and Kinases) (figura 3) que incluye varios represores transcripcionales, marcos abiertos de lectura y cinasas que se caracterizan por presentar en la región central de la proteína dos firmas denominadas cajas ROK; la primera de ellas consiste en 28 residuos de aminoácidos que presentan el motivo conservado (Glu-X-Gli-His), mientras que la segunda firma consiste en 14 residuos de aminoácidos con el motivo de unión a Zinc (Cis-X-Cis-Gli-X-X-Gli-Cis-X-Glu) (Kawai *et al.*, 2005; Romero-Rodríguez *et al.*, 2015; Titgemeyer *et al.*, 1994).

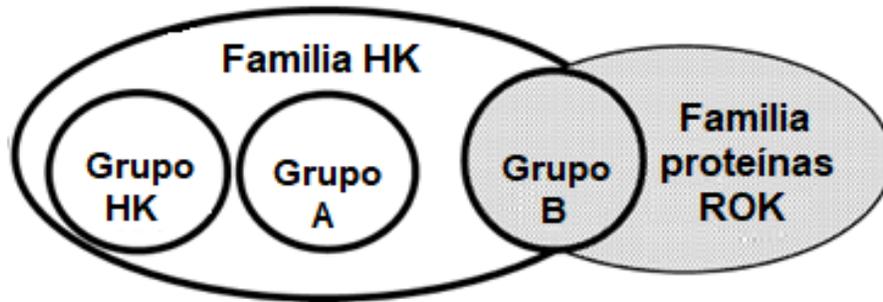


Figura 3. Subdivisión de las glucosa cinasas de la familia HK. Tomado y modificado de Kawai *et al.*, 2005

Por su parte Lunin *et al.*, propusieron otra clasificación de las glucosa cinasas microbianas basada en la comparación de sus estructuras primarias agrupándolas en tres familias distintas (Lunin *et al.*, 2004). La familia I (Pfam: PF04587) está formada por aproximadamente 200 secuencias de Glks que provienen de arqueas y de eucariontes. Las Glks de esta familia se caracterizan porque únicamente utilizan ADP como donador de grupo fosfato (Lunin *et al.*, 2004; Romero-Rodríguez *et al.*, 2015).

La familia II (Pfam: PF02685) contiene aproximadamente 1500 secuencias de proteínas completas o parciales, de las cuales la mayoría provienen de las cianobacterias y proteobacterias. Los miembros de esta familia se caracterizan porque únicamente utilizan ATP como donador de grupo fosfato y porque no poseen la firma de la familia de proteínas ROK (Lunin *et al.*, 2004; Romero-Rodríguez *et al.*, 2015).

Por último, en la familia III (Pfam: PF00480) se agrupan las Glks de los organismos eucariontes, arqueas y bacterias (principalmente organismos Gram positivos) que utilizan el ATP como donador de grupo fosfato y que además presentan la firma de la familia de proteínas ROK (Lunin *et al.*, 2004; Romero-Rodríguez *et al.*, 2015).

2.8 Participación de las Glks durante la sobreproducción de metabolitos secundarios

En el genoma de diferentes estreptomicetos se ha identificado que se encuentran codificadas dos tipos diferentes de Glks: una dependiente de ATP y otra dependiente de polifosfato. Específicamente, lo anterior ha sido observado en *S. aureofaciens*, *S. peucetius* var. *caesius* y muy recientemente en *S. coelicolor*.

La participación de estas Glks dependientes de polifosfato en el metabolismo de los estreptomicetos que las expresan no es del todo claro; Sin embargo, algunos reportes han sugerido que la actividad de la Pp-Glk podría estar relacionada con la sobreproducción de metabolitos secundarios.

El primer estudio donde se observó esta relación fue realizado por Hostalek *et al.*, quienes observaron que en una cepa sobreproductora de clortetraciclina de *S. aureofaciens* se expresa una ATP-Glk que es principalmente activa durante la fase logarítmica de crecimiento (Figura 4A y E) y también expresa una Pp-Glk que es principalmente activa durante la fase estacionaria de crecimiento (figura 4B y E), presentando además un patrón de comportamiento muy similar al observado en la curva de producción de la clortetraciclina (figura 4D) lo que de acuerdo a los autores, podría sugerir que ambos fenómenos están íntimamente relacionados. Además, observaron que los niveles de ATP intracelular (figura 4C) se encontraban en niveles muy bajos durante la producción de la clortetraciclina, coincidiendo con el hecho de que en ese momento la ATP-Glk prácticamente no presenta actividad. Por lo anterior, los autores propusieron que cada Glk parece desempeñar un papel fisiológico diferente en este microorganismo y que la actividad de la Pp-Glk parece estar relacionada directamente con la sobreproducción de la clortetraciclina (Hošťálek *et al.*, 1976).

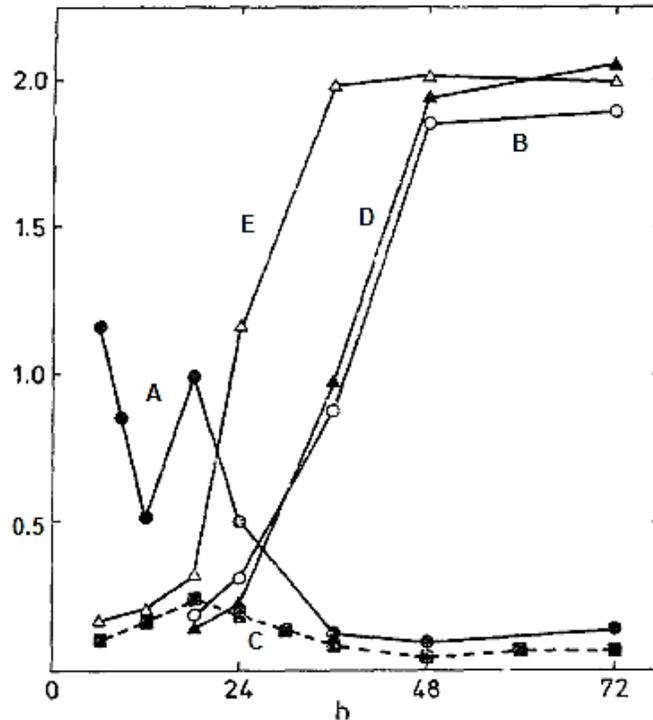


Figura 4. Diferentes estudios realizados en *S. aureofaciens*. Cinética de actividad ATP-Glk (Curva A, nmol P/min*mg proteína x 0.02) y Pp-Glk (Curva B, nmol P/min*mg proteína x 0.02); Niveles de ATP intracelular (Curva C, $\mu\text{g/mL}$); Cinética de producción de clortetraciclina (Curva D, mg/mL); Crecimiento celular (Curva E, mg/mL x 4). Tomado de Hošťálek *et al.*, 1976.

Resultados similares han sido reportados para *S. peucetius* var. *caesius*, que es una cepa sobreproductora de antraciclinas. Ruiz-Villafán *et al.*, observaron que este microorganismo expresa una ATP-Glk que es principalmente activa durante la fase exponencial de crecimiento (Figura 5A y C) y a su vez, también se expresa una Pp-Glk que es principalmente activa durante la fase estacionaria de crecimiento (Figura 5B y C) y que presenta además el doble de actividad en comparación con la ATP-Glk.

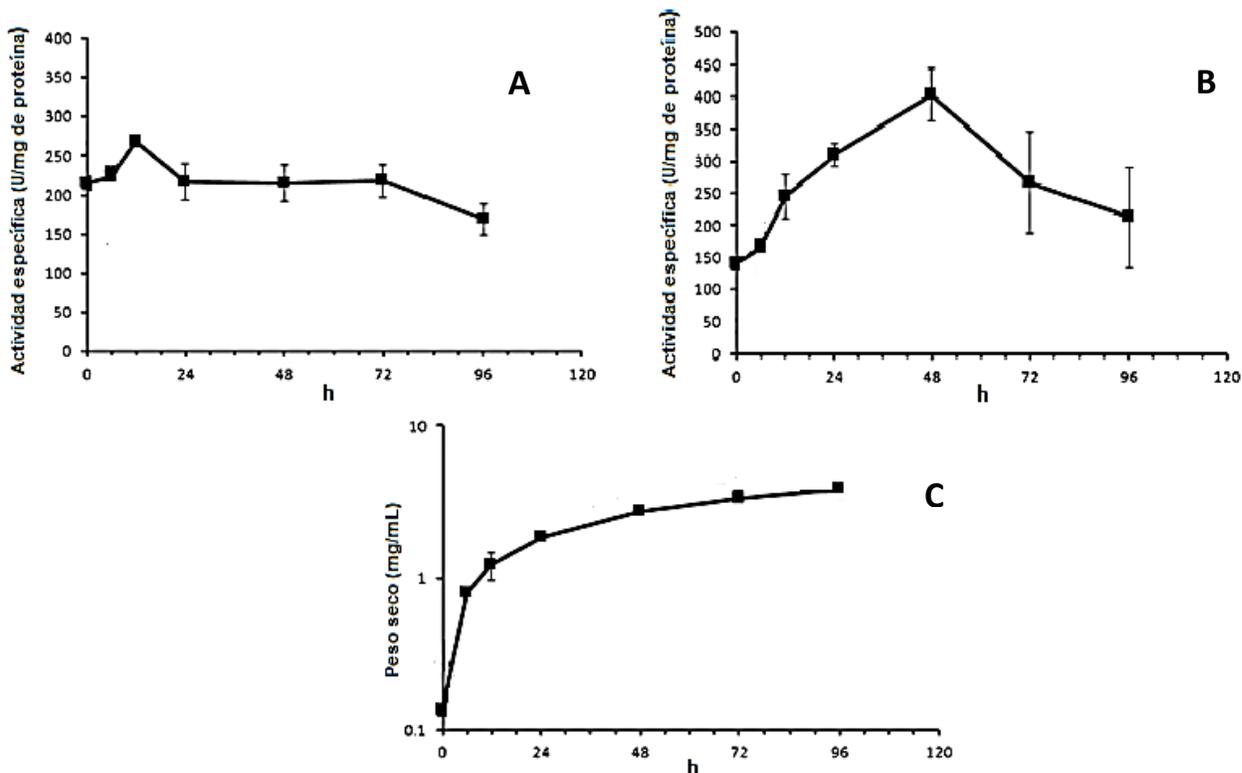


Figura 5. Cinética de actividad Glk en *S. peucetius* var. *caesius*. (A) Actividad ATP-Glk; (B) Actividad Pp-Glk; (C) Crecimiento celular. Tomado y modificado de Ruiz-Villafán *et al.*, 2014.

Por otra parte, estos mismos autores también compararon el comportamiento de ambas Glks en *S. peucetius* var. *caesius* y en su cepa parental *S. peucetius*, observando que en el primero de ellos la Pp-Glk presenta 5 veces más actividad y produce 4 veces más antraciclinas respecto a lo observado en *S. peucetius* (Figura 6), por lo que los autores sugirieron que la sobreproducción de antraciclinas en *S. peucetius* var. *caesius* podría estar asociada directamente con la actividad de la Pp-Glk (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

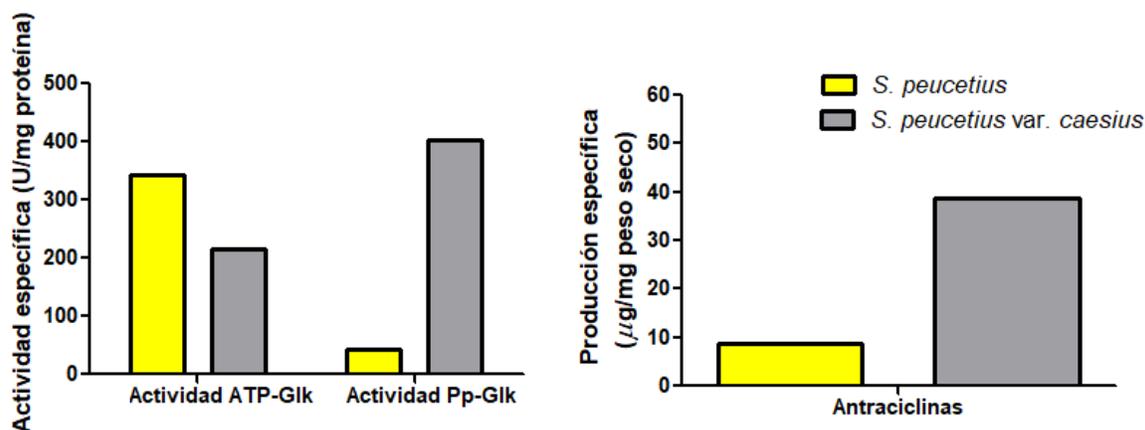


Figura 6. Comparación entre la actividad ATP-Glk, Pp-Glk y producción específica de antraciclina en *S. peucetius* y *S. peucetius var. caesius*. Basado en lo reportado por Ruiz-Villafán *et al.*, 2014.

Por otra parte, los mismos autores determinaron y compararon la actividad de ambos tipos de Glks en otros estreptomicetos filogenéticamente cercanos a *S. peucetius var. caesius* (tabla 3) observando que en casi todas las especies estudiadas la ATP-Glk es la que presenta mayor actividad, siendo la única excepción *S. peucetius var. caesius*, que presenta una mayor actividad Pp-Glk que ATP-Glk, siendo además este microorganismo el único de todos los estudiados en este trabajo que tiene la capacidad de sobreproducir algún metabolito secundario (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

Además, resulta interesante resaltar que existe una gran diferencia entre la actividad que presenta la Pp-Glk en *S. peucetius var. caesius* (403 U/mg de proteína) con respecto a todos los demás estreptomicetos estudiados (<50 U/mg de proteína) (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

Tabla 3. Actividad ATP-Glk y Pp-Glk en diferentes estreptomicetos.

Microorganismo	Actividad específica ATP-Glk (U/mg proteína)	Actividad específica Pp-Glk (U/mg proteína)
<i>S. peucetius var. caesius</i>	215.02 ± 22.74	403.29 ± 40.25
<i>S. peucetius</i>	344.31 ± 34.73	44.95 ± 2.46
<i>S. coelicolor</i>	154.95 ± 21.99	11.41 ± 0.78
<i>S. lividans</i>	19.08 ± 3.47	5.74 ± 0.67
<i>S. thermocarboxydus K155</i>	34.08 ± 4.31	9.18 ± 3.22

La actividad de ambas Glks se midió a las 48 h de incubación en todas las cepas. Se utilizó medio NDYE con glucosa 100 mM para *S. peucetius*, *S. peucetius var. caesius* y *S. thermocarboxydus K155*. Para *S. coelicolor* y *S. lividans* se utilizó medio NMMP con glucosa 50 mM. Tomado de Ruiz-Villafán *et al.*, 2014.

A la fecha, la Pp-Glk es una proteína muy poco estudiada en los estreptomicetos. Sin embargo, se ha reportado que otros actinomicetos también expresan este tipo de Glk, como *Mycobacterium phlei* (Szymona y Ostrowski, 1964) que fue el primer microorganismo en el que se encontró este tipo de enzima. Actualmente, la Pp-Glk también se ha reportado en *Nocardia minima* (Szymona y Szymona, 1979), *M. tuberculosis* (Hsieh *et al.*, 1993), *Propionibacterium shermanii* (Pepin y Wood, 1986) *Arthrobacter* sp. cepa KM (Mukai *et al.*, 2003) y *C. glutamicum* (Lindner *et al.*, 2010).

En todos los casos anteriores, se determinó que dicha enzima puede utilizar tanto Pp como ATP como moléculas donadoras de grupo fosfato y de esa manera poder llevar a cabo la fosforilación de la glucosa. En cambio, en *Mycococcus coralloides* (González *et al.*, 1990) y en *Microlunatus phosphovorius* (Tanaka *et al.*, 2003) se ha reportado que la Pp-Glk que expresan únicamente utiliza el Pp como donador de grupo fosfato.

2.9 Tipos de Glks en *S. coelicolor*

De acuerdo con la base de datos StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>), en el genoma de *S. coelicolor* se encuentran anotados tres genes cuyo producto de expresión corresponde a una glucosa cinasa (tabla 4). De ellos, dos ya han sido estudiados y caracterizados: el gen *sco2126*, que codifica una ATP-Glk y el gen *sco5059*, que codifica una Pp-Glk. En tanto, el gen *sco0063* solamente se encuentra anotado y su producto de expresión no ha sido caracterizado todavía. Adicionalmente, en el genoma se encuentran anotados otros genes cuyos productos de expresión son probables azúcar cinasas, por lo que también podrían tener la capacidad para fosforilar la glucosa (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

Tabla 4. Genes de *S. coelicolor* que codifican proteínas con/probable actividad Glk

Gen	Producto
<i>sco2126</i>	ATP-Glk
<i>sco5059</i>	Pp-Glk
<i>sco0063</i> *	Probable Glk
<i>sco1077</i> *	Probable azúcar cinasa
<i>sco2846</i> *	Probable regulador transcripcional
<i>sco6110</i> *	Probable azúcar cinasa
<i>sco6260</i> *	Probable azúcar cinasa
<i>sco6566</i> *	Probable miembro de la familia de proteínas ROK

*La información corresponde a lo reportado en la base de datos de la página StrepDB <http://strepdb.streptomyces.org.uk>.

De todos los genes mencionados anteriormente, el gen *sco2126* es el más importante porque codifica una ATP-Glk que ha sido señalada como la principal Glk responsable de participar en el catabolismo de la glucosa en este microorganismo, ya que las mutantes del gen Δ *sco2126* pierden la capacidad para metabolizar dicho carbohidrato (Angell *et al.*, 1994; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a).

La ATP-Glk ha sido caracterizada cinética y bioquímicamente (Imriskova *et al.*, 2004) y se ha identificado que está formada por cuatro subunidades idénticas de 33.1 kDa cada una y que se expresa de manera constitutiva. Además, la ATP-Glk ha sido ampliamente estudiada por su función regulatoria en el mecanismo de RCC como se describió anteriormente en la sección 2.6.

Por otra parte, recientemente en un estudio de proteómica Gubbens *et al.*, detectaron la expresión del gen *sco5059*, que es responsable de codificar una Pp-Glk en *S. coelicolor* (Gubbens *et al.*, 2012).

Posteriormente, Koide *et al.*, expresaron de manera heteróloga dicho gen en *E. coli* y lograron purificar la Pp-Glk para su caracterización cinética y bioquímica (tabla 5), encontrando que esta proteína se encuentra oligomerizada y que cada subunidad tiene un tamaño de 28 kDa. Además, determinaron que esta Glk aparte de utilizar polifosfato, también es capaz de utilizar el ATP como donador de grupo fosfato, siempre y cuando se encuentre en concentraciones mayores de 1.5 mM (Koide *et al.*, 2013).

