



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL
sco3986 SOBRE EL PROCESO DE REPRESIÓN CATABÓLICA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BERENICE HERNÁNDEZ CORDERO

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. José Guillermo Aguilar Osorio
Facultad de Química**

**Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Instituto de Biotecnología**

Ciudad de México. Noviembre, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Dr. Ruíz Terán Francisco	Presidente
Dra. Farrés González-Sarabia Amelia María de Guadalupe	Vocal
Dr. Segura González Daniel Genaro	Vocal
Dra. Romero Rodríguez Alba Icxih	Vocal
Dra. Rodríguez Sanoja Romina	Secretario

La presente tesis se desarrolló bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA (proyecto PAPIIT IN205519), así como al CONACYT (proyecto A1-S-9143: CY009143) por el financiamiento del trabajo de maestría.

Al CONACYT por la beca (847874) otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por permitirme ser parte de su laboratorio, su ayuda incondicional, sus enseñanzas y su confianza en mí.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por todas sus enseñanzas, asesorías en el proyecto, apoyo y sobre todo su amistad.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Guillermo Aguilar Osorio y Dr. Guillermo Gosset Lagarda por sus comentarios y aportaciones sobre el proyecto.

Al Dr. Daniel Guillén por sus asesorías y enseñanzas en los análisis de qPCR.

A los miembros de mi jurado, Dr. Ruíz Terán Francisco, Dra. Farrés González Sarabia Amelia María de Guadalupe, Dr. Segura González Daniel Genaro, Dra. Rodríguez Sanoja Romina y Dra. Romero Rodríguez Alba Ixciuh por sus observaciones y valiosas aportaciones.

A la maestra en ciencias Monserrat Manzo por su apoyo, enseñanzas y amistad.

¡A ti, por leer esto!

DEDICATORIAS

A mis padres por su valentía y fortaleza. Con gratitud y amor esto es para ustedes.

לחנוך האהוב שלי, על שהחליט להחזיק את ידי וללמד אותי יום יום כמה אני יכול להיות מאושרת ואהובה.

אני אוהבת אותך עם כל מה שאני.

חנוך: גם אני

A mis hermanos Fani, Hugo y Diego porque me inspiran a seguir adelante, los amo.

A mi otra familia, Enoc papá, Mary, Eli y Sel. Gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio, Charli sapiens (tu si sapiens, gracias por tu ayuda, por cada risa y reclamo), Rodri (la glkA nos separó, aun así, gracias por todo), Emiliano (mi hermanito), Fer (ya no me gustan otros helados), Dulcesita (B E R E N I C E), Susi (hermanita), One (fiero tu modo), Luisa (le ganamos al maravilloso de Víctor), Ximenita (enemigas de tarja), Almita, Armandito (no estoy enojada), Val (brillaremos por siempre con los delineadores), Ros, Karencita, Gladys (bien levanta cresta), Thalía, Dr. Fernando (gracias por los dulces), todos hicieron muy feliz mi estancia en el laboratorio.

לך, למען חסדך ואהבתך

ÍNDICE

1.	ÍNDICE DE TABLAS.....	2
2.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
3.	RESUMEN	4
4.	MARCO TEÓRICO	6
4.1	EL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	6
4.2	REGULACIÓN POR CARBONO EN <i>STREPTOMYCES</i>	7
4.3	REGULADORES TRANSCRIPCIONALES EN <i>STREPTOMYCES</i> IMPLICADOS EN EL METABOLISMO SECUNDARIO Y DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA.	12
4.4	NUEVOS REGULADORES TRANSCRIPCIONALES INFLUENCIADOS POR GLUCOSA Y GLK _A EN <i>S. COELICOLOR</i>	14
5.	JUSTIFICACIÓN.....	16
6.	HIPÓTESIS	16
7.	OBJETIVO.....	17
7.1	OBJETIVOS PARTICULARES	17
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
9.	METODOLOGÍAS	19
9.1	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	19
9.2	MODELADO DE LA PROTEÍNA SCO3986	19
9.3	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	19
9.3.1	<i>Predicción de firmas y genes blanco.....</i>	<i>19</i>
9.4	OBTENCIÓN DE LA CEPA MUTANTE	21
9.4.1	<i>Construcción de la cepa carente de sco3986.....</i>	<i>21</i>
9.5	CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA MUTANTE.	23
9.5.1	<i>Crecimiento.....</i>	<i>23</i>
9.5.2	<i>Consumo de glucosa.....</i>	<i>23</i>
9.5.3	<i>Obtención del extracto intracelular y medición de actividad de ATP-Glk.....</i>	<i>23</i>
9.5.4	<i>Cuantificación de antibióticos.....</i>	<i>24</i>
9.5.5	<i>Expresión de genes seleccionados.....</i>	<i>24</i>
9.5.6	<i>Pruebas estadísticas</i>	<i>26</i>
10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
10.1	MODELADO DE LA PROTEÍNA SCO3986.	27
10.2	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	30
10.3	OBTENCIÓN DE LA CEPA MUTANTE	33
10.4	CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA MUTANTE	35
11.	CONCLUSIONES	42
12.	PERSPECTIVAS	43
13.	REFERENCIAS.....	44
14.	APÉNDICE 1	54
15.	APÉNDICE 2	57

1. ÍNDICE DE TABLAS

Nombre de tabla	Página
Tabla 1. Posibles genes blanco de sco3986.	31

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Nombre de figura	Página
Figura 1. Diagrama del ciclo de vida y diferenciación morfológica de <i>Streptomyces</i> .	6
Figura 2. Modelo para RCC en <i>S. coelicolor</i> durante crecimiento exponencial.	10
Figura 3. Modelo de los efectos de la glucosa y Glk sobre el metabolismo de <i>S. coelicolor</i> .	11
Figura 4. Modelo sobre la función de la ATP-Glk.	12
Figura 5. Modelo del efecto regulador de SCO3264.	14
Figura 6. Construcción del plásmido TOPOsco3986::aac(3)IV.	22
Figura 7. Modelo preliminar de la proteína SCO3986.	28
Figura 8. Evaluación del modelo preliminar SCO3986	29
Figura 9. Diagrama de la firma preliminar del regulador SCO3986 con mayor número de genes blanco y con el menor E-value: 4.0 e-10.	30
Figura 10. Posibles funciones de los genes blanco de SCO3986.	31
Figura 11. A) Plásmido TOPOsco3986::aac(3)IV. B) Digestión del plásmido TOPOsco3986::aac(3)IV,	34
Figura 12. PCR para la comprobación de la cepa mutante Δ sco3986.	35
Figura 13. Comparación del crecimiento de <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> Δ sco3986 en medio NMMP complementado con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado 0.5%.	36
Figura 14. A) Consumo de glucosa <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> Δ sco3986 en medio NMMP, B) Actividad de ATP-Glk de <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> Δ sco3986 en medio NMMP. C) Cuantificación relativa normalizada de los genes <i>glkA</i> y <i>dagA</i> a las 18 h	37
Figura 15. Producción de antibióticos, expresión de genes y fenotipo de las cepas evaluadas.	40
Figura 16. Modelo propuesto del efecto regulador de SCO3986.	41

3. RESUMEN

El proceso que controla el transporte y utilización de fuentes de carbono se conoce como represión catabólica por carbono (RCC), y garantiza que cuando se dispone de una fuente primaria de carbono como la glucosa, se reprima la utilización de fuentes secundarias de carbono, incluso si estas fuentes de carbono están presentes en cantidades significativas. La RCC es un proceso de regulación complejo en el género *Streptomyces*, en el cual se encuentran implicados procesos como la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios. La RCC en *Streptomyces* ha sido objeto de estudios durante muchos años, lo que se tiene claro hasta el momento es que la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) tiene un papel en este mecanismo (Angell *et al.*, 1992; Angell *et al.*, 1994; Kwakman y Postma, 1994).

Estudios recientes proponen que la RCC puede tener un componente dependiente de ATP-Glk y otro independiente de ella. En el caso de la ATP-Glk, se ha observado que carece de dominios a unión a DNA, por lo que se plantea que debería actuar en conjunto con reguladores transcripcionales para ejercer su regulación (Gubbens *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2016a; van Wezel *et al.*, 2007). En este sentido, en un análisis transcriptómico en el que se comparó la cepa de *Streptomyces coelicolor* con una cepa nula de GlkA y en su lugar tenía la Glk de *Zymomonas mobilis*, se identificaron nueve reguladores transcripcionales dependientes de ATP-Glk (Romero *et al.*, 2016a). De estos, destaca el regulador *sco3986*, que pertenece a la familia de reguladores tipo GntR implicados en procesos como diferenciación morfológica, producción y resistencia a antibióticos, metabolismo de carbono, entre otros. Estudiar este regulador permitirá entender la red de regulación que se encuentra alrededor de la ATP-Glk.

En este estudio, se realizó un análisis bioinformático para determinar la secuencia consenso y los posibles genes blanco del regulador transcripcional SCO3986. Posteriormente, se cuantificó la producción de biomasa, antibióticos, consumo de glucosa, actividad de GlkA y la expresión de los posibles genes blanco. La eliminación de SCO3986 en *S. coelicolor* tuvo un efecto negativo sobre de la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina. Por otro lado, hubo un incremento en la actividad de ATP-Glk sin cambios en el consumo de glucosa. Finalmente, se determinó que SCO3986 actúa como activador a nivel transcripcional de los genes *sco1701* (posible acil-CoA deshidrogenasa), *sco1939* (6-fosfogluconolactonasa) y a los reguladores específicos ACTII, regulador de la

producción de actinorrodina, RedD y RedZ, reguladores de la producción de undecilprodigiosina).

4. MARCO TEÓRICO

4.1 El género *Streptomyces*

Las bacterias del género *Streptomyces*, son bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC que pertenecen al filo Actinobacteria. La mayoría de los *Streptomyces* viven como saprófitos en el suelo, aunque también habitan con éxito una amplia gama de otros nichos, tanto terrestres como acuáticos, y algunas cepas son patógenos vegetales y animales (Flärdh y Buttner 2009, Barka et al., 2015).

Streptomyces posee un ciclo de vida complejo que le permite crecer en diversos nichos. En condiciones ambientales de nutrientes favorables, las esporas de los *Streptomyces* germinan dando lugar a la formación del micelio vegetativo, mismo que crece radialmente y con ramificaciones en su sustrato. A medida que el ambiente se vuelve desfavorable para el crecimiento (e.g., agotamiento de nutrientes), el micelio vegetativo se diferencia en micelio aéreo y durante este proceso se promueve la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios. Posteriormente el micelio aéreo se divide para formar esporas e iniciar de nuevo el ciclo (Figura 1) (Ser et al., 2017).

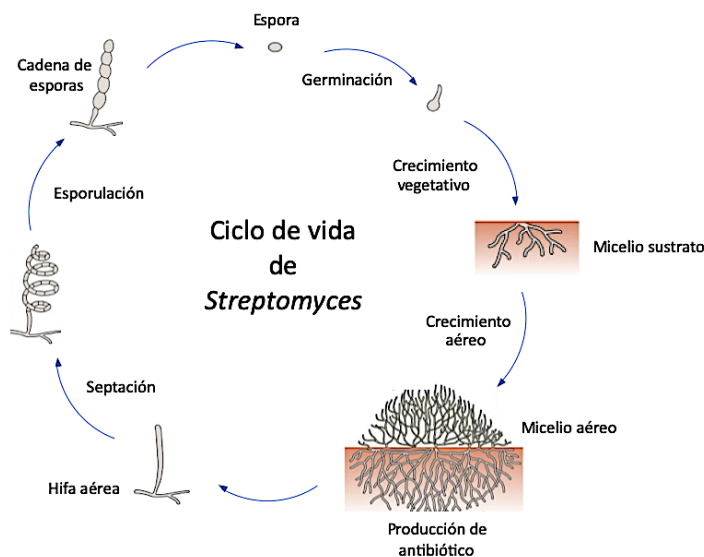


Figura 1. Diagrama del ciclo de vida y diferenciación morfológica de *Streptomyces*.

Adaptado (Barka et al., 2015)

Una característica importante de las bacterias del género *Streptomyces* es su capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios que tienen un impacto positivo en

nuestras sociedades. Estas bacterias son parte de los principales microorganismos productores de antibióticos y otras moléculas bioactivas, tales como antitumorales (e. g., doxorubicina), inmunosupresores (e. g., rapamicina), antifúngicos (e. g., anfotericina B), antihelmínticos (e. g., ivermectina); además, producen una amplia gama de enzimas como celulasas, proteasas, amilasas, lipasas, entre otras (Demain, 2014).

Streptomyces coelicolor es el organismo modelo del género debido al conocimiento adquirido sobre su fisiología y las bases bioquímicas y moleculares que la sustentan. Tiene un solo cromosoma lineal con un tamaño de 8.66 Mb y un contenido de GC del 72.1%, con 7769 genes y 56 pseudogenes (Bentley et al., 2002). De los antibióticos producidos por este microorganismo en condiciones de laboratorio están incluidos la actinorrodina (ACT), la undecilprodigiosina (RED), un antibiótico dependiente del calcio (CDA) y la metilenomicina (Mmy) (Barka et al., 2015). Sin embargo, cuando se publicó la secuencia del genoma de *S. coelicolor* (Bentley et al., 2002), se hizo evidente que el verdadero potencial de esta especie se había subestimado ya que se identificaron más de 20 grupos de genes biosintéticos para la producción de otros metabolitos secundarios (Challis y Hopwood, 2003).

El metabolismo secundario puede generarse en respuesta a condiciones ambientales, por tanto, a menudo es desencadenado por el agotamiento de un nutriente, la adición de un inductor y / o por una disminución en la tasa de crecimiento (Bibb et al., 2005). La regulación por nutrientes (fuente de nitrógeno, fósforo y carbono) ha sido objeto de estudio continuo, debido a su efecto positivo o negativo sobre la producción de metabolitos secundarios. La fuente de carbono generalmente incide de forma negativa en su producción, por ejemplo, en *Streptomyces*, donde la glucosa suele ser la fuente de carbono preferida para el crecimiento, en altas concentraciones interfiere con la formación de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica (Demain, 1989; Demain, 1998; Demain y Fang, 1995; Ruiz-Villafán et al., 2021).

4.2 Regulación por carbono en *Streptomyces*

Los *Streptomyces* poseen la maquinaria biosintética para transportar, metabolizar y utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. Cuando simultáneamente se encuentran en el medio de cultivo más de una fuente de carbono, este género cuenta con mecanismos reguladores que permiten el uso secuencial y ordenado de cada una de ellas. Al mecanismo que regula la expresión de genes implicados en la captación y utilización de fuentes de

carbono alternativas cuando más de un sustrato utilizable está presente en el medio ambiente se le conoce como represión catabólica por carbono (RCC) (Hodgson, 2000; Romero et al., 2017). De esta forma, mientras que la célula utiliza enzimas específicas para catabolizar las fuentes de carbono fácilmente asimilables, las enzimas implicadas en la utilización de otros sustratos son reprimidas hasta que se agota el sustrato primario, y es en ese momento cuando se empieza a utilizar la fuente alterna (Romero et al., 2017). Además, la RCC es un mecanismo importante para la competencia entre microorganismos en ambientes naturales, ya que la selección de fuentes de carbono preferidas es un factor determinante en la tasa de crecimiento microbiano y, por lo tanto, apoya la competencia exitosa con otros microorganismos (Görke y Stülke, 2008).

El mecanismo de RCC muestra diferencias sustanciales según el tipo de bacteria que se considere (Romero et al., 2017). El sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) se encuentra involucrado en el mecanismo de RCC descrito en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* respectivamente. Dicho mecanismo, afecta el metabolismo del carbono, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y patogenicidad. (Stülke y Hillen 1998; Görke y Stülke, 2008).

