



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Identificación de elementos relacionados funcionalmente con la proteína
Sco2127 en la regulación de la diferenciación morfológica y la biosíntesis
de actinorrodina en *Streptomyces coelicolor*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

VÍCTOR HUGO TIERRAFRÍA PULIDO

Tutor principal

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Miembros del comité tutor

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, Instituto de Biotecnología
Dr. Luis Servín González, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, CD. MX.

mayo 2019



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.

Resumen	4
Abreviaturas	6
Introducción.....	7
Características generales y relevancia de los estreptomicetos	7
<i>Streptomyces coelicolor</i> como objeto de estudio.....	8
Biosíntesis y regulación de la actinorrodina	9
<i>Regulación específica: ActII-ORF4</i>	10
<i>Regulación global</i>	10
Sistema bldA-AdpA.....	11
Sistemas de dos componentes AfsK-AfsR y PhoR-PhoP	11
Regulación catabólica por carbono (RCC).....	12
Descubrimiento del gen <i>sco2127</i> y su posible participación en la RCC.....	15
Regulación catabólica por carbono en <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>	16
Efecto del gen <i>sco2127</i> de <i>S. coelicolor</i> en mutantes de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> insensibles a RCC	17
La proteína Sco2127 de <i>S. coelicolor</i> interacciona de manera independiente con las proteínas BldKB y Sco2582	19
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	22
Materiales y métodos.....	23
Cepas y condiciones de crecimiento	23
Determinación de actinorrodina y nitrito	23
Proteómica.....	24
<i>Extracción y digestión de proteínas</i>	24
<i>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS analysis)</i>	25
<i>Biblioteca de referencia y preparación de las muestras</i>	25
<i>Análisis estadístico</i>	25
Transcriptómica	26
<i>Extracción de RNA</i>	26
<i>Análisis de microarreglos</i>	26
Enriquecimiento de las proteínas expresadas diferencialmente de acuerdo con los procesos biológicos en los cuales participan	27
Predicción bioinformática del regulón Sco0204.....	28
Resultados	29
La mutante Δ <i>sco2127</i> mostró deficiencias en la diferenciación morfológica y en la producción de actinorrodina	29
El gen <i>sco2127</i> no es responsable de la RCC en <i>S. coelicolor</i>	31
La delección del gen <i>sco2127</i> provoca cambios en la abundancia de diversas proteínas	32
<i>El mapeo de las proteínas expresadas diferencialmente reveló cambios en algunas rutas metabólicas y procesos biológicos</i>	32
El cambio en la expresión de algunas proteínas puede deberse al aumento en la expresión del regulador de respuesta Sco0204.....	38
El regulador Sco0204 controla la expresión del complejo nitrato reductasa y, por lo tanto, la formación de nitrito en la mutante Δ <i>sco2127</i>	40
Análisis transcriptómico de la mutante Δ <i>sco2127</i>	42
La integración de algunos datos obtenidos mediante proteómica y transcriptómica permitió identificar alteraciones en la ruta de biosíntesis de ectoína.....	46
Discusión.....	49

Producción de energía y biosíntesis de ectoína.....	51
Transporte.....	57
<i>Sistemas BldK y OBP</i>	57
<i>Sistema Sco0753-56</i>	59
<i>Sco7612 y su posible participación en la estabilidad de la membrana celular</i>	61
<i>Glucosa permeasas</i>	62
Relación entre el aumento en la expresión del regulador Sco0204 y los perfiles de expresión de algunos genes y proteínas en la mutante $\Delta sco2127$	64
Influencia del regulador de respuesta Sco0204 sobre la diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina, en la mutante $\Delta sco2127$	68
Conclusiones	74
Referencias	75
Información Suplementaria	I

Resumen

Después de casi 30 años de investigar la posible participación de la proteína Sco2127 de *S. coelicolor* en la regulación catabólica por carbono (RCC), se ha propuesto que el gen *sco2127* codifica para alguna permeasa o para algún regulador transcripcional que activa la expresión de los genes que codifican para las glucosa permeasas (*glcP1* y *glcP2*); sin embargo, también se ha demostrado que el gen *sco2127* no solo no codifica para cualquiera de estas proteínas, sino que la proteína codificada por este gen, no tiene homología con ninguna proteína de función conocida. En este contexto, y con la intención de conocer la participación de la proteína Sco2127 en la RCC, en el presente estudio se caracterizó el fenotipo de la mutante Δ *sco2127*. Contrario a lo esperado, esta caracterización reveló que la proteína Sco2127 no es responsable de la RCC, y que es necesaria para el desarrollo y la formación de actinorrodina, así que para analizar con mayor detalle las repercusiones de la delección del gen *sco2127* sobre la fisiología de *S. coelicolor*, también se compararon los proteomas y transcriptomas de la mutante Δ *sco2127* y la cepa silvestre. Estas comparaciones revelaron cambios en la expresión de cientos de genes y proteínas relacionados con algunas rutas, como la biosíntesis de nucleótidos de purina, la biosíntesis de actinorrodina, la degradación de glicina y la biosíntesis de ectoína, y con algunos procesos, como el metabolismo de glutamato, el transporte y algunos procesos de óxido-reducción. Además de confirmar que el gen *sco2127* es necesario para la diferenciación morfológica y la biosíntesis de actinorrodina, estos resultados revelaron que algunos intermediarios, como el 2-oxoglutarato y el glutamato, y algunas proteínas, como el regulador de respuesta Sco0204, juegan un papel importante en la fisiología de la mutante, al participar en, e incluso controlar, varias de las rutas y procesos afectados por la delección del gen *sco2127*. El cambio en la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2*, así como de algunos reguladores transcripcionales, sugiere por otro lado, y en consistencia con algunos estudios previos, que la expresión de dichos genes puede estar mediada por algún regulador transcripcional; sin embargo, en este estudio se proponen, por primera vez, algunos candidatos para llevar a cabo dicha tarea. Aunque se requieren estudios adicionales para conocer la función de la proteína Sco2127, este trabajo muestra un panorama general de los cambios fisiológicos ocasionados por la

delección del gen *sco2127*, y demuestra que, aunque la proteína Sco2127 no es un regulador transcripcional, su ausencia genera cambios en una gran variedad de genes y proteínas relacionadas con el combate a estrés y la generación de acarreadores de electrones necesarios para satisfacer la demanda de energía aparentemente ocasionada por la delección del gen *sco2127*.

Abreviaturas

tRNA, RNA de transferencia

PEP, fosfoenolpiruvato

RCC, regulación catabólica por carbono

dog, 2-desoxiglucosa

dogR, mutantes resistentes a dog

G6P, glucosa-6-fosfato

Pck, fosfoenolpiruvato carboxicinasa

Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*

UT, unidad transcripcional

MPT, molibdopterina

Introducción

Características generales y relevancia de los estreptomicetos

Los estreptomicetos son bacterias filamentosas no patógenas que se caracterizan por su capacidad para producir una gran variedad de productos naturales. Estos productos incluyen una amplia lista de compuestos, entre los que destacan algunos antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores y herbicidas, los cuales han encontrado novedosas aplicaciones en diversos ámbitos relacionados con la actividad humana, como la medicina, la agricultura, y el cuidado del medio ambiente (Dayani, Bishop et al. 2004, Oliveira, Batagov et al. 2006). Los estreptomicetos son reconocidos porque de ellos se ha obtenido casi la mitad los antibióticos producidos por microorganismos (Demain 2014); sin embargo, estas bacterias también se caracterizan por presentar un desarrollo morfológico complejo. Tanto en la naturaleza como en el laboratorio, principalmente en medio semisólido, los estreptomicetos forman un micelio vegetativo que se propaga a través de la superficie del medio, hasta agotar los nutrientes a su alrededor. Una vez que esto sucede, el micelio vegetativo sufre un proceso de autólisis que libera nutrientes adicionales, los cuales son reutilizados por la bacteria para la formación de un micelio aéreo. Finalmente, las hifas del micelio aéreo se dividen para formar unas estructuras de resistencia, mejor conocidas como esporas, las cuales contienen toda la información necesaria para comenzar un nuevo ciclo de vida cuando las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables (Chater 2006). Cuando las hifas se observan a través del microscopio en esta fase del desarrollo, parecen cadenas de esporas (Chater 2006); sin embargo, a simple vista, dan una apariencia aterciopelada a la superficie de la colonia, que permite saber que el proceso de diferenciación ha concluido.

En los estreptomicetos, la producción de antibióticos está estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica. La producción de estos metabolitos inicia generalmente cuando inicia la formación del micelio aéreo, y es abundante cuando las hifas del micelio aéreo se dividen para formar esporas. De esta manera, los estreptomicetos impiden que otros organismos que habitan el mismo ambiente, consuman los nutrientes liberados por la degradación del micelio vegetativo, y aumentan sus probabilidades de sobrevivencia (Chater 2006). En algunos casos, es posible identificar a simple vista la acumulación de estos compuestos, ya que

algunas especies como *Streptomyces coelicolor*, producen compuestos pigmentados como la undecilprodigiosina (rojo) y la actinorrodina (azul).

A pesar de que la mayoría de los estreptomicetos no esporula en medio líquido, en estas condiciones también ha sido posible identificar con precisión las fases del desarrollo y producción de metabolitos secundarios. Algunos autores incluso han propuesto que existe una íntima relación entre las curvas de crecimiento de los cultivos en medio líquido, y el desarrollo morfológico observado en placa. En 2008, por ejemplo, Ángel Manteca y colaboradores observaron que la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria de un cultivo líquido de *Streptomyces*, corresponden con la formación de micelio vegetativo y la esporulación de una colonia estriada en placa, respectivamente (Manteca, Alvarez et al. 2008), lo cual explica que la producción de antibióticos en medio líquido inicie justo en el periodo de transición entre la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria (Huang, Lih et al. 2001).

***Streptomyces coelicolor* como objeto de estudio**

La capacidad de *S. coelicolor* para producir compuestos pigmentados, aunada a la facilidad para detectar a simple vista la formación de estos compuestos, facilitan la identificación de mutantes incapaces de producirlos. Esto no solo ha permitido caracterizar por completo las rutas de biosíntesis de algunos compuestos, como la undecilprodigiosina (Cerdeno, Bibb et al. 2001) y la actinorrodina (Fernandez-Moreno, Caballero et al. 1991, Fernandez-Moreno, Martinez et al. 1992, Fernandez-Moreno, Martinez et al. 1994), sino también el desarrollo de múltiples herramientas para la manipulación genética de *S. coelicolor*. Estas herramientas incluyen diversos sistemas de expresión, librerías de cósmidos, y métodos de recombinación, para el reemplazo total o parcial de genes (Kieser, Bibb et al. 2000), y hacen de *S. coelicolor* el estreptomiceto mejor caracterizado genéticamente. De hecho, esta fue la primera especie de su género, cuyo genoma fue secuenciado. Dicho genoma reveló la presencia inesperada de múltiples genes relacionados con la biosíntesis de hasta 22 metabolitos secundarios distintos (Bentley, Chater et al. 2002), confirmando el enorme potencial de los estreptomicetos para la caracterización y el desarrollo de nuevos productos naturales; sin embargo, en el genoma también se descubrieron numerosos genes (965) que codifican para proteínas con alguna función regulatoria (Bentley,

Chater et al. 2002), lo cual indica que aunque *S. coelicolor* tiene el potencial para producir una gran variedad de compuestos útiles para la actividad humana, la formación de dichos compuestos está sujeta a diversos e intrincados sistemas de regulación.

Biosíntesis y regulación de la actinorrodina

Probablemente la ruta de biosíntesis de actinorrodina sea la vía mejor estudiada para la síntesis de cualquier antibiótico producido por *S. coelicolor*. La actinorrodina es un potente agente bacteriostático sensible a los cambios de pH (Mak and Nodwell 2017). Todos los genes relacionados con la biosíntesis y el transporte de actinorrodina están agrupados dentro del cluster de genes *act*. Este cluster contiene más de 20 genes (*sco5071-sco5092*) distribuidos a lo largo de 22 kB (Okamoto, Taguchi et al. 2009), y está organizado en siete regiones, de acuerdo al tipo de genes que complementan la habilidad de distintas mutantes incapaces de producir actinorrodina, de sintetizar nuevamente este pigmento (Fig. 1-A) (Malpartida and Hopwood 1986). Los genes de la región I (*actI-1, 2 y 3*) codifican para una poliketido sintasa (PKS) de tipo I que se encarga de confeccionar el esqueleto carbonado de la actinorrodina a partir de un residuo de acetyl-CoA y siete residuos de malonil-CoA (Fernandez-Moreno, Martinez et al. 1992); los genes de las regiones III, IV, VI y VII codifican para diversas óxido-reductasas responsables de convertir el núcleo estructural de la actinorrodina en

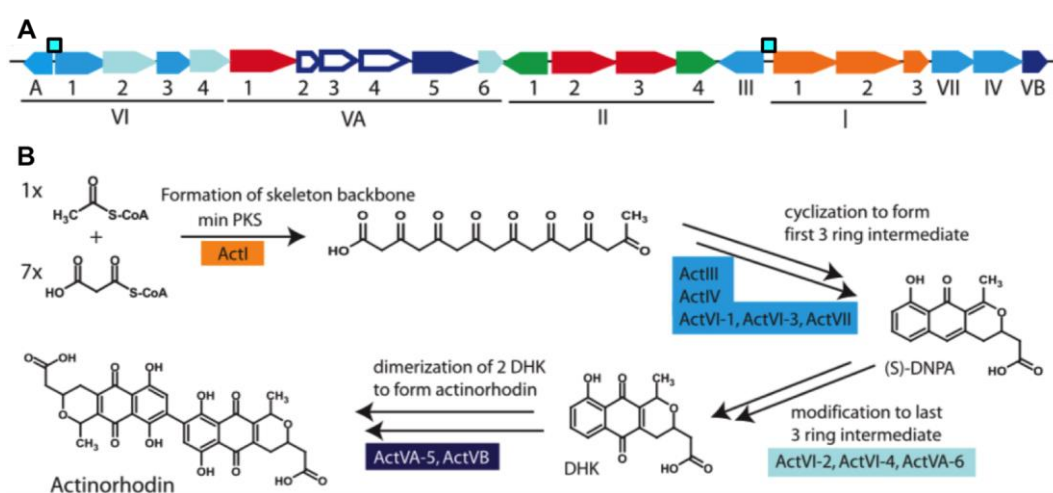


Figura 1 Biosíntesis de actinorrodina. (Imagen adaptada de Craney et al., 2013). A. Organización genómica del cluster *act*. Genes de regulación y resistencia: rojo y verde, respectivamente. Genes que codifican para la PKS: naranja. El color del resto de los genes depende de su participación en la configuración del producto final. Los genes sin relleno aún no han sido caracterizados. Sitios de unión del regulador transcripcional ActII-ORF4: cian. B. Pasos principales de la vía y enzimas que los catalizan.

un intermediario de tres anillos aromáticos; y los genes *actVA-5* y *actVB* codifican para un par de enzimas que se encargan de fusionar dos de estos intermediarios en el producto final (Fernandez-Moreno, Martinez et al. 1994) (Fig. 1-B).

Regulación específica: ActII-ORF4

Los genes de resistencia y regulación de la actinorrodina se encuentran principalmente en la región II, en la parte central del cluster (Fernandez-Moreno, Caballero et al. 1991). El gen *actII-ORF4* codifica para una proteína de unión a DNA que se une específicamente a las regiones intergénicas *actIII/actI-ORF1* y *actVIA/actVI-ORF1*, para activar la expresión de dichos genes (Arias, Fernandez-Moreno et al. 1999) (Fig. 1-A). Debido a que las enzimas codificadas por estos genes son indispensables para la biosíntesis de actinorrodina (Fig. 1), puede decirse que la proteína ActII-ORF4 regula positivamente la formación de dicho compuesto. En virtud de que el activador ActII-ORF4 controla únicamente la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de actinorrodina, esta proteína también es considerada un regulador específico, y en este sentido, es similar a otros reguladores de *S. coelicolor* que controlan específicamente la producción de otros antibióticos, como la undecilprodigiosina (RedD y RedZ), el antibiótico dependiente de calcio (CdaR), la coelimicina (CpkO) y la metilénomicina (MmyB, MmyR y MmfR) (Crane, Ahmed et al. 2013).

Regulación global

En la producción de actinorrodina no solo intervienen reguladores específicos como la proteína ActII-ORF4, sino también otros elementos de regulación. Estos elementos incluyen genes, proteínas y metabolitos, que generalmente forman parte de sistemas de regulación más complejos, y, por lo tanto, suelen afectar la producción de otros metabolitos secundarios, además de la actinorrodina. Algunos de estos sistemas, como el sistema *bldA-AdpA*, y los sistemas de dos componentes *AfsK-AfsR* y *PhoR-PhoP*, han sido bien caracterizados, y actualmente se conoce con precisión la labor que desempeña cada uno de sus integrantes, en cambio, otros sistemas, como la regulación catabólica por carbono (RCC), han sido pobremente caracterizados, y hasta el momento no se ha comprendido totalmente su influencia sobre la biosíntesis de antibióticos, incluyendo la actinorrodina.

Sistema *bldA-AdpA*

Entre los genes *sco3087* y *sco3088* se encuentra el gen *bldA*. Este gen codifica para el único RNA de transferencia (tRNA) capaz de traducir el codón TTA en *S. coelicolor*, y por tal motivo, es indispensable para la traducción de los genes que contienen este tipo de tripletes (Takano, Tao et al. 2003). Algunos de estos genes incluyen los genes *actII-ORF4* y *redZ* (Li, Wu et al. 2007), lo cual indica que la expresión de estos genes, y por lo tanto, la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, dependen del gen *bldA* (White and Bibb 1997). El tRNA *bldA* es conocido como un regulador global porque los genes que regula no necesariamente se encuentran cerca del gen *bldA*, basta con observar que los genes *actII-ORF4* (*sco5085*) y *redZ* (*sco5881*) se encuentran a más de 2 Mb del gen *bldA*. La expresión del gen *bldA* depende, a su vez, del regulador AdpA. Esta proteína contiene un par de dominios de unión a DNA que le permiten unirse al promotor del gen *bldA* y activar su expresión. En consistencia con esto, en *S. coelicolor* se ha observado que la delección del gen *adpA* afecta la producción de diversos metabolitos secundarios, incluyendo la actinorrodina, e incluso la formación de micelio aéreo (Nguyen, Tenor et al. 2003), indicando que el regulador AdpA actúa a un nivel todavía más general que el nivel al que actúa el tRNA *bldA*. La expresión del gen *adpA* es regulada por las proteínas ScbR y SlbR. Al unirse al promotor del gen *adpA*, los reguladores ScbR y SlbR reprimen la expresión de dicho gen, hasta que detectan la presencia de gama-butirolactonas (GBLs). Las GBLs son moléculas de señalización de bajo peso molecular que al unirse a las proteínas ScbR y SlbR, evitan que estas proteínas sigan unidas al promotor del gen *adpA*, y de esta manera favorecen la expresión del gen *adpA* (Takano, Chakraborty et al. 2001). Debido a que la biosíntesis de GBLs depende directamente del regulador transcripcional SlbR, esta proteína es crucial para la regulación y biosíntesis de antibióticos en *S. coelicolor*. De acuerdo con esto, se ha visto que algunas mutantes *slbR* de *S. coelicolor* producen actinorrodina y undecilprodigiosina de manera anticipada (Yang, Song et al. 2012).

Sistemas de dos componentes *AfsK-AfsR* y *PhoR-PhoP*

Los sistemas de dos componentes son mecanismos de regulación que detectan cambios en la concentración de alguna señal ambiental, y los traducen en una respuesta transcripcional. Estos sistemas generalmente están compuestos por una

cinasa y un regulador transcripcional, también conocido como regulador de respuesta. Cuando cambia la concentración de la señal apropiada, la cinasa se autofosforila, y de esta manera es capaz de fosforilar a su regulador de respuesta correspondiente. Una vez fosforilado, el regulador de respuesta puede activar o reprimir la expresión de sus genes blanco (Hutchings, Hoskisson et al. 2004). En *S. coelicolor*, los sistemas de dos componentes AfsK-AfsR y PhoR-PhoP están estrechamente relacionados con la biosíntesis de antibióticos. Aunque estos sistemas reconocen cambios en la concentración de compuestos diferentes, S-adenosilmetionina (SAM) en el caso del sistema AfsK-AfsR (Jin, Cheng et al. 2011), y fosfato en el caso del sistema PhoR-PhoP (Sola-Landa, Rodriguez-Garcia et al. 2005), ambos activan la expresión del gen *afsS*, el cual codifica para un factor sigma que promueve la expresión de algunos genes necesarios para la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina (Lee, Umeyama et al. 2002, Tanaka, Takano et al. 2007).

Regulación catabólica por carbono (RCC)

Las bacterias son capaces de utilizar diversas fuentes de carbono; sin embargo, el consumo de estos nutrientes está sujeto a un fenómeno conocido como regulación catabólica por carbono (RCC). Este fenómeno consiste en el uso preferencial de las fuentes de carbono que permiten un crecimiento celular más rápido, y que además son de fácil acceso, sobre otras fuentes de carbono que no cumplen con estas características, de tal manera que mientras esto sucede, se inhibe la expresión y/o la actividad de las enzimas necesarias para la utilización de las fuentes de carbono menos preferidas (Gorke and Stulke 2008).

La RCC ha sido ampliamente estudiada en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En *E. coli*, básicamente depende del estado de fosforilación del componente EIIA, y este, a su vez, depende de la presencia de glucosa y la concentración de fosfoenolpiruvato (PEP). En presencia de glucosa, el componente EIIA no está fosforilado, ya que el grupo fosfato que puede unir, es transferido a la glucosa por el componente EIIBC durante el transporte de esta fuente de carbono al interior de la célula. Bajo estas condiciones, el componente EIIA tampoco puede ser fosforilado por el PEP, quien normalmente se encarga de fosforilarlo, ya que este intermediario disminuye su concentración en presencia de glucosa. En cualquier caso, el componente EIIA no fosforilado es capaz de unirse

a los promotores de los genes *glpK* y *lacY* y, de esta manera, evitar la expresión de las proteínas codificadas por estos genes. Debido a que estas proteínas están relacionadas con el metabolismo de glicerol y el transporte de lactosa, respectivamente, estas fuentes de carbono no pueden ser utilizadas en presencia de glucosa (Fig. 2-A). Contrario a lo que sucede en presencia de glucosa, en ausencia de este carbohidrato aumenta la concentración de PEP, y esto permite que el componente EIIA pueda ser fosforilado. Adicionalmente, y debido a que en ausencia de glucosa no hay una fuente de carbono que deba ser fosforilada por el componente EIIBC, el componente EIIA conserva su grupo fosfato, y de esta manera es capaz de activar a la adenilato ciclasa (AC). Una vez activa, la AC cataliza la formación de AMP cíclico (cAMP), y este mensajero, a su vez, puede unirse a la proteína CRP para formar el complejo cAMP-CRP, el cual activa la expresión de los genes involucrados en la utilización de otras fuentes de carbono distintas a la glucosa, como el glicerol y la lactosa (Fig. 2-A) (Gorke and Stulke 2008).

En *B. subtilis* la RCC depende de la proteína HPr, específicamente, del sitio donde esta proteína es fosforilada. La proteína HPr puede fosforilarse predominantemente en dos sitios: la serina 46 (Ser46) y la histidina 15 (His15). Cuando el flujo glucolítico se encuentra activo, incrementa la concentración de fructosa-1,6-bisphosphate (FBP) y ATP, y esto permite que la proteína HPr sea fosforilada en la Ser 46 por la proteína bifuncional HPr cinasa/fosforilasa (HPrK).

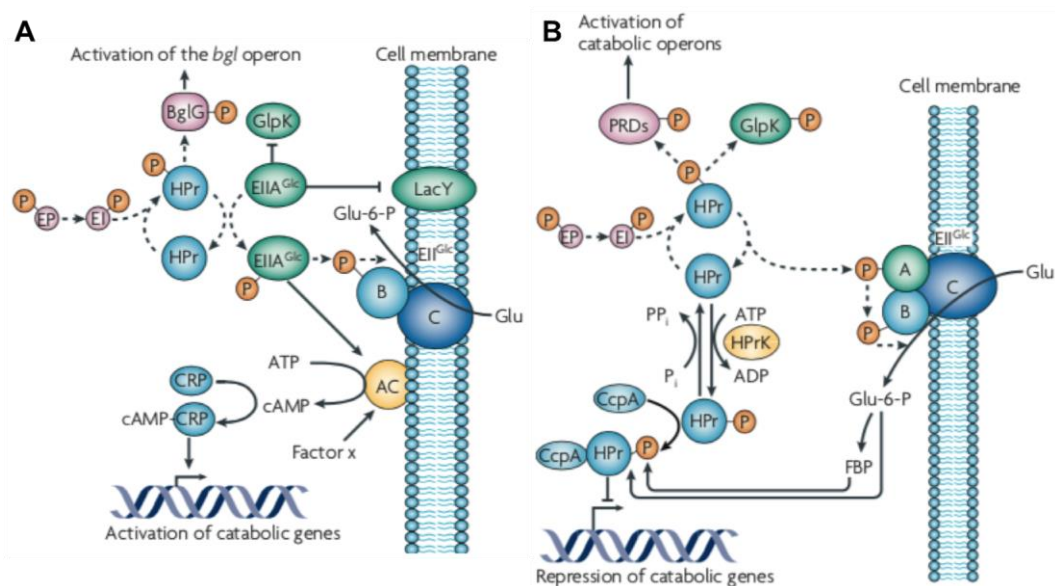


Figura 2 Regulación catabólica por carbono en *Escherichia coli* (A) y *Bacillus subtilis* (B). (Imagen tomada de (Gorke and Stulke 2008)).