Tabla 5. Caracterización cinética y bioquímica de las Glks en *S. coelicolor*

Parámetro	ATP-Glk	Pp-Glk
Peso por subunidad	33 kDa	28 kDa
Km (Glucosa)	0.610 mM	12 μ M
Km (ATP)	0.500 mM	ND
Km (Pp)	ND	4 μ M
pH óptimo de actividad	7.6	9.5-10
Temperatura optima de actividad	33°C	28°C

Los datos referentes a la Pp-Glk corresponden a lo reportado por Koide *et al.*, 2013; los datos de la ATP-Glk corresponden a lo reportado por Imriskova *et al.*, 2004. ND: No determinado.

Sin embargo, Ruiz-Villafán *et al.*, encontraron que la Pp-Glk tiene una actividad muy baja en *S. coelicolor* (Figura 7) ya que apenas presenta el equivalente al 10% de actividad en comparación con la ATP-Glk (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014). Lo anterior, concuerda muy bien con los reportes donde se ha encontrado que la ATP-Glk es la principal Glk responsable de llevar a cabo la fosforilación de la glucosa en *S. coelicolor*, ya que su ausencia provoca la incapacidad para metabolizar dicho carbohidrato (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a), por lo que se sugiere que la Pp-Glk es incapaz de sostener el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono probablemente por su baja expresión o bien, por la pobre actividad que presenta.

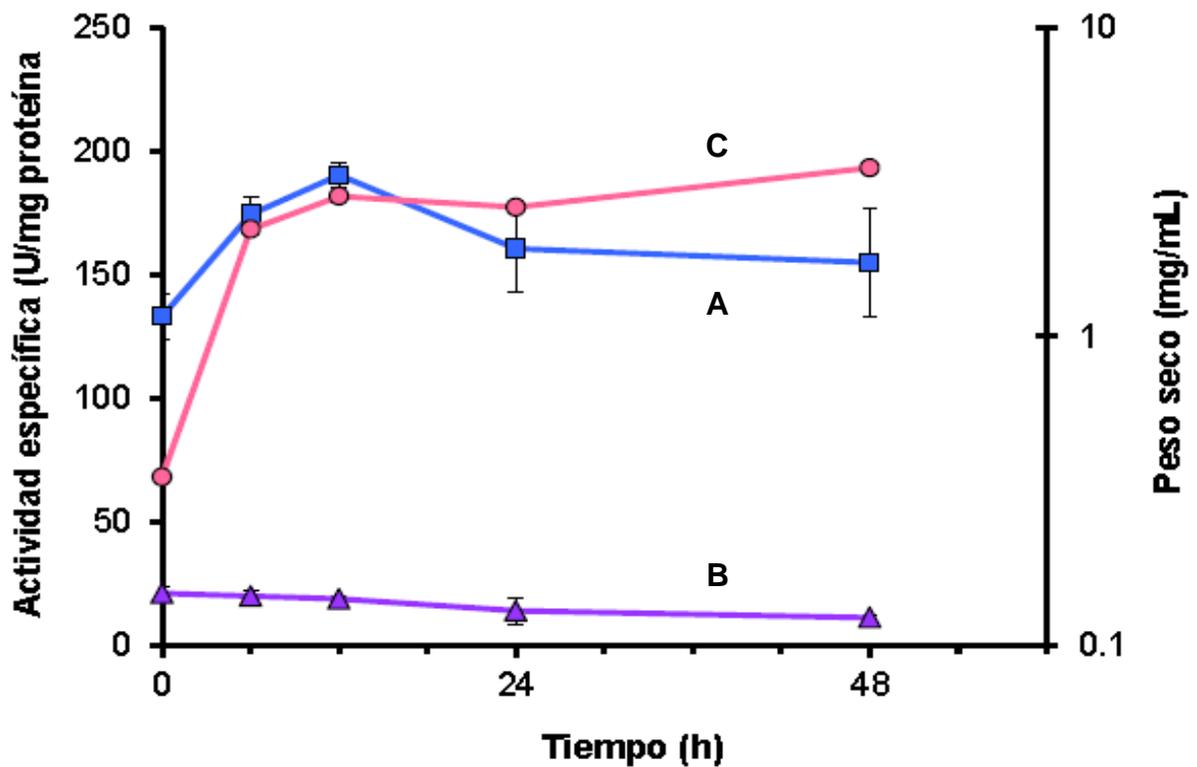


Figura 7. Cinética de actividad **A.** ATP-Glk y **B.** Pp-Glk en *S. coelicolor*. **C.** Crecimiento celular. Tomado de Ruiz-Villafán *et al.*, 2014.

3. Justificación

Las glucosa cinasas son enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa y que se encargan de catalizar la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato. En el género *Streptomyces* además de llevar a cabo dicha función, se ha propuesto que las Glks parecen estar implicadas en otros procesos muy importantes como la regulación del mecanismo de represión catabólica por carbono o en la sobreproducción de metabolitos secundarios; en este último caso, se ha señalado que la Pp-Glk parece estar relacionada con este fenómeno. Sin embargo, pocos trabajos se han enfocado a estudiar dicha enzima en los estreptomicetos y escasos conocimientos se tienen sobre el papel y la importancia que ésta tiene en los mismos.

No obstante, sólo en algunos estreptomicetos sobreproductores de metabolitos secundarios se expresa una Pp-Glk altamente activa. Por lo que es de nuestro interés estudiar el efecto que causa la expresión de una Pp-Glk proveniente del microorganismo sobreproductor de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius* sobre el metabolismo de una cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor*.

4. Hipótesis

La enzima Pp-Glk es activa en *S. peucetius* var. *caesius* y al ser *S. coelicolor* un miembro del mismo género, se espera que al expresar dicha enzima en una cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* también sea funcional y le permita restablecer el crecimiento en medio con glucosa como única fuente de carbono y afecté positivamente la producción de antibióticos.

Sin embargo, se espera que el mecanismo de represión catabólica por carbono continúe desregulado en *S. coelicolor* aún al expresar la Pp-Glk, como resultado de la ausencia de la ATP-Glk y de la regulación que ejerce sobre dicho mecanismo.

5. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto que causa la expresión de una glucosa cinasa dependiente de polifosfato proveniente de *S. peuceetius* var. *caesius* sobre el metabolismo de una cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor*.

Objetivos particulares

- Determinar si la expresión de la Pp-Glk es capaz de restablecer el consumo de glucosa en la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* y evaluar su efecto sobre el metabolismo primario.
- Evaluar el efecto generado por la expresión de la Pp-Glk sobre el metabolismo secundario de *S. coelicolor*
- Evaluar si la Pp-Glk participa en el mecanismo de represión catabólica por carbono en este microorganismo.
- Comprobar si la expresión de la Pp-Glk tiene alguna repercusión sobre la morfología de las colonias de *S. coelicolor*.

6. Materiales y métodos

6.1 Esquema de la metodología experimental empleada

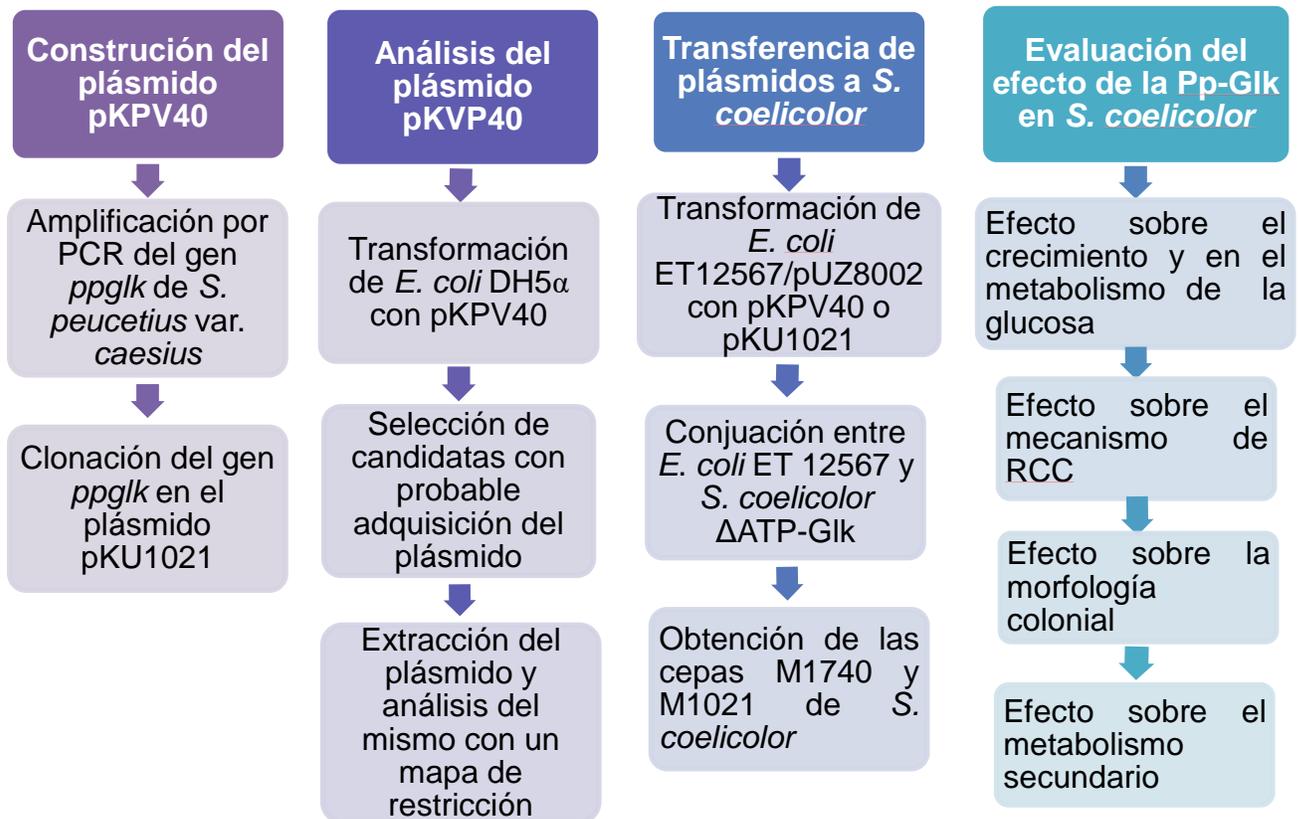


Figura 8. Diagrama general de la metodología experimental

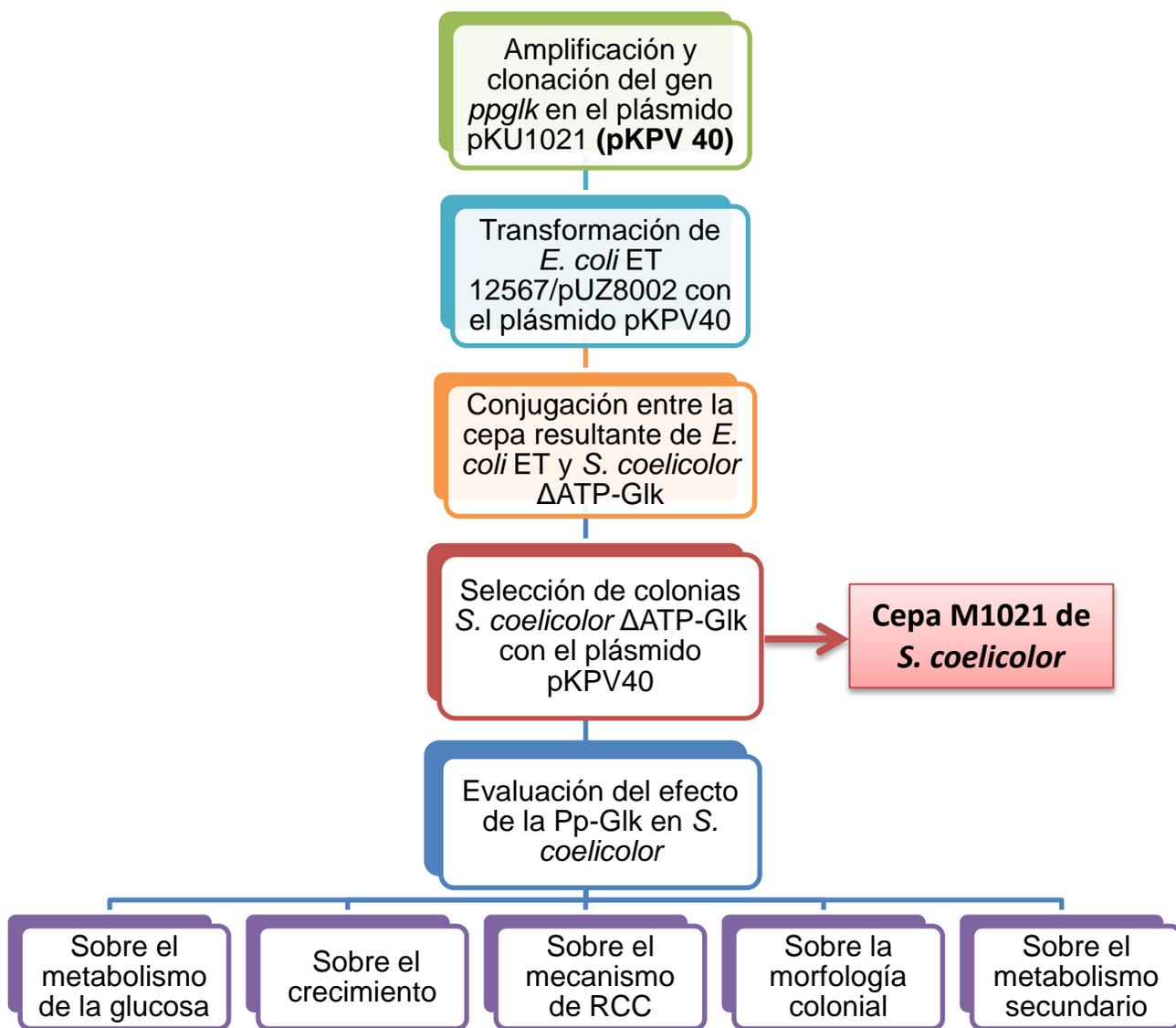


Figura 9. Diagrama resumido de la metodología experimental

6.2 Cepas y plásmidos utilizados

Cepas empleadas	Características u observaciones
<i>E. coli</i> DH5 α	Es una cepa comercial que se utilizó para procedimientos de clonación de rutina por su alta eficiencia de transformación.
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Es una cepa deficiente en el sistema de metilación (<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM Cm^R</i>) que contiene además el plásmido pUZ8002 que contiene el sistema para realizar el proceso de conjugación intergenérica (<i>tra, neo, RP4</i>) con otros microorganismos. Por lo anterior, dicha cepa se utilizó para generar DNA no metilado y poder transferirlo a <i>S. coelicolor</i> mediante el proceso de conjugación.
<i>S. coelicolor</i> M145	Cepa (SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻) obtenida a partir del centro John Innes (Norwich, Reino Unido).
<i>S. coelicolor</i> Δ ATP-Glk	Cepa (SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>glkA::aacc4</i>) proporcionada por la Dra. Alba Romero y que se derivó a partir de la cepa M145 intercambiando el gen <i>sco2126</i> por un cassette de resistencia a apramicina mediante la técnica de PCR targeting (Romero-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016a).
<i>S. coelicolor</i> M1740	Cepa generada en el presente estudio a partir de la cepa Δ ATP-Glk. Contiene el plásmido pKPV40.
<i>S. coelicolor</i> M1021	Cepa generada en el presente estudio a partir de la cepa Δ ATP-Glk. Contiene el plásmido pKU1021.
Plásmidos empleados	Características u observaciones
pKU1021	Plásmido que tiene la capacidad de integrarse en el genoma de los estreptomicetos y otorga resistencia a kanamicina y gentamicina.
pKPV40	Plásmido generado en el presente estudio, a partir de la clonación del gen <i>ppglk</i> de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> en el plásmido pKU1021.

Todas las cepas de *S. coelicolor* se almacenaron como suspensiones concentradas de esporas en glicerol 20% (v/v) a -20°C.

6.3 Medios y condiciones de crecimiento

Se utilizó medio LB para los procedimientos con *E. coli* y se emplearon como antibióticos de selección kanamicina, gentamicina y cloranfenicol a concentraciones de 50, 10 y 25 μ g/mL respectivamente.

Se utilizó el medio MS para realizar el procedimiento de conjugación intergenérica entre la cepa de *E. coli* ET 12567 y esporas de la cepa Δ ATP-Glk de *S. coelicolor*.

A su vez, también se utilizó medio DNA para identificar las colonias ex-cojugantes de *S. coelicolor* que integraron exitosamente alguno de los plásmidos (pKU1021 o pKPV40).

Para la determinación cualitativa de la actividad de la Pp-Glk se utilizó medio PBG agar que contiene el indicador de pH púrpura de bromocresol. En la caja se inoculó una colonia de la cepa M1740, una de la cepa M1021 y una de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. La caja se incubó a 29°C durante 72 h y se revisó de manera constante para detectar un cambio en el vire del indicador de morado a amarillo, lo que es indicativo del consumo de glucosa.

En la determinación cuantitativa de la actividad de la Pp-Glk se utilizó medio líquido MM con glucosa [100 mM]. Cada matraz con 50 mL de medio se inoculó con 10 µL del stock de esporas de cada cepa individualmente. Los matraces se incubaron a 29°C durante 48 h en agitación constante.

Para las curvas de crecimiento y las determinaciones de actividad amilolítica, cinética de almidón residual, producción específica de actinorrodina y undecilprodigosina, se utilizó medio líquido NMMP con almidón 1% (m/v) y medio NMMP con almidón 1% (m/v) + glucosa [100 mM]. Se tomaron 10 µL del stock de esporas en glicerol 20% de cada cepa y se preparó una dilución 1:25 utilizando medio NMMP con almidón 1% (m/v); se pre-germinaron las esporas durante 10 minutos a 50°C. Cada matraz con 50 mL de medio se inoculó de manera independiente con 250 µL de esporas pre-germinadas. Los matraces se incubaron a 29°C durante 7 días en agitación constante.

Para determinar el efecto de la represión catabólica por carbono sobre la actividad de agarasa, se tomaron 5 µL del stock de esporas de cada cepa y se preparó una dilución 1:50 con H₂O. De la dilución anterior se tomaron 25 µL y se inocularon en el centro de las cajas de medio MM con y sin glucosa [100 mM] respectivamente. Las cajas se incubaron a 29°C durante 72 h.

