



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Clonación y análisis del promotor del gen
sp7066 de *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A

ALBA ICXIUH ROMERO RODRÍGUEZ



Tutor: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

México, D.F.

Junio 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, en el laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de la tesis lo conformaron los siguientes investigadores:

- Dra. Maricarmen Quirasco Baruch (Facultad de Química)
- Dra. Elizabeth Langley McCarron (Instituto Nacional de Cancerología)
- Dr. Sergio Sánchez Esquivel (Instituto de Investigaciones Biomédicas)

El jurado de examen para optar por el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas) estuvo constituido por:

- Presidente Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte
- Vocal Dra. Romina Rodríguez Sanoja
- Secretario Dra. Herminia Loza Tavera
- Suplente Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
- Suplente Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su tiempo y por dirigir de la mejor manera este trabajo. Particularmente le agradezco el haber escuchado mis comentarios e inquietudes y hacerme partícipe de las suyas. Gracias por su interés, paciencia, comprensión y ejemplo.

A la Dra. Romina Rodríguez por su disposición y compromiso durante toda mi formación y en la revisión de este trabajo. Gracias por sus valiosas aportaciones y por ayudarme en mi desarrollo académico. También le agradezco todas las veces que me permitió el uso de los equipos de su laboratorio.

A la M. en B. Beatriz Ruíz por haberme recibido en el laboratorio con la mejor disposición y una sonrisa. Por tus asesorías técnicas y académicas, además de las personales. Por siempre tener un momento para resolver mis inquietudes aunque a veces fueran muy extrañas. Gracias Betty.

A la Dra. Maricarmen Quirasco y a la Dra. Elizabeth Langley por todas sus aportaciones, comentarios, críticas y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la Biol. Laura Escalante por todas sus atenciones.

Al Dr. Jorge M. Vázquez uno de mis profesores e investigadores ejemplo. Por darme la oportunidad de experimentar la docencia bajo su dirección y por estar siempre dispuesto a enseñarme. Desde muy diversos aspectos esta ha sido una experiencia muy valiosa en mi vida y por ello le agradezco la confianza que me brindó.

A mis sinodales

A la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte por su amabilidad y aportaciones en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por su compromiso y dedicación en la revisión de esta tesis. Gracias por su interés y por enseñarme lo valioso que es expresarse adecuadamente y hacer las cosas bien. Aprendí mucho de sus comentarios personales y académicos.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por todas sus aportaciones durante mi formación y en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio por su muy completa revisión, sugerencias y preguntas que enriquecieron esta tesis.

A la UNAM porque esta institución y todos los que la conforman me han dado una formación integral y, a partir de ahí, un nuevo enfoque de la vida. Es un gran orgullo formar parte de esta universidad pero también es una gran responsabilidad.

Agradecimientos

A mis papás. Por hacer lo mejor posible. Por ser mi faro y mi mayor fuente de apoyo. Gracias por enriquecer mi vida con sus comentarios y sugerencias pero permitiéndome ser quien soy. Gracias por ayudarme en el camino que he elegido.

A mis hermanas de quienes y por quienes he aprendido mucho. A mis sobrinas Indra y Naty sus vidas han enriquecido la mía. Gracias por los abrazos, los juegos, los besos y las risas. Gracias por regalarme tantos momentos divertidos y felices.

A mis amigas de siempre Cristina, Liliana y Paola gracias por seguir compartiendo conmigo y brindándome su apoyo en cada momento. Son excelentes amigas y espero también serlo para ustedes.

A Mariana Ledezma por las largas conversaciones y los análisis existenciales. Gracias por tu amistad siempre dispuesta.

A Víctor G. García por las desmañanadas en clase de Bioquímica, por las comidas y las escapadas a la Cineteca. Gracias por siempre echarme porras.

A los miembros del laboratorio de la Dra. Romina por las veces que me adoptaron en su laboratorio y por las conversaciones.

A todos los miembros del Laboratorio de Microbiología Industrial por hacer tan buen ambiente y por toda la diversión, si empiezo a nombrarlos no acabo....somos muchos los Sánchez. En este lugar encontré muchos compañeros agradables de quienes aprendí pero también encontré nuevos amigos, ahora personas especiales en mi vida:

A Yolanda García, Yolis, eres una persona muy especial y espero que lo sepas. Te agradezco todas las veces que me has escuchado y consolado pacientemente. Te agradezco todo lo que has compartido conmigo y todas las veces que me has hecho reír. En fin, gracias por tu amistad.

A Tania Gil, Tanis, por las largas pláticas, las inquietudes compartidas, las comidas y toda tu amabilidad. Gracias por compartirme tu visión de la vida y por explorar Acapu conmigo.

A Mauricio Sánchez gracias por ser mi cómplice en inquietudes e inconformidades... gracias por las conversaciones biológicas y técnicas. Por siempre estar dispuesto a compartir, desde una idea hasta una naranja.

A Naholi por todo el camino recorrido, por lo dulce y lo amargo. Los momentos felices y de apoyo mutuo son gratos recuerdos en mi memoria. Los momentos tristes y difíciles me han servido para encontrar mi propia fortaleza, para promover mi crecimiento y para encontrarme conmigo misma. Te agradezco todo lo que aprendí contigo y promovido por ti. Si la felicidad (autorrealización, iluminación, paz....) es una cima (camino, elección...), espero nos encontremos allí. Querrá decir que llegaste. Querrá decir que yo también lo conseguí.

*Las cadenas de la esclavitud solamente atan las manos: es la mente lo que
hace al hombre libre o esclavo.*

Franz Grillparzer

Aprender es descubrir que algo es posible

Fritz Perls

ÍNDICE GENERAL

Pag.

Índice General.....	I
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	IV
Introducción.....	V
1. Antecedentes o Marco teórico.....	1
Características del género <i>Streptomyces</i>	1
Ciclo de vida	2
Importancia del género <i>Streptomyces</i>	4
Sistemas de transporte bacterianos.....	5
Sistemas de transporte en estreptomicetos.....	8
Regulación de la expresión génica en <i>Streptomyces</i>	13
Represión catabólica.....	16
2. Antecedentes inmediatos.....	22
3. Objetivos.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares.....	26
4. Metodología.....	27
Estrategia general.....	27
Búsqueda <i>in silico</i>	28
Corroboración de las regiones promotoras.....	29
Conservación de cepas y medios de cultivo.....	29
Extracción de DNA.....	31
Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
Clonación y secuenciación de las regiones promotoras.....	31
Construcción de la fusión promotor de <i>sp7066</i> -pIJ8660.....	33
Transformación de células de <i>E. coli</i> y conjugación intergenérica.....	35
Regulación transcripcional del promotor <i>sp7066</i> : expresión de la proteína verde fluorescente.....	36
Determinación de crecimiento, proteína y carbohidrato residual.....	37
Preparación de geles de acrilamida.....	38
5. Resultados y discusión.....	39
Análisis <i>in silico</i> del transportador de glucosa en el genoma de <i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	39
Amplificación, clonación y análisis de la región del promotor de <i>sp7066</i>	42

Construcción de la fusión del promotor de <i>sp7066</i> al gen reportero <i>egfp</i>	48
Conjugación intergenérica.....	49
Expresión de eGFP.....	50
Ensayos de inducción con diversas fuentes de carbono.....	54
Efecto del pH.....	56
Efecto del producto del gen <i>sco2127</i>	57
6. Conclusiones y consideraciones finales.....	59
7. Perspectivas.....	61
8. Referencias.....	62
9. Apéndice.....	68

ABREVIATURAS

ABC	Cassette de unión a ATP
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Herramienta de alineamiento local
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CcpA	Proteína de control catabólico
cre	Elemento de respuesta a catabolito
CRP/CAP	Proteína activadora del catabolismo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dog	Desoxiglucosa
EGFP	Proteína verde fluorescente <i>enhanced</i>
FW	Oligonucleótido <i>forward</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GlcP	Permeasa de glucosa
GIK	Glucosa cinasa
HPr	Proteína que contiene una histidina como transportadora de fosfato
MCS	Sitio múltiple de clonación
MFS	Super familia de los facilitadores mayores
MIP	Major intrinsic proteins
MM	Medio mínimo
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NBDs	Dominios de unión a nucleótidos
NCBI	Centro Nacional para la Información biotecnológica
ORF	Marco de lectura abierto
oriT	Origen de transferencia
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenol piruvato
PRDs	Dominios susceptibles a regulación por PTS
PTS	Sistema de de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato
RCC	Represión catabólica por carbono
RV	Oligonucleótido reverse
SSS	Superfamilia de los transportadores de solutos dependientes de sodio
TMDs	Dominios transmembranales
HPrK/P	HPr cinasa/ fosfatasa
TIR	Secuencias invertidas repetidas

RESUMEN

Se ha descrito que uno de los fenómenos de regulación de la expresión génica, denominado represión catabólica por carbono, interfiere en la síntesis de los metabolitos secundarios y, por tanto, en la producción a nivel industrial de los mismos. Aunque definido en los organismos modelo por excelencia, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, este fenómeno en las bacterias del género *Streptomyces* continua siendo un enigma.

En estudios recientes se ha descrito un papel preponderante de la enzima glucosa cinasa y de la región denominada *sco2127* en este fenómeno, aunque aún se desconoce su papel. Se ha observado que la sobreexpresión de *glk* en mutantes insensibles a la concentración de glucosa en el medio, restaura la sensibilidad, al restaurar la actividad de *Glk*, sin embargo la sobreexpresión de sólo la región *sco2127* incrementa además el transporte de glucosa. Siendo que *SCO2127* no codifica para ningún tipo de transportador y considerando lo poco que se sabe acerca del sistema de incorporación de glucosa en la cepa modelo de nuestro grupo, *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*, el presente trabajo tuvo como objetivos la identificación de un transportador de glucosa así como su regulación a nivel transcripcional. Con este objetivo se realizaron una serie de estudios bioinformáticos para encontrar el gen de la permeasa de glucosa en dicho microorganismo. De las secuencias analizadas la región identificada como *sp7066* fue aquella con las mejores probabilidades de ser una permeasa de glucosa. El promotor de dicho gen fue fusionado a un gen reportero y se analizó la regulación transcripcional. En estudios de inducción empleando diversas fuentes de carbono se encontró inducibilidad de la transcripción exclusiva por glucosa y su análogo no metabolizable, 2-desoxiglucosa. Por otra parte, además de los ensayos de inducción por fuente de carbono, se realizaron ensayos de inducción mediante cambios en el pH extracelular sin embargo, el promotor putativo no responde a dichas variaciones. Adicionalmente, el sistema reportero se ensayó en una mutante *Streptomyces coelicolor* Δ *sco2127* y la interrupción de dicho gen parece no tener efecto alguno sobre la expresión cualitativa de la presunta permeasa de glucosa (gen *sp7066*).

INTRODUCCIÓN

En nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado al estudio del fenómeno de represión catabólica por carbono en bacterias del género *Streptomyces*. Utilizamos como organismos modelo a *S. coelicor*, que si bien no es productor de compuestos de interés biológico o biotecnológico, es el organismo mejor caracterizado de este género hasta el momento. A la par, también estudiamos al microorganismo *S. peucetius* subsp. *caesius* por ser el productor del antitumoral doxorubicina, compuesto que actualmente se emplea en la clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Este organismo, pese a su importancia, no ha sido tan ampliamente estudiado y aún no se cuenta con la secuencia completa de su genoma. Sin embargo, el grupo que se encuentra secuenciando a este microorganismo nos ha facilitado algunas de dichas secuencias.

A pesar de todos los estudios que se han llevado a cabo en las bacterias de este género, el mecanismo de represión catabólica sigue constituyendo un enigma. Poco a poco se han descubierto piezas claves que comienzan a arrojar un poco de luz acerca de la regulación de este fenómeno en los estreptomicetos. Dentro de estos estudios se ha encontrado que la glucosa cinasa, además de su papel dentro de la glucólisis parece tener un papel regulador. Otro gen de interés es el denominado *sco2127*, sin embargo, al estudiar la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos no se han podido establecer motivos conservados que permitan inferir cuál es su papel en dicho fenómeno, aunque algunas evidencias experimentales sugieren un efecto positivo sobre la expresión y/o actividad de la glucosa cinasa y sobre el transporte de glucosa.

Con respecto al efecto positivo sobre la incorporación de glucosa, no sabemos si esto es debido a interacciones proteína-proteína o a una regulación a nivel transcripcional del transportador de glucosa, cuyo gen, hasta ahora es desconocido.

En este panorama, en este trabajo se encontrará y caracterizará a un transportador de glucosa en *S. peucetius* subsp. *caesius* y se determinará si la influencia del gen *sco2127* está dada a nivel transcripcional.

ANTECEDENTES

I. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO STREPTOMYCES

Los *Streptomyces* (del latín *streptos* “curvo”, “torcido”; *myces* “hongo”) son bacterias Gram- positivas clasificadas en el orden de los actinomicetales. Las bacterias pertenecientes a este género poseen genomas ricos en guanina y citosina (60-70%) (Hopwood, 2006). Morfológicamente se caracterizan por poseer una estructura similar a la de los hongos filamentosos; sin embargo, los filamentos de los actinomicetos consisten en células procarióticas con diámetros mucho menores que aquellos de los hongos. Además de las características morfológicas, comparten con los hongos un ciclo de vida similar, y son generalmente saprófitos de suelos. Tales similitudes parecen ser el resultado de adaptaciones a nichos ecológicos similares pero los mecanismos parecen tener orígenes evolutivos distintos (Flardh and Buttner, 2009; Challis, 2003).

Además de constituir alrededor del 10% de la microbiota de los suelos, también se han aislado de ambientes acuáticos, en asociaciones simbióticas o parasitarias con plantas y animales (Schrey and Tarkka, 2008).

En términos nutricionales, físicos y biológicos, el suelo es uno de los ambientes más complejos y variables. Por esta razón, los organismos habitantes han desarrollado una serie de ciclos biológicos complejos (un patrón de crecimiento filamentosos les confiere ventajas de supervivencia en dicho ambiente), producción de enzimas y metabolitos secundarios que promueven su supervivencia (Bentley, *et al.*, 2002; Hopwood, 2006).

Un análisis genómico *in silico* demostró la existencia de una gran densidad génica y se ha predicho que poseen aproximadamente 7,500 genes que corresponden al doble de regiones codificables en otras bacterias. Esto indica que el género *Streptomyces* posee una gran diversidad metabólica (Bentley *et al.*, 2002).

A nivel genético y a diferencia de la mayoría de las bacterias, el cromosoma de los estreptomicetos es lineal. Posee una región central que se encuentra altamente conservada, flanqueada por dos brazos que están sujetos a una intensa variabilidad genética. Los genes localizados en la región central son esenciales para la vida de la bacteria, dichos genes poseen el mismo orden y dirección en el genoma de diferentes especies de *Streptomyces* (Paradkar, 2003; Ikeda *et al.*, 2003). Los genes localizados en los brazos no son esenciales, como aquellos para la producción de metabolitos secundarios y exoenzimas hidrolíticas.

Las regiones terminales del cromosoma son secuencias invertidas repetidas (TIR) o regiones teloméricas. Las regiones TIR, son variables en secuencia y tamaño. En estas secuencias se encuentran proteínas unidas covalentemente, que mantienen estable al cromosoma lineal. (Ikeda *et al.*, 2003). En la región central del cromosoma se localiza el origen de replicación (*oriC*), indicando que el proceso de replicación es bidireccional hacia la región telomérica (Huang, *et al.*, 1998; Hopwood, 2006).

Algunas bacterias de este grupo también poseen plásmidos de un tamaño variable (de 9 Kb hasta 350 Kb) que les confieren ventajas tales como la producción de antibióticos, resistencia a metales pesados y degradación de xenobióticos.

II. CICLO DE VIDA

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo, el cual puede ser dividido en tres etapas: crecimiento vegetativo, formación de hifas aéreas y la diferenciación de esas hifas en cadenas de esporas. El ciclo de *Streptomyces* comienza cuando una espora germina en un medio con nutrientes y condiciones adecuadas, dando lugar al crecimiento de tubos germinales que crecen hasta formar hifas. Las hifas crecen por extensión apical y se ramifican dando lugar a el denominado micelio vegetativo. En respuesta a la eliminación de nutrientes y otras señales se inicia, tanto la producción de metabolitos secundarios como la diferenciación morfológica. El micelio aéreo se diferencia del micelio vegetativo por poseer una capa externa muy hidrofóbica. En tal punto, se activan vías de señalización que permiten a las hifas aéreas romper la tensión superficial y escapar del ambiente acuoso del

micelio vegetativo y crecer aéreamente nutriéndose de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente, las hifas aéreas comienzan a enrollarse y septarse para dar lugar a la formación de cadenas de esporas (Fig. 1). Este proceso se acompaña de una segregación ordenada de cromosomas, dando como resultado final esporas con un solo cromosoma. Las esporas resisten bajas concentraciones de agua y son tolerantes a ambientes salinos a pesar de ser menos resistentes que las endoesporas formadas por especies de *Bacillus* (Hopwood, 2006; Claessen *et al.*, 2006; Chater, 2006; Paradkar *et al.*, 2003).