Una vez fosforilada, la proteína HPr(Ser-P) se une a la proteína de control de catabolitos (CcpA). Cuando no está fosforilado, el residuo His15 de la proteína HPr también ayuda a fortalecer la interacción del complejo HPr(Ser-P)-CcpA, el cual se encarga de reprimir la expresión de los genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa (Fig. 2-B). Por el contrario, cuando disminuye la concentración de F6B y ATP, en ausencia de glucosa, se induce la actividad fosforilasa de la proteína HPrK. Esto promueve la pérdida del grupo fosfato unido inicialmente al residuo Ser46 de la proteína HPr, y favorece la fosforilación de esta proteína en la His15. Esta reacción está mediada por el complejo EI. Finalmente, la proteína HPr(His-P) puede transferir su grupo fosfato a otras proteínas relacionadas con el metabolismo de otras fuentes de carbono, y por lo tanto, inducir su actividad, dando como resultado un incremento en el consumo de dichas fuentes de carbono (Fig. 2-B) (Gorke and Stulke 2008).

A diferencia de *E. coli* y *B. subtilis*, donde la RCC ha sido descrita detalladamente, en organismos como *S. coelicolor*, este sistema de regulación no ha sido bien caracterizado a pesar del esfuerzo que, durante años, se ha realizado por comprender las bases de su funcionamiento.

En *S. coelicolor*, la RCC ha sido estudiada desde los años ochenta, cuando David Hodgson creció células de *S. coelicolor* en presencia de arabinosa, una fuente de carbono cuya utilización es reprimida en presencia de glucosa, y 2-desoxiglucosa (dog), un análogo de la glucosa no asimilable, pero capaz de activar el sistema de regulación por carbono. Como resultado de esta fuerte presión selectiva, aparecieron diferentes mutantes resistentes a dog (mutantes dogR). Posteriormente, estas mutantes se cultivaron en placas con agar suplementado con glucosa, y se observó que alrededor de algunas colonias se habían formado halos que indicaban la utilización de agar, a pesar de la presencia de glucosa, lo cual sugería que las mutantes dogR eran insensibles a represión por carbono (Hodgson 1982). Aunque la mayoría de estas mutantes eran incapaces de crecer en glucosa como única fuente de carbono (mutantes dogR G⁻), también se obtuvieron mutantes dogR completamente capaces de usar glucosa (G⁺), y con una capacidad intermedia para usar dicho carbohidrato (G[±]) como única fuente de carbono. El fenotipo de las mutantes G⁻ y G[±] podría haberse explicado fácilmente si estas mutantes hubieran mostrado deficiencias para transportar glucosa; sin embargo, dichas mutantes no mostraron diferencias significativas en el transporte de

glucosa con respecto a la cepa silvestre, al menos durante las primeras horas de su medición, aunque después de algunas horas, sí observó una disminución en su velocidad de consumo de glucosa, lo cual sugería que si bien las mutantes no habían sufrido afectaciones importantes en el transporte de glucosa, era evidente que sí habían mostrado dificultades para metabolizar esta fuente de carbono. Debido a que estas mutantes también fueron capaces de usar galactosa como fuente de carbono, la cual es metabolizada a través de la glucosa-6-fosfato (G6P), y tomando en cuenta que la única reacción de la glucólisis entre el transporte de glucosa y la formación de G6P es la fosforilación de la glucosa, la cual está mediada por la glucosa cinasa, se postuló que las mutantes *dogR* debían tener mutaciones en el gen que codifica para dicha enzima (*glkA*) (Hodgson 1982). En consistencia con esta hipótesis, Seno y Chater demostraron, solamente un año después, que, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes *dogR* de *S. coelicolor* habían perdido su actividad glucosa cinasa (Seno and Chater 1983).

Descubrimiento del gen *sco2127* y su posible participación en la RCC

Para identificar las mutaciones presentes en las mutantes *dogR* G^- , estas mutantes se transformaron con fragmentos de DNA de 30 kb del cromosoma de *S. coelicolor*, y se observó que algunas mutantes recuperaron su habilidad para crecer en glucosa como única fuente de carbono, y su actividad glucosa cinasa. El análisis de las construcciones obtenidas a partir de algunas de estas mutantes, reveló la presencia recurrente de un fragmento de DNA de 2.9 kb que, en teoría, debía contener el gen que codifica para la glucosa cinasa (*glk*) (Ikeda, Seno et al. 1984); sin embargo, la secuencia de dicho fragmento no solo reveló la presencia del gen *glk* (*sco2126*), sino también, y de manera inesperada, del gen *sco2127*. Debido a que este último gen codifica para una proteína de función desconocida, se propuso que el gen *glk* era el único responsable de la RCC en *S. coelicolor*; sin embargo, la transformación de algunas mutantes *dogR*, únicamente con este gen (clonado en un vector de bajo número de copias), no fue suficiente para restablecer la RCC, analizada en función de la expresión del gen que codifica para la agarasa (*dag*). En cambio, la transformación de dichas mutantes con un fragmento de DNA que contenía los genes *sco2127* y *glk*, sí logró restablecer la represión del gen *dag* (Angell, Lewis et al. 1994). Aunque estos resultados advertían por primera vez que el gen *sco2127* o la proteína codificada por dicho

gen participaban de alguna manera en la RCC, esta propuesta recibió poca atención, y en este contexto, la idea de que el gen *glk* fuera el responsable de la RCC, por el contrario, adquirió mayor fuerza; sin embargo, las mutantes *dogR* transformadas únicamente con el gen *glk* no fueron capaces de restablecer la RCC. Debido a que para llevar a cabo dicha transformación se había utilizado un vector de bajo número de copias, se creyó que las mutantes *dogR* no habían complementado debido a la baja expresión del gen *glk*; sin embargo, la transformación de las mutantes con un vector multicopia, y por lo tanto la sobreexpresión del gen *glk*, tampoco fue suficiente para restablecer la RCC en dichas mutantes. En contraste con estos resultados, la transformación de las mutantes *dogR* con una sola copia de los genes *sco2127* y *glk* fue suficiente para evitar la expresión del gen *dag* (Angell, Lewis et al. 1994). Además de señalar que ni el gen *glk*, ni la actividad glucosa cinasa eran suficientes para reprimir la expresión del gen *dag* en presencia de glucosa, estos resultados fortalecieron la hipótesis de que el gen *sco2127* jugaba un papel importante en la regulación por carbono en *S. coelicolor*.

Regulación catabólica por carbono en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Similar a lo ocurrido con la expresión del gen *dag* en *S. coelicolor*, distintos autores observaron que en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* la glucosa también disminuye la actividad β -galactosidasa y la formación de antraciclinas (Segura, González et al. 1996, Escalante, Ramos et al. 1999, Ramos, Guzman et al. 2004), demostrando que la formación de enzimas extracelulares y antibióticos también está sujeta a represión por carbono en *S. peucetius* var. *caesius*. De acuerdo con estos resultados, también se observó que la formación de β -galactosidasa y antraciclinas en distintas mutantes *dogR* de *S. peucetius* var. *caesius*, en presencia de glucosa, incrementó con respecto a los niveles mostrados por la cepa silvestre (Segura, González et al. 1996), confirmando que las mutantes *dogR* de *S. peucetius* var. *caesius*, al igual que las mutantes *dogR* de *S. coelicolor*, también eran insensibles a represión por glucosa (Segura, González et al. 1996, Escalante, Ramos et al. 1999). Si bien estas observaciones señalan que el mecanismo de RCC se encuentra conservado entre algunas especies del género *Streptomyces*, en *S. peucetius* var. *caesius*, a diferencia de lo observado en *S. coelicolor*, se

obtuvieron algunas mutantes insensibles a RCC con una actividad glucosa cinasa similar a la de la cepa silvestre (Ramos, Guzman et al. 2004), lo cual descarta la existencia de una relación directa entre la actividad glucosa cinasa y la RCC. Adicionalmente, estos resultados confirmaron que ni el gen *glk*, ni la actividad glucosa cinasa, por sí solos, eran responsables de la RCC. De acuerdo con esto, la secuencia del gen *glk* de distintas mutantes insensibles a RCC no presentó deleciones ni mutaciones puntuales. A pesar de esto y con la intención de identificar algún vínculo entre el fenómeno de regulación por carbono y el fenotipo de las mutantes insensibles a dicho proceso, se midió el transporte de glucosa en distintas mutantes insensibles a RCC. Este análisis reveló que, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes de *S. peucetius var. caesius* insensibles a RCC mostraban una disminución considerable en el transporte de glucosa (Ramos, Guzman et al. 2004), lo cual sugería que había una correlación directa entre el fenómeno de RCC y el transporte de glucosa.

Efecto del gen *sco2127* de *S. coelicolor* en mutantes de *S. peucetius var. caesius* insensibles a RCC

Con base en la premisa de que el gen *sco2127* jugaba un papel importante en el fenómeno de regulación por carbono (Angell, Schwarz et al. 1992, Angell, Lewis et al. 1994), y a pesar de no haber encontrado deleciones ni mutaciones puntuales en el gen *glk* de las mutantes insensibles a RCC de *S. peucetius var. caesius* (Ramos, Guzman et al. 2004), en este organismo también se estudió el efecto de los genes *glk* y *sco2127* de *S. coelicolor* sobre el fenómeno de regulación por carbono. Para esto, primero fue necesario asegurar la presencia de genes homólogos a los genes *glk* y *sco2127* en *S. peucetius var. caesius*, ya que hasta el momento se desconoce la secuencia genómica completa de este organismo. Mediante un análisis de *southern blot*, y usando los genes de *S. coelicolor* como sondas, se confirmó la presencia de genes homólogos a *glk* y *sco2127* en *S. peucetius var. caesius*. Este ensayo también reveló que ambos genes están localizados en la misma región del cromosoma (Guzman, Carmona et al. 2005), y esto sugiere a su vez que dichos genes podrían estar organizados de la misma manera que en *S. coelicolor*, es decir, el gen *sco2127* ubicado río arriba del gen *glk*, por lo que en *S. peucetius var. caesius* se esperaba obtener resultados similares a los obtenidos en *S. coelicolor*. De acuerdo con lo esperado, todas las

mutantes insensibles a RCC de *S. peucetius var. caesius* recuperaron su actividad glucosa cinasa después de haber sido transformadas exclusivamente con el gen *glk*; sin embargo, solo algunas recuperaron su sensibilidad a RCC, confirmando que no existe una relación directa entre estos parámetros. En contraste con estos resultados, la sola presencia del gen *sco2127* de *S. coelicolor* en los plásmidos usados para complementar, fue suficiente para restablecer la capacidad regulatoria de dichas mutantes. Adicionalmente, las mutantes de *S. peucetius var. caesius* transformadas únicamente con el gen *sco2127* mostraron un aumento en la actividad glucosa cinasa, y en consistencia con esto, también mostraron un incremento en la expresión del gen *glk* (Guzman, Carmona et al. 2005). Estos resultados habrían sido explicados fácilmente de haber ocurrido algún evento de recombinación entre el gen *sco2127* y el DNA de las mutantes transformadas, ya que en *S. coelicolor* se había demostrado previamente que, además de transcribirse desde su propio promotor, el gen *glk* puede transcribirse desde un promotor localizado río arriba del gen *sco2127* (Angell, Schwarz et al. 1992); sin embargo, esta posibilidad fue descartada al confirmar la presencia del gen *sco2127* en los plásmidos obtenidos a partir de las mutantes complementadas de *S. peucetius var. caesius* (Guzman, Carmona et al. 2005). Además de recuperar su capacidad regulatoria, y haber mostrado un incremento tanto en la expresión del gen *glk*, como en la actividad glucosa cinasa, las mutantes de *S. peucetius var. caesius* transformadas solamente con el gen *sco2127* de *S. coelicolor*, mejoraron su capacidad para transportar glucosa (Guzman, Carmona et al. 2005); sin embargo, no pudo comprobarse si dicha mejora se debía a un aumento en la expresión de la glucosa permeasa, ya que, al igual que el gen *sco2127* de *S. coelicolor*, tampoco se conoce la secuencia del gen que codifica para la glucosa permeasa de *S. peucetius var. caesius*. Aunado a esto, poco tiempo después, en 2007, Gilles van Wezel y colaboradores demostraron que aunque la cepa silvestre y la mutante dogR M480 de *S. coelicolor* muestran diferencias significativas en el transporte de glucosa, dichas diferencias no se deben al cambio en la expresión del gen *glcP* (van Wezel, Konig et al. 2007). Por lo tanto, parece poco probable que el restablecimiento del transporte de glucosa en las mutantes dogR de *S. peucetius var. caesius* transformadas con el gen *sco2127* haya sido provocado por un cambio en la expresión de la glucosa permeasa.

Si el restablecimiento del transporte de glucosa en las mutantes insensibles a RCC de *S. peucetius var. caesioides* no se debe al cambio en la expresión de la glucosa permeasa, entonces ¿a qué podría deberse la variación en el transporte de glucosa en estas mutantes? En ese mismo año, van Wezel y colaboradores también observaron que, en presencia de glucosa, la glucosa cinasa se localiza en la membrana celular. Con base en estas observaciones, estos autores sugirieron que la glucosa cinasa interacciona con la glucosa permeasa, y de esta manera favorece el transporte de glucosa (van Wezel, König et al. 2007); sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que la glucosa cinasa pueda interaccionar con otras proteínas de membrana. Aunque la glucosa cinasa realmente fuera la responsable del aumento en el transporte de glucosa en las mutantes complementadas con el gen *sco2127*, aún no queda claro como pudo haber aumentado la expresión de esta proteína en dichas mutantes. Como se mencionó anteriormente, parece poco probable que la expresión del gen *glk*, así como de su producto de expresión, haya aumentado en las mutantes transformadas, como resultado de la transcripción del gen *glk* desde el promotor localizado río arriba del gen *sco2127*, ya que los plásmidos purificados a partir de dichas mutantes conservaban el gen *sco2127* junto con su promotor, y en este contexto, parece que la proteína Sco2127 es quien realmente controla los niveles de expresión del gen *glk*. Debido a que la secuencia de la proteína Sco2127 no presenta dominios de unión a DNA, resulta difícil creer que esta proteína pueda activar directamente la expresión del gen *glk*; por lo tanto, dicha activación debería ocurrir mediante interacciones proteína-proteína entre la proteína Sco2127 y otra u otras proteínas, como aparentemente sucede entre la glucosa cinasa y la glucosa permeasa, o por medio de un regulador transcripcional que pueda controlar directamente la expresión del gen *glk*, como se había sugerido anteriormente (Angell, Lewis et al. 1994).

La proteína Sco2127 de *S. coelicolor* interacciona de manera independiente con las proteínas BldKB y Sco2582

Para saber si el producto de expresión del gen *sco2127* interaccionaba con otras proteínas, se realizaron ensayos de *pull-down*, seguidos de un análisis de *western blot*. Primeramente, se expresó y purificó la proteína Sco2127 con una cola de histidinas (Chavez, Garcia-Huante et al. 2009). Posteriormente, la proteína

purificada se unió a una resina de níquel, y el complejo formado fue expuesto al extracto celular de un cultivo de *S. coelicolor* crecido en medio complejo hasta el inicio de la fase estacionaria, ya que, bajo estas condiciones, la proteína Sco2127 se expresa predominantemente a partir de este punto (Chavez, Forero et al. 2011). Los complejos formados Sco2127-proteína se detectaron con anticuerpos específicos contra la proteína Sco2127 en un gel desnaturalizante, y finalmente, las proteínas unidas a la proteína Sco2127, se identificaron por espectrometría de masas (Chavez, Forero et al. 2011).

Aunque se esperaba encontrar interacciones entre la proteína Sco2127 y alguna proteína de unión a DNA, que ayudaran a explicar el aumento en la expresión del gen *glk* en las mutantes insensibles a RCC complementadas únicamente con del gen *sco2127*, estos experimentos solamente revelaron interacciones entre la proteína Sco2127 y las proteínas Sco5113 y Sco2582 (Chavez, Forero et al. 2011).

La proteína Sco5113 (BldKB) es un sistema de importación de oligopéptidos que permite el transporte del péptido bld261 hacia al interior de la célula, y con ello favorece la diferenciación morfológica en *S. coelicolor*, ya que dicho péptido funciona como molécula de señalización (Nodwell and Losick 1998). Por su parte, la proteína Sco2582 es una proteasa de función desconocida; sin embargo, su secuencia de aminoácidos indica que pertenece a la familia de proteínas M48 (Boratyn, Schaffer et al. 2012). El prototipo de esta familia de proteínas es la proteasa Ste24 de *Saccharomyces cerevisiae* (<http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings, Barrett et al. 2016). Esta proteína realiza un corte en cada uno de los motivos CaaX (donde "a" significa un residuo alifático, y "X" cualquier residuo) y STATA del "Factor a" de *S. cerevisiae*, una hormona de apareamiento en levaduras que requiere dichos cortes para su maduración (Pryor, Horanyi et al. 2013). Suponiendo que la proteasa Sco2582 de *S. coelicolor* realiza cortes en los mismos motivos que la proteína Ste24, la presencia de cualquiera de estos motivos en la secuencia de las proteínas de *S. coelicolor* podría revelar las proteínas blanco de la proteasa Sco2582. Con base en esto, se buscaron los motivos CaaX y STATA en la secuencia de las 7825 proteínas de *S. coelicolor*; sin embargo, solo se encontró un motivo, el motivo STATA, en una de las proteínas, la proteína Sco5913, lo cual sugiere que esta

proteína puede ser la proteína blanco de la proteasa Sco2582 en *S. coelicolor* (Jiménez-Rodríguez 2018).

Al igual que la proteína Sco2582, la proteína Sco5913 es una proteasa. La estructura primaria de la proteasa Sco5913 contiene un péptido señal que, al ser eliminado, deja en su lugar una proteína de menor tamaño, constituida por un propéptido y el péptido funcional. Con base en estas observaciones, la proteína Sco5913 de *S. coelicolor* aparentemente también requiere dos cortes para su activación, similar al número de cortes necesarios para la maduración del "Factor a" de *S. cerevisiae*. Aunque se desconoce quien realiza el primer corte sobre la proteína Sco5913, cuya función puede ser la eliminación del péptido señal, es probable que el segundo corte, y por lo tanto la activación final de dicha proteína, se lleve a cabo por la proteasa Sco2582, ya que el motivo STATA identificado en la secuencia de la proteína Sco5913, se localiza precisamente entre el propéptido y el péptido funcional. En *S. coelicolor* se ha observado que la proteasa Sco5913 es capaz de digerir al inhibidor de proteasas Sti (*Streptomyces trypsin inhibitor*, Sco0762), y que cuando esto sucede, disminuye la actividad inhibitoria de la proteína Sti, y aumenta la actividad proteasa extracelular, provocando una anticipación de la diferenciación morfológica y un aumento en la producción de actinorrodina (Kim, Hesketh et al. 2008). Si además de esto se considera que la proteasa Sco5913 puede ser activada por la proteasa Sco2582, y que esta última, a su vez, es capaz de unirse a la proteína Sco2127, es posible pensar que tanto la diferenciación morfológica como la producción de actinorrodina en *S. coelicolor* dependen en última instancia de la proteína Sco2127; sin embargo, aún no se ha demostrado la participación concreta de la proteína Sco2127 sobre estos procesos.

Objetivo general

Conocer el efecto de la delección del gen *sco2127* sobre la diferenciación morfológica y la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor*.

Objetivos específicos

1. Analizar la diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina de la cepa silvestre y la mutante $\Delta sco2127$ de *S. coelicolor*.
2. Comprobar si la proteína Sco2127 participa en la regulación catabólica por carbono.
3. Obtener y analizar los transcriptomas y proteomas de la cepa silvestre y la mutante $\Delta sco2127$ para identificar los genes y proteínas expresados diferencialmente entre ambas cepas.
4. Analizar la relación de algunos de estos genes o proteínas con la diferenciación morfológica y la biosíntesis de actinorrodina.
5. Verificar la posible participación de algunos genes o proteínas seleccionados previamente con ambos procesos biológicos.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento

En este estudio se usó la cepa *S. coelicolor* M145 como cepa silvestre. Esta cepa carece de los plásmidos SCP1 y SCP2. La mutante nula $\Delta sco2127$ se obtuvo mediante recombinación homóloga (Gust, Challis et al. 2003), a partir de la mutante resistente a apramicina $\Delta sco2127::aac(3)IV$ construida previamente (Chavez, Garcia-Huante et al. 2009). Para asegurar que el fenotipo de la mutante nula $\Delta sco2127$ se debía únicamente a la delección del gen *sco2127*, esta mutante fue complementada con el gen *sco2127*. Este gen, así como su promotor, fueron clonados en el plásmido integrativo pMS81 (Gregory, Till et al. 2003), y el plásmido resultante fue insertado posteriormente en la mutante $\Delta sco2127$. Como control de esta construcción, se usó el plásmido pMS81 vacío, el cual fue insertado en otro clon de la mutante $\Delta sco2127$. La doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204$ también se obtuvo por recombinación homóloga, sólo que, en este caso, el gen *sco0204* de la mutante sencilla $\Delta sco2127$ fue reemplazado por el cassette de resistencia a apramicina.

Para la obtención de esporas, las cepas se sembraron en placas con medio soya-manitol (Kieser, Bibb et al. 2000). Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio R5 modificado (Fernandez, Weissbach et al. 1998) suplementados con arabinosa 55 mM, en lugar de glucosa, como fuente de carbono. El medio fue inoculado con 200×10^6 esporas, incubado a 30°C y agitado a 200 rpm.

Determinación de actinorrodina y nitrito

La producción de actinorrodina se determinó con base en la estrategia reportada por Bystrykh y colaboradores (Bystrykh, Fernandez-Moreno et al. 1996). Se tomaron muestras de 1 mL de cultivo, y se les agregaron 500 μ L de KOH 3N para obtener una concentración final de KOH de 1N. Estas mezclas se incubaron a 4 °C durante 16 h, y después se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 1 min para separar la biomasa del sobrenadante. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 640 nm en un espectrofotómetro de luz visible, usando 1 mL de KOH 1N como blanco, y finalmente, se calculó la concentración de actinorrodina usando el

coeficiente de extinción molar de dicho compuesto: $25320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bystrykh, Fernandez-Moreno et al. 1996).

Para determinar la concentración de nitrito, se siguió el método de Griess-Ilosvay, el cual está basado en la capacidad del nitrito de formar un pigmento rosa en presencia de ácido sulfanílico (reactivo 1) y un colorante de tipo azo. La prueba original emplea alfa-naftilamina como colorante; sin embargo, este compuesto es carcinógeno, y debido a esto, fue reemplazado por N, N-dimetil-1-naftilamina (reactivo 2) (Wallace and Neave 1927). Los reactivos 1 y 2 están incluidos en el kit Api 20 ETM (bioMérieux, Inc.). Para la determinación, se tomaron 658 μL de muestra, a los cuales se añadieron 282 μL de nitrito de sodio 100 μM , para obtener una concentración de nitrito de sodio de 30 μM . A esta mezcla se añadieron 30 μL del reactivo 1, y la reacción se incubó a 45 °C durante 5 min. Inmediatamente después, se añadieron 30 μL del reactivo 2, y la mezcla se incubó a la misma temperatura durante otros 10 minutos. Después de esto, la muestra se centrifugó para recuperar el sobrenadante, cuya absorbancia fue determinada a 530 nm en un espectrofotómetro de luz visible, usando como blanco 940 μL de medio R5 modificado adicionado con arabinosa.

Proteómica

Extracción y digestión de proteínas

Por cada cepa se analizaron dos réplicas biológicas obtenidas durante las fases de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. Primeramente, los cultivos se centrifugaron a $11,000\times g$ a 4 °C. La pastilla celular resultante se lavó con buffer PBS y se resuspendió en buffer de lisis, ambos a pH 7.5, como se describe en (Licon-Cassani, Lim et al. 2014). Las células se lisaron por sonicación, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a $10,000\times g$ durante 5 min a 4 °C. Para eliminar el resto de las impurezas, las muestras se trataron con DNase I y RNase A. El extracto de proteína resultante se dializó con agua Milli-Q. La cantidad de proteína contenida en la muestra se cuantificó usando el método de Bradford, y finalmente las muestras se liofilizaron.