Con la finalidad de estudiar la morfología macroscópica colonial se utilizaron cajas de medio R5 y de medio NMMP con almidón 1% o con almidón 1% + glucosa [100

mM]. Se tomaron 10 μ L del stock de esporas de cada cepa y se preparó una dilución 1:50 con H₂O. De la dilución anterior se inocularon 20 μ L en cada caja y se incubaron a 29°C durante 6 días.

6.4 Amplificación del gen *ppgIk* por PCR

La amplificación del gen *ppgIk* se realizó a partir del DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* (propocionado por la Dra. Diana Rocha) utilizando los siguientes cebadores:

A) Forward: (5´-ACGACGTAACGTAGACATATGCAGATCTTCGGC- 3´)

B) Reverse: (5´-ACGGCCTGAGGTCAAGCTTGCGCTAGTGGGTC- 3´)

Las condiciones empleadas durante la reacción de PCR fueron las siguientes:

- a) Un ciclo de desnaturalización inicial a 98°C durante 3 min.
- b) 25 ciclos comenzando con una etapa de desnaturalización a 98°C durante 10s, seguido de una etapa de alineamiento a 60°C durante 10s y una ultima etapa de extensión a 72°C durante 30s.
- c) Un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

6.5 Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa

El producto de PCR generado se verificó por medio de un gel de agarosa al 0.8% para electroforesis y se recuperó utilizando el kit “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System” de la marca Promega empleando las indicaciones proporcionadas en el protocolo del fabricante.

6.6 Construcción del plásmido pKPV40

El plásmido pKU1021 se utilizó en el presente estudio por su capacidad para integrarse en el genoma de los miembros del género *Streptomyces* gracias a que contiene la secuencia *attP* del fago ϕ C31 (ver anexos, figura 22). Tanto el gen *ppgIk* como el plásmido pKU1021 fueron digeridos con la enzima de restricción

HindIII. Posteriormente ambas muestras se purificaron por precipitación con NaCl 1M y etanol absoluto. Las muestras se dejaron precipitar durante 8h a -20°C. Después de ese lapso se procedió a centrifugar las muestras a 15,000 rpm durante 20 min. A continuación se eliminó el sobrenadante en ambas muestras y se adicionó 1 mL de etanol al 70% a cada una. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 15,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, repitiendo los lavados con etanol al 70% dos veces. A continuación, se eliminó el sobrenadante y las muestras se concentraron en el equipo SpeedVac. Posteriormente el plásmido pKU1021 se sometió a una digestión doble utilizando las enzimas *NdeI* y *PstI*, mientras que el gen *ppgIk* solo fue digerido con la enzima *NdeI*. Por último, se realizó la ligación del gen *ppgIk* al plásmido pKU1021 en proporción 1:1 utilizando la enzima DNA Ligasa T4 para generar el plásmido pKPV40.

6.7 Transformación bacteriana por electroporación de células competentes de *E. coli*

Se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido pKPV40 y de manera independiente con el plásmido pKU1021. Después de realizar el proceso de electroporación, se utilizó medio LB con kanamicina como marcador de selección.

6.8 Miniprep por lisis alcalina

Se seleccionaron 4 colonias de *E. coli* DH5 α que presentaban el fenotipo Kan^R y que por ende, presuntamente habían adquirido alguno de los plásmidos y se transfirieron a tubos de ensayo con medio líquido LB con kanamicina para su incubación a 37°C durante 8 h. De cada tubo se tomó un volumen de 1.5 mL de medio y se transfirieron a tubos independientes. A continuación se centrifugaron todos los tubos a 13,000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el pellet de cada tubo con 1 mL de H₂O, centrifugando de nueva cuenta los tubos con las condiciones mencionadas anteriormente y desechando el sobrenadante. Después, el pellet de cada tubo se resuspendió en 150 μ L solución SET + 5 μ L de RNAsa (5 mg/mL). A continuación se agregaron

350 μ L de la solución II (NaOH 1M/ SDS 20%) a cada tubo. Después se dejaron incubando los tubos durante 10 min en hielo. Seguido a esto, se añadieron 250 μ L de la solución III (acetato de sodio 3M, pH: 5.2) a cada muestra y se agitaron los tubos para posteriormente dejarlos incubando durante 15 min en hielo. A continuación se centrifugaron los tubos durante 5 min a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante de cada muestra en un nuevo tubo y se añadieron 800 μ L de isopropanol a cada uno. Se procedió a centrifugar de nueva cuenta los tubos durante 15 min a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. A continuación se agregó 1 mL de etanol al 70% a cada uno y se centrifugaron durante 10 min a 13,000 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada tubo y el pellet de cada muestra se resuspendió en 50 μ L de H₂O y se almacenaron a 4 °C.

Para corroborar la identidad de cada uno de los plásmidos que se obtuvieron a partir de las candidatas seleccionadas, se procedió a digerir las muestras correspondientes al plásmido pKPV40 con las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III, mientras que las muestras del plásmido pKU1021 solo fueron digeridas con la enzima *Hind*III. Posteriormente, cada muestra digerida y no digerida, se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Una vez corroborado que se había generado exitosamente el plásmido pKPV40, se procedió a transformar células competentes de *E. coli* ET 12567/pUZ8002 con cada uno de los plásmidos (pKPV40 o pKU1021) de manera independiente. Después de realizar el proceso de electroporación, se utilizó medio LB con kanamicina + cloranfenicol + gentamicina como marcadores de selección.

6.9 Conjugación intergénica entre *E. coli* ET 12567/pUZ8002 y *S. coelicolor* Δ ATP-GIk

Para realizar este procedimiento se inocularon 5 μ L de la cepa de *E. coli* ET 12567/pUZ8002 con el plásmido pKPV40 o con el plásmido pKU1021 en un tubo de ensayo con medio líquido LB con kanamicina + cloranfenicol + gentamicina y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Al día siguiente, se tomaron 500 μ L del medio y se determinó la densidad óptica a 600 nm (D.O.

$_{600\text{nm}}$). A continuación, se transfirió la cantidad necesaria de inóculo que había que agregar de este cultivo a un matraz con 50 mL de medio LB para obtener una D.O. $_{600\text{nm}}$ inicial de 0.1 y se procedió a incubar el matraz a 37°C con agitación constante hasta obtener un valor de D.O. $_{600\text{nm}}$ de 0.5. Una vez alcanzado este valor, se transfirió todo el volumen de medio LB a un tubo Falcon y se procedió a centrifugarlo a 6,000 rpm durante 5 min; posteriormente se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet tres veces con H₂O utilizando las mismas condiciones para centrifugar; Posteriormente se resuspendió el pellet en 500 µL de medio 2xYT. Por otro lado, se añadieron 10 µL de esporas de *S. coelicolor* ΔATP-Glk a un tubo con 500 µL de medio 2xYT y se realizó un choque térmico incubando a 50°C durante 10 min. Después de este lapso, se dejó enfriar el tubo con las esporas durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se transfirieron los 500 µL de medio 2xYT con las esporas de *S. coelicolor* ΔATP-Glk al tubo con las células de *E. coli* ET 12567/pUZ8002 y se procedió a centrifugar el tubo a 13,000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante; A continuación se resuspendió el pellet con 200 µL de medio 2xYT y se procedió a preparar diluciones seriadas 10⁻¹-10⁻⁴, inoculando cada dilución por duplicado en una caja de medio MS e incubándola a 29°C durante 20 h. Una vez cumplido este lapso, se agregó a cada caja ácido nalidíxico [0.5 mg/mL] y kanamicina [200 µg/mL] con la finalidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* y para seleccionar las exconjugantes de *S. coelicolor* ΔATP-Glk que adquirieron exitosamente alguno de los plásmidos (pKU1021 o pKPV40); A continuación se procedió a incubar las cajas durante 3 días. Las colonias que presentaban el fenotipo Kan^R se transfirieron a cajas de medio DNA con y sin kanamicina a una concentración de [200 µg/mL] para corroborar la resistencia a dicho antibiótico. La cepa de *S. coelicolor* ΔATP-Glk/pKPV40 se denominó M1740, mientras que la cepa *S. coelicolor* ΔATP-Glk/pKU1021 se denominó M1021.

6.10 Determinaciones

a) Crecimiento celular por peso seco

En esta determinación se utilizaron filtros Whatman del No. 1 que se secaron a 100°C durante 48 h para obtener un peso constante. Cumplido este lapso, se determinó el peso de cada filtro y se procedió a filtrar cada muestra (5 mL de medio con micelio) en un sistema de filtración al vacío. Posteriormente los filtros se secaron bajo las mismas condiciones de la primera vez. Transcurridas 48 h, se determinó de nueva cuenta el peso de cada papel filtro.

b) Almidón residual

Para realizar esta determinación se construyó una curva estándar empleando las siguientes concentraciones de almidón soluble: 0%, 0.25%, 0.50%, 1.0%, 2.5%, 5% m/v. Se tomaron 100 µL de cada concentración y se depositaron en tubos de ensayo de manera individual, a continuación se adicionó a cada tubo 2.4 mL de lugol al 4% v/v. Seguido a esto se agitó vigorosamente cada tubo y se determinó la absorbancia a 620 nm.

La absorbancia de las muestras se determinó de la misma forma pero utilizando 100 µL de sobrenadante de cada muestra tomada en diferentes tiempos de incubación. La concentración de almidón residual se determinó por intrapolación utilizando los datos de la curva patrón.

c) Actividad amilolítica

La actividad amilolítica se determinó por un método espectrofotométrico a 405 nm cuantificando la producción de p-nitrofenol a partir de la hidrólisis del compuesto 4-nitrofenil-1,4- α -D-maltoheptáosido mediante una reacción acoplada con la enzima α -glucosidasa, utilizando los reactivos del kit Amilasa (AMY) de la marca Randox. La reacción se llevó a cabo utilizando 500 µL de reactivo + 100 µL de sobrenadante de cada muestra. La absorbancia del p-nitrofenol se determinó cada minuto durante un lapso de 10 min a 37° C. Para determinar la actividad amilolítica se utilizó el coeficiente de extinción molar de 18.5 mM⁻¹ cm⁻¹.

d) Actividad agarolítica

Para determinar la actividad agarolítica se añadió 1 mL de lugol concentrado a las cajas de medio MM y se esperó durante 10 min a que se visualizará el halo generado por la actividad de la enzima. Posteriormente se midió el diámetro de la colonia y del halo que ésta había formado. La actividad agarolítica se determinó de manera indirecta mediante la relación del diámetro halo/colonia para cada cepa a las 72 h de incubación.

e) Cuantificación de la producción de actinorrodina

La cuantificación de actinorrodina total se realizó mezclando el sobrenadante de cada muestra con KOH 3N en proporción 1:1. A continuación se agitó vigorosamente la mezcla anterior y se midió la absorbancia de cada muestra a 640 nm. La concentración de actinorrodina se determinó mediante la ley de Lambert-Beer utilizando un coeficiente de extinción molar de $25,320 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ de acuerdo a lo reportado por Bystrykh *et al.*, 1996.

f) Cuantificación de la producción de undecilprodigiosina

La cuantificación de undecilprodigiosina se determinó añadiendo a cada muestra de micelio previamente seco 1 mL de metanol ácido (pH 3) y se dejó en agitación constante a 180 rpm durante 24 h. Posteriormente se determinó la absorbancia de la muestra a 530 nm. La concentración de undecilprodigiosina en la muestra se determinó mediante la ley de Lambert-Beer utilizando un coeficiente de extinción molar de $100,500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ de acuerdo a lo reportado por Strauch *et al.*, 1991.

g) Evaluación de la morfología colonial macroscópica

Las cajas de medio NMMP con almidón 1% m/v o con almidón 1% m/v + glucosa [100 mM] junto a las cajas de medio R5 se incubaron a 29°C y se monitorearon cada 24 h durante un lapso de 6 días observándose en el microscopio estereoscópico el desarrollo morfológico de las colonias de cada cepa en los diferentes medios.

7. Resultados

a) Amplificación y clonación del gen *ppgIk* de *S. peucetius* var. *caesius* en el plásmido integrativo pKU1021

Con la finalidad de estudiar el efecto que causa la expresión de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* sobre el metabolismo de *S. coelicolor*, se procedió en primera instancia a amplificar por PCR el gen *ppgIk* a partir de una muestra de DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius*. El producto de PCR generado se analizó en un gel de agarosa al 0.8%. En la figura 10A (carril 2) se observa una banda que corresponde al gen *ppgIk* con un tamaño de 755 pb.

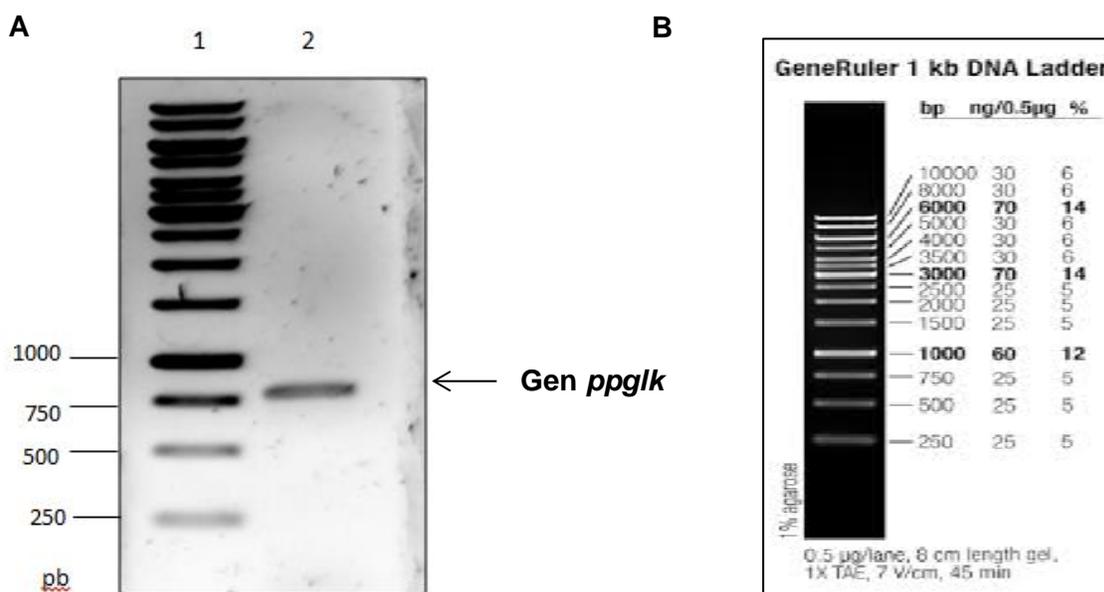


Figura 10. **A.** Amplificación por PCR del gen *ppgIk* a partir del DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius*; Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb™ Thermo Fisher Scientific. Carril 2: producto de PCR correspondiente al gen *ppgIk* con un tamaño de 755 pb. **B.** Bandas del marcador molecular Gene Ruler 1kb™.

Seguido a esto, se procedió a purificar y clonar el gen *ppgIk* en el plásmido pKU1021 para generar así el plásmido pKPV40 de acuerdo a lo estipulado en la metodología. Como se mencionó anteriormente, se eligió el plásmido pKU1021 por su capacidad para integrarse en el genoma de los miembros del género *Streptomyces* mediante el sitio *attP* del fago ϕ C31. El gen *ppgIk* fue clonado en el

plásmido pKU1021 entre los sitios de restricción *NdeI* y *HindIII* y su expresión quedo bajo el control del promotor constitutivo *rpsJ* que viene incluido en el plásmido (Figura 11). La clonación en este plásmido permite la integración del gen en un número controlado de copias.

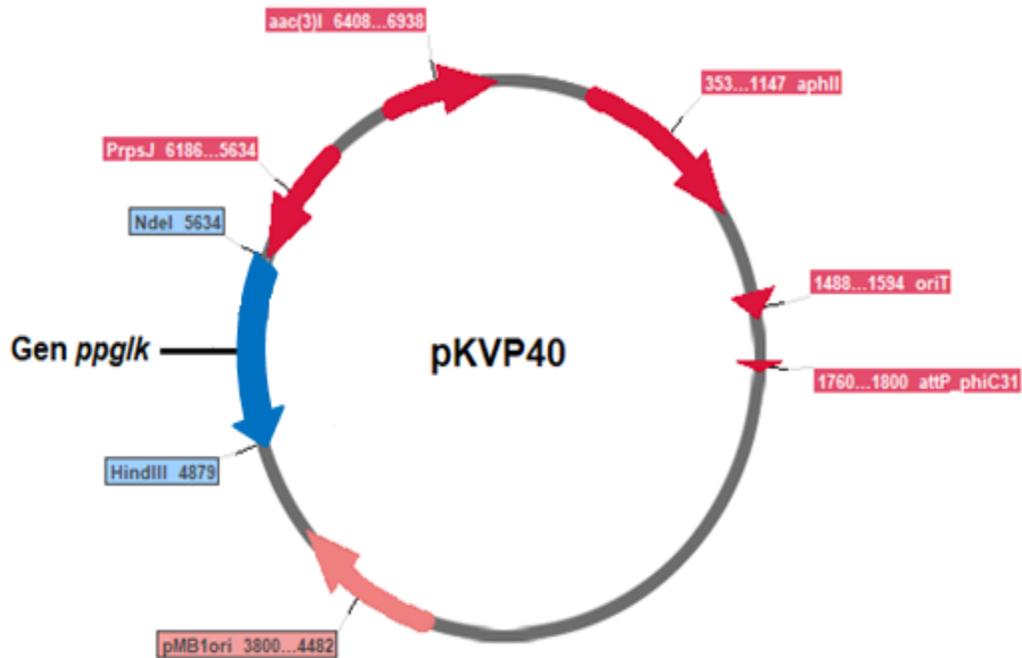
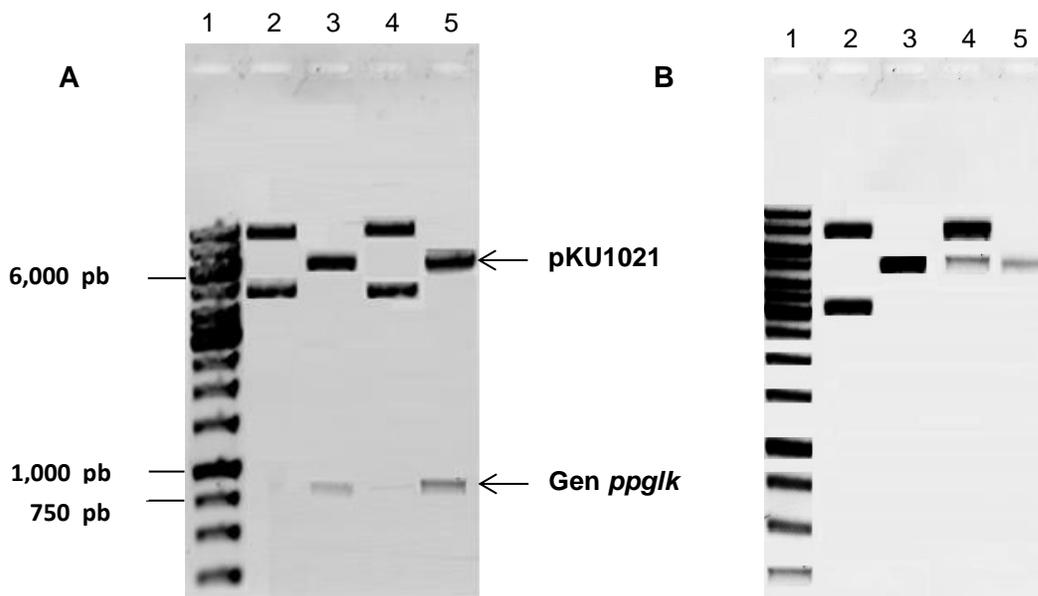


Figura 11. Mapa de la construcción pKPV40. En color azul se representa el sitio de clonación del gen *ppgIk* y en color rojo se representan otros genes o secuencias de interés. La expresión del gen *ppgIk* quedo bajo control del promotor del operón *rpsJ*. El gen *aac(3)I* codifica una aminoglucósido N-acetiltransferasa que otorga resistencia a gentamicina. El gen *aphIII* codifica una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa que otorga resistencia a kanamicina. La secuencia *oriT* indica el sitio de origen de la transferencia durante el proceso de conjugación. La secuencia *attP* corresponde al sitio de unión del fago ϕ C31. El sitio pMB1ori indica el sitio de origen de replicación del plásmido.

Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido pKPV40 y de manera independiente con el plásmido pKU1021 (como control de transformación). De las colonias resultantes, se seleccionaron 4 candidatas para cada uno de los plásmidos y se realizó la extracción de los mismos mediante lisis alcalina. Las muestras correspondientes al plásmido

pKPV40 se digirieron con las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI*, mientras que las muestras referentes al plásmido pKU1021 se digirieron únicamente con la enzima *HindIII*. Cada muestra digerida y sin digerir fue analizada en un gel de agarosa 0.8%. En el caso de la digestión del plásmido pKPV40 se esperaba observar 2 bandas: una correspondiente al plásmido linealizado pKU1021 (aprox. 6,200 pb) y otra correspondiente a la liberación del gen *ppgIk* (755 pb), mientras que en el caso del control pKU1021 solamente se esperaba observar una banda de aprox. 6,200 pb. En la figura 12A (carril 3 y 5) se puede observar que las muestras 1 y 2 presentan las dos bandas esperadas de la digestión del plásmido pKPV40, mientras que en la figura 12B (carril 3 y 5) se puede observar que las muestras 3 y 4 solo presentan la banda correspondiente al plásmido pKU1021 pero no la banda correspondiente al gen, por lo que éstas últimas se descartaron.



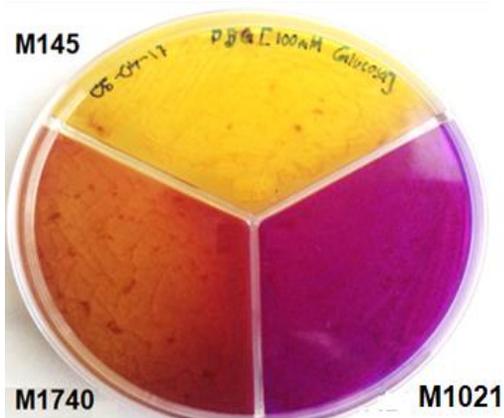
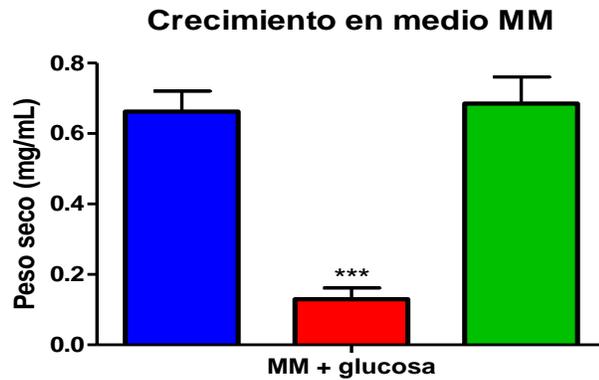
Posteriormente se procedió a transformar células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido pKPV40 y de manera independiente con el plásmido pKU1021. Seguido a esto, se llevó a cabo la conjugación intergénica entre las cepas de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido pKPV40 o pKU1021 y esporas de la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* para generar así las cepas M1740 y M1021 respectivamente, de acuerdo a lo estipulado en la metodología.

b) Evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad de la Pp-Glk

Para comprobar si la cepa M1740 era capaz de expresar el gen *ppgIk* proveniente de *S. peucetius* var. *caesius*, se decidió verificar si dicha cepa había recuperado la capacidad para metabolizar glucosa gracias a la actividad de la enzima. Para tal fin, se utilizó medio PBG agar. En la misma caja se inocularon las cepas M1740, M1021 y la cepa silvestre M145 de *S. coelicolor*.

En la figura 13A se puede observar que tanto la cepa M145 y la cepa M1740 hicieron virar el color del indicador de púrpura a amarillo, lo que es indicativo de que ambas cepas son capaces de metabolizar la glucosa, a diferencia de la cepa M1021 que como era de esperarse, no produjo un cambio en el vire del indicador.

Posteriormente, se procedió a comparar cuantitativamente el crecimiento de la cepa M1740, el de la cepa silvestre M145 y el de la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* en medio mínimo MM con glucosa [100 mM] como única fuente de carbono. Como se esperaba, se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa nula ATP-Glk en comparación con el crecimiento de la cepa M145 (figura 13B). Sin embargo, la expresión de la Pp-Glk restauró exitosamente el consumo de glucosa en la cepa M1740, reflejándose en que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de esta cepa respecto al de la cepa silvestre M145.

A**B**

M145
 ΔATPGlk
 M1740

Figura 13. **A.** Prueba cualitativa de utilización de la glucosa en medio BPG. Determinación realizada a las 48 h de incubación. **B.** Crecimiento de las cepas M145, ΔATP-Glk y M1740 en medio MM con glucosa [100 mM] determinado por peso seco a las 48 h de incubación. La determinación se hizo por duplicado para cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($P < 0.05$) vs cepa M145. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (***)

c) Evaluación del efecto de la actividad de la Pp-Glk sobre el metabolismo primario

Una vez determinado que la cepa M1740 había recuperado la capacidad para metabolizar glucosa por la actividad de la Pp-Glk, se decidió evaluar a continuación el efecto que ésta tenía sobre el metabolismo primario. Para ello, se realizó una curva de crecimiento para las cepas M1740, M145 y ΔATP-Glk en medio NMMP con almidón 1% (m/v) y con almidón 1% (m/v) + glucosa [100 mM].

En la figura 14A se puede observar que en el medio NMMP con almidón las cepas M145 y M1740 presentan niveles de crecimiento muy similares a lo largo del tiempo, a diferencia de la cepa ΔATP-Glk que tuvo un crecimiento inferior respecto a las otras cepas, como consecuencia de su incapacidad para metabolizar la glucosa generada de la hidrólisis del almidón. En este medio, la cepa M1740 entró a la fase estacionaria a las 72 h, mientras que la cepa M145 lo hizo a las 48 h; En el caso de la cepa nula ATP-Glk no se evidenció tan claramente las fases de crecimiento celular debido al pobre crecimiento que presenta.

En el medio NMMP con almidón y glucosa (figura 14B) se puede apreciar que la cepa M145 y M1740 presentaron niveles de crecimiento muy similares a partir de las 36 h. En cambio, la cepa Δ ATP-Glk presentó menores niveles de crecimiento en todos los tiempos en comparación con las otras cepas. En este medio, las cepas M145 y M1740 entraron a la fase estacionaria a partir de las 72 h, mientras que para la cepa nula ATP-Glk nuevamente no se evidenciaron claramente las fases de crecimiento celular por el pobre crecimiento de dicha cepa.

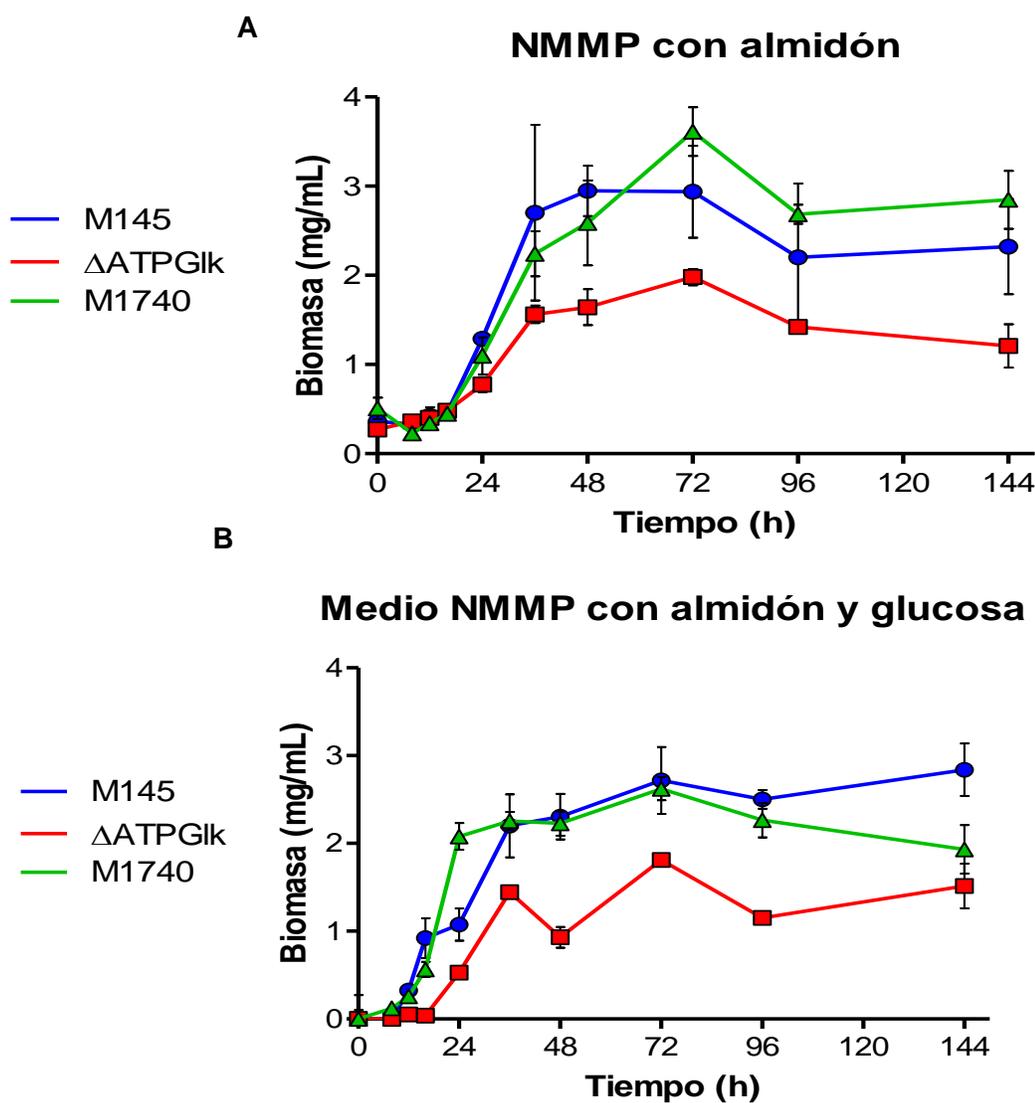


Figura 14. Crecimiento de las cepas \bullet M145, \blacksquare Δ ATP-Glk y \blacktriangle M1740. **A.** medio NMMP con almidón 1% (m/v). **B.** Medio NMMP con almidón 1% (m/v) y glucosa [100 mM]. El crecimiento se determinó por peso seco. Cada medición se realizó por duplicado a partir dos muestras biológicas diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar de cada medición.

Por otra parte, resulta interesante resaltar que en el caso del medio NMMP con almidón las 3 cepas presentaron una fase de latencia hasta las 16 h de incubación, momento en el que se evidenció el final de dicha fase y el comienzo de la fase logarítmica. En cambio, en el medio NMMP con almidón y glucosa las cepas M1740 y M145 presentaron una fase de latencia hasta las 12 h, lo que demuestra que gracias a la presencia de la glucosa en el medio, ambas cepas fueron capaces de entrar a la fase logarítmica en menor tiempo en comparación con el medio que solo tiene almidón.

Todo lo anterior evidencia que la expresión de la Pp-Glk en la cepa M1740 restablece exitosamente el catabolismo de la glucosa y restaura los niveles de crecimiento de la cepa nula ATP-Glk a los niveles de la cepa silvestre M145.

d) Sensibilidad de la actividad amilolítica a represión catabólica por carbono

Para continuar con la evaluación del efecto de la Pp-Glk sobre el metabolismo primario de *S. coelicolor*, se decidió probar si dicha enzima tenía alguna participación en el mecanismo RCC en la cepa M1740.

Con este fin, se procedió a determinar la actividad amilolítica en condiciones represoras y no represoras, ya que se sabe que dicha actividad es sensible a represión catabólica por glucosa en *S. coelicolor* (Virolle y Bibb, 1987), por lo que se determinó la actividad amilolítica en las cepas M145, M1740 y Δ ATP-Glk en medio NMMP con almidón 1% (condiciones no represoras) y en medio NMMP con almidón 1% y glucosa [100 mM] (condiciones represoras).

En la figura 15 se puede apreciar que en condiciones no represoras la actividad amilolítica de las cepas M145, M1740 y Δ ATP-Glk fueron de 0.746, 0.962 y 1.060 nmol/min*ml respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre ellas. En cambio, bajo condiciones represoras la cepa Δ ATP-Glk presentó una actividad enzimática de 1.856 nmol/min*ml, que fue significativamente superior en comparación con las otras cepas. Por su parte, las cepas M145 y M1740 presentaron una actividad de 1.157 y 1.135 nmol/min*ml respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas.

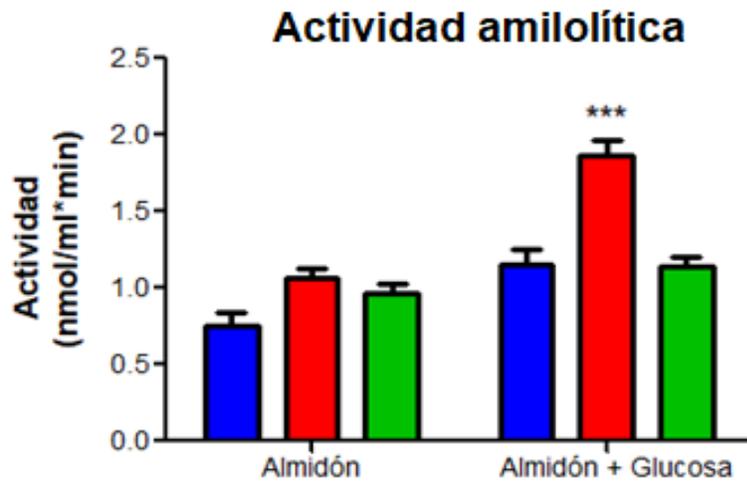


Figura 15. Comparación de la actividad amilolítica que presentaron las cepas ■ M145, ■ ΔATP-Glk y ■ M1740 en medio NMMP con almidón 1 % m/v o medio NMMP con almidón 1% m/v y glucosa [100 mM] a las 36 h de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar de cada determinación. Los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA de 2 vías con post-test de Bonferroni ($P < 0.001$) vs la actividad de la cepa silvestre M145 en cada uno de los medios. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (***)

Se puede observar que la cepa nula ATP-Glk presentó la mayor actividad amilolítica en el medio con almidón y glucosa, lo que podría interpretarse como una clara desregulación en el mecanismo RCC por parte de esta cepa, lo que nos hace pensar entonces que las cepas M145 y M1740 fueron al menos parcialmente sensibles a represión catabólica por glucosa.

De manera complementaria al ensayo anterior, también se realizó una cinética de consumo de almidón bajo las mismas condiciones represoras y no represoras. En la figura 16A se puede apreciar que en el medio NMMP con almidón las cepas M145 y ΔATP-Glk consumen por completo el almidón a las 48 h, mientras que la cepa M1740 lo hizo a las 56 h.

A sí mismo, en el medio NMMP con almidón y glucosa (figura 16B) la cepa M145 nuevamente consumió por completo el almidón a las 48 h, a diferencia de las cepas M1740 y ΔATP-Glk que lo hicieron hasta las 56 h.

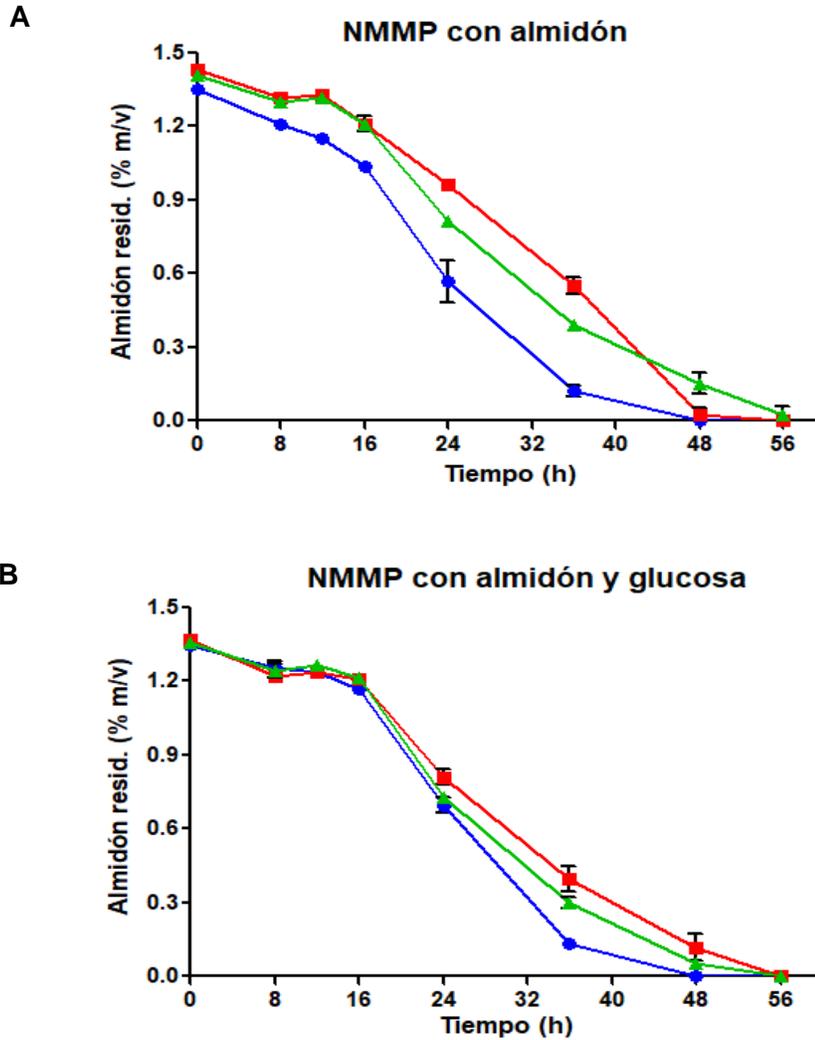


Figura 16. Cinética de consumo de almidón de las cepas \bullet M145, \blacksquare Δ ATP-Glk y \blacktriangle M1740; **A.** Medio NMMP con almidón 1%. **B.** Medio NMMP con almidón 1% y glucosa [100 mM]. Cada determinación se hizo por duplicado a partir de dos muestras biológicas distintas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada determinación

Al comparar el comportamiento de cada cepa en los dos medios utilizados, se puede observar que todas las cepas presentaron un patrón de consumo de almidón muy parecido en presencia o ausencia de glucosa.