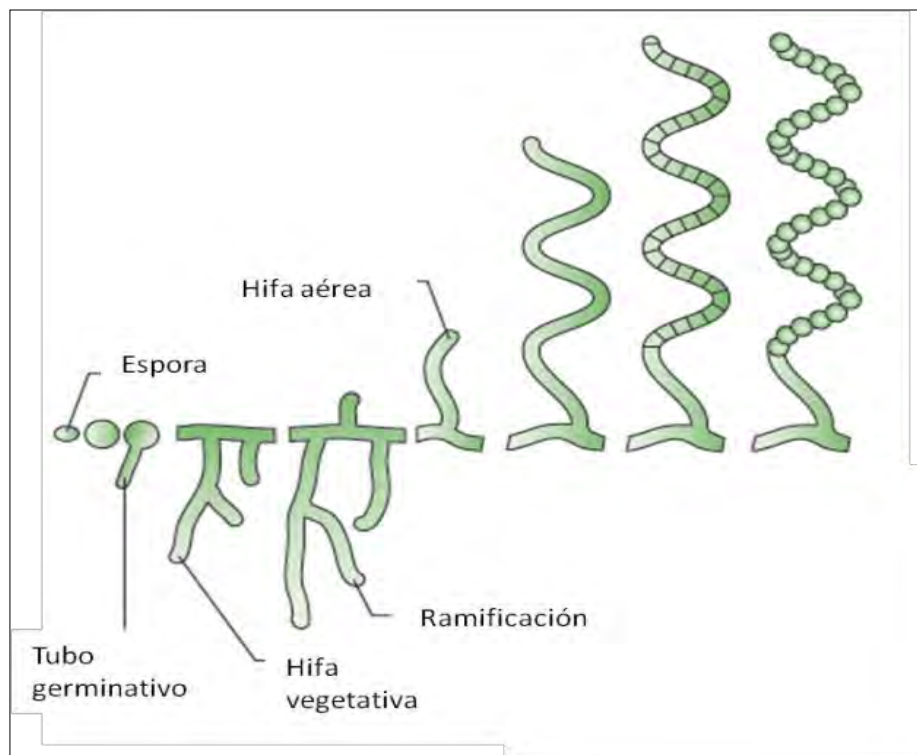


Figura 1. Ciclo de vida de *S. coelicolor* cuando una espora encuentra un medio apropiado germina dando lugar a la formación de un micelio vegetativo. Una vez que los nutrientes en el medio se han agotado comienza a emerger el micelio aéreo a expensas de la lisis del micelio vegetativo. Las hifas del micelio aéreo comienzan a enrollarse y septarse para dar lugar a cadenas de esporas (Flardh and Buttner, 2009).

III. IMPORTANCIA DEL GÉNERO STREPTOMYCES

En el ambiente estos microorganismos son importantes en el ciclo del carbono al metabolizar compuestos complejos, por ejemplo quitina y lignina, mediante una variada gama de enzimas hidrolíticas extracelulares (xilanasas, amilasas, celulasas, lipasas), permitiendo la disponibilidad de esqueletos carbonados más sencillos para microorganismos incapaces de utilizar sustratos complejos (Hodgson, 2000).

Por otra parte, durante el ciclo de vida de los estreptomicetos, además de los cambios morfológicos que sufren, existe un fenómeno paralelo de diferenciación fisiológica. Así, cuando el crecimiento se detiene (idiofase) se sintetizan una gran variedad de moléculas de naturaleza química variable denominados metabolitos secundarios. Los genes para la producción de metabolitos secundarios se encuentran regulados por otros genes que controlan el tiempo y nivel de expresión. Estos metabolitos no son esenciales para el crecimiento pero se les ha conferido una ventaja competitiva para el organismo productor, además, suelen ser específicos de cada especie.

Las vías biosintéticas involucradas en la formación de metabolitos secundarios generalmente implican la formación de compuestos aromáticos, isoprenos, oligosacáridos, péptidos, policétidos y anillos β -lactámicos. La formación de dichos compuestos puede ocurrir vía complejos enzimáticos, o proteínas actuando individualmente (Demain, 1998; Ruíz *et al.*, 2009).

A pesar de que los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento de sus organismos productores, en el género *Streptomyces* se ha determinado que la mayoría de los genes de metabolismo secundario son de origen cromosomal.

En conjunto con la producción de enzimas extracelulares, los metabolitos secundarios han sido aprovechados en la industria y en la medicina (Paradkar, *et al* 2003). Por ejemplo, los miembros del género *Streptomyces* son los principales productores de antibióticos utilizados comercialmente (Watve *et al.*, 2001; Bibb, 2005), de los cuales los más usados son la estreptomicina (producida por *Streptomyces griseus*), la tetraciclina (producida por *Streptomyces rimosus*) y el cloramfenicol (producida por *Streptomyces venezualae*).

En la Tabla 1 se señalan compuestos producidos y utilizados industrialmente por algunos miembros del género *Streptomyces*

Tabla 1. Metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces* adaptado de Hopwood, 2000.

Microorganismo	Tipo de metabolito	Ejemplo
<i>Streptomyces lividans</i>	Enzima extracelular	Xilanasas
<i>Streptomyces griseus</i>	Antibiótico	Estreptomicina
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Antibiótico	Cloranfenicol
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicida	Bialafos
<i>Streptomyces tsukabimensis</i>	Inmunosupresor	FK506
<i>Streptomyces achromogenes var. streptozoticus</i>	Inhibidor de β -lactamasas	Ácido clavulánico
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Antiparasitario	Avermectina

De manera adicional, varios genes de enzimas del metabolismo secundario se comienzan a emplear para la formación de clusters artificiales para la biosíntesis de nuevos compuestos, en la llamada biosíntesis combinatoria. Otra posibilidad que actualmente se plantea, es el uso de miembros del género *Streptomyces* como *reactores* o *bolsas enzimáticas* para la producción de compuestos complejos que difícilmente pueden ser obtenidos en bacterias como *Escherichia coli*, dado que estos microorganismos naturalmente presentan varios sistemas de exportación y sistemas enzimáticos complejos (Ohnishi *et al.*, 2005).

IV. SISTEMAS DE TRANSPORTE BACTERIANOS

Las membranas plasmáticas constituyen una barrera selectivamente permeable entre la célula y el ambiente extracelular. Su baja permeabilidad asegura que las moléculas esenciales como iones, fuentes de carbono, aminoácidos y lípidos entren a la célula de manera controlada, que los metabolitos intermediarios permanezcan dentro de ella, y que los compuestos de desecho abandonen la célula. El movimiento de prácticamente todas las moléculas y iones es mediado por proteínas transportadoras embebidas en la membrana. Así, los sistemas de transporte son esenciales en cada célula viva ya que permiten la internalización de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y reproducción de la

célula, regulan las concentraciones citoplásmicas de metabolitos, iones y solutos mediante procesos de importación o exportación (Pao *et al.*, 1998; Konings, 2006). De hecho, el transporte es un paso esencial en diversos procesos que sostienen la vida como el metabolismo, la comunicación, la biosíntesis y la reproducción.

Dada la constitución de las membranas biológicas éstas son prácticamente impermeables sin embargo, existen algunas moléculas movilizadas como resultado de un fenómeno espontáneo de difusión pasiva a través de la bicapa de fosfolípidos sin gasto energético, porque el movimiento es a favor del gradiente de concentración (transporte pasivo). La velocidad de difusión está determinada por el gradiente de concentración, el tamaño relativo de la molécula y su carga. Son pocas las moléculas que son incorporadas eficientemente por este fenómeno, como son los gases O₂ y CO₂, moléculas polares pequeñas no cargadas, como la urea y el etanol.

Es por lo anterior evidente la necesidad de las células de contar con proteínas de membrana especializadas en el transporte de moléculas. Las bacterias emplean diversas estrategias para llevar a cabo la importación y exportación de moléculas (Konings, 2006).

i. *Difusión facilitada.*

Se refiere a canales formados por proteínas que permiten el flujo pasivo pero controlado de solutos dentro o fuera de la célula, es decir, a favor de sus gradientes eléctricos o de concentración. Las proteínas canal forman un pasadizo hidrofílico a través de la membrana por el cual atraviesan simultáneamente iones, agua u otras moléculas. Algunos canales se encuentran abiertos durante mucho tiempo; éstos son denominados de compuerta abierta. La mayoría de los canales se abren solamente como respuesta a una señal química o eléctrica; éstos se denominan de compuerta cerrada.

ii. *Sistemas de transporte primario.*

Son sistemas que emplean energía para movilizar solutos contra su gradiente de concentración, potencial eléctrico o ambos. Es decir, el transporte se encuentra acoplado a una reacción que provee la energía necesaria para el mismo. Dentro de este grupo se encuentran las bombas ATP (sistemas acoplados a ATPasas); los transportadores de tipo ABC (de inglés ATP Binding Cassette).

iii. *Sistemas de transporte secundario.*

Éstos emplean los potenciales electroquímicos generados por el transporte primario para la movilización de solutos. En este grupo se encuentran los uniportadores, los antiportadores y simportadores. Los dos últimos acoplan el movimiento de un tipo de ion o molécula contra su gradiente de concentración con el movimiento de otro soluto a favor de su gradiente de concentración.

iv. *Sistemas de secreción de proteínas.*

Emplean la hidrólisis de ATP o potenciales electroquímicos para trasladar proteínas a través de la membrana.

v. *Sistemas de traslocación de grupo.*

Acoplan la traslocación de un sustrato y su modificación química; el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS) acopla el transporte de carbohidratos y la fosforilación de la molécula.

En la Fig. 2 se resumen las estrategias bacterianas para el transporte de solutos.

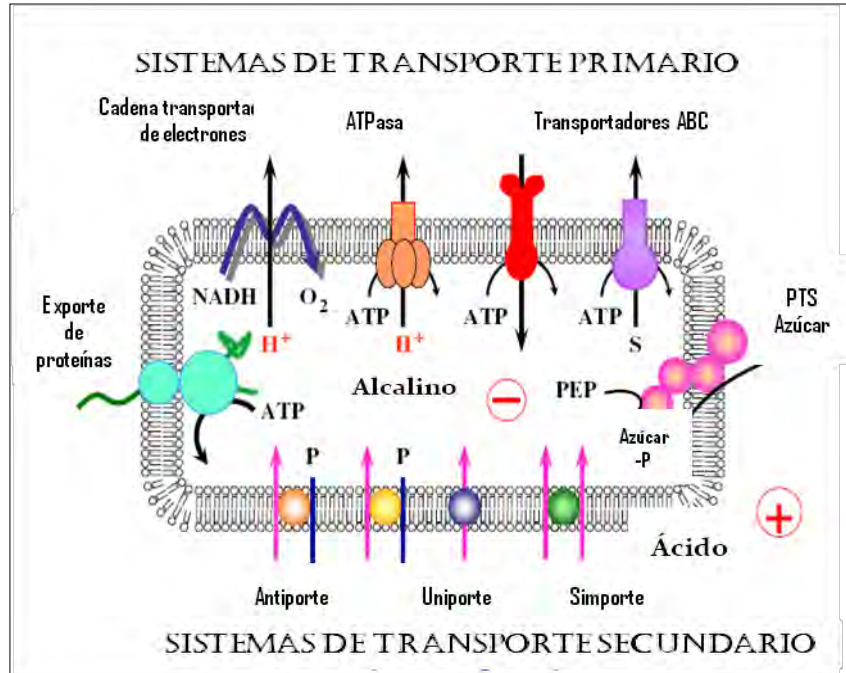


Figura 2. Resumen de los sistemas de transporte bacteriano. Modificado de Konings, 2006. La presencia e importancia de los diferentes sistemas de transporte varía entre diferentes organismos. Un análisis en el genoma de bacterias y arqueas demostró que más del 20% de los genes codifican proteínas de membrana.

V. SISTEMAS DE TRANSPORTE EN EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

En el caso del género *Streptomyces* un estudio *in silico* del genoma de *S. coelicolor* predijo la existencia de 53 sistemas de transporte para carbohidratos. En éstos se incluyen, 14 permeasas de la familia ABC, 4 permeasas del sistema PTS, 2 copias de un presunto transportador de carbohidrato de la familia MFS (del inglés Major Facilitator Superfamily), un miembro de la familia de transportadores dependientes de sodio SSS (del inglés superfamily of sodium dependent solute transporters) y un facilitador de la familia MIP (del inglés Major Intrinsic Proteins) (Bertram *et al.*, 2004).

En este estudio se resalta la gran cantidad de genes de *S. coelicolor* relacionados con el transporte de solutos no sólo de carbohidratos sino también de nucleósidos, oligopéptidos y exportación de antibióticos. Por ejemplo, los sistemas de transporte tipo ABC se encuentran codificados 5-10 veces más que en otras bacterias.

Los transportadores pertenecen al menos a 300 diferentes familias de proteínas, las dos más grandes son los transportadores primarios ABC y los transportadores secundarios MFS.

a. *Sistemas de transporte ABC.*

Estos sistemas de transporte se encuentran ampliamente distribuidos entre los seres vivos y se han encontrado en todos los reinos. La evidencia filogenética sostiene la teoría de que la familia de transportadores ABC diversificó antes que las bacterias, arqueas y eucariontes divergieran, de esta manera muchos transportadores ABC humanos tienen sus homólogos respectivos en *E. coli*. Estos sistemas acoplan la energía de la hidrólisis del ATP a diferentes fenómenos biológicos, relacionados no solamente con el transporte transmembranal, sino también con procesos como la reparación del DNA, durante la elongación de la traducción. Actualmente, en células eucariotas, se han estudiado extensamente debido a que están relacionados con diversas enfermedades humanas hereditarias y con el transporte de fármacos anticancerígenos por células cancerosas. En procariontes se les ha relacionado con supervivencia, virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos (Moussatova, *et al.*, 2008).

Los sistemas ABC pueden ser divididos en tres categorías funcionales principales (Davidson, *et al.*, 2009). Importadores median la incorporación de nutrientes en procariontes. Los sustratos incorporados varían ampliamente en estructura y naturaleza, incluyendo mono y disacáridos, iones orgánicos e inorgánicos, aminoácidos, péptidos, sideroforos de hierro, metales, opinas, vitaminas y poliaminas. Los exportadores están involucrados en la secreción de varias moléculas, como péptidos, lípidos, fármacos hidrofóbicos, polisacáridos y proteínas, incluyendo toxinas como la hemolisina. En el tercer grupo se encuentran los sistemas aparentemente no relacionados con el transporte sino involucrados en la traducción del mRNA y en la reparación del DNA. Cabe resaltar, que algunos transportadores ABC se han adaptado para el transporte específico de moléculas regulatorias y, por tanto son importantes en la regulación de la fisiología celular. Ejemplos de estos se han observado en el sistema BldK de *S. coelicolor* A3 el cual importa un oligopéptido requerido para la formación de micelio aéreo; y el sistema AmfAB

probablemente también involucrado en el transporte de un compuesto necesario para la formación de micelio aéreo en *S. griseus* y *S. coelicolor*.

Todos los transportadores ABC comparten una estructura base sin importar si actúan como importadores o exportadores. Están formados por dos dominios transmembranales (TMDs) y dos dominios de unión a nucleótido (NBDs). El primero consiste en una serie de α -hélices transmembranales que constituyen el canal transportador, presentan variabilidad estructural considerable entre los transportadores ABC. El número de hélices transmembranales varía entre 8-20 para los importadores y 12 para los exportadores.

El segundo consiste de proteínas hidrofílicas asociadas a las proteínas transmembranales y se encuentra altamente conservado entre la familia ABC. Consiste de los motivos característicos (Walker A y Walker B) encontrados en todas las proteínas de unión a ATP (así como un motivo C característico de esta familia de transportadores. Estos dominios son los encargados de unir e hidrolizar ATP proporcionando la energía necesaria para el transporte. La unión al ATP induce un cambio conformacional en los NBDs, acercándolos para formar el característico sándwich de nucleótido. Tales cambios son transmitidos a los TMDs, ocasionando un cambio conformacional que abre un conducto entre los TMDs hacia fuera o dentro de la célula.

Entre los transportadores ABC más estudiados se encuentra el de maltosa de *E. coli*, pero al final del año 2007, se habían obtenido las estructuras cristalinas de 91 transportadores ABC de más de 45 sistemas ABC diferentes.

b. *Sistemas de transporte de la familia MFS.*

Los miembros de esta familia, al igual que los miembros del sistema ABC, son ubicuos en todos los dominios de la vida y en todas las células. Mecánicamente, se pueden clasificar en: uniportadores, transportan solamente un tipo de sustrato y son energizados solamente por el gradiente electroquímico; simportadores, translocan en la misma dirección uno o más sustratos simultáneamente, haciendo uso del gradiente electroquímico de un sustrato como fuerza motriz; antiportadores, los cuales transportan uno o más sustratos en dirección opuesta a través de la membrana. Son capaces de transportar una enorme diversidad de sustratos: iones, azúcares, neurotransmisores, nucleósidos, aminoácidos,

péptidos, entre otras moléculas hidrofílicas (Law *et al.*, 2008). En bacterias, las proteínas MFS son principalmente responsables de la incorporación de nutrientes, aunque algunas pueden actuar como bombas exportadoras de fármacos y están relacionadas con el desarrollo de resistencia a antibióticos.

Los análisis de hidropatía y estudios topológicos predicen que la mayoría de las proteínas MFS poseen una topología uniforme de 12 α -hélices transmembranales conectadas por asas hidrofílicas, con los extremos terminales N y C dentro del citoplasma (Fig. 3). Existen excepciones a la regla anterior, algunas familias MFS poseen 14 dominios transmembranales (TMDs), otras sólo 6 TMDs y algunas otras pueden tener 24 TMDs.

Los miembros de esta familia mejor caracterizados son el simportador LacY lactosa/H⁺ de *E. coli* del cual se ha resuelto la estructura (Abramson *et al.*, 2009) y el transportador humano de glucosa Glut1. En el caso de *S. coelicolor*, se determinó que el transportador de glucosa (GlcP) es miembro de esta familia (van Wezel *et al.*, 2005). Sin embargo, dada la relevancia que pueden tener estos sistemas (patogénesis, represión por carbono, etc.) es indispensable caracterizar más miembros de esta familia.