Se diluyeron 50 μg de proteína en 800 μL de una solución de urea 8 M y bicarbonato de amonio (AMBIC) 50 mM. Las muestras se colocaron en cuatro filtros Amicon Ultra de 0.5 mL y se lavaron dos veces con 200 μL de la solución

de urea y AMBIC, centrifugando a $14,000\times g$ durante 15 min. Después de estos lavados, las muestras se lavaron 2 veces más únicamente con 100 μL de AMBIC, y se digirieron en el mismo filtro con 5 μg de tripsina grado MS (espectrometría de masas), diluidos en 30 μL de AMBIC. Los péptidos fueron recolectados después de tres ciclos de centrifugación con 30 μL de AMBIC. El pH final de las muestras se ajustó a 3.0 con ácido fórmico. Las muestras se concentraron en una centrífuga de vacío, y finalmente se recuperaron con puntas especiales C-18 ZipTip (Millipore) para asegurar que la cantidad de muestra inyectada en cada análisis de cromatografía líquida (LC) fuera la misma.

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS analysis)

Para la determinación y cuantificación de proteínas, las muestras se separaron usando el sistema Shimadzu Prominence nano-LC como se describió previamente en (Kappler and Nouwens 2013), con algunas modificaciones reportadas por (Orellana, Marcellin et al. 2015).

Biblioteca de referencia y preparación de las muestras

El método de adquisición dependiente de la información (IDA) se usó para crear una biblioteca de referencia, a partir de una muestra que contenía 50 μg de proteína de cada una de las cepas analizadas. Antes del análisis de MS, las muestras se concentraron usando una centrífuga de vacío para eliminar el acetonitrilo residual, y posteriormente se resuspendieron en 99.5 μL de ácido fórmico al 0.1 %. De acuerdo con (Bernhardt, Selevsek et al. 2012) y (Escher, Reiter et al. 2012), a cada muestra se añadió una mezcla de péptidos sintéticos para corregir el tiempo de retención. Los análisis de IDA y SWATH se llevaron a cabo por duplicado usando 4 y 0.5 μg de péptidos, respectivamente.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos de SWATH MS/MS, se usó el programa PeakView 1.2 (ABSciex). Los datos fueron convertidos a \log_2 y se promediaron las réplicas técnicas. Para el análisis estadístico únicamente se tomaron en cuenta las proteínas con por lo menos dos péptidos con una identidad mayor al 95%. El análisis estadístico de las dos muestras biológicas se realizó ajustando los datos de cada proteína a un modelo lineal (Smyth 2005). Para calcular las proteínas

expresadas diferencialmente se usó el método de Bayes, estableciendo que dichas proteínas deben tener un *p value* menor a 0.05 (Smyth 2004).

Transcriptómica

Extracción de RNA

Se extrajo el RNA de cuatro réplicas biológicas de cada cepa en la fase de crecimiento exponencial. Cada muestra de 10 mL se mezcló inmediatamente con 2 volúmenes de RNeasy Protect Bacteria Reagent (QIAGEN). La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (TA), antes de centrifugar a 6,800×g durante 10 min. Después de remover cuidadosamente el sobrenadante, la pastilla celular resultante se resuspendió en 200 µL de buffer TE, adicionado con 30 µL de lisozima y 20 µL de proteinasa K, y posteriormente se transfirió a un tubo de 1.5 mL para agitarse en vortex durante 10 s. Esta suspensión se incubó a TA durante 10 min, agitando por vortex cada 2 min. Posteriormente, se agregaron 700 µL de buffer RLT, y la mezcla se agitó vigorosamente. El lisado celular se lavó en repetidas ocasiones con 1 volumen de fenol/cloroformo hasta eliminar la mayor cantidad posible de material biológico en la interfase. A la fase acuosa recuperada de los lavados, se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, pH 6.0, y 1 volumen de isopropanol. Esta mezcla se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5,000×g durante 10 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Los ácidos nucleicos precipitados se resuspendieron en 500 µL de agua destilada, y volvieron a precipitarse con acetato de sodio e isopropanol para eliminar los residuos de fenol, ya que estos pueden inhibir la digestión con DNase I. El precipitado resultante se lavó con etanol, y se incubó a TA para permitir la evaporación de los residuos de etanol. La pastilla resultante, que contiene los ácidos nucleicos totales, se resuspendió en 250 µL de agua destilada. Después de digerir el DNA de las muestras con DNase I, el RNA se purificó usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La calidad y concentración del RNA se determinó usando el equipo Bioanalyzer 2100 System (Agilent Technologies).

Análisis de microarreglos

Las muestras de RNA se enviaron al Laboratorio de Genómica Funcional de la Universidad de Surrey, en Reino Unido, para sintetizar y marcar el cDNA. Las

muestras de la cepa silvestre y la mutante $\Delta sco2127$ se compararon de acuerdo con el protocolo de bloques equilibrados (Laing, Bucca et al. 2008), usando los microarreglos *IJISS 105K microarrays* de *S. coelicolor* (Lewis, Laing et al. 2010). Los microarreglos fueron procesados con el escáner Agilent Technologies Scanner G2505C US45102984, y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Feature Extractor Software versión 10.7.1.1, usando un fondo local para eliminar el "ruido". Después de normalizar los datos, se identificaron los genes expresados diferencialmente entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta sco2127$, usando la herramienta *Rank Products* (Laing and Smith 2010). Se consideró que un gen está expresado diferencialmente entre ambas cepas si su probabilidad de ser un falso positivo (*FPF value*) es menor a 0.15 (Hesketh, Bucca et al. 2007).

Enriquecimiento de las proteínas expresadas diferencialmente de acuerdo con los procesos biológicos en los cuales participan

Para realizar este análisis se utilizó la herramienta *GO Enrichment Analysis* (<http://geneontology.org/>), la cual se basa en la anotación funcional de las proteínas para encontrar los términos ontológicos o categorías (GO terms) sobre- o subrepresentados en un conjunto de proteínas (Mi, Muruganujan et al. 2013). Para esto, se analizó la lista de las proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre M145, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria. Dicha lista se cargó en el campo apropiado de la herramienta, y se seleccionaron los parámetros: *biological process* y *Streptomyces coelicolor*. Como referencia, *GO Enrichment Analysis* usa una lista de 8038 proteínas de *S. coelicolor*. Debido a que esta cifra representa 213 proteínas más que las 7825 codificadas en el cromosoma de la cepa M145, es probable que la lista de referencia incluya las proteínas codificadas en los plásmidos SCP1 y SCP2 de la cepa A3(2) de *S. coelicolor*, a partir de la cual se obtuvo la cepa M145, objeto de este estudio. Del total de proteínas expresadas diferencialmente en este estudio, solo se mapeó el 63.3 %, ya que el resto de las proteínas no ha sido anotado. El resultado, por defecto, está ordenado con base en la jerarquía de las categorías, es decir, las categorías más específicas aparecen hasta arriba, y las más generales hacia abajo, y con una viñeta que indica que contienen categorías más específicas. Solo se consideraron las categorías con una probabilidad de falso positivo (FDR) menor a 0.05 (Mi, Muruganujan et al. 2013).

Predicción bioinformática del regulón Sco0204

Para identificar los genes que podrían estar regulados por la proteína Sco0204 en *S. coelicolor*, se realizó un análisis filogenético utilizando la herramienta *footprint-discovery*, la cual está disponible en: <http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/> (Janky and van Helden 2008). Dicho análisis consistió en obtener los promotores de todos los ortólogos del gen *sco0204* de *S. coelicolor* en la clase Actinobacteria para encontrar una secuencia consenso que represente el sitio de unión del regulador de respuesta Sco0204 (ver texto principal). Posteriormente, la secuencia resultante se buscó en los promotores de todas las unidades transcripcionales de *S. coelicolor*, usando la herramienta *matrix-scan* (Turatsinze, Thomas-Chollier et al. 2008), disponible también en el sitio que acaba de mencionarse.

Resultados

La mutante $\Delta sco2127$ mostró deficiencias en la diferenciación morfológica y en la producción de actinorrodina

Aunque la mutante $\Delta sco2127$ de *S. coelicolor* se obtuvo desde 2010, esta tesis, así como el artículo científico que la respalda (Tierrafría, Cuauhtemoc et al. 2016), son los primeros trabajos que incluyen información relacionada con su caracterización fenotípica. Para analizar su desarrollo morfológico, tanto la mutante $\Delta sco2127$ como la cepa silvestre M145 se estriaron en placas con medio R5 modificado (Fernandez, Weissbach et al. 1998) y se incubaron a 30 °C. A partir del tercer día de incubación bajo estas condiciones, la mutante $\Delta sco2127$ adquirió un aspecto rugoso y una coloración rojiza, mientras que la cepa silvestre desarrolló una superficie grisácea de aspecto aterciopelado y un halo azul alrededor de la estría (Fig. 3). Aunque las cepas se incubaron durante varios días más, no se observaron cambios significativos en la apariencia de la mutante, con respecto a lo observado al tercer día de incubación. En cambio, la superficie de la cepa silvestre adquirió una coloración blanca y un aspecto más suave, mientras que el tamaño e intensidad de color del halo azul formado alrededor de la estría, aumentaron notablemente (Fig. 3). Con base en estas observaciones, y tomando en cuenta que el aspecto aterciopelado de los estreptomicetos indica que el proceso de diferenciación morfológica ha concluido satisfactoriamente, y que, en el caso de *S. coelicolor*, el halo azul formado alrededor de la estría puede significar la acumulación de actinorrodina (Chater 2006), puede decirse que la delección del gen *sco2127* produce afectaciones importantes en ambos procesos.

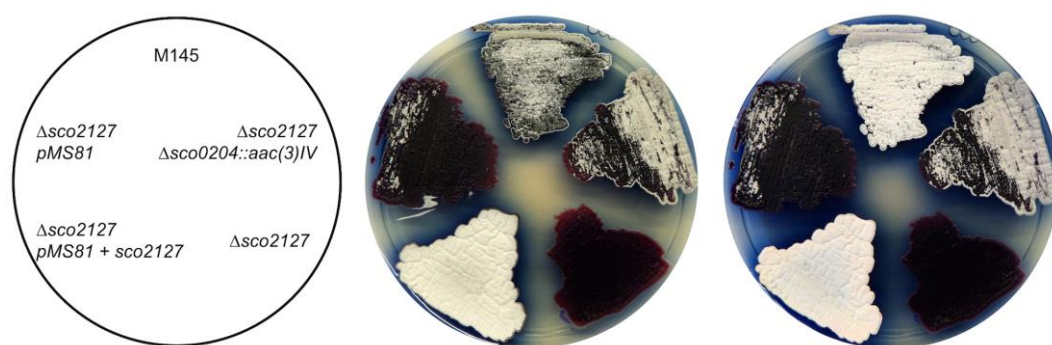


Figura 3 Crecimiento en placa de algunas mutantes de *S. coelicolor* M145. El genotipo y ubicación de dichas mutantes se indican en el esquema de la izquierda. Las imágenes fueron tomadas al tercer (centro) y cuarto día (derecha) de incubación en agar R5 modificado (Fernandez, Weissbach et al. 1998) suplementado con arabinosa, a 30 °C.

Para asegurar que dichas afectaciones se debían únicamente a la delección del gen *sco2127*, también se analizó el fenotipo de la mutante transformada con el gen *sco2127*, y de la mutante transformada con el vector de clonación pMS81 "vacío" (ver Materiales y Métodos). A diferencia de la mutante $\Delta sco2127$, la cepa transformada con el gen *sco2127* desarrolló una superficie aterciopelada similar a la desarrollada por la cepa silvestre M145. Esta similitud pudo distinguirse mejor a partir del cuarto día de incubación (Fig. 3). Por otro lado, la mutante transformada con el vector de clonación vacío, mostró prácticamente el mismo fenotipo que la mutante $\Delta sco2127$ (Fig. 3). Por lo tanto, estas observaciones demuestran que las afectaciones observadas en la mutante $\Delta sco2127$ se deben únicamente a la delección del gen *sco2127*.

Para determinar cuantitativamente el efecto de la delección del gen *sco2127* sobre la producción de actinorrodina, se realizaron fermentaciones en medio líquido, y se observó que la mutante $\Delta sco2127$ mostró una reducción de hasta el 87% (a las 64 h de cultivo) en la producción del pigmento azul con respecto a la cepa silvestre (Fig. 4). Además de confirmar lo observado en placas, estos resultados sugieren, contrario a lo esperado, que el gen *sco2127* es necesario para la formación de actinorrodina en *S. coelicolor*.

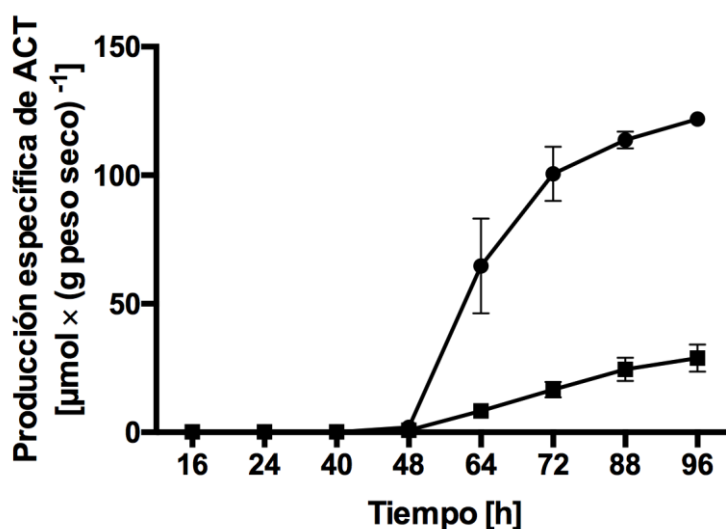


Figura 4 Producción de actinorrodina de la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre M145 en medio líquido. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250 mL, en un volumen final de 50 mL de medio R5 modificado (Fernandez, Weissbach et al. 1998) suplementado con arabinosa 55 mM. El medio fue inoculado con 200×10^6 esporas de la mutante (cuadros) o la cepa silvestre (círculos). Los cultivos fueron incubados a 30°C y agitados a 200 rpm durante 4 días.

El gen *sco2127* no es responsable de la RCC en *S. coelicolor*

Como se describió anteriormente, diversas mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC recuperaron su sensibilidad a este fenómeno de regulación, después de haber sido transformadas con el gen *sco2127* de *S. coelicolor*, es decir, las mutantes disminuyeron nuevamente su habilidad para producir antraciclinas en presencia de glucosa (Guzman, Carmona et al. 2005), lo cual sugería que el gen *sco2127* era responsable de la regulación por carbono. Para probar esta hipótesis, nuevamente se analizó la formación de actinorrodina en medio líquido tanto en la mutante Δ *sco2127* como en la cepa silvestre M145, solo que en esta ocasión, la determinación del pigmento se realizó en presencia de dos concentraciones distintas de glucosa, 55 y 220 mM.

Similar a lo observado en las dos figuras anteriores, en presencia de glucosa, ya sea 55 o 220 mM, la mutante Δ *sco2127* nuevamente produjo menos actinorrodina que la cepa silvestre. En cualquiera de estas dos condiciones, la mutante produjo solamente el 10% del pigmento producido por la cepa parental (Fig. 5), lo que sugería fuertemente que el gen *sco2127* de *S. coelicolor* no está involucrado en la RCC. Para confirmar esta suposición, adicionalmente se analizó, en cada cepa, el efecto de la adición de glucosa sobre la formación de actinorrodina. Para esto, tanto la cepa silvestre como la mutante Δ *sco2127* se cultivaron en ausencia y presencia de glucosa, 55 y 220 mM. En la figura 5 puede observarse que al aumentar la concentración de glucosa de 0 a 220 mM, la formación de actinorrodina en la cepa parental pasó de 113.8 ± 3.8 a 36.3 ± 14.8

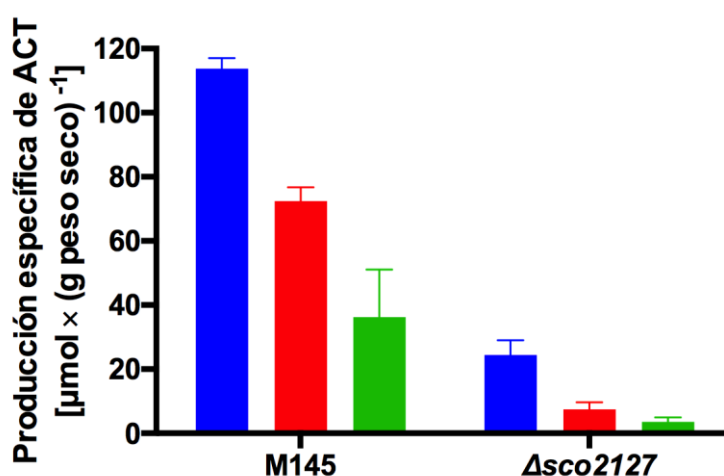


Figura 5 Efecto de la glucosa sobre la biosíntesis de actinorrodina en la cepa silvestre y la mutante Δ *sco2127* de *S. coelicolor*. La determinación de actinorrodina se hizo en ausencia de glucosa (barras azules), y en presencia de glucosa 55 mM (barras rojas) y 220 mM (barras verdes).

$\mu\text{mol}\cdot(\text{g peso seco})^{-1}$, mientras que en la mutante pasó de 24.5 ± 4.6 a 3.6 ± 1.5 $\mu\text{mol}\cdot(\text{g peso seco})^{-1}$, lo que representa una disminución del 68 y 85% en la cantidad de pigmento producida por la cepa silvestre y la mutante $\Delta\text{sco2127}$, respectivamente. En dicha figura también se observa cómo al aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo, la mutante $\Delta\text{sco2127}$ produce cada vez menos actinorrodina. Debido a que este perfil de producción de actinorrodina se ajusta perfectamente al comportamiento clásico de regulación por carbono, ilustrado en este caso por la cepa silvestre, puede concluirse que el gen *sco2127* no participa en la regulación por carbono.

La delección del gen *sco2127* provoca cambios en la abundancia de diversas proteínas

Debido a la enorme dificultad para formular hipótesis acerca del funcionamiento del gen *sco2127* o de su producto de expresión, derivada, en gran medida, de la falta de homología del gen *sco2127* con cualquier gen de función conocida, se realizó una comparación a escala genómica de los perfiles de expresión de proteína de la mutante $\Delta\text{sco2127}$ y de la cepa silvestre M145 para identificar algunas proteínas que ayudaran a explicar el fenotipo de la mutante, y que pudieran estar relacionados funcionalmente con la proteína Sco2127. Dicha comparación se realizó inicialmente en la fase estacionaria, ya que en un estudio previo se había reportado que, en medio complejo, la proteína Sco2127 se expresa fundamentalmente durante ese periodo (Chavez, Forero et al. 2011), y por lo tanto, era más probable que, de presentarse cambios en la abundancia de las proteínas producidas por ambas cepas, estos se debieran a la ausencia del gen *sco2127*. No obstante, también se realizó una segunda comparación en la fase de crecimiento exponencial para tener una visión más general de los cambios ocasionados por la delección del gen *sco2127* durante el desarrollo.

El mapeo de las proteínas expresadas diferencialmente reveló cambios en algunas rutas metabólicas y procesos biológicos

La comparación de los proteomas de la mutante $\Delta\text{sco2127}$ y la cepa silvestre en las dos fases analizadas, arrojó un total de 454 proteínas expresadas diferencialmente. Estas proteínas se mapearon en el mapa metabólico de *S. coelicolor* (<https://biocyc.org/>) para identificar las rutas o reacciones enzimáticas

Tabla 1 Rutas metabólicas de *S. coelicolor* mayormente afectadas por la delección del gen *sco2127*

Ruta	p-value	Coincidencias¹
Biosíntesis de novo de nucleótidos de purina I	6.81E-04	17
Fermentación heteroláctica	5.14E-03	15
Gluconeogénesis I	5.65E-03	11
Asimilación de formaldehído I (Ruta de Serina)	2.37E-02	7
Biosíntesis de actinorrodina	2.94E-02	8
Degradación de glicina I	4.54E-02	4

¹ Número de proteínas de la ruta indicada que se expresaron de manera diferencial en al menos una fase del cultivo, entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre.

que pudieron haber sido afectadas por la delección del gen *sco2127*, y se observaron afectaciones en 6 rutas principalmente (Tabla 1). En algunos casos, como la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina, la biosíntesis de actinorrodina y la degradación de glicina, fue sencillo comprender el significado de los cambios observados, ya que la mayoría de las proteínas pertenecientes a estas rutas mostraron perfiles de expresión similares en una o ambas fases del cultivo. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento exponencial, algunas proteínas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos de purina, principalmente aquellas involucradas en la biosíntesis de xantosina-5-fosfato (XMP) (Sco1461, Sco4770 y Sco4771), o de su derivado dGDP (Sco5805), la cual también está involucrada en la síntesis de dADP, disminuyeron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. En cambio, durante la fase estacionaria, estas enzimas, así como la mayoría de las enzimas relacionadas con la síntesis de ATP (complejo ATP sintasa) y diversas proteínas relacionadas con la formación de inosina monofosfato (IMP), el precursor de todos estos nucleótidos, aumentaron su expresión (Fig. 6-A). Por otro lado, en la mutante $\Delta sco2127$ también se observó una disminución importante, con cambios de hasta 100 veces con respecto a la cepa silvestre, en la abundancia de la mayoría de las enzimas necesarias para la biosíntesis de actinorrodina; sin embargo, dicha disminución se observó únicamente en la fase estacionaria. La única proteína que cambió su expresión durante la fase de crecimiento exponencial, disminuyendo su expresión 1.4 veces con respecto a la cepa silvestre, fue la cetoacil reductasa Sco5086 (Fig. 6-C), la cual ayuda a confeccionar el policétido una vez que este ha sido completamente formado (Hallam, Malpartida et al. 1988).

En contraste con la disminución observada en la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de actinorrodina, en la mutante $\Delta sco2127$ también se observó un aumento en la abundancia de la mayoría de las enzimas necesarias para la degradación de glicina. La única excepción fue la subunidad H del sistema de degradación de glicina Sco5471. Esta proteína disminuyó su expresión 1.86 veces con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, las otras dos isoenzimas que catalizan la misma reacción, es decir, las proteínas Sco1378 y Sco5472, así como la proteína Sco4824, aumentaron su expresión hasta 2 veces en la mutante, ya sea en la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria (Fig. 6-F). También es importante destacar que, además de estar involucradas en la degradación de glicina, la aminometiltransferasa Sco5472 y la proteína Sco4824 están involucradas en la biosíntesis de los folatos 5,10-metilentetrahidrofolato (metilen-THF) y 10-formiltetrahidrofolato (formil-THF), respectivamente (Fig. 6-F).

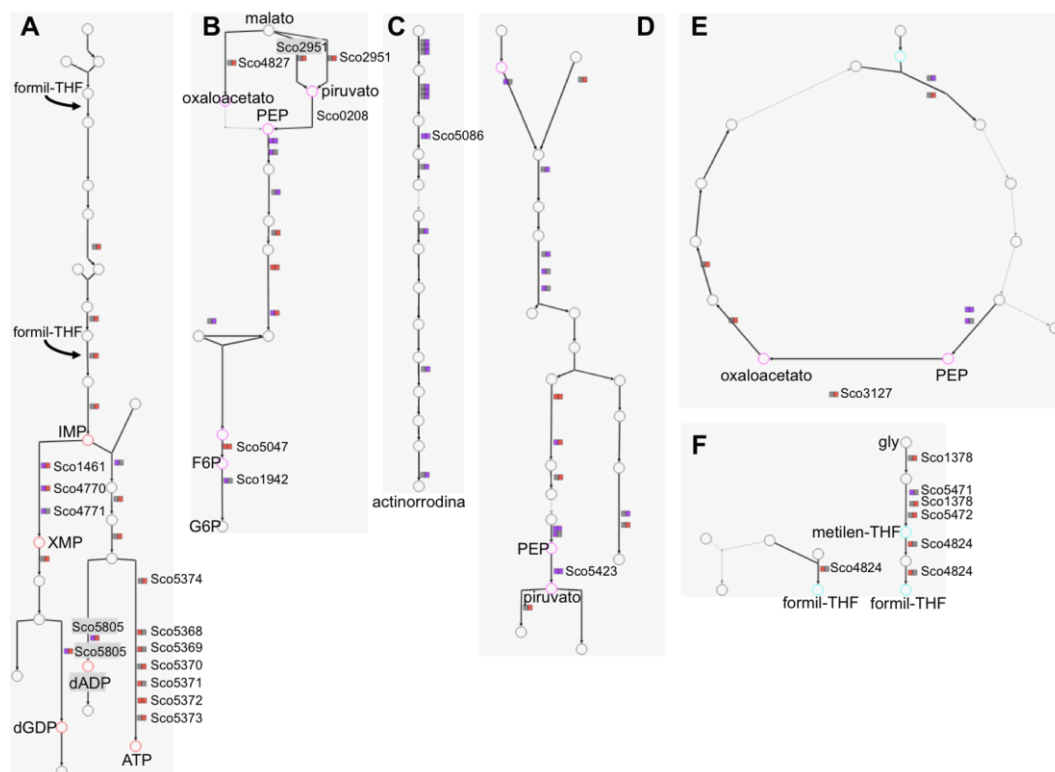


Figura 6 Perfil de expresión de algunas proteínas relacionadas con las rutas metabólicas mayormente afectadas por la delección del gen *sco2127* de *S. coelicolor*. A. Biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina. B. Gluconeogénesis. C. Biosíntesis de actinorrodina. D. Fermentación heteroláctica. E. Asimilación de formaldehído (Ruta de Serina). F. Degradación de glicina. Donde corresponde, los recuadros indican que esa proteína varió su expresión al menos en una fase del cultivo. Los recuadros de la izquierda representan el perfil de expresión de las proteínas en la fase de crecimiento exponencial, y los de la derecha, el perfil de expresión en la fase estacionaria. El color de los recuadros además puede ser naranja, púrpura o gris, dependiendo de si la proteína en cuestión aumentó, disminuyó o simplemente no varió su expresión en la mutante $\Delta sco2127$, con respecto a la cepa silvestre, respectivamente. Las flechas negras representan las reacciones que han sido descritas en *S. coelicolor*, mientras que las flechas grises representan reacciones espontáneas o reacciones para las cuales no se ha identificado una enzima.