En el caso de *S. coelicolor* los genes que codifican las fosfotransferasas generales del sistema PTS EI (*pstI*), IIACrr (*crr*) y HPr (*pstH*), así como las permeasas NagE1 y NagE2, son inducidas por N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Kamionka et al., 2002; Nothaft et al., 2003a, 2003b; Sánchez et al., 2010; Butler et al., 1999). En condiciones ricas en nutrientes, la acumulación de GlcNAc promueve el crecimiento y bloquea los procesos de desarrollo, mientras que en condiciones bajas en nutrientes favorece el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios (Rigali et al., 2008). Sin embargo, la ausencia de HPr (*pstH*) no afecta la RCC por glucosa, y el sistema PTS solo responde a la presencia de fructosa y GlcNAc (Kamionka et al., 2002). La RCC en *Streptomyces* afecta tres funciones fundamentales: la utilización de diversas fuentes de carbono, la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios (Romero et al., 2017, Lui et al., 2013).

Los primeros estudios para caracterizar la RC por glucosa se hicieron en mutantes de *S. coelicolor* que eran resistentes a 2-desoxi-D-glucosa (Dog), un análogo tóxico de la glucosa. Las mutantes mostraron un decremento en la sensibilidad a represión por varias fuentes de carbono, incluyendo la glucosa, además, se observó que había una reducción en la

actividad de glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) (Hodgson, 1982). Posteriormente, se realizó la complementación de mutantes *glkA*⁻ de *S. coelicolor* con el gen *glk* de la bacteria Gram-negativa *Zymomonas mobilis*. Este gen fue capaz de restablecer la utilización de la glucosa y la actividad de ATP-Glk, pero no la sensibilidad a RCC, lo cual sugirió un papel dual de la enzima GlkA, uno catalítico y otro regulador (Angell et al., 1994). En ese mismo año, se demostró que la RCC debida a la presencia de fuentes de carbono que no se catabolizan vía glucólisis se elimina en ausencia de ATP-Glk, lo que sugiere que esta enzima podría tener un papel más global en la regulación por RCC y que la represión no está influenciada por el flujo metabólico que genera la ATP-Glk (Kwakman y Postma, 1994).

Resultados similares se obtuvieron en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Se observó que mutantes capaces de crecer en presencia de Dog (Dog^R) y que eran resistentes a RCC, conservaban la capacidad para usar glucosa y presentaban baja actividad de ATP-Glk (Segura et al., 1997). A partir de una de esas mutantes Dog^R se aislaron nuevas mutantes, ahora sensibles a Dog (Dog^S). Algunas de estas mutantes recuperaron casi el 100% de actividad de ATP-Glk, pero seguían siendo insensibles a RCC por glucosa. Lo anterior sugiere que al menos en esta cepa, la presencia de la ATP-Glk no es la única necesaria para ejercer la RCC (Ramos et al., 2004).

Las glucosa cinasas se han clasificado en dos familias no homólogas: HK y RK. Las proteínas en la familia HK son subclasificadas en tres grupos, HK, A y B. Las proteínas ROK incluyen a las glucosas cinasas del grupo B y proteínas con otras funciones (Kawai et al., 2005). La ATP-Glk de *S. coelicolor* pertenece a la familia ROK (del inglés repressor, open reading frames, kinase), la cual comprende cinasas bacterianas y reguladores como NagC de *E. coli* y XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer et al., 1994). La ATP-Glk, no contiene dominios de unión a DNA en el extremo N-terminal como ocurre con las proteínas represoras de la familia ROK, por tanto, no puede regular directamente la transcripción. Es aquí donde entra la pregunta de como es que la ATP-Glk puede llevar a cabo su papel regulador.

Gubbens y colaboradores en 2012, llevaron a cabo una correlación proteómica entre la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 y una mutante nula de *glkA* para comprender el efecto de GlkA en la RCC. Los autores identificaron vías de control de carbono dependientes e independientes de GlkA, además, observaron que la represión por glucosa es mucho más

compleja de lo previsto, lo que sugiere que GlkA no es el único factor responsable de la RCC. En la Figura 2 se explica el modelo propuesto por los autores.

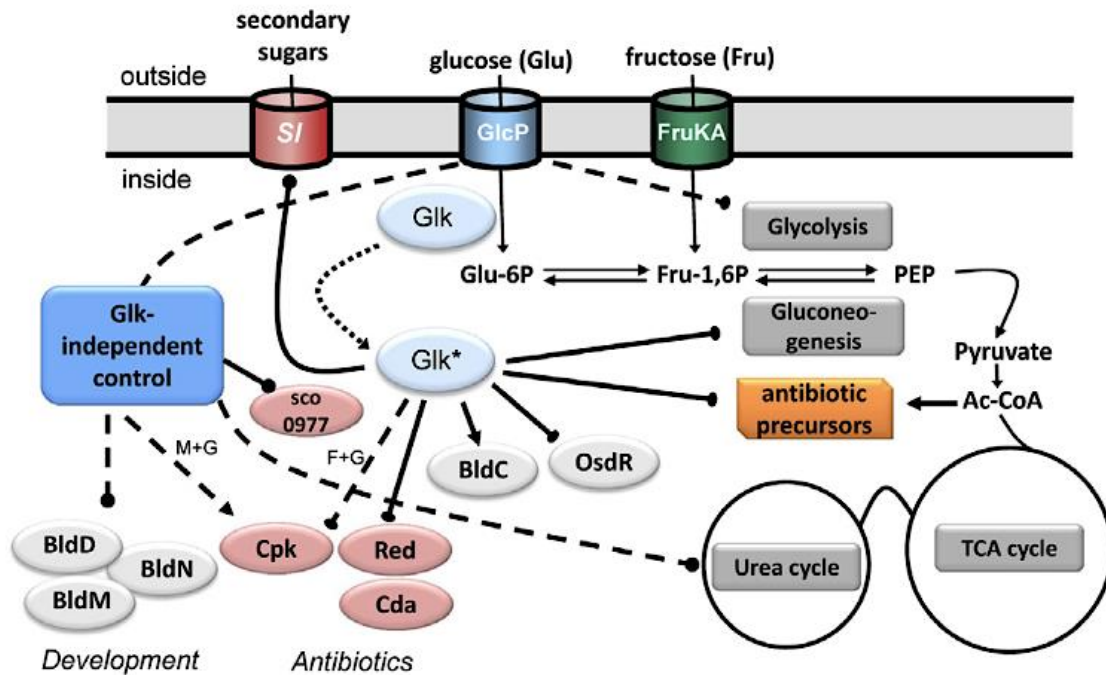


Figura 2. Modelo para RCC en *S. coelicolor* durante crecimiento exponencial. Se muestra la represión de la glucosa dependiente de GlkA (líneas continuas) e independiente de GlkA (líneas discontinuas) para las rutas metabólicas principales, el desarrollo y la producción de antibióticos. Las flechas indican activación, los círculos cerrados indican represión. Anteriormente se propuso que GlkA se activara postraduccionalmente (GlkA*) de una manera dependiente del transporte de glucosa (van Wezel et al., 2007). Cda, Cpk y Red se refieren a las proteínas biosintéticas para la producción de antibióticos dependientes de calcio, policétido críptico y undecilprodigiosina, respectivamente. La biosíntesis de Cpk se activa en glucosa + manitol y se reprime en glucosa + fructosa. BldC, BldD, BldM y BldN son reguladores de desarrollo temprano. SI, inducción de sustrato. PEP, fosfoenolpiruvato (Gubbens et al., 2012).

Para separar los efectos de GlkA y glucosa, Romero y colaboradores en 2016, estudiaron la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 y una mutante nula de *glkA* ($\Delta glkA$) complementado con el gen *glk* de *Z. mobilis*. La cepa de tipo salvaje se cultivó en glucosa (condiciones represoras), y su transcriptoma se comparó con esta misma cepa cultivada en agar como única fuente de carbono (condiciones no represoras). Estos autores también compararon el transcriptoma de la cepa *S. coelicolor* M145 con el de la cepa $\Delta glkA$ cultivada en glucosa. Aquí, la presencia de glucosa pudo regular 32 reguladores transcripcionales y cuatro sistemas de dos componentes, y la presencia de *glkA* pudo regular 9 reguladores

transcripcionales. Por lo tanto, en este estudio se pudo determinar que, si bien la GlkA juega un papel en la RCC, la glucosa también afecta significativamente este mecanismo. En la Figura 3 se ilustra el modelo del efecto de la glucosa y GlkA (Romero et al., 2016a).

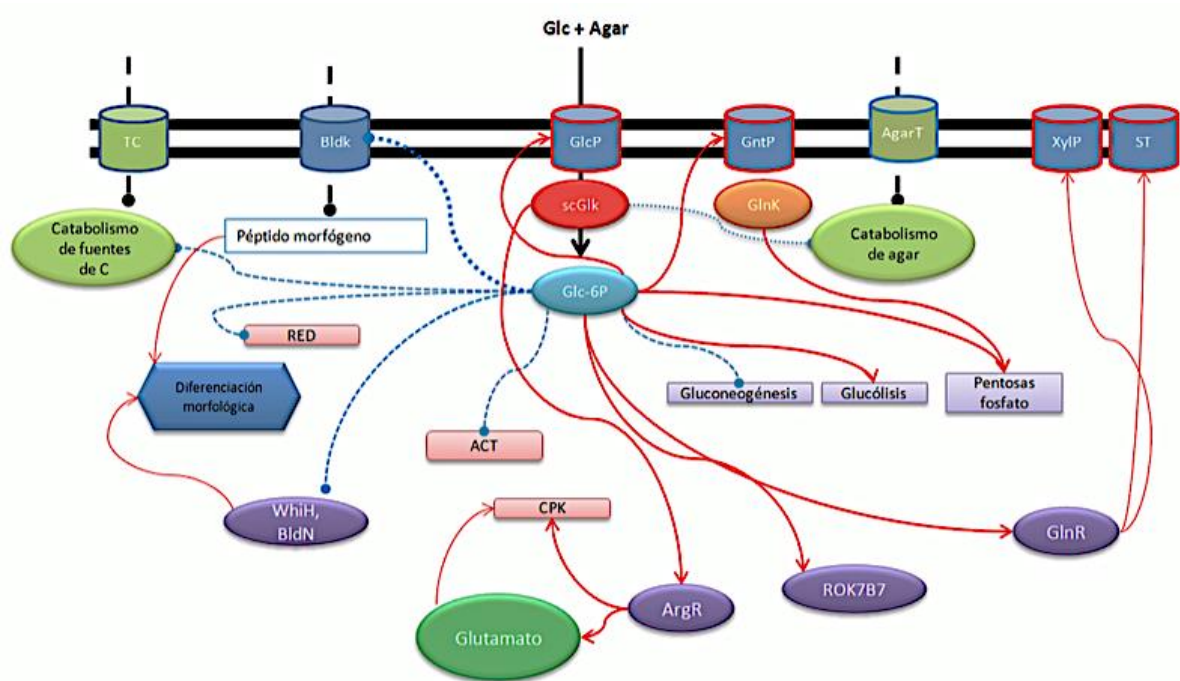


Figura 3. Modelo de los efectos de la glucosa y Glk sobre el metabolismo de *S. coelicolor*. En presencia de glucosa y una enzima GlkA (GlkA o Glkzm), el transportador de glucosa GlcP y el transportador de gluconato (GntP) son regulados positivamente, al igual que la glucólisis y la vía de pentosas fosfato, en tanto la gluconeogénesis es reprimida. En este mismo contexto, los transportadores para fuentes de carbono alternas (AgarT) y de otras fuentes de carbono (TC), así como las enzimas necesarias para su catabolismo son regulados negativamente. Sin embargo, en el caso del transportador y metabolismo de agar, la regulación negativa es dependiente de Glk. Respecto a la diferenciación morfológica en presencia de glucosa y Glk, el transportador Bldk es regulado negativamente así como los reguladores transcripcionales involucrados en la diferenciación morfológica (WhiH y BldN), deteniéndose la diferenciación morfológica. En presencia de glucosa e independiente de Glk existe una mayor transcripción de los reguladores transcripcionales Rok7B7 y GlnR. Posiblemente, GlnR se encuentre regulando positivamente la expresión del transportador de xilosa (XylP) y otros sistemas de transporte (ST). El regulador transcripcional ArgR, que depende de la presencia de la Glk para ser regulado positivamente, podría ser el responsable de los cambios observados en el metabolismo del glutamato y de la regulación positiva del metabolito secundario Cpk. Mientras Cpk es regulado positivamente, en presencia de glucosa y la enzima Glk, los antibióticos Act y Red son regulados negativamente en glucosa y de manera independiente a Glk. En el esquema las flechas rojas indican regulación positiva, mientras las flechas azules discontinuas, indican regulación negativa (Romero et al., 2016a).

La identificación de reguladores transcripcionales relacionados con la RCC (Romero et al., 2016a) es relevante debido a una hipótesis generada por van Wezel y colaboradores en 2007. Ellos evaluaron el papel de la ATP-Glk en la RCC y sugieren la necesidad de su unión con el transportador de glucosa GlcP para ejercer el efecto represor. El modelo propuesto con base en estudios proteómicos, sugiere que esta unión provoca un cambio conformacional en la ATP-Glk, permitiendo la comunicación con reguladores transcripcionales, los cuales son los efectores de la regulación. En la Figura 4 se explica el modelo propuesto por los autores.

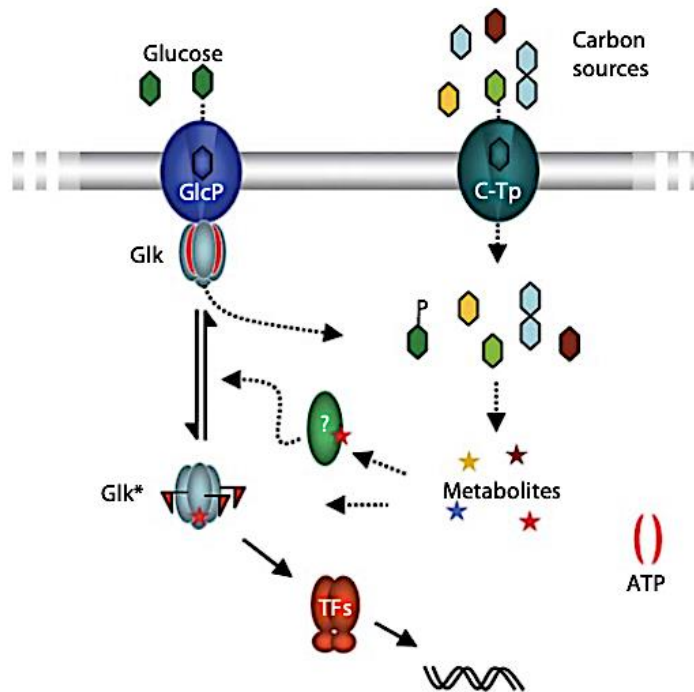


Figura 4. Modelo sobre la función de la ATP-Glk. Glk interactúa con GlcP en presencia de glucosa para convertir inmediatamente el azúcar entrante en Glc-6-fosfato. La glucosa y otras fuentes de carbono, que ingresan a la célula a través de permeasas específicas de carbohidratos (C-Tp), generan metabolitos durante el catabolismo. Estos desencadenan Glk (Glk*) y/o una proteína sensora de nutrientes desconocida que se requiere para la modificación postraduccional de Glk. Glk* interactúa con factores de transcripción (como MalR, GylR, BldB, etc.) para ejercer la represión de catabolitos de carbono (van wezel et al., 2007)

4.3 Reguladores transcripcionales en *Streptomyces* implicados en el metabolismo secundario y diferenciación morfológica.

La regulación al inicio de la transcripción es probablemente la respuesta más común para las adaptaciones metabólicas que ocurren en *Streptomyces*. Los principales actores en este

mecanismo son las proteínas denominadas reguladores transcripcionales (RT). Los RT son capaces de unirse al ADN para reprimir o activar la transcripción de genes específicos. Los RT en *Streptomyces* pueden estar implicados en metabolismo primario y secundario. En el metabolismo primario se incluyen aquellos RT involucrados en la transcripción de genes necesarios para las funciones básicas de las células, incluido el crecimiento, la reproducción, la comunicación, la utilización de nutrientes y los involucrados en las respuestas a las condiciones nutricionales. Para el metabolismo secundario se incluyen RT involucrados en la resistencia a xenobióticos, la producción de metabolitos secundarios y/o diferenciación morfológica, la regulación de las bombas de expulsión, la regulación de la homeostasis de los metales y la respuesta a los factores estresantes. Sin embargo, es bastante difícil establecer una distinción muy clara de las funciones biológicas de los RT debido al sesgo de investigación con respecto al estudio de los RT involucrados en el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, y también porque el metabolismo primario y secundario, así como los factores estresantes, parecen estar altamente interconectados en *Streptomyces* (Romero et al., 2015). Por ejemplo, en la RCC, en donde el metabolismo primario y el secundario se encuentran interconectados, los estudios sobre los RT han sido significativos para tratar de elucidar como se regula dicho mecanismo.