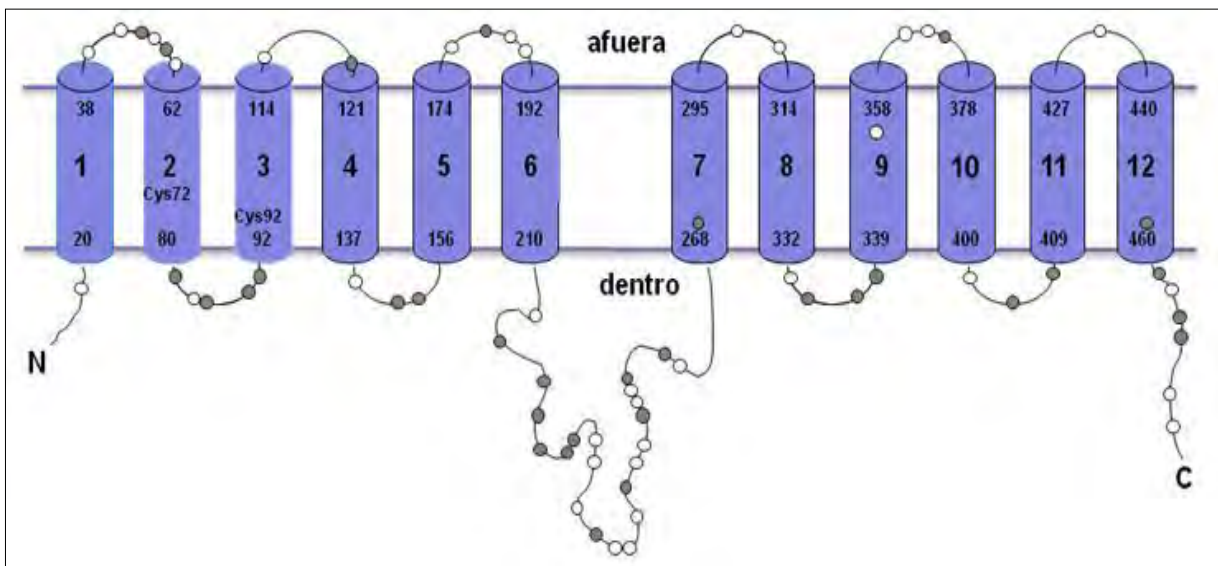


Figura 3. Estructura típica de los transportadores de la familia MFS. Se muestran las 12 asas transmembranales características de estos sistemas (van Wezel *et al.*, 2005).

c. Sistema PTS.

El sistema PTS es una vía de transporte de carbohidratos ubicada en eubacterias no descrita ni en arqueas ni en eucariotes. Este sistema utiliza el fosfoenolpiruvato (PEP) para catalizar el transporte y la fosforilación concomitante (formación del fosfoéster) de diversas hexosas, entre ellas, N-acetilmanosamina, glucosa, manosa, glucosamina y N-acetilglucosamina (Siebold *et al.*, 2001). Algunas de las proteínas de este sistema tienen un papel en la transducción de señales intracelulares además de su función dentro del transporte. Tales subunidades regulan sus blancos de manera alostérica o por fosforilación.

La estructura base de este complejo multienzimático es similar en todas las especies estudiadas. Comprende dos componentes citoplásmicos EI y HPR, los cuales son comunes a todos los carbohidratos transportados por este sistema. La especificidad del sistema reside en las proteínas denominadas EII, de tal manera que una bacteria puede tener diferentes EIIs.

Cada complejo EII consiste en uno o dos dominios hidrofóbicos integrales (dominios C y D) y dos dominios hidrofílicos (dominios A y B). Los dominios anteriores, en conjunto son los responsables del transporte de carbohidrato y su fosforilación (Fig. 4).

Todas las reacciones de transferencia de grupo fosfato entre las proteínas del PTS son reversibles; de tal manera que el estado de fosforilación de todas las proteínas PTS está determinado por dos factores: actividad del transporte PTS y la proporción fosfoenolpiruvato:piruvato, el cual refleja el flujo glucolítico.

Este sistema, en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas con bajo contenido G+C desempeña un papel preponderante en el transporte de carbohidratos, metabolismo del carbono, particularmente en el fenómeno de represión catabólica por carbono. Recientemente se ha descrito que es necesario para la respuesta de choque frío en *Lactobacillus casei* (Monedero *et al.*, 2007) además, algunas proteínas del sistema PTS podrían ser factores de virulencia bacterianos, como en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Siebold *et al.*, 2004).

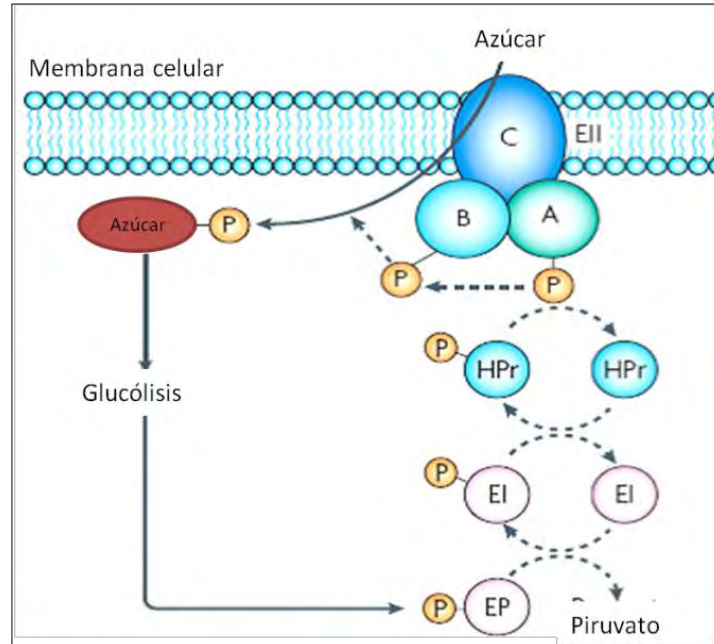


Figura 4. Componentes del sistema PTS. Los carbohidratos son transportados y concomitantemente fosforilados por el sistema PTS. El carbohidrato fosforilado alimenta a la vía glucolítica, normalmente en los niveles de glucosa-6P o fructosa-6P. Durante la glucólisis se producen 2 moléculas de fosfoenolpiruvato, una de ellas se utiliza para el transporte y la fosforilación inicial del carbohidrato. Así, el estado de fosforilación de las moléculas del PTS depende de la concentración extracelular de carbohidrato y de la proporción interna de fosfoenolpiruvato y piruvato (Görke and Stülke, 2008).

VI. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *STREPTOMYCES*

Desde el primer trabajo de regulación de la expresión genética en bacterias llevado a cabo por Jacob y Monod y el establecimiento del modelo de regulación del operón, muchos avances acerca de la regulación de la expresión genética se han sucedido, principalmente en los organismos modelo *E. coli* y *B. subtilis*. Con estos estudios se ha determinado la existencia de factores transcripcionales basales o generales (como los factores sigma) y factores transcripcionales específicos (como en el operón de lactosa, el represor LacI) que en conjunto median la expresión genética de los organismos procariontes (Venancio and Arvind, 2009) (Fig. 5).

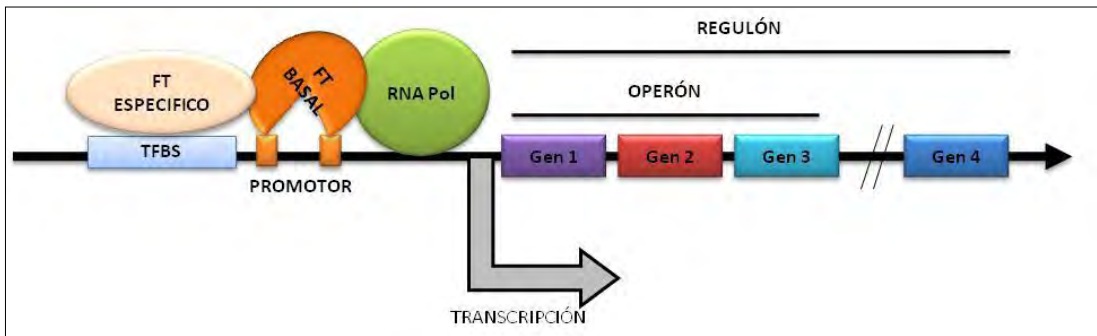


Figura 5. Representación esquemática de la maquinaria de transcripción modelo de procariontes para operones y regulones. Los factores transcripcionales (FT) basales, por ejemplo factores sigma, contactan el promotor del operon y los factores transcripcionales específicos reconocen secuencias río arriba del promotor denominadas sitios de unión de factores transcripcionales (TFBs).

El número de factores sigma (σ) en las bacterias es variable y puede estar relacionado con el nicho ecológico ocupado por la bacteria, y refleja la habilidad de adaptarse a diferentes cambios ambientales incluyendo la competencia biótica. Además de los factores σ involucrados en la expresión de genes constitutivos o de housekeeping, existen factores sigma alternativos capaces de controlar la expresión de un conjunto de genes (regulones) involucrados en una respuesta específica a un estímulo ambiental. En las bacterias del género *Streptomyces* no menos de 60 factores σ están codificados e involucrados en varias respuestas conduciendo a la diferenciación bioquímica y morfológica (Bourn and Bab, 1995; Strohl, 1992). Sin embargo, menos de 20 sitios para la unión de factores transcripcionales han sido experimentalmente caracterizados. Una de las respuestas mejor caracterizadas es el llamado "Regulón SigR" involucrado en la respuesta al estrés oxidativo e incluye más de 30 genes (Eng *et al.*, 2009).

En el caso de la regulación de la diferenciación morfológica y la diferenciación bioquímica, se han descubierto un grupo de moléculas pequeñas autoregulatorias implicadas en ambos procesos (Takano, 2006; Ohnishi *et al.*, 2005). El autoregulador mejor estudiado es el factor A (2-isocapryloyl-3R-hydroxymethyl-butylolactone), que es una molécula pequeña (243Da) similar a una hormona que induce tanto la diferenciación morfológica como la fisiológica en *S. griseus*. Este sistema de señalización vía γ -butirolactonas está altamente distribuido entre los estreptomicetos. En *S. griseus* la unión del factor A con su receptor Arp A desreprime la expresión del activador transcripcional AdpA. Esta proteína actúa como un regulador central, así el regulón AdpA incluye diferentes reguladores positivos del

desarrollo [*ssgA*, *amfR* y *adsA* (*bldN*)] y proteasas. En la Fig. 6 se resume la cascada regulatoria del factor A.

Las mutantes deficientes en el factor A no son capaces de esporular ni de producir antibióticos (estreptomicina), las mutantes que sobreexpresan el regulador AdpA producen estreptomicina en etapas tempranas del crecimiento y en mayor cantidad.

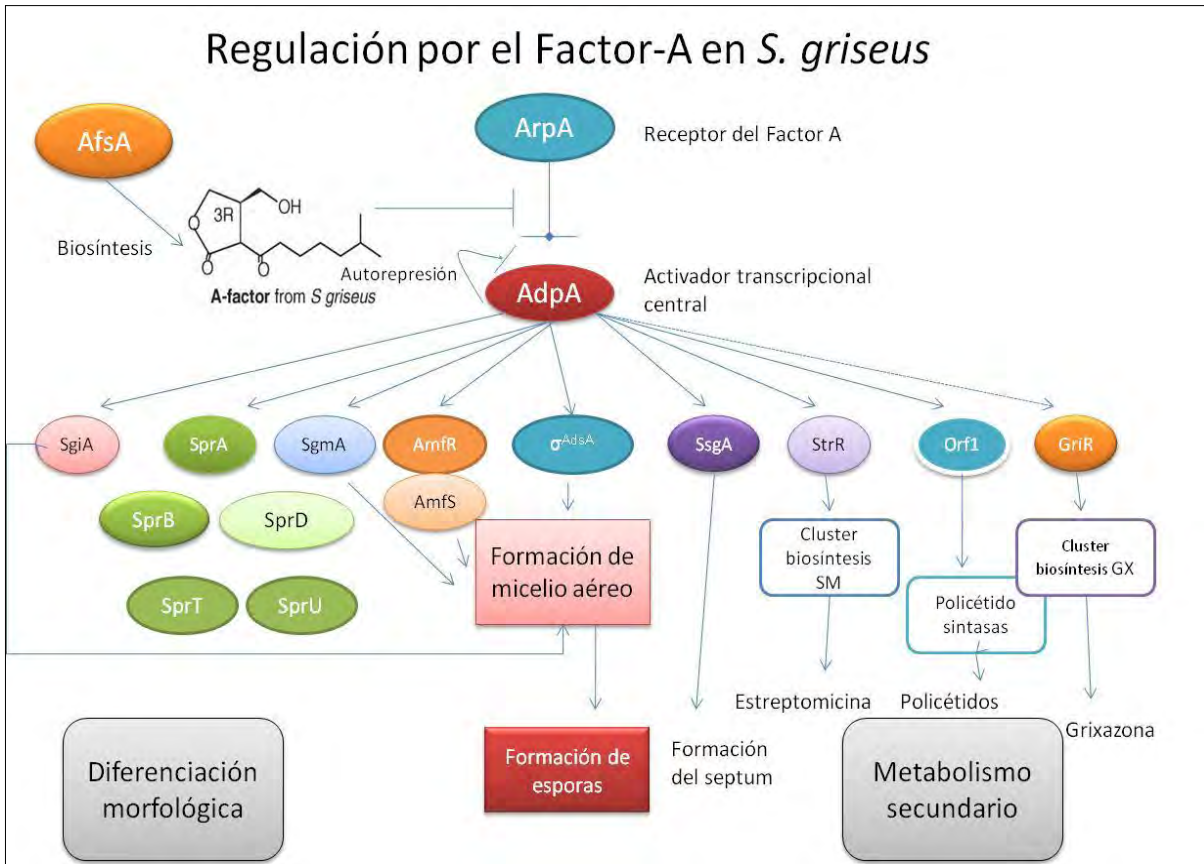


Figura 6. Cascada regulatoria del factor A en *S. griseus*. La señalización por el factor A comienza por la biosíntesis de esta molécula por el gen *afsA*, la unión de dicha molécula a su receptor *ArpA* conduce a la producción del activador transcripcional central *AdpA* y finalmente una gran variedad de genes requeridos para la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario son expresados (Ohnishi, 2005).

Pese a que las vías de regulación mediadas por γ -butirolactonas en varias especies del género *Streptomyces* están relativamente bien estudiadas, el control de la diferenciación morfológica y fisiológica (metabolismo secundario) se encuentra simultáneamente controlado también por varios estímulos ambientales y nutricionales, como la fuente de carbono, fuentes de nitrógeno y fósforo, metales y elementos traza. De esta forma, existen diversos mecanismos regulatorios que afectan la producción de metabolitos secundarios y,

uno de los más sobresalientes es el mecanismo de represión catabólica por la fuente de carbono (Wolfgang, 2002; Demain and Sánchez, 2009). Por ejemplo, la glucosa inhibe la producción del metabolito secundario actinorodina en *Streptomyces lividans* inhibiendo la síntesis del mRNA del gen *afsR2* que, como en el caso de *S. griseus*, codifica para una proteína reguladora involucrada en la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kim, *et al.*, 2001).

VII. REPRESIÓN CATABÓLICA

El término represión catabólica por carbono (RCC) se refiere al fenómeno de regulación global en microorganismos, donde la presencia de una fuente preferencial de carbono en el medio puede reprimir la expresión de ciertos genes y operones, cuyos productos están relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternas (Bruckner, 2002). Este mecanismo permite la utilización organizada y secuencial de los carbohidratos cuando más de una fuente de carbono se encuentra presente.

Alrededor del 5-10% de todos los genes bacterianos están sujetos a este fenómeno y es uno de los fenómenos regulatorios más importantes. Es importante para la competencia entre microorganismos en sus ambientes naturales, así la elección de la fuente de carbono que promueve el crecimiento más rápido es un arma en la competencia y supervivencia de los microorganismos. Además, este fenómeno está también asociado con la expresión de genes de virulencia. Se ha descrito que alrededor del 5-10% de los genes bacterianos están sujetos a RCC (Görke and Stülke, 2008).

La regulación por carbono depende de la utilización rápida de la fuente preferencial. Una de las características del metabolismo secundario es el crecimiento lento de los microorganismos productores, por tanto, bajas concentraciones de la fuente represora en el medio de cultivo proporcionan bajas tasas de crecimiento y por tanto, se elimina la interferencia sobre la biosíntesis de idiolitos.

En términos generales, la fuente preferida de carbono es la glucosa. Sin embargo, la adaptación a nichos ecológicos especiales puede resultar en la elección de prácticamente cualquier carbohidrato como fuente preferencial (Bruckner, 2002).

A pesar de que las consecuencias fisiológicas de la RCC son las mismas, los mecanismos implicados en dicho proceso son diversos en diferentes géneros bacterianos. Hasta ahora se han podido elucidar los mecanismos implicados en la represión catabólica por la fuente de carbono en bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G/C en su genoma; en ambos casos el sistema PTS, descrito anteriormente, tiene un papel preponderante (Wolfgang, 2002; Deutscher, 2006).

a. Represión catabólica por carbono en bacterias Gram-negativas.

En esta sección se describe brevemente el mecanismo de RCC en *E. coli*, organismo modelo para el estudio bacterias Gram-negativas (Görke and Stülke, 2008; Titgemeyer and Hilén 2002; Deutscher 2008).