En otras rutas, como la gluconeogénesis, fue más difícil predecir la dirección del flujo metabólico. Esto se debió principalmente a que diversas enzimas de la gluconeogénesis mostraron perfiles de expresión opuestos (Fig. 6-B), y a que la mayoría de las enzimas que participan en esta ruta, también participan en la glucólisis. A pesar de esto, tanto la glucólisis como la gluconeogénesis tienen enzimas que catalizan reacciones irreversibles, y con base en los perfiles de expresión de estas enzimas, fue posible predecir que el flujo metabólico en la mutante $\Delta sco2127$ ocurrió en dirección gluconeogénica. En esta dirección, la fosfoenolpiruvato sintasa (Sco0208) y la fructosa bisfosfatasa (Sco5047) catalizan la conversión irreversible de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP), y de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato (F6P), respectivamente. La fosfoenolpiruvato sintasa (Sco0208) no mostró cambios en sus perfiles de expresión entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre (Fig. 6-B); sin embargo, la piruvato cinasa (Sco5423), la cual cataliza la reacción inversa, y por lo tanto, opera en dirección glucolítica, aunque también está relacionada con la fermentación heteroláctica, disminuyó su expresión poco más de dos veces (Fig. 6-D). Por otro lado, la fructosa bisfosfatasa (Sco5047) aumentó su expresión casi en la misma proporción (Fig. 6-B), a diferencia de las tres isoenzimas que catalizan la reacción opuesta, Sco1214, Sco2119 y Sco5426, las cuales no cambiaron su expresión con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados). Otra evidencia que ayudó a inferir un aumento en el flujo gluconeogénico en la mutante $\Delta sco2127$, fue el aumento en la expresión de la enzima málica (Sco2951), la malato deshidrogenasa (Sco4827) y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Sco4979), ya que estas enzimas se encargan de la formación de algunos precursores gluconeogénicos. La fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Pck), la cual cataliza la formación de PEP a partir de oxaloacetato, aumentó su expresión durante la fase de crecimiento exponencial (Fig. 11-A). En cambio, la enzima málica y la malato deshidrogenasa, las cuales se encargan de la formación de piruvato y oxaloacetato a partir de malato y aspartato, respectivamente, aumentaron su expresión durante la fase estacionaria del cultivo (Fig. 6-B).

Al igual que las enzimas involucradas en la gluconeogénesis, las enzimas involucradas en la fermentación heteroláctica o en la asimilación de formaldehído también mostraron perfiles de expresión distintos en la mutante $\Delta sco2127$ (Fig. 6-D y 6-E), solo que en estos casos, y a diferencia de lo observado en la

gluconeogénesis, se cuenta con menos información acerca de las enzimas que podrían catalizar reacciones irreversibles, y por lo tanto, no fue posible inferir la dirección del flujo metabólico a través de dichas rutas. A pesar de esto, más adelante se describe la importancia de algunas de estas enzimas en procesos como la conversión de folatos y la producción de oxaloacetato.

En resumen, el mapeo de las proteínas expresadas diferencialmente, con sus correspondientes rutas metabólicas, solamente ayudo a identificar alteraciones en 6 de las 322 rutas metabólicas descritas en *S. coelicolor* (Karp, Billington et al. 2017). Debido a que esta proporción no representa ni el 2% del total de las rutas descritas en dicho organismo, parecía difícil tratar de explicar, con tan pocas evidencias, el significado de los cambios observados, así como su relación con la delección del gen *sco2127*, razón por la cual se realizó un segundo enriquecimiento basado, no en las rutas metabólicas, sino en los procesos biológicos en los cuales participan las proteínas expresadas diferencialmente (*GO Enrichment Analysis*). A diferencia del enriquecimiento anterior, este enriquecimiento no solo indica los procesos sobrerrepresentados, sino también los procesos subrepresentados, es decir, aquellos donde el número de proteínas asociadas con ciertos procesos es menor al número de proteínas que se esperaría que estuvieran relacionadas con estos mismos procesos, tomando en cuenta el número de proteínas de *S. coelicolor* cuya anotación está relacionada con esos procesos (<http://geneontology.org/>) (Mi, Muruganujan et al. 2013). Aunque solo 288 de las 455 proteínas expresadas diferencialmente pudieron analizarse de esta manera (ver Materiales y Métodos), estas proteínas se agruparon en seis categorías principalmente. Una de ellas, de hecho, la que contenía el mayor número de proteínas (115), estuvo conformada por proteínas no clasificadas; sin embargo, del resto de las categorías o procesos biológicos, tres estuvieron sobrerrepresentados, y dos estuvieron subrepresentados en el conjunto de proteínas analizadas. Dentro de los procesos sobrerrepresentados se encontraron el metabolismo de glutamato, el transporte de péptidos y diversos procesos de óxido-reducción, mientras que dentro de los procesos subrepresentados se encontraron dos procesos muy similares entre sí: la transcripción y la regulación de la transcripción (Tabla S1). Con respecto a los procesos sobrerrepresentados, solo el metabolismo de glutamato pudo analizarse posteriormente, en función de las rutas metabólicas donde participan las proteínas expresadas diferencialmente, ya que, de los procesos identificados, fue el que

estuvo relacionado con un menor número de proteínas, solo 5 (Tabla S1). Estas proteínas están involucradas específicamente en la formación de 2-oxoglutarato a partir de glutamato (Sco2999) o 2,5-dioxopentanoato (Sco1871), un intermediario de la degradación de arabinosa (Fig. 11-A), y con la formación de glutamato a partir de 2-oxoglutarato y amonio (Sco4683) o a partir de prolina (Sco5519 y Sco5520) (Fig. 11-B). De estas proteínas, solo la glutamato deshidrogenasa (Sco4683) disminuyó su expresión en ambas fases del cultivo. Esta proteína disminuyó su expresión 4.9 y 6.5 veces en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, respectivamente (datos no mostrados). El resto de las proteínas aumentó su expresión en una u otra fase del cultivo (Fig. 11).

A diferencia del metabolismo de glutamato, el resto de los procesos sobrerrepresentados, es decir, el transporte de péptidos y los procesos de óxido-reducción, involucran un total de 66 proteínas. La mayoría de estas proteínas aumentó su expresión en la mutante $\Delta sco2127$; sin embargo, no fue posible predecir cambios en el flujo metabólico a través de cualquiera de las rutas relacionadas con estas 66 proteínas, debido a que, aunque el mapeo de dichas proteínas con sus rutas correspondientes se vio reflejado en una gran variedad de rutas, como era de esperarse, el número de enzimas que varió su expresión en la mutante, por cada una de esas rutas, fue insuficiente para asegurar que el flujo metabólico a través de dichas rutas realmente se haya visto afectado. A pesar de esto, se observaron cambios en la expresión de diversas enzimas pertenecientes a cualquiera de estos sistemas de transporte de tipo ABC: el sistema BldK (Sco5113, Sco5115 y Sco5116) o el sistema OBP (Sco5477, Sco5479 y Sco5480). A diferencia del sistema BldK, el cual se encarga de transportar un oligopéptido morfogénico al interior de la célula (Nodwell and Losick 1998), el sistema OBP no ha sido caracterizado experimentalmente; sin embargo, se ha observado que las lipoproteínas de ambos sistemas, Sco5113 en el caso del sistema BldK, y Sco5477 en el caso del sistema OBP, adoptan distintos estados conformacionales, y por lo tanto, se ha propuesto que ambas lipoproteínas pueden desempeñar diversas funciones (Li, Liang et al. 2014). Otras proteínas de transporte que se expresaron de manera diferencial son las proteínas Sco1655 y Sco6451. Aún no se sabe si estas dos proteínas también adoptan distintos estados conformacionales; sin embargo, su parecido con las proteínas de unión a periplasma de tipo 2 (PBP2), no descarta la posibilidad de que estas proteínas puedan estar relacionadas con el

transporte de moléculas tan diversas, como el fosfato, sulfato, polisacáridos e, incluso, algunos aminoácidos (Marchler-Bauer, Bo et al. 2017).

Como se mencionó anteriormente, dentro de los procesos biológicos subrepresentados por las proteínas expresadas diferencialmente, se identificaron la transcripción y la regulación de la transcripción. Estos dos procesos incluyen un total de 17 proteínas de unión a DNA (Tabla S1); sin embargo, siete de estas proteínas están relacionadas con ambos procesos. De hecho, todas las proteínas relacionadas con el proceso de "transcripción" (GO:0006351) (Tabla S1), están igualmente relacionadas con la "regulación de la transcripción", de tal manera que solo otras 3 proteínas están relacionadas exclusivamente con la "regulación de la transcripción" y no con el proceso mismo de "transcripción" (Fig. 7-A). Adicionalmente, es importante señalar que las siete proteínas agrupadas dentro de la categoría "transcripción", actúan como reguladores transcripcionales, mientras que el resto actúa como proteínas de choque térmico (Fig. 7-A). De los siete reguladores transcripcionales identificados, únicamente la proteína Sco0204 mostró un perfil de expresión similar en la mutante $\Delta sco2127$, en ambas fases del cultivo (Fig. 7-B). Esta proteína indujo su expresión 3.36 y 2.5 veces en la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, respectivamente, y debido a que algunos factores transcripcionales pueden controlar la expresión de múltiples genes (den Hengst, Tran et al. 2010), era probable que la proteína Sco0204 jugara un papel importante en la mutante $\Delta sco2127$.

El cambio en la expresión de algunas proteínas puede deberse al aumento en la expresión del regulador de respuesta Sco0204

La secuencia de aminoácidos de la proteína Sco0204 revela la presencia de dos dominios funcionales: un dominio receptor (REC) y un dominio de unión a DNA de tipo HTH. Esto indica que la proteína Sco0204 podría estar involucrada en algún mecanismo de transducción de señales. De acuerdo con esta hipótesis, Hutchings y colaboradores propusieron que la proteína Sco0204 forma parte de un sistema de dos componentes, ya que río abajo del gen *sco0204*, se localiza el gen *sco0203*, el cual codifica para una histidina cinasa típica de este tipo de sistemas (Hutchings, Hoskisson et al. 2004). Como su nombre lo indica, los sistemas de dos componentes son grupos de dos proteínas que actúan de manera coordinada para convertir cierta señal ambiental, en una respuesta transcripcional, y por lo

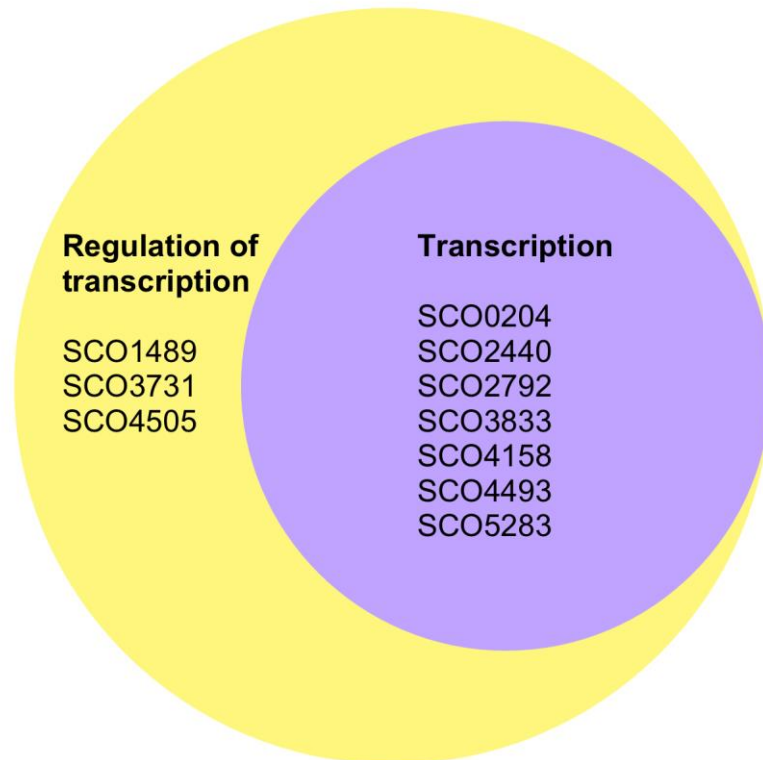
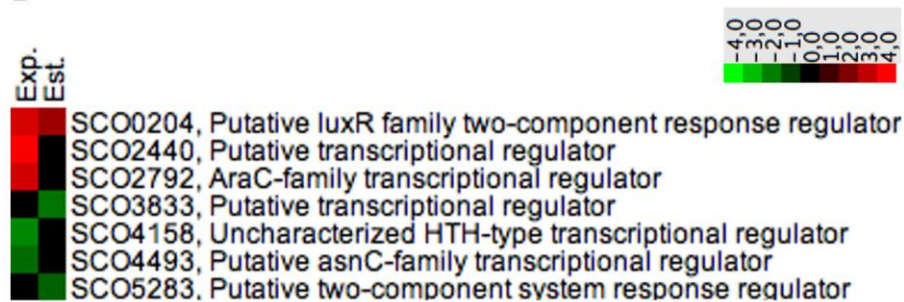
A**B**

Figura 7 Procesos biológicos subrepresentados dentro del conjunto de proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre. A. Relación de las proteínas con ambos procesos. B. Perfil de expresión de los siete reguladores transcripcionales identificados. El perfil de expresión de cada proteína se indica en los recuadros de la parte izquierda de la figura. Si los recuadros son rojos, verdes o negros, significa, respectivamente, que determinada proteína aumentó, disminuyó, o no varió su expresión en la mutante $\Delta sco2127$, con respecto a la cepa silvestre, ya sea en la fase de crecimiento exponencial ("Exp", columna izquierda) o en la fase estacionaria ("Est", columna derecha). La magnitud de los cambios, expresada como el número de veces cada proteína cambió su expresión con respecto a la cepa parental, está representada por la intensidad del color de los recuadros, de acuerdo con la barra horizontal de colores.

tanto, fisiológica. Estos sistemas operan de la siguiente manera: después de que la histidina cinasa reconoce, mediante un dominio de detección, la presencia de alguna señal ambiental, esta proteína se autofosforila en un residuo conservado de histidina y se forma un grupo fosforilo de alta energía. Posteriormente, este grupo se transfiere a al dominio REC del regulador de respuesta, específicamente a un residuo conservado de aspartato, lo cual provoca que el regulador cambie de

conformación, y que finalmente pueda controlar la expresión de sus genes blanco (Hutchings, Hoskisson et al. 2004).

Para saber si el cambio en la expresión de algunas proteínas en la mutante $\Delta sco2127$ pudo haber sido ocasionado por el aumento en la expresión del regulador Sco0204, se realizó un estudio bioinformático basado en la identificación de los posibles sitios de unión de la proteína Sco0204 en el cromosoma de *S. coelicolor* (ver Materiales y Métodos). Este estudio reveló la existencia de 194 sitios diferentes en la región regulatoria de 216 genes (datos no mostrados). Si bien este descubrimiento sugiere que la proteína Sco0204 puede regular la expresión de estos 216 genes, es importante señalar que en *S. coelicolor*, así como en otras bacterias, por ejemplo *E. coli*, algunas unidades transcripcionales (UTs) están compuestas por más de un gen (<https://biocyc.org/>) (Tabla S2). Además, es común observar que, si un factor transcripcional regula la expresión del primer gen de una UT compuesta por más de un gen, generalmente puede regular la expresión del resto de los genes de esa UT. Aunque estas observaciones sugieren que el regulador Sco0204 puede controlar la expresión de un mayor número de genes, sólo 15 de las proteínas codificadas por estos genes variaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$; sin embargo, estas evidencias sugieren fuertemente que al menos la expresión de estas 15 proteínas pudo haber sido controlada directamente por el regulador de respuesta Sco0204. Aunque estas proteínas están relacionadas con procesos tan diversos como la hidrólisis de proteínas (Sco1074 y Sco1796), modificaciones postraduccionales y recambio de proteínas (Sco1796), transporte de péptidos (Sco5112 y Sco5113), biosíntesis de tetrahidrolatos (Sco2614), utilización de 6-fosfogluconato (Sco0975), y la adaptación y crecimiento bajo condiciones de estrés (Sco0167, Sco0179, Sco0200, Sco0204, Sco0216 y Sco0217) (Daigle, Lerat et al. 2015), es probable que todas ellas, y por lo tanto, los procesos en los cuales participan, estén relacionados entre sí.

El regulador Sco0204 controla la expresión del complejo nitrato reductasa y, por lo tanto, la formación de nitrito en la mutante $\Delta sco2127$

De las 15 proteínas cuya expresión podría depender del regulador Sco0204, solo se ha confirmado experimentalmente la función de algunas de ellas. Estas incluyen las proteínas Sco0216 y Sco0217, las cuales conforman,

respectivamente, las cadenas alfa y beta del complejo nitrato reductasa Sco0216-0219. En *S. coelicolor*, se ha observado que este complejo enzimático es el principal responsable de la producción de nitrito a partir de nitrato (Fischer, Falke et al. 2014), así que para saber si el incremento en la expresión de estas dos proteínas en la mutante $\Delta sco2127$ representaba un aumento en la formación de nitrito, se realizó una prueba colorimétrica que, en condiciones ácidas, revela la presencia de nitritos como un pigmento rosa (ver Materiales y Métodos). Bajo estas condiciones, la actinorrodina también adquiere un tono rosa que desafortunadamente interfiere con la determinación de nitrito (datos no mostrados); por lo tanto, en la fase estacionaria, donde suele producirse este compuesto, no pudo cuantificarse la acumulación de nitrito. Sin embargo, en la fase de crecimiento exponencial, donde generalmente no se produce actinorrodina, se observó que la mutante $\Delta sco2127$ produjo más nitrito que la cepa silvestre, alcanzando un aumento de hasta 4 veces a las 40 h de cultivo (Fig. 8).

Después de comprobar que el aumento en la abundancia de las proteínas Sco0216 y Sco0217 se veía reflejado en un aumento en la concentración de nitrito, el siguiente paso era comprobar si la proteína Sco0204 era capaz de regular la expresión de estas dos proteínas. Para esto, se generó la doble mutante $\Delta sco2127 \Delta sco0204::aac(3)IV$, y posteriormente se determinó la capacidad de dicha mutante para producir nitrito en medio líquido. De acuerdo con lo esperado, la doble mutante produjo claramente menos nitrito que su parental $\Delta sco2127$. A

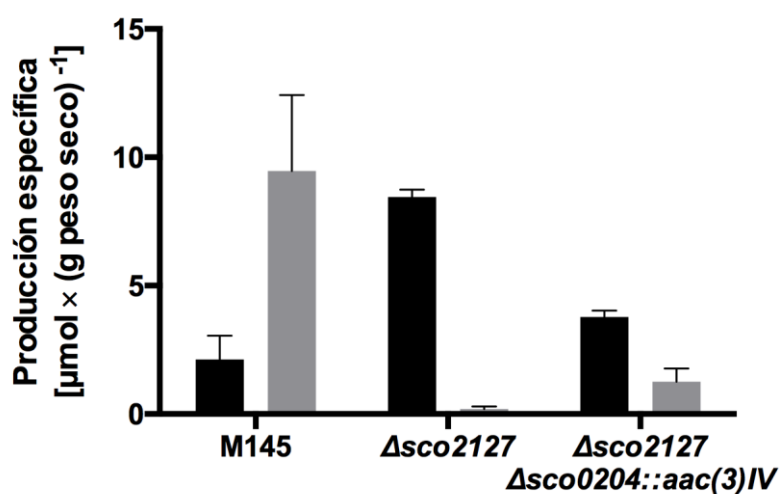


Figura 8 Influencia de la delección de los genes *sco2127* y *sco0204* sobre la producción de nitrito (barras grises) y actinorrodina (barras negras) en *S. coelicolor*

las 40 h de cultivo, la doble mutante produjo solo $3.78 \pm 0.25 \mu\text{mol} \cdot (\text{g peso seco})^{-1}$ de nitrito, mientras que la mutante sencilla produjo $8.46 \pm 0.28 \mu\text{mol} \cdot (\text{g peso seco})^{-1}$. Esto representa una reducción del 55.3 % con respecto al nitrito producido por la mutante sencilla (Fig. 8), y fortalece la idea de que la proteína Sco0204 efectivamente regula la expresión de las proteínas Sco0216 y Sco0217.

El nitrito tiene varios efectos negativos sobre el desarrollo de *S. coelicolor*. Además de impedir la diferenciación morfológica de esta bacteria en placa, en medio líquido limita su crecimiento y producción de actinorrodina (Fischer, Falke et al. 2014). De acuerdo con esto, en el presente estudio no solo se observó que la mutante $\Delta\text{sco2127}$ produjo más nitrito que la cepa silvestre M145, sino que dicho aumento estuvo acompañado de una reducción importante en la concentración de actinorrodina (Fig. 8). Por el contrario, la doble mutante produjo menos nitrito, aunque más actinorrodina que la mutante sencilla (Fig. 8). A diferencia de los cultivos líquidos, en placa no se determinó la concentración de nitrito; sin embargo, en estas condiciones, la presencia del gen *sco0204*, así como el aumento en la concentración de nitrito que esto implica, parecen haber afectado significativamente el desarrollo morfológico de la mutante $\Delta\text{sco2127}$ (Fig. 3). En cambio, parece que la ausencia del gen *sco0204* y, por lo tanto, la disminución de nitrito, mejoraron el desarrollo de la doble mutante (Fig. 3). En conjunto, estos resultados no solo indican que el regulador de respuesta Sco0204 puede controlar la expresión del complejo nitrato reductasa y, por lo tanto, la producción de nitrito en la mutante $\Delta\text{sco2127}$, sino que el aumento en la expresión del regulador Sco0204 pudo haber determinado en cierta medida el fenotipo de dicha mutante.

Análisis transcriptómico de la mutante $\Delta\text{sco2127}$

Aunque el incremento de nitrito en la mutante $\Delta\text{sco2127}$ confirmó que el regulador Sco0204 jugaba un papel importante en la fisiología de dicha mutante, aún no estaba claro por qué del total de proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante y la cepa silvestre, solo 15 podrían haber sido reguladas por la proteína Sco0204. Probablemente la respuesta más sencilla a este cuestionamiento radica en el hecho de no haber usado la información adecuada para validar la predicción bioinformática del regulón Sco0204. Debido a su origen, los datos de expresión de proteína implican distintos procesos celulares posteriores a la transcripción, que pueden causar diferencias entre la abundancia del transcrito y

de la proteína, codificados por un mismo gen. Por lo tanto, la validación de una red de regulación transcripcional como la que se ha propuesto en este trabajo, con datos de expresión de proteínas, puede generar incertidumbre tanto en la predicción bioinformática como en los datos experimentales.

Para validar con mayor certeza la predicción del regulón Sco0204, se compararon los perfiles de transcripción de la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre. Esta comparación se realizó únicamente en la fase de crecimiento exponencial, ya que solamente en esta fase pudo comprobarse que el aumento en la expresión del regulador Sco0204 en la mutante $\Delta sco2127$ tenía un efecto medible sobre la acumulación de nitrito. La comparación de los transcriptomas dio como resultado un cambio en la expresión de 179 genes (datos no mostrados). Similar al número de proteínas cuya expresión pudo haber variado como resultado del aumento en la expresión del regulador Sco0204 (Tabla S2), este acercamiento reveló cambios en la expresión de 15 genes pertenecientes al regulón Sco0204; sin embargo, la proporción de genes que pudieron haber sido regulados por la proteína Sco0204, con respecto al total de genes expresados diferencialmente entre la mutante y la cepa silvestre, la cual fue del 8.4%, fue 2.5 veces mayor que la proporción de proteínas reguladas por dicho factor transcripcional, con respecto al total de proteínas expresadas de manera diferencial entre ambas cepas, la cual fue del 3.3% (Fig. 9). Por lo tanto, estos resultados indican que hubo una mayor correlación entre la predicción bioinformática del regulón Sco0204 y los datos de expresión génica, que entre dicha predicción y los datos de expresión de proteínas.