En *S. coelicolor* el regulador global DasR de la familia GntR controla los genes de transporte de GlcNAc, la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario (Rigali et al., 2006; Świątek et al., 2012). Sus dianas incluyen el gen regulador de antibióticos *actII-ORF4* (van Wezel y McDowall, 2011) y algunos genes relacionados con la síntesis de coelomicina y CDA (Świątek et al., 2015). El regulador Rok7B7 regula negativamente el operón adyacente *xyI/FGH* (operón de captación de xilosa) (Świątek et al., 2013; Lu et al., 2020), promueve la producción de ACT y suprime la biosíntesis de RED y CDA, probablemente por unión directa al promotor *actII-ORF4* y *redZ* (Park et al., 2009). Curiosamente, DasR y Rok7B7 reprimen la expresión de GlkA (Świątek et al., 2015) y GlkA reprime a Rok7B7. La ausencia de *rok7B7* provoca la pérdida de RCC, lo que lo involucra directamente en la RCC (Gubbens et al., 2012; Świątek et al., 2013; Romero et al., 2016a). Los RT específicos RedD y ActIIORF4, controlan la biosíntesis de undecilprodigiosina (RED) y actinorrodina (ACT) en *S. coelicolor*, respectivamente (Romero et al., 2015).

Pese a los esfuerzos realizados para caracterizar las funciones de los RT implicados en el metabolismo primario y secundario, el control antibiótico y morfológico en *Streptomyces*, los estudios siguen siendo insuficientes.

4.4 Nuevos reguladores transcripcionales influenciados por glucosa y GlkA en *S. coelicolor*.

Como se mencionó anteriormente, dentro de los reguladores transcripcionales identificados en el estudio transcriptómico hecho por Romero y colaboradores en 2016, se encontraron 9 dependientes de la enzima ATP-Glk: dos pertenecientes a la familia GntR *sco3264* y *sco3986*, un probable LuxR *sco4261*, el SARP *sco6288*, el represor de arginina ArgR (*sco1576*), y los probables MerR *sco3413*, *sco5025*, *sco7530*, *sco7698*. Adicionalmente, se encontraron 32 reguladores transcripcionales influenciados por la presencia de glucosa.

En un estudio preliminar hecho por Manzo en 2018, se realizó la búsqueda de la secuencia consenso para cada uno de los 9 regulador dependientes de ATP-Glk. A partir de esta secuencia se identificaron los posibles genes blanco de cada regulador. De este grupo destacaron dos reguladores por su alto número de genes blanco, relacionados con el metabolismo de carbono, *sco3264* y *sco3986* ambos de tipo GntR. Estos reguladores a nivel transcripcional estaban sobreexpresados en ausencia de *glkA*, y en presencia de *glkA*, *sco3264* no mostro expresión diferencial mientras que *sco3986* estaba reprimido.

En este sentido, en 2018, Manzo evaluó al regulador transcripcional tipo GntR SCO3264. Se encontró que *sco3264* tiene como posibles genes blanco a *glkA* y a *sco3986*. Al evaluar la cepa carente del gen *sco3264* (*S. coelicolor sco3264::aac(3)IV*), encontraron los resultados explicados en el modelo que se presenta a continuación (Figura 5).

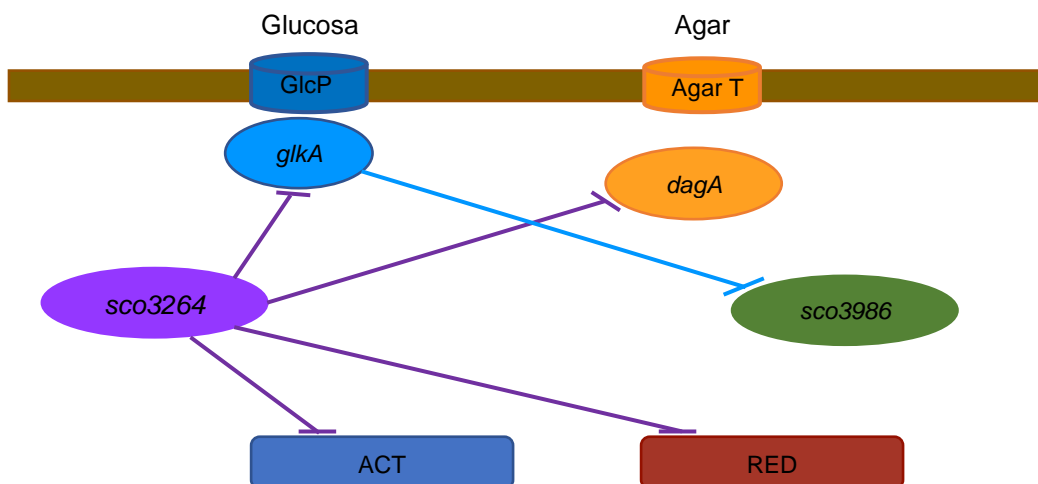


Figura 5. Modelo del efecto regulador de SCO3264. El regulador transcripcional SCO3264 actúa como un represor en la producción de antibióticos ACT y RED y del gen *dagA*, encargado de metabolizar el agar y que es susceptible a RCC. El gen *sco3986* se encontró reprimido, pero este efecto se debe a la represión ejercida por la *glkA* (Manzo, 2018). Las líneas representan efecto represor.

Es interesante que en este último análisis destaca la presencia de SCO3986, pues, como se mencionó, este regulador tiene un gran número de posibles genes blanco relacionados con el metabolismo de carbono, y su expresión depende de *glkA*. Adicionalmente, en la cepa carente de *glkA*, donde se sobreexpresa *sco3986*, disminuyó tanto la producción de undecilprodigiosina como la transcripción del *cluster* para el metabolito secundario coelimicina (Cpk), lo que podría sugerir un efecto represor sobre la producción de este antibiótico. Por tanto, sería importante estudiar a *sco3986* para conocer cuál es su efecto sobre la RCC, si tiene alguna relación con la GlkA o está implicado en el metabolismo secundario.

5. JUSTIFICACIÓN

La regulación por la fuente de carbono en los sistemas microbianos parece ser determinante en la competencia para sobrevivir en el medio ambiente natural. En *S. coelicolor* dicho mecanismo parece impactar no sólo la utilización secuencial de las fuentes de carbono sino, también directa o indirectamente, la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica. Pese a los estudios realizados a la fecha, el mecanismo preciso de la RCC se desconoce y parece depender, al menos en parte, de la enzima ATP-Glk.

Debido a que la enzima ATP-Glk en *S. coelicolor*, carece de sitios de unión al DNA, se considera que su posible participación en la RCC sea a través de interactuar con diversos reguladores transcripcionales.

En el análisis transcriptómico hecho por Romero-Rodríguez et al., 2016a, se detectaron nueve reguladores transcripcionales dependientes de la enzima ATP-Glk, de los cuales SCO3986, tiene una expresión baja en presencia de ATP-Glk, además, un gran número de posibles genes blanco relacionados con el metabolismo de carbono. Lo que indica que podría participar en el proceso de RCC.

Por tanto, el estudio de SCO3986 podría aportar información que contribuirá a entender la red de regulación que se encuentra alrededor de la RCC y el papel de ATP-Glk en sintonía con los reguladores transcripcionales.

6. HIPÓTESIS

Si *sco3986* es un regulador afectado por *glkA* y su sobreexpresión parece provocar una disminución de la producción de antibióticos, *sco3986* actuará como un represor de la producción de antibióticos.

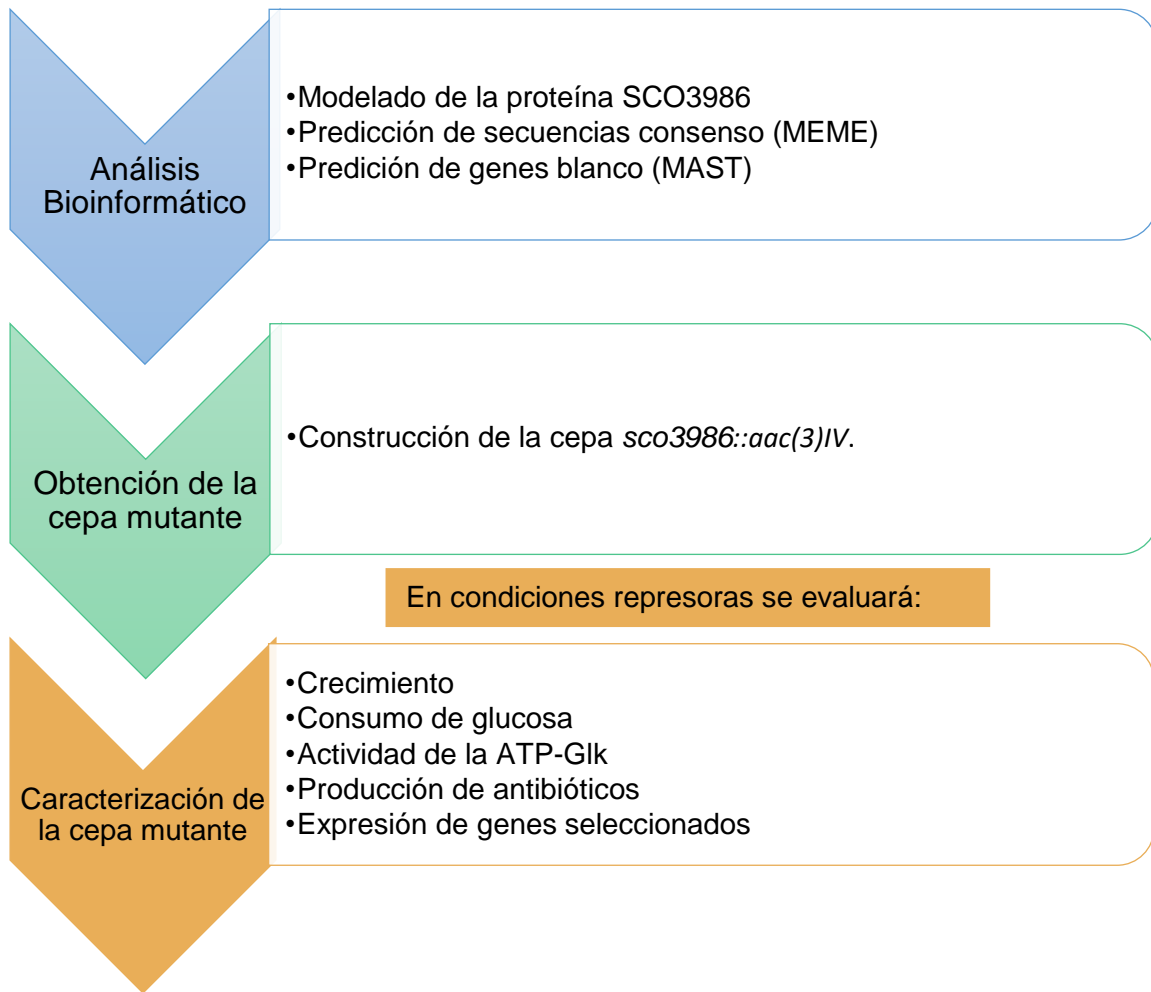
7. OBJETIVO

Evaluar la participación del regulador transcripcional SCO3986 en el mecanismo de RCC, el metabolismo secundario y su relación con la ATP-Glk en *S. coelicolor*.

7.1 Objetivos particulares

- Realizar un análisis *in silico* de *sco3986* para inferir sus posibles genes blanco.
- Construir la cepa mutante carente de *sco3986*.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. METODOLOGÍAS

9.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

S. coelicolor M145 fue proporcionado por el John Innes Centre (Norwich, UK). La cepa fue almacenada como una suspensión de esporas en glicerol al 20% a -20°C. El medio de esporulación utilizado fue MS (Apéndice 1).

Las cepas de *E. coli* DH5 α y *E. coli* JM110 se utilizaron para hacer las clonaciones y para la obtención de DNA no metilado, respectivamente. Dichas cepas se incubaron en medio Luria-Bertani (Apéndice 1) con agitación de 180 rpm a 37°C.

9.2 Modelado de la proteína SCO3986

Con el fin de verificar si SCO3986 tiene la estructura y aminoácidos conservados de los reguladores tipo GntR ya caracterizados, se procedió a realizar el modelo de la proteína SCO3986.

- Modelado de SCO3986 con el servidor Rosetta
En el servidor Rosetta se introdujo la secuencia completa de SCO3986 y se le dio la instrucción para generar seis mil modelos. Posteriormente, se hizo el cribado de las estructuras resultantes y se escogió la estructura con el mejor puntaje en Rosetta (Bender et al., 2016; Rohl et al., 2004).
- Verificación del modelo de la proteína SCO3986
Para verificar la calidad del modelo de la proteína, se hizo la validación de la estructura. Se utilizó, por tanto, el servidor Swiss-Model que ofrece una herramienta que evalúa la calidad global y local de la estructura de la proteína.

9.3 Análisis bioinformático

9.3.1 Predicción de firmas y genes blanco

Inicialmente, se buscaron 20 secuencias de genes ortólogos de SCO3986. El método utilizado para inferir los ortólogos fue el de mejores resultados recíprocos (reciprocal best hits, por sus siglas en inglés: RBH). Brevemente, RBH establece lo

siguiente: cuando 2 proteínas que están codificadas por 2 genes, cada una en un genoma diferente, se encuentran entre sí como la coincidencia de mejor puntaje entre todos los homólogos, por tanto, se consideran ortólogos (Hu y Friedberg, 2019). La búsqueda se hizo en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>), tomando la región -400 a +50, donde es probable que se encuentre la región promotora (Li et al., 2015), la búsqueda se limitó a organismos procariontes.

Para predecir el sitio de unión del regulador SCO3986 (firma) se partió de la premisa de que éste se autoregula (McCormick y Flårdh et al., 2012), es decir que se une a su propia secuencia reguladora. También se tomó en cuenta que su región promotora se encuentra dentro de los 400 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y 50 pb dentro de la secuencia codificadora del gen. La predicción de firmas fue realizada alimentando al programa MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (Bailey et al., 2009) con las 20 secuencias de los ortólogos. La búsqueda se limitó a firmas con una longitud máxima de 30 nucleótidos, usando los parámetros pre-establecidos por el programa, modo de descubrimiento del motivo: modelo clásico; tipo de secuencia: DNA; distribución de sitios en la secuencia: cero o una aparición; número de motivos presentados: tres; tamaño del motivo: mínimo seis nucleótidos, máximo: 30 nucleótidos; número de sitios que debe tener cada motivo: mínimo dos, máximo 600.

Para la predicción de genes blanco se utilizó el programa MAST (Motif Alignment & Search Tool) (Bailey et al., 1998). Para la búsqueda de genes blanco se utilizó una base de datos con las regiones -400 a +50 de todos los genes de *S. coelicolor*, y se consideraron como significativos solo aquellos alineamientos que presentaron un E-value menor a 10 y un p-value posicional menor a 0.0001, valores por debajo de estos números son suficientes para garantizar que se encuentre los motivos presentes en las secuencias de los genes (Bailey et al., 1998). Además, se tienen reportes que valores por debajo de estos valores, las predicciones son acertadas (Manzo, 2018; Studholme et al., 2004). Posteriormente, para cada regulador se obtuvieron dos grupos de posibles genes blanco correspondientes a las firmas palindrómica y no palindrómica. Se realizó una comparación entre las firmas de los reguladores transcripcionales y se escogió aquella firma con mayor número de genes blanco.

