



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de un sistema de dos componentes que afecta la morfogénesis de *Streptomyces coelicolor*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Erick Eligio Arroyo Pérez

Dr. Luis Servín González
[Instituto de investigaciones Biomédicas](#)

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
[Instituto de investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Dimitris Georgellis
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Financiamiento

Este proyecto fue realizado con el apoyo del CONACyT para el fondo Ciencia Básica CB2013-01 para el proyecto no. 220020.

Durante la realización del proyecto fui beneficiado con la beca para estudiantes de posgrado del CONACyT (CVU 779774).

Agradecimientos

A mi tutor, el dr. Luis Servín González, por dejarme jugar en su laboratorio.

A la m. en C. Gabriela González Cerón, por su apoyo técnico y sus consejos en el laboratorio.

A la dra. Gloria Soberón y sus alumnos, por sus aportaciones en nuestros seminarios de grupo.

A la dra. Rosa Laura Camarena Mejía y el dr. Dimitris Georgellis, por sus aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la dra. Clelia Domenzain Reyna, por su ayuda en la microscopía.

A la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, a cargo de la dra. Laura Ongay Larios y la biol. Guadalupe Códiz Huerta, por sus servicios de secuenciación para este trabajo.

A la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM, localizada en el Instituto de Biotecnología, a cargo del dr. Alejandro Sánchez Flores, y al dr. Ricardo Alfredo Grande Cano y la m. en C. Veronica Jimenez Jacinto, por la secuenciación y análisis de transcriptomas.

A los dres. Sergio Sánchez Esquivel, Rodolfo García Contreras, Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos, David René Romero Camarena y Luis David Alcaraz Peraza, por sus comentarios a este manuscrito.

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	
2.1. El género <i>Streptomyces</i>	6
2.2. Crecimiento y diferenciación de <i>Streptomyces</i>	8
2.3. Morfogénesis en medio líquido	9
2.4. Sistemas de dos componentes	10
3. Antecedentes	13
4. Objetivo	16
5. Materiales y métodos	
5.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en este trabajo	17
5.2. Cultivos	19
5.3. Curvas de crecimiento	20
5.4. Geles de actividad de nucleasas	20
5.5. Medición del fenotipo de sedimentación de las diferentes cepas	20
5.6. Mutagénesis de los genes <i>sco5283</i> y <i>sco5282</i>	20
5.7. Clonación y expresión heteróloga de los genes <i>sco5282</i> y <i>sco5283</i>	21
5.8. Fosforilación <i>in vitro</i>	22
5.9. Extracción de RNA y secuenciación	22
6. Resultados	
6.1. Comparación morfológica y fisiológica entre la cepa silvestre M145 y la cepa mutante 2L12	24
6.2. Sedimentación de las mutantes del gen <i>sco5282</i>	27
6.3. Prueba de dominancia/recesividad del alelo <i>sco5282-D125G</i>	29
6.4. Fosforilación <i>in vitro</i> del sistema de dos componentes	30
6.5. Identificación de genes cuya expresión es afectada por el sistema de dos componentes	32
7. Discusión	38
8. Conclusiones	44
9. Perspectivas	45
10. Bibliografía	46

1. Resumen

Streptomyces es un género de bacterias Gram positivas de alto contenido de G+C que se caracteriza por tener un complejo ciclo de vida. Éste comienza con la germinación de esporas que forman hifas ramificadas en forma de un micelio vegetativo adaptado a crecer dentro del suelo. El micelio vegetativo madura y sale a la superficie, formando micelio aéreo, el cual dará origen a las nuevas esporas.

El nivel de ramificación y de compactación de las hifas varía entre las distintas especies, pero en algunos casos, como el de *Streptomyces coelicolor*, las hifas se agregan y forman cúmulos tan compactos que resulta casi imposible cultivarlas en medio líquido sin ayuda de agentes dispersantes, como sacarosa o polietilenglicol, que aumenten la viscosidad del medio. Otras especies, como *Streptomyces venezuelae*, forman un micelio más laxo, con pocos agregados y pueden crecer fácilmente en medio líquido.

En el laboratorio se había aislado una cepa de *S. coelicolor*, 2L12, capaz de crecer de forma dispersa, incluso en medios sin sacarosa. En este trabajo se caracterizó fisiológica y genéticamente esta cepa.

Se encontró que la principal diferencia entre la cepa 2L12 y la silvestre es el crecimiento en cúmulos más pequeños y fragmentados. También se encontró que esta cepa no tenía defectos en el crecimiento, ya sea en medios con o sin sacarosa. Aunque sí se encontraron diferencias en la producción de antibióticos, éstas eran dependientes de la morfología, pues en un medio espeso en el que se fuerza a ambas cepas a crecer de forma dispersa, las diferencias desaparecieron.

El genoma de esta cepa reveló una mutación que ocasiona una sustitución en el dominio HAMP de una cinasa de histidinas de un sistema de dos componentes no descrito. Cuando se transfiere este alelo a un fondo silvestre se demostró que esta mutación es suficiente para causar un crecimiento disperso. Comparando el fenotipo de mutantes nulas en los componentes del sistema se descubrió que la sustitución de la cepa 2L12 no inactiva a la cinasa ni la vuelve inespecífica. Los ensayos con cepas merodiploides homo- y heterocigóticas para ambos alelos del sistema demostraron que esta mutación es recesiva.

Se evaluó la actividad *in vitro* de la cinasa silvestre y mutante y se encontró que la forma mutante fosforila más rápido su regulador de respuesta.

Se compararon los transcriptomas de ambas cepas, y se encontró una adaptación metabólica a las diferentes morfologías durante el crecimiento, así como posibles genes blanco que podrían explicar el fenotipo de la cepa 2L12.

2. Introducción

2. 1. El género *Streptomyces*

Streptomyces es un género de bacterias filamentosas dentro del filo de las actinobacterias que presenta una morfología y un ciclo de vida complejos. Estas bacterias crecen en forma de un micelio compuesto de hifas adaptadas a crecer en la tierra, que se alargan y se ramifican después de germinar de una espora. Las hifas que se entretrejen para formar el micelio (llamado vegetativo), tienen pocos septos que las dividen en células o compartimientos, cada uno con muchas copias del cromosoma. Cuando se agotan los nutrientes del sustrato, comienza un programa de diferenciación para que el micelio crezca hacia arriba, fuera de la tierra, en forma de micelio aéreo. El micelio vegetativo sufre una autólisis que libera nutrientes para que el micelio aéreo termine de diferenciarse en cadenas de esporas pigmentadas unigenómicas, que son capaces de soportar la desecación y temperaturas altas. Una vez que las esporas se encuentren nuevamente en condiciones ideales para germinar se reinicia el ciclo (Fig. 1A).¹

La diferenciación del micelio vegetativo al micelio aéreo esporulante está fuertemente ligada a la producción de metabolitos secundarios, muchos de ellos con actividad antibiótica. Estos compuestos previenen el crecimiento de competidores que pudieran aprovechar los nutrientes liberados por la autólisis del micelio vegetativo e interrumpir la formación de las esporas (Fig. 1A). Así, las mutantes incapaces de diferenciarse a micelio aéreo (denominadas *bld*, del inglés *bald*, por su fenotipo liso y brillante) generalmente son también incapaces de producir metabolitos secundarios.² Los antibióticos cuya síntesis está codificada en el cromosoma de *Streptomyces coelicolor*, el organismo modelo del género, son la actinorrodina (ACT) que le da el color azul característico a las colonias de este organismo, las prodigiosinas (RED) de color rojo, el antibiótico dependiente de calcio (CDA) y un policétido descubierto recientemente de color amarillo (yCPK). También es capaz de producir metilenomicina por un grupo de genes ubicados en el plásmido lineal SCP1.¹

A causa de la gran diversidad de compuestos con actividad biológica que sintetizan, este grupo de bacterias ha sido aprovechado para la producción de la mayor parte de los antibióticos de uso médico.³ También se ha explorado la capacidad de algunos miembros del género para producir proteínas heterólogas a gran escala.⁴

El crecimiento miceliar de *Streptomyces* representa un obstáculo para su cultivo en medio líquido, tanto a pequeña como a gran escala. Desde que germinan, las hifas tienden a agregarse y formar cúmulos que se sedimentan con facilidad (Fig. 1B). Mientras van creciendo y ramificándose, se van enredando y los cúmulos se van apretando, lo que limita la entrada de nutrientes al interior de éstos.⁵ Para su crecimiento a nivel industrial, los cúmulos son inconvenientes porque crecen más lento que las formas dispersas,⁶ y presentan peor desempeño en la producción de proteínas heterólogas.⁷ Sin embargo, los cúmulos se prefieren para producir antibióticos, ya que es en el interior de éstos donde se inicia el metabolismo secundario.^{8,9}

La morfología en medio líquido varía considerablemente entre diferentes especies. Por ejemplo, *Streptomyces venezuelae* forma cúmulos muy pequeños, muy dispersos y que se fragmentan con facilidad (Fig. 1B). *Streptomyces albus* crece como cúmulos grandes pero dispersos, denominados tapetes miceliarios. *S. coelicolor* forma cúmulos muy densos y compactos, con una carencia nutricional considerable al interior⁹ (Fig. 1B). Por esta razón a los cultivos de *S. coelicolor* se les añaden agentes espesantes u objetos físicos, que aumentan la fricción y las fuerzas de ruptura, disminuyendo el apelmazamiento de las hifas.¹⁰

Otra diferencia importante es la capacidad de algunos miembros del género de esporular en medio líquido. Algunos lo hacen únicamente en medios limitados de nutrientes, como *S. griseus*. Otros, como *S. venezuelae*, lo hacen bajo casi cualquier condición. *S. coelicolor*, en cambio, no esporula en medio líquido bajo ninguna condición conocida.⁹

2.2. Crecimiento y diferenciación de *Streptomyces*

La diferenciación celular que ocurre durante el ciclo de vida de *Streptomyces* ha sido objeto de estudio por muchos años. Tradicionalmente las etapas de la diferenciación se dividen en desarrollo del micelio aéreo y esporulación. Cuando los nutrientes del medio son limitados, o bien como respuesta a ciertos tipos de estrés, comienza la diferenciación a micelio aéreo: las hifas se recubren con una capa de proteínas amiloides

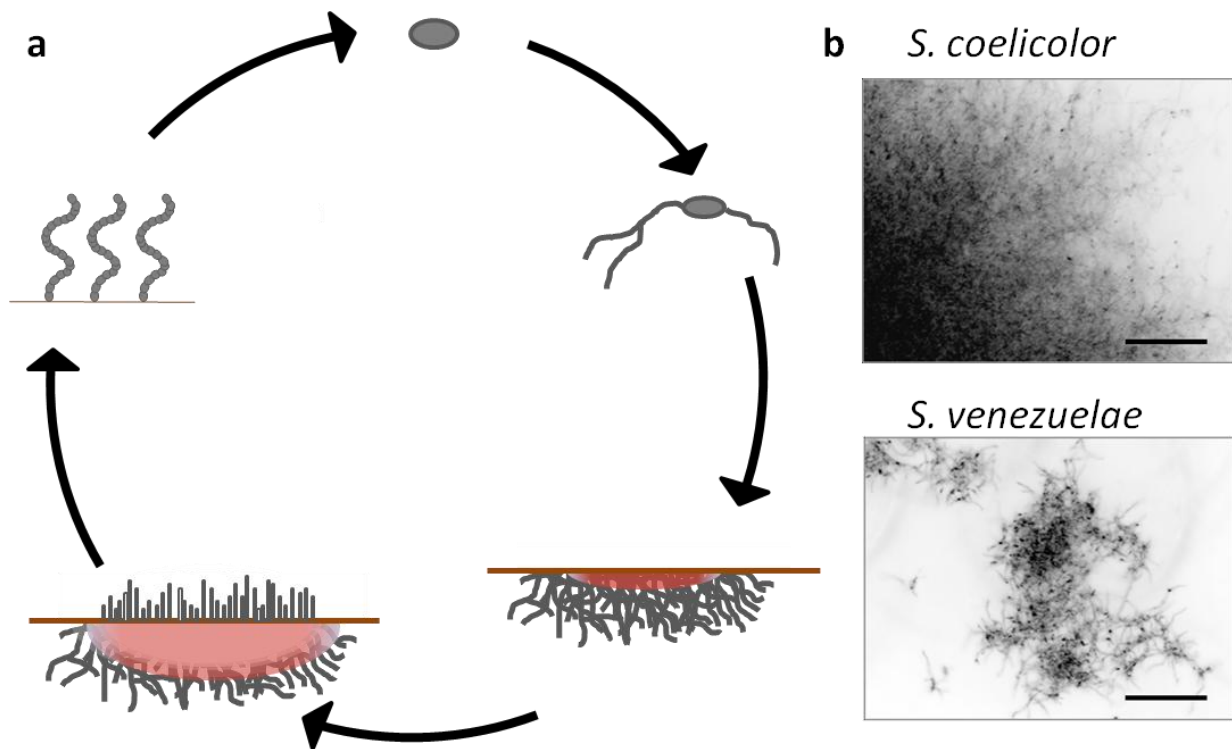


Figura 1. Ciclo de vida y morfología de *Streptomyces*. A) Ciclo de vida. Las esporas individuales germinan cuando encuentran un medio rico, dando lugar a un crecimiento como hifas que se ramifican y forman un micelio vegetativo. Conforme se acaban los nutrientes, éste comienza a producir antibióticos y eventualmente a comenzar la diferenciación a micelio aéreo, erigiendo hifas blancas e hidrofóbicas sobre la superficie del suelo. El micelio vegetativo comienza a lisarse para alimentar al micelio aéreo. El micelio aéreo eventualmente va a dividirse y generar largas cadenas retorcidas de esporas unigenómicas. b) Morfología en medio líquido de *S. coelicolor* y *S. venezuelae*. La barra representa 20 μm .

hidrofóbicas (chaplinas y rodlinas), y se secreta un péptido surfactante que permite la erección de las hifas hacia el aire.¹¹ También ocurren cambios en la maquinaria de división celular: se forma un septo basal que separa el citoplasma de las hifas esporogénicas del resto del micelio y comienzan a expresarse proteínas que van a llevar a cabo la división celular esporogénica (FtsZ, SsgA, MreB, etc.).¹²

Todo esto ocurre de manera concertada con una autólisis del micelio vegetativo, en un proceso que ha sido comparado con la muerte celular programada de eucariontes.¹³ Así, en esta fase del crecimiento hay una liberación característica de nucleasas inespecíficas que degradan el DNA de las células lisadas,¹³ tanto en cultivos en medio sólido¹⁴ como en medio líquido.⁸

Se ha propuesto que esta autólisis sirve para liberar nutrientes que puedan aprovechar las hifas aéreas en la formación de esporas. En esta fase también se liberan antibióticos para evitar el crecimiento de organismos competidores. De hecho, la *N*-acetil glucosamina derivada de la pared celular del micelio lisado es una señal activadora del metabolismo secundario y la síntesis de antibióticos.¹⁵

Durante la esporulación, las hifas aéreas esporogénicas engrosan su pared celular, cesan la extensión de las hifas y comienzan un proceso de división celular similar al que ocurre en bacterias unicelulares como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*: FtsZ señala la posición de múltiples septos a lo largo de la hifa, MreB coordina la remodelación de la pared alrededor de esos septos, mientras que ParAB y FtsK coordinan la segregación de los cromosomas en cada compartimiento.¹¹ Finalmente las esporas acumulan un pigmento, en el caso de *S. coelicolor* de color gris. Las mutantes incapaces de esporular se quedan del color blanco del micelio aéreo, razón por la cual los genes identificados por estas mutaciones han recibido el nombre *whi* del inglés *white*. Muchos de estos genes codifican reguladores transcripcionales. WhiG es un factor σ , que activa otros factores de transcripción particulares de actinobacterias, como WhiB y WhiD, de la familia de proteínas Wbl (*WhiB-like*), o WhiA. Otros factores que promueven la esporulación son factores sigma que responden a estrés como σ^B ,¹⁶ σ^F ,¹⁷ σ^L y σ^M ,¹⁸ o el regulador de respuesta huérfano RamR.¹⁹

Además de estos dos procesos, se ha propuesto que el micelio vegetativo sufre otro proceso de diferenciación. Se ha observado que hay un primer micelio, después de la germinación, que está muy segmentado, y que sufre una primera muerte celular para dar origen a un segundo micelio vegetativo, con menos divisiones entre las hifas, y que es el que va a iniciar la producción de antibióticos y la diferenciación a micelio aéreo.¹⁴ Así, la muerte celular de la que se habló hace unos párrafos correspondería a la segunda muerte celular que sufre este micelio vegetativo tardío. Aunque en condiciones de laboratorio el primer micelio vegetativo tiene una duración muy corta (de menos de 15 horas), cultivos de *Streptomyces* en suelos de bosque presentan esta forma hasta por un mes, sugiriendo que ésta podría ser la forma predominante del micelio de *Streptomyces* en la naturaleza.²⁰

En medio líquido, las hifas de *Streptomyces* crecen principalmente en forma de micelio vegetativo; las especies que pueden esporular en medio líquido lo hacen sin que haya una diferenciación a micelio aéreo, con la única diferencia de que las esporas formadas tienen una pared más delgada y menos organizada que la de esporas formadas en medio sólido.⁹ Sin embargo, se ha visto que en medio líquido sí ocurre una transición entre micelio vegetativo temprano y tardío, separados por una muerte celular, como ocurre en medio sólido.⁸ El micelio vegetativo tardío es el responsable de producir antibióticos en medio líquido, crece como hifas multigenómicas, y en el caso de *S. coelicolor*, forma los cúmulos que llegan a medir milímetros de diámetro.