Interesantemente, 13 de los 15 genes (86%) que se expresaron de manera diferencial entre la mutante y la cepa silvestre, y cuya expresión pudo haber sido controlada por el regulador de respuesta Sco0204, se encuentran en la misma región del cromosoma, entre los genes *sco0167* y *sco0268*. De conformidad con los resultados obtenidos mediante proteómica, algunos de estos genes codifican para 5 de las 15 proteínas cuya expresión pudo haber sido controlada por el regulador Sco0204 (Tabla S2). Este es el caso de los genes *sco0216* y *sco0204*, los cuales, como se ha descrito en este estudio, codifican para la subunidad alfa del complejo nitrato reductasa y para un factor transcripcional, respectivamente; y de los genes *sco0167* y *sco0200*, los cuales codifican para proteínas de estrés. Sin embargo, entre los genes cuya expresión pudo haber sido regulada por la proteína Sco0204, también se encuentran los genes *sco0168*, *sco0213* y *sco0214*, los cuales codifican para una proteína similar al dominio efector de las proteínas CRP y FNR, las cuales son capaces de activar la transcripción después de detectar compuestos como el AMP cíclico (cAMP) y el oxígeno, para un transportador de nitrato, y para una piridoxamina 5'-fosfato oxidasa, respectivamente. La mayoría de estos genes aumentó su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. Algunos de ellos, como los genes *sco0168*, *sco0204* y *sco0177*, aumentaron su expresión hasta 28 veces con respecto a la cepa silvestre, ubicándose entre los 10 genes más inducidos en la mutante $\Delta sco2127$; por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el regulador Sco0204 juega un papel importante en la fisiología

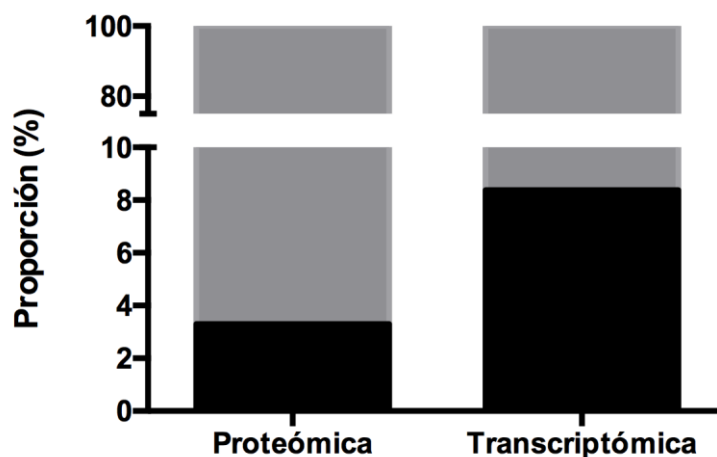


Figura 9 Proporción de genes y proteínas que pudieron haber sido regulados por la proteína Sco0204 en la mutante $\Delta sco2127$. Cada barra indica el porcentaje de genes o proteínas posiblemente regulados por el regulador Sco0204 (fracción negro), con respecto al total de genes o proteínas expresados diferencialmente entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre (fracción gris).

de la mutante $\Delta sco2127$.

Como se mencionó anteriormente, además de los cambios observados en la expresión de estos 15 genes, se observaron cambios en la expresión de otros 164 genes. En este caso, similar a lo ocurrido en el análisis de proteínas, tampoco fue posible mapear todos los genes con sus correspondientes rutas metabólicas; sin embargo, se encontró que algunos genes pueden estar relacionados con la asimilación de sulfato para la biosíntesis de cisteína (*sco2910*, *sco4164*, *sco5176*, *sco5178*, *sco6094*, *sco6096*, *sco6098-6100* y *sco6102*), la utilización de arabinosa (*sco2401*, *sco2402* y *sco2404-2406*) o la polimerización de ácido teicóico (*sco2589-2590*) (Fitzgerald and Foster 2000), un polímero de glicerol fosfato y carbohidratos que puede anclarse a la pared celular para mantener la firmeza de esta estructura (Horne and Tomasz 1993). Los genes relacionados con la asimilación de sulfato y la biosíntesis de cisteína, así como los genes involucrados en el metabolismo de arabinosa, aumentaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$, en cambio, los genes relacionados con la biosíntesis de ácido teicóico disminuyeron su expresión. Otros genes que también disminuyeron su expresión en la mutante, fueron los genes *sco0753-0756*, *sco5578*, *sco7153* y *sco7612*. Aunque tampoco se conocen las rutas metabólicas asociadas con estos últimos siete genes, su organización genómica, sobre todo en el caso de los genes *sco0753-0756*, así como el análisis de la secuencia de sus productos de expresión, sugieren que estos genes podrían participar en diversos procesos de transporte. Los genes *sco0753-0756*, por ejemplo, codifican para un transportador de tipo ABC, donde la ATPasa, la proteína de unión a sustrato y las dos proteínas transmembranales que lo componen, están codificadas por los genes *sco0753*, *sco0754*, y *sco0755* y *sco0756*, respectivamente. Por su parte, los genes *sco5578* y *sco7153* codifican para las glucosa permeasas *glcP1* y *glcP2*, respectivamente (van Wezel, Mahr et al. 2005), y el gen *sco7612* codifica para una proteína de unión a membrana capaz de unir quinonas isoprenoides. Además de la posible participación de estos genes en algún mecanismo de transporte, vale la pena señalar que la expresión de algunos de estos genes disminuyó notablemente en la mutante $\Delta sco2127$. El gen que disminuyó más veces su expresión en la mutante, fue el gen *sco0753*. La expresión de este gen disminuyó casi 57 veces con respecto a la silvestre; no obstante, también se observó una reducción

considerable, entre 10 y 13 veces, en la expresión de los genes *sco5578*, *sco7153* y *sco7612*.

La integración de algunos datos obtenidos mediante proteómica y transcriptómica permitió identificar alteraciones en la ruta de biosíntesis de ectoína

La ectoína es un osmolito de bajo peso molecular que evita la pérdida de agua y favorece el plegamiento correcto de las proteínas bajo condiciones adversas, como el estrés térmico y el estrés salino (Bursy, Kuhlmann et al. 2008). La ruta completa para la biosíntesis de este compuesto se describió por primera vez en 2008, e involucra la participación de 4 proteínas: Sco1864-1867 (Bursy, Kuhlmann et al. 2008) (Fig. 10). Dos de estas proteínas, la Sco1865 y la Sco1867, ya habían sido detectadas mediante proteómica. Estas proteínas no solo aumentaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$, sino que además lo hicieron en las dos fases del cultivo analizadas (Fig. 10); sin embargo, como ya se ha

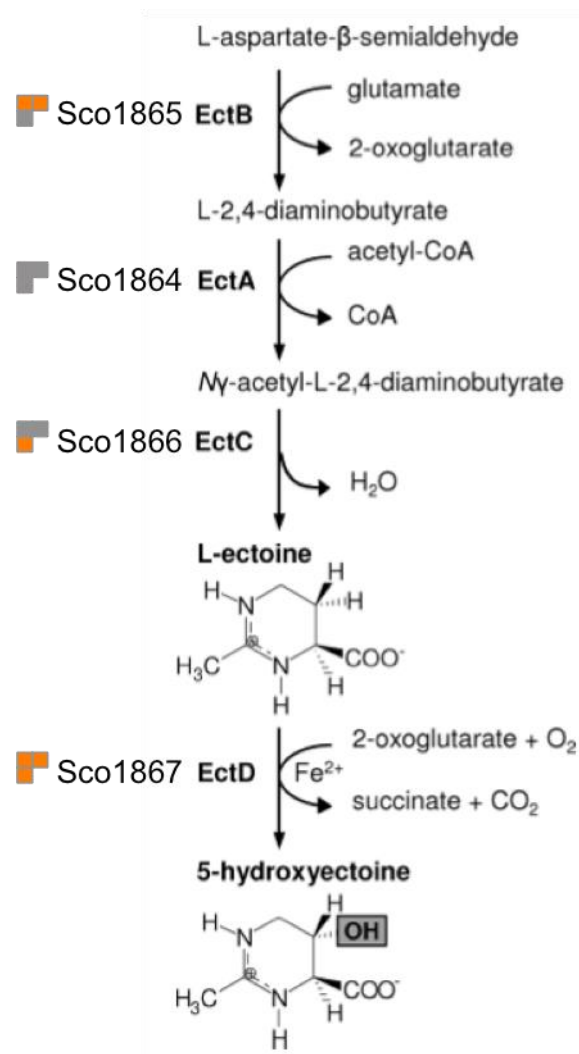


Figura 10 Perfil de expresión de algunos genes y proteínas involucrados en la biosíntesis de ectoína, y expresados diferencialmente en la mutante $\Delta sco2127$. (Imagen adaptada de (Bursy, Kuhlmann et al. 2008)). El perfil de expresión de cada enzima se expresa como en las Fig. 6, solo que a diferencia de esa figura, las enzimas descritas aquí incluyen un recuadro adicional en la parte inferior de cada mapa de calor, que indica el perfil de expresión de cada gen en la fase exponencial.

mencionado en varias ocasiones a lo largo de este estudio, tanto en este, como en otros casos, dicha evidencia no había sido suficiente para afirmar que se hubieran presentado alteraciones en el flujo metabólico a través de dicha ruta, ya que solo 2 de las 4 enzimas necesarias para la biosíntesis de ectoína habían variado su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. A pesar de esto, y después de analizar los perfiles de expresión génica, se encontró que dos genes de la ruta, los genes *sco1866* y *sco1867*, igualmente habían aumentado su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. Además de confirmar, como en el caso del gen *sco1867*, la veracidad de los resultados obtenidos previamente mediante proteómica, este último análisis reveló cambios en la expresión de genes cuyas proteínas no habían sido detectados mediante dicho acercamiento, como en el caso del gen *Sco1866*, de tal manera que, después de integrar la información obtenida mediante proteómica y transcriptómica, ya no fueron solo dos, sino tres de los cuatro genes o proteínas involucrados en la biosíntesis de ectoína, los que variaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$ (Fig. 10).

Discusión

El interés por estudiar la posible participación del gen *sco2127* en la represión catabólica por carbono (RCC) surgió del análisis de mutantes espontáneas, insensible a dicho fenómeno de regulación. Además de haber mostrado afectaciones en el gen *sco2127*, estas mutantes sufrieron deleciones en el gen *sco2126* (*glkA*), el cual codifica para la glucosa cinasa, y debido a esto, se propuso que el fenotipo de las mutantes insensibles a RCC no se debía simplemente a la ausencia del gen *sco2127*, sino también a la ausencia del gen *glkA* (Angell, Schwarz et al. 1992). Para obtener información más precisa acerca del funcionamiento de la proteína codificada por el gen *sco2127*, previamente se construyó una mutante de *S. coelicolor* M145 que carece de dicho gen; sin embargo, este es el primer reporte que incluye información relacionada con la caracterización de dicha mutante. Contrario a lo esperado, la deleción del gen *sco2127* afectó negativamente la formación de esporas y la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*. Cuando se analizó el efecto de la glucosa sobre la producción de actinorrodina, se observó que tanto la cepa silvestre como la mutante, produjeron menos pigmento conforme se aumentaba la concentración de glucosa en el medio de cultivo, además de que la cantidad de pigmento producido por la mutante siempre fue significativamente inferior que la producida por la cepa parental. A diferencia de lo que se había propuesto en trabajos anteriores (Angell, Schwarz et al. 1992, Angell, Lewis et al. 1994, Guzman, Carmona et al. 2005), estos resultados confirman que el gen *sco2127* no es responsable del fenómeno de represión por carbono. Esta afirmación parece ser respaldada por los resultados obtenidos en *S. peucetius* var. *caesius*, donde, también de manera inesperada, se observó que una mutante insensible a RCC conservaba íntegro el gen *sco2127* (Jiménez, Cabrera et al. 2012). Si bien esto indica que las mutantes insensibles a RCC no necesariamente tienen deleciones o mutaciones puntuales en el gen *sco2127*, y probablemente tampoco en el gen *glk*, como se había planteado previamente (Ikeda, Seno et al. 1984, Segura, González et al. 1996, Ramos, Guzman et al. 2004), estos resultados también sugieren que, para identificar con mayor precisión la o las mutaciones responsables de dicho fenotipo, es necesario secuenciar el genoma completo de las mutantes insensibles a RCC.

Para analizar con mayor detalle las repercusiones de la delección del gen *sco2127* en la fisiología de *S. coelicolor*, en el presente estudio se analizaron los proteomas de la mutante Δ *sco2127* y la cepa parental M145. Este análisis fue realizado tanto en la fase de crecimiento exponencial, como en la fase estacionaria, y reveló cambios en la expresión de diversas enzimas relacionadas con la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina, la biosíntesis de actinorrodina, la degradación de glicina y la gluconeogénesis. En consistencia con la dificultad de la mutante para producir actinorrodina, se encontró que la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis de este pigmento había disminuido su expresión en esta cepa, apoyando la hipótesis de que la proteína Sco2127 es necesaria para la biosíntesis de dicho antibiótico. Debido a que la reducción en la expresión de estas enzimas solo pudo apreciarse en la fase estacionaria, estos resultados también confirman que la producción de actinorrodina, así como la de otros antibióticos, ocurre principalmente durante dicha fase (Huang, Lih et al. 2001).

Por otro lado, el cambio en los perfiles de expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos de purina, indica que en la mutante Δ *sco2127* probablemente se indujo la producción de dGDP, dADP y ATP, sobre todo en la fase estacionaria. El aumento en la concentración de ATP parece especialmente importante para la mutante, ya que casi todas las subunidades del complejo ATPasa, es decir, las proteínas Sco5368-5373 y Sco5374, aumentaron su expresión (Fig. 6-A). Debido a que el ATP juega un papel fundamental en la generación de energía, estas observaciones sugieren que la delección del gen *sco2127* también pudo haber provocado un aumento en la demanda de energía.

Al igual que el complejo ATPasa, prácticamente todas las enzimas necesarias para la degradación de glicina aumentaron su expresión en la mutante Δ *sco2127*. El producto final de la degradación de glicina es el 10-formiltetrahidrofolato (formil-THF). Como se observa en la Figura 6, este compuesto es indispensable para la formación de inosina monofosfato (IMP), y el IMP, a su vez, actúa como precursor de la biosíntesis de dGDP, dADP y ATP (Figs. 6-A y 6-F); por lo tanto, estas observaciones sugieren que la degradación de glicina está estrechamente relacionada con la biosíntesis de nucleótidos de purina, y dada que algunos de estos nucleótidos son necesarios para la producción de energía, incluso puede argumentarse que la ruta de degradación de glicina pudo

haberse activado para hacer frente a la demanda energética de la mutante $\Delta sco2127$.

Producción de energía y biosíntesis de ectoína

A pesar de la dificultad para predecir la dirección del flujo metabólico a través de la glucólisis/gluconeogénesis en la mutante $\Delta sco2127$, debida en gran medida a la diferencia observada en los perfiles de expresión de las enzimas pertenecientes a esta ruta, la abundancia de las proteínas encargadas de catalizar reacciones irreversibles en una u otra dirección, ayudaron a inferir que el flujo a través de dicha ruta ocurrió en dirección gluconeogénica. Uno de los objetivos de la gluconeogénesis es la biosíntesis de glucosa a partir de compuestos de dos o tres carbonos (Marrero, Rhee et al. 2010); sin embargo, en la mutante no se observó un aumento en la expresión de la glucosa-6-fosfato isomerasa (Sco1942), la enzima encargada de producir glucosa-6-fosfato (G6P) a partir de fructosa-6-fosfato (F6P). De hecho, esta enzima no solo no aumentó, sino que redujo su expresión con respecto a la cepa silvestre (Fig. 6-B); por lo tanto, parece poco probable que el flujo gluconeogénico en la mutante $\Delta sco2127$ haya aumentado para elevar los niveles de glucosa al interior de la célula.

Si el objetivo del aumento en el flujo gluconeogénico en la mutante no fue la biosíntesis de glucosa, entonces ¿a que pudo deberse dicho aumento?. En 2010, Marrero y colaboradores demostraron que la fosfoenolpiruvato carboxinasa PckA de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), es la única enzima de esa actinobacteria, capaz de convertir oxaloacetato en fosfoenolpiruvato (PEP) (Marrero, Rhee et al. 2010). Esta proteína es similar (68% de identidad) a la Pck de *S. coelicolor* (Sco4979), lo cual sugiere que la Pck de *S. coelicolor* también está involucrada en la formación de PEP. Debido a que el PEP puede ser incorporado fácilmente en la gluconeogénesis (Fig. 11-A), estas observaciones sugieren que la posible activación de la gluconeogénesis en la mutante $\Delta sco2127$ pudo haber sido ocasionada por el aumento en la expresión de la proteína Sco4979; sin embargo, todavía era necesario saber de donde pudo haber provenido el oxaloacetato necesario para la formación de PEP.

De acuerdo con la base de datos BioCyc (Karp, Billington et al. 2017), el oxaloacetato puede sintetizarse por carboxilación, a partir de piruvato, y por transaminación, a partir de aspartato. Hasta donde se sabe, la piruvato carboxilasa

Sco0546 es la única enzima de *S. coelicolor* capaz de producir oxaloacetato a partir de piruvato (Bentley, Chater et al. 2002). Esta proteína no varió su expresión entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre; por lo tanto, parece poco probable que el oxaloacetato necesario para la formación de PEP haya sido producido a partir de piruvato. A diferencia de la proteína Sco0546, la aminotransferasa Sco6222 aumentó su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. Al igual que otras aminotransferasas, esta proteína puede estar relacionada con la formación de oxaloacetato a partir de aspartato. El aspartato, como tal, no fue agregado directamente al medio de cultivo; sin embargo, la formulación del medio R5 modificado (Fernandez, Weissbach et al. 1998) sugiere que este aminoácido pudo haber sido agregado al medio de cultivo, en forma de casaminoácidos, y por lo tanto, puede pensarse que el oxaloacetato necesario para la formación de PEP, fue producido a partir del aspartato contenido en los casaminoácidos agregados al medio de cultivo, y gracias a la acción de la aminotransferasa Sco6222. En resumen, todo esto señala que el posible aumento en el flujo metabólico a través de la gluconeogénesis, no solo se debió al aumento en la expresión de la Pck Sco4979, sino también a la adición de casaminoácidos al medio de cultivo y al aumento en la expresión de la aminotransferasa Sco6222 (Fig. 11-A).

Además de observar que la PckA de Mtb es esencial para la formación de PEP, y por lo tanto, para la activación de la gluconeogénesis, Marrero y colaboradores demostraron que esta enzima es indispensable para la persistencia de Mtb en el hospedero (Marrero, Rhee et al. 2010). Si bien esto sugiere que la Pck Sco4979 es igualmente importante para el crecimiento de *S. coelicolor*, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el aumento en la expresión de esta proteína, así como la aparente activación de la gluconeogénesis, no fueron suficientes para sostener el crecimiento de la mutante $\Delta sco2127$, al menos al nivel del crecimiento observado en la cepa silvestre (Fig. 3), y en este contexto, es posible que el aumento en la expresión de la Pck también se haya debido al aumento en la expresión de la glutamato deshidrogenasa Sco2999. Como se mencionó anteriormente, el aspartato, adicionado al medio de cultivo en forma de casaminoácidos, puede ser convertido en oxaloacetato por la aminotransferasa Sco6222; sin embargo, además de producir oxaloacetato, y provocar de esta manera el aumento en la expresión de la Pck, la reacción catalizada por la aminotransferasa también produce glutamato (Fig. 11-A). En *S. coelicolor* este

aminoácido puede ser metabolizado por dos enzimas distintas: la glutamato deshidrogenasa (gdh) Sco2999 y la gdh Sco4683; sin embargo, el aumento en la expresión de la primera, en la fase de crecimiento exponencial, y la caída en la expresión de la segunda, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, señalan que, al menos en la fase exponencial, el glutamato fue metabolizado por

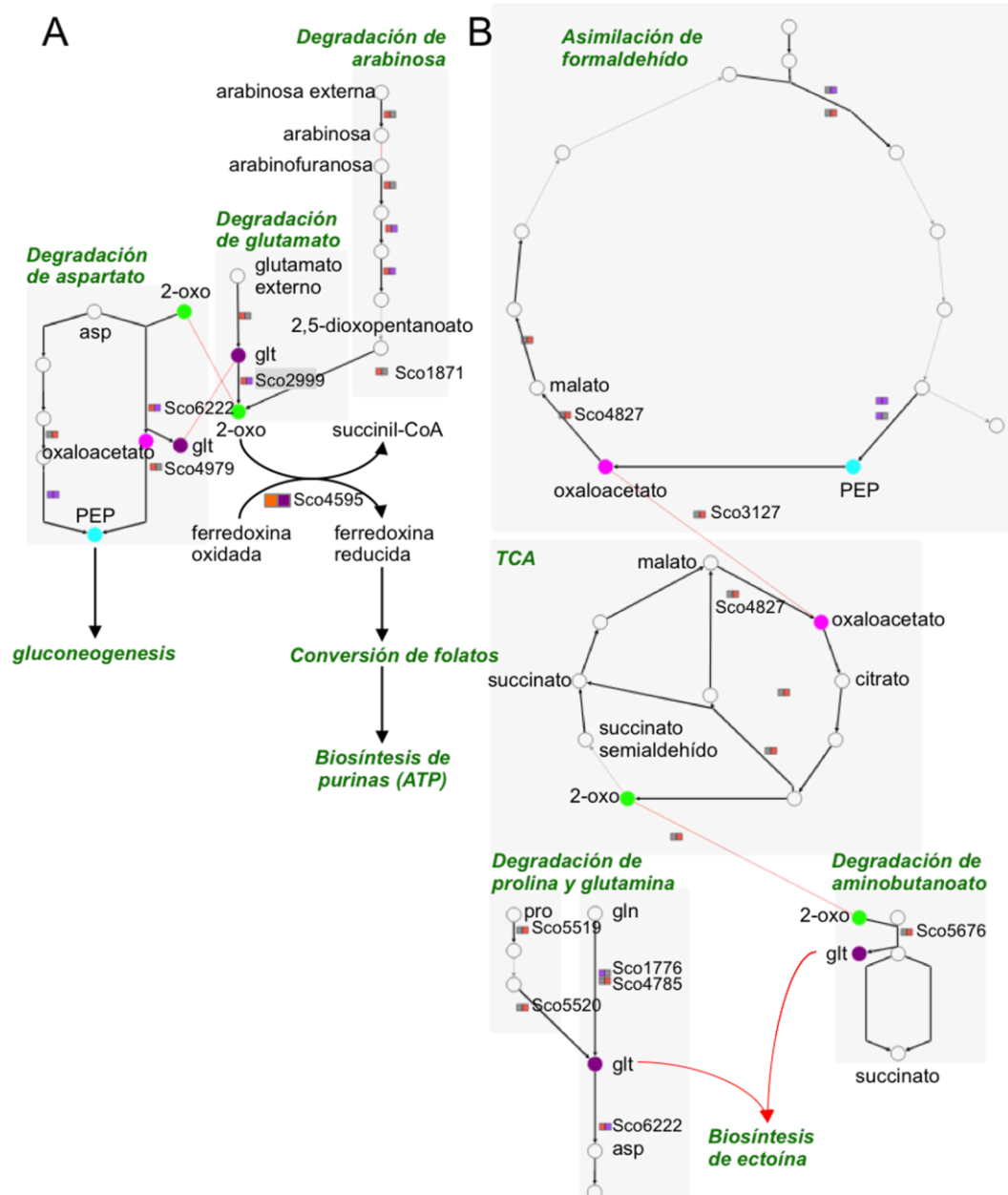


Figura 11 Efecto del cambio en la expresión de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de glutamato, sobre la producción de energía (A) y la biosíntesis de ectoína (B). Véase el pie de la Fig. 6 para conocer el significado de la mayoría de los símbolos. Las rutas metabólicas involucradas en cada proceso se indican con recuadros grises que engloban sus reacciones y/o en cursivas. A excepción de la flecha que indica la conversión de arabinosa en arabinofuranosa (inciso A), las flechas rojas representan el flujo de algunos metabolitos a través de distintas rutas. Debido a que aún no se conoce la enzima que cataliza la conversión de arabinosa en arabinofuranosa, la flecha que representa esta reacción debería ser gris; sin embargo, no fue posible modificar el color de dicha flecha después de configurar la imagen en Scocyc.

la gdh Sco2999 (Fig. 11-A).

La utilización de glutamato, por parte de la gdh Sco2999, produce amonio y 2-oxoglutarato. Debido a que el amonio puede participar en una gran variedad de reacciones, es difícil conocer su destino en el contexto fisiológico de la mutante $\Delta sco2127$. En cambio, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el 2-oxoglutarato producido en la fase exponencial, ya sea mediante el metabolismo de glutamato o de arabinosa (Fig. 11-A), pudo haber sido utilizado para la generación de poder reductor, específicamente NADH₂, y de otros acarreadores de electrones reducidos. La posible relación del 2-oxoglutarato con la producción de NADH₂ está basada principalmente en el aumento en la expresión de la gdh Sco2999; sin embargo, la presencia de aspartato y el aumento en la expresión de la aminotransferasa Sco6222, también parecen sustentar dicha relación. En un estudio previo se observó que el aspartato actúa como activador alostérico de la gdh de *Streptomyces clavuligerus* (Minambres, Olivera et al. 2000). Esta enzima, es prácticamente idéntica (82% de identidad) a la gdh Sco2999 de *S. coelicolor* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Boratyn, Schaffer et al. 2012); por lo tanto, y en consistencia con el aumento en la expresión de la aminotransferasa Sco6222, descrito anteriormente, estas observaciones sugieren que el aumento en la expresión de la gdh Sco2999 en la mutante $\Delta sco2127$, también se debe a la presencia de aspartato. Con base en estas observaciones, puede pensarse que el 2-oxoglutarato puede ser reutilizado por la aminotransferasa para producir glutamato, y que el glutamato producido por la aminotransferasa, a su vez, puede ser reutilizado por la gdh para producir nuevamente 2-oxoglutarato, de tal manera que se forma un ciclo entre las reacciones catalizadas por ambas enzimas (Fig. 11-A). Debido a esto, parece poco probable que el aumento en la expresión de las proteínas Sco2999 y Sco6222 se vea reflejado en un cambio significativo en la concentración de 2-oxoglutarato o glutamato; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en la mutante haya aumentado la concentración de otros productos derivados de las reacciones catalizadas por estas mismas enzimas, por ejemplo, el NADH₂.