Finalmente, se clasificaron los genes blanco de acuerdo con su función, utilizando la anotación KEGG.

9.4 Obtención de la cepa mutante

9.4.1 Construcción de la cepa carente de *sco3986*

- Ensamble de Gibson

Para eliminar un gen en *Streptomyces coelicolor*, generalmente se utiliza la biblioteca de cósmidos que se encuentra secuenciada y el procedimiento de PCR targeting (Gust et al., 2003). En este procedimiento se sustituye el gen a eliminar por un cassette de resistencia a apramicina. Debido a que no se contaba con el cósmido que contiene al gen *sco3986* se procedió a realizar un ensamble de Gibson. Esta tecnología permite la unión de múltiples fragmentos de DNA superpuestos en orden correcto mediante una reacción isotérmica en un tiempo corto. Para realizar el ensamble se diseñaron cebadores de 30 pb en promedio, que se alinearán con los extremos de cada fragmento a unir. Los fragmentos amplificados fueron: 3000 pb río arriba de *sco3986*, 3000 pb río abajo de *sco3986* y el casete de apramicina. Se utilizó el plásmido pCR Blunt II TOPO (Invitrogen) como plásmido de contención, ya que solamente se replica en *E. coli*. Los cebadores utilizados se presentan a continuación:

- Amplificación 3000 pb río arriba de *sco3986*: Forward: 5' GTGTGCTGGAATTCGCCCTT CGCACCCCTCGCGAGGTTC 3'.
Reverso: 5' ACATCGAATT GAACTGCGTCACCGCCTTC 3'.
- Amplificación 3000 pb río abajo de *sco3986*: Forward: 5' CGGAATATCA TGCCGCGGAACGAACTGC 3'. Reverso: 5' ATATCTGCAGAATTCGCCCT ATCGGTGGTAGGAGATTGATATGCG 3'.

- Amplificación casete de apramicina: Forward: 5' GACGCAGTTC AATTCGATGTGTAGGCTG3'. Reverso: 5' TTCCGCGGCA TGATATTCCGGGGATCCG 3'.

Posteriormente, se hicieron reacciones de PCR para amplificar los fragmentos a unir. Para los fragmentos de 3000 pb se utilizó la enzima Long Amp Taq DNA polymerase (NEB) bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial 94°C 5 min, desnaturalización 94°C 30 s, alineamiento 65 °C 45 s, extensión 65 °C 3 min y extensión final 65 °C 10 min. Y para el fragmento del casete de apramicina se utilizó la enzima Platimun Taq DNA polymerase (Invitrogen) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C 5 min, desnaturalización 95°C 45 s, alineamiento 68°C 1 min, extensión 72 °C 1.5 min y extensión final 72°C 5 min. Cada fragmento fue visualizado en gel de agarosa 0.8% y purificado con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Una vez que se tenían los fragmentos y el plásmido, se utilizó Kit de clonación NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning kit (New England BioLabs), siguiendo todas las instrucciones del fabricante. Finalmente, se obtuvo la construcción TOPOsco3986::aac(3)IV (Figura 6). Dicha construcción se transformó en células competentes DH5α, se seleccionaron las colonias por PCR en colonia.

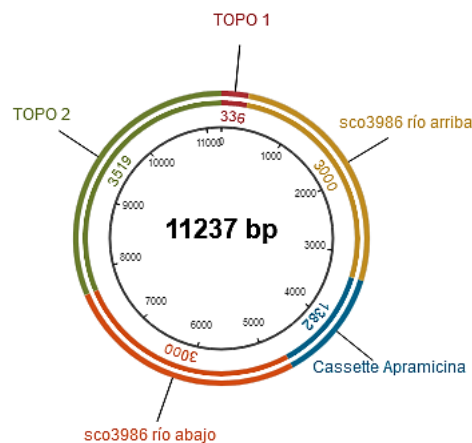


Figura 6. Construcción del plásmido TOPOsco3986::aac(3)IV.

- Transformación de la construcción TOPOsco3986::aac(3)IV.
La construcción TOPOsco3986::aac(3)IV se transformó en la cepa de *E. coli* JM110 para obtener el DNA no metilado (Kieser et al., 2000). Posteriormente,

se extrajo la construcción no metilada, por la técnica de miniprep (Birnboim y Doly, 1979), y se transformó en *S. coelicolor* M145 mediante el uso de la técnica de transformación de protoplastos (Gust et al., 2003). El remplazo de *sco3986* por el casete de apramicina se comprobó por resistencia a apramicina 100 µg/mL, PCR y secuenciación.

9.5 Caracterización de la cepa mutante.

La caracterización de la cepa nula se realizó con cinéticas de crecimiento y producción de antibióticos. Se cultivaron las cepas silvestre y mutante en medio NMMP complementado con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado 0.5% (Apéndice 1) durante 144 h. Se tomaron muestras cada 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 h. Se determinaron biomasa, consumo de glucosa, actividad de GlkA y concentración de antibióticos.

9.5.1 Crecimiento.

El crecimiento se determinó mediante peso seco, se filtraron 5 o 10 mL de cada muestra utilizando filtros Whatman No. 1 previamente puestos a peso constante y se secaron a 60°C durante 60 h. Al final se restó el peso del papel al del papel con muestra y se reportó en mg de peso seco/mL de muestra.

9.5.2 Consumo de glucosa.

La glucosa residual se cuantificó con el método de Trinder (GOD-POD Spinreact reagent) siguiendo las instrucciones del proveedor.

9.5.3 Obtención del extracto intracelular y medición de actividad de ATP-Glk.

La fracción soluble se obtuvo de cultivos en medio NMMP (Apéndice 1) con 18 h de incubación. Las células obtenidas de 50 mL de cultivo fueron suspendidas en 5 mL de Tris-HCl 20 mM pH 7.2 con inhibidor de proteasas (cOMplete Tablets EDTA – free, EASY pack cocktail Roche) en proporción 1:10. Las células se sonicaron (Ultrasonic Processor, Cole Parmer) con seis pulsos a 50% Ampl con duración de 30 s y dejando 1 min de reposo entre cada pulso. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante para medir la actividad enzimática.

La actividad ATP-Glk fue determinada indirectamente mediante una reacción acoplada con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, Roche), en la que se monitoreó espectrofotométricamente la formación de NADPH a 340 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 25 mM, NADP 0.5 mM, ATP 1 mM, D-glucosa 20 mM, 0.7 U/mL de G6PDH y 50 μL del extracto intracelular. La reacción se realizó a 42°C y se midió la absorbancia cada 20 s durante 2 min. Una unidad de actividad enzimática se define como nmol de NADPH reducido /min*mg de proteína (Ruiz *et al.*, 2014).

La concentración de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) usando albúmina sérica bovina como estándar.

9.5.4 Cuantificación de antibióticos.

- Actinorrodina

Para la determinación de actinorrodina total se añadieron 0.5 mL de KOH 3N a 1 mL de cultivo y se determinó la absorbancia a 640 nm. La concentración de actinorrodina se cuantificó usando un coeficiente de extinción molar de $25\,320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

- Undecilprodigiosina

La extracción de undecilprodigiosina se hizo a partir del micelio seco obtenido de 1 mL de cultivo, añadiendo 1 mL de metanol acidificado con HCl pH 3 (Apéndice 1). Se determinó la absorbancia a 530 nm y para la cuantificación del antibiótico se utilizó el coeficiente de extinción molar de $100\,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9.5.5 Expresión de genes seleccionados.

La expresión de los genes blanco de SCO3986 se determinó por qPCR, tomando como referencia el gen *gyrA*.

- Aislamiento de RNA

Se hicieron cultivos de *S. coelicolor* M145 y de la mutante $\Delta sco3986$ en medio NMMP con glucosa (0.5%) y agar parcialmente hidrolizado (0.5%). El aislamiento de RNA total se hizo por triplicado de muestras tomadas a las 18 h de incubación, siguiendo las instrucciones del kit RNeasy (Qiagen) (Apéndice 1). Para la obtención de cDNA se realizó la transcripción inversa con la enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo el protocolo de la enzima.

- RT-qPCR

Una vez sintetizado el cDNA, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación en tiempo real. Cada reacción de 10 μ L, contenía 1 μ L de cDNA (10 ng), 5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de oligos (5 μ M) y 3 μ L de agua. Asimismo, se empleó un protocolo de tres pasos con 40 ciclos de amplificación: desnaturalización inicial 10 min, desnaturalización 1 min y alineamiento y extensión 1 min. El equipo utilizado fue Rotor-Gene (Qiagen). Se realizaron curvas de calibración para evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos para los genes blanco. Después de 40 ciclos de amplificación, la calidad de los productos de PCR se evaluó mediante el análisis de la curva de disociación. Las reacciones se realizaron por triplicado y se promediaron los valores de Ct. Los oligonucleótidos fueron diseñados a través de la herramienta PrimerQuest IDT (Apéndice 1).

Los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando la expresión del gen *gyrA* como referencia. Los datos fueron normalizados con respecto a dicho gen (Romero *et al.*, 2016b). Finalmente, los resultados se representaron como cuantificación relativa normalizada (NRQ) de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 comparada con la cepa mutante $\Delta sco3986$ de la expresión de cada gen evaluado (Pfaffl, 2001).

9.5.6 Pruebas estadísticas

Los resultados se analizaron con la prueba t de student con distribución de dos colas, considerando las muestras con varianzas diferentes. Se consideraron valores estadísticamente diferentes aquellos con resultados menores a 0.05 en la prueba y están señalados en las gráficas con asteriscos (*).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La RCC es un proceso de regulación complejo en *Streptomyces*, en el cual se encuentran implicados procesos como la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios. Como se dijo anteriormente, la enzima *glkA* participa en la RCC, sin embargo, el mecanismo mediante el cual la enzima ejerce su regulación sigue siendo una incógnita. Debido a esto, se ha propuesto que la *glkA* participa en conjunto con reguladores transcripcionales quienes son los efectores en la regulación de genes en la RCC (van Wezel et al., 2007; Romero et al., 2016; Gubbens *et al.*, 2012). Romero et al., (2016a), identificó a 9 reguladores transcripcionales influenciados por la *glkA* mediante un análisis de microarreglos, al comparar una cepa silvestre de *S. coelicolor* contra una cepa carente de *glkA* y en su lugar tenía la *glk* de *Z. mobilis*. Manzo en el 2018, realizó la búsqueda de los posibles genes blanco de estos 9 reguladores y los clasificó de acuerdo con su función. De este último estudio, destacó el regulador de la familia GntR *sco3986* por su gran número de posibles genes blanco relacionados con el metabolismo de carbono (Manzo, 2018). La familia de los reguladores GntR destaca por su abundancia y participación en diversos procesos biológicos incluyendo la diferenciación morfológica, producción y resistencia de antibióticos, metabolismo de carbono, etc. Además, se caracterizan por tener un dominio conservado de unión a DNA en el N-terminal, el cual se une a la región promotora del gen blanco, y un dominio de unión a ligando y/o de oligomerización de la proteína en el C-terminal en donde, al unirse la molécula efectora, se lleva a cabo un cambio conformacional y el primer dominio puede unirse al DNA (Hoskisson y Rigali, 2009). Se conoce que en *S. coelicolor* existen 56 reguladores GntR (Tsyplik et al., 2016, Hoskisson y Rigali, 2009). En este sentido, para determinar si SCO3986 tenía la estructura y los aminoácidos conservados de los reguladores tipo GntR, se realizó el modelado de la proteína. Al hacer los alineamientos de SCO3986 frente a otras proteínas, se encontró baja homología con otros reguladores GntR. Solo se encontró 27% de homología con el regulador DasR. Por tanto, se decidió hacer el modelo de SCO3986 *ab initio* mediante el servidor Rosetta.

10.1 Modelado de la proteína SCO3986.

1) Modelado *ab initio* de SCO3986.

En el método Rosetta, se ensamblan fragmentos cortos de proteínas conocidas mediante una estrategia de Monte Carlo para producir conformaciones de proteínas de tipo nativo.

Usando solo información de secuencia, las predicciones exitosas de Rosetta producen modelos con precisiones típicas de la desviación cuadrática media de la raíz (RMSD) de 3–6 Å C α de las estructuras determinadas experimentalmente para segmentos contiguos de 60 o más residuos. Para cada predicción de estructura, se llevan a cabo muchas simulaciones cortas a partir de diferentes estructuras semilla aleatorias para generar un conjunto de estructuras señuelo que tienen interacciones locales favorables y propiedades globales similares a las proteínas. Luego, este conjunto se agrupa por similitud estructural para identificar los mínimos de energía libre más amplios (Roh et al., 2004, Bender et al., 2016).

En el servidor Rosetta se introdujo la secuencia completa de SCO3986 y se escogió la estructura con el mejor puntaje de Rosetta, -320.41. En la Figura 7 se presenta el modelo obtenido.

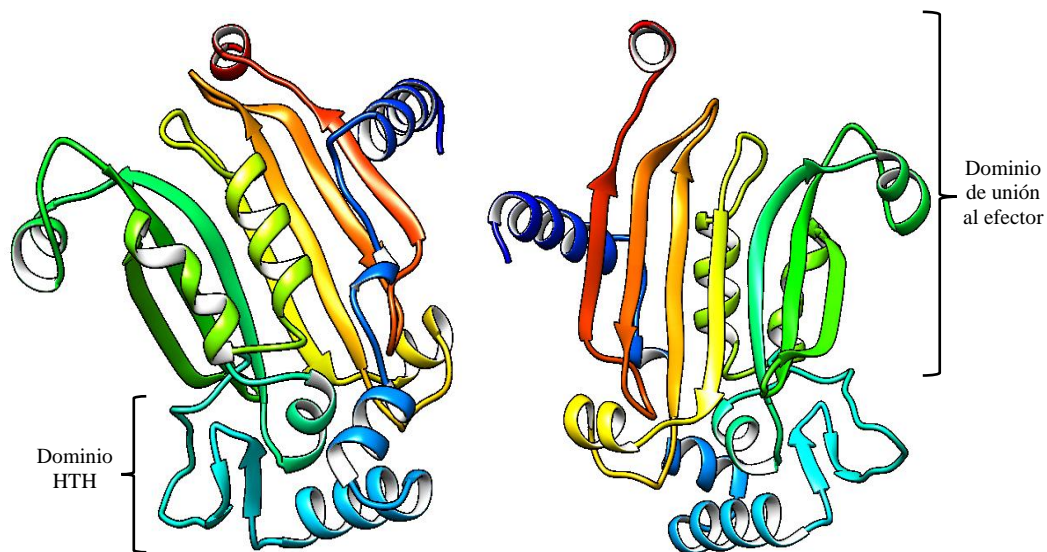


Figura 7. Modelo preliminar de la proteína SCO3986. Visualizador UCSF Chimera.

Como podemos observar en la Figura 7, SCO3986 tiene los dominios característicos de los reguladores tipo GntR, constan de un dominio HTH de unión al DNA en el extremo N-terminal y un dominio de unión al efector y/o de oligomerización en el extremo C-terminal. Al realizar la búsqueda de los aminoácidos conservados que participan en la unión de la molécula efectora y la unión con el DNA, se encontró que SCO3986 tiene muchos de estos aminoácidos (Apéndice 2). Las diferencias que existen las podemos atribuir al tipo de molécula efectora que se une al dominio de unión al efector, pues cada regulador tiene los

aminoácidos necesarios para reconocer su propia molécula efectora (Fillenberg et al., 2016). Hasta el momento se desconoce cuál es la molécula efectora que produce el cambio conformacional en SCO3986.

2) Validación del modelo de SCO3986

La validación es un paso necesario para determinar la calidad del modelo. Para ello se introdujo la secuencia de SCO3986 al servidor Swiss-Model.