2.3 Morfogénesis en medio líquido

Hay muchos factores que contribuyen a la morfología del micelio en medio líquido. Por un lado, la cohesión entre las hifas de un cúmulo se debe, al menos en parte, a una matriz extracelular poco caracterizada. Se sabe que esta matriz contiene DNA extracelular, seguramente proveniente de la muerte de las células del interior del cúmulo.²¹ También se sabe que el polímero sintetizado por el producto del gen *csIA*, un polímero tipo celulosa, contribuye a la cohesión de la matriz extracelular; mutantes $\Delta csIA$ de *S. coelicolor* forman cúmulos dispersos, similares a tapetes miceliarios.²² Un fenotipo similar se obtiene al mutar los genes *matAB*, que codifican posibles sintetetasas de polisacáridos extracelulares, y podrían ser análogos a los responsables de construir el *biofilm* de otras bacterias.²³ El papel de esta matriz extracelular en el crecimiento natural de *Streptomyces* (*i. e.* en el suelo) no está del todo claro; aunque *csIA* contribuye a mantener la morfología de las hifas esporogénicas,²² *matAB* parece no ser importante en la diferenciación en medio sólido.²³

Hay otros factores genéticos que afectan el crecimiento, y en consecuencia la morfología del cultivo en medio líquido. La familia de proteínas SALP está presente exclusivamente en actinobacterias formadoras de esporas; sus miembros tienen un papel importante en diferentes puntos de la esporulación, presumiblemente por interacciones con proteínas involucradas en la remodelación del peptidoglicano, o con proteínas del divisoma.²⁴ Por ejemplo, SsgB es responsable de reclutar a FtsZ a la pared de las hifas que se van a convertir en esporas para comenzar la división celular esporogénica.²⁵ SsgA, la proteína fundadora de la familia, es necesaria para la esporulación en *S. coelicolor*,²⁶ y su ausencia tiene efectos pleiotrópicos en la expresión de muchos genes reguladores tanto del crecimiento vegetativo como aéreo, además de causar aberraciones en la formación de septos, la segregación del cromosoma y la ramificación de las hifas.²⁷

Por otro lado, la sobreexpresión de SsgA estimula la división celular y la ramificación, lo que hace que el micelio en medio líquido forme cúmulos pequeños y dispersos.²⁶ También hace a las células más propensas a la lisis, probablemente debido a su papel en la remodelación de la pared celular.⁹ Por sus efectos en la morfología de cultivos de *Streptomyces* en medio líquido, la sobreexpresión de *ssgA* ya ha sido explorada como estrategia para mejorar la producción a nivel industrial de compuestos y proteínas en estos organismos.⁷

Otros reguladores que modifican la morfología en medio líquido participan en el crecimiento del micelio vegetativo. En esta etapa, las hifas crecen activamente únicamente en las puntas. Aquí se localiza un complejo multiproteico conocido como centro organizador de la punta (TIPOC). En el TIPOC actúan proteínas ya mencionadas como la sintetasa de exopolisacárido CslA, y SsgA, proteínas importantes para la síntesis de la envoltura celular como el sistema de secreción Tat, y la proteína DivIVA.⁹

DivIVA es esencial para el crecimiento y la organización del TIPOC mediante interacciones con la proteína de andamiaje Scy.⁹ Cuando se bloquea la síntesis de la pared celular por agentes externos, ya sean químicos o físicos, la cinasa AfsK fosforila a DivIVA y se disocia del TIPOC. Las moléculas de DivIVA que quedan en las paredes laterales de las hifas pueden formar nuevos centros de crecimiento, dando lugar a ramificaciones. La expresión de un alelo constitutivamente activo de AfsK tiene como consecuencia el arresto del crecimiento en las puntas, seguido de la aparición de varias ramas laterales.²⁸

AfsK es una cinasa de serinas y treoninas que se encontró gracias a su sustrato AfsR, que es un regulador transcripcional. Inicialmente *afsR* fue descubierto por su capacidad de complementar el fenotipo de una mutante en *afsB* de *S. coelicolor*, un gen necesario para la síntesis de factor A.²⁹ El factor A es un compuesto secretado que se ha estudiado en *S. griseus* por su papel en la regulación de la diferenciación a micelio aéreo y de la activación del metabolismo secundario. En cambio, en *S. coelicolor*, la vía de señalización del factor A parece afectar únicamente el metabolismo secundario y no la diferenciación;³⁰ AfsR promueve la transcripción de vías específicas de biosíntesis de los antibióticos ACT y RED en *S. coelicolor*.¹¹ Así, esta vía de regulación del metabolismo secundario podría estar relacionada con la regulación del crecimiento mediante la cinasa AfsK.

2.4 Sistemas de dos componentes

Una estrategia muy común para responder a señales del ambiente es mediante unas proteínas denominadas reguladores de respuesta que regulan procesos celulares dependiendo de su estado de fosforilación, generalmente a nivel de transcripción de genes. La mayoría de las veces estas proteínas se fosforilan por una proteína cinasa de histidinas. Las cinasas de histidinas, o cinasas sensoras, responden a estímulos extracelulares o citoplasmáticos autofosforilándose en un residuo de histidina, y posteriormente transfiriendo el grupo fosfato a un aspartato conservado en el regulador de respuesta. Cuando la cinasa no está fosforilando al regulador de respuesta, tiene actividad de fosfatasa sobre el mismo. Generalmente, pero no siempre, las cinasas de histidinas tienen dominios transmembranales y requieren dimerizarse para funcionar.³¹

El genoma de *S. coelicolor* tiene 100 genes con una función predicha de cinasa de histidinas y 87 con función de regulador de respuesta.³² Son pocos los sistemas de dos componentes de los que se conoce la señal a la que responden. Por ejemplo, el sistema CseB-CseC responde a daños en la pared celular, ya sea por lisozima o por antibióticos. La activación del regulador de respuesta CseC promueve la transcripción de su propio operón,

el cual también codifica un factor σ^E . Éste a su vez promueve la transcripción de genes que ayudan a enfrentar el daño a la pared celular.³³

Otro sistema estudiado es el de respuesta a la limitación de fosfato, mediada por las proteínas PhoP-PhoR. Cuando baja la concentración de fosfato inorgánico, se fosforila la proteína PhoP y activa la transcripción de genes de proteínas que reciclan el fosfato orgánico (como la fosfatasa alcalina PhoA) o que forman un sistema transportador de alta afinidad (como PstS).³⁴ La concentración de fosfatos también tiene efectos sobre el metabolismo secundario. Específicamente, niveles elevados de fosfato inhiben la síntesis de antibióticos, y este proceso depende de *phoP*, aunque el regulador de respuesta no se une directamente a los promotores de las proteínas activadoras de la vía de síntesis de cada antibiótico.³⁵

En años recientes se ha observado que el regulón *pho* en *Streptomyces* se entrecruza con la regulación del metabolismo secundario dependiente de AfsR, mediante el control de la transcripción del activador de la síntesis de antibióticos *afsS*. También se ha visto que PhoP puede unirse tanto al promotor del regulador de respuesta huérfano GlnR, que responde a limitación de nitrógeno, como al de algunos de los blancos de éste, sugiriendo más entrecruzamiento entre las señales nutricionales y el metabolismo secundario.³⁶ Curiosamente, la disminución en la concentración de fosfato en el medio también es una señal para la esporulación, por lo menos en medio líquido,⁹ por lo que la respuesta a limitación de fosfato podría tener un papel también en la morfogénesis y el desarrollo.

Hay otros sistemas de dos componentes que han sido estudiados por sus efectos en la síntesis de antibióticos. El sistema AbsA1-AbsA2 y el sistema CutR-CutS son represores de la síntesis de ACT y RED en *S. coelicolor* y *S. lividans*.³⁴ Los sistemas AbrA1-AbrA2 y AbrC1-AbrC2-AbrC3 tienen efectos opuestos sobre la producción de ACT, RED y CDA, pero también sobre la diferenciación a micelio aéreo.³⁷

Los sistemas DraR-DraK y AfsQ1-AfsQ2 son reguladores pleiotrópicos de la síntesis de antibióticos cuyo sitio de unión a DNA ha sido determinado a nivel molecular.^{38, 39} AfsQ1-AfsQ2 activa las cuatro vías de síntesis de antibióticos codificadas en el cromosoma de *S. coelicolor*,⁴⁰ mientras que DraR-DraK activa la síntesis de ACT, pero reprime la síntesis de RED y de yCPK.³⁹ Curiosamente, las mutaciones nulas de estos genes tienen un efecto dependiente del medio en que crecen. La mutante $\Delta draR-draK$ muestra un fenotipo exacerbado en medios con altas concentraciones de fuentes de nitrógeno,³⁹ mientras que la mutante $\Delta afsQ1-afsQ2$ sólo muestra un fenotipo característico en medio mínimo con glutamato como fuente de nitrógeno.³⁸ En el caso de *afsQ1-afsQ2* esto podría estar relacionado con el hecho de que el regulador de respuesta AfsQ1 puede unirse a los promotores blanco del regulador huérfano GlnR y competir con éste. AfsQ1 puede además regular la transcripción de *pstS*, blanco de PhoP, y de los genes reguladores de la diferenciación a micelio aéreo y de esporulación *bldM* y *whiD*. También regula la transcripción del regulador de respuesta *abrC3* del sistema AbrC1-AbrC2-AbrC3.³⁸ Todo esto

sugiere que los sistemas de dos componentes forman una red global de regulación muy entrelazada, junto con otros reguladores transcripcionales.

3. Antecedentes

Un estudio de evolución *in vitro* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizó la fuerza de gravedad para seleccionar mutantes que presentaran un crecimiento multicelular, formando cúmulos. El método de selección se basó en el hecho de que los cúmulos multicelulares se deberían sedimentar más rápidamente que las células individuales. Entonces, al dejar asentar el cultivo se recuperó una fracción del volumen del fondo, con la cual se volvió a inocular un nuevo cultivo, ejerciendo así una presión selectiva artificial para obtener los cúmulos multicelulares.⁴¹

En el laboratorio adaptamos esta técnica de sedimentación, pero aplicando la selección contraria, para obtener cepas mutantes de *S. coelicolor* que presenten un crecimiento disperso en medio líquido. Esta selección se basó en el hecho de que *S. coelicolor* naturalmente crece en medio líquido en forma de cúmulos densos de micelio. Es decir, se dejaron asentar cultivos de la cepa silvestre, crecidas en un medio con sacarosa como agente dispersante, y se tomaba el volumen superior para inocular medio fresco. La concentración de sacarosa se fue disminuyendo gradualmente, hasta encontrar algunas mutantes capaces de crecer de forma considerablemente más dispersa que la cepa silvestre y que tardaban un tiempo considerable en sedimentarse, a diferencia de la cepa silvestre.

La cepa 2L12 fue aislada de esta manera, y mostró un crecimiento más disperso que la cepa silvestre incluso en ausencia de sacarosa. Esta diferencia en su morfología fue la única diferencia fenotípica aparente respecto a la cepa silvestre, por lo menos en los medios completos en los que se cultivó (LB, YT2x, MS). Esto sugirió que la regulación del metabolismo secundario y de la diferenciación permanecen intactos en la cepa 2L12.

Se secuenció el genoma de esta cepa y se encontró una mutación en la región codificante del gen *sco5282*, que codifica una cinasa de histidinas membranal, la cual ocasiona una sustitución del ácido aspártico en la posición 125 de la secuencia de la proteína por una glicina (D125G). Río arriba del gen *sco5282* se encuentra el gen *sco5283*, con función predicha de regulador de respuesta. El codón de término de *sco5283* se sobrelapa con el codón de inicio de *sco5282*, lo que sugiere que ambos genes forman un operón y están acoplados traduccionalmente (Fig. 2a). Estos genes se encuentran entre otros dos que codifican enzimas del metabolismo primario: la sintetasa de espermedina SpeE y una subunidad de la deshidrogenasa de α -cetoglutarato, que participa en el ciclo de Krebs. La organización de estos cuatro genes está conservada en muchas especies de *Streptomyces* (Fig. 2a). En algunas especies también hay un quinto gen conservado que codifica una transferasa de glutatión. En la secuencia del genoma también se identificaron otras dos mutaciones: una resulta en una sustitución T251A de la cinasa de serinas/treoninas codificada por el gen *sco4820*. La otra es una inserción de una base en la región entre los genes *sco6571* y *sco6572*. Sin embargo, no hay mucha certeza en la secuencia de estas mutaciones, pues no todas las lecturas de estas regiones indicaban su presencia. Por esta razón, en este trabajo nos enfocamos en la mutación del gen *sco5282*.

La función del sistema de dos componentes Sco5282-Sco5283 es desconocida. La cinasa está anotada en el genoma por su similitud a AfsQ2, aunque también es parecida a otras cinasas que realizan diferentes funciones, como DraK y CseC. En un trabajo en el que se buscaron homólogos del sistema CssS-CssR de *Bacillus subtilis*, que responde al estrés de secreción de proteínas induciendo la producción de la proteasa HtrA, se evaluó al sistema Sco5282-Sco5283 entre otros. Sin embargo, aparentemente este sistema no respondió a la secreción de proteínas, a diferencia del sistema Sco4156-Sco4155, el cual indujo la transcripción de varios homólogos de *htrA*.⁴²

La cinasa Sco5282 tiene dos dominios transmembranales en el extremo amino-terminal, con un asa extracelular de apenas 5 aminoácidos, que es poco probable que constituya un dominio sensor. Además, cuenta con un dominio HAMP entre los dominios transmembranales y el dominio de fosforilación. Este dominio está presente en 31 de las 100 cinasas de histidinas de *S. coelicolor*, y esta misma organización es la que tienen algunas cinasas ya mencionadas como DraK, AfsQ2 y CseC.³² El dominio HAMP está formado por dos hélices α , denominadas AS1 y AS2, que interaccionan entre sí y con las hélices AS1' y AS2' del otro monómero cuando

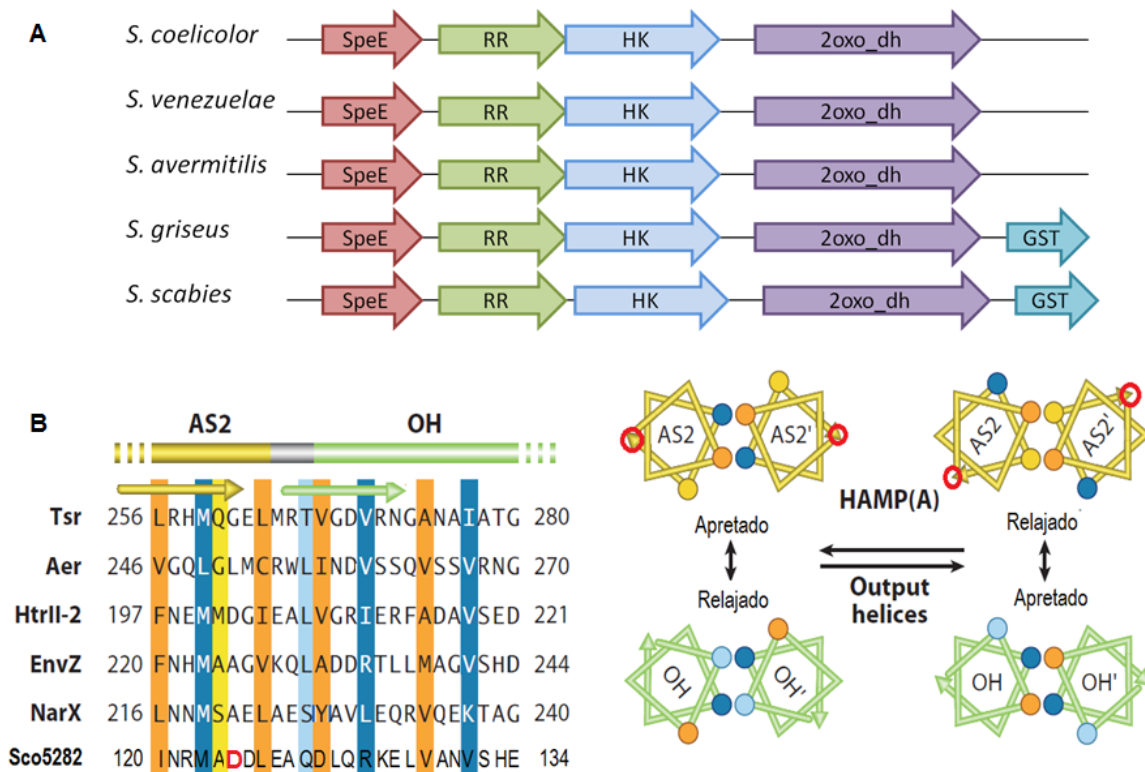


Figura 2. Organización del operón *sco5283-5282* y sus ortólogos en diferentes especies de *Streptomyces*. A) Región cromosómica donde se localiza el operón *sco5283-5282* y sintenia presentada en varias especies de *Streptomyces*. SpeE, sintasa de espermidina; RR, regulador de respuesta; HK, cinasa de histidinas; 2oxo_dh, deshidrogenasa de α -cetoglutarato; GST, *S*-transferasa de glutatión. B) Estructura secundaria del dominio HAMP en varias cinasas de histidinas y la cinasa Sco5282; estructura primaria del lado izquierdo y modelos de rueda de la estructura secundaria del lado derecho. Los colores del lado izquierdo corresponden a los círculos del lado derecho. En rojo el residuo D125 en la estructura primaria. Adaptado de ⁴³.