En consistencia con su participación en el catabolismo de glutamato, la gdh Sco2999 requiere NAD⁺ para operar de manera adecuada. Esto significa que, a diferencia de lo que puede ocurrir con el 2-oxoglutarato, el cual puede ser reutilizado por la aminotransferasa Sco6222, sin que esto represente un

incremento neto en la cantidad de dicho intermediario, en cada ciclo a través de la aminotransferasa Sco6222 y la gdh Sco2999, se produce una molécula de NADH₂. En condiciones aerobias, esta molécula suele actuar como donador de electrones para producir energía a través de la cadena respiratoria; sin embargo, en la mutante $\Delta sco2127$, ninguna de las enzimas relacionadas con este proceso varió su expresión, lo cual sugiere que el NADH₂ producido por el metabolismo de glutamato, difícilmente fue utilizado para la producción de energía. Alternativamente, el 2-oxoglutarato puede ser descarboxilado por la sintasa Sco4595, para la generación de otros acarreadores de electrones. En este caso, la sintasa Sco4595 requiere la presencia de una ferredoxina oxidada que se reduce tras la descarboxilación del 2-oxoglutarato, y una vez reducida, dicha ferredoxina puede participar en otras reacciones de óxido-reducción. Entre las reacciones que utilizan ferredoxinas reducidas en *S. coelicolor*, se encuentran algunas relacionadas con la conversión entre distintos tipos de folatos. Como se mencionó anteriormente, estos compuestos son indispensables para la biosíntesis de nucleótidos de purina, incluyendo el ATP (Fig. 6-A), y este nucleótido, a su vez, es fundamental para la obtención de energía, así que, con base en estos elementos de información, puede pensarse que la utilización de 2-oxoglutarato por la proteína Sco4595, tuvo como objetivo principal, el aumento en la producción de acarreadores de electrones reducidos para la reducción de folatos que pudieran favorecer la biosíntesis de ATP, y por lo tanto, la producción de energía en la mutante $\Delta sco2127$ (Fig. 11-A).

A diferencia de lo observado en la fase exponencial, en la fase estacionaria disminuyó la expresión de las enzimas relacionadas con la producción de 2-oxoglutarato y de acarreadores de electrones reducidos, es decir, la gdh Sco2999, la aminotransferasa Sco6222, las enzimas relacionadas con la degradación de arabinosa y la 2-oxoglutarato sintasa Sco4595 (Fig. 11-A). Estas observaciones, aunadas al aumento en la expresión de diversas enzimas relacionadas con la síntesis de 2-oxoglutarato a partir de oxaloacetato, las cuales bien pueden formar parte de la fermentación ácido-mixta o del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), sugieren que en la fase estacionaria, el 2-oxoglutarato ya no proviene de la degradación de glutamato y arabinosa, sino del oxaloacetato (Fig. 11-B). El aumento en la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa Sco3127, la cual forma parte de la vía de asimilación de formaldehído, sugiere, por otro lado, que

el oxaloacetato proviene del PEP (Fig. 11-B), y esto, a su vez, tiene una connotación mayor, sobre el hecho de que el PEP aparentemente acumulado durante la fase exponencial, pueda haber sido utilizado para la formación de 2-oxoglutarato durante la fase estacionaria (Fig. 11). Independientemente del origen del 2-oxoglutarato, el aumento en la expresión de la aminobutirato aminotransferasa Sco5676, también en la fase estacionaria, sugiere que, en presencia de aminobutirato, el 2-oxoglutarato producido pudo haber sido transformado en succinato semialdehído y glutamato (Fig. 11-B). De acuerdo con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos propuesto para *S. coelicolor*, el succinato semialdehído debería ser metabolizado por una aldehído deshidrogenasa (Sco1204 o Sco4780) o por una succinato semialdehído deshidrogenasa (Sco7035) (<https://biocyc.org/>); sin embargo, ninguna de estas enzimas varió su expresión en la mutante, en la fase estacionaria. Interesantemente, en esta fase del cultivo tampoco varió la expresión del resto de las enzimas del TCA, las cuales son necesarias para convertir el succinato semialdehído en malato (Fig. 11-B); por lo tanto, y aunque el 2-oxoglutarato haya sido producido por "la primera mitad" de las enzimas del TCA, no puede asegurarse que este intermediario haya sido metabolizado completamente a través de dicho ciclo, más bien parece que el objetivo del posible aumento en la producción de 2-oxoglutarato, en la fase estacionaria, fue la producción de glutamato, lo cual parece ser apoyado por el aumento, también en la fase estacionaria, en la expresión de la prolina deshidrogenasa Sco5519 y de la proteína Sco5520, las cuales están relacionadas con la biosíntesis de glutamato, a partir de prolina, y de la glutamato sintasa Sco4785, la cual está involucrada en la formación de glutamato, a partir de glutamina (Fig. 11-B).

Aunque el glutamato puede participar en una gran variedad de procesos biosintéticos, como la biosíntesis de aminoácidos, tetrahidrolatos, NAD⁺, glutamina, y ectoína, el número de enzimas relacionadas con la mayoría de estos procesos, y cuya expresión varió en la mutante $\Delta sco2127$, no fue suficiente para inferir que el glutamato acumulado haya sido metabolizado a través de estos procesos biológicos. La única excepción parece ser la biosíntesis de ectoína. En este estudio no se determinó la concentración de ectoína; sin embargo, el aumento en la expresión de 3 de los 4 genes o proteínas involucrados en la síntesis de este compuesto (Fig. 10), sugiere fuertemente que, a pesar de que la mutante no fue

expuesta deliberadamente a estrés término o salino, la ectoína elevó su concentración en la mutante $\Delta sco2127$. El aumento observado en la expresión de la proteína Sco1865, así como el posible aumento en la producción de glutamato, parecen especialmente importantes para la biosíntesis de ectoína, ya que la proteína Sco1865 se encarga de convertir el L-aspartato-4-semialdehído en L-2,4-diaminobutirato, usando glutamato como donador del grupo amino (Fig. 10); sin embargo, abajo también se describe como la cisteína, y sobre todo, el glutamato y la acetil-CoA derivados de la degradación de cisteína, son igualmente importantes para la producción de ectoína, y posiblemente también, para la sobrevivencia de la mutante $\Delta sco2127$.

Mas allá de explicar por qué el metabolismo de glutamato, como proceso biológico, se vio sobrerrepresentado sobre otros procesos en los cuales pudieron haber participado otras proteínas expresadas diferencialmente, estos resultados ilustran claramente la complejidad de los cambios ocasionados por la delección del gen *sco2127*. Ciertamente estos cambios también están influenciados por el tipo y disponibilidad de nutrientes; sin embargo, es difícil negar que los objetivos principales de dichos cambios fueron la producción de energía y la biosíntesis de ectoína (Fig. 11).

Transporte

Sistemas BldK y OBP

A diferencia del sistema OBP, el cual no ha sido caracterizado experimentalmente, el sistema BldK, el cual está conformado por las proteínas Sco5113-16, ha sido relacionado con el proceso de diferenciación morfológica. Esta relación está basada, fundamentalmente, en la capacidad de dicho sistema de transportar el oligopéptido morfogénico bld261 al interior de la célula, y en la habilidad de este oligopéptido para promover la diferenciación morfológica en *S. coelicolor* (Nodwell and Losick 1998). De acuerdo con estas evidencias, se hubiera esperado que el aumento en la abundancia de las proteínas Sco5113-16, observado en la mutante $\Delta sco2127$, se hubiera visto reflejado en la anticipación de la diferenciación morfológica por parte de esta cepa; sin embargo, como se muestra en la figura 3, el aumento en la expresión de estas enzimas aparentemente no fue suficiente para completar el proceso de diferenciación morfológica.

En algunos análisis de proteína a escala genómica, se ha observado que las lipoproteínas BldKB (Sco5113) y OBP (Sco5477) adoptan distintos estados conformacionales, y debido a esto, se ha propuesto que estas proteínas pueden desempeñar diversas funciones durante el desarrollo de *S. coelicolor* (Li, Liang et al. 2014). En otros estudios, también se ha observado que estas proteínas aumentan su expresión en respuesta a la interrupción temporal del crecimiento, ocasionada por la falta de glutamato, y que esta respuesta es similar a la respuesta obtenida bajo distintas condiciones de estrés, como el choque término y el estrés salino (Novotna, Vohradsky et al. 2003). Aunque, como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en el presente trabajo no son suficientes para asegurar que la concentración de glutamato haya disminuido en la mutante $\Delta sco2127$, el aumento en la concentración de nitrito y en la expresión de la mayoría de las enzimas involucradas con la biosíntesis de ectoína en la mutante $\Delta sco2127$ (Figs. 8 y 10), sugieren fuertemente que la mutante si estuvo sujeta a cierto tipo de estrés. Aunque no se conoce la función de las proteínas BldKB y OBP en la fisiología de la mutante $\Delta sco2127$, dichas observaciones, aunadas a las afectaciones observadas en el desarrollo de la mutante (Fig. 3), ocasionadas, en parte, por el aumento en la concentración de nitrito, sugieren, similar a lo observado por Novotna y colaboradores, que el aumento en la abundancia de las proteínas BldKB y OBP en la mutante pudo haber sido resultado de las afectaciones observadas en el crecimiento (Fig. 12).

El aumento en la expresión de la proteína Sco5113, así como la interacción observada previamente entre esta proteína y la proteína Sco2127 (Chavez, Forero et al. 2011), sugieren que la proteína Sco2127 controla la expresión de la proteína Sco5113. Este control puede darse de distintas maneras; sin embargo, y por simplicidad, a continuación se plantean algunas hipótesis relacionadas únicamente con el control transcripcional o postranscripcional de la expresión del gen *sco5113* y/o de su producto de expresión. Si dicho control fuera de tipo transcripcional, parece poco probable que la proteína Sco2127 pueda controlar directamente la expresión del gen *sco5113*, ya que esta proteína carece de dominios de unión a DNA, y en este contexto, la expresión del gen *sco5113* debería estar bajo el control de un regulador transcripcional que pueda controlar directamente la expresión de dicho gen. Si por otro lado, el control fuera de tipo postranscripcional, la interacción entre las proteínas Sco2127 y Sco5113 adquiere

mayor relevancia, ya que existe la posibilidad de que la proteína Sco2127 pueda afectar directamente la expresión de la proteína Sco5113, y probablemente, de otras proteínas relacionadas con este, y otros procesos biológicos. Si esto es cierto, entonces a qué se debe que Chávez y colaboradores no hayan identificado interacciones adicionales entre la proteína Sco2127 y otras proteínas? Aunque todavía no se tiene una respuesta concreta a este cuestionamiento, es probable que esto se haya debido al uso de condiciones de crecimiento diferentes, es decir, en su estudio, Chávez y colaboradores usaron extractos de cultivos crecidos en medio complejo YM (extracto de malta), adicionado con glucosa, en cambio, en el presente estudio se usó medio definido, adicionado con arabinosa.

Sistema Sco0753-56

Además del cambio observado en la abundancia de los sistemas BldK y OBP a nivel de proteína, en la mutante $\Delta sco2127$ se observó un cambio en la expresión de los genes *sco0753-56*. Estos genes también codifican para un sistema de transporte de tipo ABC; y aunque tampoco se ha demostrado experimentalmente qué es lo que transporta este sistema, las evidencias que a continuación de describen, sugieren que este sistema puede transportar ácido teicóico para mantener la firmeza de la pared celular.

El producto de expresión del gen *sco0756*, es una proteína de membrana similar (32% de identidad) a la proteína AtrB de *Sphingomonas sp.* S88 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Boratyn, Schaffer et al. 2012). Esta proteína, la proteína AtrB, aparentemente está relacionada con el transporte de L-ramnosa, y debido a que este carbohidrato es esencial para la producción de polisacáridos estructurales necesarios para la formación de cápsulas de resistencia, puede considerarse que esta proteína también está relacionada con la formación de dichas cápsulas (Yamazaki, Thorne et al. 1996). A diferencia de las especies del género *Sphingomonas*, los estreptomicetos no forman cápsulas; sin embargo, es bien sabido que estos organismos forman otras estructuras de resistencia, comúnmente conocidas como esporas (Chater 2006). Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la proteína de membrana codificada por el gen *sco0756*, y probablemente, todo el sistema de transporte codificado por los genes *sco0753-56*, está involucrado en el transporte de algún carbohidrato necesario para la biosíntesis de la membrana celular. Otra evidencia que apoya esta

hipótesis proviene del análisis de la proteína codificada por el gen *sco0754*. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas HylD (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Boratyn, Schaffer et al. 2012), y una de las proteínas mejor caracterizadas de esta familia es la proteína DevB de *Anabaena sp.* PCC7120. El perfil hidropático de esta proteína, así como la organización genómica del gen que la codifica, no solo sugieren que la proteína DevB es una proteína de unión a membrana, sino que esta proteína también forma parte de un transportador de tipo ABC. En *Anabaena sp.*, se ha propuesto que el transportador codificado por los genes *devBCA* puede estar involucrado en la exportación de glicolípidos o de alguna enzima, probablemente lítica, necesaria para la formación de la membrana celular de los heterocistos (Fiedler, Arnold et al. 1998), células especializadas en la fijación de nitrógeno, en condiciones donde este nutriente es escaso.

Tomando en cuenta la posibilidad de que el transportador formado por las proteínas Sco0753-56 pudiera transportar alguna enzima lítica involucrada en el procesamiento de polisacáridos, se buscaron artículos de *S. coelicolor* relacionadas con el término *lytic polysaccharide*. Como resultado de esta búsqueda, se encontró un artículo relacionado con el estudio de dos monooxigenasas líticas, las proteínas Sco0643 y Sco1188 (Forsberg, Mackenzie et al. 2014); sin embargo, estas proteínas, o los genes que las codifican, no se encontraron en los conjuntos de genes y proteínas expresados diferencialmente entre la mutante $\Delta sco2127$ y la cepa silvestre M145. En ese trabajo, también se reporta que *S. coelicolor* codifica para otras cuatro monooxigenasas líticas; no obstante, los autores no mencionan cuales son esas proteínas. A excepción de los dominios de unión a carbohidratos, los cuales pueden encontrarse en múltiples proteínas asociadas con distintas funciones, las monooxigenasas líticas no contienen dominios conservados; por lo tanto, es difícil saber si alguna monooxigenasa lítica varió su expresión en la mutante $\Delta sco2127$. Debido a esto, y con la intención de identificar el elemento que podría ser transportado a través del transportador Sco0753-56, en la base de datos StrepDB se buscaron los genes asociados con el término *polysaccharide*. Esta búsqueda arrojó un total de 19 genes, de los cuales, únicamente el gen *sco2590* se encontró en el grupo de genes expresados diferencialmente entre la mutante y la cepa silvestre. La secuencia del gen *sco2590* revela la presencia de un dominio Pfam04464, característico de la CDP:glicerol (glicerofosfato) glicerofosfotransferasa de *Staphylococcus epidermis*

ATCC14990 (Boratyn, Schaffer et al. 2012). En *S. epidermis*, esta proteína se encarga de polimerizar la cadena principal de ácido teicóico (Fitzgerald and Foster 2000), un polímero de glicerol fosfato y carbohidratos unidos mediante enlaces fosfodiéster que se encuentra en la pared celular de la mayoría de las bacterias Gram-positivas, y sirve principalmente para dar rigidez a la pared celular. En la mutante $\Delta sco2127$ no solo disminuyó la expresión del gen *sco2590*, sino también de su producto de expresión. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que lo que se transporta a través del transportador Sco0753-56 debe ser ácido teicóico. En consistencia con esta propuesta, en la mutante $\Delta sco2127$ también se observó una disminución en la abundancia del gen *sco2589* y de la proteína codificada por este gen. La proteína Sco2589 tiene 38% de identidad con la proteína *sco2590* y también posee un dominio Pfam04464, lo que indica que, al igual que la proteína Sco2590, el producto de expresión del gen *sco2589* también podría estar involucrado en la polimerización del ácido teicóico. Finalmente, y además de haber encontrado una relación entre el sistema de transporte codificado por los genes *sco0753-56* y las enzimas Sco2589 y So2590, la disminución en la expresión de estos genes y proteínas sugieren que las afectaciones morfológicas observadas en la mutante $\Delta sco2127$ también pudieron haber sido resultado de la falta de polimerización de ácido teicóico, y por lo tanto, de la falta de rigidez de la membrana celular.

Sco7612 y su posible participación en la estabilidad de la membrana celular

La proteína codificada por el gen *sco7612* pertenece a la familia de proteínas YceI (COG2353). Esta proteína tiene 37 y 34% de identidad con la proteína TT1927b de *Thermus thermophilus* y la proteína periplásmica YceI de *E. coli*, respectivamente (Boratyn, Schaffer et al. 2012). Por su parte, la proteína TT1917b de *T. thermophilus* tiene una estructura de barril beta, y es capaz de unir poliisoprenoides de 8 unidades (C40). Interesantemente, todos los residuos de la proteína TT1927b que interaccionan con este tipo de compuestos, se encuentran altamente conservados en la proteína Sco7612 (Handa, Terada et al. 2005). Por lo tanto, es altamente probable que la proteína Sco7612 de *S. coelicolor* también pueda unir poliisoprenoides, y que se mantenga unida a la membrana, como en el caso de la proteína YceI de *E. coli*.

Los poliisoprenoides son lípidos derivados del isopreno (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>). Debido a sus propiedades antioxidantes, se ha comprobado que esta clase de lípidos puede proteger a la membrana de la peroxidación lipídica y de los efectos nocivos que las especies reactivas de oxígeno pueden ocasionar sobre los componentes de la membrana (Nowicka and Kruk 2010); por lo tanto, se entiende que las afectaciones observadas en el desarrollo de la mutante $\Delta sco2127$ también pudieron haber sido provocadas por la disminución en la expresión del gen *sco7612*.

Glucosa permeasas

Desde los primeros trabajos relacionados con el estudio del gen *sco2127*, se ha sugerido que este gen o su producto de expresión están relacionados con el transporte de glucosa. Esta relación está basada principalmente en el restablecimiento del transporte de glucosa observado en algunas mutantes de *S. coelicolor* insensibles a RCC, complementadas únicamente con el gen *sco2127*; sin embargo, hasta el momento no se sabe con precisión cómo el gen *sco2127* pudo haber incidido sobre el transporte de dicho carbohidrato. Con base en los resultados obtenidos previamente por varios autores (Angell, Lewis et al. 1994, Guzman, Carmona et al. 2005, Guzman, Ramos et al. 2005), se ha propuesto que la proteína Sco2127 puede controlar el transporte de glucosa por medio de algún regulador transcripcional que regule directamente la expresión de los genes que codifican para las glucosa permeasas (*glcP1* y *glcP2*), o mediante interacciones proteína-proteína que favorezcan la actividad de dichas proteínas. De hecho, en un estudio previo se comprobó que la proteína Sco2127 sí es capaz de interactuar con otras proteínas; sin embargo, las proteínas que se unieron a la proteína Sco2127 no eran ni las glucosa permeasas ni algún regulador transcripcional que se ajustara a cualquiera de los mecanismos de regulación propuestos, sino las proteínas Sco2582 y Sco5113 (Chavez, Forero et al. 2011). La interacción entre la proteína Sco2127 y la proteína Sco5113 es importante, no solo porque, como se describió anteriormente, el producto de expresión del gen *sco5113* forma parte del sistema de transporte BldK, sino porque en el presente estudio se observaron cambios en la expresión 9 proteínas y 7 genes relacionados con el transporte. La presencia de los genes *glcP1* y *glcP2* en este grupo de genes llama poderosamente la atención, ya que la expresión de dichos genes aumentó a pesar de no haber utilizado glucosa

en este estudio. Aunque esto apoya la hipótesis de que el cambio en la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2* también puede deberse al cambio en la abundancia de algún regulador transcripcional, en *S. coelicolor* aún no se ha identificado el factor transcripcional que pueda regular la expresión de dichos genes. Previamente en este estudio también se propuso que el regulador de respuesta Sco0204 puede controlar la expresión de varios genes, entre los que se encuentra el gen sco5113 (ver arriba); sin embargo, la ausencia de los genes *glcP1* y *glcP2* en este grupo de genes, indica que los genes que codifican para las glucosas permeasas no son regulados por la proteína Sco0204. A pesar de esto, en la mutante Δ sco2127, se observaron cambios en la abundancia de otros reguladores transcripcionales. En este trabajo solo se analizó el regulador de respuesta Sco0204 porque fue el único factor transcripcional que varió su expresión en ambas fases de crecimiento; sin embargo, en la fase exponencial, donde se observó el cambio en la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2*, también se observaron cambios en la abundancia de otros factores transcripcionales, como las proteínas Sco2440, Sco2792, Sco4158 y Sco4493 (Fig. 7-B). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que cualquiera de estos factores pueda controlar la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2* en la mutante Δ sco2127.

Independientemente de que el cambio en la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2* en la mutante Δ sco2127 haya estado influenciado por el cambio en la expresión de algún factor transcripcional, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la expresión de los genes que codifican para las glucosa permeasas no solo depende de la presencia de glucosa. En este estudio tampoco se determinó la concentración de glucosa; sin embargo, es poco probable que este carbohidrato haya sido sintetizado a partir de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, y/o de los cambios observados en la expresión de los genes y proteínas descritos. Probablemente la única evidencia que sugiere un cambio en la concentración de glucosa en la mutante Δ sco2127, es el posible aumento en el flujo metabólico a través de la gluconeogénesis; sin embargo, como se mencionó anteriormente, parece que gluconeogénesis se activó como resultado de la degradación de aspartato para la formación de glutamato, y no porque realmente juegue un papel importante en la fisiología de la mutante. Incluso suponiendo que la activación de la gluconeogénesis fuera relevante para la fisiología de la mutante, la disminución en la expresión de la glucosa-6-fosfato isomerasa

Sco1942, la cual se encarga de convertir la fructosa-6-fosfato (F6P) en glucosa-6-fosfato (G6P) (Fig. 6-B), sugiere que aunque la mutante haya sido capaz de producir F6P a través de la gluconeogénesis, este intermediario difícilmente pudo haber sido convertido en glucosa.