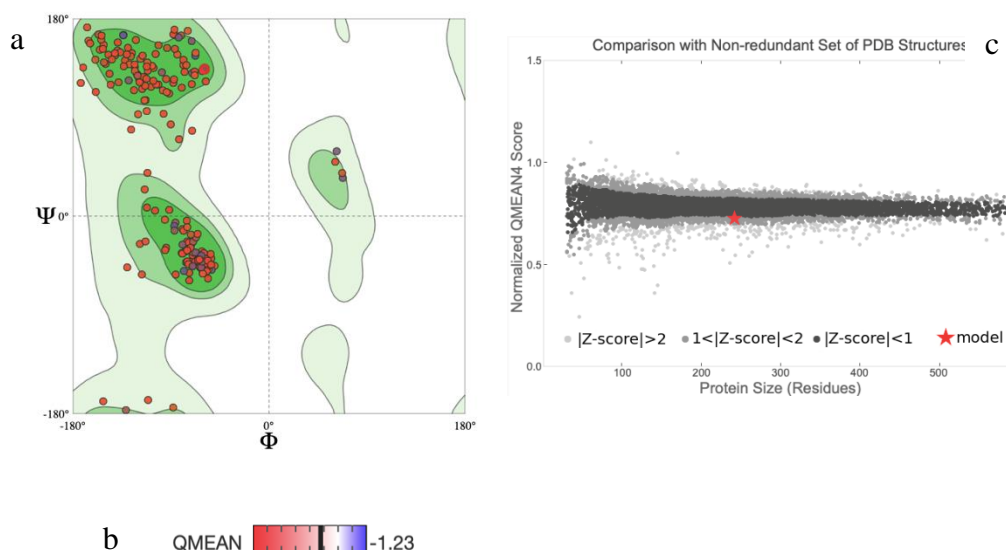


Figura 8. Evaluación del modelo preliminar SCO3986. a. Diagrama de Ramachandran, b. Valor de QMEAN, c. Gráfica de comparación de modelos.

En la Figura 8, se observa el diagrama de Ramachandran (Figura 8a) en donde se obtuvo un valor de 96.27%, lo que indica que los aminoácidos se encuentran en regiones favorecidas. Por otro lado, se obtuvo un puntaje de “Clash” (número de choques) de 182.85, lo que indica que existen muchos aminoácidos enterrados lo que provoca choques entre ellos. El valor de QMEAN proporciona una estimación de las características estructurales observadas en el modelo a escala global e indica si el modelo es comparable a lo que cabría esperar de estructuras experimentales de tamaño similar. En este caso, se obtuvo un valor de -1.23 (Figura 8b), lo que indican una concordancia baja entre la estructura del modelo y las estructuras experimentales de tamaño similar. Finalmente, en la gráfica de comparación de modelos (Figura 8c) los puntajes de calidad del modelo están relacionados con los

obtenidos para estructuras experimentales de tamaño similar. El eje “x” muestra la longitud de la proteína (número de residuos). El eje “y” es la puntuación QMEAN normalizada. Cada punto representa una estructura de proteína experimental. Los puntos negros son estructuras experimentales con una puntuación QMEAN normalizada dentro de 1. Nuestro modelo se representa con una estrella roja, y como podemos observar, se encuentra en la zona gris, lo que indica que la estructura tiene baja calidad en comparación a las experimentales o que muestra grandes diferencias frente a las proteínas experimentales. Como podemos observar, se necesita mejorar el modelo, y para ello, es necesario someterlo a una minimización de energía y para comprobar si el modelo es estable, es necesario someterlo a ensayos de dinámica molecular.

Con la obtención del modelo de SCO3986, podemos concluir que SCO3986 pertenece a la familia de los reguladores tipo GntR. Por otro lado, es interesante que SCO3986 presente homología con el regulador DasR, implicado en la RCC, lo que apoya la hipótesis que *sco3986* podría participar en la RCC (Rigali et al., 2008).

El siguiente paso fue seguir la metodología propuesta por Studholme y colaboradores en 2004 y aplicada por Manzo en 2018. Se realizó de nuevo la búsqueda de la secuencia consenso y los posibles genes blanco de SCO3986 para corroborar los resultados del análisis preliminar hecho por Manzo en 2018. Además, este tipo de análisis es conveniente repetirlo, para obtener un resultado más preciso, dado que las bases de datos se renuevan constantemente.

10.2 Análisis bioinformático

Con el objetivo de determinar los posibles genes blanco del regulador SCO3986 se obtuvo una secuencia consenso de unión en el DNA. Para ello se tomó en consideración que generalmente los reguladores se unen a su propia secuencia reguladora. De esta manera se obtuvo la firma preliminar (Figura 9) a partir de la cual se predijeron sus posibles genes blanco y se clasificaron de acuerdo con su función.

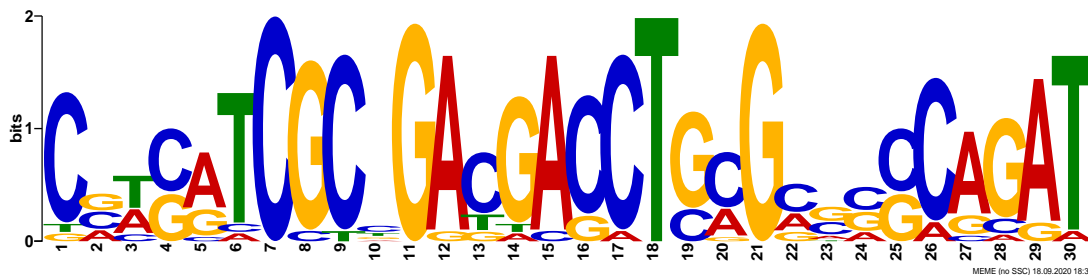


Figura 9. Diagrama de la firma preliminar del regulador SCO3986 con mayor número de genes blanco y con el menor E-value: 4.0 e-10.

Las funciones que engloba la familia de los reguladores tipo GntR incluyen diferenciación morfológica, producción y resistencia de antibióticos, metabolismo de carbono, metabolismo de lípidos, entre otras. En la Figura 10 se muestran una gran variedad de funciones de los posibles genes blanco, sin embargo, nos enfocaremos en las funciones de transporte y metabolismo de carbono, metabolitos secundarios, transporte y metabolismo de lípidos y transcripción, dado que son las funciones que abarcan los regulares GntR.

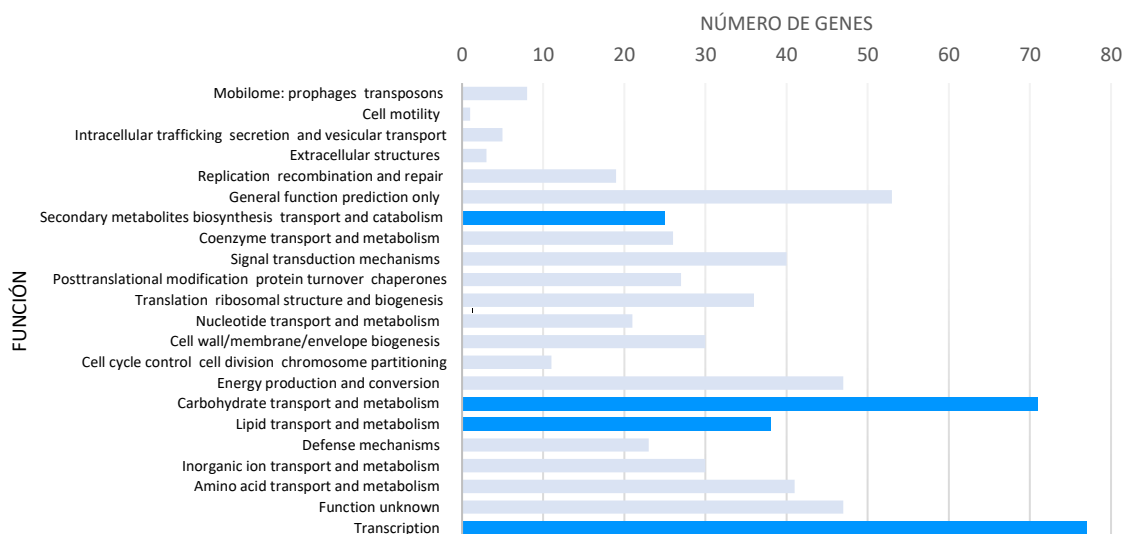


Figura 10. Posibles funciones de los genes blanco de SCO3986.

De estos grupos de genes con las funciones seleccionadas se eligieron los que tuvieran valores de E-value más bajos. Posteriormente, los genes seleccionados se buscaron en las bases de datos de Brenda (<https://www.brenda-enzymes.org>) y KEGG para corroborar su función y predecir las vías metabólicas afectadas por SCO3986. En la Tabla 1 se presentan los resultados de los posibles genes blanco para cada grupo seleccionado.

Tabla 1. Posibles genes blanco de *sco3986*.

Vía metabólica	Gen	Descripción	Participación
Metabolismo de carbono	<i>sco1939</i>	6-fosfogluconolactonasa	Cataliza la hidrólisis de 6-fosfogluconolactona a 6-fosfogluconato en la vía de las pentosas fosfato (Crimmins et al., 2009).

	sco2126	ATP-Glk	Participa en el primer paso de glucólisis al fosforilar a la glucosa en glucosa-6- fosfato (Ruiz et al., 2014).
Metabolismo de lípidos	sco5385	Posible 3-hidroxi-butiril- CoA deshidrogenasa	Cataliza la reducción dependiente de NAD ⁺ de b-hidroxiacil-CoA a β-oxoacil-CoA en la vía de β-oxidación (Taylor et al., 2010).
	sco1701	Posible acil-CoA deshidrogenasa	Relacionada con la primera reacción de la β-oxidación, la producción de ACT y producción de micelio aéreo. (Gehring et al., 2004).
Metabolismo de secundario	sco5314	Policétido ciclasa whiE VII	Síntesis de pigmento para esporas. (Kelemen et al., 1998)
Transcripción	sco3264	Regulador transcripcional tipo GntR	Producción de ácidos grasos Catabolismo de aminoácidos Metabolismo del carbono central (Manzo, 2018, Romero et al., 2015)
	sco4426	SARP (<i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory protein)	Regulador global del metabolismo secundario (Takana et al., 2007)

En la tabla 1, para el grupo de metabolismo de carbono los genes blanco participan en la glucólisis y en la vía de las pentosas fosfato. Se ha propuesto que la enzima SCO1939, participante en la vía de pentosas fosfato, puede estar implicada en el suministro de NADPH para la producción de metabolitos secundarios (Gubbens et al., 2012). Por otro lado, es interesante que el análisis indicara como posible gen blanco de SCO3986 a la ATP-Glk, pues, en un estudio previo (Romero et al., 2016a), la ATP-Glk afecta negativamente a sco3986, por tanto, entra la pregunta de cuál es el papel regulador de sco3986 en la RCC.

Para el grupo de metabolismo de lípidos la primera enzima SCO5385 codifica para una posible 3-hidroxi-butiril- CoA deshidrogenasa, la cual está involucrada en la ruta de β-oxidación. En cuanto a la enzima SCO1701, posiblemente codifica una acil-CoA deshidrogenasa, implicada en el primer paso del β-oxidación. Además, en un estudio realizado por Gehring y colaboradores en 2004, al eliminar una posible acil-CoA deshidrogenasa observaron un efecto negativo sobre metabolismo secundario y diferenciación morfológica. Lo anterior es relevante porque muchos productos de ácidos

grasos son precursores de metabolitos secundarios, por ejemplo, los policétidos. Los policétidos son moléculas que poseen una gran diversidad estructural y presentan actividad biológica como antibióticos, tal es el caso de la actinorrodina (Gubbens et al., 2012; Staunton y Weissman, 2001).

En el grupo de metabolismo secundario, encontramos a una posible policétido ciclasa *whiE* VII (*sco5314*). El complejo *whiE* participa en la producción del pigmento para esporas, por lo que este gen *sco5314*, podría participar en la síntesis del pigmento (Kelemen et al., 1998).

Finalmente, para el grupo de transcripción, los resultados indican que SCO3986 podría unirse a *sco3264*. En el estudio realizado por Manzo en 2018, señala que al eliminar a *sco3264*, *sco3986* se reprime, lo que sugiere que *sco3264* regula a *sco3986*. Sin embargo, al eliminar a *sco3264* aumenta también la expresión de *glkA*, por tanto, la represión de *sco3986*, posiblemente se deba al aumento en la expresión de *glkA*, y como se mencionó antes, la expresión de *sco3986* depende de *glkA*. Por otro lado, SCO3986 tiene como posible gen blanco a un regulador global relacionado con el metabolismo secundario, *sco4426*, lo que puede indicar un efecto sobre dicho proceso.

Con base en estos resultados, se escogieron a los genes *sco1939*, *sco1701* y *sco2126*, para medir su expresión, dado que su posible participación en la β -oxidación y en la glucólisis podría tener un efecto en la producción de metabolitos secundarios y la RCC.

10.3 Obtención de la cepa mutante

- Construcción de la cepa carente de *sco3986*

La eliminación de genes en *S. coelicolor* generalmente se realiza con el método de PCR targeting descrito por Gust et al., 2003. Para ello se ocupa una biblioteca de cósmidos que ha sido secuenciada y que actualmente se mantiene en la Universidad de Swansea en el Reino Unido. Desafortunadamente, no existe el cósmido que contenga el gen *sco3986*, por ello fue necesario realizar un ensamble de Gibson.

- Ensamble de Gibson

El diseño del ensamble de Gibson incluyó 3 kb del genoma de *S. coelicolor* a cada lado del gen *sco3986*, además de la sustitución de dicho gen por un casete de resistencia a

apramicina. Los 7 kb de la construcción fueron ensamblados dentro del vector pCR Blunt II TOPO que solamente se replica en *E.coli*. Así se generó el plásmido TOPO*sco3986::aac(3)IV* (Figura 11a), que fue transformado en células competentes de *E. coli* DH5 α . En la Figura 11b se observa la digestión con las enzimas *NotI* y *XhoI* las cuales cortan cada uno de los fragmentos de la construcción TOPO*sco3986::aac(3)IV*. Con esto se confirmó la unión de todos los fragmentos.

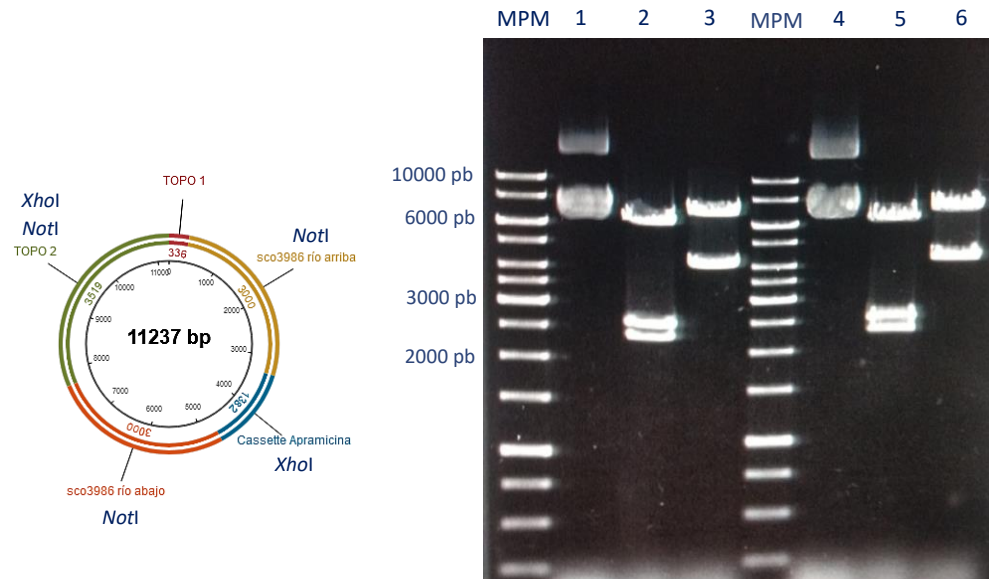


Figura 11. A) Plásmido TOPO*sco3986::aac(3)IV*. B) Digestión del plásmido TOPO*sco3986::aac(3)IV*, gel de agarosa 0.8%. MPM: marcador peso molecular, carril 1 y 4: plásmido sin digerir, carril 2 y 5: plásmido digerido con *NotI*, carril 3 y 6: plásmido digerido con *XhoI*.