éstos dimerizan. Las repeticiones de aminoácidos conservados en héptadas tienen además un titubeo de fase (*phase stutter*), de forma que las hélices pueden reemplazar los contactos que están formando por otros con los aminoácidos adyacentes, dando una rotación respecto al eje de la hélice (Fig. 2B). Se ha propuesto que esta rotación de las hélices AS2 y AS2' se transmite a las hélices de salida (OH y OH') del dominio de fosforilación, de forma que la señal percibida en el dominio transmembranal se traduce en un cambio conformacional del dominio de fosforilación.⁴³

La mutación de la cepa 2L12 reemplaza el aspartato 125 por una glicina (D125G). Este residuo está en la parte distal a la membrana de la hélice AS2, y podría ocasionar un quiebre de la hélice. Curiosamente, mutaciones similares pero en la hélice AS1 resultaron en la activación de la cinasa PhoQ de *Salmonella enterica*.⁴⁴

4. Objetivo

Estudiar el papel del sistema de dos componentes constituido por los productos de los genes *sco5283* y *sco5282* en la morfología de *S. coelicolor* en medio líquido.

Objetivos particulares

- Caracterizar morfológica y fisiológicamente la cepa 2L12 mediante observación microscópica y curvas de crecimiento.
- Confirmar que el alelo *sco5282-D125G* es el responsable de la morfología alterada en la cepa 2L12 mediante su transferencia a un fondo genético silvestre.
- Obtener mutantes nulas de los genes del operón *sco5283-sco5282* mediante la técnica de *PCR targeting*⁴⁵ adaptada para *Streptomyces*.⁴⁶
- Realizar pruebas de complementación con los alelos silvestre y mutante (D125G).
- Medir cuantitativamente la facilidad para sedimentarse de estas cepas.
- Purificar a la cinasa sensora Sco5282 (silvestre y mutante) y al regulador de respuesta Sco5283 y realizar ensayos de fosforilación *in vitro* con el sistema de dos componentes silvestre y mutante
- Evaluar el transcriptoma de la cepa con el fenotipo disperso ocasionado por la mutación *sco5282-D125G*

5. Materiales y métodos

5.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en este trabajo

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli*

Nombre	Genotipo	Referencia
DH5 α	F ⁻ , $\Delta(\text{argF-lac})169$, $\phi 80\text{dlacZ58(M15)}$, ΔphoA8 , glnX44(AS) , λ , deoR481 , rfbC1? , gyrA96(NalR) , recA1 , endA1 , thiE1 , hsdR17	47
ET12567/pUZ8002	F ⁻ dam-13::T9 , dcm-6 , hsd-M pUZ8002	48
BW25113	F ⁻ , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787(::rrnB-3)}$, λ , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, hsdR514	45
BL21 Rosetta 2 TM	F ⁻ $\text{ompT hsdS}_B(\text{r}_B^- \text{m}_B^-)$ $\text{gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam}^R)$	49

Tabla 2. Cepas de *Streptomyces coelicolor*

Nombre	Genotipo	Referencia
M145	A3(2) SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	1
2L12	Derivada de M145 con crecimiento disperso	Este trabajo
M145-D125G	M145 sco5282-D125G	Este trabajo
IB94	M145 $\Delta\text{sco5282::aac(3)IV}$	Este trabajo
IB95	M145 $\Delta\text{sco5282}$	Este trabajo
IB96	M145 $\Delta\text{sco5283-sco5282::aac(3)IV}$	Este trabajo
IB97	M145 $\Delta\text{sco5283-sco5282}$	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos

Nombre	Descripción	Referencia
StCB12	Cósmido derivado de SuperCos 1, Kan ^R Ap ^R , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) que incluye el gen <i>sco5282</i>	50
StCB12-D125G	StCB12 <i>sco5282-D125G</i> , obtenido por recombinación con la cepa 2L12	Este trabajo
pIJ773	Apra ^R , contiene el cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , flanqueado por sitios FRT	46
pIJ784	Apra ^R , fragmento con cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , flanqueado por las regiones aledañas del gen <i>bla</i> del SuperCos 1	46
pIJ790	Plásmido de recombinación de λ -RED inducible por L-arabinosa, Cm ^R ; replicación sensible a temperatura	46
pCP20	Ap ^R Cm ^R , codifica la recombinasa sitio-específic FLP; replicación sensible a temperatura	45
pIJ6902	Apra ^R Thi ^R , vector integrativo con promotor P _{tipA} inducible por tiostreptón	51
pIJ6902-5282D125G	<i>sco5282-D125G</i> clonado bajo el promotor P _{tipA} en pIJ6902	Este trabajo
pET28a	Kan ^R , vector de expresión en <i>E. coli</i> con promotor T7	49
pET28a-5282solWT	<i>sco5282</i> ₈₀₋₃₇₅ clonado en el vector pET28a, poniendo una etiqueta de histidinas del lado amino	Este trabajo
pET28a-5282solD125G	<i>sco5282</i> ₈₀₋₃₇₅ D125G clonado en el vector pET28a, poniendo una etiqueta de histidinas del lado amino	Este trabajo
pET28a-RR	<i>sco5283</i> clonado en el vector pET28a, poniendo una etiqueta de histidinas del lado amino	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'→3'	Referencia
SCO5282For	GCA CGG CGT GGG CTA CGC CTT GGA GAC GCC GAC GCC ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC	Este trabajo
SCO5282Rev	CGC AGT GGA TCT TGA CGC TCC GCT TCG AAC CCT ACG TCA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	Este trabajo
SCO5282Up	GTG GAC AGC CAC ATC AAG G	Este trabajo
SCO5282Down	GTT CAT CGT CGC GTA AGT CA	Este trabajo
SCO5283For	CCA CGG ATT CCG GAA AGC ACA CCT CAG GGG CGG GCG ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC	Este trabajo
SCO5283Up	GGA TCA TTC AAG CGT CAA GC	Este trabajo
cl5282For	CAT ATG AGC AGC AGA GGA CGG GA	Este trabajo
cl5282Rev	GAA TTC AAC CGG ACG TCG ACG GCA	Este trabajo
cl5282Sol	CAT ATG TCG CTG ACC GCC CCG CTG	Este trabajo
cl5283For	CAT ATG GAG CAG ACA CAG ACC TCC	Este trabajo
cl5283Rev	GAA TTC ATG GCG TCG GCG TCT CC	Este trabajo
ATTB_FOR	CCA TGC ATG CAC AGC TCA GGC AGA CGT TA	52
ATTB_REV	GTG TGC ATG CGA CCG GTA CTT GTC ATG G	52

5.2. Cultivos

Se obtuvieron esporas de las cepas de *S. coelicolor* cultivadas en medio MS (manitol 2%, harina de soya 2%, agar 2%, preparado con agua de la llave). Las esporas se preservaron en glicerol al 20%, a -20°C, o se utilizaron inmediatamente después de cosechadas para inocular los medios para las curvas de crecimiento. Los medios líquidos utilizados en los experimentos fueron YT2x (Bacto-triptona 1.6 %, extracto de levadura 1.0%, NaCl 0.5%), LB+sacarosa (bacto-triptona 1 %, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, sacarosa 25%) y YEME (extracto de levadura 0.5%, bacto-peptona 0.3%, extracto de malta 0.3%, glucosa 1%, sacarosa 34%).

5.3. Curvas de crecimiento

Se inocularon 200 mL de medio (YT2x o YEME) en matraces de 1 L con esporas recién cosechadas a una densidad óptica $OD_{450}=0.06$. A los tiempos indicados se tomaron 10 mL del cultivo y se filtraron en filtros pesados previamente con tamaño de poro de 0.45 μm , que se secaron hasta tener peso constante para determinar el peso seco. Se reservó 1 mL adicional de cultivo para lisar el micelio con KOH 1 M y medir absorbancia a 640 nm para determinar la concentración de actinorrodinas totales.¹

5.4. Geles de actividad de nucleasas

De los mismos cultivos de los que se realizaron las curvas de crecimiento, se tomaron 400 μL del filtrado de cultivo y se precipitaron las proteínas con 3 volúmenes de acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Las proteínas precipitadas se disolvieron en 20 μL de *buffer* de carga para electroforesis de proteínas, y se calentaron las muestras 3 minutos a 50°C , para posteriormente analizarlas en geles SDS-PAGE con DNA sonicado de timo de ternera a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de la electroforesis se separó el carril del marcador de peso molecular para teñirlo con azul de Coomassie; el resto del gel se lavó repetidas veces con un *buffer* de renaturalización (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 7 mM, pH=8) a 4°C para quitar el SDS, y después se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un *buffer* de actividad (Tris 20 mM, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 5 mM, β -mercaptoetanol 7 mM, DMSO 10%, pH=8).¹³ El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió en un transiluminador con luz ultravioleta.

5.5. Medición del fenotipo de sedimentación de las diferentes cepas

Para tener una medida más objetiva y reproducible de la morfología de las diferentes cepas, se ideó un experimento con un resultado cuantitativo. Éste consiste en cultivar las cepas en un medio sin sacarosa por 36 hr, inoculado a partir de un cultivo de esporas diluidas y germinadas por 24 hr en medio con sacarosa. Los cúmulos de micelio resultantes se diluyeron con un volumen adicional de agua destilada, se colocaron sobre una columna de una solución de sacarosa al 10% de 3 cm de altura y se midió el tiempo que tardan en caer al fondo de ésta.

Alternativamente, los cúmulos de micelio se diluyeron en 2 mL de sacarosa al 10%, se agitaron y se colocaron en una celda para medir densidad óptica a 450 nm durante 10 minutos, cada 3 segundos.

5.6. Mutagénesis de los genes *sco5283* y *sco5282*

Para obtener mutantes nulas sin marcadores se utilizó la técnica de *PCR targeting* en el cósmido StCB12 de *S. coelicolor*, el cual contiene 54 kb del cromosoma, incluyendo el operón *sco5283-sco5282*. Con esta técnica se amplifica por PCR un gen de resistencia, en este caso el gen *aac(3)IV* de resistencia a apramicina, con oligos híbridos que contienen la región aledaña al gen *sco5282* (SCO5282For y SCO5282Rev) o al operón completo (SCO5283For y SCO5282Rev). En una cepa de *E. coli* con un plásmido codificando las enzimas del sistema de recombinación λ -red (BW25113/pIJ790) se introduce el cósmido y el producto de PCR para obtener

un cósmido producto de recombinación con la región deseada del cromosoma de *S. coelicolor*, pero con el gen deseado (*sco5283*, *sco5282* o ambos) reemplazados por el gen *aac(3)IV*. El cósmido es introducido a *S. coelicolor* por conjugación con una cepa de *E. coli* deficiente de metilación de DNA, que contiene un plásmido de conjugación no movilizable (ET12567/pUZ8002). El cósmido se integra por un evento de recombinación homóloga, generando una estructura transitoria con una duplicación de 54 kb y los marcadores de resistencia a apramicina (de la mutagénesis) y a kanamicina (del cósmido).

Un segundo evento de recombinación del otro lado del gen de interés puede sustituir el alelo del cromosoma por el marcador *aac(3)IV*, dejando en el cósmido el alelo que estaba originalmente en la cepa. De esta forma, se puede usar esta técnica para dejar una mutación nula en el la cepa parental, como se generaron las cepas IB94 e IB96. Por otro lado, también se puede aislar la molécula circular resultante y clonar un alelo de interés, como se hizo con el cósmido StCB12-D125G, que se transfirió a la cepa IB94 para reemplazar la mutación Δ *sco5282::aac(3)IV* por el alelo *sco5282-D125G*, generando la cepa M145-D125G. El gen *sco5282* de esta cepa fue amplificado con los oligos SCO5282Up y SCO5282Down y secuenciado con el oligo SCO5282Up para confirmar la sustitución.

El marcador se elimina del cósmido aprovechando los sitios de la recombinasa específica FLP, que deja una secuencia de 81 pb sin codones de paro, que no tiene efectos polares, dejando una mutación nula y el marcador *aac(3)IV* disponible para introducir otros plásmidos u otras mutaciones. Así se generaron las cepas IB95 e IB97 usadas en este trabajo.

5.7. Clonación y expresión heteróloga de los genes *sco5282* y *sco5283*

Para complementar las mutantes nulas, se clonó el gen *sco5282* utilizando los oligos c15282For y c15282Rev que alinean en los extremos 5' y 3' del marco de lectura del gen *sco5282*, y que añaden un sitio de restricción NdeI (en el extremo 5') y un sitio EcoRI (en el extremo 3'). El alelo *sco5282-D125G* fue amplificado por PCR de la cepa 2L12, ligado en el plásmido pBlueScript IISK digerido con EcoRV. El plásmido fue secuenciado para corroborar que no hubiera errores, se digirió con las enzimas NdeI y EcoRI, y se ligó el fragmento correspondiente al gen en el vector integrativo de *Streptomyces* pIJ6902, digerido con NdeI y EcoRI, de forma que el gen quedara bajo el control del promotor *PtipA*, inducible por tiostreptón.

Para su expresión en *E. coli*, el fragmento NdeI-EcoRI del gen *sco5283* amplificado con los oligos c15283For y c15283Rev, correspondiente al regulador de respuesta, fue clonado en el vector pET28a, de forma que el gen queda fusionado con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Para expresar la cinasa, el gen *sco5282* se amplificó con los oligos c15282sol y c15282Rev, que eliminan la región N-terminal correspondiente a los dominios transmembranales, y se clonó también en el vector pET28a. Estas construcciones fueron introducidas en la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta 2™ para su expresión. Las proteínas fueron purificadas a partir

de cultivos de esta cepa inducidos con IPTG, mediante FPLC en un equipo Äkta Prime Plus utilizando columnas preempacadas de Ni-NTA (QIAGEN).

5.8. Fosforilación *in vitro*

Las cinasas purificadas se incubaron en un *buffer* de fosforilación (HEPES 33 mM pH=7.5, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y glicerol 10%) a una concentración de 2.5 µM. Donde se indica, se añadió el regulador de respuesta a la misma concentración. La reacción se inició con la adición de [γ -³²P]ATP, y a cada tiempo se tomó una alícuota que se inactivó con un volumen de *buffer* de carga para electroforesis desnaturante 2x. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS, el cual se secó y se le midió la radioactividad con un Phosphorimager.⁵³

5.9. Extracción de RNA y secuenciación

Las cepas IB97 y M145-D125G fueron cultivadas en medio YT2x con agitación a 30°C, hasta que al homogenizarlas tuvieran una OD₄₅₀=4.8-5, correspondiente a la mitad de la fase exponencial. La extracción de RNA total se realizó por triplicado, a partir de tres cultivos independientes de cada cepa. El cultivo se filtró después de enfriarlo pasándolo por un embudo con hielo a través de un papel Whatman, y el micelio obtenido se raspó del filtró y se depositó en tubos con volúmenes iguales de solución Kirby modificada (1%SDS, 6% EDTA, 50 mM Tris-Hcl pH=8.3, 6% solución saturada de fenol, 150 mM β-mercaptoetanol) y perlas de vidrio de 4 mm en hielo. Los fragmentos de micelio se lisaron agitando con Vortex por 2 minutos y otros 5 ciclos de 30 segundos con un volumen de fenol:cloroformo. Se centrifugó y la fase acuosa se extrajo otras 3 veces con fenol:cloroformo, y posteriormente los ácidos nucleicos se precipitaron con acetato de sodio e isopropanol a -20 °C al menos una hora.

La preparación de ácidos nucleicos totales obtenidos se disolvió en agua para analizar por electroforesis, y se trató con DNAsa I libre de RNAsas (Thermofisher). Se realizó una reacción de PCR de 30 ciclos con el RNA obtenido como templado y los oligos ATTB_FOR y ATTB_REV para verificar que no hubiera DNA contaminante. Posteriormente se eliminó el rRNA por hibridación substractiva con el kit Ribo-Zero (Gram positive) de Illumina®. El RNA resultante fue tratado según las instrucciones del kit de preparación de muestras para mRNA-seq de Illumina® para generar la biblioteca de cDNA, y ésta fue secuenciada en una plataforma Illumina® NextSeq hasta 10 000 lecturas pareadas/muestra.

Las secuencias fueron alineadas contra el genoma de referencia de la cepa A3(2) y la expresión diferencial de genes codificantes analizada por los programas DESeq2,⁵⁴ edgeR⁵⁵ y NOISeq.⁵⁶ Se tomaron como positivos los genes que tuvieran una diferencia de expresión de al menos dos veces ($\text{Log}_2 \text{Fold Change} = 1$) y un p-valor ajustado para comparaciones múltiples menor a 0.05.

La construcción de bibliotecas, la secuenciación de las mismas, y el análisis estadístico de expresión diferencial fueron llevados a cabo por la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM, localizada en el Instituto de Biotecnología.