Sin embargo, estos resultados no parecían tener una correlación directa con lo observado previamente en la actividad amilolítica, ya que se observó que en medio con almidón y glucosa las cepas M145, M1740 y Δ ATP-Glk presentaron un aumento en dicha actividad del 55%, 18% y 75% respectivamente en comparación

con la actividad que presentaron en el medio solo con almidón; No obstante, dicho aumento en la actividad amilolítica no se vio claramente reflejado en el consumo del almidón, aunque las causas de esto no son del todo claras.

Previamente Virolle y Bibb habían reportado que la glucosa reprime la expresión de la amilasa de *S. limosus* al clonarla en *S. coelicolor* (Virolle y Bibb, 1988). Así mismo, en *S. peucetius* var. *caesius* también se observó que la actividad amilolítica está sujeta a represión catabólica por glucosa (Rocha *et al.*, datos sin publicar).

Sin embargo, los resultados previamente descritos en las figuras 15 y 16 parecían sugerir dos cosas: que la actividad amilolítica en *S. coelicolor* solo es parcialmente sensible a represión por glucosa o bien, que el efecto observado no parecía estar en concordancia con los ensayos previos. De acuerdo con la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) *S. coelicolor* tiene anotado en su genoma 5 genes putativos (*sco6078*, *sco6081*, *sco2226*, *sco5443*, *sco7335*) cuyos productos parecen ser α -amilasas; Además tiene anotado otros dos genes que se ha corroborado codifican α -amilasas (*sco7019* y *sco7020*); Sin embargo, se desconoce cuáles de ellos son sensibles a represión catabólica por carbono y si se encuentran parcial o totalmente reguladas por dicho mecanismo.

Por otra parte, la composición del medio también podría explicar los efectos negativos de la glucosa sobre la actividad amilolítica en *S. coelicolor*, ya que en un estudio preliminar donde se utilizó medio NMMP sin buffer de fosfatos se observó que la actividad amilolítica fue totalmente sensible a represión catabólica por glucosa en *S. coelicolor*, lo que se puede explicar por el hecho que se ha identificado que existe una estrecha relación entre los niveles de C, N y P intra y extracelular en *S. coelicolor* (Xu *et al.*, 2016).

Para verificar la influencia de la composición del medio en el mecanismo RCC, se decidió cuantificar el consumo de almidón en medio NMMP con la concentración habitual de buffer de fosfatos [0.015 M] y también en una variante del mismo que

no contiene buffer de fosfatos, ambos complementados con almidón 1% (m/v) y glucosa [100 mM] e inoculados con la cepa M145.

En la figura 17 se puede observar que en el medio NMMP con buffer de fosfatos [0.015 M] la cepa M145 consume el almidón preferentemente aún en presencia de glucosa, consumiéndolo por completo a las 48 h, lo que demuestra que bajo estas condiciones no hubo represión catabólica por glucosa. Sin embargo, en la variante del medio NMMP que no contiene buffer de fosfatos se observó que hasta las 48 h los niveles de almidón se mantuvieron constantes, lo que claramente refleja que bajo esas condiciones el consumo de almidón se ve reprimido en presencia de glucosa.

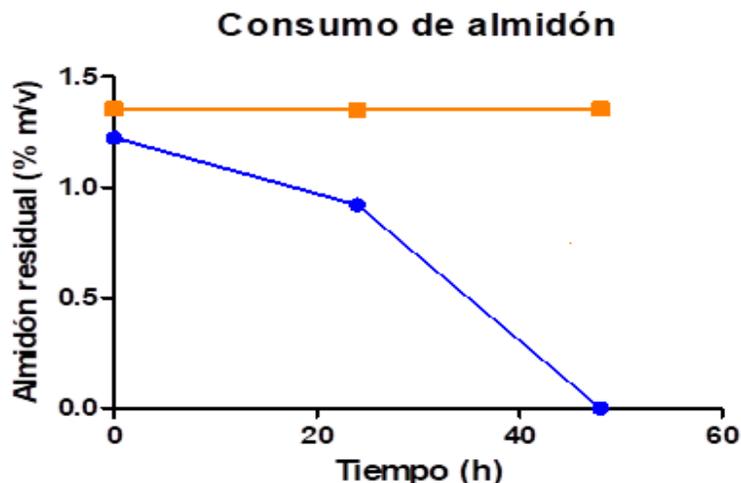


Figura 17. Cinética de consumo de almidón para la cepa M145. ■ Medio NMMP con buffer de fosfatos [0.015 M] y con almidón 1% y glucosa [100 mM]. ■ Medio NMMP sin buffer de fosfatos y con almidón 1% y glucosa [100 mM] Cada determinación se realizó por duplicado en los tiempos de incubación 0, 24 y 48 h.

Los resultados anteriores demuestran que la concentración de fosfatos en el medio y la composición del mismo pueden influir sobre el funcionamiento del mecanismo RCC en *S. coelicolor*. Por otra parte y bajo las condiciones utilizadas, se observó que la actividad amilolítica solo es parcialmente sensible a represión catabólica en presencia de glucosa en la cepa silvestre M145 y en la cepa M1740.

e) Sensibilidad de la actividad agarolítica a represión catabólica por carbono

Para continuar con la evaluación del efecto de la Pp-Glk sobre el mecanismo RCC en *S. coelicolor* se trabajó con un modelo enzimático más, en el cual se evaluó el efecto represor de la glucosa sobre la actividad agarolítica (Kwakman y Postma, 1994; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a). Esta prueba se realizó en medio MM con agar 1% m/v como única fuente de carbono como condiciones no represoras y en medio MM con agar 1% m/v y glucosa [100 mM] como condiciones represoras.

La actividad de la agarasa se determinó de manera indirecta con base en la relación del diámetro (halo/colonia) que generó cada una de las cepas bajo condiciones represoras y no represoras (tabla 6; figura 18).

En el caso de la cepa M145 bajo condiciones no represoras presentó una relación halo/colonia de 3.22, mientras que en condiciones represoras es de 2.51, lo que significa que hubo una disminución en la actividad de la agarasa del 22% en presencia de glucosa. La cepa M1740 presenta la misma relación halo/colonia de 3.07 en condiciones represoras y no represoras. Por último, la cepa Δ ATP-Glk en condiciones represoras presenta una relación halo/colonia de 3.34 y en condiciones no represoras de 3.59, lo que significa que hubo una disminución en la actividad de la agarasa del 4.5% en presencia de glucosa.

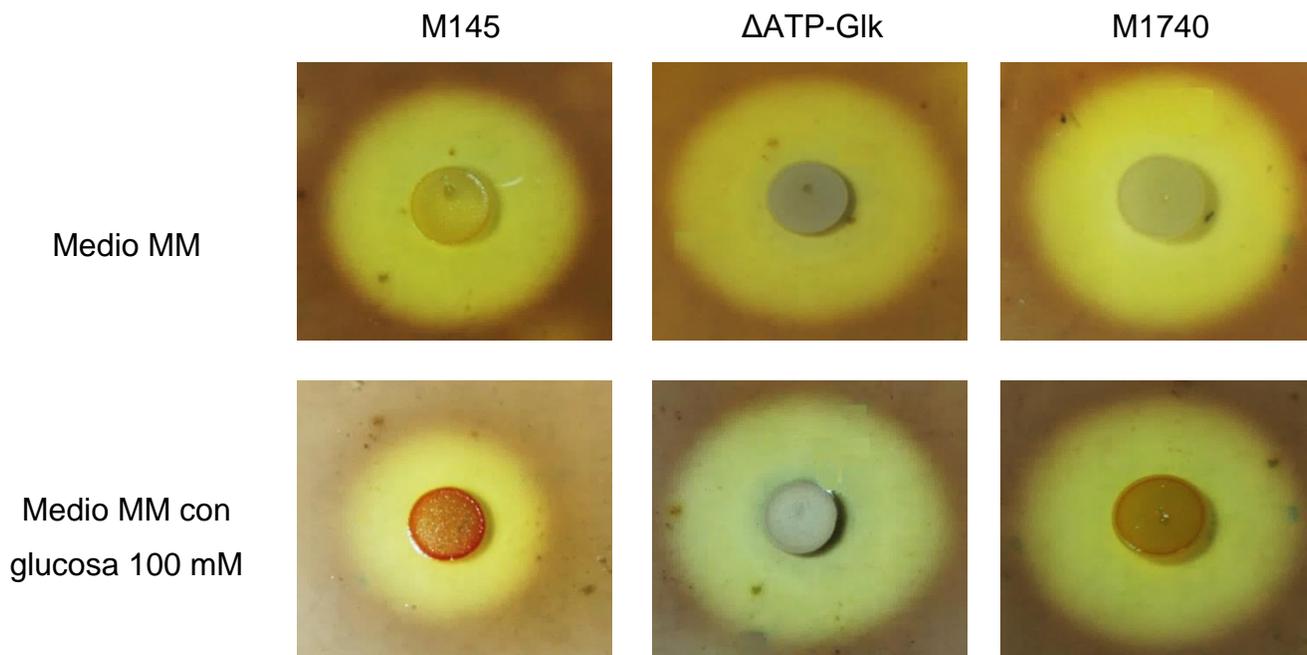


Figura 18. Visualización de la actividad de la agarasa en medio MM

Tabla 6. Comparación de la actividad agarolítica en condiciones represoras y no represoras

Cepa	Medio	Diámetro colonia (cm)	Diámetro halo (cm)	Relación diámetro (halo/colonia)
M145	MM	0.97 ± 0.05	3.12 ± 0.02	3.22
	MM + Glucosa	1.00 ± 0.04	2.51 ± 0.05	2.51
ΔATP-GIk	MM	0.88 ± 0.03	3.16 ± 0.04	3.59
	MM + Glucosa	0.92 ± 0.06	3.16 ± 0.02	3.43
M1740	MM	1.10 ± 0.02	3.38 ± 0.07	3.07
	MM + Glucosa	1.10 ± 0.04	3.38 ± 0.08	3.07

La actividad de la agarasa se determinó en medio MM con agar 1% m/v o complementado con agar 1% m/v y glucosa [100 mM] a las 72 h de incubación, utilizando lugol concentrado para revelar el halo formado por la actividad de la agarasa. Cada determinación se realizó por triplicado.

Lo anterior demuestra que la actividad agarolítica fue insensible a represión catabólica por glucosa en la cepa nula ATP-Glk y en la cepa M1740, siendo la cepa silvestre M145 la única susceptible a represión catabólica, lo que sugiere que la Pp-Glk no tiene participación directa en el mecanismo de la represión catabólica en la actividad agarolítica en *S. coelicolor*.

f) Efecto de la expresión de la Pp-Glk sobre el metabolismo secundario

Para evaluar si la expresión de la Pp-Glk tenía un efecto positivo sobre la producción de antibióticos en el metabolismo secundario en la cepa M1740, se procedió a cuantificar la producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina en las cepas M1740, M145 y Δ ATP-Glk en medio NMMP con almidón 1% m/v y en medio NMMP con almidón 1% m/v y glucosa [100 mM].

- **Producción de actinorrodina**

En la figura 19A se puede observar que en medio NMMP con almidón la cepa Δ ATP-Glk comenzó la producción de ACT desde las 72 h y presentó mayores niveles de producción específica en todos los tiempos evaluados respecto a la cepa M145. En cambio, las cepas M145 y M1740 comenzaron la producción de ACT a las 96 h y se observó que únicamente a las 144 h la cepa M145 produce una cantidad significativamente superior a la cepa M1740.

Por otro lado, en la figura 19B se puede observar que en medio NMMP con almidón y glucosa la cepa Δ ATP-Glk comenzó la producción de ACT desde las 72 h y fue la única de las cepas que produjo actinorrodina en todos los tiempos evaluados.

- **Producción de undecilprodigiosina**

En la figura 19C se puede observar que la cepa Δ ATP-Glk presentó mayores niveles de producción de RED en todos los tiempos evaluados en comparación con la cepa M145 en medio NMMP con almidón, mientras que las cepas M145 y M1740 presentaron niveles similares de producción de RED a lo largo del tiempo sin diferencias significativas.

Por otro lado, en la figura 19D se puede observar de nueva cuenta que la cepa Δ ATP-Glk presentó mayores niveles de producción de RED en todos los tiempos evaluados respecto a la cepa M145 en medio NMMP con almidón y glucosa, mientras que las cepas M145 y M1740 presentaron bajos niveles de producción en todos los tiempos y sin diferencias significativas entre sí. En ambos medios, las tres cepas comenzaron la producción de RED a las 72 h.

Resulta interesante resaltar que para ambos antibióticos, la producción específica de las cepas M145 y M1740 fueron menores en medio NMMP con almidón y glucosa que en el medio NMMP con almidón, lo que evidencia que la glucosa ejerció un efecto negativo en la producción de ambos antibióticos en esas dos cepas, a diferencia de la cepa nula ATP-Glk que resultó insensible a dicho efecto y que además fue capaz de sobreproducir ambos antibióticos, lo que probablemente es causado como una respuesta ante el estrés por la escasez de nutrimentos al que se encuentra expuesta, aunado al hecho de que esta cepa utiliza como única fuente de carbono los aminoácidos presentes en el medio NMMP, los cuales pueden ser convertidos rápidamente a precursores para la producción de ACT y RED.

Por otra parte, también vale la pena resaltar que la expresión de la Pp-Glk en la cepa M1740 restablece los niveles de producción específica de ACT y de RED a los niveles de la cepa silvestre M145 en los dos medios utilizados. Sin embargo, no tiene un efecto potenciador en la producción de antibióticos como previamente se había considerado.

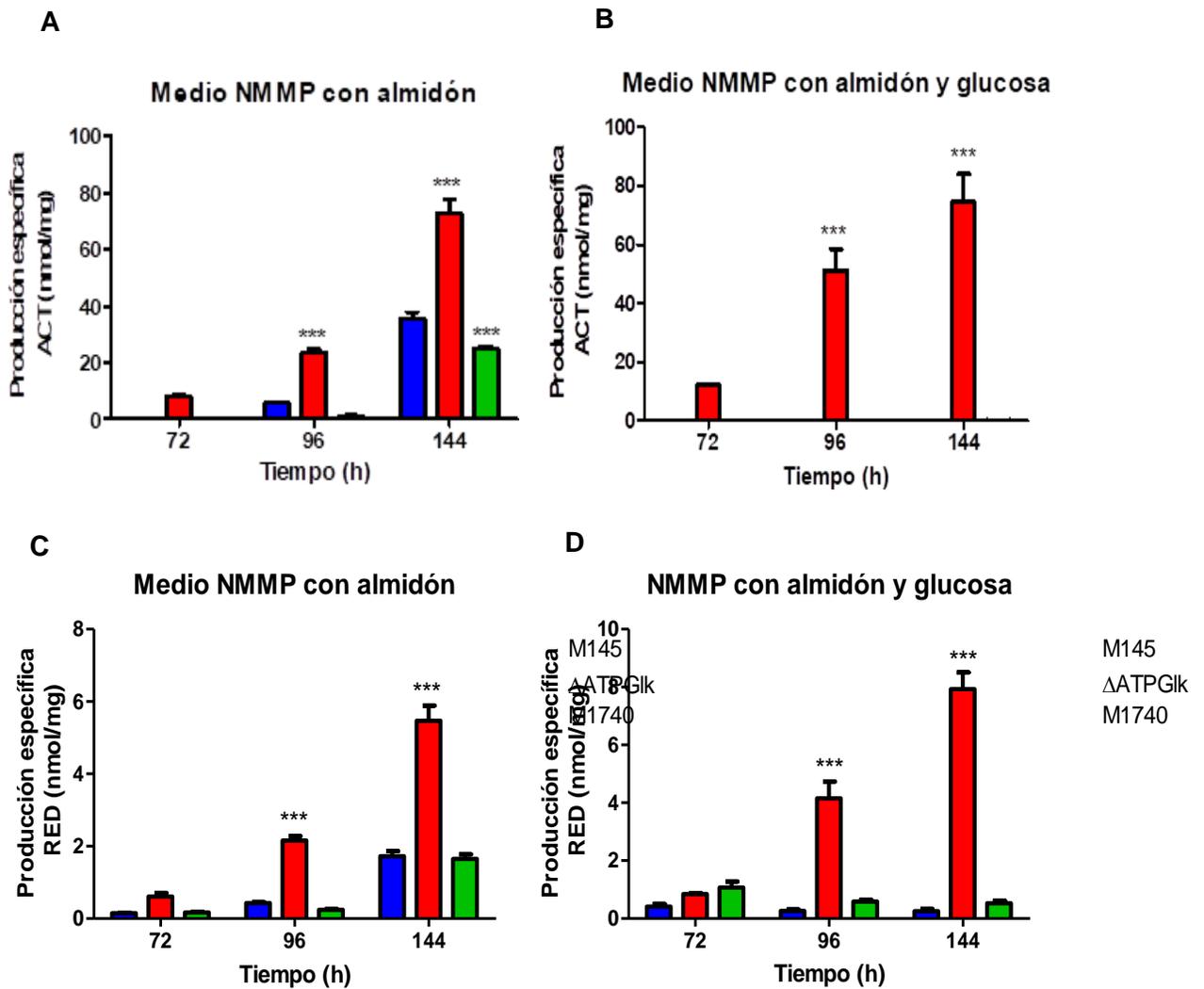


Figura 19. Producción específica de ACT (A y B) y RED (C y D) en las cepas ■ M145, ■ ΔATPGIk y ■ M1740. A y C. Medio NMMP con almidón 1%. B y D. Medio NMMP con almidón 1% y glucosa [100 mM]. Cada determinación se realizó por duplicado de dos muestras biológicas distintas. La desviación estándar de cada determinación se muestra en las barras de error. Las determinaciones se realizaron a las 72, 96, 144 h de incubación. Los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA de 2 vías con post-test de Bonferroni ($P < 0.001$) vs cepa M145. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (***).

g) Efecto de la expresión de la Pp-Glk sobre la morfología colonial macroscópica

Para evaluar si la expresión de la Pp-Glk tenía un efecto sobre la morfología de las colonias de la cepa M1740, se procedió a comparar la morfología macroscópica de las colonias de dicha cepa con respecto a la morfología que presentan las colonias de la cepa M145 y de la cepa Δ ATP-Glk. Con este fin, se utilizó medio R5 y medio NMMP con almidón 1% m/v y con almidón 1% + glucosa [100 mM]

- **Medio R5**

En el medio R5 se observó que a las 24 h de incubación (figura 20A) todas las cepas presentaban micelio vegetativo y no hubo diferencias en ninguna de ellas. Sin embargo, a las 48 h (figura 20B) se observó que la cepa Δ ATP-Glk ya presentaba micelio aéreo y esporas maduras, que se identifican por la aparición del pigmento gris, lo que es indicativo de que dicha cepa ya comenzaba a experimentar por completo el proceso de diferenciación morfológica, a diferencia de las cepas M145 y M1740 que en ese mismo tiempo aún presentaban micelio vegetativo y únicamente en los bordes de ambas colonias se observaba la formación de micelio aéreo.