La proteína clave en este modelo es la enzima EII^{Glc} y la regulación está basada en la fosforilación-desfosforilación de dicha enzima. En presencia de glucosa u otros azúcares incorporados vía el sistema PTS, el fosfato de la enzima EII^{Glc} es transferido hacia el carbohidrato entrante. Además, la concentración PEP:Piruvato contribuye a definir el estado de fosforilación de EII^{Glc} , si la proporción PEP:piruvato es alta entonces la enzima se encuentra predominantemente en estado fosforilado. Por el contrario, si en la célula están presentes concentraciones altas de piruvato y bajas de PEP, entonces la enzima EII^{Glc} se encontrará en estado no fosforilado. Al mismo tiempo, EII^{Glc} se encuentra en estado desfosforilado cuando *E. coli* crece rápidamente en fuentes de carbono rápidamente asimilables, como la glucosa. EII^{Glc} fosforilada ejerce su papel regulatorio al activar a la enzima adenilato ciclasa. Una vez que el cAMP se ha sintetizado, se une a su proteína receptora CRP (o CAP), y el complejo cAMP-CRP se encarga de la activación de genes y operones catalíticos. Dichos promotores, son normalmente débiles y requieren ser activados para permitir la unión de la RNA polimerasa o la formación del complejo de transcripción. De manera adicional, el complejo cAMP-CRP modula, en *E. coli*, RNAs pequeños no codificantes, como Spot42 and CyaR. Así es posible explicar el efecto indirecto de tal complejo sobre muchos genes (Fig. 7).

De manera adicional a los mecanismos globales de RCC, existen mecanismos operon específicos: exclusión del inductor y prevención de la inducción. En *E. coli*, la proteína EII^{Glc} desfosforilada, en presencia de glucosa interactúa con permesas específicas de carbohidrato (p. ej. LacY) bloqueándolas y evitando así la entrada del inductor del operon específico (exclusión del inductor). Este fenómeno también se presenta en las fuentes de carbono secundarias: melibiosa, rafinosa, maltosa y galactosa. Además, existen múltiples operones para el catabolismo de azúcares PTS controlados por reguladores transcripcionales que contienen dominios regulatorios PTS duplicados (PRDs). Tales reguladores pueden actuar como activadores transcripcionales o antiterminadores. Dicha actividad puede ser modulada por la disponibilidad del sustrato específico y por el mecanismo de RCC. Los reguladores con dominios PRDs reciben la información sobre la disponibilidad de sustratos o glucosas mediante fosforilación dependiente PTS de sus dominios PRDs.

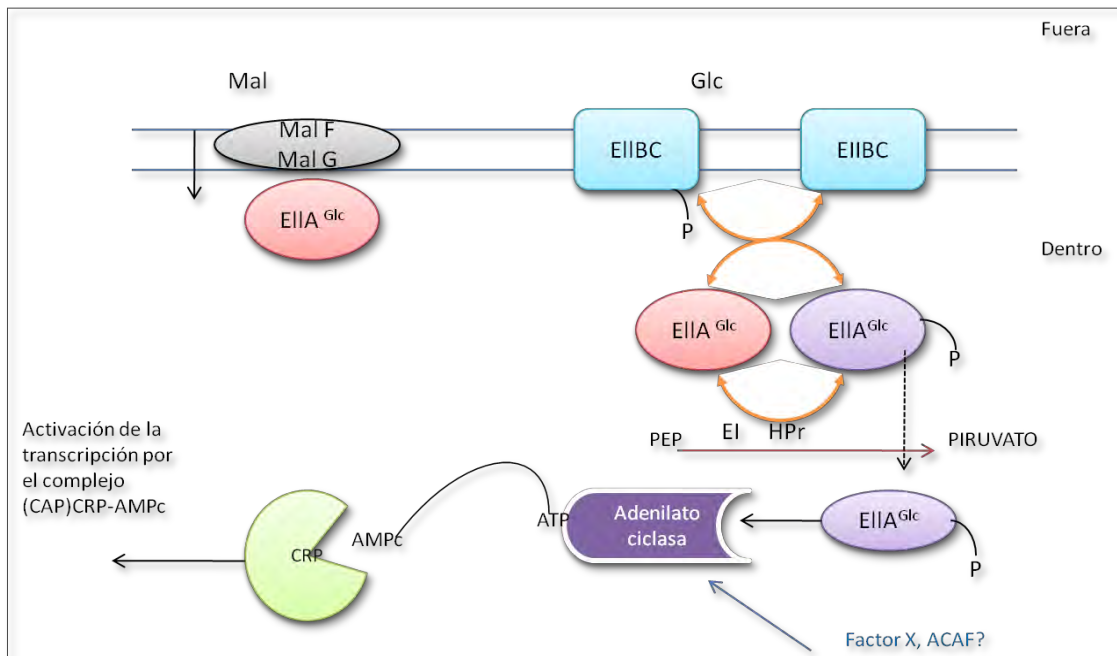


Figura 7. Esquema simplificado del mecanismo de represión catabólica en *E. coli*. La importación de glucosa y otros sustratos PTS conduce a la desfosforilación de las proteínas PTS. La enzima EIIA^{Glc} bloquea la importación de carbohidratos como la lactosa, maltosa y melibiosa. En la ausencia de glucosa y en

presencia de fosfoenolpiruvato, las proteínas PTS se encuentran principalmente fosforiladas. La enzima EIIA^{Glc} en su estado fosforilado activa a la enzima adenilato ciclasa pero, probablemente, sólo en presencia de un factor activador desconocido (ACAF adenylate cyclase activation factor). El complejo CRP-AMPc activa la transcripción de genes y operones.

b. Represión catabólica por carbono en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G+C.

En *B. subtilis* el estado de fosforilación de la enzima HPr es crucial para la RCC (Gorke, 2008; Titgemeyer and Hillen, 2002; Deustscher, 2008). Esta proteína puede ser fosforilada en un sitio regulatorio, Ser46, y de manera dependiente de EI en la His15. La HPr (Ser-P) funciona como un efector para la proteína dimerica CcpA y conlleva su unión a sitios operadores, promoviendo la regulación transcripcional. La fosforilación de HPr en Ser46 es catalizada por la enzima monohexamérica HPrK, que une ATP a través de un motivo clásico asa-P. La actividad de la HPrK es desencadenada por la disponibilidad de fructosa1-6 bifosfato, indicador de un alto flujo glucolítico.

En condiciones limitantes de nutrientes, predomina la actividad fosfatasa, la cual es estimulada por la acumulación de fosfato inorgánico en la célula. Así, bajo condiciones ricas en nutrientes la HPrK actúa como cinasa, generando el cofactor HPr (Ser46-P) para CcpA.

La unión de HPr (Ser46-P) a CcpA induce rearrreglos conformacionales que dan lugar a la conformación adecuada para que CcpA se una al DNA. Además, la His-15 de HPr también contribuye al rearrreglo conformacional de CcpA, en concordancia con la inhibición de RCC cuando la His-15 se encuentra fosforilada. El complejo CcpA-cofactor se une a regiones palindrómicas en los promotores de operones catabólicos llamados elementos de respuesta a catabolito (*cre* del inglés catabolite responsive elements). La mayoría de los sitios *cre* se localizan en las regiones de inicio de la transcripción y se superponen con las secuencias consenso de promotores (Fig. 8).

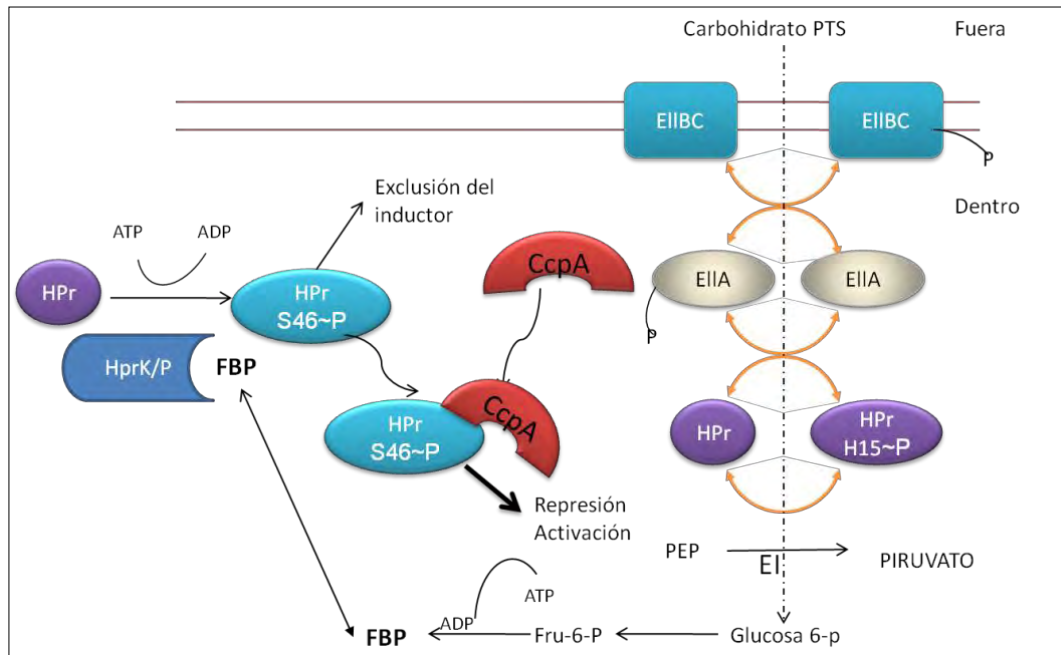


Figura 8. Mecanismo simplificado de represión catabólica por carbono en *B. subtilis*. La importación de glucosa y otros carbohidratos rápidamente metabolizables vía PTS producen una desfosforilación neta de las proteínas PTS. Durante la fosforilación concomitante del carbohidrato importado, la enzima HPr se encuentra fosforilada en la histidina 15. Las altas concentraciones de fructosa bifosfato (FBP) presentes en células creciendo en un carbohidrato rápidamente metabolizable estimula la actividad cinasa de la enzima bifuncional HprK/P (cinasa/fosfatasa de HPR) y la formación de HPr-Ser-P. La enzima HPr fosforilada en el sitio regulador S-46 interactúa con CcpA y el complejo se une a sitios *cre* del DNA de sitios operadores blanco. La RCC requiere que los sitios *cre* de los genes blanco estén en el promotor o río abajo del mismo. S-HPr probablemente interacciona con ciertas permeasas no PTS, como el transportador de maltosa en *L. casei* y por tanto inhibiendo la actividad de dichos transportadores. Las altas concentraciones de Pi (fosforo inorgánico) presentes en células en reposo favorecen la desfosforilación de S-HPr por la HprK/P.

b. Represión catabólica por carbono en bacterias Gram positivas con alto contenido G+C.

En comparación con los mecanismos de RCC en bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas con bajos contenidos de G+C, en las bacterias del género *Streptomyces* y de bacterias Gram-positivas con alto contenido G+C se sabe relativamente poco de este fenómeno. (Titgemey and Hillen, 2002; Wang, *et al.*, 2002). Se ha encontrado un sistema PTS en bacterias de este género y se sabe que está involucrado en el transporte de D-fructosa y N-acetilglucosamina (NacGlc) (Nothaft, *et al.*, 2003; Parche, *et al.* 1999)

El regulón GlcNac está controlado por un factor transcripcional DasR (Hillerich and Westpheling, 2006) y se ha observado que la NacGlc evita el progreso más allá del estado vegetativo y anula la producción de metabolitos secundarios. Tal efecto no se presenta en una mutante en el transportador NacGlc (Rigali *et al.*, 2004).

Las deleciones en los genes *dasR* o *pts* generan un fenotipo “calvo” (ausencia de micelio aéreo). Sin embargo, la delección del gen *ptsH* codificante para la enzima HPr no tiene efecto sobre la represión por glucosa sobre algunos genes, incluyendo aquéllos de la agarasa, galactocinasa (Nothaft, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2002). Por tanto, se requiere un mecanismo adicional o paralelo necesario para explicar la represión que ejerce la glucosa y otras fuentes carbonadas sobre la expresión de genes y operones.

ANTECEDENTES INMEDIATOS

El mecanismo de represión catabólica en el género *Streptomyces* no ha podido ser elucidado, sin embargo, es reconocido que la detección, transporte y metabolismo del carbohidrato represor forman la parte central de la represión catabólica y es por esto, que las enzimas clave de dicho proceso son los componentes principales a estudiar.

En un estudio se seleccionaron mutantes de *S. coelicolor* resistentes al análogo no metabolizable de la glucosa, 2-desoxiglucosa, (Dog). Dichas mutantes presentaron sensibilidad disminuida a represión catabólica por diversas fuentes de carbono y pérdida total o parcial de la actividad de Glk. A pesar de su incapacidad para utilizar la glucosa no mostraron deficiencias en el transporte de la misma (Hodgson, 1982). La ausencia de represión por glucosa en estas mutantes se correlacionó con la pérdida de la actividad de una glucosa cinasa ATP-dependiente

En un estudio posterior las mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, incapaces de crecer en glucosa, fueron complementadas con un fragmento *BclI* de DNA de 2.9 kb de *S. coelicolor*, restaurando la actividad de Glk y la sensibilidad a represión por glucosa (Ikeda, *et al.*, 1984).

Al analizar la secuencia de nucleótidos del fragmento *BclI* de 2.9 kb se determinó la presencia de tres marcos de lectura abiertos, *sco2126* y *sco2127* completos, y uno incompleto *sco2128* (Angell, *et al.*, 1992) (Fig. 9). *sco2126* (*glkA*) codifica para la enzima glucosa cinasa (Glk), la cual posee un tamaño aproximado de 33.1 kDa. Por su parte *sco2127*, posiblemente codifica para una proteína de 20.1 kDa, cuya función no se ha determinado.



Figura 1 Fragmento de 2.9kb con el que se complementó a las mutantes Dog^R. Se muestra el marco de lectura abierto incompleto correspondiente a la región *sco2128*, y los dos marcos de lectura completos *sco2127* y *sco2126* ambos con su correspondiente promotor.

Al complementar las mutantes Dog^R con el gen *glkA*, recuperaron la actividad de la glucosa cinasa, sin embargo, la sensibilidad a represión catabólica por glucosa sólo se recuperó parcialmente. Con todo, cuando las mutantes fueron complementadas con la región que contiene los genes *glkA* y *sco2127*, la sensibilidad a la RCC se recuperó por completo (Angell, *et al.*, 1994). Por lo anterior, se consideró que la región *sco2127* podría estar involucrada en el transporte o metabolismo de la glucosa. No obstante, la secuencia de nucleótidos no parece codificar ni para una permeasa ni para una hexocinasa.

En estudios similares en *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*, se determinó que las cepas Dog^R, además de mostrar deficiencias en su Glk e insensibilidad a RCC, mostraron disminución en la incorporación de glucosa (Segura, *et al.*, 1996)

Al transformar las mutantes con el gen *glkA* de *S. coelicolor*, se restablece la actividad de Glk y la sensibilidad a RCC, pero el transporte no se ve modificado de manera significativa. El transporte deficiente de glucosa y la actividad de Glk, así como la sensibilidad a represión por glucosa fueron corregidas simultáneamente cuando se le transformó con la región *sco2127* de *S. coelicolor* (Guzmán, *et al.*, 2005).

En la tabla siguiente se resumen los resultados encontrados al complementar a cepas Dog^R de *S. peucetius* subsp. *caesius* con diferentes insertos. Cabe resaltar que para determinar el fenómeno de represión catabólica se cuantificó la producción de metabolitos secundarios, en este caso, de antraciclinas.

Tabla 1. Resultado de las complementaciones de las mutantes Dog^R y su comparación con la cepa silvestre. En la tabla se muestran los resultados de % de actividad de Glk, transporte, concentración de antraciclinas así como la sensibilidad a represión catabólica (S: sensible, R: resistente, SS: supersensible) (Tomado de Guzmán, *et al.*, 2005).

Cepa (inserto)	%Glk act	%Transporte	Producción de antraciclinas		RCC
			100 mM	500 mM	
Original	100	100	127.73±10.3	6.71±0.04	S
Dog R	15	51	547.08±22.5	235.45±7.12	R
SDR-1 (<i>glkA</i>)	95	49	45.49±4.6	7.39±0.23	S
SDR-2 (<i>sco2127</i>)	115	108	4.91±0.3	5.38±0.38	SS

En estudios para determinar los niveles de RNA en las cepas anteriores mediante dot-blot, se observó un efecto estimulador de SCO2127 sobre los niveles de RNA del gen de *glk*. En el mismo estudio se planteó la posibilidad de que la región *sco2127* sea una especie de regulador transcripcional tanto para el gen *glk* como para el transportador de glucosa. Sin embargo, cabe resaltar que en estudios *in silico*, no se ha demostrado que la secuencia teórica de proteína de *sco2127* codifique o tenga algún motivo de unión a DNA o semejanza alguna con proteínas descritas (Guzman, *et al.*, 2005).

Actualmente, en *S. coelicolor* se ha descrito al sistema transportador de glucosa (GlcP) como un sistema perteneciente a la familia de los Facilitadores Principales (MFS), se probó su inducibilidad por glucosa, se caracterizaron los parámetros cinéticos y además, se determinó que aunque codificado dos veces en el genoma sólo el gen localizado en la región central es funcional. En mutantes en el gen *glcP* se determinó que dicho gen es el principal transportador de glucosa, en ausencia de este las bacterias prácticamente no crecen ni transportan glucosa.

Recientemente, dados los perfiles de actividad de Glk y GlcP se plantea la posibilidad de que ambas moléculas interaccionen para formar un complejo activo GIK-GlcP según el modelo de la figura 10 (van Wezel, *et al.*, 2007).