Relación entre el aumento en la expresión del regulador Sco0204 y los perfiles de expresión de algunos genes y proteínas en la mutante

Δsco2127

En contraste con el número de proteínas relacionadas con cualquiera de los procesos que acaban de mencionarse, la delección del gen *sco2127* provocó cambios solamente en siete proteínas relacionadas con la transcripción. De estas proteínas, únicamente el regulador de respuesta Sco0204 mostró el mismo perfil de expresión en ambas fases del cultivo (Fig. 7); por lo tanto, es posible que esta proteína juegue un papel importante en la fisiología de la mutante *Δsco2127*. En consistencia con esta hipótesis, en este estudio también se descubrió que, aunque la proteína Sco0204 tiene el potencial para regular la expresión de 216 genes, solo 15 de los productos codificados por estos genes cambiaron su expresión en la mutante *Δsco2127*. A pesar de esto, estos resultados coinciden con el enriquecimiento observado en el transporte de péptidos, ya que algunas de esas proteínas, entre las que se encuentran las proteínas Sco1074, Sco1796, Sco5112 y Sco5113, están relacionadas con la hidrólisis, el recambio y, sobre todo, el transporte de proteínas. La presencia de las proteínas Sco5112 y Sco5113 en este grupo de proteínas merece especial atención, ya que apoya la hipótesis de que la proteína Sco2127 pueda controlar la expresión de ciertos genes a través de un regulador transcripcional. Anteriormente se había planteado la posibilidad de que la proteína Sco2127 pudiera controlar directamente la expresión de la proteína Sco5113 a través de interacciones proteína-proteína; sin embargo, el cambio en la expresión del regulador transcripcional Sco0204 en la mutante, y sobre todo, la aparente capacidad de este regulador para controlar directamente la expresión de los genes *sco5112* y *sco5113*, no descartan la posibilidad de que la expresión de ambos genes también pueda darse a nivel transcripcional (Fig. 12). Otras proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante *Δsco2127* y la cepa silvestre, y cuya expresión podría depender, inicialmente, del regulador de respuesta Sco0204, incluyen las proteínas Sco2614 y Sco0975. La relación de la

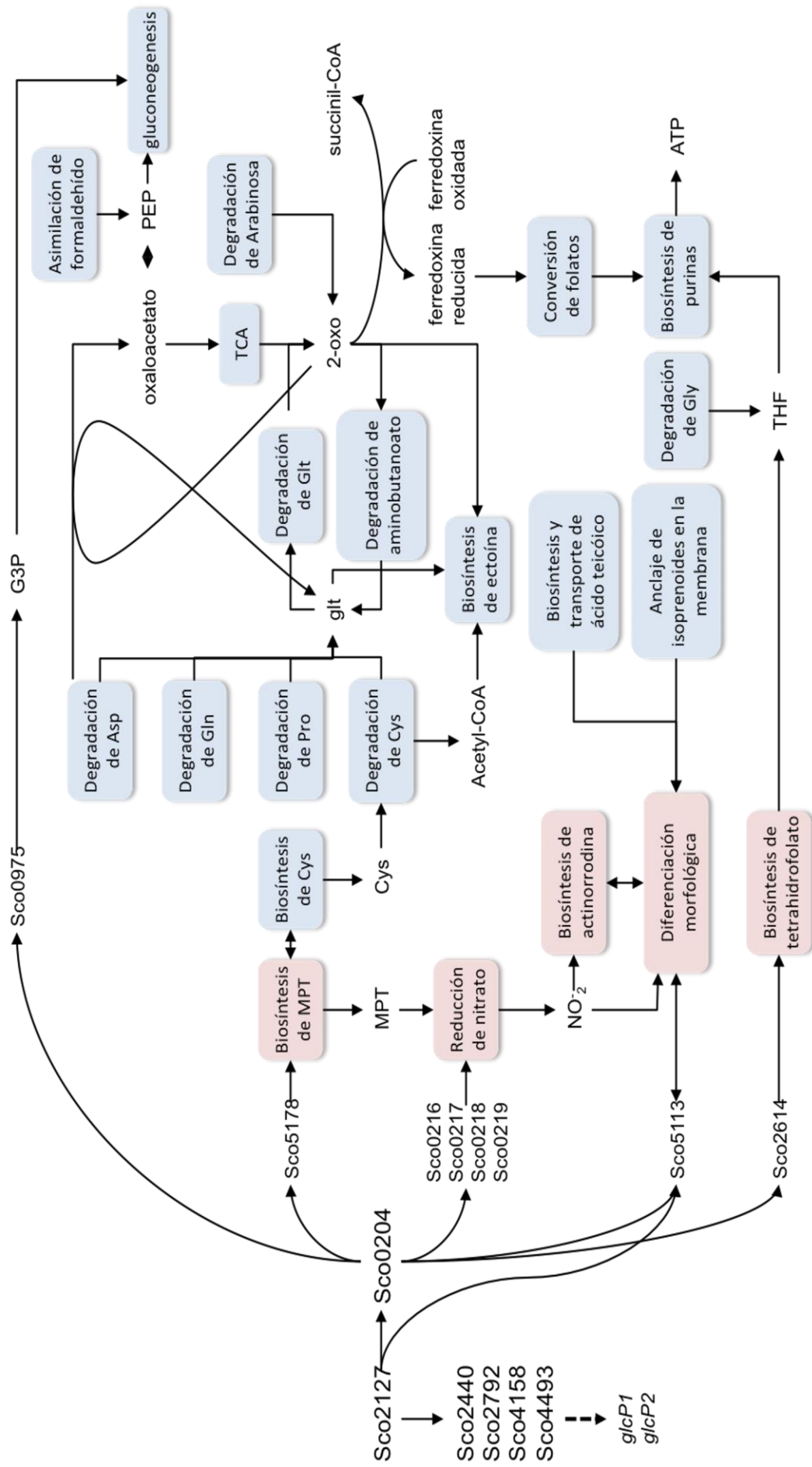


Figura 7 Posible relación entre las proteínas Sco2127, Sco0204, y las rutas y procesos aparentemente afectados por la delección del gen sco2127. Los recuadros rojos representan las rutas o procesos donde participan genes o proteínas aparentemente regulados por el regulador Sco0204. Los recuadros azules representan rutas o procesos aparentemente no regulados por la proteína Sco0204, pero influenciados por la delección del gen sco2127. Las flechas sólidas representan interacciones regulatorias o el flujo metabólico entre distintas proteínas y/o procesos. Las flechas punteadas representan interacciones regulatorias por confirmar.

primera, con la biosíntesis de tetrahidrofolatos, y de la segunda, con la utilización de 6-fosfogluconato para la formación de gliceraldehído-3-fosfato, el cual puede ser incorporado en la gluconeogénesis, sugiere que, además de estar influenciados por el flujo metabólico que impera en la mutante $\Delta sco2127$, estos procesos podrían estar controlados, a nivel transcripcional, por el regulador de respuesta Sco0204 (Fig. 12).

De acuerdo con las hipótesis de que la mutante $\Delta sco2127$ estuvo sometida a cierto tipo de estrés, el resto de las proteínas cuya expresión pudo haber sido controlada por la proteína Sco0204 en la mutante $\Delta sco2127$, aparentemente está relacionado con la adaptación y el crecimiento celular bajo condiciones de estrés (Daigle, Lerat et al. 2015). Estas proteínas incluyen algunas proteínas de estrés (Sco0167 y Sco0200), una alcohol deshidrogenasa (Sco0179), el propio regulador de respuesta Sco0204, y dos subunidades del complejo nitrato reductasa (Sco0216 y Sco0217). Al igual que estas proteínas, otros productos de expresión que también podrían haber sido estar reguladas por la proteína Sco0204, debido a que los promotores de los genes que los codifican contienen sitios de unión para dicho regulador, son las proteínas Sco0161 y Sco0268; sin embargo, estas proteínas no mostraron cambios en sus perfiles de expresión.

Para saber si el regulador de respuesta Sco0204 también puede inducir la expresión de los genes sco0161 y sco0268, así como de otros genes que contienen, en sus promotores, posibles sitios de unión a dicho regulador (recuérdese que, según el análisis bioinformático realizado en el presente estudio, la proteína Sco0204 podría regular la expresión de hasta 216 genes en *S. coelicolor*), se compararon los transcriptomas de la mutante y la cepa silvestre. Contrario a lo esperado, esta comparación no reveló cambios en la expresión del gen sco0161; sin embargo, sí produjo cambios en la expresión del gen sco0268, y de otros 20 genes localizados entre el gen sco0161 y el gen sco0268, sumando un total de 21 genes cuya expresión podría haber sido regulada por la proteína Sco0204, 14 más que el número de proteínas que variaron su expresión en la mutante, y cuya abundancia también podría depender del regulador Sco0204. En resumen, estos resultados no solo sugieren que el regulador Sco0204 puede controlar la expresión de estos 21 genes, sino que el transcriptoma se ajusta mejor que el proteoma, a la predicción del regulón Sco0204.

Si bien los resultados obtenidos mediante la comparación de los transcriptomas de ajustaron mejor a la predicción del regulón Sco0204, que los resultados obtenidos mediante la comparación de los proteomas, aún es preciso discutir por qué el número de proteínas fue menor que el número de genes cuya expresión pudo haber sido regulada por la proteína Sco0204, y en este sentido, se ha propuesto que esta falta de correlación puede deberse a, por lo menos, una de las siguientes razones: i) retrasos durante el inicio del proceso de traducción, ii) afectaciones durante el proceso mismo de traducción, y iii) cambios en la expresión de enzimas relacionadas con la actividad proteolítica, modificaciones postraduccionales y/o recambio de proteínas. El primer punto se refiere a que, para que un transcrito pueda ser traducido en su producto de expresión correspondiente, primero deben ensamblarse, alrededor del sitio de inicio de la traducción, el ribosoma, el factor de iniciación, y el tRNA de inicio, es decir, el tRNA-Met. La unión de estos tres elementos generalmente toma su tiempo, y este tiempo suele ser suficiente para que los transcritos no se traduzcan de manera inmediata (Olivares-Hernandez, Bordel et al. 2011), lo cual provoca diferencias entre el número de genes y proteínas regulados por un mismo TF. El segundo punto está relacionado con el tipo y abundancia de las enzimas encargadas de incorporar los aminoácidos necesarios para la formación de los péptidos nacientes, también conocidas como aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs), y con el uso de codones de los transcritos (Olivares-Hernandez, Bordel et al. 2011). De las cuatro aaRSs cuya expresión disminuyó en la mutante $\Delta sco2127$ (Sco1818: tirosina, Sco3961: serina, Sco1663: cisteína y Sco2076: isoleucina), aparentemente la disminución en la expresión de la tirosil- y la seril-tRNA sintetasas tuvo el mayor efecto sobre la falta de correlación entre los perfiles de expresión de los genes y las proteínas posiblemente reguladas por la proteína Sco0204. Estas proteínas son las únicas dos aaRSs de *S. coelicolor* capaces de acarrear tirosina y serina para la síntesis de proteínas. Aunque el porcentaje de estos dos aminoácidos en la composición de la mayoría de las proteínas que conforman el regulón de Sco0204 es bajo, la serina es el cuarto o quinto aminoácido más abundante en la composición de algunas proteínas del regulón, como las proteínas Sco0201, Sco0213 y Sco0214, y por lo tanto, es factible suponer que, aunque los genes que codifican para estas tres enzimas aumentaron su expresión en la mutante, la disminución en la abundancia de sus

correspondientes productos de expresión pudo haberse debido a la disminución en la abundancia de la tirosil y la seril tRNA sintetetasas. El tercer y último argumento para explicar la falta de correlación entre los perfiles de expresión de genes y proteínas, está relacionado con el aumento en la expresión de la proteína Sco1796 en la mutante $\Delta sco2127$. Debido a que esta enzima está relacionada con la actividad proteolítica, modificaciones postraduccionales y el recambio de proteínas, es posible que el aumento en su expresión haya afectado la estabilidad de algunas proteínas en la mutante $\Delta sco2127$, incluyendo, por supuesto, algunas proteínas del regulón Sco0204. Aunque estos tres escenarios se plantearon para explicar las diferencias observadas entre los perfiles de expresión solo de aquellos genes y proteínas cuya expresión podría depender del regulador Sco0204, no se descarta la posibilidad de que cualquiera de estos mecanismos haya afectado la biosíntesis o estabilidad de otras proteínas, es decir, de proteínas que no formen parte del regulón Sco0204. De acuerdo con esta posibilidad, es interesante subrayar que solo 49 de las proteínas codificadas por los 179 genes expresados diferencialmente, mostraron el mismo perfil de expresión que sus respectivos genes, lo que equivale apenas al 27% de los genes expresados diferencialmente.

Influencia del regulador de respuesta Sco0204 sobre la diferenciación morfológica y la producción de actinorrodina, en la mutante $\Delta sco2127$

De las proteínas cuya expresión puede depender de la proteína Sco0204, únicamente se conoce la función del complejo enzimático nitrato reductasa Nar2. Este complejo está conformado por las proteínas Sco0216-0219. De estas proteínas, solo las proteínas Sco0216 y Sco0217 aumentaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$; sin embargo, y al igual que lo observado en la ruta de biosíntesis de ectoína, el análisis de los transcriptomas permitió identificar un aumento en la expresión de otros genes igualmente relacionados con el complejo nitrato reductasa, como el gen sco0219, pero cuyos productos de expresión no habían sido identificados inicialmente mediante proteómica, además de confirmar los resultados obtenidos mediante dicho acercamiento, como en el caso de los genes sco0216 y sco0217. Debido a que también en este caso, la integración de la información obtenida por proteómica y transcriptómica permitió identificar cambios en la mayoría de los genes o proteínas relacionados con el complejo

nitrito reductasa, es altamente probable que el complejo Nar2 haya incrementado su concentración en la mutante.

El complejo Nar2 es uno de los tres complejos nitrito reductasa codificados en el cromosoma de *S. coelicolor*, y el principal responsable de la reducción de nitrito a nitrito en esta bacteria (Fischer, Falke et al. 2014). De acuerdo con estas evidencias, el posible aumento en la concentración del complejo Nar2 coincide con la acumulación de nitrito observada en la mutante $\Delta sco2127$; sin embargo, en *S. coelicolor* el nitrito afecta negativamente el desarrollo morfológico y la producción de actinorrodina (Fischer, Falke et al. 2014). Debido a que estas afectaciones son similares a las afectaciones ocasionadas por la delección del gen *sco2127*, cabe la posibilidad de que el fenotipo de la mutante $\Delta sco2127$ haya sido fuertemente influenciado por el aumento en la concentración de nitrito. Esta hipótesis fue confirmada al observar que la doble mutante mostró una disminución importante en la concentración de nitrito. Interesantemente, esta disminución estuvo acompañada de un aumento en la concentración de actinorrodina (Fig. 8) y de un restablecimiento parcial en la diferenciación morfológica, con respecto a la mutante sencilla (Fig. 3). Por lo tanto, estas observaciones sugieren que el fenotipo de la mutante $\Delta sco2127$ se debe, en gran medida, al aumento en la concentración de nitrito, y que el regulador de respuesta Sco0204 efectivamente puede controlar la expresión de los genes que codifican para el complejo nar2, así como de otros genes, como se describió anteriormente (ver arriba).

Estos resultados parecen ser apoyados por los resultados obtenidos recientemente por Urem y colaboradores. Estos autores también observaron cambios en la expresión de diversos genes localizados entre el gen *sco0161* y *sco0268*, solo que, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, los cambios observados por Urem y colaboradores se produjeron como resultado de la inactivación del gen *sco0204*. Estos autores también realizaron una predicción bioinformática para identificar los posibles sitios de unión del regulador de respuesta Sco0204. Urem y colaboradores no solo encontraron, como posible sitio de unión del regulador Sco0204, una secuencia consenso similar a la identificada en este estudio, también confirmaron que dicho regulador se une a la región regulatoria de su propio gen, y a la región regulatoria de otros genes localizados en la misma región del cromosoma, entre los que se encuentran los

genes *sco0207* y *sco0208* (Urem, van Rossum et al. 2016). Finalmente, estos autores compararon los perfiles de transcripción de la mutante Δ *sco0204* y la cepa silvestre M145 de *S. coelicolor*, y observaron cambios en la expresión de aproximadamente 200 genes. Nuevamente, algunos de estos genes están localizados entre los genes *sco0161* y *sco0220*; por lo tanto, los resultados obtenidos por estos investigadores, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren fuertemente que al menos la expresión de los genes localizados en dicha región del cromosoma, está regulada directamente por la proteína Sco0204.

Retomando la discusión sobre el aumento en la expresión del complejo Nar2, y la influencia de este complejo sobre la formación de nitrito, es preciso señalar que en la mutante Δ *sco2127* también se observó un aumento en la expresión del gen *sco5178*, y en la abundancia de la proteína codificada por este gen. Esta proteína es similar (62% de similitud) a la molibdopterina (MPT) sintasa sulfurilasa de *E. coli* (MoeB) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Boratyn, Schaffer et al. 2012). En *E. coli*, tanto la MPT sintasa sulfurilasa, como la MPT sintasa, se encargan de la biosíntesis de MPT, específicamente, de la formación del grupo ditioleno de la MPT. Este grupo es capaz de unir molibdeno, y el molibdeno, a su vez, es indispensable para la actividad nitrato reductasa, y, por lo tanto, para la formación de nitrito. Durante la biosíntesis de MPT, la MPT sintasa sulfurilasa se encarga de transferir dos grupos azufre, de un donador de azufre de bajo peso molecular, a la MPT sintasa, y la MPT sintasa, por su parte, se encarga de transferir dichos grupos a la piranopterina-monofosfato cíclica (cPMP), precursor de la MPT (Pitterle, Johnson et al. 1993). En *S. coelicolor* aún no sabe cual es el gen que codifica para la MPT sintasa; sin embargo, la búsqueda de la palabra *molybdopterin* en StrepDB reveló 21 genes relacionados con dicha palabra. De acuerdo con la anotación funcional de las proteínas codificadas por dichos genes, solamente 3 proteínas están relacionadas con la biosíntesis ya sea de molibdopterina (Sco3181 y Sco3828) o del cofactor de molibdeno (Sco3179), y de estas, solamente la proteína Sco3179 varió su expresión entre la mutante Δ *sco2127* y la cepa silvestre. El análisis de la secuencia de la proteína Sco3179, reveló que esta proteína pertenece a la familia de proteínas MogA-MoaB, la cual está relacionada con la biosíntesis del cofactor de molibdeno

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Boratyn, Schaffer et al. 2012). Adicionalmente, y aunque no se observaron cambios en la expresión del gen *sco3179*, la proteína codificada por este gen aumentó su expresión casi 14 veces en la fase exponencial, con respecto a la silvestre. De hecho, la proteína Sco3179 fue la segunda proteína más inducida en esta fase de crecimiento; por lo tanto, es altamente probable que la proteína Sco3179, en conjunto con la proteína codificada por el gen *sco5178* sean responsables de la biosíntesis de MPT en *S. coelicolor* (Fig. 12).

De acuerdo con la base de datos BioCyc, la sulfurilasa Sco5178 también puede catalizar la reacción entre el sulfato y el ATP, para la formación de adenosina-5-fosfosulfato, un intermediario de la biosíntesis de cisteína. La catálisis de esta reacción por parte de la proteína Sco5178, no solo sugiere que el sulfato puede ser el donador de azufre de bajo peso molecular necesario para la biosíntesis de MPT, sino que la biosíntesis de MPT y cisteína pueden estar acopladas en la mutante $\Delta sco2127$ (Fig. 12). Aunque esta última sugerencia parece estar apoyada por el aumento en la expresión de diversos genes y proteínas relacionados con la biosíntesis de cisteína y con el transporte de sulfonatos, los cuales pueden ser convertidos en sulfito, y finalmente en cisteína (Lee, Karoonuthaisiri et al. 2005), en este estudio no se observaron cambios en los niveles de cisteína entre la cepa silvestre y la mutante $\Delta sco2127$; por lo tanto, es posible que la cisteína pueda ser utilizada para otros fines. De acuerdo con Scocyc, la cisteína puede ser degradada, inicialmente, por una cisteína desoxigenasa para producir 3-sulfoalanina. Posteriormente, y por acción de una aminotransferasa, la 3-sulfoalanina pierde su grupo amino, y se convierte en 3-sulfopiruvato. Finalmente, el 3-sulfopiruvato se degrada de manera espontánea para dar lugar a la formación de sulfito y piruvato, el cual todavía puede ser descarboxilado para producir acetil-CoA. Además de sulfito y piruvato, la degradación de cisteína puede producir glutamato durante la conversión de sulfoalanina a sulfopiruvato. De las enzimas relacionadas con la degradación de cisteína o la descarboxilación de piruvato, únicamente la aminotransferasa Sco6222 y la acetiltransferasa Sco2181, las cuales están involucradas en la formación de glutamato y acetil-CoA, respectivamente, variaron su expresión entre la mutante y la cepa silvestre. Estas dos enzimas aumentaron su expresión en la mutante $\Delta sco2127$; por lo tanto, es probable que la cisteína producida por la

mutante haya sido convertida en glutamato y acetil-CoA (Fig. 12). Previamente, en este trabajo ya se había planteado que, debido a su participación en la primera reacción para la biosíntesis de ectoína, el glutamato podría ser utilizado para la formación de este osmolito; sin embargo, estas observaciones, así como la participación de la acetil-CoA en la segunda reacción para la producción de ectoína (Fig. 10), sugieren fuertemente que tanto el glutamato, como la acetil-CoA, y por lo tanto, la cisteína a partir de la cual provienen dichos compuestos, pudieron haber sido utilizados para la formación de ectoína (Fig. 12). Adicionalmente, esta sugerencia apoya otra de las hipótesis planteadas en este trabajo: que la delección del gen *sco2127* provoca algún tipo de estrés en la mutante. En este sentido, el aumento en la expresión de la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de cisteína, incluyendo los genes *sco5178* y *sco2910* (*cysM*), además sugiere que dicho estrés podría ser de tipo oxidativo, ya que la expresión de estos genes también aumenta en presencia de diamida, un compuesto usado comúnmente para generar este tipo de estrés, debido a su capacidad para oxidar los grupos tiol de manera específica (Paget, Kang et al. 1998).

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio ofrecen por primera vez un panorama general de los cambios fisiológicos ocasionados por la delección del gen *sco2127* en *S. coelicolor*. A pesar de falta de información relacionada con el gen *sco2127*, y con la mayoría de los genes o proteínas de *S. coelicolor*, este trabajo permitió identificar, tras la delección del gen *sco2127*, alteraciones en el metabolismo de glutamato, el transporte y diversos procesos de óxido-reducción, principalmente. Después de analizar cuidadosamente estos cambios, se concluyó que, en su mayoría, dichos cambios estuvieron enfocados en contrarrestar algún tipo de estrés y a satisfacer la demanda de energía en la mutante Δ *sco2127*. Además de estas observaciones, y con la finalidad de analizar una mayor cantidad de genes y proteínas expresados diferencialmente entre la mutante Δ *sco2127* y la cepa silvestre, se realizó una predicción bioinformática sobre los genes cuya expresión podría haber sido regulada por la proteína Sco0204 en la mutante. Este análisis no solo confirmó que la mutante estuvo sujeta a algún tipo de estrés, sino que la proteína Sco0204 regula directamente la expresión del complejo nitrato reductasa y, por lo tanto, la producción de nitrito en la mutante Δ *sco2127*. Esta

predicción también reveló que la expresión de los genes que codifican para las glucosa permeasas depende, de alguna manera, de la presencia del gen *sco2127*. En consistencia con las conclusiones obtenidas por otros autores, en este trabajo también se propone que la expresión de los genes que codifican para las glucosas permeasas podría estar a cargo de un regulador transcripcional, pero a diferencia de las investigaciones previas, en este estudio se tienen, por primera vez, algunos candidatos para llevar a cabo dicha regulación. Para saber si alguno de estos factores de transcripción realmente puede controlar la expresión de los genes *glcP1* y *glcP2*, es necesario hacer predicciones bioinformáticas, como la realizada en este estudio, y confirmar dichas predicciones por medio de experimentos de unión in vivo y a escala genómica, por ejemplo, mediante ChIP-Seq. Por otro lado, y para conocer más sobre la participación de la proteína Sco2127 en la fisiología de *S. coelicolor*, también podrían realizarse ensayos de interacción proteína-proteína in vivo. Un aspecto importante para tomar en cuenta antes de realizar estos ensayos, y con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, es que dichos ensayos no deberían estar limitados a identificar interacciones entre la proteína Sco2127 y las proteínas de la fracción soluble, sino también entre dicha proteína y las proteínas de la membrana celular. Además, es importante subrayar que, de ser posible, estos ensayos deberían realizarse bajo las mismas condiciones de crecimiento usadas en el presente estudio para garantizar la consistencia entre los resultados, o bien, descartar alguna de las hipótesis planteadas en este trabajo.

Conclusiones

1. El gen *sco2127* es necesario para la diferenciación morfológica y la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor*.
2. El gen *sco2127* no es responsable de la regulación catabólica por carbono, al menos bajo las condiciones probadas en este estudio.
3. La delección del gen *sco2127* aparentemente provocó un aumento en la demanda de energía.
4. El 2-oxoglutarato juega un papel fundamental en la mutante Δ *sco2127*. En la fase exponencial inicia una serie de reacciones dedicadas a satisfacer la demanda energética de la mutante, y en la fase exponencial, se convierte en glutamato para favorecer, junto con la acetil-CoA derivada de la degradación de cisteína, la producción de ectoína.
5. Las alteraciones observadas en la producción de nitrito, en las rutas de biosíntesis de molibdopterina y tetrahidrofolatos, y en general, en el fenotipo de la mutante Δ *sco2127*, pudieron deberse, en cierta medida, al aumento en la expresión del regulador de respuesta Sco0204.
6. Las afectaciones observadas en la diferenciación morfológica de la mutante Δ *sco2127* también pudieron haber sido ocasionadas por la incapacidad de la mutante de polimerizar ácido teicóico y mantener lípidos de tipo isoprenoide unidos a la membrana.