A las 96 h (figura 20C) el micelio aéreo de la cepa Δ ATP-Glk ya había esporulado por completo, a diferencia de las cepas M145 y M1740, que presentaban mayor cantidad de micelio aéreo y en ambas cepas comenzaba a observarse la producción de pigmento gris. A las 144 h (figura 20D) de incubación, la cepa Δ ATP-Glk no presentaba ningún cambio respecto a lo observado a las 96 h; Sin embargo, en este tiempo las cepas M1740 y M145 ya presentaban micelio aéreo en toda la colonia, observándose cualitativamente que la cepa M1740 presentaba mayor cantidad de esporas maduras que la cepa M145.

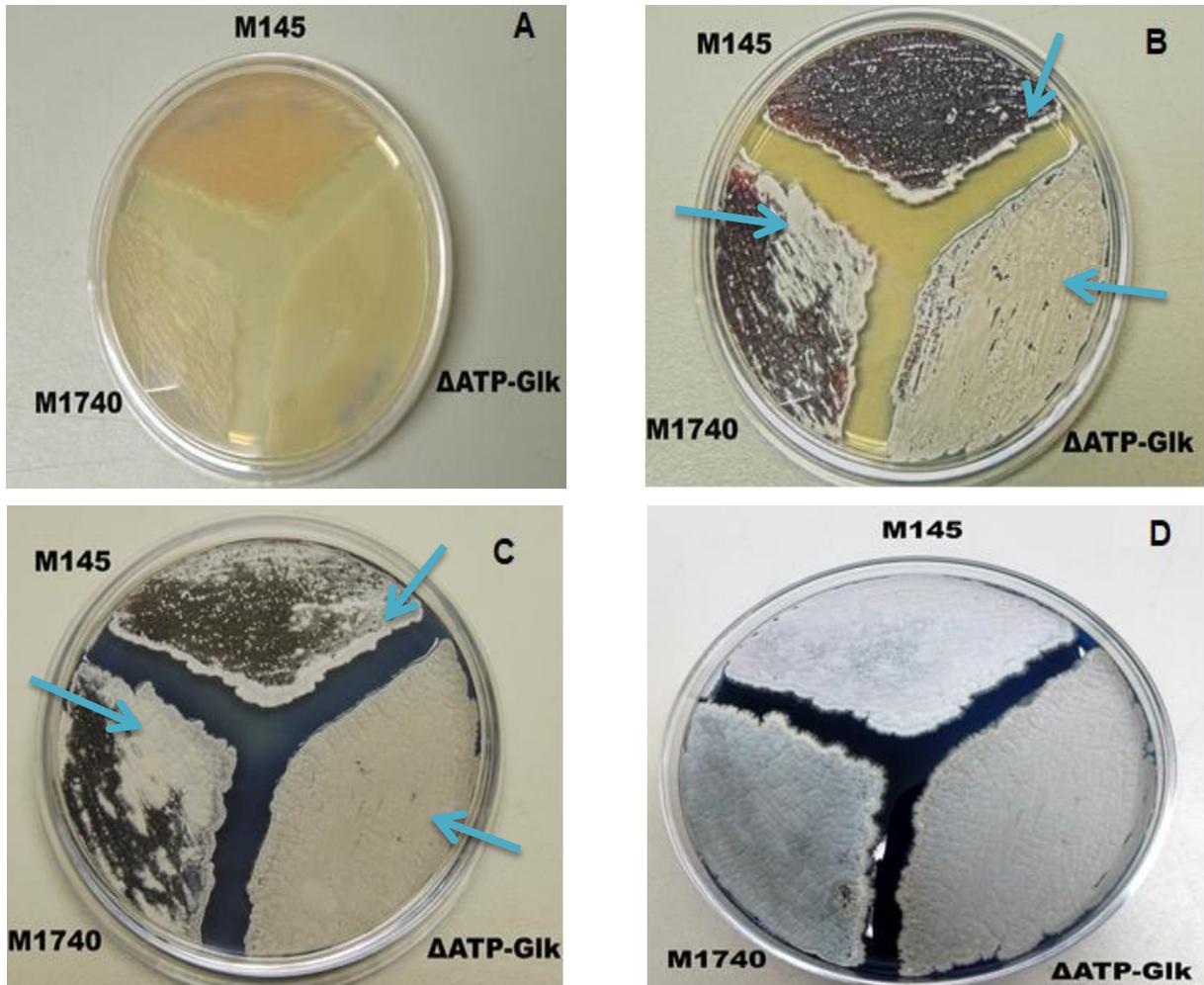


Figura 20. Caja de R5 inoculada con la cepa Δ ATP-Glk, M145 y M1740. Esta determinación se realizó por duplicado. Las cajas fueron incubadas durante 7 días a 29° C y se revisaron cada 24 h. Las imágenes mostradas corresponden a los tiempos de incubación: **A)** 24 h, **B)** 48 h; **C)** 96 h y **D)** 144 h. Las flechas en azul indican la formación de micelio aéreo y/o formación de esporas.

- **Medio NMMP**

En medio NMMP con almidón 1% m/v (figura 21A) durante la mayoría de los tiempos únicamente se observó la formación de micelio vegetativo en la cepa M145, hasta que a las 144 h (figura 21B) se observó que dicha cepa presentaba una pequeña zona con micelio aéreo. En cambio, la cepa Δ ATP-Glk a las 24 h (figura 21A) presentaba la formación de micelio vegetativo y a las 48 h se evidenció la formación de micelio aéreo. Sin embargo, en ninguno de los tiempos

posteriores se observó producción de pigmento gris. En el caso de la cepa M1740, a las 24 h (figura 21A) evidenciaba la formación de micelio vegetativo y se mantuvo sin cambios significativos hasta las 96 h tiempo en el que se evidenció la formación de micelio aéreo y a las 144 h (figura 21B) se observó la producción de pigmento gris.

Por otro lado, en el medio NMMP con almidón 1% m/v y glucosa [100 mM] se evidenció en la cepa Δ ATP-Glk la formación de micelio vegetativo a las 24 h de incubación (figura 21C), mientras que a las 48 h se observó la formación de micelio aéreo pero no presentó producción de pigmento gris en ninguno de los tiempos posteriores (figura 21D). Por otra parte, tanto la cepa M1740 como la cepa M145 únicamente presentaron micelio vegetativo durante todos los tiempos evaluados, es decir, hasta las 144 h (figura 21C y 21D).

En resumen, se observó que en ambas variantes de medio NMMP la cepa Δ ATP-Glk presentó micelio aéreo a partir de las 48 h pero en ninguno de los tiempos hubo producción del pigmento gris. Por otro lado, la cepa M145 a las 144 h en medio NMMP sin glucosa presenta un poco de micelio aéreo, a diferencia del medio NMMP con glucosa que en ninguno de los tiempos se evidenció la formación de micelio aéreo. En medio NMMP sin glucosa se observó la formación de micelio aéreo y presencia de esporas maduras para la cepa M1740 a las 96 y 144 h respectivamente, a diferencia de lo observado en medio NMMP con almidón y glucosa donde únicamente presentó micelio vegetativo en todos los tiempos evaluados.

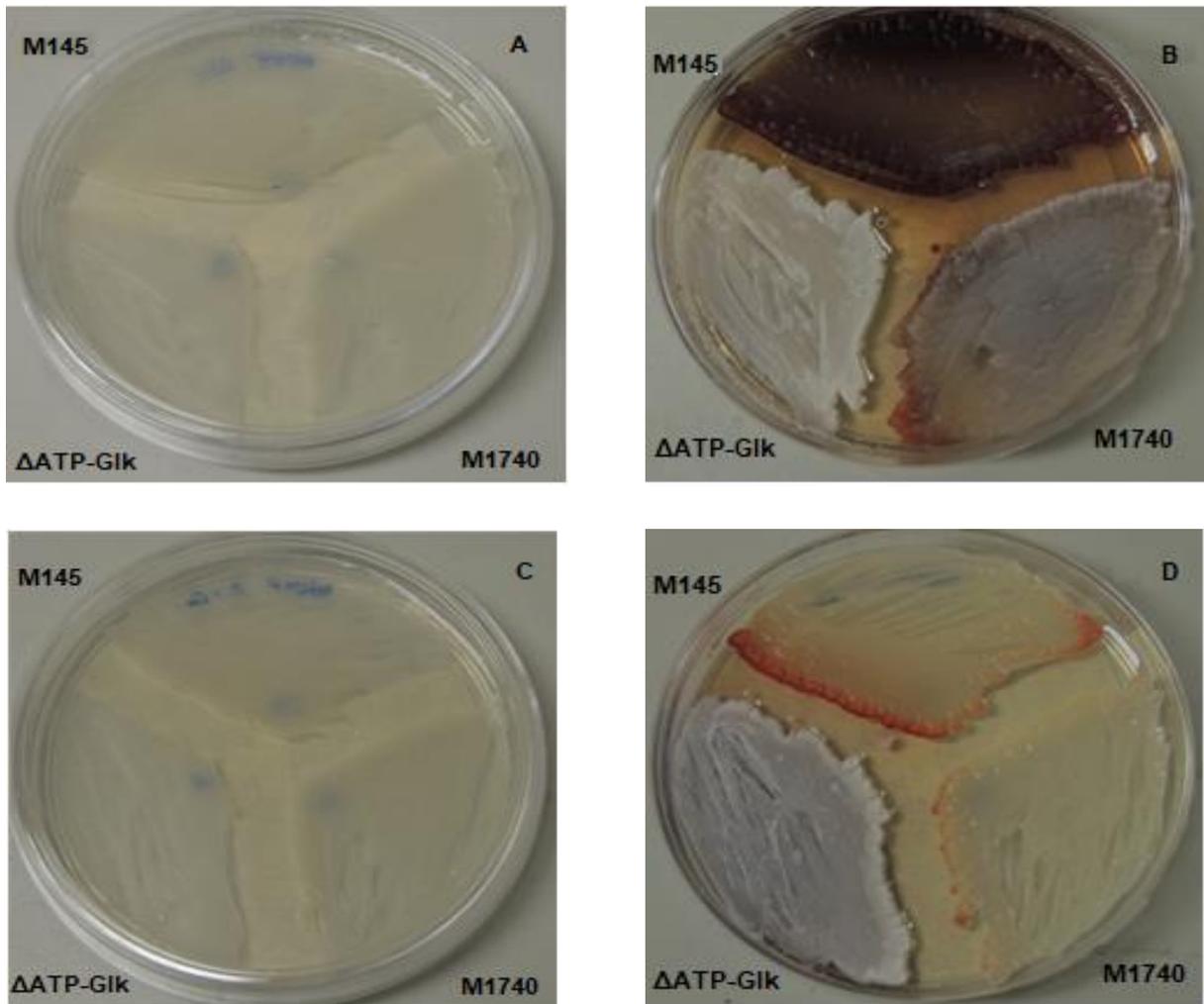


Figura 21. Cajas de medio NMMP con almidón 1% (A y B) o medio NMMP con almidón 1% y glucosa [100 mM] (C y D). Esta determinación se realizó por duplicado para cada medio. Las cajas fueron incubadas durante 7 días a 29°C y se revisaron cada 24 h. Las imágenes mostradas corresponden a los tiempo de incubación de 24 h (A y C) y 144 h (B y D).

8. Discusión

La enzima Pp-Glk es una proteína que se ha encontrado en algunos microorganismos pertenecientes al filo de las actinobacterias y desde un principio llamo la atención por su capacidad para utilizar el polifosfato como molécula donadora de grupo fosfato para catalizar la conversión de glucosa a glucosa-6P de manera independiente al ATP y ADP. Sin embargo, esta enzima ha sido poco estudiada en los estreptomicetos y por ende, la información disponible sobre la misma es muy limitada.

Por su parte, se sabe que el genoma de *S. coelicolor* codifica una Pp-Glk y una ATP-Glk que ha sido señalada como la principal Glk responsable de participar en el metabolismo de la glucosa, ya que se ha observado que las mutantes nulas ATP-Glk pierden la capacidad para crecer en este carbohidrato como única fuente de carbono (Hodgson, 1982). De acuerdo con nuestros resultados, la capacidad para metabolizar glucosa se recupera en dicha cepa mutante al expresar la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, lo que confirma una de las hipótesis planteadas al comienzo sobre la funcionalidad de la Pp-Glk en la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* y sobre su capacidad para restablecer el consumo y crecimiento en glucosa de dicha cepa mutante. Por su parte Angell *et al.*, obtuvieron resultados similares al complementar la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* con el gen nativo de la ATP-Glk (*sco2126*) así como también al expresar en dicha cepa mutante una Glk proveniente del microorganismo Gram negativo *Zimomonas mobilis* (Angell *et al.*, 1994), lo que demuestra que basta con expresar una Glk funcional en la cepa nula ATP-Glk para que dicha cepa recupere la capacidad para metabolizar glucosa. Esto sugiere indirectamente que la Pp-Glk de *S. coelicolor* no es una proteína funcional, lo que nos hace pensar que la baja actividad Pp-Glk observada por Ruiz-Villafán *et al.*, podría ser en realidad una señal de fondo propia del método utilizado, debido a que la actividad Glk se determinó de manera indirecta a partir de extractos celulares (Ruiz-Villafán *et al.*, 2014).

Sin embargo, la expresión de la Pp-Glk de *S. coelicolor* fue detectada mediante un estudio de proteómica cuantitativa (Gubbens *et al.*, 2012) y posteriormente el equipo de Koide *et al.*, logró expresar el gen de dicha proteína (*sco5059*) en *E. coli* para su subsecuente purificación y caracterización cinética y bioquímica *in vitro*, obteniendo una constante de afinidad (Km) para la glucosa de 12 μ M (Koide *et al.*, 2013) a diferencia de la ATP-Glk que tiene un valor de Km de 0.610 mM para dicho carbohidrato (Imriskova *et al.*, 2004), lo que demuestra que en *S. coelicolor* la Pp-Glk tiene una mayor afinidad por la glucosa que la ATP-Glk.

Todo lo anterior parece sugerir entonces que si bien el gen *sco5059* de *S. coelicolor* parece que puede expresarse, su producto parece ser no funcional en el microorganismo por algún motivo todavía desconocido, por lo que valdría la pena estudiar en un futuro cómo funciona la regulación y expresión de este gen, ya que podría aportar información importante sobre el papel y la importancia de las Pp-Glks en los estreptomicetos.

En cambio en el caso de *S. peucetius* var. *caesius* la Pp-Glk solo ha sido parcialmente caracterizada de manera bioquímica y cinética, pero no se ha determinado su constante de afinidad por la glucosa (Ruíz Villafán, 2014) a diferencia de la ATP-Glk que tiene un valor de Km de 1.6 mM para este carbohidrato (Imriskova *et al.*, 2004), por lo que no se ha podido establecer cuál de las dos Glks presenta mayor afinidad por la glucosa en este microorganismo.

Por otra parte, como era de esperarse, la expresión de la Pp-Glk tuvo un efecto directo sobre el metabolismo primario de la cepa M1740, ya que se observó que dicha cepa alcanzó mayores niveles de crecimiento que la cepa nula ATP-Glk y además presentó los mismos niveles de crecimiento que la cepa silvestre M145, lo que demuestra que gracias a la Pp-Glk los niveles de crecimiento de la cepa M1740 se restablecen a los niveles de la cepa silvestre. Es decir, esta enzima permite recuperar la capacidad para crecer en glucosa como única fuente de carbono.

Por otro lado, se observó que la Pp-Glk de *S. peuceitius* var. *caesius* fue incapaz de restablecer la sensibilidad de la actividad agarolítica a represión catabólica por glucosa en la cepa M1740, lo que coincide con la hipótesis planteada al inicio, la cual se basó en lo reportes previos hechos por Kwakman y Postma y por Angell *et al.*, que determinaron que la ATP-Glk en *S. coelicolor* tiene una función regulatoria muy importante para el adecuado funcionamiento del mecanismo RCC en dicho microorganismo y que dicha función es independiente de su función cinasa (Angell *et al.*, 1994; Kwakman y Postma, 1994).

Empero, recientes trabajos han demostrado que la ATP-Glk no tiene un papel tan preponderante como se pensaba anteriormente sobre el mecanismo de RCC (Gubbens *et al.*, 2012; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a). Sin embargo, Romero-Rodríguez *et al.* observaron que la regulación catabólica de la agarasa DagA sí parece estar mediada de manera dependiente de la función regulatoria de la ATP-Glk, aunque no se ha esclarecido el mecanismo exacto en cómo se lleva a cabo esta regulación (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a). Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se reafirma que la regulación catabólica de la actividad agarolítica es dependiente de la función regulatoria de la ATP-Glk. Así mismo bajo nuestras condiciones, se descarta que la Pp-Glk de *S. peuceitius* var. *caesius* participe de manera directa en el mecanismo de represión catabólica por carbono de la actividad agarolítica en *S. coelicolor*.