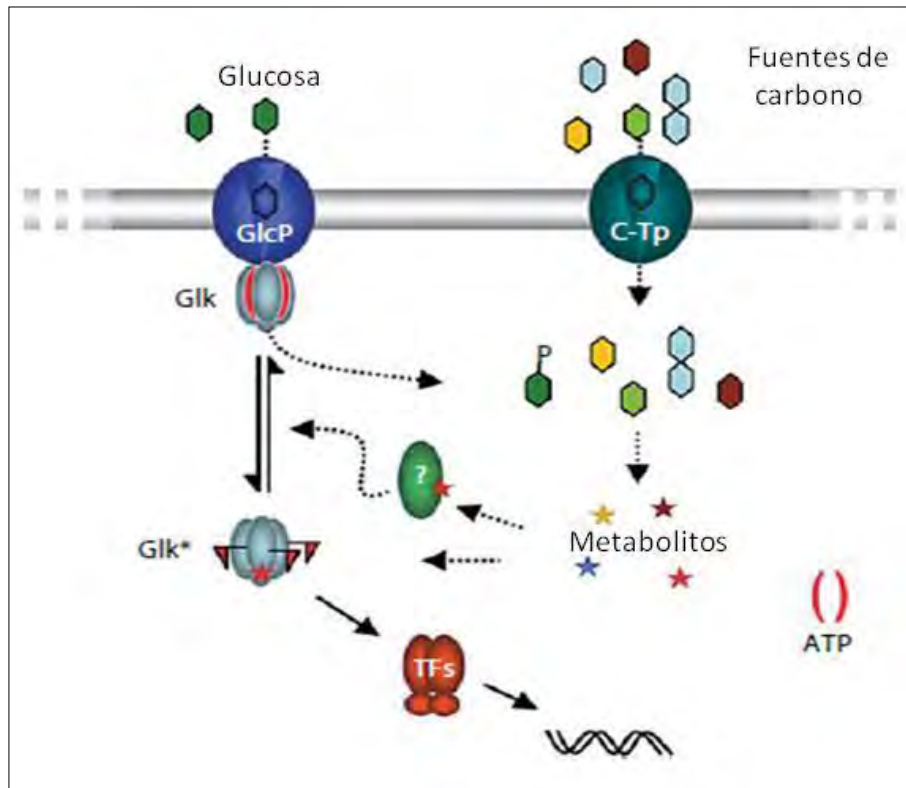


Figura 2. Modelo de la función de la glucosa cinasa. Glk interactúa con GlcP en presencia de glucosa para convertir inmediatamente al azúcar entrante a su forma fosforilada. La glucosa y otras fuentes de carbono que entran vía permeasas específicas generan metabolitos durante su catabolismo. Tales metabolitos son la señal para que Glk sea modificada postraduccionalmente por una proteína sensora desconocida. Así, la Glk modificada, Glk*, puede interactuar con factores transcripcionales para llevar a cabo la RCC. Tomado de van Wezel, *et al.*, 2007.

OBJETIVOS

Objetivo General

- **Clonar y caracterizar el promotor de un gen homólogo a *glcP* en *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius***

- **Objetivos particulares**
 - ✓ Identificar en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* el homólogo al gen *glcP* (*sco5578*) de *S. coelicor* y amplificar su región promotora

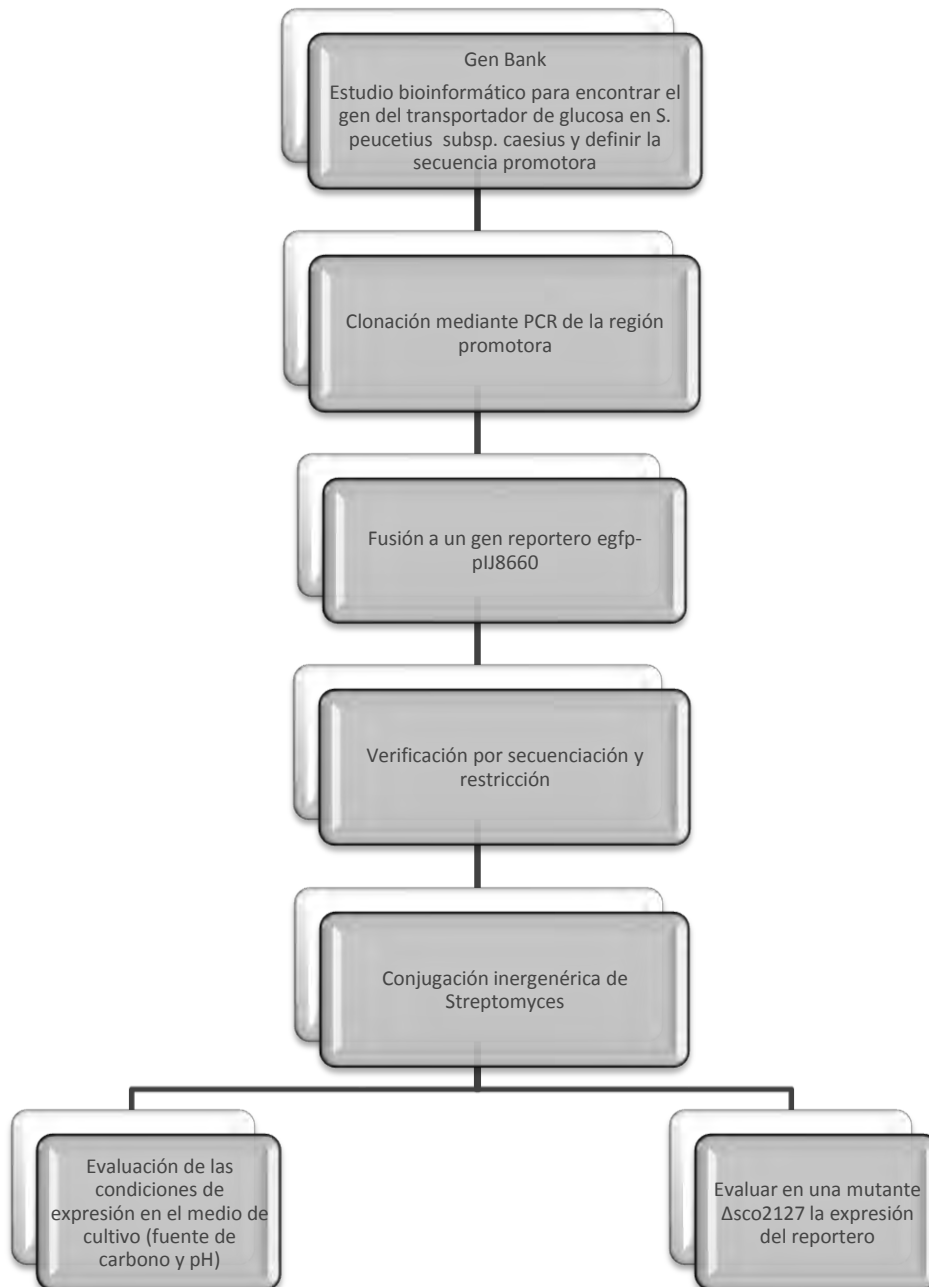
 - ✓ Clonar la región del promotor del gen homólogo a *glcP* de *S. peucetius* subsp. *caesius* y generar una fusión a un gen reportero *gfp* donde la región promotora regule la expresión de la proteína reportera.

 - ✓ Analizar la respuesta del promotor a diferentes fuentes de carbono y pH en el medio de cultivo

 - ✓ Determinar la respuesta del promotor en una mutante *scoΔ2127* de *S. coelicor*.

METODOLOGÍA

Estrategia General



A continuación, se describen brevemente las metodologías empleadas. Para mayor detalle, consultar el apéndice.

- 1. Búsqueda *in silico* del gen homólogo a *glcP* de *S. coelicolor* en el genoma de *S. peucetius subsp. caesius*.**

Partiendo de las secuencias del genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* (Sohng, comunicación personal) se hizo una búsqueda bioinformática en la base de datos de secuencias genómicas de actinomicetos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando la herramienta blastn. Posteriormente, se seleccionaron las secuencias con mayor porcentaje de identidad y se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W.

La secuencia de nucleótidos se tradujo a secuencia de aminoácidos, se realizó un blastp y un alinamiento múltiple.

Además, se procedió a realizar un ensayo de hidrofobicidad y de localización celular con la secuencia teórica de proteínas, utilizando los programas HMMTOP (www.enzim.hu/hmmtop/index), TopPred (www.sbc.su.se) y ProtComp Version 8 (www.softberry.com).

Para la clonación del promotor putativo del gen *glcP* se analizó la región río arriba del sitio del inicio de la traducción en busca de las secuencias consenso σ^{70} de promotores de estreptomicetos (www.softberry.com).

2. Corroboración de las regiones promotoras.

Una vez identificado el gen putativo del transportador de glucosa en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* como el ORF *sp7066*, se procedió a diseñar cebadores con el fin de amplificar la región promotora. Por otro lado se obtuvo el gen del transportador del grupo del Dr. Sohng (University Sun Korea).

Por tanto, la clonación de la región promotora putativa se realizó utilizando dos acercamientos diferentes. El primero, mediante la amplificación de la presunta región promotora contenida en el plásmido donado y la segunda, mediante la amplificación de DNA genómico.

Para ambos templados se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieran la amplificación de las secuencias promotoras mediante PCR y su ligación posterior al vector reportero.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la putativa región promotora del gen para permeasa de glucosa. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Promotor	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Fragmento esperado
----------	-------------------------------------	--------------------

		pb
Promotor <i>sp7066</i> a partir de plásmido	FW GTGGATCCCGTCGTGAAGCTGTGCA RV AGCATATGTTTCGTAGCGGTCCCGGAT	265
Promotor <i>sp7066</i> a partir de DNA genómico	FW TGATCGTGATATCGCACCAGAAGCGGACCA RV CGCAGCCGCCACCGGCA \overline{T} CTAGAGCCCGCT	374

Los cebadores fueron diseñados con sitios de corte para enzimas de restricción que posteriormente permitieran clonar y direccionar la región promotora en el plásmido reportero pIJ8660. En el primer caso, se emplearon los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*; para el otro fragmento se seleccionaron los sitios *XbaI* y *EcoRV*.

Los productos de PCR se ligaron al vector pGEM-T Easy, se verificaron por restricción y por secuenciación.

Las secuencias resultantes, fueron nuevamente examinadas *in silico* buscando secuencias consenso de promotores bacterianos con el programa Softberry. Además, de manera manual se buscó un sitio probable del inicio de la transcripción.

3. Conservación de las cepas y medios de cultivo.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo fueron la DH5 α para la clonación de las regiones promotoras en el plásmido pGEM-T Easy y en el plásmido pIJ8660. Para los ensayos de conjugación intergenérica se emplearon cepas de *E. coli* ET 12567.

En general, las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C por 12 h con agitación. En el caso de *Streptomyces* se emplearon medios YMG, TSB, MS agar y medios químicamente definidos. En la tabla siguiente se muestran las características de las cepas empleadas en este trabajo

Todos los microorganismos se conservaron en glicerol 4% a -70°C.

Tabla 3. Cepas microbianas empleadas en este trabajo.

Cepas microbianas	Características genéticas/ inserto	Fuente
<i>E. coli</i> DH5- α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Sambrook, <i>et al.</i> , (2001) Invitrogene

<i>E. coli</i> ET12567	F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44	Choi <i>et al.</i> (2004) Donada por el Dr. Luis Servin
<i>E. coli</i> DH5α-pG7066	Cepa de <i>E. coli</i> conteniendo el plásmido pGEM-T7066	Donado por el Dr. Sohng
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145	SCP-1, SCP-2	Donada por el Dr. Luis Servin
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145 ΔSCO2127	<i>S. coelicolor</i> con un casete de resistencia a apramicina interrumpiendo el gen <i>sco2127</i>	Forero y col. Sin publicar
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145-p7066	Cepa conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145 ΔSCO2127-p7066	Mutante Δ SCO2127 conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	Cepa obtenida por tratamiento mutagénico de <i>S. peucetius</i> con N-nitroso-N-metil uretano	Arcamone, <i>et al.</i> , 1969
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>-p8660	Cepa conteniendo el plásmido pIJ8660	Este trabajo
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>-p7066	Cepa conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo

En la tabla 5 se muestran las características de los plásmidos utilizados en la realización de este trabajo.

Tabla 4. Características de los plásmidos empleados en la realización de este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente
pGEM –T Easy	Plásmido para clonación de productos de PCR MCS, promotor SP6, <i>lacZ</i> , operador Lac, Amp ^R , oriF1.	Promega
pGEM-T7066	Plásmido pGEM-T donde se encuentra clonado el gen <i>sp7066</i>	Donado por el Dr. Sohng
pIJ8660	Plásmido reportero conteniendo el gen de la <i>egfp</i> . pUC18, <i>aac(3)</i> , MCS, oriT, Φ C31.	Sun <i>et al.</i> , 1999. Donado por el Dr. Justin Nodwell
pIJ7066	Plásmido derivado de pIJ8660 con el promotor del gen <i>sp7066</i>	Este trabajo

4. Extracción de DNA.

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de *S. peucetius* subsp. *caesius* se realizó con solventes orgánicos mediante la técnica fenol-cloroformo (Hopwood, 2006) a partir de cultivos bacterianos .

Extracción de DNA plásmidico

Para todos los procedimientos de extracción de plásmidos de *E. coli* se utilizó la técnica de lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 2001), dependiendo del volumen de cultivo de partida se realizó mini extracción (miniprep) o extracción a gran escala (maxiprep).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las diferentes PCRs se realizaron empleando como cebadores a los oligonucleótidos diseñados. En el caso de la amplificación a partir del plásmido pGEM-T/*sp7066* se utilizaron 100 ng de plásmido utilizando el kit AmpliTaq (Applied Biosystems). Para la amplificación a partir de DNA genómico, se utilizó 1 µg del material genómico y el mismo kit de PCR. El perfil de PCR para cada par de oligonucleótidos fue estandarizado para definir las condiciones de amplificación.

6. Clonación y secuenciación de las regiones promotoras.

Una vez amplificados mediante PCR los fragmentos de interés se ligaron al vector para productos de PCR pGEM-T Easy (Promega). Utilizando el protocolo recomendado por el proveedor.

A la serie de plásmidos pGEM-T y pGEM-T Easy se les ha incorporado una 3' OH timidina a ambos extremos del plásmido (Fig. 11) facilitando la ligación de productos de PCR amplificados con polimerasas termoestables que al final de la amplificación en el 3'OH agregan una desoxiadenina, de forma independiente al molde.

Como se observa en la Fig. 11, dentro de la región de clonación múltiple se encuentra la región codificante para la enzima β-galactosidasa. Así, la inactivación insercional del α-

péptido permite reconocer directamente a las clonas recombinantes mediante un screening por color, en placas con indicador.

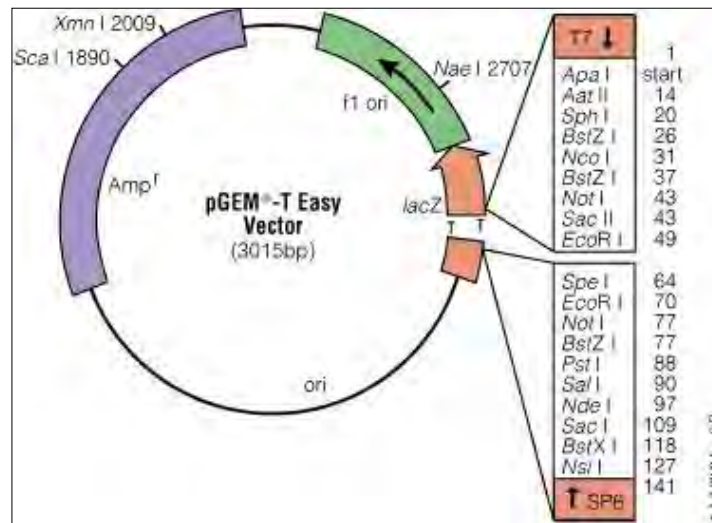


Figura 3. Mapa circular y puntos de referencia del plásmido pGEM-T Easy. Se resalta el sitio de clonación múltiple, el gen de resistencia a ampicilina y el gen para la β -galactosidasa.

Las reacciones de ligación se incubaron toda la noche a 4°C. Dichas ligaciones fueron introducidas por corriente eléctrica (electroporación) (ver apéndice) en células de *E. coli* DH5- α . Las células se sembraron en cajas petri con medio LB conteniendo 0.5 mM IPTG, 80 μ g/mL y 100 μ g/mL ampicilina. Las placas se incubaron 12 h a 37°C.

De las colonias obtenidas, se seleccionaron al azar colonias blancas para resembrarlas en medio LB líquido con 100 μ g/mL ampicilina. Después de 12 h de crecimiento se extrajo el plásmido y con la enzima *EcoRI* se digirió para determinar la presencia del fragmento de interés. Tanto el plásmido sin digerir como el digerido fueron observados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

7. Construcción de la fusión de la región promotora *sp7066* al gen reportero de *egfp* en pIJ8660.

La región promotora, clonada en el plásmido pGEM-T Easy, fue subclonada en el vector para estreptomicetos pIJ8660 (Sun, *et al.*, 1999), el cual contiene el gen *egfp*, que permite la detección de transformantes mediante fluorescencia o determinación de la proteína verde fluorescente por técnicas inmunológicas.

En diversos organismos se ha empleado exitosamente a la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero. La GFP es una proteína de 27 kDa extraída de la medusa

Aequorea victoria con un fluoróforo constituido por los aminoácidos Ser65-Tyr66-Gly67. En su detección no requiere de la aplicación de ningún sustrato o cofactor y puede ser detectada por un microscopio de fluorescencia. La GFP silvestre absorbe luz azul y UV, con un pico de absorbancia mayor a los 395 nm y un pico menor a los 470 nm; así mismo, emite luz verde a 509 nm (Sun, *et al.*, 1999).