- Transformación de la construcción TOPO*sco3986::aac(3)IV*.

El plásmido TOPO*sco3986::aac(3)IV* se transformó en la cepa no metilante JM110, para después aislar el plásmido y transformarlo en *S. coelicolor* (Gust et al., 2003). Se obtuvieron 6 colonias resistentes a apramicina de las cuales se escogió una y se comprobó la sustitución del gen *sco3986* por el casete de apramicina por PCR. La PCR se realizó con los cebadores, Fwd: CATGCCGGGTGAGCGACCTCTTCCAACCTG y Rev: CATCCCGGTCGCCGAGTACTGCCGTAACCT, los cuales se unen 100 pares de bases río arriba y río abajo del gen *sco3986*. También se realizó la PCR con cebadores específicos para amplificar solo a *sco3986*. Los cebadores utilizados fueron, Fwd:

ACGGAGCTCATGACGTCTCGCCGCCTCAT y
CAGCTGCAGCCGCGGCATCATCTGTGCAC.

Rev:

En la Figura 12a y b, se observa la PCR realizada sobre el DNA genómico de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 que tiene el gen *sco3986* y la cepa mutante donde tiene el casete de apramicina. Con esto se confirmó la obtención de la mutante ***S. coelicolor sco3986::aac(3)IV* (Δ *sco3986*)**.

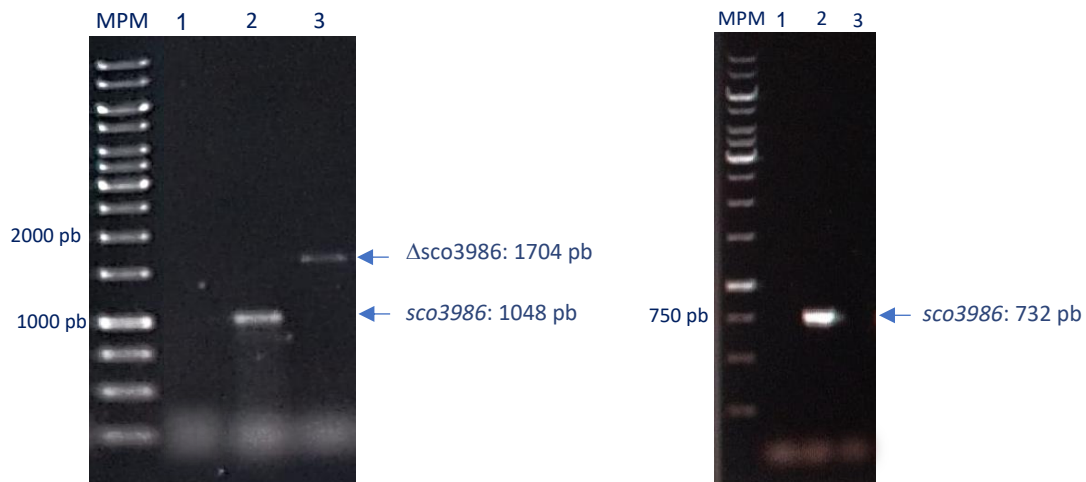


Figura 12. PCR para la comprobación de la cepa mutante Δ *sco3986*. A) MPM: marcador peso molecular, carril 1: blanco de reactivos, carril 2: amplicón de *sco3986* sin casete de apramicina en *S. coelicolor* M145, carril 3: amplicón del casete de apramicina en la mutante Δ *sco3986*. B) MPM: marcador de peso molecular, carril 1: blanco de reactivos, carril 2: PCR de *sco3986* en cepa *S. coelicolor* M145, carril 3: PCR del remplazo del gen *sco3986* por el cassette de apramicina en la mutante Δ *sco3986*.

10.4 Caracterización de la cepa mutante

Una vez generada la cepa *S. coelicolor sco3986::aac(3)IV* (Δ *sco3986*), se procedió a comparar el comportamiento de la mutante obtenida con el de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 en un medio de cultivo donde se observara la represión por glucosa. Esta comparación se hizo en medio mínimo NMMP (Apéndice 1) complementado con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado 0.5% en matraces bafleados de 50 mL, el medio se inoculó con 1×10^8 esporas.

Para conocer los efectos sobre el metabolismo primario se evaluó el crecimiento, consumo de glucosa, actividad de ATP-Glk y la expresión de los genes *glkA* y *dagA* a diferentes tiempos de incubación en ambas cepas. La expresión se cuantificó a las 18 h en

condiciones represoras (0.5% glucosa y 0.5% de agar parcialmente hidrolizado) y se utilizó el gen *gyrA* para normalizar los valores.

Se observó un comportamiento diáuxico en el crecimiento de ambas cepas debido a las dos fuentes de carbono (Figura 13). El primer máximo de crecimiento se alcanzó a las 36 h lo que corresponde al consumo de la glucosa que fue la fuente preferencial (Martín y Liras, 2020) y el segundo máximo de crecimiento se alcanzó a las 60 h que corresponde a la segunda fuente de carbono, el agar parcialmente hidrolizado. En estos primeros tiempos la producción de biomasa es similar, pero en los últimos tiempos de 120 a 144 h se observa una menor degradación del micelio en la cepa mutante $\Delta sco3986$ en comparación a la cepa silvestre M145. Chater y colaboradores en 2010, señalaron la importancia de la señalización y el procesamiento proteolítico extracelular durante la diferenciación morfológica. En *Streptomyces* se producen un número excepcional de proteínas hidrolíticas que permiten el consumo de nutrientes, por ejemplo, celulasas y quitinasas. Algunas proteasas secretadas, reguladas a su vez por inhibidores, participan en cascadas extracelulares para el desarrollo y canalizan la producción de biomasa del micelio sustrato hacia el crecimiento aéreo, la esporulación y producción de metabolitos secundarios. En este sentido, los resultados de crecimiento de la cepa $\Delta sco396$ sugieren que *sco3986* podría participar como un activador en la regulación de proteasas implicadas en la degradación del micelio primario. Esta disminución en la degradación del micelio se vio reflejado en la producción de antibióticos y en el fenotipo de la mutante, lo cual se discute más adelante.

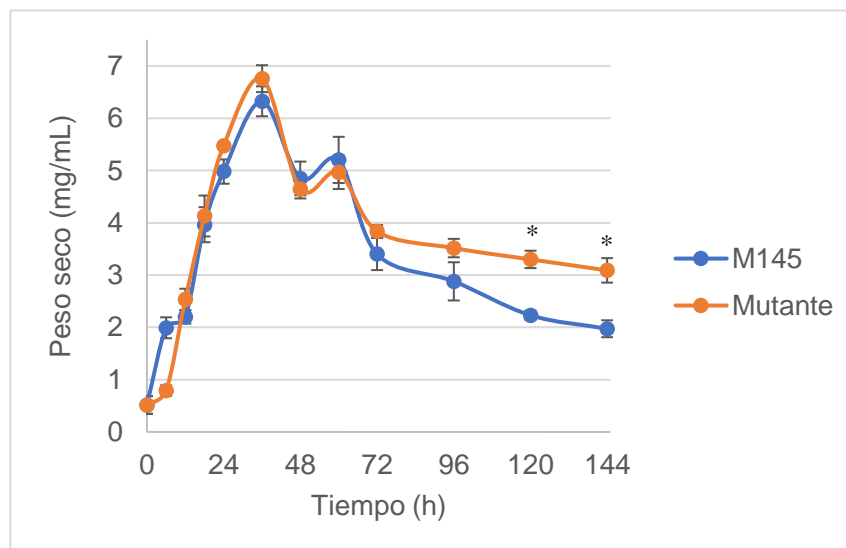


Figura 13. Comparación del crecimiento de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta sco3986$ en medio NMMP complementado con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado 0.5%. Los asteriscos representan diferencia significativa (*).

En relación al consumo de glucosa, a las 36 h cuando se presenta el primer máximo de crecimiento, se consume por completo la glucosa en ambas cepas (Romero et al. 2016b), y no se observa una diferencia significativa en la velocidad del consumo de glucosa (Figura 14a). Por el contrario, hubo un aumento en la actividad de GlkA de 48% en la cepa mutante $\Delta sco3986$ respecto a la cepa silvestre M145 (Figura 14b).

Para saber si el efecto en la actividad y consumo de glucosa se debía a la cantidad de transcrito producida, se midió la expresión relativa de *glkA*. Se comparo la expresión relativa entre cepa silvestre *S. coelicolor* M145 y la cepa mutante $\Delta sco3986$. Esta cuantificación se realizó a las 18 h en condiciones represoras (0.5% glucosa y 0.5% de agar parcialmente hidrolizado) y se utilizó el gen *gyrA* para normalizar los valores. Los resultados mostraron que no hay una diferencia significativa en la producción de transcrito de la *glkA* (Figura 14c).

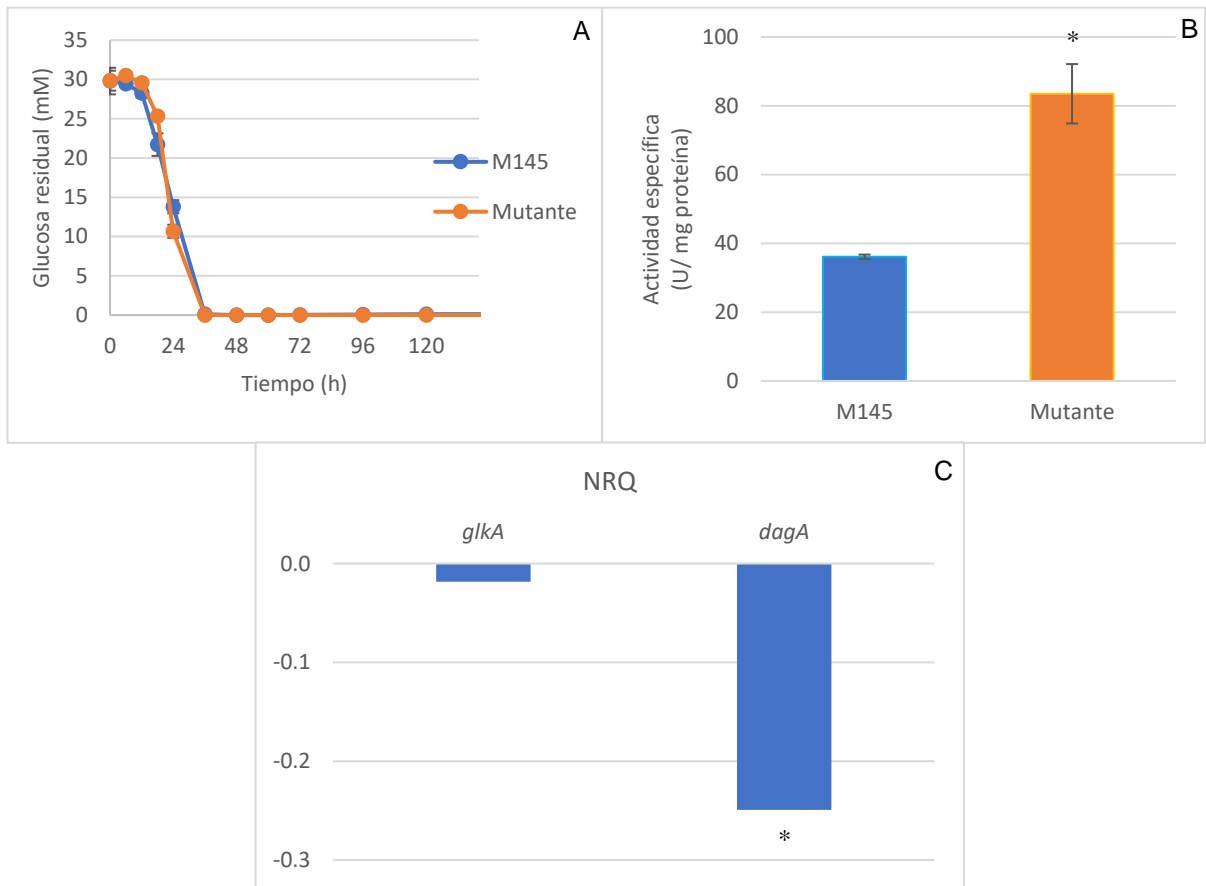


Figura 14. A) Consumo de glucosa *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta sco3986$ en medio NMMP, B) Actividad de ATP-Glk de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta sco3986$ en medio NMMP. C) Cuantificación relativa normalizada de los genes *glkA* y *dagA* a las 18 h. Los medios complementados con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado. La actividad se cuantificó a partir de micelio obtenido a las 18 h de incubación. Los asteriscos representan diferencia significativa (*).

Estas diferencias en la actividad de GlkA, consumo de glucosa y expresión de *glkA*, puede deberse a diferentes hipótesis, la primera es a la presencia de otras Glk en el genoma de *S. coelicolor*, SCO6260 o SCO0063. De la posible glucosa cinasa SCO6260 se conoce que puede ser inactiva en la cepa silvestre M145 y cuya expresión puede inducirse en mutantes *glkA*⁻ cultivadas durante un período prolongado en presencia de glucosa (Angell et al., 1994). Respecto a la glucosa cinasa SCO0063 en la mutante *glkA*⁻ no se detectaron cambios transcripcionales (Romero et al., (2016a). Lo anterior nos lleva a sugerir que, bajo nuestras condiciones, presencia de GlkA, glucosa y ausencia de *sco3986*, las proteínas SCO6260 o SCO0063 podrían ser activas y reflejar un aumento en la actividad, por tanto, SCO3986 podría actuar como un represor de SCO6260 o de SCO0063. La otra posibilidad la describen van Wezel y colaboradores en 2007, observaron que no hubo una relación directa entre la cantidad de glucosa cinasa en los extractos de proteína y la actividad enzimática de la proteína. Sus resultados los llevan a concluir que la actividad de Glk se modula a través de la activación dependiente de metabolitos y/o modificación postraduccional. Finalmente, la ATP-Glk presenta una estructura cuaternaria de “dímero de dímeros”, la cual es catalíticamente activa. Imriskova y col. (2005) demostraron que al perder esa estructura tetramérica, la ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* pierde actividad. En este caso, la mayor actividad de GlkA podría deberse a una mejor estabilidad de la GlkA en su forma tetramérica y no a la mayor cantidad de transcrito. Hasta el momento, desconocemos cuáles son los factores que pueden ayudar a la estabilidad de la ATP-Glk o si existen otras proteínas regulatorias que ayuden a aumentar la eficiencia catalítica de dicha enzima sin modificar la cantidad de transcrito.

En cuanto a la segunda fuente de carbono, se eligió agar ya que se ha descrito que el gen que codifica para la agarasa, *dagA*, es reprimida por glucosa y a su vez su expresión depende de la expresión de la Glk y sus posibles interacciones. (Servín-González et al., 1994, Angell et al., 1994; Romero et al., 2016a). Por tanto, los resultados muestran una menor expresión de *dagA* en la cepa mutante Δ *sco3986* respecto a la silvestre M145 (Figura 14c). Partiendo de este resultado, se realizó un ensayo para determinar la degradación de agar a nivel cualitativo mediante la detección de halos de degradación revelando con yodo (Kwakman y Postma, 1994). En estos ensayos se esperaba tener un halo de inhibición menor en la cepa mutante Δ *sco3986* con respecto a la silvestre M145, dado que en la cepa mutante hay menor expresión de *dagA*. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia entre ambas cepas (datos no mostrados). Esto puede deberse a la presencia de otra

agarasa, *dagB* (*sco3487*), que, bajo nuestras condiciones, presencia de GlkA, glucosa y ausencia de *sco3986*, esta agarasa pudo ser activa, llevar a cabo la degradación del agar y, por tanto, en el ensayo cualitativo no se pudo detectar cambios en la degradación de agar. Otra posible explicación, es la regulación postranscripcional por el sRNA *scr5239* sobre *dagA*. *scr5239* podría regular la actividad de la agarasa, lo cual no permitió ver un cambio en la degradación del agar (Vockenhuber y Suess, 2012).