Por otra parte, hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo donde se determina la sensibilidad de la actividad amilolítica de *S. coelicolor* a represión catabólica por glucosa; En dicho ensayo se observó que la actividad amilolítica solo fue parcialmente sensible a represión catabólica por glucosa en las cepas M1740 y M145 pero fue totalmente insensible en la cepa nula ATP-Glk. Lo anterior parece sugerir dos cosas: la primera es que la regulación de la actividad amilolítica en este microorganismo es dependiente del metabolismo de la glucosa pero independiente de la Glk que participe en el catabolismo de la misma o la segunda, que la Pp-Glk al igual que la ATP-Glk de *S. coelicolor*, también podría tener una

función regulatoria capaz de restablecer la sensibilidad de la actividad amilolítica a represión catabólica por carbono.

Sin embargo, en *S. peucetius* var. *caesius* se ha observado que la sensibilidad de la actividad amilolítica a represión catabólica por glucosa parece ser dependiente de la ATP-Glk e independiente de la Pp-Glk (Rocha *et al.*, datos sin publicar), lo que parece sugerir entonces que en este microorganismo la Pp-Glk no tiene una función regulatoria en el mecanismo RCC, a diferencia de ATP-Glk que sí parece tenerla.

Lo anterior sustenta fuertemente la idea de que la Pp-Glk tampoco debería de presentar una función regulatoria en el mecanismo RCC en *S. coelicolor*, lo que parecería estar apoyado por nuestros resultados al determinar la sensibilidad de la actividad agarolítica a represión catabólica, lo que nos hace pensar que el efecto de la represión catabólica de la actividad amilolítica es dependiente únicamente del catabolismo de la glucosa y no del tipo de Glk que participe en el metabolismo de la misma.

Por su parte, Virolle *et al.*, observaron que al expresar una amilasa de *S. limosus* en *S. coelicolor* ésta era sensible a represión catabólica en presencia de glucosa y de manera dependiente de la ATP-Glk (Virolle y Bibb, 1987). No obstante, si los resultados obtenidos por Virolle *et al.*, guardan relación con nuestros hallazgos, probablemente lo que ellos observaron fue que la cepa nula ATP-Glk resultó insensible a represión por glucosa por su incapacidad para metabolizar dicho carbohidrato y no precisamente por la función regulatoria de la ATP-Glk sobre el mecanismo RCC. En conjunto, todo lo anterior parecer sugerir entonces que la Pp-Glk *S. peucetius* var. *caesius* no participa directamente en el mecanismo RCC en *S. coelicolor*.

Sorpresivamente no se observó una relación directa entre la actividad amilolítica que presentó cada una de las cepas y el consumo de almidón que cada una de ellas presentó en los dos medios probados, aunque el o los motivos de este fenómeno no son del todo claros, esto podría ser generado por el hecho de que en

S. coelicolor se han identificado varios genes cuyo producto es o parece ser una α -amilasa (7 genes en total, 5 de ellos putativos según la base de datos del NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y debido a que se desconoce cuál o cuáles de ellos son sensibles a represión catabólica, es probable que se puedan expresar varias amilasas y que cada una tenga una regulación distinta, lo que en conjunto podría estar generando los resultados obtenidos, aunque sería necesario realizar otros ensayos para corroborar la veracidad de la afirmación anterior.

En *S. peucetius* var. *caesius* y *S. aureofaciens* se ha asociado la actividad de la Pp-Glk con la sobreproducción de metabolitos secundarios (antraciclinas y clortetraciclina respectivamente). Ambos microorganismos tienen la característica de presentar mayor actividad Pp-Glk que de ATP-Glk (Hošťálek *et al.*, 1976; Ruiz-Villafán *et al.*, 2014). Teniendo esto en cuenta, se planteó como hipótesis que gracias a la expresión de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* se favorecía positivamente la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*, como los antibióticos actinorrodina y/o undecilprodigiosina.

Sin embargo, contrario a la hipótesis planteada, se observó que los niveles de producción específica de ACT y RED en la cepa M1740 fueron muy inferiores en comparación a la cepa Δ ATP-Glk, pero fueron similares a los niveles de la cepa silvestre M145, lo que demuestra que al menos bajo las condiciones utilizadas, la actividad de la Pp-Glk por sí sola no favorece la producción de dichos antibióticos en *S. coelicolor* y que por el contrario, ayuda a revertir la producción de ambos antibióticos a los niveles de la cepa silvestre M145.

Químicamente, las antraciclinas, la clortetraciclina y la actinorrodina son policétidos aromáticos formados por una policétido sintasa de tipo II, por lo que sus rutas biosintéticas incluyen pasos en común, a diferencia de la undecilprodigiosina que es un tripirrol generado a partir de una ruta biosintética totalmente distinta, donde participa una ácido graso sintasa. Por lo que para ser más específicos, nuestros resultados demuestran que la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* no favorece la producción de antibióticos de naturaleza policétida y no policétida en *S. coelicolor*.

Sin embargo, una consideración importante que hay que tener en cuenta es que a diferencia de la cepa M1740 que únicamente presenta actividad Pp-Glk, *S. peucetius* var. *caesius* y *S. aureofaciens* presentan actividad tanto de ATP-Glk como de Pp-Glk y cada una de ellas es principalmente activa en ciertas fases del crecimiento de ambos microorganismos, por lo que existe la posibilidad de que la sobreproducción de metabolitos secundarios en estas cepas sea el resultado en conjunto de la actividad de ambas Glks, lo que les permitiría generar y disponer de una mayor cantidad de precursores para la producción de metabolitos secundarios tal y como lo sugiere Ruiz-Villafán en el caso de *S. peucetius* var. *caesius* (Ruíz Villafán, 2014). No obstante, la información disponible al respecto es muy limitada, por lo que valdría la pena probar dicha hipótesis, ya que cualquier intento por tratar de comprender los fenómenos que causan la sobreproducción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* es, desde el punto de vista industrial, de alta relevancia por las posibles ventajas y aplicaciones que ello implicaría.

Por otra parte, al evaluar la morfología macroscópica de las colonias de la cepa M1740 no es raro que se hayan observado diferencias en las mismas respecto a las colonias de la cepa nula ATP-Glk, las cuales son generadas por la capacidad de una cepa y la incapacidad de la otra para metabolizar la glucosa. En cambio, la cepa M1740 presentó una morfología colonial macroscópica parecida al de la cepa silvestre M145; No obstante, se observó que la cepa M1740 sufrió de un proceso de diferenciación morfológica más rápido que la cepa M145, lo cual podría estar relacionado directamente con la velocidad con la que cada una de las cepas es capaz de consumir la glucosa presente en los medios examinados.

En un estudio preliminar en medio líquido NMMP con almidón 1% y glucosa 100 mM se observó que la cepa M1740 consume más rápido la glucosa presente en el medio que la cepa M145 y debido a que la glucosa retrasa el proceso de diferenciación morfológica, sería normal observar entonces que la cepa M1740 experimente antes el proceso de diferenciación morfológica en medio sólido que la

cepa M145, que fue precisamente el resultado obtenido. Sin embargo, habría que realizar más pruebas para corroborar que la afirmación anterior es cierta.

A sí mismo, se observó que la glucosa tuvo un efecto negativo en la producción de ACT, RED y en el proceso de diferenciación morfológica en las cepas M1740 y M145, a diferencia de la cepa Δ ATP-Glk que resultó insensible a dicho efecto. Lo anterior evidencia que de manera independiente al tipo de Glk que participe, es el metabolismo de la glucosa en sí lo que desencadena los efectos regulatorios que dicho carbohidrato ejerce sobre el proceso de diferenciación morfológica y sobre la producción de ambos antibióticos. Similares resultados fueron observados y reportados por Gubben *et al.*, y por Romero-Rodríguez *et al.*, (Gubbens *et al.*, 2012; Romero-Rodríguez *et al.*, 2016a). Sin embargo, aún no se ha esclarecido por completo la forma en como la glucosa ejerce dicha regulación en *S. coelicolor*.

Evolutivamente, se ha propuesto que las ATP-Glks y las Pp-Glks de la familia HK según la clasificación de Kawai *et al.*, (que incluye las Glks de los microorganismos Gram positivos, Gram negativos, cianobacterias, entre otros organismos) provienen de un ancestro en común que seguramente utilizaba el Pp como molécula donadora de grupo fosfato (Kawai *et al.*, 2005), lo cual estaría sustentado por el hecho de que el Pp ha sido señalado como el acarreador de energía y donador de fosfato más antiguo (Kornberg *et al.*, 1999). Sin embargo, ciertos eventos habrían generado que la mayoría de las Glks evolucionaran de manera divergente y se fueran haciendo estructuralmente más complejas a costa de su capacidad para utilizar el Pp, dando así origen a las ATP-Glks y Pp-Glks actuales (Kawai *et al.*, 2005). No obstante, la teoría anterior no permite explicar porque únicamente los actinomicetos preservaron y continuaron haciendo uso de las Pp-Glks.

Así mismo, se sabe que el Pp se encuentra en altas concentraciones en la naturaleza y también se ha encontrado en una gran variedad de organismos distintos como bacterias, hongos, plantas y animales (Kulaev y Vagabov, 1983). Además, se ha reportado que el Pp puede desempeñar una gran variedad de funciones biológicas distintas en los seres vivos e incluso puede ser utilizado como

sustituto del ATP en algunas de ellas, como por ejemplo, en la donación de grupo fosfato (Kornberg, 1995).

No obstante, el ATP es la molécula utilizada por excelencia por los seres vivos como principal fuente de energía y es utilizada además para llevar a cabo otras funciones en las células, por lo que su formación y utilización está altamente conservada en los tres dominios de la naturaleza.

Lo anterior permitiría explicar y justificar la probable transición/adaptación de las Pp-Glks de los actinomicetos para utilizar ATP como donador de fosfato de manera alterna al Pp (Hsieh *et al.*, 1993) siendo un claro ejemplo de esto la Pp-Glk de *S. coelicolor*, por lo que es altamente probable que otras Pp-Glks expresadas en otros estreptomicetos también tengan la capacidad de utilizar el ATP como donador de fosfato, aunque una caracterización preliminar de la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* mostró que dicha enzima es incapaz de utilizar el ATP como donador de fosfato (Ruiz Villafán, 2014).

No obstante, se ha observado que la gran mayoría de los estreptomicetos estudiados hasta ahora presentan mayor actividad ATP-Glk que de Pp-Glk, siendo las únicas excepciones reportadas *S. peucetius* var. *caesius* y *S. aureofaciens* que han mostrado la tendencia inversa (Hošťálek *et al.*, 1976; Ruiz-Villafán *et al.*, 2014), lo que demuestra que las ATP-Glks parecen ser de mayor importancia en este género que las Pp-Glks y que solo en casos muy específicos, la Pp-Glk parece tener un papel igual o superior de importante que la ATP-Glk sobre el catabolismo de la glucosa, como en el caso *S. aureofaciens* y *S. peucetius* var. *caesius*, aunque aún falta por esclarecer las causas por las cuales este fenómeno hasta la fecha, se presenta únicamente en el caso de estos dos estreptomicetos.

9. Conclusiones

- La Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* fue capaz de restablecer el consumo de glucosa en la cepa nula ATP-Glk de *S. coelicolor* y le permitió crecer en medio mínimo con este carbohidrato como única fuente de carbono.
- Se observó que la expresión de la Pp-Glk Glk permitió restablecer los niveles de crecimiento de la cepa nula ATP-a los niveles de la cepa silvestre M145.
- Se descarta que la Pp-Glk participe de manera directa sobre el mecanismo RCC en *S. coelicolor*.
- En cuanto al metabolismo secundario, se observó que la actividad de la Pp-Glk permitió restablecer los niveles de producción de ACT y RED en la cepa nula ATP-Glk a los niveles de la cepa silvestre M145.
- Al evaluar el efecto de la Pp-Glk sobre la morfología macroscópica colonial se observó que la cepa complementada presentó un fenotipo parecido al de la cepa silvestre M145.
- Por último, se observó que el efecto regulatorio que ejerce la glucosa sobre la producción de ACT, RED y sobre el proceso de diferenciación morfológica depende únicamente del catabolismo de la glucosa y no del tipo de Glk que participe en el metabolismo de la misma.

10. Referencias

- Angell, S., Bibb, M. J., Lewis, C. G., Buttner, M. J. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular And General Genetics*, 3(244), 135–143.
- Angell, S., Schwarz, E., 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), 2833–2844.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Titgemeyer, F., Nothaft, H., Saier, M. H. (2004). In Silico and Transcriptional Analysis of Carbohydrate Uptake Systems of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1362–1373.
- Brückner, R., Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: Choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2002), 141–148.
- Bystrykh, L. V, Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A, Dijkhuizen, L., Herrema, J. K., Fernández-Moreno, M. A. (1996). Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 178(8), 2238–2244.
- Cerdeño, A. M., Bibb, M. J., Challis, G. L. (2001). Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, 8(2001), 817-829.
- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471.
- González, F., Fernández-Vivas, A., Arias, J. M., Montoya, E. (1990). Polyphosphate glucokinase and ATP glucokinase activities in *Mycococcus coralloides* D. *Archives of Microbiology*, 154, 438–442.

- 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), 613–624.
- Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., 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*, 86(6), 1490–1507.
- 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), 2417–2430.
- Hodgson, D. A. (2000). Primary Metabolism and its Control in Streptomycetes: A Most Unusual Group of Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42, 1–192.
- Hošťálek, Z., Tobek, I., Bobyk, M. A., Kulayev, I. S. (1976). Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiologica*, 21(2), 131–138.
- Hsieh, P. C., Shenoy, B. C., Jentoft, J. E., Phillips, N. F. (1993). Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Expression and Purification*, 4(1), 76–84.
- Hwang, K.-S., Kim, H. U., Charusanti, P., Palsson, B. Ø., & Lee, S. Y. (2014). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32(2), 255–268.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., ... Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 21(5), 526–531.
- Ikeda, H., Seno, E. T., Bruton, C. J., Chater, K. F. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular General Genetics : MGG*, 196(3), 501–507.
- Imriskova, I., Arreguín-Espinosa, R., Guzmán, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., Sanchez, S. (2004). Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Research in Microbiology*, 156(3), 361–366.
- Kang, S. G., and Lee, K. J. (1997). Kinetic analysis of morphological differentiation and protease production in *Streptomyces albidoflavus* SMF301. *Microbiology*, 143(8), 2709–2714.

- Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., Murata, K. (2005). Hypothesis: Structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 320–330.
- Keller, N. P., Turner, G., and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism-From biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937–947.
- Kim, E., Hong, H., Choi, C., and Cohen, N. (2001). Modulation of Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces lividans* by Glucose Repression of *afsR2* Gene Transcription. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2198–2203.
- Koide, M., Miyanaga, A., Kudo, F., and Eguchi, T. (2013). Characterization of polyphosphate glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(11), 2322–2324.
- Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: Toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 491–496.
- Kornberg, A., Rao, N. N., & Ault-riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 89–125.
- Kulaev, I. S., and Vagabov, V. M. (1983). Polyphosphate Metabolism in Micro-Organisms. *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 24).
- Kwakman, J. H., and Postma, P. W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 176(9), 2694–2698.
- Lee, J., Hwang, Y., Kim, S., Kim, E., Choi C., (2000). Effect of a Global Regulatory Gene , *afsR2* , from *Streptomyces lividans* on Avermectin Production in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 606–608.
- Lindner, S. N., Knebel, S., Pallerla, S. R., Schoberth, S. M., Wendisch, V. F. (2010). Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 703–713.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., Tan, H. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112–143.
- Lo Grasso, L., Martino, D. C., Alduina R., (2016). Production of Actibacterial Compounds from Actinomycetes. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, capítulo 7 (pp. 177–198).
- Lunin, V. V, Li, Y., Schrag, J. D., Iannuzzi, P., Cygler, M., Matte, A. (2004). Crystal Structures of *Escherichia coli* ATP-Dependent Glucokinase and Its Complex with Glucose. *Journal of Bacteriology*, 186(20), 6915–6927.

- Martin, J. F., and Demain, A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44(2), 230–251.
- McCormick, J. R., & Flärdn, K. (2012). Signals and Regulators That Govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 206–231.
- Mukai, T., Kawai, S., Mori, S., Mikami, B., Murata, K. (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase from *Arthrobacter* sp. strain KM. *Acta Crystallographica*, (D59), 1662–1664.
- Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics: Discovery of Alternative Routes for Quinone Formation Encoded in the act Gene Cluster. *Chemistry and Biology*, 16(2), 226–236.
- Pepin, C. A., and Wood, H. G. (1986). Polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. Kinetics and demonstration that the mechanism involves both processive and nonprocessive type reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 261(10), 4476–4480.
- Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Guzmán-Trampe, S., Maldonado-Carmona, N., Vázquez-Hernández, M., ... Sánchez, S. (2017). Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(162).
- Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D., Sánchez, S. (2016a). Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiology*, 16(77).
- Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Rocha-Mendoza, D., Manzo-Ruiz, M., Sánchez, S. (2015). Biochemistry and regulatory functions of bacterial glucose kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 577–578, 1–10.
- Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V. H., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. (2016b). Carbon Catabolite Regulation of Secondary Metabolite Formation and Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(6), 1152–1166.
- Ruiz-Villafán, B., Rodríguez-Sanoja, R., Aguilar-Osorio, G., Gosset, G., Sanchez, S. (2014). Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6061–6071.
- Ruiz-Villafán, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167.

- Ruiz-Villafán, B. (2014). *Las glucosa cinasas de Streptomyces peucetius var. caesi*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... Ruiz, B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics*, 63(8), 442–459.
- Seno, E. T., and Chater, K. F. (1983). Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 129(2), 1403–1413.
- Seo, J., Ohnishi, Y., Hirata, A., Horinouchi, S. (2002). ATP-Binding Cassette Transport System Involved in Regulation of Morphological Differentiation in Response to Glucose in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 91–103.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H. A., Bibb, M. J. (1991). The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 5(2), 289–298.
- Szymona, M., y Ostrowski, W. (1964). Inorganic Polyphosphate glucokinase of *Mycobacterium phlei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 85, 283–295.
- Szymona, O., Szymona M. (1979). Polyphosphate- and ATP-glucose phosphotransferase of *Nocardia minima*. *Acta Microbiol. Pol*, 28(2), 153-160
- Tanaka, S., Lee, S. O., Hamaoka, K., Kato, J., Takiguchi, N., Nakamura, K., ... Kuroda, A. (2003). Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorus*. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5654–5656.
- Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H. (1994). Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140(9), 2349–2354.
- Van Wezel, G. P., König, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M., Titgemeyer, F. (2007). A new piece of an old jigsaw: Glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12(1–2), 67–74.
- Virolle, M.-J., and Bibb, M. J. (1987). Cloning, characterization and regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces limosus*. *Molecular Microbiology*, 2(2), 197–208.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., Salmond, G. P. C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodigiosins. *Nature Reviews Microbiology*, 4(5), 887–899.