Sin embargo, los primeros intentos para expresar a la proteína verde fluorescente en *S. coelicolor* no fueron exitosos incluso cuando el gen se insertaba en un plásmido multicopia (aprox. 150 copias de plásmido/cromosoma). Posiblemente esto se debía a la naturaleza del gen GFP, que es relativamente, rico en AT (38 mol % G+C comparado con la estimada 74 mol% G+C de *S. coelicolor*) y el consecuente uso de diferencial codones entre el gen GFP y el hospedero. En el plásmido pIJ8660 se ha insertado la versión modificada del gen de la proteína verde fluorescente, denominado EGFP (enhanced GFP). EGFP contiene dos sustituciones de aminoácidos, Ser65 por Thr y Phe64 por Leu, con eso se incrementa la fluorescencia alrededor de 35 veces con respecto a la proteína silvestre. Sin embargo, de mayor relevancia para su uso en *Streptomyces*, son los cambios de nucleótidos que generan mutaciones silenciosas en la región codificante (más de 190 cambios de nucleótidos) basadas en el uso preferencial de codones del humano. Dado que el nuevo uso de codones corresponde más cercanamente con el de los genes de los estreptomicetos (sólo siete de 239 codones presentes en el gen EGFP terminan en A ó T comparados con los 163 de 238 del gen silvestre, y todos los codones TTA han sido removidos).

Así, el plásmido pIJ8660 con el gen *egfp* es útil como gen reportero para el análisis de la expresión génica de *Streptomyces*, dado que anteriormente contaba con otras características deseables de un vector reportero (Fig. 12). Dentro de dichas características se pueden mencionar las siguientes:

- pUC18 origen de replicación para la propagación en *E. coli*
- gen de resistencia a apramicina (*aac* (3)IV) para la selección en *E. coli* y *Streptomyces* sp.
- *oriT*(RK2) para la conjugación entre *E. coli* y los estreptomicetos

- ΦC31 región att-int para su integración estable en el cromosoma, aparentemente en un solo número de copias.
- Casete de EGFP flanqueado por terminadores transcripcionales
- Sitio de clonación múltiple con los sitios *XhoI*, *BglIII*, *EcoRV*, *BamHI*, *XbaI*, *NsiI*, *KpnI*, *BglIII*
- Codones de paro en los tres marcos de lectura entre el MCS y el codón de inicio de EGFP para evitar la formación de fusiones traduccionales no deseadas.

El plásmido pIJ8660 se extrajo de células de *E. coli* DH5-α y por restricción se verificó la identidad del mismo. A la par, el plásmido pGEM-T Easy con el fragmento de interés también se extrajo y ambos plásmidos fueron digeridos con las enzimas *EcoRV* y *XbaI* (Fermentas). El plásmido digerido y el fragmento del promotor *sp7066* se recuperaron de un gel de agarosa utilizando columnas de fibra de vidrio.

Las condiciones de ligación entre el plásmido pIJ8660 y el promotor putativo fueron estandarizadas. Células DH5-α fueron electrotransformadas con la fusión anterior y se sembraron en cajas con medio LB suplementado con apramicina 50 µg/mL.

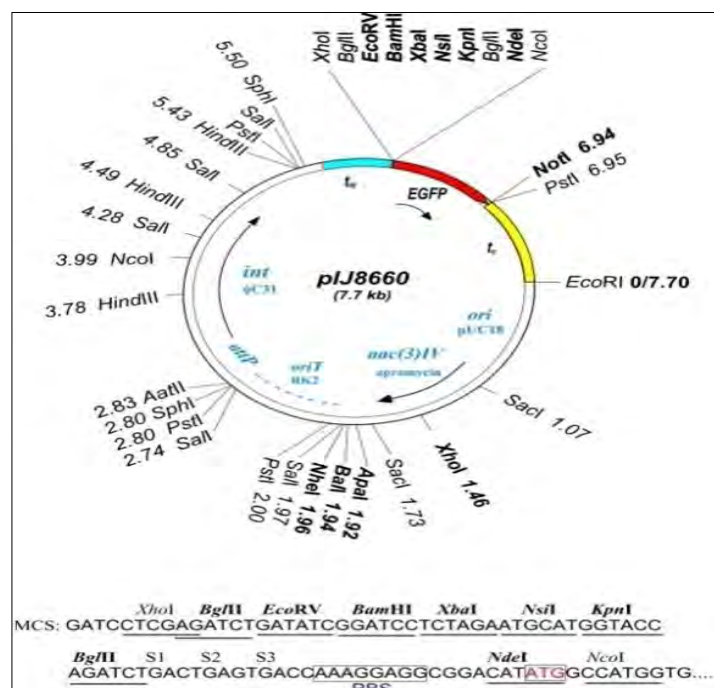


Figura 4. Mapa del plásmido pIJ8660. Se resalta el sitio múltiple de clonación (Sun, *et al.*, 1999)

De las colonias obtenidas en caja, se seleccionaron 5 clonas al azar, se sembraron en medio LB líquido (50 µg/mL apramicina) y después de 12 h de crecimiento se extrajo el plásmido y se verificó por restricción la presencia del fragmento correspondiente al promotor.

8. Transformación de células de *E. coli* y conjugación intergenérica.

Una vez corroborada la fusión, denominada ahora pIJ7066, el plásmido se extrajo y se transformó con él a la cepa *E. coli* ET12567 (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsd*⁻) deficiente en sistemas de metilación de conteniendo el plásmido pUZ8002.

Se ha comprobado que varias cepas del género *Streptomyces* tienen sistemas que restringen DNA metilado en adeninas y citosinas y, por tanto al introducir un DNA metilado en estos organismos, los sistemas de restricción se activan provocando la degradación del material genético. Con la finalidad de poder introducir ácidos nucleicos a las bacterias con estos sistemas se emplea a la cepa de *E. coli* ET12567 debido a que al carecer de los tres sistemas de metilación (Dam, Dcm y Hsd) es posible amplificar o replicar material genético en ella sin que este sea metilado, facilitando así la introducción de DNA foráneo en cepas con tales sistemas de restricción.

Además, la cepa *E. coli* ET12567 posee el plásmido pUZ8002 plásmido conjugativo derivado del plásmido RP4. Los plásmidos pueden ser transferidos de *E. coli* a *Streptomyces* de manera dependiente al origen de transferencia (*oriT*) del plásmido IncP RK2 y a la función del gen *tra* del plásmido RP4 (Blaesing, 2005; Chen, 2006).

Las células de *E. coli* ET12567/pIJ7066 y de *E. coli* ET12567/pIJ8660 (plásmido original) se conjugaron con las diferentes cepas de *Streptomyces*. En el cuadro se resumen las conjugaciones realizadas.

Tabla 5. Cepas de *Streptomyces* y el plásmido que se les transfirió mediante conjugación. pIJ8660 plásmido original. pIJ7066 plásmido pIJ8660+promotor *sp7066*.

Microorganismos	Plásmido	Tipo
<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	pIJ8660	Control negativo
<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	pIJ7066	A evaluar
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	pIJ8660	Control negativo

<i>Streptomyces coelicolor M145</i>	pIJ7066	A evaluar
<i>Streptomyces coelicolor M145 Δ2127</i>	pIJ7066	A evaluar

De todas las exconjugantes obtenidas, se seleccionaron al azar en promedio 10 colonias por cada placa de conjugación y se sembraron en agar nutritivo con apramicina 50 µg/mL. Nuevamente al azar se seleccionaron clonas para cultivarlas en medio líquido, YMG y TSB para *S. peucetius* subsp. *caesius* y *S. coelicolor* respectivamente, apramicina 5 µg/mL. De las colonias que mostraron mejor crecimiento en medio líquido se seleccionaron 3 para verificar la expresión de la proteína verde fluorescente.

9. Regulación transcripcional del promotor de *sp7066*.

Expresión de la proteína verde fluorescente

Con el objetivo de demostrar que el fragmento del promotor *sp7066* amplificado y clonado es inducido por glucosa, las exconjugantes de *S. peucetius* subsp. *caesius* 7066 y 8660 se cultivaron en medio químicamente definido NDM suplementado con 100 mM de glucosa como fuente de carbono. Las células se cosecharon a intervalos definidos, se centrifugaron y lavaron en una solución 0.75% NaCl. Para extraer la proteína total, las células se sonicaron en frío 5 veces durante 30 s con descansos de 60 s a una amplitud de 60A, utilizando amortiguador PED. Las muestras sonicadas se centrifugaron en frío a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Además, se evaluó el crecimiento, el consumo de carbohidrato y el cambio de pH en el medio. Las mismas determinaciones se realizaron utilizando arabinosa 100 mM como fuente de carbono, siendo ésta una de las fuentes de referencia cuando se trabaja con *S. peucetius* subsp. *caesius*.

Una vez que se corroboró la expresión de la EGFP en las células del estreptomiceto pIJ7066 y no en las conjugantes control (pIJ8660) se realizaron ensayos de expresión de la proteína. Las bacterias se cultivaron en medios químicamente definidos NDM para *S. peucetius* suplementados con 100 mM de arabinosa. Una vez que las bacterias estaban al final de la fase exponencial de crecimiento ≈36 h, se le agregó al medio, cada 15 min, la fuente de carbono a evaluar. Se cosecharon las células y se siguió el protocolo anteriormente descrito.

En el caso de la influencia de pH las células se cultivaron hasta las 36 horas, se cosecharon y se transfirieron a matraces con medio mínimo utilizando una fuente de carbono no inductora (Ara 100 mM) cada uno con un pH diferente. Como control positivo se empleó en los mismos valores de pH el medio mínimo suplementado con glucosa.

Para evaluar el efecto del gen *sco2127*, las exconjugantes Δ SCO2127/7066, M145/7066 y M145/8660 se sembraron en medio mínimo NMMP con 100 mM de glucosa. Las muestras se cosecharon a intervalos definidos y se realizó el mismo tratamiento anteriormente descrito.

10. Determinación de proteína total.

Para todos los sobrenadantes obtenidos, se determinó proteína total por el método de Bradford, según lo recomendado por el proveedor (BIORAD). Las curvas para llevar a cabo la interpolación de los resultados se consideraron como adecuadas con un valor de R^2 0.99, utilizando como estándar albumina sérica bovina (BSA).

11. Determinación de crecimiento.

Para las determinaciones de crecimiento se tomaron muestras de 1 mL del cultivo microbiano a intervalos determinados. Dichas muestras fueron lavadas con solución isotónica y macerada en un homogenizador manual para determinar espectrofotométricamente la D.O a 550 nm. Se realizaron las diluciones pertinentes en los casos necesarios.

Para corroborar la correspondencia de los resultados obtenidos por D.O. también se determinó el crecimiento por peso seco, técnica usual para la determinación del crecimiento de bacterias miceliares (consultar apéndice).

12. Determinación de carbohidrato residual.

Determinación de glucosa

Cada muestra de cultivo se centrifugó para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se trató según las recomendaciones del proveedor para la determinación de glucosa por el método enzimático de glucosa oxidasa (Spinreact).

Determinación de arabinosa

La determinación de arabinosa en el sobrenadante de las muestras se realizó utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico para la determinación de carbohidratos. A 0.5 mL de muestra se le agregó 0.5 mL de fenol 5% w/v y 2.5 mL de ácido sulfúrico. Los tubos se llevaron a baño maría hirviendo durante 15 min. Se enfriaron en agua-hielo y se determinó la absorbancia a 40 nm.

1. Preparación de geles SDS-PAGE y Western-blot.

Se realizaron geles de acrilamida-SDS al 10% (ver apéndice), para cada muestra se utilizaron 100 µg de proteína total. Los geles se transfirieron a membranas de celulosa utilizando una cámara húmeda.

Las membranas se dejaron secar toda la noche y se continuó con el proceso de revelado utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Invitrogen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Búsqueda *in silico* del gen homólogo a *glcP* de *S. coelicolor* en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius*.

Con los análisis bioinformáticos realizados (blastn y alineamientos) dentro de la base de datos del NCBI, se determinó que en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius*, la región correspondiente al ORF denominado *sp7066* sea la que probablemente codifique para el transportador de glucosa, .

Con una cobertura del 99% para *S. coelicolor* la región *sp7066* tiene una identidad máxima del 85% con el gen *glcP*, que corresponde a la región codificante para el principal transportador de glucosa en esa bacteria. Con respecto a *S. griseus* con la misma cobertura la identidad máxima corresponde a un 87% para un transportador putativo de glucosa. En el caso de *S. lividans*, con una cobertura menor, también se obtuvo un 85% de identidad con el transportador de glucosa de esta bacteria.

Tabla 6. Alineamiento múltiple del gen *sp7066*.

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 DNA, complete genome	1602	1602	99%	0.0	87%
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome <i>glcP</i> gene	1461	1461	99%	0.0	85%
<i>Streptomyces lividans</i> glucose transport protein <i>glcP</i> gene	1456	1456	99%	0.0	85%
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 DNA, complete genome	1426	1426	96%	0.0	85%

Sin embargo, para hacer una comparación a un nivel funcional, la secuencia nucleotídica se tradujo *in silico* a secuencia de aminoácidos para realizar otro acercamiento, utilizando la herramienta blastp y además, estudios bioinformáticos de localización subcelular y análisis de hidrofobicidad.

Con respecto al blastp y los alineamientos con secuencias de aminoácidos, evidentemente los porcentajes de identidad fueron mayores y se obtuvieron comparaciones con secuencias de bacterias fuera del género *Streptomyces* correspondientes con

transportadores de carbohidratos y glucosa, putativos o bien caracterizados (Fig. 13). Este resultado proporciona un indicio más de que la secuencia determinada como un posible transportador de glucosa era una buena aproximación dado que los miembros de la familia MFS, se encuentran ampliamente difundidos en todos los reinos.

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value	
ref ZP_05803386.1	sugar transporter [Streptomyces flavogrise...		842	0.0	
ref ZP_04696542.1	putative glucose transporter [Streptomyces...		838	0.0	
ref YP_001823412.1	putative glucose transporter [Streptomyce...		833	0.0	G
ref ZP_05514513.1	putative glucose transporter [Streptomyces...		806	0.0	
ref NP_629713.1	sugar transporter [Streptomyces coelicolor A...		793	0.0	G
ref ZP_04705082.1	putative glucose transporter [Streptomyces...		790	0.0	
ref ZP_05534484.1	sugar transporter [Streptomyces viridochro...		784	0.0	
ref ZP_05018682.1	sugar transporter [Streptomyces sviveus AT...		783	0.0	
ref ZP_05538487.1	sugar transporter [Streptomyces griseoflav...		783	0.0	
emb CBG69736.1	glucose transport protein GlcP [Streptomyces ...		782	0.0	
ref ZP_04685650.1	sugar transporter [Streptomyces ghanaensis...		779	0.0	
ref NP_823833.1	L-arabinose permease [Streptomyces avermitil...		775	0.0	G
ref ZP_05521977.1	sugar transporter [Streptomyces lividans T...		755	0.0	
emb CAY39209.1	glucose permease [Streptomyces clavuligerus A...		753	0.0	
ref ZP_05509313.1	putative glucose transporter [Streptomyces...		747	0.0	
ref ZP_04998650.1	sugar transporter [Streptomyces sp. Mgl] >...		747	0.0	
ref ZP_04683750.1	sugar transporter [Streptomyces ghanaensis...		738	0.0	
ref ZP_04683604.1	putative glucose transporter [Streptomyces...		626	2e-177	
ref ZP_04477955.1	MFS transporter, sugar porter family [Stre...		590	1e-166	
ref ZP_04333462.1	MFS transporter, sugar porter family [Noca...		536	1e-150	
ref YP_001109306.1	major facilitator superfamily sugar trans...		531	8e-149	G
ref YP_289726.1	sugar transporter [Thermobifida fusca YX] >g...		529	3e-148	G
ref YP_003111108.1	sugar transporter [Catenulispora acidiphi...		501	1e-139	G
ref YP_002766284.1	sugar transporter [Rhodococcus erythropol...		498	7e-139	G
ref ZP_04385121.1	arabinose-proton symporter [Rhodococcus er...		498	8e-139	
ref YP_003155168.1	MFS transporter, sugar porter family [Bra...		457	2e-126	G
ref YP_003147922.1	MFS transporter, sugar porter family [Kyt...		444	1e-122	G
ref ZP_04367340.1	MFS transporter, sugar porter family [Cell...		437	9e-121	
ref ZP_04031916.1	MFS transporter, sugar porter family [Ther...		437	1e-120	
ref YP_001222123.1	putative sugar MFS permease [Clavibacter ...		431	8e-119	G
ref YP_062390.1	sugar transporter [Leifsonia xyli subsp. xyl...		430	1e-118	G
emb CAA34119.1	unnamed protein product [Synechocystis sp. PC...		426	3e-117	
ref NP_442047.1	glucose transport protein [Synechocvstis sp....		425	4e-117	G

Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de *sp7066 (blastp)*. Los alineamientos resaltados coinciden con secuencias de transportadores de glucosa putativos y de otros ya caracterizados dentro y fuera del género *Streptomyces*.

Con respecto al estudio de localización subcelular se predijo como localización de la secuencia examinada, la membrana (Fig. 14).

```

Seq name: test sequence, Length=473
Significant similarity in Location DB - Location:Membrane
Database sequence: AC=P15729 Location: Membrane DE GLUCOSE TRANSPORT
PROTEIN.
Score=10820, Sequence length=468, Alignment length=437
Predicted by Neural Nets - Outer Membrane with score 3.0
***** Transmembrane segments are found: .+61:87o..o155:181o..o346:370.
Integral Prediction of protein location: Outer Membrane with score 10.0
Location weights:          LocDB / PotLocDB /          NNets          / Pentamers /
Integral
Cytoplasmic                0.00 /          0.00 /          0.00 /          2.33 /
0.00
Membrane                    10.00 /         3.00 /          2.97 /          2.67 /
9.99
Secreted                    0.00 /          0.00 /          0.03 /          0.00 /
0.01
Periplasmic                 0.00 /          0.00 /          0.00 /          0.00 /
0.00
    
```

Figura 6. Análisis *in silico* de localización subcelular de la secuencia de aminoácidos del gen *sp706* (ProtComp Version 8).