6. Resultados

6.1. Comparación morfológica y fisiológica entre la cepa silvestre M145 y la cepa mutante 2L12

Con el fin de determinar las diferencias que ocasionaban una sedimentación lenta y un crecimiento disperso de la cepa 2L12, se realizaron observaciones al microscopio óptico. Al observar a la cepa 2L12 crecida en cultivo líquido, resultó evidente que ésta también formaba cúmulos al crecer en medio sin sacarosa, al igual que la cepa silvestre M145. Sin embargo, los cúmulos de la cepa 2L12 eran significativamente más pequeños que los de la cepa silvestre (Fig. 3). Además, los cúmulos de 2L12 eran aparentemente menos densos, y se encontraron más frecuentemente rotos. Esto sugiere que la razón por la que esta cepa se sedimenta menos es porque forma cúmulos más pequeños y ligeros, probablemente porque las hifas no se unen tan fuertemente entre sí.

A pesar de las diferencias en la forma y tamaño de los cúmulos, ambas cepas presentaron la misma cinética

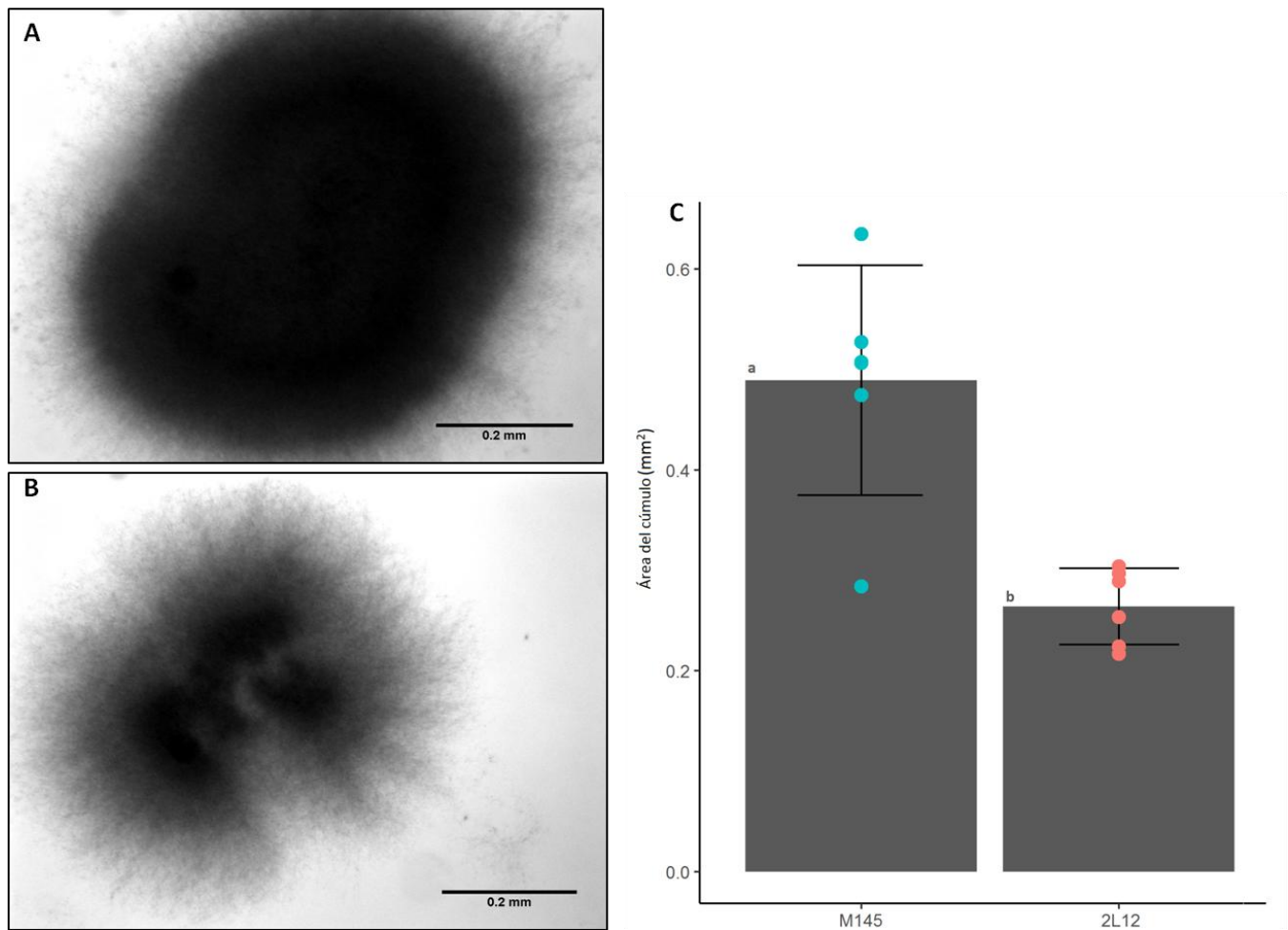


Figura 3. Análisis de cúmulos miceliare en medio líquido. Micrografía de campo claro representativa de los cúmulos de hifas de la cepa M145 (A) y 2L12 (B). De seis cultivos independientes de cada cepa se tomaron fotografías de entre 6 y 12 cúmulos y se les midió el área. En C se grafica el promedio obtenido de cada cultivo independiente como un punto individual; las barras indican el promedio total \pm desviación estándar. Las letras indican significancia estadística (prueba de t , $p < 0.01$)

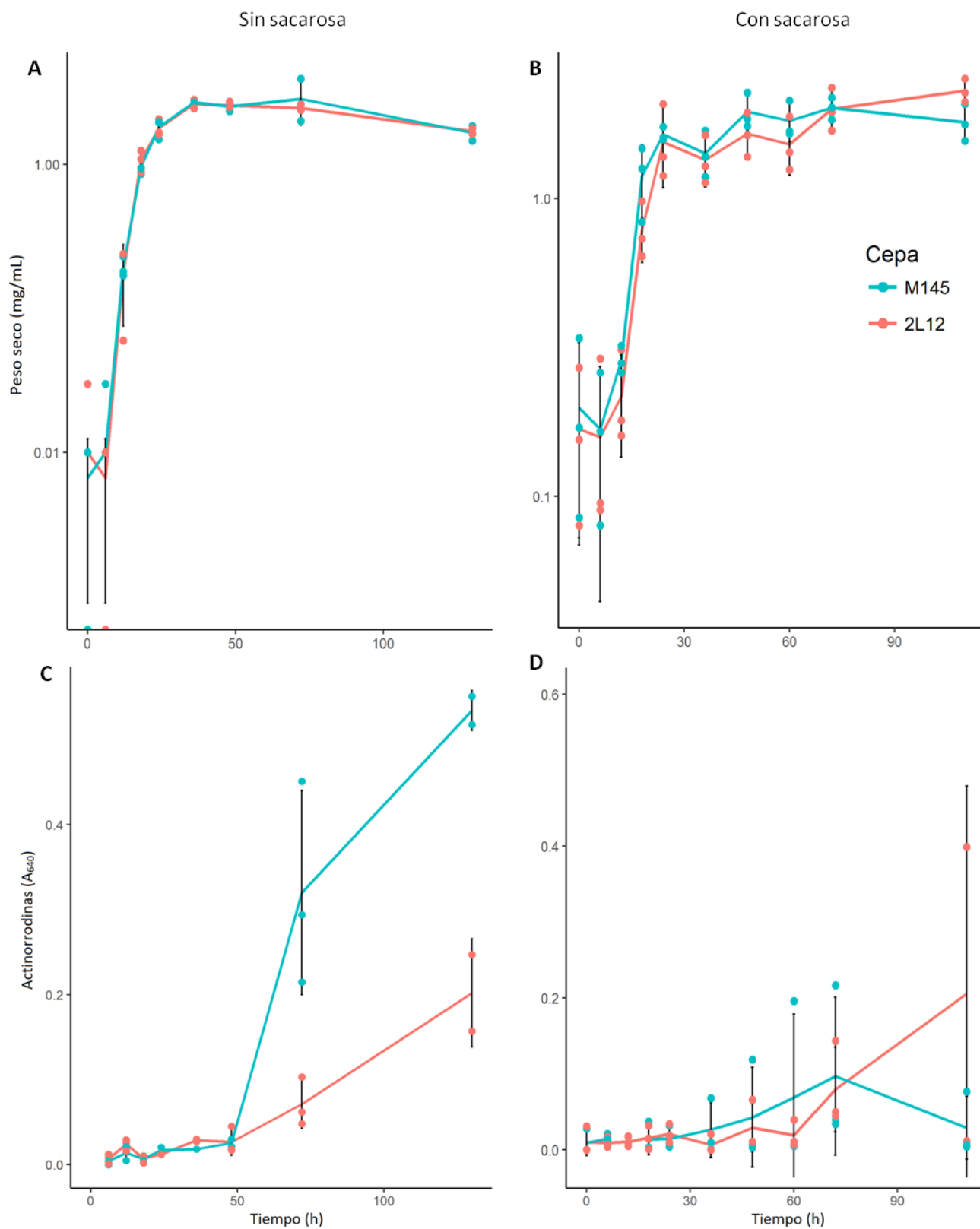


Figura 4. Cinética de crecimiento y producción de actinorrodinas. Las cepas M145 y 2L12, crecidas en medio sin sacarosa (YT2x, A) o con sacarosa (YEME, B). También se midió la producción de actinorrodinas totales, lisando el micelio con KOH y midiendo la absorbancia a 640 nm, de los mismos cultivos en YT2x (C) o YEME (D).

de crecimiento en medio líquido (Fig. 4a,B). Tanto en un medio sin sacarosa (YT2x), donde se forman cúmulos, como en un medio con sacarosa (YEME) donde el micelio crece más laxo y casi no forma cúmulos, la cepa 2L12 creció a la misma velocidad y alcanzó niveles de biomasa indistinguibles de la cepa silvestre. Esto indica que a pesar de abarcar más volumen y tener más acceso al medio, la cepa 2L12 crece tanto como una cepa silvestre. También demuestra que la mutación *sco5282-D125G* no tiene efectos pleiotrópicos que afecten el crecimiento, y que pudieran ser la causa de la fragilidad de los cúmulos.

La única diferencia evidente entre las dos cepas es que la cepa silvestre produjo más actinorrodina, pero únicamente en el medio en el que forma cúmulos (YT2x, Fig. 4c). Esto es consistente con el dato de que es en el interior de los cúmulos donde se producen principalmente los metabolitos secundarios;⁸ entonces, como la cepa 2L12 forma cúmulos más pequeños, tiene menos biomasa en el interior de éstos, y por lo tanto menor producción de antibióticos. En el medio con sacarosa, ninguna de las cepas formó cúmulos muy apretados, por lo que ninguna produjo mucho antibiótico (Fig. 4d).

Aunque en medio líquido *S. coelicolor* no presenta una diferenciación a micelio aéreo y esporas, sí ocurre una lisis del micelio, acompañada de una liberación de enzimas citosólicas, que incluyen nucleasas inespecíficas.^{8, 13} Siguiendo la presencia de estas enzimas en el sobrenadante de cultivos líquidos (sin sacarosa, donde se forman cúmulos) mediante un gel de actividad de nucleasas, se puede tener una idea de cuándo ocurre este proceso de diferenciación. Así, en la figura 5 se puede observar que a las 12 horas la cepa silvestre ya pasó por una lisis significativa, pues aparece una banda de ~47 kDa, mientras que en la cepa 2L12 este proceso apenas empieza. Puesto que ambas cepas crecieron a la misma tasa podemos excluir que se deba a una diferencia en la cantidad

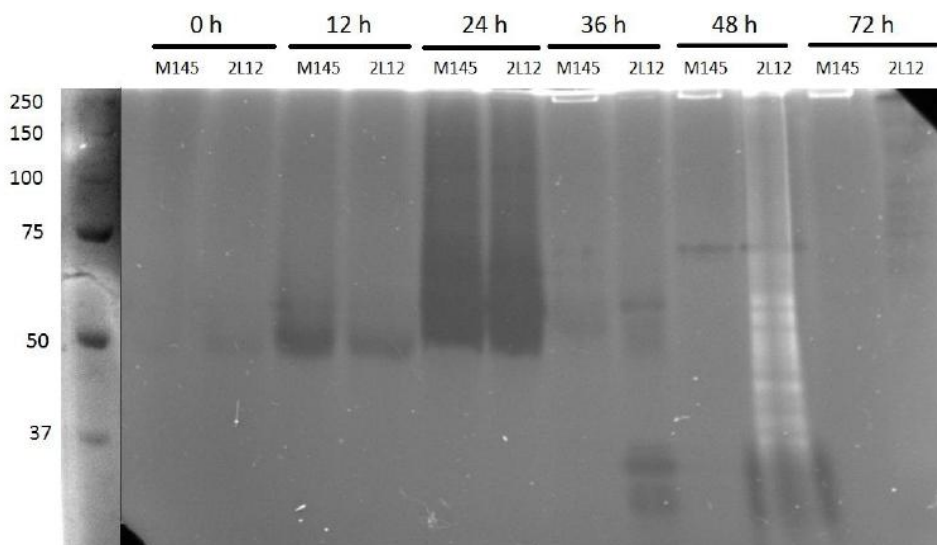


Figura 5. Análisis de la actividad de nucleasas en los sobrenadantes de las cepas M145 y 2L12. Ambas cepas fueron crecidas en medio YT2x. En los tiempos indicados se tomaron 400 μ L de sobrenadante, los cuales fueron concentrados y sometidos a electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS con DNA de timo de ternera; posteriormente las proteínas fueron renaturalizadas, incubadas en un *buffer* de actividad, y después se tiñó el gel con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular se tiñó con azul de Coomassie.

de biomasa, y en consecuencia, de proteína. Esta observación puede explicarse porque la cepa silvestre forma cúmulos más grandes y densos, donde hay mayor muerte al interior. Este micelio sería el que está liberando tan pronto a esta nucleasa.

A las 24 horas ambas cepas liberaron una gran cantidad de nucleasa, que en los tiempos posteriores ya no se observa. Esto se debe seguramente a que el medio también se satura de proteasas que procesan a las nucleasas, generando bandas más pequeñas, o inactivándolas por completo. En estos tiempos tardíos ya sólo se ven bandas con los sobrenadantes de la cepa 2L12, lo cual puede ser porque esta cepa se lisa más en estas etapas, o a que produce menos proteasas que inactiven las nucleasas.

6.2. Sedimentación de las mutantes del gen *sco5282*

Para comparar cuantitativamente el fenotipo de la mutantes 2L12 con el de la cepa silvestre, se ideó una técnica para medir el tiempo que tardan en sedimentarse los cúmulos de micelio. Para esto, se cultivó micelio en medio sin dispersante, se colocó una fracción del cultivo sobre una columna de una solución acuosa de sacarosa al 10%, y se midió el tiempo que tardaban en sedimentarse los cúmulos a través de la solución de sacarosa. Puesto que el micelio no cae como una sola masa homogénea, sino que frecuentemente caen los cúmulos individualmente, se midió el tiempo que tarda en caer ya sea la primera partícula o la última (Fig. 6). Con cualquiera de las dos mediciones se observó que la cepa 2L12 tardó significativamente más tiempo en sedimentarse que la cepa silvestre, aunque la medición correspondiente a la primera caída parece tener una

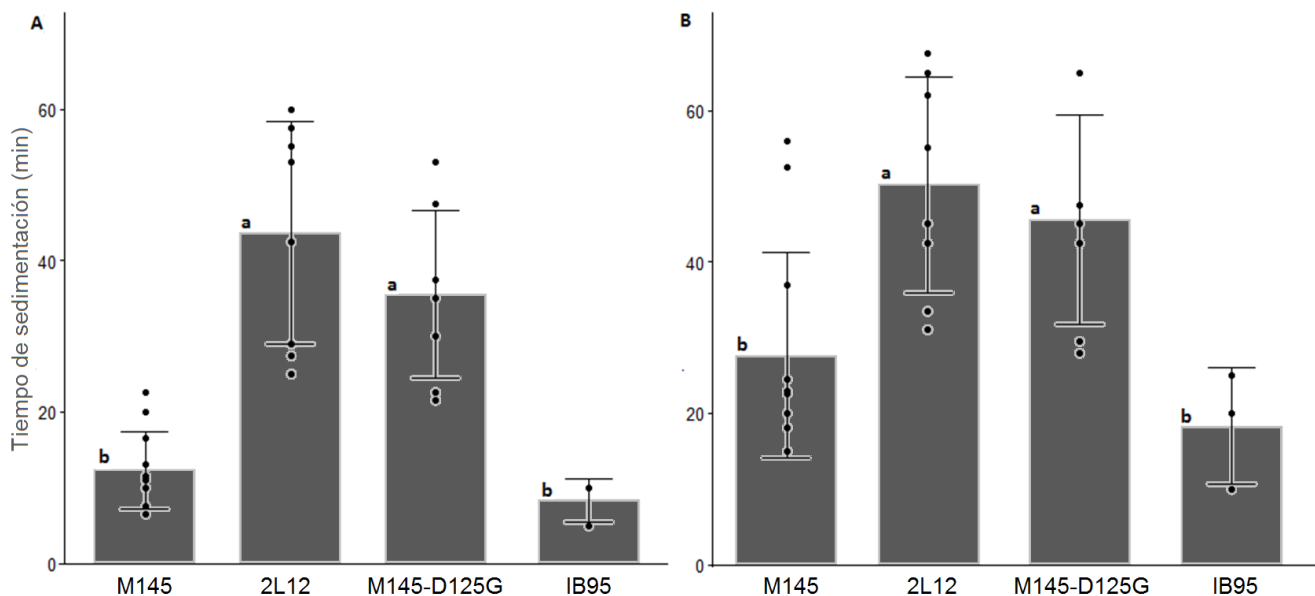


Figura 6. Diferencias morfológicas de los cúmulos analizadas por tiempo de sedimentación. Los tiempos de sedimentación indicados corresponden a la primera (A) o la última (B) caída de los cúmulos de micelio depositados sobre un colchón de sacarosa al 10%. Las barras muestran el promedio \pm desviación estándar; las letras significancia estadística (prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn *post hoc*, $p < 0.01$)

distribución menos sesgada (Fig. 6A). Por esta razón se utilizó esta medida para los siguientes experimentos.