Xu, Y., Liao, C. H., Yao, L. L., Ye, X., 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), 6819–6830.

11. Anexos

11.1 Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

Triptona	1.0% m/v
Extracto de levadura	0.5% m/v
NaCl	1.0% m/v
Agar	1.5% m/v

Medio soya-manitol (MS)

Manitol	2.0% m/v
Harina de soya	2.0% m/v
Agar	2.0% m/v

Medio agar nutritivo (DNA)

Agar nutritivo marca Difco	2.3% m/v
----------------------------	----------

Medio púrpura de bromocresol glucosa (PBG)

Peptona	0.5% m/v
Extracto de carne	0.3% m/v
Glucosa	1.0% m/v
Agar	2.0% m/v
Púrpura de bromocresol	c.b.p.

Ajustar pH a 7.0

Medio mínimo (MM)

K_2HPO_4	0.050% m/v
$(NH_4)_2SO_4$	0.100% m/v
$MgSO_4$	0.020% m/v
$FeSO_4$	0.001% m/v

Medio mínimo líquido (NMMP)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20% m/v
Casaminoácidos	0.50% m/v
MgSO ₄	0.06% m/v

Complementar cada 80 mL de medio después de esterilizar

Buffer de fosfatos NaH₂PO₄/K₂HPO₄

[0.1M] ajustado a pH 6.8	15.0 mL
Solución de elementos traza	0.1 mL

Medio R5

Sacarosa	10.30% m/v
K ₂ SO ₄	0.025% m/v
MgCl ₂ *6H ₂ O	1.012% m/v
Glucosa	1.000% m/v
Casaminoácidos	0.010% m/v
Extracto de levadura	0.500% m/v
Agar	2.200% m/v

Complementar cada 100 mL de medio después de esterilizar con:

KH ₂ PO ₄ [0.5%]	1.0 mL
CaCl ₂ *2H ₂ O [5M]	0.4 mL
L-prolina [20%]	1.5 mL
NaOH [1N]	0.7 mL
Solución de elementos traza	0.2 mL
Buffer TES	10 mL
Glucosa [1M]	5.55 mL

11.2 Amplificación del gen *ppgIk* de *S. peuceitius* var. *caesius*

Secuencia del gen *ppgIk*

5´

gccctcaaggagaagttcccgtgctcatctcgccgccgagcgcacacatctgctacgccacgcagaaccgcca
gctcgcggtcaagcagatgggtgagcaggcggagctcgtcatctggtcggctcgcgcaactcgtccaactccgt
acgactcgtcgaggctgccaagctcgcgggcgcgggaggcgctacctcgtggactcgcgacgagatcgac
gagagctggctggaggcgtcaccacggtggcgtcacctccgggctcgggagggcctcgtggagca
ggtcctggaatacctgaccacgcacggctacgaggacgtggaactcgtcaaggcggccgaggagtcacatcacct
tctcgtgcccaggagttgcccgtgacctcgcgcggaggcggccgcccctggtggccgagcgcaccgcgag
cgccccaggcaccctcgggagtgactgtccgtcgt**acgacgtaacgtagagccATGCAGATCTTC**
GGCGTGGACATCGGTGGATCAGGGATCAAGGGCGCTCCCGTGGACCTGGAC
AAGGGCGACCTGGCGGAGGAGCGCTACAAGGTGCTCACGCCGCACCCGGC
CACACCCGACGCGGTGGCGGACGGTGTGAAGGAGGTCGTGACCACTTCGG
CTGGACGGGCCAGGTCGGGATCACCTTCCCGGGCGTGGTCACCGGCGGGCTC
CACCATCCGCACGGCCGCCAACGTGGACAAGGACTGGATAGACACCGACGC
GCGCGCCCTGCTCGGCGACCGGCTGGGCGGCCTCCAGGTGACCGTGCTGA
ACGACGCGGACGCGGGCGGGTGTGCGGGAGATGGAGTTCGGCGCGGGCAAG
GGCCGCCGGGGCACGGTCTTCTCCTCACCTTCGGTACGGGGATCGGCAGC
GCCCTTTTCGTGGACGGCACCCCTCGTCCCGAACACGGAGCTGGGCCATCTG
GAGCTGAACGGCCACGACGCCGAGAAGCACGCTAVCTCCACGAAGGCCAAG
GAGGACCACGACCTCTCCTGGGAGCACTGGGCCCACCGGGTGCAGAAGTAC
CTCGCCCATGTCGAGATGCTCTTCTCGCCCGAGCTTTCATCATCGGCGGCG
GCGTCAGCCGCAAGGCCCAGAAGTTCCTGCCGCTGATCGAGGGCATCAAGG
CGGAGATGGTCCCGGCCAGCTGCAGAACAACGCGGGGATCGTGGGCGCG
GCGATGCGGGCGGCACAGACCCACTAGcgcggtgtgacctcaggccgtgggagcgtgacc
tcaggccgtacggcgtcgtgctgcccgtgcccgtcgtacgggtcacgatgaccccgcc
agcagcgtccctccgtagagccatcccgcgtgatggcgagcgcggtgaccagccccatcagccggcccgga
atccgccgtcctgtcggcgaccggcagcagtcggcagggcgaaggc**gatcgggtacggcgacgacggcggtg**
acgaggtcggcccggcaccataccgcggtcagcagcagaccggcaggaacagcactccgtagacgac
gagcagggccccgaagagcagctgtccacacaggccagcgcgaacatcgacgccgagcagaagagccca
ctgccgaggccgggtgagccgggattggggaacctgctaccgcctgcaccaggggagcagcggcgccg
gtccgccccggccggcacaccggcgccgccc 3´

Notas:

A) Las bases que no forman parte de la región codificante están indicadas con letras minúsculas, mientras que en mayúsculas se indican las bases que se encuentran dentro de la región codificante del gen *ppgIk*.

B) Las bases que están sombreadas de color amarillo indican la región que es sustituida por la secuencia del cebador Forward, mientras que la región de color verde indica la región que es sustituida por la secuencia inversa del cebador Reverse.

1) Cebadores utilizados para clonar el gen *ppgIk* por PCR

A) Forward: (5'-ACGACGTAACGTAGACATATGCAGATCTTCGGC- 3')

B) Reverse: (5'-ACGGCCTGAGGTCAAGCTTGCGCTAGTGGGTC- 3')

2) Secuencia del producto de PCR

Cadena de DNA 5'----- 3'

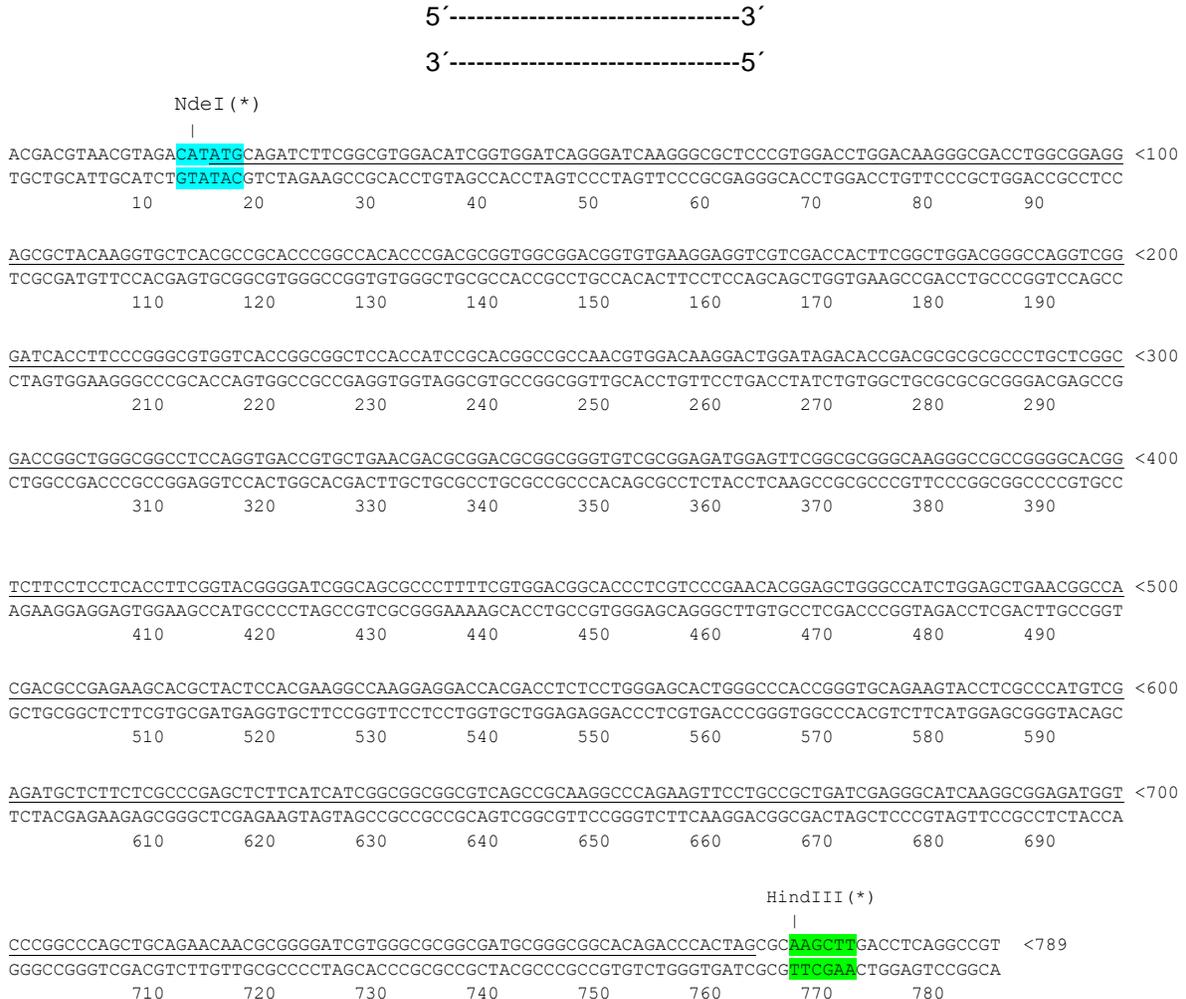
5' **NdeI**
acgacgtaacgtaga **catATG**CAGATCTTCGGCGTGGACATCGGTGGATCAGGGATCAAGGGCGCTCCCGTGGACCTGGA
CAAGGGCGACCTGGCGGAGGAGCGCTACAAGGTGCTCAGCCGCACCCGGCCACACCCGACGCGGTGGCGGACGGTGTGA
AGGAGGTCGTCGACCACTTCGGCTGGACGGGCCAGGTCGGGATCACCTTCCCGGGCGTGGTCACCGCGGCTCCACCATC
CGCACGGCCGCCAACGTGGACAAGGACTGGATAGACACCGACGCGCGCCCTGCTCGGCGACCGGCTGGGCGGCCCTCA
GGTGACCGTGTGAACGACGCGGACGCGCGGGTGTGCGGGAGATGGAGTTTCGGCGCGGGCAAGGGCCGCCGGGGCACGG
TCTTCTCCTCACCTTCGGTACGGGGATCGGCAGCGCCCTTTTCGTGGACGGCACCTCGTCCCGAACACGGAGCTGGGC
CATCTGGAGCTGAACGGCCACGACGCCGAGAAGCACGCTACTCCACGAAGGCCAAGGAGGACCACGACCTCTCCTGGGAG
CACTGGGCCACCGGGTGCAGAAGTACCTCGCCCATGTCGAGATGCTCTTCTCGCCCGAGCTCTTCATCATCGGCGCGG
CGTCAGCCGCAAGGCCAGAAGTTCTGCCGCTGATCGAGGGCATCAAGGCGGAGATGGTCCCGGCCAGCTGCAGAACA
ACGCGGGGATCGTGGGCGCGGCATGCGGGCGGCACAGACCCACTAGcgc **aagctt**gacctcagccgct 3'

HindIII

- El sitio de restricción de la enzima *NdeI* está sombreado de color azul
- El sitio de restricción de la enzima *HindIII* está sombreado de color verde
- Las bases de la región no codificante están en letras minúsculas y en letras mayúsculas están las bases que se encuentran en la región codificante del gen *ppgIk*.

- Las bases subrayadas corresponden a las secuencias de los cebadores utilizados.

Secuencia de ambas cadenas de DNA del producto de PCR



- El sitio de restricción de la enzima *NdeI* está sombreado de color azul
- El sitio de restricción de la enzima *HindIII* está sombreado de color verde
- Las bases que codifican el gen *ppgIk* están subrayadas.

11.3 Clonación del gen *ppgIk* en el plásmido pKU1021

La clonación del gen *ppgIk* en el plásmido pKU1021 (figura 22) se realizó empleando las enzimas de restricción *Hind*III y *Nde*I para generar así el plásmido pKPV40 (figura 23).

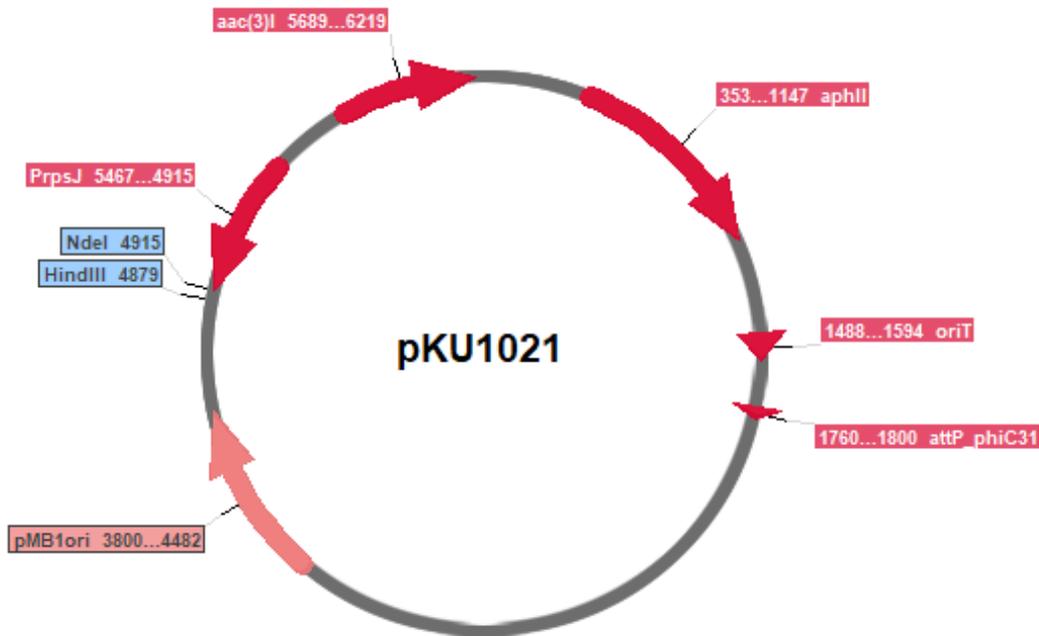


Figura 22. Mapa del plásmido pKU1021.

En color rojo se representan los genes o secuencias de interés. El sitio PrpsJ corresponde a la secuencia del promotor del operón *rpsJ*. El gen *aac(3)I* codifica una aminoglucósido N-acetiltransferasa que otorga resistencia a gentamicina. El gen *aphII* codifica una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa que otorga resistencia a kanamicina. La secuencia *oriT* indica el sitio de origen de la transferencia durante el proceso de conjugación. La secuencia *attP* corresponde al sitio de unión del fago ϕ C31. El sitio pMB1ori indica el sitio de origen de replicación del plásmido.

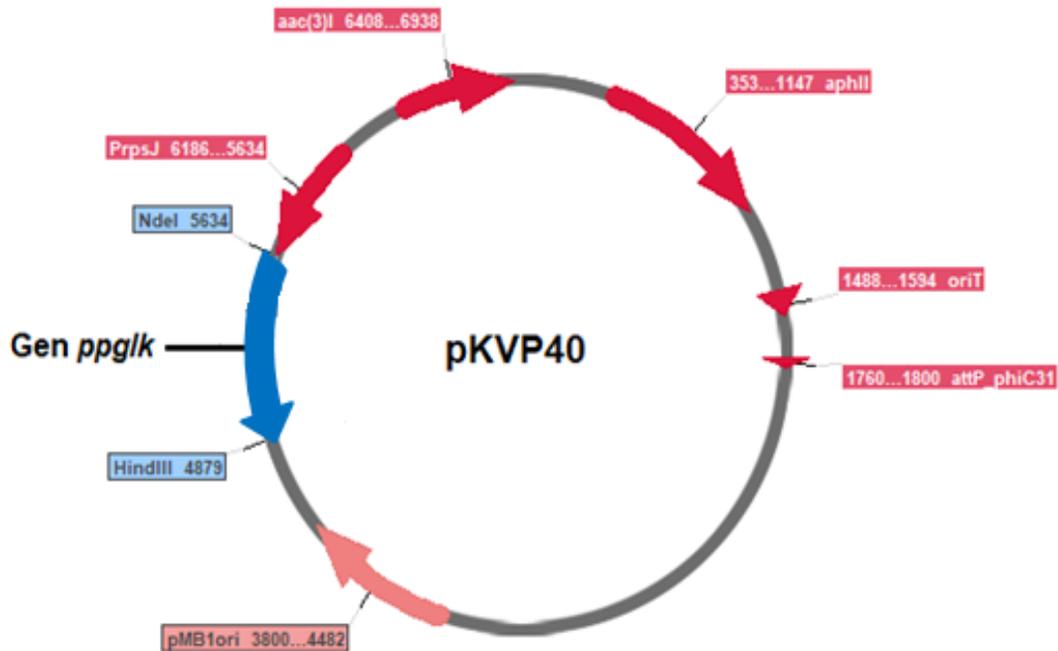


Figura 23. Mapa del plásmido pKVP40

En color azul se representa el sitio de clonación del gen *ppglk* y en color rojo se representan otros genes o secuencias de interés. La expresión del gen *ppglk* quedó bajo control del promotor del operón *rpsJ*. El gen *aac(3)I* codifica una aminoglucósido N-acetiltransferasa que otorga resistencia a gentamicina. El gen *aphII* codifica una aminoglucósido 3'-fosfotransferasa que otorga resistencia a kanamicina. La secuencia *oriT* indica el sitio de origen de la transferencia durante el proceso de conjugación. La secuencia *attP* corresponde al sitio de unión del fago ϕ C31. El sitio *pMB1ori* indica el sitio de origen de replicación del plásmido.