Con respecto al análisis de hidrofobicidad, como se observa en la Fig. 15 la secuencia de aminoácidos de SP7066 se predice la formación de 12 dominios transmembranales característicos de los sistemas de transporte de la familia MFS.

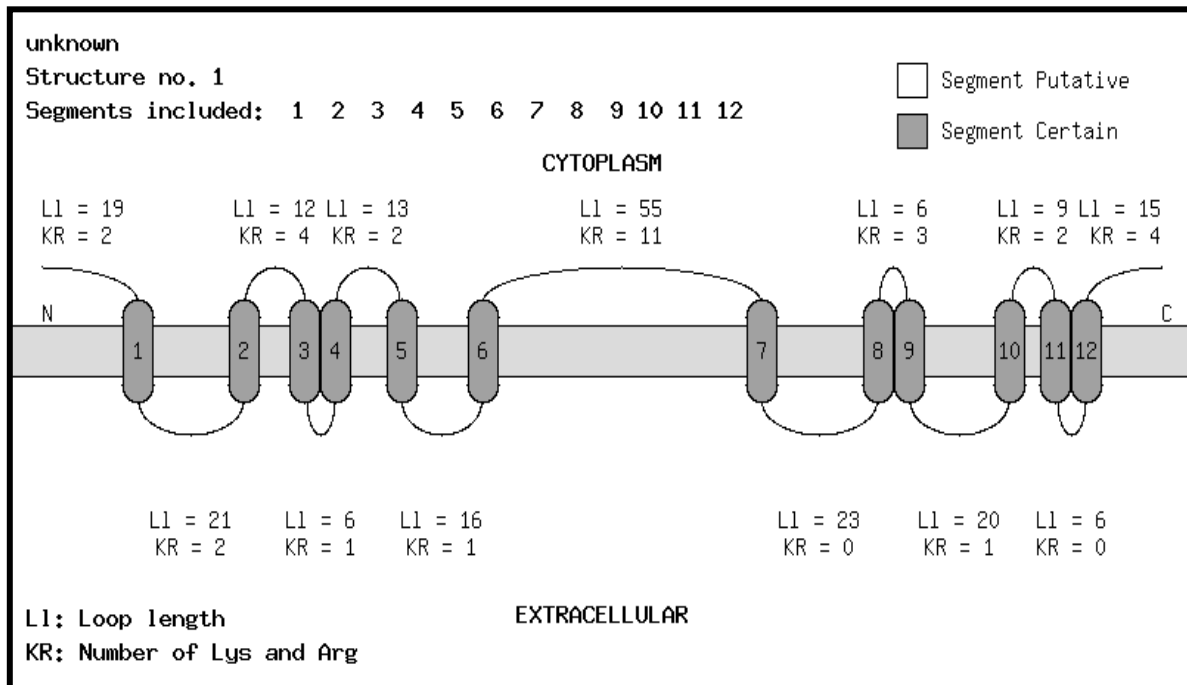


Figura 7. Análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos del gen *sp7066*. Se muestran los 12 segmentos transmembranales característicos de los transportadores de la familia MFS (HMMTOP).

Con toda la evidencia bioinformática acumulada, una vez identificada a la región *sp7066* como el homólogo al transportador de glucosa de *S. coelicolor* y un posible transportador

de carbohidratos, se decidió a proceder con la búsqueda, amplificación y clonación de una región promotora putativa de dicho gen.

2. Amplificación y análisis de la región promotora.

Amplificación del promotor putativo

A partir del plásmido pGEM – sp7066

Como se ha mencionado, el grupo del Dr. Sohng (University Sun, Korea) encargado de secuenciar el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* nos proporcionó el plásmido pGEM-T donde se encuentra clonado el gen *sp7066* (Fig. 16).

El plásmido se electroporó en células competentes DH5 α . De las colonias en placa se seleccionó una y se hizo crecer en medio LB líquido. Se extrajo el plásmido y a partir de éste se procedió con la amplificación de la región promotora.

Los cebadores para amplificar la región promotora a partir del plásmido se diseñaron de la siguiente forma. Para el oligo forward se tomó en cuenta la secuencia del oligonucleótido forward con el que se clonó el gen (Dr.Sohng) y su presunta región promotora en el plásmido pGEM-T, con la única variación de que el oligonucleótido original contenía la secuencia para la enzima de restricción KpnI y ese sitio fue modificado para introducir un sitio BamHI (Tabla 8).

Tabla 7. Secuencia de los cebadores empleados en la amplificación de la región promotora putativa de *sp7066* utilizando el plásmido pGEM/*sp7066* como molde. Se resalta los sitios de restricción *BamHI* y *NdeI* para los oligos FW y RV, respectivamente.

Inserto	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Fragmento esperado pb
Promotor <i>sp7066</i> a partir de plásmido	FW GTGGATCCCGTCGTGAAGCTGTGCA RV AGCATATGTTTCGTAGCGGTCCCGGAT	265

En el caso del cebador reverse se tomó en cuenta la secuencia codificante del gen *sp7066*. (Fig. 16).

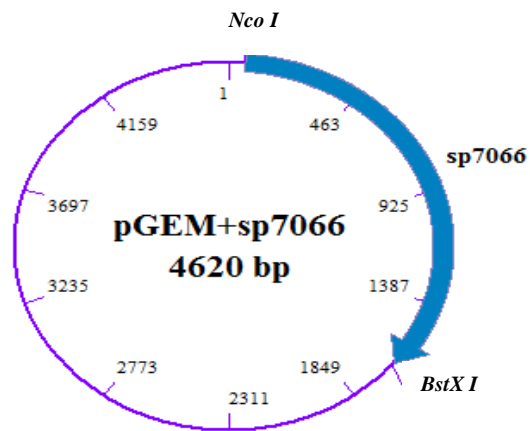


Figura 8. Gen *sp7066* clonado en el plásmido pGEM.

Con los oligonucleótidos anteriores, se realizó un PCR de gradiente para optimizar la temperatura de alineamiento para la amplificación del fragmento de 260 pb. Como puede observarse en el gel (Fig. 17) la temperatura óptima para la amplificación del fragmento de interés corresponde a 61°C. Una vez establecida la temperatura óptima para amplificación se procedió a realizar otro ciclo de PCR para obtener amplificado en concentración suficiente para proceder a ligarlo en el vector correspondiente. En total, la amplificación consistió en 25 ciclos, según las condiciones del esquema 18.

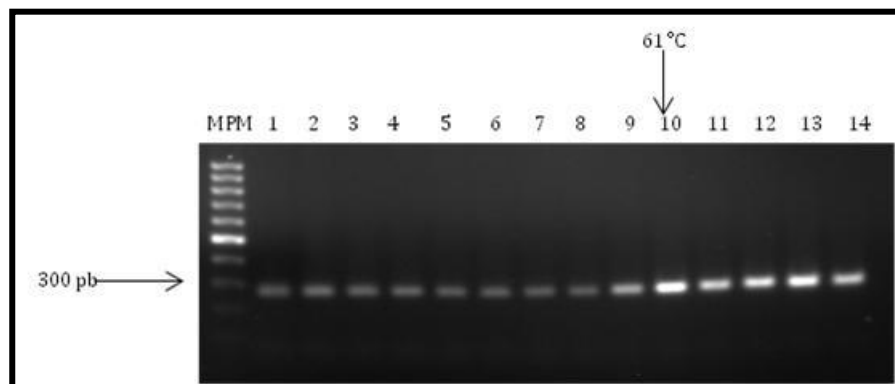


Figura 9. PCR de gradiente para la amplificación del promotor de *sp7066*. Tamaño esperado 260pb. Gel de agarosa 2%.

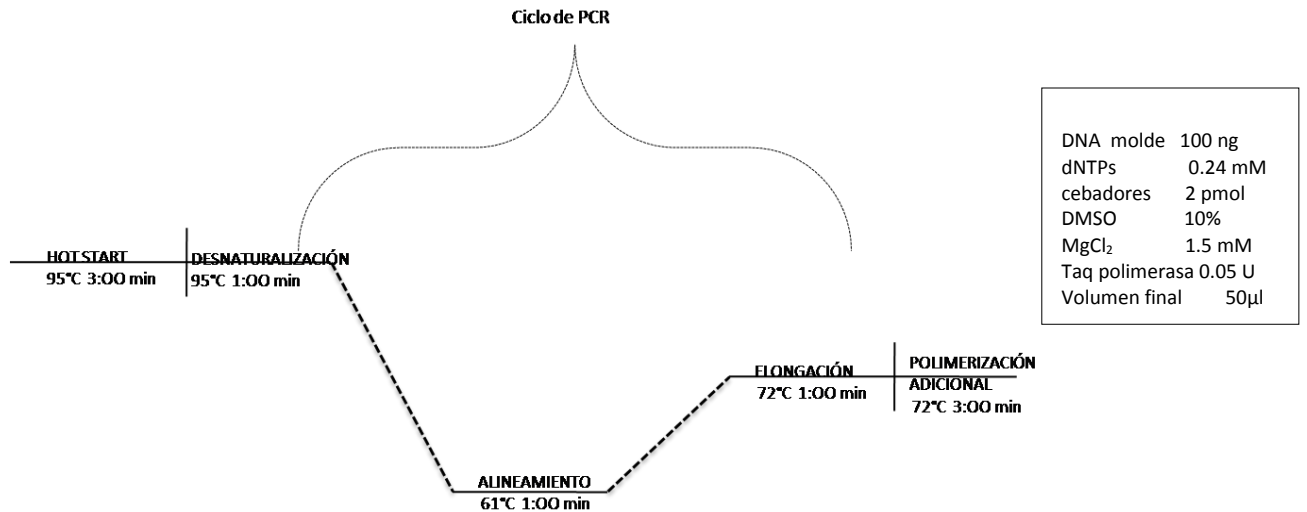


Figura 10. Ciclo de PCR y condiciones para la amplificación de la región promotora del gen *sp7066* a partir de plásmido.

A partir de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico se realizó según lo descrito en la metodología, corroborándose la concentración y pureza del DNA mediante espectrofotometría. También se verificó la integridad del DNA mediante un gel de agarosa al 0.75% y no se observaron bandas resultado de la degradación del DNA (resultados no mostrados).

El DNA genómico obtenido se utilizó como molde para la amplificación de la región putativa del promotor de *sp7066*. Dado que el genoma de *Streptomyces* es rico en GC, el protocolo para la amplificación del fragmento tuvo que ser estandarizado desde la temperatura hasta la concentración de ión magnesio y DMSO en el medio de reacción. En la figura 19 se muestra el gel de agarosa, se observa un gradiente de temperatura y además, dos concentraciones de ión magnesio.

El fragmento obtenido a partir de la amplificación utilizando como molde DNA genómico fue designado fragmento B 7066.

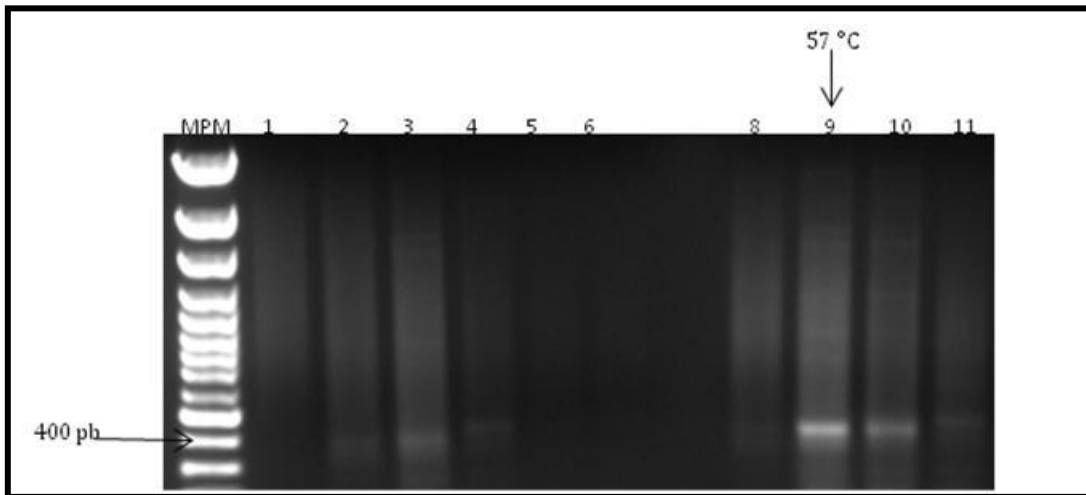


Figura 11. PCR de gradiente para la amplificación del promotor del gen SP7066 (a partir de DNA genómico). Del carril 1-6 con 2.5 mM [Mg²⁺] y carriles 8-11, 3 mM [Mg²⁺] Producto esperado 375 pb.

Como se observa en el gel, la amplificación a partir de DNA genómico es menos eficiente y específica comparada con la amplificación a partir de DNA plasmídico. A pesar de que se ajustaron los parámetros de amplificación (Fig. 20) generalmente se amplificaba el producto esperado junto con otros productos no específicos razón por la cual el producto deseado se escindió del gel de agarosa y se limpió empleando columnas de fibra de vidrio y fenol-cloroforno. Posteriormente se volvió a correr un gel de agarosa para verificar que únicamente se encontrara presente el fragmento de 375 pb.

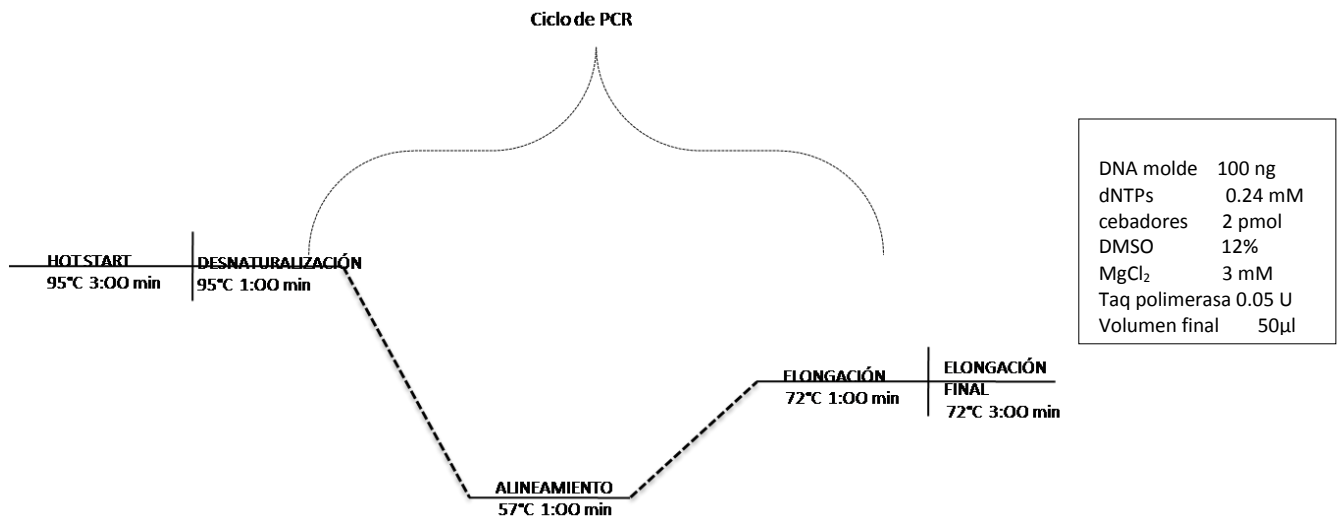


Figura 12. Ciclo de PCR y condiciones para la amplificación de la región promotora del gen *sp7066* a partir de DNA genómico

Los productos de PCR se limpiaron y espectrofotométricamente se determinó su concentración y se verificó, en un gel de agarosa, que no hubiera otros fragmentos contaminantes.

Los fragmentos A7066 y B7066 fueron ligados directamente al vector para productos de PCR pGEM-T Easy. La ligación se llevó a cabo según las recomendaciones del proveedor. Dicha construcción se electroporó en células competentes y se sembró en caja con agar LB

ampicilina. De las colonias blancas obtenidas, se seleccionaron al azar 10 para la extracción del plásmido. En la Fig. 21 se muestra la digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas.

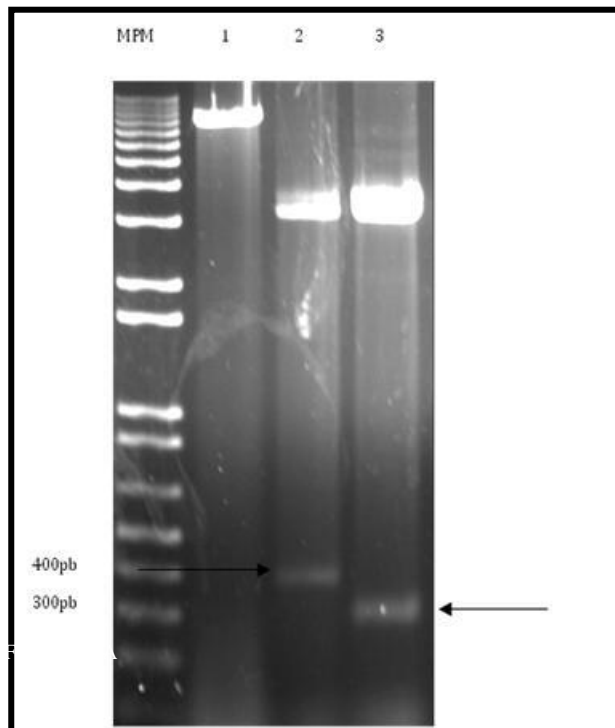


Figura 13. Gel de agarosa donde se muestra la digestión de los plásmidos pGEM-T Easy conteniendo los fragmentos de interés con la enzima *EcoRI*. En el carril 2 se observa la liberación del fragmento B7066 de 375 pb y en el carril 3 la liberación del fragmento A7066 de 260 pb.