Para conocer los efectos sobre el metabolismo secundario se evaluó la producción de antibióticos, el fenotipo de ambas cepas y la expresión de los reguladores específicos ACTII, producción de actinorrodina, RedD y RedZ, producción de undecilprodigiosina. La expresión se cuantificó a las 18 h en condiciones represoras (0.5% glucosa y 0.5% de agar parcialmente hidrolizado) y se utilizó el gen *gyrA* para normalizar los valores.

En la cepa silvestre M145 la producción de actinorrodina comenzó a las 48 h y la de undecilprodigiosina comenzó a las 24 h llegando a un máximo a las 96 h. Para la cepa mutante Δ *sco3986* la producción de actinorrodina comenzó a las 48 h, llegando a un máximo a las 96 h, mientras que la producción de undecilprodigiosina comenzó a las 24 h llegando a un máximo a las 60 h. Los resultados muestran que hubo un decremento en la producción de ambos antibióticos en la mutante Δ *sco3986* con respecto a la cepa silvestre. La disminución para actinorrodina fue de 71% y la undecilprodigiosina de 92% (Figura 15a, b). Esto se podría atribuir a la menor degradación del micelio sustrato en la cepa mutante, pues, como se mencionó, la lisis del micelio sustrato es necesario para la producción de metabolitos secundarios. Por otro lado, la expresión los reguladores específicos, ACTII (producción de actinorrodina), RedD y RedZ (producción de undecilprodigiosina), fue menor en ausencia de *sco3986* (Figura 15c), lo que sugiere de que la presencia de este regulador afecta positivamente a la producción de estos dos antibióticos.

En cuanto a la expresión de los genes otros genes seleccionados, *sco1701* tuvo una menor expresión en la mutante Δ *sco3986* (Figura 15c). Posiblemente, *sco1701*, codifica para la acil-CoA deshidrogenasa relacionada con la primera reacción de la β -oxidación. En un estudio realizado por Gehring y colaboradores en 2004, identificaron una posible acil-CoA deshidrogenasa (*sco6938*) en *S. coelicolor*. Observaron que al interrumpir este gen había una disminución de actinorrodina y micelio aéreo. Por tanto, es posible que la represión de *sco1701* esté relacionado con la disminución de antibióticos y formación de micelio aéreo en la mutante Δ *sco3986*, aunque se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis.

De igual forma, *sco1939* tuvo una menor expresión en la cepa Δ *sco3986* (Figura 15b). Este gen codifica para una enzima 6-fosfogluconolactonasa que se encuentra dentro del clúster *sco1935-sco1942* y codifica para enzimas implicadas en la ruta de las pentosas fosfato que son inducibles por glucosa. Se ha propuesto que este grupo puede estar implicado en el suministro de NADPH para la producción de metabolitos secundarios (Gubbens et al., 2012, Romero et al., 2016a, Challis y Hopwood, 2003). Lo anterior nos lleva a suponer que la represión de *sco1939* podría ser otra razón por la cual hay un decremento en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en la cepa mutante Δ *sco3986*.

En la comparación en medio sólido R2YE, medio utilizado para la producción de antibióticos (Kieser et al., 2000), a las 96 h, la cepa mutante Δ *sco3986* parece producir una menor cantidad de esporas y de antibióticos en comparación con la silvestre M145 (Figura 15d). Lo cual podría implicar la participación de *sco3986* sobre la diferenciación morfológica.

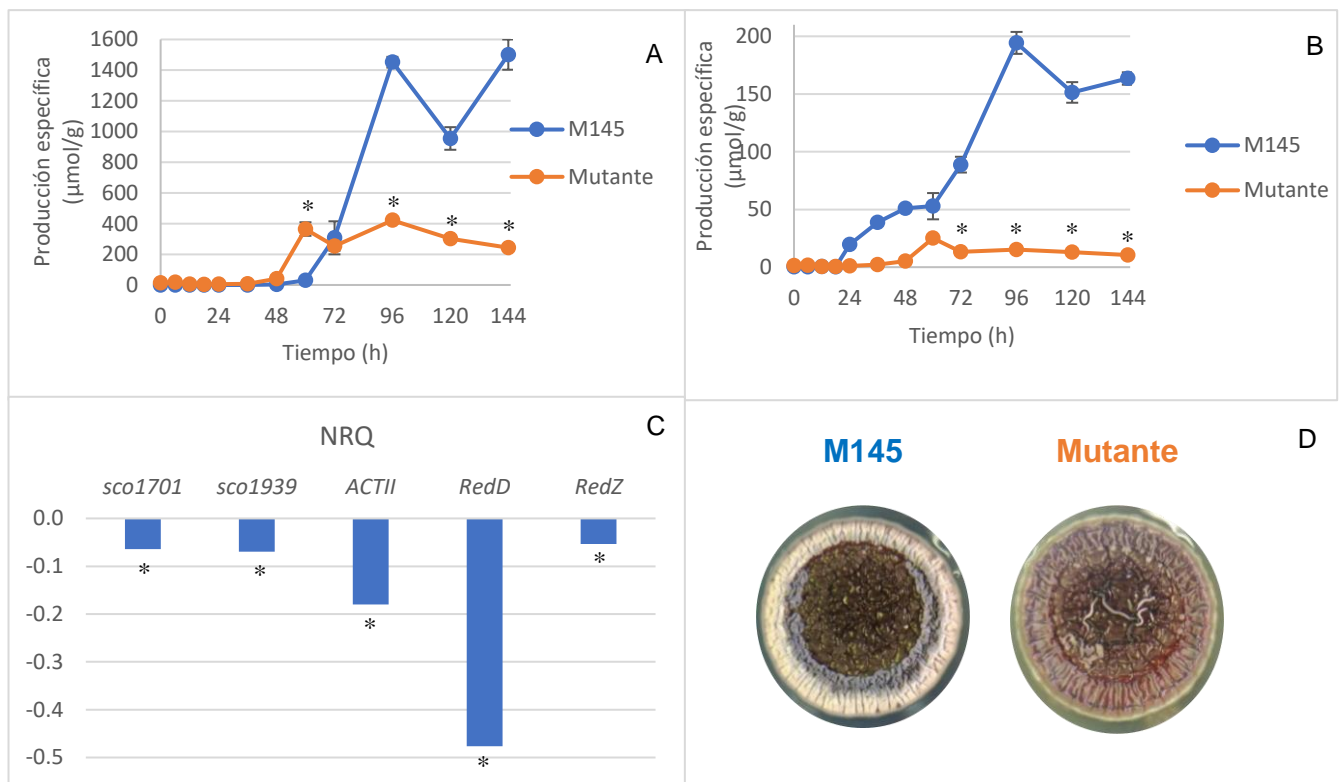


Figura 15. Producción de antibióticos, expresión de genes y fenotipo de las cepas evaluadas. A) Producción específica de actinorrodina, B) Producción específica de undecilprodigiosina, C) Cuantificación relativa normalizada de genes seleccionados en condiciones represoras a las 18 h. Valores normalizados respecto a *gyrA*. D) Medio R2YE complementado con glucosa a las 96 h de incubación. La cuantificación de antibióticos se realizó en *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* Δ *sco3986* en medio NMMP complementado con glucosa 0.5% y agar parcialmente hidrolizado 0.5. Los asteriscos representan diferencia significativa (*).

Todos los resultados sugieren que el efecto del regulador SCO3986 podría ser de un activador sobre la producción de antibióticos. A continuación, se presenta una propuesta de modelo sobre el papel regulador de *sco3986* (Figura 16).

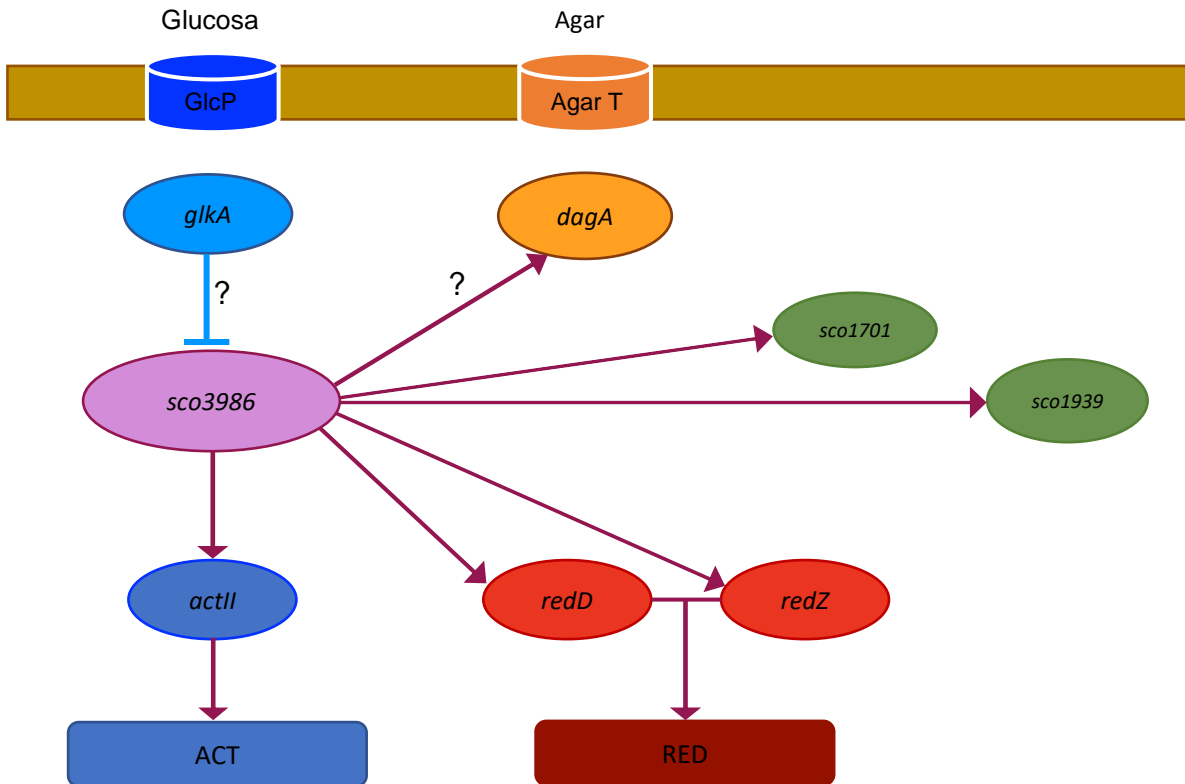


Figura 16. Modelo propuesto del efecto regulador de SCO3986. El regulador transcripcional SCO3986 actúa como un activador de los genes *actII*, *redD*, *redZ*, *sco1701* y *sco1939* genes implicados en la producción de metabolitos secundarios. Por tanto, *sco3986* actúa como un activador en la producción de antibióticos actinorrodina (ACT) y undecilprodigiosina (RED). Para el caso del gen *dagA*, encargado de metabolizar el agar, aunque parece que *sco3986* podría actuar como un activador, se necesitan hacer más estudios para determinar cómo es el tipo de regulación sobre este gen, dado que no se observaron diferencias en los ensayos cualitativos de degradación de agar. Finalmente, *sco3986* no tiene ningún efecto sobre la *glkA*, por lo que su participación en la RCC es sobre la producción de antibióticos. Se desconoce cómo la *glkA* puede llevar a cabo la regulación de *sco3986*.

Finalmente, se desconoce la manera en la que SCO3986 regula los genes evaluados, puede ser de manera directa al unirse a sus promotores, o de manera indirecta al regular genes que a su vez regulen a los genes evaluados. Para saberlo, se necesita realizar ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) o ensayos de Footprinting para saber si *sco3986* es capaz de unirse a los sitios reguladores de estos genes.

11. CONCLUSIONES

- SCO3986 participa como activador sobre la producción de antibióticos, actinorrodina y undecilprodigiosina.
- El análisis bioinformático mostró los posibles genes blanco de SCO3986 para poder predecir en que vías metabólicas participa. En particular, se comprobó que SCO3986 afecta positivamente la expresión de los genes *sco1701* y *sco1939*, ambos participantes de vías metabólicas en las que sus productos ayudan a la producción de metabolitos secundarios. En cuanto a *dagA*, se requieren más estudios para determinar cuál es el tipo de regulación sobre este gen.
- SCO3986 no afecta directamente a nivel transcripcional a la ATP-Glk por lo que su participación en la RCC parece ser sobre el metabolismo secundario.

12. PERSPECTIVAS

- Realización de ensayos EMSA o Footprinting con la proteína SCO3986.
Para poder comprobar si el regulador SCO3986 regula de manera directa a los genes blanco que resultaron reprimidos en este estudio o existen genes intermediarios.
- Complementar la mutante $\Delta sco3986$.
Para comprobar que los efectos observados en la cepa mutante se deban a la ausencia del regulador *sco3986*.
- Obtención de la cepa que sobreexpresa a *sco3986*
Con esta cepa se comprobaría si el regulador *sco3986* funciona como activador, pues al sobreexpresarlo se esperaría un aumento en la producción de antibióticos.

13. REFERENCIAS

- Angell, S., Schwarz, E., & Bibb, M. J. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular microbiology*, 6(19), 2833–2844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01463.x>
- Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J., & Bibb, M. J. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular & general genetics: MGG*, 244(2), 135–143. <https://doi.org/10.1007/BF00283514>
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue), W202–W208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bailey, T. L., & Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(1), 48–54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.1.48>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bender, B. J., Cisneros, A., 3rd, Duran, A. M., Finn, J. A., Fu, D., Lokits, A. D., Mueller, B. K., Sangha, A. K., Sauer, M. F., Sevy, A. M., Sliwoski, G., Sheehan, J. H., DiMaio, F., Meiler, J., & Moretti, R. (2016). Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts. *Biochemistry*, 55(34), 4748–4763. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete

Streptomyces coelicolor A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147.

<https://doi.org/10.1038/417141a>

Bibb M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>

Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>

Butler, M. J., Deutscher, J., Postma, P. W., Wilson, T. J., Galinier, A., & Bibb, M. J. (1999). Analysis of a ptsH homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS microbiology letters*, 177(2), 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13744.x>

Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 2(Suppl 2), 14555–14561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>

Chater, K. F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 171–198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>

Crimmins, G. T., Schelle, M. W., Herskovits, A. A., Ni, P. P., Kline, B. C., Meyer-Morse, N., Iavarone, A. T., & Portnoy, D. A. (2009). *Listeria monocytogenes* 6-Phosphogluconolactonase mutants induce increased activation of a host cytosolic surveillance pathway. *Infection and immunity*, 77(7), 3014–3022. <https://doi.org/10.1128/IAI.01511-08>

Demain A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(4), 259–264.

Demain A, Fang A (1995) Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetology* 9(2), 98–117 https://doi.org/10.3209/saj.9_98

Demain A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(2), 185–201. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>

Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 7(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>

Fillenberg, S. B., Friess, M. D., Körner, S., Böckmann, R. A., & Muller, Y. A. (2016). Crystal Structures of the Global Regulator DasR from *Streptomyces coelicolor*: Implications for the Allosteric Regulation of GntR/HutC Repressors. *PloS one*, 11(6), e0157691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157691>

Gehring, A. M., Wang, S. T., Kearns, D. B., Storer, N. Y., & Losick, R. (2004). Novel genes that influence development in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 186(11), 3570–3577. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3570-3577.2004>

Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews. Microbiology*, 6(8), 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>

Gubbens, J., Janus, M. M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., & van Wezel, G. P. (2012). Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Molecular microbiology*, 86(6), 1490–1507. <https://doi.org/10.1111/mmi.12072>

Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1541–1546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337542100>

Hodgson, D. (1982). Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. *Microbiology-sgm.* 128. 2417-2430. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-10-2417>

Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine. New York: Oxford Univ. Press.