Para comprobar que el fenotipo de la cepa 2L12 se debe a la mutación D125G en el gen *sco5282*, se transfirió esta mutación al fondo genético de la cepa silvestre M145 por medio de reemplazo alélico mediado por recombinación homóloga, utilizando diferentes variantes del cósmido StCB12, como se describe en la metodología. La cepa resultante (M145-D125G) tuvo el mismo tiempo de sedimentación que la cepa 2L12, demostrando que el fenotipo de la cepa 2L12 se debe únicamente al alelo D125G del gen *sco5282*. También mediante recombinación se aisló la cepa IB95, la cual tiene una mutación nula del gen *sco5282* ($\Delta sco5282$); el fenotipo de esta cepa, al menos respecto al tiempo de sedimentación, fue igual al de la cepa silvestre. Esto indica que la mutación D125G no es de pérdida de función, sino que probablemente active a la cinasa.

Se probó obtener una medida similar del tiempo de sedimentación con la densidad óptica del cultivo. Los cúmulos de micelio se diluyeron en sacarosa 10%, se agitaron y se les midió la absorbancia a 450 nm durante 10 minutos, mientras se asentaba el micelio (Fig. 7A). Para comparar las curvas se tomó el tiempo al cual la densidad óptica había disminuido a la mitad (tiempo de sedimentación 50). Utilizando este método se replicaron los resultados ya descritos: que la cepa 2L12 y la cepa M145 con la mutación puntual *sco5282*-D125G tardan más tiempo en sedimentarse que la cepa silvestre, mientras que la cepa $\Delta sco5282$ se sedimenta a la misma velocidad que ésta (Fig. 7B).

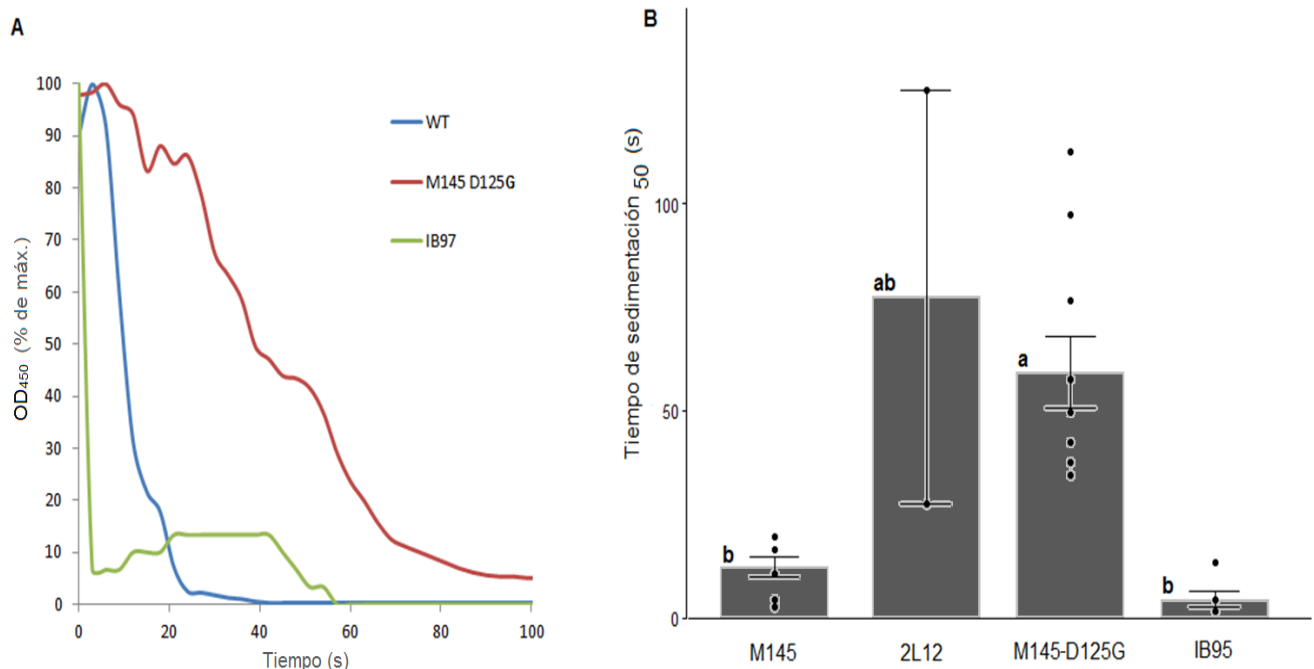


Figura 7. Tasa de sedimentación de los cúmulos analizada por densidad óptica. Las lecturas son representativas del seguimiento de OD₄₅₀ de los cúmulos de micelio asentándose en sacarosa al 10%, normalizadas respecto al máximo de cada lectura (A). Tiempo de sedimentación 50 estimado con éste método (B). Las barras muestran el promedio \pm desviación estándar; las letras significancia estadística (prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn *post hoc*, $p < 0.05$)

El mismo gen *sco5282-D125G* se clonó en el vector de expresión integrativo pIJ6902 bajo el control transcripcional del promotor *PtipA* inducible por tiostreptón, para introducirlo en la cepa IB95 y ver si podía restaurar el fenotipo de crecimiento disperso. También se introdujo en la cepa silvestre, para ver cuál de los dos alelos es el dominante, y en una cepa con una delección del operón completo (IB97), para ver si el efecto fenotípico causado por la cinasa Sco5282 D125G depende de la presencia del regulador de respuesta Sco5283. En este experimento se observó que la cepa IB95 con el alelo *sco5282-D125G* en *trans* fue la única con un mayor tiempo de sedimentación (Fig. 8). El mismo alelo no tuvo ningún efecto en la cepa M145, sugiriendo que es recesivo respecto al alelo silvestre. Tampoco tuvo efecto en la cepa IB97, lo cual demuestra que el alelo *sco5282-D125G* sí necesita del gen del regulador de respuesta *sco5283* para tener efecto; es decir, que el efecto de la cinasa mutante se ejerce a través del regulador de respuesta.

6.3. Prueba de dominancia/recesividad del alelo *sco5282-D125G*

Para demostrar con mayor certeza que el alelo D125G de esta cinasa es recesivo respecto al alelo silvestre, se generaron merodiploides con dos copias del operón completo del sistema de dos componentes, mediante la integración por recombinación homóloga del cósmido StCB12, que lleva ~50 kb de la región del cromosoma

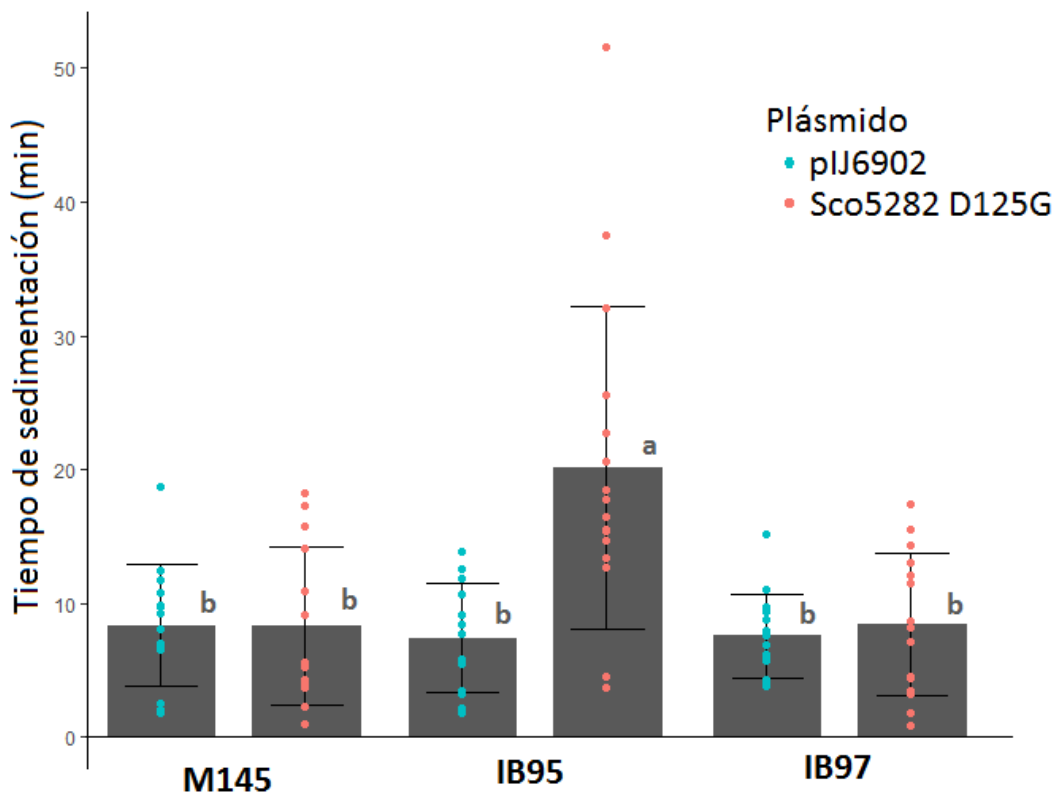


Figura 8. Complementación en *trans* con el alelo *sco5282-D125G*. Se midió el tiempo de la primera caída de cada una de las cepas transformada con el vector pIJ6902 vacío o con el gen *sco5282-D125G* clonado. Las barras muestran el promedio ± desviación estándar, las letras significancia estadística (prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn *post hoc*, $p < 0.05$).

donde se encuentran estos genes. De esta manera, ambas formas de la cinasa pueden expresarse desde su propio promotor, y en la misma proporción que el regulador de respuesta. La versión silvestre de este cósmido y la versión con el alelo D125G se introdujeron a la cepa M145 y a la cepa 2L12. También se hizo esto con la mutante doble $\Delta sco5283-sco5282$ (IB97), para corroborar que la inserción del cósmido no tuviera efecto por sí sola.

Se midieron los tiempos de sedimentación de las cepas obtenidas (Fig. 9) y se encontró que la introducción del alelo silvestre a la cepa 2L12 bastaba para conferirle un fenotipo silvestre. En cambio, el alelo mutante D125G no le pudo conferir un fenotipo mutante a la cepa M145. El alelo silvestre y el alelo mutante, por sí solos, en la cepa IB97, confirieron un fenotipo silvestre y mutante, respectivamente, indicando que el resto del cósmido no tuvo efecto alguno en el fenotipo de sedimentación. Con esto quedó demostrado que el alelo $sco5282-D125G$ es recesivo respecto al alelo silvestre.

6.4. Fosforilación *in vitro* del sistema de dos componentes

Puesto que la mutación $sco5282-D125G$ no resultó en pérdida de función, ni volvió inespecífica a la cinasa, lo más probable es que la mutación ocasionó una activación de la cinasa. Para comprobar esta hipótesis se

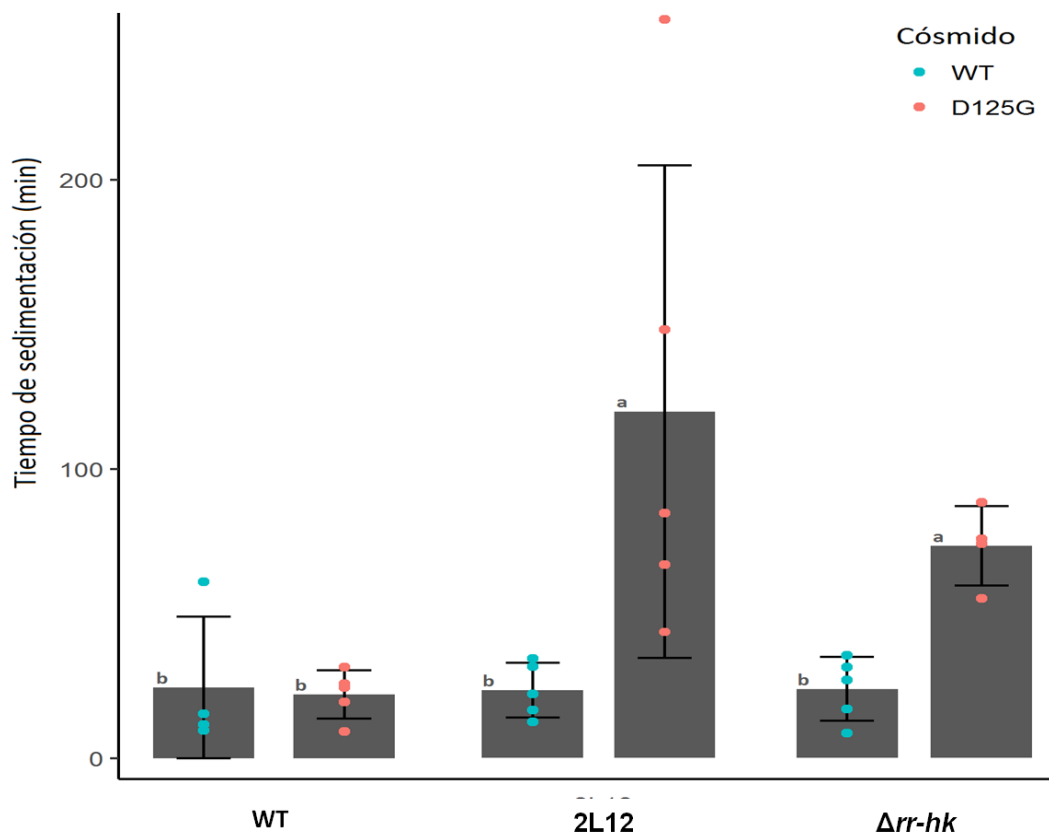


Figura 9. Prueba de dominancia/recesividad con las cepas merodiploides. Las barras muestran el promedio \pm desviación estándar, las letras significancia estadística (prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn *post hoc*, $p < 0.05$).

realizaron cinéticas de fosforilación *in vitro*.

El regulador de respuesta y las cinasas silvestre y mutante se expresaron de forma heteróloga en *E. coli* y se purificaron; las cinasas se expresaron y purificaron sin el dominio transmembranal. Al comparar la tasa de autofosforilación de la cinasa silvestre y de la mutante, cuando éstas se incubaron por sí solas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, se observó una tendencia a que la cinasa mutante se fosforile más rápido (Fig. 10A). Sin embargo, al añadir el regulador de respuesta a la reacción, se observó claramente que la cinasa Sco5282-D125G transfiere el fosfato al regulador de respuesta más rápido (Fig. 10B). Esto demuestra que la mutación D125G efectivamente resulta en una activación de la cinasa mayor a la que ocurre en le cepas silvestre, por lo menos en la transfosforilación.

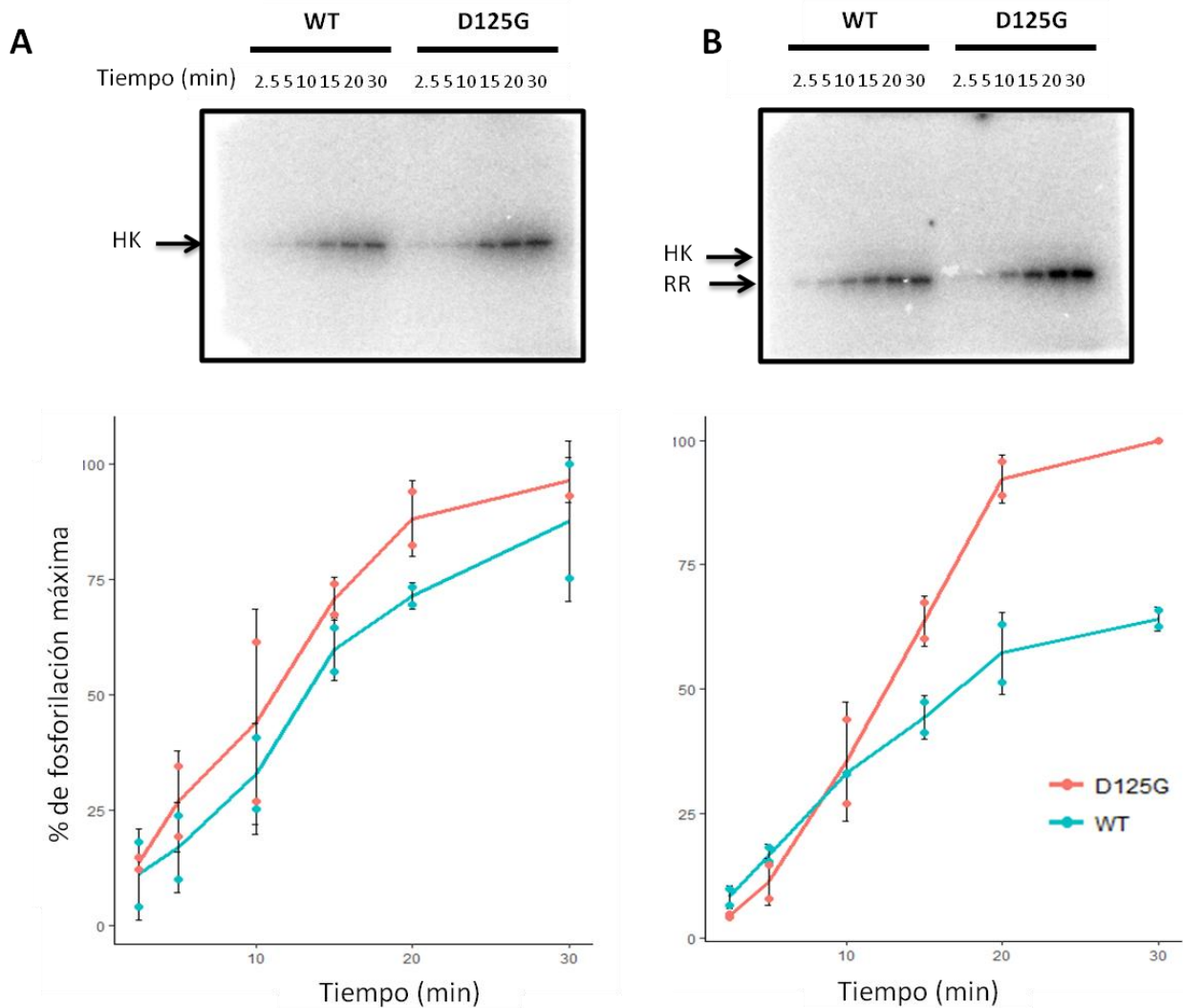


Figura 10. Pruebas de fosforilación *in vitro*. Autofosforilación de las cinasas solas (A) y transfosforilación del regulador de respuesta (B) *in vitro*. Se tomaron muestras a 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de las reacciones. Las gráficas representan la densitometría de los gels, normalizada respecto a la banda más intensa de cada gel.