Referencias

- Angell, S., C. G. Lewis, M. J. Buttner and M. J. Bibb (1994). "Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase." *Mol Gen Genet* **244**(2): 135-143.
- Angell, S., E. Schwarz and M. J. Bibb (1992). "The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression." *Mol Microbiol* **6**(19): 2833-2844.
- Arias, P., M. A. Fernandez-Moreno and F. Malpartida (1999). "Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein." *J Bacteriol* **181**(22): 6958-6968.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill and D. A. Hopwood (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Nature* **417**(6885): 141-147.
- Bernhardt, O. M., N. Selevsek, L. C. Gillet, O. Rinner, P. Picotti, R. Aebersold and L. Reiter (2012). Spectronaut: A fast and efficient algorithm for MRM-like processing of data independent acquisition (SWATH-MS) data. 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, Canada, Journal of The American Society for Mass Spectrometry.
- Boratyn, G. M., A. A. Schaffer, R. Agarwala, S. F. Altschul, D. J. Lipman and T. L. Madden (2012). "Domain enhanced lookup time accelerated BLAST." *Biol Direct* **7**: 12.
- Bursy, J., A. U. Kuhlmann, M. Pittelkow, H. Hartmann, M. Jebbar, A. J. Pierik and E. Bremer (2008). "Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses." *Appl Environ Microbiol* **74**(23): 7286-7296.
- Bystrykh, L. V., M. A. Fernandez-Moreno, J. K. Herrema, F. Malpartida, D. A. Hopwood and L. Dijkhuizen (1996). "Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *J Bacteriol* **178**(8): 2238-2244.
- Cerdeno, A. M., M. J. Bibb and G. L. Challis (2001). "Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes." *Chem Biol* **8**(8): 817-829.
- Chater, K. F. (2006). "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1469): 761-768.
- Chavez, A., A. Forero, M. Sanchez, R. Rodriguez-Sanoja, G. Mendoza-Hernandez, L. Servin-Gonzalez, B. Sanchez, Y. Garcia-Huante, D. Rocha, E. Langley, B. Ruiz and S. Sanchez (2011). "Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*." *Appl Microbiol Biotechnol* **89**(3): 799-806.
- Chavez, A., Y. Garcia-Huante, B. Ruiz, E. Langley, R. Rodriguez-Sanoja and S. Sanchez (2009). "Cloning and expression of the sco2127 gene from *Streptomyces coelicolor* M145." *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**(5): 649-654.
- Craney, A., S. Ahmed and J. Nodwell (2013). "Towards a new science of secondary metabolism." *J Antibiot (Tokyo)* **66**(7): 387-400.
- Daigle, F., S. Lerat, G. Bucca, E. Sanssouci, C. P. Smith, F. Malouin and C. Beaulieu (2015). "A terD domain-encoding gene (SCO2368) is involved in calcium homeostasis and participates in calcium regulation of a DosR-like regulon in *Streptomyces coelicolor*." *J Bacteriol* **197**(5): 913-923.
- Dayani, P. N., M. C. Bishop, K. Black and P. M. Zeltzer (2004). "Desferoxamine (DFO)--mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer." *J Neurooncol* **67**(3): 367-377.
- Demain, A. L. (2014). "Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery." *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**(2): 185-201.
- den Hengst, C. D., N. T. Tran, M. J. Bibb, G. Chandra, B. K. Leskiw and M. J. Buttner (2010). "Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth." *Mol Microbiol* **78**(2): 361-379.

Escalante, L., I. Ramos, I. Imriskova, E. Langley and S. Sánchez (1999). "Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*." Applied Microbiology and Biotechnology **52**: 572-578.

Escher, C., L. Reiter, B. MacLean, R. Ossola, F. Herzog, J. Chilton, M. J. MacCoss and O. Rinner (2012). "Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides." Proteomics **12**(8): 1111-1121.

Fernandez, E., U. Weissbach, C. Sanchez Reillo, A. F. Brana, C. Mendez, J. Rohr and J. A. Salas (1998). "Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin." J Bacteriol **180**(18): 4929-4937.

Fernandez-Moreno, M. A., J. L. Caballero, D. A. Hopwood and F. Malpartida (1991). "The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of *Streptomyces*." Cell **66**(4): 769-780.

Fernandez-Moreno, M. A., E. Martinez, L. Boto, D. A. Hopwood and F. Malpartida (1992). "Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin." J Biol Chem **267**(27): 19278-19290.

Fernandez-Moreno, M. A., E. Martinez, J. L. Caballero, K. Ichinose, D. A. Hopwood and F. Malpartida (1994). "DNA sequence and functions of the actVI region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Biol Chem **269**(40): 24854-24863.

Fiedler, G., M. Arnold, S. Hannus and I. Maldener (1998). "The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." Mol Microbiol **27**(6): 1193-1202.

Fischer, M., D. Falke, T. Pawlik and R. G. Sawers (2014). "Oxygen-dependent control of respiratory nitrate reduction in mycelium of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **196**(23): 4152-4162.

Fitzgerald, S. N. and T. J. Foster (2000). "Molecular analysis of the tagF gene, encoding CDP-Glycerol:Poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990." J Bacteriol **182**(4): 1046-1052.

Forsberg, Z., A. K. Mackenzie, M. Sorlie, A. K. Rohr, R. Helland, A. S. Arvai, G. Vaaje-Kolstad and V. G. Eijsink (2014). "Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenases." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(23): 8446-8451.

Gorke, B. and J. Stulke (2008). "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients." Nat Rev Microbiol **6**(8): 613-624.

Gregory, M. A., R. Till and M. C. Smith (2003). "Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors." J Bacteriol **185**(17): 5320-5323.

Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser and K. F. Chater (2003). "PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1541-1546.

Guzman, S., A. Carmona, L. Escalante, I. Imriskova, R. Lopez, R. Rodriguez-Sanoja, B. Ruiz, L. Servin-Gonzalez, S. Sanchez and E. Langley (2005). "Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*." Microbiology **151**(Pt 5): 1717-1723.

Guzman, S., I. Ramos, E. Moreno, B. Ruiz, R. Rodriguez-Sanoja, L. Escalante, E. Langley and S. Sanchez (2005). "Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*." Appl Microbiol Biotechnol **69**(2): 200-206.

Hallam, S. E., F. Malpartida and D. A. Hopwood (1988). "Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*." Gene **74**(2): 305-320.

Handa, N., T. Terada, Y. Doi-Katayama, H. Hirota, J. R. Tame, S. Y. Park, S. Kuramitsu, M. Shirouzu and S. Yokoyama (2005). "Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8." Protein Sci **14**(4): 1004-1010.

Hesketh, A., G. Bucca, E. Laing, F. Flett, G. Hotchkiss, C. P. Smith and K. F. Chater (2007). "New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures." BMC Genomics **8**: 261.

Hodgson, D. A. (1982). "Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose." Journal of General Microbiology **128**: 2417-2430.

Horne, D. S. and A. Tomasz (1993). "Possible role of a choline-containing teichoic acid in the maintenance of normal cell shape and physiology in *Streptococcus oralis*." *J Bacteriol* **175**(6): 1717-1722.

Huang, J., C. J. Lih, K. H. Pan and S. N. Cohen (2001). "Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays." *Genes Dev* **15**(23): 3183-3192.

Hutchings, M. I., P. A. Hoskisson, G. Chandra and 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**(Pt 9): 2795-2806.

Ikeda, H., E. T. Seno, C. J. Bruton and K. F. Chater (1984). "Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*." *Mol Gen Genet* **196**(3): 501-507.

Janky, R. and J. van Helden (2008). "Evaluation of phylogenetic footprint discovery for predicting bacterial cis-regulatory elements and revealing their evolution." *BMC Bioinformatics* **9**: 37.

Jiménez, A., B. Cabrera, F. C. Cordero, B. Ruiz-Villafan, R. Rodríguez-Sanoja, V. H. Tierrafría and S. Sánchez (2012). *sp2563* nor its orthologue *sco2127* seem to be the only factors eliciting Carbon Catabolite Repression in two *Streptomyces* strains. *BioTecnología*. México, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. **16**: 34-43.

Jiménez-Rodríguez, O. (2018). Efecto de la interrupción del gen *sco2582* sobre el crecimiento y producción de pigmentos en *Streptomyces coelicolor*. Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.

Jin, Y. Y., J. Cheng, S. H. Yang, L. Meng, S. A. Palaniyandi, X. Q. Zhao and J. W. Suh (2011). "S-adenosyl-L-methionine activates actinorhodin biosynthesis by increasing autophosphorylation of the Ser/Thr protein kinase AfsK in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Biosci Biotechnol Biochem* **75**(5): 910-913.

Kappler, U. and A. S. Nouwens (2013). "The molybdoproteome of *Starkeya novella*--insights into the diversity and functions of molybdenum containing proteins in response to changing growth conditions." *Metallomics* **5**(4): 325-334.

Karp, P. D., R. Billington, R. Caspi, C. A. Fulcher, M. Latendresse, A. Kothari, I. M. Keseler, M. Krummenacker, P. E. Midford, Q. Ong, W. K. Ong, S. M. Paley and P. Subhraveti (2017). "The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways." *Brief Bioinform*.

Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood (2000). Media, buffers and suppliers. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, England, John Innes Foundation.

Kim, D. W., A. Hesketh, E. S. Kim, J. Y. Song, D. H. Lee, I. S. Kim, K. F. Chater and K. J. Lee (2008). "Complex extracellular interactions of proteases and a protease inhibitor influence multicellular development of *Streptomyces coelicolor*." *Mol Microbiol* **70**(5): 1180-1193.

Laing, E., G. Bucca and C. P. Smith (2008) "University of Surrey Microarray Experiment Guidelines."

Laing, E. and C. P. Smith (2010). "RankProdIt: A web-interactive Rank Products analysis tool." *BMC Res Notes* **3**: 221.

Lee, E. J., N. Karoonuthaisiri, H. S. Kim, J. H. Park, C. J. Cha, C. M. Kao and 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*." *Mol Microbiol* **57**(5): 1252-1264.

Lee, P. C., T. Umeyama and S. Horinouchi (2002). "afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Mol Microbiol* **43**(6): 1413-1430.

Lewis, R. A., E. Laing, N. Allenby, G. Bucca, V. Brenner, M. Harrison, A. M. Kierzek and C. P. Smith (2010). "Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization." *BMC Genomics* **11**: 682.

Li, F., J. Liang, W. Wang, X. Zhou, Z. Deng and Z. Wang (2014). "Analysis of *Streptomyces coelicolor* membrane proteome using two-dimensional native/native and native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis." *Anal Biochem* **465**: 148-155.

Li, W., J. Wu, W. Tao, C. Zhao, Y. Wang, X. He, G. Chandra, X. Zhou, Z. Deng, K. F. Chater and M. Tao (2007). "A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA." *FEMS Microbiol Lett* **266**(1): 20-28.

Licon-Cassani, C., S. Lim, E. Marcellin and L. K. Nielsen (2014). "Temporal dynamics of the *Saccharopolyspora erythraea* phosphoproteome." *Mol Cell Proteomics* **13**(5): 1219-1230.

Mak, S. and J. R. Nodwell (2017). "Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells." *Mol Microbiol* **106**(4): 597-613.

Malpartida, F. and D. A. Hopwood (1986). "Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Mol Gen Genet* **205**(1): 66-73.

Manteca, A., R. Alvarez, N. Salazar, P. Yague and J. Sanchez (2008). "Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*." *Appl Environ Microbiol* **74**(12): 3877-3886.

Marchler-Bauer, A., Y. Bo, L. Han, J. He, C. J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L. Y. Geer and S. H. Bryant (2017). "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures." *Nucleic Acids Res* **45**(D1): D200-D203.

Marrero, J., K. Y. Rhee, D. Schnappinger, K. Pethe and S. Ehrh (2010). "Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for *Mycobacterium tuberculosis* to establish and maintain infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(21): 9819-9824.

Mi, H., A. Muruganujan, J. T. Casagrande and P. D. Thomas (2013). "Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system." *Nat Protoc* **8**(8): 1551-1566.

Minambres, B., E. R. Olivera, R. A. Jensen and J. M. Luengo (2000). "A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*." *J Biol Chem* **275**(50): 39529-39542.

Nguyen, K. T., J. Tenor, H. Stettler, L. T. Nguyen, L. D. Nguyen and C. J. Thompson (2003). "Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene." *J Bacteriol* **185**(24): 7291-7296.

Nodwell, J. R. and R. Losick (1998). "Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*." *J Bacteriol* **180**(5): 1334-1337.

Novotna, J., J. Vohradsky, P. Berndt, H. Gramajo, H. Langen, X. M. Li, W. Minas, L. Orsaria, D. Roeder and C. J. Thompson (2003). "Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes." *Mol Microbiol* **48**(5): 1289-1303.

Nowicka, B. and J. Kruk (2010). "Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones." *Biochim Biophys Acta* **1797**(9): 1587-1605.

Okamoto, S., T. Taguchi, K. Ochi and K. Ichinose (2009). "Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster." *Chem Biol* **16**(2): 226-236.

Olivares-Hernandez, R., S. Bordel and J. Nielsen (2011). "Codon usage variability determines the correlation between proteome and transcriptome fold changes." *BMC Syst Biol* **5**: 33.

Oliveira, P. H., A. Batagov, J. Ward, F. Baganz and P. Krabben (2006). "Identification of erythroblastin, a hydroxamate-type siderophore produced by *Saccharopolyspora erythraea*." *Lett Appl Microbiol* **42**(4): 375-380.

Orellana, C. A., E. Marcellin, B. L. Schulz, A. S. Nouwens, P. P. Gray and L. K. Nielsen (2015). "High-antibody-producing Chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis." *J Proteome Res* **14**(2): 609-618.

Paget, M. S., J. G. Kang, J. H. Roe and M. J. Buttner (1998). "sigmaR, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *EMBO J* **17**(19): 5776-5782.

Pitterle, D. M., J. L. Johnson and K. V. Rajagopalan (1993). "In vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z using purified converting factor. Role of protein-bound sulfur in formation of the dithiolene." *J Biol Chem* **268**(18): 13506-13509.

Pryor, E. E., Jr., P. S. Horanyi, K. M. Clark, N. Fedoriw, S. M. Connelly, M. Koszelak-Rosenblum, G. Zhu, M. G. Malkowski, M. C. Wiener and M. E. Dumont (2013). "Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p." *Science* **339**(6127): 1600-1604.

Ramos, I., S. Guzman, L. Escalante, I. Imriskova, R. Rodriguez-Sanoja, S. Sanchez and E. Langley (2004). "Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*." *Res Microbiol* **155**(4): 267-274.

Rawlings, N. D., A. J. Barrett and R. Finn (2016). "Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors." *Nucleic Acids Res* **44**(D1): D343-350.

Segura, D., R. González, R. Rodríguez, T. Sandoval, L. Escalante and S. S. (1996). "*Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism." *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **4**(1): 30-36.

Seno, E. T. and K. F. Chater (1983). "Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Gen Microbiol **129**(5): 1403-1413.

Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.

Smyth, G. K. (2005). *limma: Linear Models for Microarray Data*. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. R. Gentleman, V. J. Carey, W. Huber, R. A. Irizarry and S. Dudoit. New York, NY, Springer New York: 397-420.

Sola-Landa, A., A. Rodriguez-Garcia, E. Franco-Dominguez and J. F. Martin (2005). "Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes." Mol Microbiol **56**(5): 1373-1385.

Takano, E., R. Chakraborty, T. Nihira, Y. Yamada and M. J. Bibb (2001). "A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **41**(5): 1015-1028.

Takano, E., M. Tao, F. Long, M. J. Bibb, L. Wang, W. Li, M. J. Buttner, M. J. Bibb, Z. X. Deng and K. F. Chater (2003). "A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*." Mol Microbiol **50**(2): 475-486.

Tanaka, A., Y. Takano, Y. Ohnishi and S. Horinouchi (2007). "AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARP." J Mol Biol **369**(2): 322-333.

Tierrafría, V. H., L. C. Cuauhtemoc, M. C. Nidia, R. R. Alba, C. L. Sara, M. Esteban, R. S. Romina, B. Ruiz-Villafan, N. L. K and S. Sergio (2016). "Deletion of the hypothetical protein SCO2127 of *Streptomyces coelicolor* allowed identification of a new regulator of actinorhodin production." Appl Microbiol Biotechnol **100**(21): 9229-9237.

Turatsinze, J. V., M. Thomas-Chollier, M. Defrance and J. van Helden (2008). "Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules." Nat Protoc **3**(10): 1578-1588.

Urem, M., T. van Rossum, G. Bucca, G. F. Moolenaar, E. Laing, M. A. Swiatek-Polatynska, J. Willemse, E. Tenconi, S. Rigali, N. Goosen, C. P. Smith and G. P. van Wezel (2016). "OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the Dormancy Regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* Control Overlapping Regulons." mSystems **1**(3).

van Wezel, G. P., M. Konig, K. Mahr, H. Nothaft, A. W. Thomae, M. Bibb and F. Titgemeyer (2007). "A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *streptomyces coelicolor* A3(2)." J Mol Microbiol Biotechnol **12**(1-2): 67-74.

van Wezel, G. P., K. Mahr, M. Konig, B. A. Traag, E. F. Pimentel-Schmitt, A. Willimek and F. Titgemeyer (2005). "GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **55**(2): 624-636.

Wallace, G. I. and S. L. Neave (1927). "The Nitrite Test as Applied to Bacterial Cultures." J Bacteriol **14**(6): 377-384.

White, J. and M. Bibb (1997). "bldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade." J Bacteriol **179**(3): 627-633.

Yamazaki, M., L. Thorne, M. Mikolajczak, R. W. Armentrout and T. J. Pollock (1996). "Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88." J Bacteriol **178**(9): 2676-2687.

Yang, Y. H., E. Song, J. N. Kim, B. R. Lee, E. J. Kim, S. H. Park, W. S. Kim, H. Y. Park, J. M. Jeon, T. Rajesh, Y. G. Kim and B. G. Kim (2012). "Characterization of a new ScbR-like gamma-butyrolactone binding regulator (SlbR) in *Streptomyces coelicolor*." Appl Microbiol Biotechnol **96**(1): 113-121.

Información Suplementaria

Tabla S1 Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante $\Delta sco2I27$ y la cepa M145, en función de los procesos biológicos en los cuales participan

GO biological process complete	SCO (REF) a	# b	expected c	over/under	Fold Enrichment	raw P-value	FDR d
glutamate metabolic process (GO:0006536)	16	5	.57	+	8.72	6.17E-04	3.40E-02
carboxylic acid metabolic process (GO:0019752)	354	27	12.68	+	2.13	4.26E-04	2.42E-02
oxoacid metabolic process (GO:0043436)	369	29	13.22	+	2.19	1.83E-04	1.32E-02
organic acid metabolic process (GO:0006082)	373	29	13.36	+	2.17	1.95E-04	1.36E-02
small molecule metabolic process (GO:0044281)	637	53	22.82	+	2.32	2.18E-08	4.10E-05
dicarboxylic acid metabolic process (GO:0043648)	61	9	2.19	+	4.12	6.38E-04	3.42E-02
peptide transport (GO:0015833)	52	9	1.86	+	4.83	2.23E-04	1.50E-02
amide transport (GO:0042886)	53	9	1.90	+	4.74	2.53E-04	1.53E-02
oxidation-reduction process (GO:0055114)	727	57	26.05	+	2.19	4.48E-08	4.21E-05
Unclassified (UNCLASSIFIED)	4143	115	148.44	-	.77	1.17E-04	1.57E-02
regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)	769	10	27.55	-	.36	1.77E-04	1.44E-02
regulation of cellular macromolecule biosynthetic process (GO:2000112)	777	10	27.84	-	.36	1.27E-04	1.19E-02
regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031326)	783	10	28.05	-	.36	9.22E-05	1.73E-02
regulation of biosynthetic process (GO:0009889)	783	10	28.05	-	.36	9.22E-05	1.92E-02
regulation of metabolic process (GO:0019222)	791	11	28.34	-	.39	2.27E-04	1.47E-02
regulation of biological process (GO:0050789)	949	16	34.00	-	.47	6.76E-04	3.34E-02
regulation of cellular metabolic process (GO:0031323)	790	11	28.31	-	.39	2.27E-04	1.42E-02
regulation of cellular process (GO:0050794)	948	16	33.97	-	.47	6.73E-04	3.41E-02
regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)	783	10	28.05	-	.36	9.22E-05	2.16E-02
regulation of macromolecule metabolic process (GO:0060255)	789	10	28.27	-	.35	9.22E-05	1.44E-02
regulation of gene expression (GO:0010468)	777	10	27.84	-	.36	1.27E-04	1.13E-02
regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903506)	775	10	27.77	-	.36	1.26E-04	1.39E-02

GO biological process complete	SCO (REF) a	# b	expected c	over/under	Fold Enrichment	raw P-value	FDR d
regulation of RNA biosynthetic process (GO:2001141)	775	10	27.77	-	.36	1.26E-04	1.25E-02
regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	775	10	27.77	-	.36	1.26E-04	1.32E-02
regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)	778	10	27.88	-	.36	1.27E-04	1.09E-02
regulation of primary metabolic process (GO:0080090)	789	10	28.27	-	.35	9.22E-05	1.33E-02
regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171)	789	10	28.27	-	.35	9.22E-05	1.57E-02
transcription, DNA-templated (GO:0006351)	641	7	22.97	-	.30	1.80E-04	1.35E-02
cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645)	852	9	30.53	-	.29	4.58E-06	2.15E-03
macromolecule biosynthetic process (GO:0009059)	865	11	30.99	-	.35	3.44E-05	9.23E-03
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	1467	25	52.56	-	.48	1.01E-05	3.80E-03
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	1218	15	43.64	-	.34	2.86E-07	1.79E-04
nucleic acid-templated transcription (GO:0097659)	641	7	22.97	-	.30	1.80E-04	1.41E-02
RNA biosynthetic process (GO:0032774)	647	7	23.18	-	.30	1.25E-04	1.47E-02
RNA metabolic process (GO:0016070)	768	11	27.52	-	.40	4.17E-04	2.44E-02
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	918	12	32.89	-	.36	3.44E-05	1.08E-02
gene expression (GO:0010467)	826	13	29.60	-	.44	6.55E-04	3.42E-02

^a Lista de referencia de las proteínas codificadas por *S. coelicolor* A3(2). Esta cepa incluye los plásmidos SCP1 y SCP2.

^b Proteínas expresadas diferencialmente que pertenecen al proceso indicado.

^c Fracción de proteínas que se esperaba que estuvieran relacionadas con el proceso indicado, con base en total de proteínas codificadas por *S. coelicolor* (ver a).

^d En la tabla solo se muestran los resultados con FDR < 0.05.

Tabla S2 Perfil de expresión de las proteínas cuya expresión pudo haber sido controlada por el regulador de respuesta Sco0204 en la mutante Δ sco2127

Proteína	Expresión relativa		UT ¹	Sitio ²	Cadena ³	Posición ⁴		Sig ⁵	Rank ⁶		
	Exp	Est				Inicio	Fin				
SCO0167	0	-2.09	SCO0167	GGGCCGGTTCGGCCCACC	R	-156	-140	5.132	1		
				GGGCCGACCGGCCCCAGC	D	-153	-137			5.132	2
				GGGCCGAAGGTCCCTCG	D	-112	-96			4.448	3
				AGGCCGGTTCGGCCCTTC	R	-392	-376			4.125	4
				AGGCCGGGGGGGCCCATG	R	-201	-185			4.053	5
SCO0179	4.26	6.53	SCO0179	GGGCCGACCGGCCCAAG	D	-150	-134	4.891	1		
				GGGCCGGTTCGGCCCCC	R	-153	-137	4.708	2		
SCO0200	0	1.99	SCO0200 , SCO0199, SCO0198	GGGACGGTTCGGCCCCGT	D	-98	-82	4.708	1		
SCO0204	3.36	2.5	SCO0204	GGGCCGACCGTCCCTGC	R	-101	-85	4.659	2		
				GGGCCGACCGGCCCTGG	D	-79	-63	5.912	1		
SCO0216	4.16	2.83	SCO0216 , SCO0217 , SCO0218, SCO0219	GGGCCGACCGGCCCTGC	R	-82	-66	5.625	2		
				GGGCCGAAGGTCCCTGC	R	-55	-39	4.361	1		
SCO0217	0	2.81									
SCO0975	0	-2	SCO0975	TGTCCGTGGTGCCCTGT	R	-41	-25	4.489	1		
				GCGACGTGCGTCCCGGC	D	-116	-100	3.979	2		
SCO1074	0	1.35	SCO1074	GGGCCGATCCTCCCACA	R	-68	-52	4.125	1		
SCO1796	2.47	-1.56	SCO1796	AGGCCGTTTCGGCCCACT	R	-163	-147	5.912	1		
SCO2614	0	-1.76	SCO2614 , SCO2613	GGGCCGGGCGACCCACC	R	-335	-319	4.091	1		
SCO2903	0	-1.97	SCO2903	GGGCCGCCCCGGCCCTGT	D	-39	-23	5.336	1		
				GGGCCGGGCGGCCCGTG	R	-42	-26	4.448	2		
SCO5112	0	1.86	SCO5112	GGGCCGTGCTGCCCTC	D	-116	-100	4.053	1		
SCO5113	1.48	0	SCO5113	GCGCCGCTCAGCCCGGC	D	-71	-55	4.125	1		
SCO5262	0	-1.3	SCO5262	GCGCCGGCCGCGCTGG	D	-222	-206	4.202	1		
SCO5971	-1.47	0	SCO5971	GGGCCGCGGGGCCCCCGG	R	-76	-60	4.361	1		

¹ Unidades transcripcionales a las que pertenecen las proteínas expresadas diferencialmente. Los genes que codifican para dichas proteínas se indican en negritas.

² Posible(s) sitio(s) de unión del regulador de respuesta Sco0204 en la región regulatoria de la UT indicada.

³ Cadena de DNA donde se localizan los posibles sitios de unión. Cadena positiva (D); cadena negativa (R).

⁴ Posición de la secuencia identificada con respecto al codón de inicio del primer gen de la UT indicada.

⁵ Grado de similitud del sitio indicado, con la secuencia consenso generada a partir del alineamiento de las regiones regulatorias de los ortólogos del gen *sco0204* de *S. coelicolor* en otras actinobacterias (ver Materiales y Métodos). Dicha similitud está definida como $\text{sig} = -\log(\text{P value})$.

⁶ Orden de las secuencias encontradas en cada región, de acuerdo a su grado de similitud con la secuencia consenso.