Hodgson D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in microbial physiology*, 42, 47–238. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(00\)42003-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(00)42003-5)

Hoskisson, P. A., & Rigali, S. (2009). Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in applied microbiology*, 69, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69001-8)

Hu, X., & Friedberg, I. (2019). SwiftOrtho: A fast, memory-efficient, multiple genome orthology classifier. *GigaScience*, 8(10), giz118. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz118>

Imriskova, I., Arreguín-Espinosa, R., Guzmán, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., & Sanchez, S. (2005). Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Research in microbiology*, 156(3), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.11.001>

Kamionka, A., Parche, S., Nothaft, H., Siepelmeyer, J., Jahreis, K., & Titgemeyer, F. (2002). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor*. *European journal of biochemistry*, 269(8), 2143–2150. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02864.x>

Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., & Murata, K. (2005). Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 320–330. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.320>

Kelemen, G. H., Brian, P., Flårdh, K., Chamberlin, L., Chater, K. F., & Buttner, M. J. (1998). Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore

pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology*, 180(9), 2515–2521. <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2515-2521.1998>

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. *International Microbiology*, 3.

Kwakman, J. H., & Postma, P. W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 176(9), 2694–2698. <https://doi.org/10.1128/jb.176.9.2694-2698.1994>

Li, S., Wang, J., Li, X., Yin, S., Wang, W., & Yang, K. (2015). Genome-wide identification and evaluation of constitutive promoters in *Streptomyces*. *Microbial cell factories*, 14, 172. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0351-0>

Lu, X., Liu, X., Chen, Z., Li, J., van Wezel, G. P., Chen, W., & Wen, Y. (2020). The ROK-family regulator Rok7B7 directly controls carbon catabolite repression, antibiotic biosynthesis, and morphological development in *Streptomyces avermitilis*. *Environmental microbiology*, 22(12), 5090–5108. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15094>

Manzo M, (2018). Caracterización de un regulador transcripcional dependiente del gen *glk* en *Streptomyces coelicolor*. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México). Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2018/diciembre/0783676/Index.html.pdf>

Martín, J. F., & Liras, P. (2020). The Balance Metabolism Safety Net: Integration of Stress Signals by Interacting Transcriptional Factors in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *Frontiers in microbiology*, 10, 3120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03120>

McCormick, J. R., & Flärdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS microbiology reviews*, 36(1), 206–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x>

Nothaft, H., Parche, S., Kamionka, A., & Titgemeyer F. (2003a). In vivo analysis of HPR reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 185 (3), 929-937. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.929-937.2003>

Nothaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M., & Titgemeyer, F. (2003b). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *Journal of bacteriology*, 185(23): 7019-7023. doi: 10.1128/JB.185.23.7019-7023.2003

Park, S. S., Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Kim, W. S., Sohng, J. K., Lee, H. C., Liou, K. K., & Kim, B. G. (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(8), 1073–1083. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0591-2>

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Ramos, I., Guzmán, S., Escalante, L., Imriskova, I., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S., & Langley, E. (2004). Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Research in microbiology*, 155(4), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.004>

Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H. K., Hopwood, D. A., Titgemeyer, F., & van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology*, 61(5), 1237–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05319.x>

Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), 670–675. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.83>

Rohl, C. A., Strauss, C. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. *Proteins*, 55(3), 656–677. <https://doi.org/10.1002/prot.10629>

Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D., & Sánchez, S. (2016a). Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. *BMC microbiology*, 16, 77. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0690-y>

Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Guzmán-Trampe, S., Maldonado-Carmona, N., Vázquez-Hernández, M., Zelarayán, A., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2017). Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(9), 162. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2328-0>

Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V. H., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2016b). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(6), 1152–1166. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2158-9>

Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(8), 1017–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.06.007>

Ruiz-Villafán, B., Rodríguez-Sanoja, R., Aguilar-Osorio, G., Gosset, G., & Sanchez, S. (2014). Glucose kinases from *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 6061–6071. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5662-2>

Ruiz-Villafán B, Cruz-Bautista R, Manzo-Ruiz M, Kumar Passari A, Villarreal-Gómez K, Rodríguez-Sanoja R, and Sánchez S. (2021). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microb. Biotechnol.* 14(3) doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13791>

Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Avalos, M., Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., & Ruiz, B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 442–459. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.78>

Segura, D., Santana, C., Ghosh, R., Escalante, L., & Sánchez, S. (1997). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia pacific journal of molecular biology and biotechnology*, 4, 30-36 <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030709465/en/>

Ser, H. L., Tan, L. T., Law, J. W., Chan, K. G., Duangjai, A., Saokaew, S., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Khan, T. M., Goh, B. H., & Lee, L. H. (2017). Focused Review: Cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived *Streptomyces*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02065>

Servín-González, L., Jensen, M. R., White, J., & Bibb, M. (1994). Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology (Reading, England)*, 140 (Pt 10), 2555–2565. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-10-2555>

Staunton, J., & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product reports*, 18(4), 380–416. <https://doi.org/10.1039/a909079g>

Stülke, J., & Hillen, W. (1998). Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Die Naturwissenschaften*, 85(12), 583–592. <https://doi.org/10.1007/s001140050555>

Studholme, D. J., Bentley, S. D., & Kormanec, J. (2004). Bioinformatic identification of novel regulatory DNA sequence motifs in *Streptomyces coelicolor*. *BMC microbiology*, 4, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-14>

Świątek-Połatyńska, M. A., Bucca, G., Laing, E., Gubbens, J., Titgemeyer, F., Smith, C. P., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2015). Genome-wide analysis of in vivo binding of the master regulator DasR in *Streptomyces coelicolor* identifies novel non-canonical targets. *PloS one*, 10(4), e0122479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122479>

Świątek, M. A., Tenconi, E., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2012). Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of

development and antibiotic production. *Journal of bacteriology*, 194(5), 1136–1144. <https://doi.org/10.1128/JB.06370-11>

Świątek, M. A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y. H., Laing, E., Kim, B. G., Smith, C. P., & van Wezel, G. P. (2013). The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 195(6), 1236–1248. <https://doi.org/10.1128/JB.02191-12>

Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2007). AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *Journal of molecular biology*, 369(2), 322–333. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.096>

Taylor, R. C., Brown, A. K., Singh, A., Bhatt, A., & Besra, G. S. (2010). Characterization of a beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 7), 1975–1982. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038802-0>

Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A., & Saier, M. H., Jr (1994). Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 140 (Pt 9), 2349–2354. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-9-2349>

Tsypik, O., Yushchuk, O., Zaburanyi, N., Flärdh, K., Walker, S., Fedorenko, V., & Ostash, B. (2016). Transcriptional regulators of GntR family in *Streptomyces coelicolor* A3(2): analysis in silico and in vivo of YtrA subfamily. *Folia microbiologica*, 61(3), 209–220. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0426-7>

van Wezel, G. P., White, J., Young, P., Postma, P. W., & Bibb, M. J. (1997). Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. *Molecular microbiology*, 23(3), 537–549. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.d01-1878.x>

van Wezel, G. P., König, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M., & Titgemeyer, F. (2007). A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a

glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 12(1-2), 67–74. <https://doi.org/10.1159/000096461>

Vockenhuber, M. P., & Suess, B. (2012). *Streptomyces coelicolor* sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the *dagA* coding region. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 2), 424–435. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054205-0>

14. APÉNDICE 1

Medio MS (Hobbs *et al.*, 1989)

Para 1 L de medio de cultivo:

- Agar 20 g
- Manitol 20 g
- Harina de soya 20 g
- Agua del grifo 1 L

Medio Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 2001)

Para 1 L de medio de cultivo:

- Difco Bacto™ triptona 10 g
- Difco extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g

Metanol acidificado.

Haciendo uso de un potenciómetro se mide el pH a 500 mL de metanol, se adiciona 10 μ L de HCl 1N (agregar poco a poco) y se mide el pH, esto se repite hasta llegar a un pH de 3.

Medio NMMP (Hodgson, 1982)

Para 1 L de medio de cultivo:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g
- Casaminoácidos 5 g
- Elementos traza 1 mL
- Agua destilada (ajustar volumen de acuerdo con el volumen empleado del buffer de fosfatos y la fuente de carbono) para los cultivos de 50 mL, añadir:
 - Buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.1 M pH 6.8) 7.5 mL
 - Glucosa 5% 5 mL
 - Agar parcialmente hidrolizado 5%* 5 mL

- Elementos traza (1 L):

ZnSO₄·7H₂O 1 g

FeSO₄·7H₂O 1 g

MnCl₂·4H₂O 1 g

CaCl₂ 1 g

* Para 300 mL de agar hidrolizado se pesan 15 gramos de agar de la marca Difco. Con ayuda de un potenciómetro se lleva a pH de 3 con una solución de HCl 1N y se esteriliza exactamente 20 min. Posteriormente, se enfría y se neutraliza con NaOH 1 M. Finalmente se esteriliza 20 min.

Extracción de RNA

Todo el material que se utilice para la extracción y manipulación de RNA debe ser esterilizado dos veces. De preferencia utilizar pipetas que se utilicen únicamente para la manipulación de RNA.

1. Tomar la muestra al tiempo deseado, el micelio se centrifuga y lava con agua desionizada o con RNAprotect (Qiagen) en tubos Eppendorf de 2 mL.
2. Tomar aprox. 300 mg de micelio (en volumen no más de 1 mL) y resuspender el micelio en 200 µL de buffer TE (Previamente esterilizado y filtrado) preparado con proteinasa K (20 µg/mL) y lisozima 25 mg/mL. Mezclar vigorosamente con Vórtex hasta homogenizar adecuadamente.
3. Inmediatamente añadir 2.5 volúmenes de RNAprotect (Qiagen) y mezclar con Vórtex 5s. Incubar 10 min a temperatura ambiente en agitación constante o agitar en Vórtex cada 2 min.

Si se procesan varias muestras al mismo tiempo, hacer los pasos 2 y 3 continuos por cada muestra para evitar la degradación de RNA.

4. Añadir 700 µL de buffer RLT (RNeasy mini kit, Qiagen) preparado con β-mercaptoetanol (10 µL/mL de buffer) o DTT (0.0155 g por cada mL de buffer o 20

μL de DTT 2 M por cada mL de buffer). Agitar vigorosamente hasta romper las células.

5. Centrifugar 10 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente.
6. Recuperar el sobrenadante. Limpiar la muestra con 1 volumen de fenol ácido pH 4 y mezclar 5 veces (*La mezcla se vuelve translúcida y una sola fase*). Agregar posteriormente 400 μL cloroformo (*para separar las fases*) mezclar 5 veces más y centrifugar 5 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente. Finalmente, se recupera la fase acuosa y se agrega un volumen de etanol absoluto.

Al añadir la mezcla de disolventes agitar suavemente por inmersión (con 5 veces es suficiente) para evitar la degradación de RNA.

7. Transferir la muestra a la columna del kit y centrifugar 1 min a 15000 rpm. Desechar el líquido.

Debido a que se tiene aproximadamente 1500 μL de volumen, la muestra se tendrá que transferir a la columna en dos rondas.

8. Añadir a la columna 700 μL de buffer RW1. Centrifugar 1 min a 15000 rpm. Desechar el líquido.
9. Añadir a la columna 500 μL de buffer RPE. Centrifugar 1 min a 15000 rpm. Desechar el líquido.
10. Añadir a la columna 500 μL de buffer RPE. Centrifugar 2 min a 15000 rpm. Desechar el líquido.

Si se requiere, transferir la columna a un tubo de colección limpio y centrifugar 1 min a 15000 rpm.

11. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL limpio y añadir 50 μL de agua MilliQ. Dejar reposar la columna con el agua durante 1 min. Centrifugar 1 min a 15000 rpm.
12. Añadir nuevamente 50 μL de agua MilliQ a la columna para eluir el RNA que pudo haber quedado en la columna. Dejar reposar la columna con el agua durante 1 min. Centrifugar 1 min a 15000 rpm.

Una vez extraída, es preferible almacenar la muestra de RNA a -70°C .

15. APÉNDICE 2

Secuencias de oligonucleótidos empleados en el análisis RT-qPCR.

Gen	Secuencia de oligonucleótido.
<i>glkA</i>	Fwd: 5' CTA CT TCGCGCCCAACAT 3' Rev: 5' GCCGCCGA ACTT GTACTC 3'
<i>dagA</i>	Fwd: 5' TTC ACT GACTGGCGAGAAG 3' REV: 5' TGG AATCCATTCC GAAAGAAGAG 3'
<i>sco1939</i>	Fwd: 5' ACGTGGCGTCGCTCTTC 3' Rev: 5' CCAGCAGCCACACCTCA 3'
<i>sco1701</i>	Fwd:5' CTCCAAGGCCAAGCTCTTC 3' Rev: 5' TACTCGTCGATGTAGCCGTAG 3'
ACTII	Fwd: 5' AAAGGAATATCGCGCACCTGGAAG 3' Rev: 5' GTTCCGGAATCATCGGCCCTATTC 3'
RedD	Fwd: 5' ATCTCATCAGCGCGATGTTCC 3' Rev: 5' ACCATCAGCAGCTCGCAGAAC 3'
RedZ	Fwd: 5' TCTTCACCATGGACAGCATCGAC 3' Rev: 5' GGCATTGACTTCGGTGATGGTTC 3'

ScuR	AYLCNYLPPG-LVDLDTGQL---E--ATGLYRLMRA-AGITLHSARQSIGARAATSGEAE	200
CguR	AILENYLPPA-FNDVSLDEL---E--KGGLYDALRS-RGVVLKIANQKIGARRAVGEEST	103
DasR	AIETHLSAKRFPALRRSLV---K--YTSLYTALAEVYDVHLAEAEETIETSLATPREAG	209
PhnF	GLETTKLPAQRYPGLRETFD---H--EASLYAEIRS-RGIAFTRTVDTIDTALPDAREAA	196
TreR	ILDKDYFFRKHVPHLTKEIC---E--NS-IYEYIEGELGLSISYAQKEIVAEPCTDEDRE	105
BcuR	IMEHTWMPISVIPGVEVSVL---E--ES-IYSHIQNKLGQVGTSVVVRVKGIRPDDKEKQ	105
Yurk	TFEVTHYPLDLFPGIDTFIA---D--GVSMHDILKQQYKVVPTHNTKLLNVVYAQQEESK	127
EfuR	CFEVASIPYSLVSQYGKSEI---T--NS-FYKTLEAKSGHKIGHSNQTI SAVQASEQIAE	102
StuR	CIEYSYYHKEIVKYLND DIA---K--GS-IFDYLESNMKLRIGFSDIFFNVDKLTSSEAS	117
Yydk	CYEESSYYTKSIVTYLNNEIV---S--HS-IFHYIREGLGLKIGFSDIFLHVQQLNEEEAE	191

SauR	TLGGVPGHVVLV LQR TYFA-SGRP VETADV VVPADRYRVAYHLPVK-----	272
TraR	-----	102
PsuR	LLQIDAGEPCLLIRRR TWS-GRQP VTAARLIHPGSRHRLEGRFTK-----	148
SCO3986	TLRINTALAVLAI TRVAADNTGRVVEAALLVFPGDRVD AVFSTHHVIEERQVHR	243
BbuR	LLGVEFGRPLLQVDRI SYTYGDRPMEVRRGLYLT DHYHYRNSLN-----	162
ScuR	RLGEDAGAPLLT MERTTFDDTGRAVEFGTHTYRPSRYSFEFQLLVRP-----	247
CguR	LLDIEDGGPLLTV ERVALDNSGQVIELGSHCYRPMYNFETT LVAR-----	149
DasR	LLGTDVGLPMLMLSRHSQDR TGQPVEWVRSVYRGDRYKFVARLKR PQD-----	257
PhnF	LLGADARTPMFLLNRVSYDQDDVAIEQRRLYRGDRMTFTAVMHAKNSAIVS--	248
TreR	LLDLRGYDHMVVVRNYVFLEDTSLFQYTESRHR LDKFRFVDFARRGK-----	152
BcuR	FMNL TNQDFLMRVEQVAYLTDGRTFEYSYADHLPETFE-----	143
Yurk	YLCDIGDALFEIDKTAFTSNDQPIYCSLFLMHTNRVTFTINSPYT-----	173
EfuR	YLEIKRGDAILRVQVSYFENGLPF EYVRTQYAGSRFEFYLEK-----	145
StuR	LLQLSTGEPCLRYHOTFYTMTGKPF DSSDIVFHYRHAQFYIPSKK-----	162
Yydk	YLGLEAGLPKLYIESIFHLTNGQPF DYSKISYNYEQSQFVVQANSFLL-----	239