6.5. Identificación de genes cuya expresión es afectada por el sistema de dos componentes

Una vez que se determinó que el fenotipo de la cepa 2L12 lo causa una mutación que aparentemente resulta en una sobreactivación de la cinasa Sco5282, entonces es razonable pensar que el crecimiento disperso es ocasionado por la activación de genes que normalmente no están encendidos en medio líquido en la cepa silvestre, o bien que están expresados en un nivel menor que en la cepa mutante. Para determinar si efectivamente había genes expresados diferencialmente entre ambas cepas, se secuenció el transcriptoma de dos cepas que crecen con las dos diferentes morfologías: la morfología silvestre, de cúmulos grandes, y la morfología mutante de cúmulos dispersos. Para maximizar las diferencias ocasionadas directamente por la activación de este sistema de dos componentes, se optó por comparar los transcriptomas de la cepa M145-D125G y la cepa IB97 ($\Delta sco5283-sco5282$); es decir, una cepa con el sistema activado y la otra con el sistema ausente, y por lo tanto completamente inactivo. Puesto que la diferencia morfológica tiene implicaciones importantes en el metabolismo, esperamos que la mayoría de los genes diferencialmente expresados que encontremos estén respondiendo a las condiciones de crecimiento, y que no necesariamente sean blancos directos del sistema Sco5282-Sco5283. La secuenciación del transcriptoma se hizo por triplicado para cada cepa, con muestras de RNA obtenidas de cultivos independientes.

Con esta estrategia se identificaron 437 genes diferencialmente expresados; 354 de ellos en acuerdo entre las tres pruebas estadísticas usadas (DESeq2,⁵⁴ EdgeR⁵⁵ y NOISeq⁵⁶). Los genes que resultaron significativos en al menos dos pruebas estadísticas fueron anotados con el programa EggNOG-mapper.⁵⁷ Sólo a 282 se les pudo asignar función: 120 regulados positivamente y 162 negativamente.

6.5.1. Genes del metabolismo primario

Una gran proporción de los genes encontrados codifican enzimas del metabolismo primario. Casi la mitad de las anotaciones corresponden a las categorías de metabolismo energético, de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos y síntesis de DNA. Siguiendo la anotación de vías metabólicas de *S. coelicolor* de la base de datos KEGG, se observaron los siguientes cambios en el metabolismo primario (Tabla 5):

- Las enzimas limitantes de la gluconeogénesis (fosfoenolpiruvato carboxicinas y fructosa-1,6-bisfosfatasa) están activadas, mientras que la piruvato cinasa de la glucólisis está reprimida.
- Las enzimas de la degradación de purinas están activadas
- Las vías de degradación de aminoácidos de cadena ramificada están activadas
- La mayor parte de la vía de las pentosas está reprimida, pero está activada una isomerasa que permite el flujo de ribosa-5-fosfato de la síntesis/degradación de los nucleótidos hacia la formación de xilosa.

Esto parece indicar que la cepa M145-D125G no está usando carbohidratos y está consumiendo otras fuentes de carbono y energía, como bases nitrogenadas y aminoácidos.

Gen	Función	Log2 Fold Change	Vía metabólica	COG	p-valor ajustado		
					EdgeR	DESeq2	NOISeq
SCO4979	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa	2.37	Glucólisis/Gluconeogénesis	C	7.45E-19	3.81E-03	0.00E+00
SCO7040	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1.48	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	5.98E-08	1.18E-01	3.03E-05
SCO5047	fructosa-1,6-bisfosfatasa	1.45	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	1.11E-07	3.97E-04	1.67E-15
SCO7638	Enolasa	-1.22	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	5.90E-05	2.76E-03	5.66E-03
SCO5423	Piruvato cinasa	-1.38	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	7.14E-07	1.21E-04	2.89E-15
SCO1947	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	-1.67	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	9.66E-10	8.63E-07	1.44E-15
SCO7511	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	-5.22	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	2.49E-69	1.56E-09	1.01E-14
SCO6659	Fosfohexosa isomerasa	-4.00	Glucólisis/Gluconeogénesis	G	1.45E-45	1.41E-03	1.44E-15
SCO2774	Acil-CoA deshidrogenasa	1.56	Degradación de aa ramificados	I	8.90E-09	1.41E-04	4.44E-16
SCO2776	Carboxilasa	2.11	Degradación de aa ramificados	I	3.14E-15	1.33E-01	3.77E-15
SCO2777	Carboxilasa	2.12	Degradación de aa ramificados	I	1.85E-15	1.16E-01	0.00E+00
SCO2778	Hidroximetilglutaril-CoA liasa	1.96	Degradación de aa ramificados	I	2.54E-13	2.75E-01	1.06E-03
SCO2779	Acil-CoA deshidrogenasa	2.08	Degradación de aa ramificados	I	6.17E-15	1.50E-01	0.00E+00
SCO4800	Isobutiril-CoA mutasa	1.16	Degradación de aa ramificados	I	4.36E-05	2.09E-04	2.03E-03
SCO5398	Metilmalonil-CoA epimerasa	1.38	Degradación de aa ramificados	I	5.03E-07	1.03E-05	0.00E+00
SCO5399	Acetil-CoA acetiltransferasa	1.63	Degradación de aa ramificados	I	1.63E-09	1.41E-09	0.00E+00
SCO5415	Metilmalonil-CoA mutasa	1.47	Degradación de aa ramificados	I	7.03E-08	2.39E-01	0.00E+00
SCO6701	Acetil-CoA acetiltransferasa	1.44	Degradación de aa ramificados	I	7.60E-07	4.84E-04	4.18E-03
SCO6702	Acetil-CoA acetiltransferasa subunidad B	1.81	Degradación de aa ramificados	I	3.26E-10	4.79E-02	8.24E-03
SCO4972	Xantina deshidrogenasa	2.65	Degradación de purinas	F	7.57E-23	1.38E-02	2.22E-15
SCO6209	OHCU descarboxilasa	3.11	Degradación de purinas	F	8.62E-27	9.16E-19	5.50E-09
SCO6247	Dihidroorotasa	2.92	Degradación de purinas	F	2.17E-26	7.02E-20	0.00E+00
SCO6248	Alantoata amidinohidrolasa	2.43	Degradación de purinas	F	4.30E-19	2.53E-13	1.51E-11
SCO1679	Gluconocinasa	-2.54	Pentosas fosfato	G	5.38E-20	4.82E-02	6.66E-16
SCO6497	Transcetolasa	-1.99	Pentosas fosfato	G	1.32E-12	3.37E-16	0.00E+00
SCO6658	6-fosfogluconato deshidrogenasa	-3.92	Pentosas fosfato	G	2.50E-44	1.07E-03	3.33E-16
SCO6661	glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	-4.84	Pentosas fosfato	G	9.78E-62	1.86E-04	0.00E+00
SCO6662	Transaldolasa	-5.33	Pentosas fosfato	G	2.54E-71	1.10E-04	0.00E+00
SCO6663	Transcetolasa	-6.12	Pentosas fosfato	G	1.51E-87	3.66E-05	4.33E-15
SCO1224	Ribosa-5-fosfato Isomerasa	1.55	Pentosas fosfato	G	1.33E-08	1.09E-06	0.00E+00

La vía de las pentosas produce, entre otras cosas, NADPH. Éste es necesario para la síntesis de muchos metabolitos secundarios. Así, la represión observada en esta vía podría ser consecuencia de la represión del metabolismo secundario observado en la cepa de crecimiento disperso, M145-D125G (Fig. 4c).

Es curioso que el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa principal de *Streptomyces*,⁵⁸ *sco1947*, está reprimido, mientras que el parálogo *sco7040* está activado. Esto podría ser reflejo de una especialización de cada gen, quizás uno para condiciones de glucólisis y otro para condiciones de gluconeogénesis.

6.5.2. Genes involucrados en el mantenimiento de la envoltura celular

Los genes más sobreexpresados en la cepa M145-D125G son un operón con dos transportadores ABC (*sco0755*, *sco0756*), similares a transportadores de bacteriocinas o lantibióticos, una proteína de la familia de *HlyD* del aparato de secreción tipo 1 (*sco0754*), y un péptido de 77 aminoácidos con una posible señal de secreción presente en productos naturales ribosomales (*sco0753*). Muy probablemente se trata de un sistema de secreción de algún péptido con actividad biológica no caracterizado (Tabla 6).

También se encuentra significativamente sobreexpresado el siguiente gen de este grupo, *sco0757*, que codifica una exopolifosfatasa, pero en mucho menor medida que el resto del operón. Además, éste último gen no muestra sintenia con el resto del operón al comparar con otras especies de *Streptomyces* (dato no mostrado), por lo que es poco probable que esté relacionado con este aparato de secreción.

Gen	Función	Log2 Fold Change	COG	p-valor ajustado		
				EdgeR	DESeq2	NOISeq
SCO0753	Producto natural ribosomal	6.30	-	1.46E-91	4.09E-15	1.03E-13
SCO0754	HylD	4.40	M	7.61E-51	1.52E-47	2.05E-14
SCO0755	Transportador ABC	4.25	V	2.56E-49	3.64E-60	2.89E-15
SCO0756	Transportador ABC	4.25	V	1.82E-50	1.05E-58	5.55E-16
SCO0757	Exopolifosfatasa	1.58	F, P	2.69E-08	7.81E-09	6.20E-06
SCO6160	SecDF	2.89	U	1.40E-26	3.77E-02	0.00E+00
SCO6161	Proteína secretada	1.51	-	1.44E-07	4.00E-06	2.81E-03
SCO6162	Regulador de respuesta	2.21	T	1.79E-16	5.30E-02	0.00E+00
SCO6163	Cinasa de histidinas	2.13	T	1.71E-15	1.24E-01	0.00E+00
SCO0381	Poliprenil glicosilfosfotransferasa	-1.86	M	3.26E-10	2.75E-01	1.53E-02
SCO0382	UDP-glucosa/GDP-manosa deshidrogenasa (<i>algD</i>)	-1.37	M	7.10E-06	3.74E-01	1.97E-02
SCO0836	Canal iónico mecanosensible	-1.31	M	1.23E-05	4.96E-09	1.59E-03
SCO2589	CDP-glicerol poli(glicerofosfato) glicerofosfotransferasa	2.24	M	5.05E-17	7.63E-39	0.00E+00
SCO2590	CDP-glicerol poli(glicerofosfato) glicerofosfotransferasa	2.37	M	7.63E-19	5.53E-41	3.33E-15
SCO2591	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	-3.77	M	2.34E-41	3.01E-125	5.33E-14
SCO2962	Transferasa (<i>matB</i>)	-1.73	M	3.03E-10	2.03E-23	1.11E-16
SCO6131	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa	2.93	M	2.93E-27	5.86E-47	0.00E+00

Otro gen que se encuentra muy sobreexpresado es el que codifica para un parólogo de SecD y SecF que tiene los dos dominios fusionados en el mismo polipéptido (*sco6160*, *secDF*). Se sabe que este gen se expresa mucho menos que los genes *secD* y *secF* en condiciones normales, y que su ausencia afecta la secreción de proteínas por el sistema Sec, aunque no tanto como la ausencia de SecD-F.⁵⁹ Curiosamente, este gen se encuentra río abajo de una posible proteína secretada (*sco6161*) y un sistema de dos componentes (*sco6162* y *sco6163*), y todos estos genes se encuentran sobreexpresados en la mutante M145-D125G (Tabla 6). Por otro lado, en esta cepa disminuye la expresión de genes que posiblemente sintetizan exopolisacáridos. Entre ellos está *matB* (*sco2962*), el gen que se ha propuesto que sintetiza un polímero de *N*-acetilglucosamina, y cuya delección da lugar a un fenotipo disperso.²³ Sin embargo, aunque significativa, la disminución no es mucha. Además, solamente este gen y el siguiente en el presunto operón resultaron significativamente diferencialmente expresados. Esto sugiere que, aunque el fenotipo podría deberse al menos en parte a la regulación sobre este gen, muy probablemente ésta sea indirecta.

Otros genes que podrían sintetizar algún exopolisacárido, y que la proteína con la mutación D125G reprime, son un homólogo de *algD* (*sco0382*), que es la enzima limitante de la síntesis de alginato en otras bacterias, y una poliprenil glicosiltransferasa (*sco0381*, Tabla 6). De nuevo, estos genes parecen formar parte de un operón, el resto del cual no está diferencialmente expresado entre estas cepas.

Tabla 7. Genes expresados diferencialmente involucrados en regulación transcripcional

Gen	Función	Log2 Fold Change	COG	p-valor ajustado		
				EdgeR	DESeq2	NOISeq
SCO6164	Proteína con dedos de zinc tipo DksA	2.53	K	5.72E-21	3.03E-01	0.00E+00
SCO6165	Proteína tipo DksA	2.71	K	1.50E-23	1.67E-01	0.00E+00
SCO6166	MreB/Mbl	2.77	S	1.34E-24	9.08E-02	5.81E-04
SCO6167	Proteína rica en prolinas	1.48	S	5.63E-08	8.79E-05	5.55E-16
SCO1897	Regulador tipo DeoR	2.15	K	3.20E-15	1.14E-06	2.21E-05
SCO0864	Factor sigma ECF	1.69	K	1.27E-08	5.50E-05	7.98E-03
SCO4767	WhiD	1.45	K	7.60E-07	1.45E-04	7.85E-03
SCO6685	RamR	-1.48	T	7.25E-05	2.15E-02	1.33E-02
SCO3198	Regulador tipo DeoR	-1.59	K	1.13E-08	2.03E-01	9.10E-03
SCO6520	SigK	-1.65	K	4.32E-09	8.41E-07	4.09E-03
SCO0600	SigB	-1.70	K	4.36E-10	3.06E-23	3.22E-15
SCO7325	RsbV	-1.28	T	7.68E-06	2.38E-03	4.55E-03
SCO4005	Factor sigma ECF	-1.81	K	3.10E-11	4.31E-17	0.00E+00
SCO1658	GylR	-2.05	K	2.88E-14	1.36E-07	1.78E-15
SCO2845	Regulador tipo GntR	-2.62	K	1.17E-16	2.93E-02	5.13E-03
SCO7314	SigM	-2.75	K	2.56E-22	7.35E-18	0.00E+00
SCO2846	Regulador tipo ROK	-3.49	K	3.83E-36	1.03E-02	4.44E-16

6.5.3. Genes involucrados en regulación transcripcional

Se encontraron 24 genes diferencialmente expresados que tienen una posible función en la regulación transcripcional. Se muestran algunos en la tabla 7. De éstos, las más sobreexpresados en la cepa con la mutación D125G son los que codifican proteínas similares a DksA (*sco6164*, *sco6165*), cuya función se desconoce. Sin embargo, uno de ellos está sobrelapado con uno de los tres genes que codifican homólogos de MreB que tiene *S. coelicolor* (*sco6166*). Los otros dos homólogos de MreB (MreB y Mbl) actúan en la división celular esporogénica.⁶⁰ A la proteína codificada en *sco6166* le faltan dos dominios que sí tiene MreB, y se ha demostrado que es la única que no se localiza en la membrana. Además, su perfil de expresión normal es contrario al de las otras dos: se acumula en el micelio vegetativo y desaparece abruptamente al inicio de la diferenciación a micelio aéreo. Éste homólogo de MreB, *sco6166*, también se sobreexpresa fuertemente con la mutación D125G (Tabla 7).

Entre los reguladores transcripcionales cuyos genes se encuentran menos expresados en la cepa con la mutación D125G hay varios miembros de la familia de σ ⁷⁰. SigB (*sco0600*) activa la diferenciación en respuesta a estrés osmótico.¹⁶ Esto lo hace, en parte, activando a SigM (*sco7314*)¹⁸ y a su factor anti-anti-sigma RsbV (*sco4005*).⁶¹ SigK (*sco6520*), en cambio, es un regulador negativo de la diferenciación.⁶² Sin embargo, en este proceso, los niveles de su transcrito aumentan, mientras que la proteína es la que se degrada. Todos estos factores σ , que se transcriben durante la diferenciación, están menos expresados en la mutante D125G. También lo está RamR (*sco6685*), un regulador de respuesta que también activa la esporulación.¹⁹ Esta regulación hace pensar que la mutante que crece de forma dispersa tiene menos señales de estrés que la que crece en cúmulos, y por lo tanto no activa las vías de diferenciación y esporulación. Es decir, la menor expresión de estos reguladores probablemente sea consecuencia de los cambios en la morfología de esta cepa, y no su causa.

Una excepción digna de mencionar es WhiD (*sco4767*). Como todos los genes *whi*, es un factor necesario para la esporulación. Específicamente, se requiere para coordinar la deposición de las divisiones entre las esporas.⁶³ WhiD pertenece a un grupo de proteínas denominadas Wbl (proteínas tipo WhiB) que son factores de transcripción con un núcleo [4Fe-4S] capaz de unir óxido nítrico y oxígeno.^{64, 65} La expresión de *whiD* en cultivos en medio sólido no se da sino hasta el inicio de la esporulación; en medio líquido normalmente no es detectable⁶³ (*S. coelicolor* no esporula en medio líquido). Por esto, es sorprendente descubrir que su transcrito aumente en la mutante de crecimiento disperso, en dirección contraria a los otros reguladores de la diferenciación.

Estos fueron los únicos genes de diferenciación y esporulación que se identificaron como expresados diferencialmente. Ningún efector ni regulador maestro resultó alterado significativamente. Tampoco se encontró expresión diferencial de los genes de biosíntesis de los antibióticos conocidos de *S. coelicolor*, ACT, RED, CDA

y yCPK. Esto es consistente con la observación macroscópica de que la cepa 2L12 no tiene alteraciones visibles ni en la diferenciación ni en el metabolismo secundario.

6.5.4. Otros genes expresados diferencialmente

Entre los genes más fuertemente reprimidos apareció un grupo de genes de síntesis de vesículas de gas (*gvp*, *sco6499-sco6508*). Mejor dicho, estos genes se sobreexpresaron fuertemente en la doble mutante Δ *sco5283-sco5282*, la cepa que forma cúmulos. Aunque los genes de vesículas de gas están ampliamente distribuidos entre actinobacterias (*S. coelicolor* tiene dos grupos de estos), nadie los ha observado en acción en estos organismos.⁶⁶ Sin embargo, se ha visto que la transcripción de este grupo de genes aumenta en una mutante nula del represor de síntesis de arginina ArgR,⁶⁷ en una mutante nula del sensor de nitrógeno GlnK,⁶⁸ y en respuesta a estrés salino, de forma dependiente de SigB.¹⁸ No está claro si estos genes en verdad producen vesículas de gas en actinobacterias; podrían tener una función protectora contra el estrés osmótico⁶⁶ o incluso servir como reserva de aminoácidos.⁶⁷

7. Discusión

Hay muchos factores que controlan la morfología de *Streptomyces*. Es por esto que hay muchas formas de aislar mutantes afectadas morfológicamente. Tradicionalmente, los genes que se han caracterizado en *Streptomyces* son los que regulan el proceso de diferenciación; los estadíos entre la germinación y la formación del micelio aéreo han sido menos estudiados. El cultivo en medio líquido permite estudiar esta parte del ciclo de vida, y revela nuevos aspectos de estos organismos que no son evidentes en su cultivo en medio sólido. Así, aunque *S. coelicolor* y *S. venezuelae* pueden formar micelio aéreo y eventualmente cadenas de esporas en medio sólido, sus micelios vegetativos en medio líquido tienen morfologías completamente diferentes: una forma cúmulos de hifas apretados y la otra es completamente dispersa, con fragmentos de hifas casi unicelulares.

Nuestra estrategia de selección artificial está basada, pero en sentido inverso, en una cuya intención era estudiar la aparición de la multicelularidad en organismos unicelulares.⁴¹ Nosotros, en cambio, partimos de un organismo multicelular y aplicamos la selección opuesta, esperando encontrar factores que permitieran un crecimiento disperso, más cercano a un crecimiento unicelular. Inicialmente esperábamos encontrar mutantes que presentaran un crecimiento de hifas fragmentadas similar al que presenta *S. venezuelae* al crecer en medio líquido. La cepa que obtuvimos no presentó este fenotipo, pero sí uno en que los cúmulos de hifas tenían características diferentes que permitían un crecimiento disperso. Aunque con este método se encontraron mutantes aparentemente con efectos pleiotrópicos, en la cepa estudiada en este trabajo, 2L12, se afectó únicamente la morfología en medio líquido, que no mostró diferencias aparentes ni en la esporulación ni en el metabolismo secundario. La comparación de las cinéticas de crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa 2L12 mostró que esta cepa no tiene afectaciones generales en el crecimiento, pues las cinéticas resultaron iguales, incluso en un medio sin sacarosa, en el que se maximizan las diferencias entre las morfologías. Por un lado esto muestra que el genotipo de la cepa 2L12 no está afectando de forma importante el metabolismo de la bacteria, disminuyendo su viabilidad o su tasa de crecimiento. Sin embargo, es curioso que incluso cuando las morfologías eran muy diferentes, la cepa dispersa creció tan rápido como la silvestre. Esto puede deberse a que, aunque los cúmulos en la cepa silvestre en verdad se encontraban bajo una condición de estrés nutricional, pudieron adaptar su metabolismo para seguir creciendo. Quizás es por esto que en el transcriptoma vemos tantas diferencias en los genes del metabolismo primario: la cepa que forma cúmulos, mostró tener activa la glucólisis, mientras que la cepa mutante, que creció en forma dispersa, mostró tener activa la gluconeogénesis, junto con otras vías catabólicas de fuentes de carbono. Esto puede tener dos explicaciones:

- La cepa dispersa tuvo más acceso al medio y agotó los carbohidratos más rápidamente, por lo que a mitad de la fase exponencial estaba consumiendo principalmente aminoácidos y bases nitrogenadas, abundantes en el medio YT2x
- La cepa que forma cúmulos tuvo acceso limitado a nutrientes y oxígeno, e inició antes el proceso de muerte celular que ocurre en el micelio vegetativo. Entonces, el micelio que vemos en el análisis

transcriptómico estaba alimentándose de los restos del primer micelio, que son ricos en carbohidratos derivados de la pared celular.

Esta segunda hipótesis se apoya en la cinética de liberación de nucleasas extracelulares, que sugiere que la cepa silvestre comienza la lisis celular (y la liberación de nucleasas) antes que la cepa dispersa. Para poder distinguir entre estas dos posibilidades sería necesario realizar experimentos de crecimiento en medios definidos, monitoreando los niveles de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, a pesar de estar creciendo a la misma velocidad en el medio sin sacarosa, la cepa silvestre produjo más actinorrodina. Esto refleja por un lado que se puede tener la misma tasa de crecimiento con metabolismos diferentes. Por el otro, el hecho de que esta diferencia se observó únicamente en el medio sin sacarosa demuestra que no es a causa de la mutación, sino de la morfología. Si esta diferencia no se reflejó en el transcriptoma fue porque las muestras para este análisis se tomaron a mitad de la fase exponencial, antes de que haya producción visible de antibióticos. Sin embargo, la activación relativa de la vía de las pentosas en la cepa que crece en cúmulos puede deberse a la necesidad de NADPH de esta cepa para comenzar la producción de metabolitos secundarios.

Microscópicamente, la principal diferencia que tiene la cepa 2L12 es que sus cúmulos son más pequeños, y aparentemente más laxos. Muy probablemente esto se debe a que sus cúmulos se fragmentan más fácilmente, lo cual puede deberse a un defecto en la matriz extracelular, o a alguna alteración en la estructura de las hifas que ya no permite que se apelmacen entre sí.

Para identificar las mutaciones causantes de este fenotipo se secuenció el genoma de la cepa 2L12. Sorprendentemente se encontró nada más un SNP de alta confianza: una sustitución en un gen codificante de una cinasa de un sistema de dos componentes que ocasiona el cambio D125G. Al introducir el alelo mutante en un fondo silvestre se demostró inequívocamente que esta mutación es suficiente para causar el crecimiento disperso. En otros trabajos también se ha demostrado que es suficiente la alteración de un solo gen para modificar por completo la morfología del micelio vegetativo (*ssgA*, *csIA*, *matB*). Esto apoya la idea de que la morfología del micelio vegetativo es una característica compleja que depende de muchas variables.

Las otras pruebas genéticas arrojaron luz sobre el efecto de esta mutación. El hecho de que la mutante nula mostrara un fenotipo silvestre indicó que el efecto de la sustitución D125G no se debió a una pérdida de función de la misma. Además, la mutación en el gen de la cinasa se pudo complementar, lo que indica que no tiene efectos polares. Por otro lado si también se muta el regulador de respuesta la mutación no puede ser complementada únicamente con el gen de la cinasa silvestre, lo que indica que el efecto de la cinasa mutante se ejerce a través del regulador de respuesta específico; además esta falta de complementación de la mutante también revela que la mutación no ocasionó que la cinasa actúa inespecíficamente a través de otros blancos. Estos resultados en conjunto sugieren que la mutación ocasionó una activación de la cinasa.

Sin embargo, al realizar la prueba de dominancia/recesividad mediante la introducción de una segunda copia del sistema completo a las cepas, mostró que la mutación D125G es recesiva respecto al alelo silvestre, contrario a lo que se esperaría de una mutación activadora.

La sustitución D125G cae en la parte distal de la hélice AS2 del dominio HAMP. Este dominio es responsable de la dimerización de la cinasa y de la transmisión de la señal de activación al dominio de ATPasa. Es probable que la sustitución de un residuo de aspartato por uno de glicina en esta región desestablezca la hélice. Se ha observado que mutaciones que desestabilizan la parte distal de la hélice AS1 activan otras cinasas con una estructura similar a la cinasa Sco5282.⁴⁴ Parece ser que el dominio HAMP estabiliza el estado reprimido de la cinasa, por lo que mutaciones que alteran su estructura resultan en un fenotipo constitutivo.⁴⁴ La mutación Sco5282-D125G podría tener un efecto similar, desestabilizando el dominio HAMP y permitiendo la activación constitutiva. Curiosamente, esta activación parece ocurrir únicamente sobre la reacción de transfosforilación, y no sobre la autofosforilación, por lo menos *in vitro* con las cinasas que carecen del dominio transmembranal. Es necesario evaluar las cinéticas de fosforilación con las proteínas completas, insertadas en la membrana, para confirmar que esta diferencia no es un artefacto debido a la elisión de dicho dominio, donde no hay ningún dominio transmitiendo una señal mediante el dominio HAMP.

Si la mutación D125G desestabiliza el dominio HAMP, esto explicaría también que la mutación sea recesiva ante el alelo silvestre: si están expresadas las dos copias en la misma célula, se van a formar heterodímeros de cinasas. En un heterodímero, sólo una de las cuatro hélices del haz del dominio HAMP estaría desestabilizada, a diferencia de dos hélices, en un homodímero de Sco5282-D125G. El monómero silvestre podría conferir la rigidez faltante para mantener la estructura reprimida, lo que resultaría en un fenotipo silvestre.

Para indagar en el mecanismo por el cual este sistema de dos componentes puede afectar el crecimiento, se decidió comparar el transcriptoma entre una mutante nula en el sistema y la mutante activada M145-D125G. De esta forma, los genes más diferencialmente expresados serían los más probables blancos del sistema, directos o indirectos.

La expresión diferencial de los genes de esta cepa se analizó por tres pruebas estadísticas. Del total de genes identificados, una gran proporción (354/437) fueron hallazgos de las tres pruebas (Fig. 11a). Esto indica que hay homogeneidad entre los grupos, y es muy probable que estas diferencias sean verdaderas. Puesto que es un análisis exploratorio, se incluyó en los estudios posteriores también los genes que fueron identificados solamente por dos pruebas. La mayoría de estos genes sólo dieron negativo con DESeq2 (65/68, Fig. 11a). Esto no es sorprendente, pues este método está desarrollado para experimentos con más réplicas independientes,⁵⁴ y por lo tanto es más exigente.

Los 422 que resultaron significativos por al menos dos pruebas se compararon con la base de datos eggNOG⁵⁷ para identificar funciones sobrerrepresentadas. A pesar de que hubo muchos genes que no se pudieron anotar, la mayoría no tuvo valores extremos de expresión diferencial. La única excepción es el gen *sco0753*, que fue el gen más sobreexpresado en la cepa M145-D125G. Como era de esperarse, una gran parte de los genes anotados están involucrados en el metabolismo primario: metabolismo y transporte de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, bases nitrogenadas y iones inorgánicos; tanto reprimidos como activados (Fig. 11B). Esto comprueba que se necesita una remodelación metabólica para adaptarse a estas dos condiciones diferentes de crecimiento: cúmulos laxos y apretados. También hubo una gran cantidad de genes clasificados como “de función desconocida”, tanto activados como reprimidos (Fig. 11B). De hecho, varios de los genes con valores extremos de expresión diferencial se encuentran en esta categoría, que a pesar del nombre incluye a varios genes

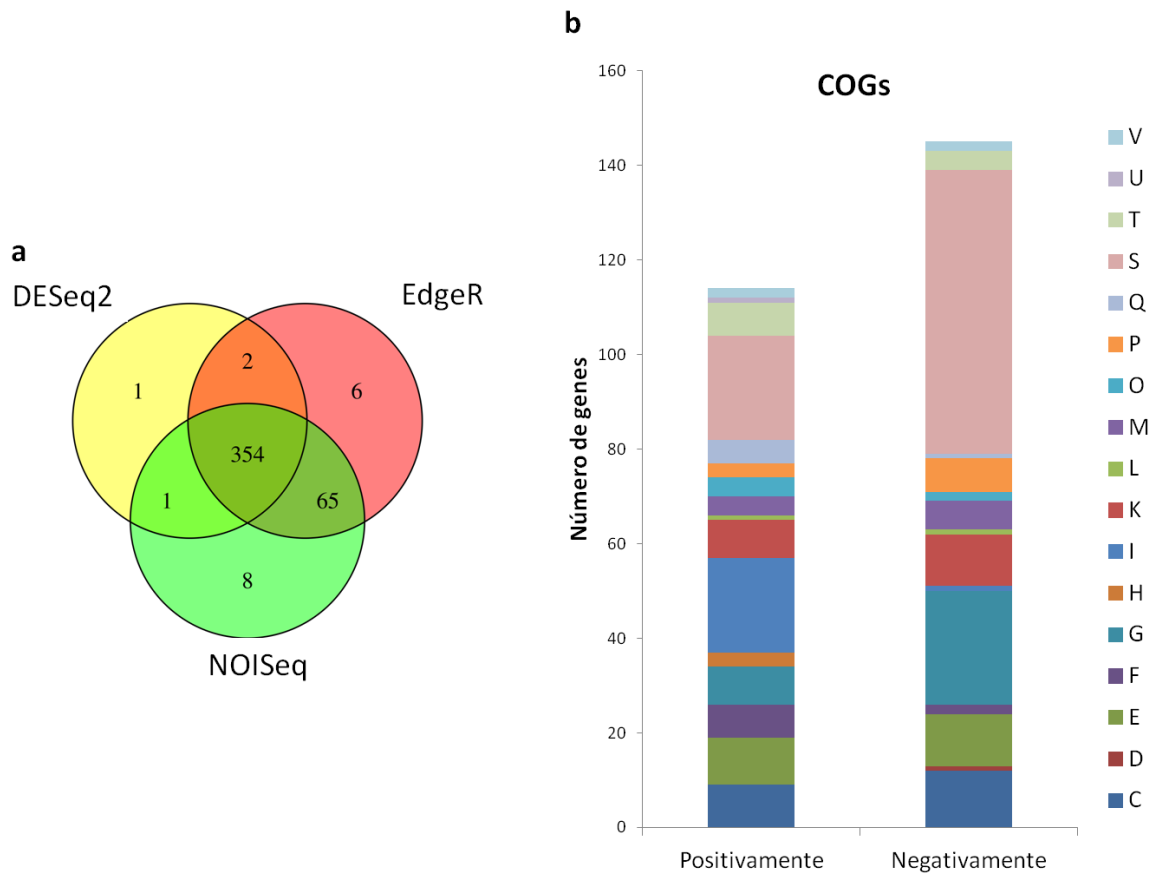


Figura 11. Resumen de genes expresados diferencialmente entre las cepas M145-D125G e IB97. A) Diagrama de Venn de los genes identificados como expresados diferencialmente por cada programa estadístico. B) Anotación funcional COG de los genes identificados por al menos dos programas. V, mecanismos de defensa, U, Secreción y tráfico vesicular, T, transducción de señales, S, función desconocida, Q, metabolismo secundario, P, metabolismo de iones inorgánicos, O, modificaciones postraduccionales, M, biogénesis de pared y membrana celular, L, replicación y recombinación, K, regulación de la transcripción, I, metabolismo de lípidos, H, metabolismo de coenzimas, G, metabolismo de carbohidratos, F, metabolismo de nucleótidos, E, metabolismo de amino ácidos, D, ciclo celular, C, producción de energía.

sobre cuya función sí se sabe algo. Esto incluye a los genes de vesículas de gas y al homólogo de *mreB*, *sco6166*.

Entre los genes activados más fuertemente por el sistema hay varios involucrados con secreción y biogénesis de la envoltura celular. El gen más sobreexpresado codifica un posible péptido secretado por un aparato de secreción tipo 1 (*sco0753-0756*). Sistemas similares en otras especies secretan bacteriocinas y lantibióticos, que son moléculas con actividad contra la membrana y la pared de otras bacterias. A *S. coelicolor* también se le conoce por secretar otro péptido similar pero con actividad surfactante, el cual es importante para la erección del micelio aéreo durante la diferenciación.⁶⁹ Este nuevo péptido, *Sco0753*, podría tener algún efecto sobre la cubierta de las hifas, que vuelva a los cúmulos más propensos a fragmentarse.

Otro gen activado por el sistema de dos componentes son un parálogo de *SecD* y *SecF*, *SecDF*, que normalmente casi no se expresa. Además parece pertenecer a un operón que contiene otro sistema de dos componentes. *SecDF* ayuda a reiniciar los ciclos de secreción del sistema *Sec*.⁵⁹ Si su función está relacionada con ese sistema de dos componentes, puede ser que sea necesario para acelerar la secreción de ciertas proteínas en respuesta a un estímulo. Estas proteínas, una vez del lado extracelular, podrían tener una función en la pared o la matriz extracelular. Dado que todo ese presunto operón se activa con la mutación *D125G*, es tentador sugerir que su expresión es activada directamente por el sistema *Sco5282-Sco5283*.

Es interesante recordar que el sistema *Sco5282-Sco5283* se parece a nivel de secuencia al sistema *CssR-CssS* de respuesta a estrés de secreción de proteínas en *B. subtilis*. Aunque en un estudio previo este sistema no respondió (a nivel de transcripción) a un estrés de secreción de la vía *Sec*,⁴² la activación del gen *SecDF* es consistente con una respuesta a estrés de secreción de proteínas. Curiosamente, uno de los genes más sobreexpresados por la mutación *Sco5282-D125G* es una proteasa de serinas, similar al efector de *CssR* *HtrA*.

En la mutante también se expresa fuertemente un operón que incluye a una proteína similar a *MreB*, *Sco6166*. *MreB* ayuda a regular el crecimiento de la pared celular para mantener la forma de otras bacterias. A diferencia de sus parálogos, la proteína *Sco6166* parece expresarse únicamente en el micelio vegetativo y no se requiere para la esporulación.⁶⁰ Aunque se encontró que no se localiza en la membrana celular, es posible que necesite de otras proteínas que no estaban presentes en las condiciones en las que se midió. Quizás en esta mutante está sobreactivada la función de *Sco6166*, y eso lleva a hifas aberrantes que no se apelmazan y forman cúmulos laxos.

Es interesante que entre los transcritos que son regulados negativamente se encontraron los que codifican algunas proteínas homólogas a las responsables de sintetizar *biofilm* en otras especies. Incluso se sabe que la ausencia de una de ellas, *MatB*, es suficiente para causar un fenotipo disperso en *S. coelicolor*.²³ Es posible que el fenotipo observado en la cepa *2L12*, de cúmulos frágiles y laxos, sea causado por una deficiencia en la síntesis de estos polímeros extracelulares. Sin embargo, la diferencia en la expresión de estos genes es relativamente baja

(2-3 veces), y no ocurre en todo el operón. Aunque la matriz extracelular (o *biofilm*) pudiera ser importante en el fenotipo de esta cepa, es difícil creer que sea el blanco principal de este sistema de dos componentes.

A pesar de que hay una gran reprogramación en el metabolismo (una tercera parte de los genes identificados pertenecen al metabolismo primario, incluyendo vías centrales como la glucólisis y la vía de las pentosas), la cepa dispersa no tiene ventajas ni problemas para crecer. Esto habla de la gran plasticidad metabólica que tienen estos organismos para mantener un ritmo de crecimiento en condiciones tan diferentes. Un ejemplo que salta a la vista es el de las tres copias de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que tiene *S. coelicolor*. Esta enzima no se considera como reguladora; sin embargo, en la cepa de crecimiento disperso, que tiene activada la gluconeogénesis, la transcripción de dos de las copias disminuye (*sco1947*, *sco7511*) mientras que la de la otra (*sco7040*) aumenta, como si las diferentes formas de la enzima tuvieran una función especializada para mantener el crecimiento en distintos estados metabólicos.

8. Conclusiones

La cepa 2L12 tiene un crecimiento disperso, caracterizado por la formación de cúmulos más pequeños que los de la cepa silvestre sin necesidad de añadir dispersantes en el medio. Este fenotipo es causado por una mutación puntual que sustituye un aspartato por glicina en el dominio HAMP de una cinasa de un sistema de dos componentes, Sco5282-Sco5283. Dicha mutación aumenta la fosforilación del regulador de respuesta de este sistema por la cinasa Sco5282; sin embargo, la mutación es recesiva respecto al alelo silvestre.

Aunque la mutación no ocasiona alteraciones en la tasa de crecimiento, el análisis transcriptómico de esta cepa reveló que hay modificaciones en el metabolismo, posiblemente en respuesta a las dificultades que implican crecer en forma de cúmulos. Notablemente, se observó la activación de vías gluconeogénicas en la cepa de crecimiento disperso, mientras que en la cepa con crecimiento en cúmulos se activaron vías de respuesta general de estrés.

Entre los posibles genes blanco de este sistema de dos componentes que podrían explicar el crecimiento disperso de la cepa 2L12 se encontraron activados genes de secreción de un péptido de función desconocida, un gen homólogo a *mreB* involucrado en la morfología, y genes relacionados con la secreción de proteínas como *secDF*. Además, en la cepa de crecimiento disperso se encontraron reprimidos genes de síntesis de exopolisacáridos como *matB* y un homólogo de *algD*.

9. Perspectivas

- Realizar ensayos de fosforilación con la cinasa Sco5282 silvestre y mutante expresadas en la membrana celular.
- Validar por RT-qPCR los genes identificados en el análisis transcriptómico que pudieran estar relacionados con el crecimiento disperso (*sco0753*, *sco6166*, *secDF*, *matB*) o con las adaptaciones metabólicas (*gap2*, *pckA*, *sigB*).
- Buscar *in silico* un motivo en los promotores de los genes identificados al que pudiera unirse el regulador de respuesta Sco5283.
- Evaluar la unión del regulador de respuesta Sco5283 a promotores de estos genes *in vitro*, con geles de retardo, e *in vivo*, mediante inmunoprecipitación de la cromatina.

10. Bibliografía

1. Kieser T., M. Bibb, M. Buttner, K. Chater y D. A. Hopwood. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, Inglaterra: John Innes Foundation.
2. Bibb, M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 208–215.
3. Hopwood D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine*. Nueva York, E. U.: Oxford University Press.
4. Anné J., B. Maldonado J. Van Impe, L. Van Mellaert y K. Bernaerts. 2011. Recombinant protein production and streptomycetes. 2011. *Journal of Biotechnology*, 158(4):159-67.
5. Walisko, R., J. Moench-Tegeder, J. Blotenberg, T. Wucherpfennig y R. Krull. 2015. The Taming of the Shrew – Controlling the Morphology of Filamentous Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 149:1-27.
6. Liu, L., H. Yang, H. D. Shin, J. Li, G. Du, y J. Chen. 2013. Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: From transcription and translation regulation to secretion pathway selection. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 9597–9608.
7. van Wezel G., P. Krabben, B. Traag, B. Keijser, B. Kerste, E. Vijgenboom, J. Heijnen y B. Kraal. 2006. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8): 5283-5288.
8. Manteca, A., R. Alvarez, N. Salazar, P. Yagüe y J. Sanchez. 2008. Mycelium differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12): 3877-3886.
9. van Dissel, D., D. Claessen y G. P. van Wezel. 2014. Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures, en *Advances in Applied Microbiology*, Volume 89, Chapter 1.
10. Gamboa-Suasnavart, R. A., N. A. Valdez-Cruz, L. E. Cordova-Dávalos, J. A. Martínez-Sotelo, L. Servín González, C. Espitia y M. A. Trujillo-Roldán. 2011. The *O*-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 10:110.
11. McCormick, J. R. y K. Flärdh. 2011. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 206-231.
12. Flärdh, K. y M. J. Buttner. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 36–49.
13. Nieceza, R. G., J. Huergo, B. A. Conolly y J. Sanchez. 1999. Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29): 20366-75.

14. Manteca, A., M. Fernandez y J. Sanchez. 2005. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*, 151: 3689-3697.
15. Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A. W. Thomae, D. A. Hopwood y G. P. van Wezel. 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 9(7): 670-5.
16. Cho Y. H., E. J. Lee, B. E. Ahn, J. H. Roe. 2001. SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 42(1):205-14.
17. Kelemen, G. H., G.L. Brown, J. Kormanec, L. Potůčková, K. F. Chater y M. K. Buttner. 1996. The positions of the σ factor genes, whiG and sigF, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 21:593–603.
18. Lee E. J., N. Karoonuthaisiri, H. S. Kim, J. H. Park, C. J. Cha, C. M. Kao y J. H. Roe. 2005. A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* 57(5):1252-64.
19. Keijsers B. J., G. P. van Wezel, G. W. Canters y E. Vijgenboom. 2002. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *Journal of bacteriology* 184(16):4420-9.
20. Manteca A. y J. Sanchez. 2009. *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9): 2920-2924.
21. Kim, Y. M., y J. H. Kim. 2004. Formation and dispersion of mycelial *pellets* of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Microbiology*, 42: 64–67.
22. Xu, H., K. F. Chater, Z. Deng y M. Tao. 2008. A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 190: 4971–4978.
23. van Dissel, D., D. Claessen, M. Roth y G. P. van Wezel. 2015. A novel locus for mycelial aggregation forms a gateway to improved *Streptomyces* cell factories. *Microbial Cell Factories*, 14:44.
24. Noens, E. E. E., V. Mersinias, B. A. Traag, C. P. Smith, H. K. Koerten y van Wezel, G. P. 2005. SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58: 929–944.
25. Noens, E. E. E., V. Mersinias, J. Willemse, B. A. Traag, E. Laing, K. F. Chater *et al.* 2007. Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 64: 1244–1259.
26. van Wezel, G. P., J. van der Meulen, S. Kawamoto, R. G. M. Luiten, H. K. Koerten y B. Kraal. 2000. *ssgA* Is Essential for Sporulation for *Streptomyces coelicolor* A3(2) and Affects Hyphal Development by Stimulating Septum Formation. *Journal of Bacteriology*, 182: 5653-5662.

27. Xu, Q., B. A. Traag, J. Willemsse, D. McMullan, M. D. Miller, M. A. Elsliger *et al.* 2009. Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex actinomycetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 25268–25279.
28. Hempel, A. M., S. Cantlay, V. Molle, S. B. Wang, M. J. Naldrett, J. L. Parker *et al.* 2012. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: E2371–E2379.
29. Horinouchi S., O. Hara, T. Beppu. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* 155: 1238–1248.
30. Horinouchi, S. 2003. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 462-467.
31. Hakenbeck, R. y J. B. Stock. 1996. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods in Enzymology*, 273: 281–300.
32. Rodríguez, H., S. Rico, M. Díaz y R. I. Santamaría. 2013. Two component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial Cell Factories*, 12: 127.
33. Hong, H. J., M. S. B. Paget y M. J. Buttner. 2002. A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Molecular Microbiology*, 44: 1199–1211.
34. Hutchings, M. I., P. A. Hoskisson, G. Chandra y M. J. Buttner. 2004. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 150: 2795-2806.
35. Martin, J. F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol*, 186: 5197–5201.
36. Martín, J. F., A. Sola-Landa, F. Santos-Beneit, L. T. Fernández-Martínez, C. Prieto y A. Rodríguez-García. 2011. Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial Biotechnology*, 4(2): 165-174.
37. Yepes, A., S. Rico, A. Rodriguez-Garcia, R. I. Santamaria, M. Diaz. 2011. Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One*, 6:e19980.
38. Wang, R., Y. Mast, J. Wang, W. Zhang, G. Zhao, W. Wohlleben, Y. Lu, W. Jiang. 2013. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 87: 30–48.
39. Yu, Z., H. Zhu, F. Dang, W. Zhang, Z. Qin, S. Yang, H. Tan, Y. Lu, W. Jiang. 2012. Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 2012, 85: 535–556.

40. Shu, D., L. Chen, W. Wang, Z. Yu, C. Ren, W. Zhang, S. Yang, Y. Lu, W. Jiang. 2009. *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbial Biotechnology*, 81: 1149–1160.
41. Ratcliff W. C., R. F. Denison, M. Borrello y M. Travisano. 2011. Experimental evolution of multicellularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 1595–1600.
42. Gullón, S., R. L. Vicente y R. P. Mellado. 2012. A Novel Two-Component System Involved in Secretion Stress Response in *Streptomyces lividans*. *PLoS One*, 7(11):e48987.
43. Parkinson, J. S. 2010. Signaling Mechanisms of HAMP Domains in Chemoreceptors and Sensor Kinases. *Annual Reviews in Microbiology*, 64: 101-122.
44. Matamouros, S., K. R. Hager y S. Miller. 2015. HAMP Domain Rotation and Tilting Movements Associated with Signal Transduction in the PhoQ Sensor Kinase. *MBio*, 26;6(3):e00616-15.
45. Datsenko, K. A., y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. 97(12): 6640–6645.
46. Gust, B., G. Chandra, D. Jakimowicz, T. Yuqing, C. J. Bruton y K. F. Chater. 2004. λ Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*, 54: 107-128.
47. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli* in DNA cloning: a practical approach, ed Glover D. M. (IRL Press, Oxford, United Kingdom), 1:109–135.
48. MacNeil D. J., K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons y T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111: 61-68.
49. Novagen, pET system manual, 10^o edición, Mayo, 2003.
50. Redenbach M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi y D. A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology*, 21: 77-96.
51. Huang J., J. Shi, V. Molle, B. Sohlberg, D. Weaver, M. J. Bibb. 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 58:1276–1287.
52. Palacios-Adalid, A. (2016). Funcionalidad del elemento integrativo-conjugativo AICE5349 de *Streptomyces coelicolor*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
53. Álvarez, A. F. y D. Georgellis. 2012. *In vitro* and *in vivo* analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods in Enzymology*, 471:205-28.
54. Love, M. I., W. Huber y S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15:550.

55. Robinson, M. D., D. J. McCarthy y K. Gordon. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 1; 26(1): 139–140.
56. Tarazona, S., F., García-Alcalde, J. Dopazo, A. Ferrer y A. Conesa. 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research*, 21(12):2213-23.
57. Huerta-Cepas, J., K. Forslund, L. P. Coelho, D. Szklarczyk, L. J. Jensen, C. von Mering y P. Bork. 2017. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msx148.
58. Li R. y C. A. Townsend. 2006. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic engineering*, 8(3):240-52.
59. Zhou Z., Y. Li, N. Sun, Z. Sun, L. Lv, Y. Wang, L. Shen y Y. Q. Li. 2014. Function and Evolution of Two Forms of SecDF Homologs in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE* 9(8):e105237.
60. Heichlinger A., M. Ammelburg, E. M. Kleinschnitz, A. Latus, I. Maldener, K. Flärdh, W. Wohlleben, G. Muth. 2011. The MreB-Like Protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Depends on MreB for Proper Localization and Contributes to Spore Wall Synthesis. *Journal of bacteriology* 193(7):1533-42.
61. Lee E. J., Y. H. Cho, H. S. Kim, B. E. Ahn y J. H. Roe. 2004. Regulation of sigmaB by an anti- and an anti-anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress. *Journal of bacteriology* 186(24):8490-8.
62. Mao X. M., Z. Zhou, X. P. Hou, W. J. Guan y Y. Q. Li. 2009. The Reciprocal Regulation between SigK and Differentiation Programs in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 191(21):6473-6481.
63. Molle V, Palframan WJ, Findlay KC, Buttner MJ. 2000. WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology* 182(5):1286-95.
64. Jakimowicz P, Cheesman MR, Bishai WR, Chater KF, Thomson AJ, Buttner MJ. 2005. Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. *The Journal of biological chemistry* 280(9):8309-15.
65. Crack JC, den Hengst CD, Jakimowicz P, Subramanian S, Johnson MK, Buttner MJ, Thomson AJ, Le Brun NE. 2009. Characterization of [4Fe-4S]-containing and cluster-free forms of *Streptomyces* WhiD. *Biochemistry* 48(51):12252-64.
66. van Keulen, G., D. A. Hopwood, L. Dijkhuizen, R. G. Sawers. 2005. Gas vesicles in actinomycetes: old buoys in novel habitats? *Trends in Microbiology*. 13(8):350-354.
67. Botas, A., R. Pérez-Redondo, A. Rodríguez-García, R. Álvarez-Álvarez, P. Yagüe, A. Manteca y P. Liras. 2018. ArgR of *Streptomyces coelicolor* Is a Pleiotropic Transcriptional Regulator: Effect on the Transcriptome, Antibiotic Production, and Differentiation in Liquid Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 9:361.

68. Waldvogel, E., A. Herbig, F. Battke, R. Amin, M. Nentwich, K. Nieselt, T. E. Ellingsen, A. Wentzel, D. A. Hodgson, W. Wohlleben e Y. Mast. 2011. The PII protein GlnK is a pleiotropic regulator for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92(6):1219–1236.
69. Willey J., R. Santamaria, J. Guijarro, M. Geistlich y R. Losick. 1991. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell*, 65:641-650.