Ambos plásmidos, plásmido pGEM-T Easy -A7066 y el plásmido pGEM-T Easy B7066 se secuenciaron. Con las secuencias obtenidas se hizo un análisis *in silico* para verificar la presencia de las secuencias consenso de los promotores bacterianos. Las secuencias se analizaron de forma manual y en el programa Softberry BPROM (www.softberry.com) con ninguno de los métodos se encontraron secuencias consenso putativas de un promotor bacteriano en el caso del fragmento A (no mostrado). Para el fragmento B se encontraron las secuencias putativas de los promotores bacterianos de σ^{70} de bacterias Gram-negativas pero estos datos sirvieron como un primer acercamiento para delimitar la zona de búsqueda del promotor (Fig. 22).

```
> test sequence
Length of sequence-      374
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      226 LDF- 1.74
-10 box at pos.      211 AGGAATAGT Score      29
-35 box at pos.      194 TTGACT Score      61

Oligonucleotides from known TF binding sites:
```

Figura 14. Predicción de promotores utilizando el programa Softberry www.softberry.com. La secuencia analizada es la correspondiente al fragmento B7066. Se muestra que la secuencia tiene una región promotora putativa y la localización de las cajas consenso -35 y -10.

Partiendo de que en la secuencia del fragmento B sí había un presunto promotor, con base en la secuencia consenso de los promotores de *Streptomyces* se realizó otra búsqueda y se encontraron las secuencias consenso tipo -10 y -35 para los promotores σ^{70} de *Streptomyces* (Strohl, 1992). Para determinar el sitio de inicio de la transcripción probable, se partió del principio de que dichas regiones están generalmente conformadas por dos pirimidinas, en este caso dos adeninas adyacentes. Además, se realizó un alineamiento para comparar el sitio de inicio de la transcripción de otros genes de *S. coelicolor* determinados experimentalmente observado que el sitio señalado es el más probable, dando como resultado la región promotora descrita en la figura 23.

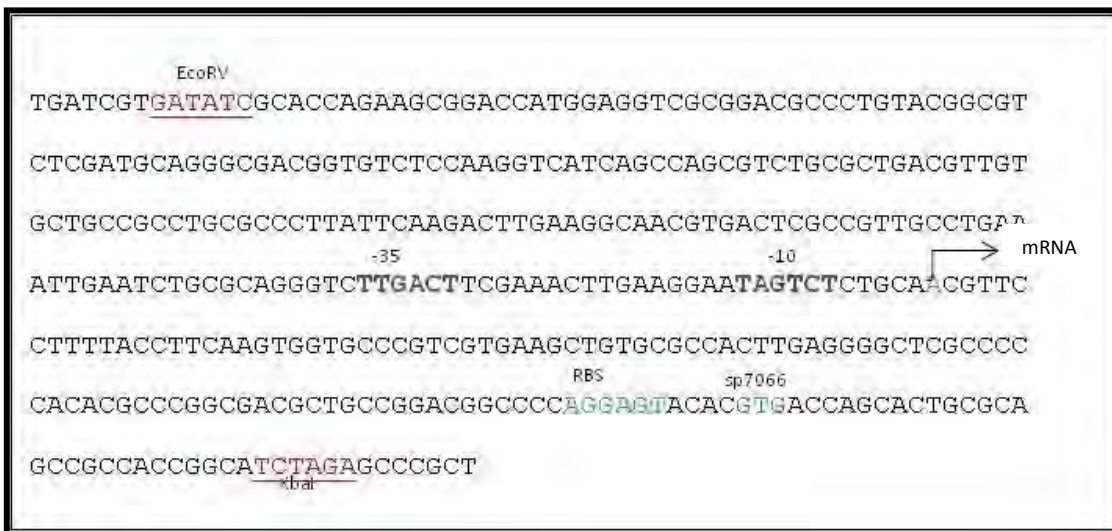


Figura 15. Análisis de la secuencia del promotor putativo del gen *sp7066*. En rojo y subrayado se muestran los sitios de restricción insertados mediante la amplificación por PCR. En azul se muestra el sitio de unión al ribosoma (RBS), en verde el codón de inicio del gen. Las regiones consenso -10 y -35 se encuentran señaladas. La flecha indica el sitio probable de inicio de la transcripción.

Con los resultados anteriores, se corroboró que la región denominada B7066 tenía buenas probabilidades de ser una región promotora, en cambio, la región denominada A7066 no

contaba con las secuencias consenso de un promotor y por tanto fue descartada. A partir de este momento, el fragmento B7066 será denominado como el promotor o el promotor putativo.

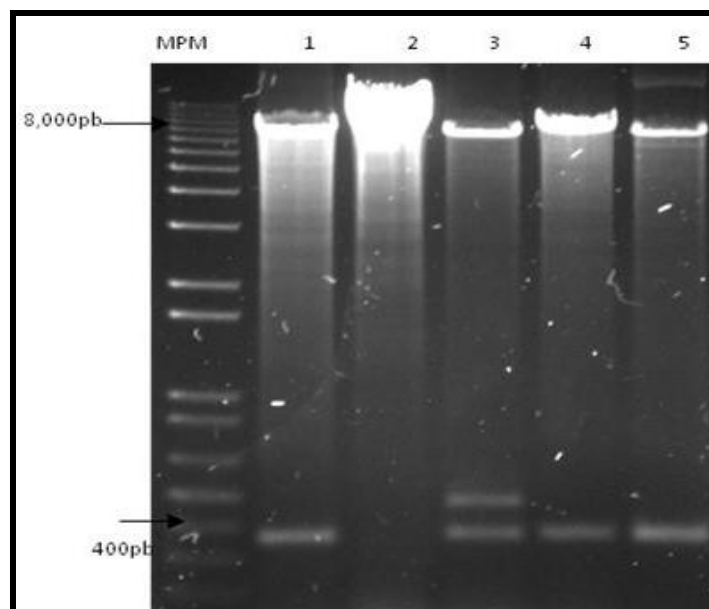
3. Construcción de la fusión de la región promotora *sp7066* al gen reportero de *EGFP* en pIJ8660.

El promotor putativo se liberó del plásmido pGEM-T Easy con los sitios de corte *EcoRV* y *XbaI*. El plásmido pIJ8660 extraído de células *E. coli* DH5- α digerido con las mismas enzimas se ligó al fragmento del promotor. Al nuevo plásmido (pIJ8660+promotor *sp7066*) se le denominó pIJ7066.

La construcción, plásmido pIJ7066, se verificó por restricción usando las enzimas *XbaI* y *EcoRV*, liberándose el fragmento correspondiente al promotor 310 pb (Fig. 24)

Se seleccionó la colonia correspondiente al carril 4 para volver a sembrarla y extraer nuevamente el plásmido.

Dado los sistemas de restricción metilo sensibles presentes en ciertas especies de estreptomicetos particularmente para fines de este estudio en *S. coelicolor*, la construcción se introdujo mediante electrotransformación en células competentes de *E. coli* ET12567. De manera adicional, esta cepa bacteriana contiene el plásmido pUZ8002, que es un derivado del plásmido RK2. Cabe hacer mención que los plásmidos pueden ser transferidos desde *E. coli* a cepas de *Streptomyces* en forma dependiente del origen de transferencia (*oriT*) de los plásmidos RK2 del grupo IncP α y a la función del gen *tra* del plásmido RP4. Los sistemas de conjugación con dichas características, no son sólo útiles para la transferencia de genes entre diferentes especies bacterianas sino también en otro tipo de células como levaduras y células de mamífero (Blaesing *et al.*, 2006)



levaduras y
mamífero
2005; Chen *et*

Figura 16. Se muestra el resultado de las digestiones de clonas de *E. coli* electrotransformadas con el plásmido pIJ7066. Las bandas cercanas a 8 kb corresponden al plásmido pIJ8660 en tanto las bandas del fragmento del promotor corresponden a las bandas cercanas a 400 pb.

Las células ET12567/pIJ7066 se cultivaron en las mismas condiciones que cualquier cepa de *E. coli* para extracción de plásmido por miniprep. Se verificó la presencia del plásmido mediante la visualización de un gel de agarosa (no mostrado). Al mismo tiempo, células ET12567 se electrotransformaron con el plásmido pIJ8660 (plásmido original sin promotor) para servir como control negativo y verificar que la expresión de la proteína verde fluorescente fuera por la regulación del promotor.

4. Conjugación intergenérica.

Una vez corroborada la presencia del plásmido pIJ7066 en las células conjugativas ET12567 éstas se pusieron en contacto con fragmentos miceliares de *S. peucetius* subsp. *caesius* o con esporas de *S. coelicolor* sobre una placa de agar MS (consultar el apéndice). Transcurridos 7 días posteriores a la conjugación se seleccionaron 20 colonias exconjugantes para ser sembradas nuevamente en medio MS con apramicina (Fig. 25). De las colonias sobrevivientes del paso anterior se resembraron en medio nutritivo con el antibiótico correspondiente mediante la formación de parches.

El mismo procedimiento se realizó para la transferencia del plásmido control pIJ8660 a dichos microorganismos.

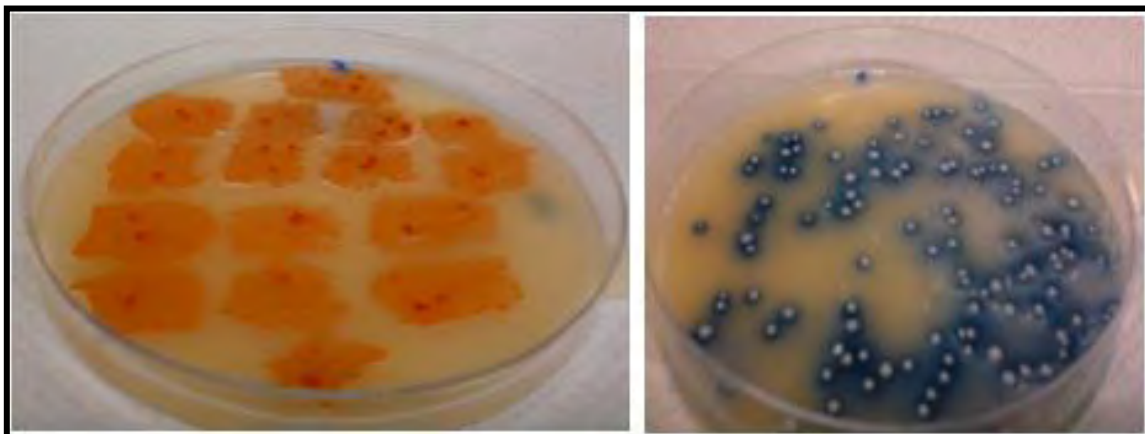


Figura 17. Colonias de exconjugantes creciendo en medio MS (AM 25 µg/ml). A la derecha colonias de *S. coelicolor* y a la izquierda colonias de *S. peucetius* subsp. *caesius* sembradas en forma de parches.

De las colonias obtenidas en una tercera resiembra, se seleccionaron 5 para ser crecidas en medio líquido con 5 µg/mL de apramicina, TSB para *S. coelicolor* y YMG para *S. peucetius* subsp. *caesius*.

5. Expresión de la proteína verde fluorescente.

Las colonias con mejor crecimiento en medio líquido se seleccionaron para hacer un ensayo rápido de expresión de la proteína verde fluorescente. Para dicho ensayo, las bacterias fueron sembradas en medio mínimo suplementado con glucosa 100 mM, se colectaron muestras a las 8 h. Las muestras se lisaron por sonicación y se determinó la concentración de proteína en cada una de las muestras. Se procedió a realizar geles de acrilamida 10% y la transferencia a membranas de celulosa. Posteriormente, se realizó un Western-blot anti-GFP.

En la Fig. 26 se muestra el inmuno-blot de 3 de las colonias seleccionadas. Como control positivo se empleó una cepa de *E. coli* conteniendo un plásmido pBad con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) inducida con IPTG y cosechada a las 8 h. El control negativo corresponde a la misma cepa pero sin inducir. De las tres colonias probadas se observa que dos presentan una banda cercana a 30 kDa al tiempo que fueron colectadas. Con todas las exconjugantes probadas se obtuvieron datos similares (resultados no mostrados) así que se seleccionó a la que mostró un mejor crecimiento, promedio de tres diferentes matraces y tres experimentos independientes, en medio líquido. De acuerdo al sistema para discriminar entre las colonias probadas la que fue seleccionada correspondía a la exconjugante denominada EII.

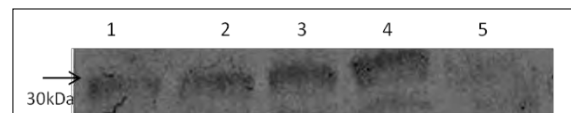


Figura 18 Western-blot anti-GFP para corroborar la expresión de la proteína por *S. peucetius* subsp. *caesius*. En el carril 1-3 se muestran los lisados de las colonias exconjugantes conteniendo el plásmido pIJ7066, el carril 4 corresponde al C+ lisado de células de *E. coli* pBad/gfp inducidas; el carril 5, control negativo, corresponde a la misma cepa pero sin inducir.

Con la exconjugante seleccionada se procedió a realizar una cinética de crecimiento en medio completo con el fin de comparar el crecimiento de ésta y la cepa control *S. peucetius* subsp. *caesius* pIJ8660. Los resultados se muestran en la Fig. 27.

Con respecto al crecimiento, en las condiciones probadas, la cepa EII muestra un mejor crecimiento aparente que la cepa control, sin embargo no se realizó análisis estadístico

para corroborar la significancia de las diferencias observadas. De manera cualitativa, a pesar de que sí hubo un mayor crecimiento de la cepa EII, el micelio se observaba más disgregado e incluso lisado con respecto al control. A las 72 h en ambas cepas se ha consumido completamente el carbohidrato, la cepa EII parece consumir el carbohidrato más rápido que la cepa control.

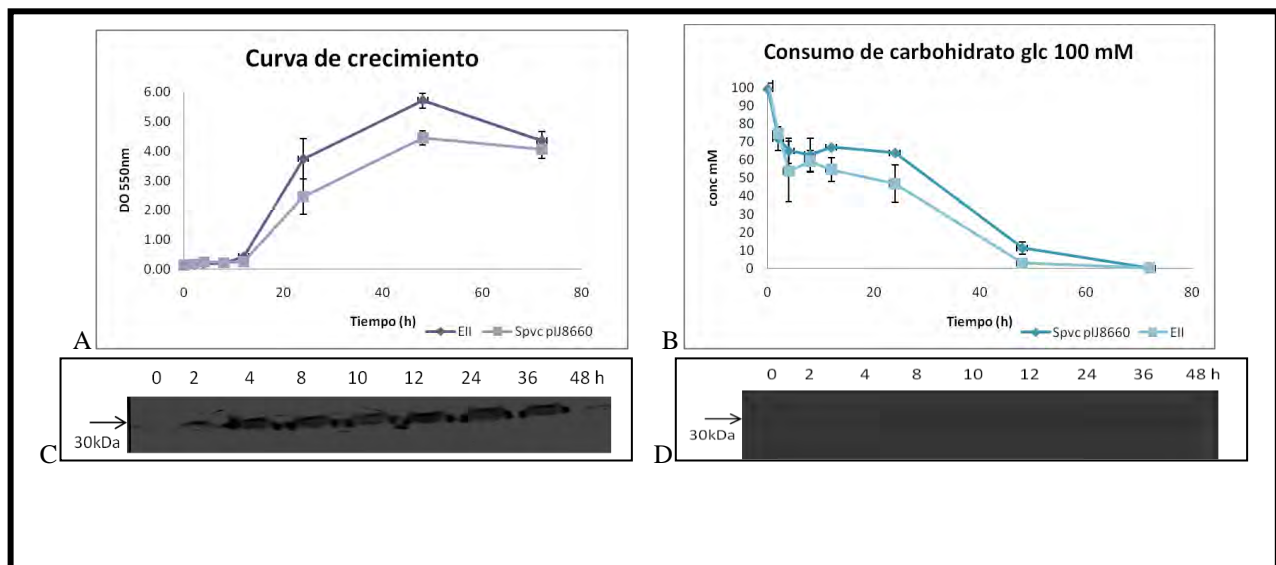


Figura 19. En A se observa la curva de crecimiento comparativa de SppIJ8660 y EII en medio completo. En B se observa la curva de consumo de glucosa de ambas cepas. En C y D se observan los inmuno-blots para las cepas anteriores. Resultados representativos de dos experimentos independientes. Con el inmunoblot anti-proteína verde fluorescente, se observa expresión de la proteína verde desde las 2 h. A las 48 h cuando la glucosa se ha terminado, prácticamente no se observa expresión de la proteína. En el caso de la cepa transformada con el plásmido pIJ8660 (plásmido sin promotor), cultivada a las mismas condiciones que la

cepa anterior y empleando las mismas condiciones para el ensayo inmunológico no se aprecia expresión de la proteína.

Una vez corroborada la expresión de la proteína verde fluorescente, se procedió a realizar una cinética de crecimiento en medio mínimo empleando como fuentes de carbono glucosa y arabinosa 100 mM. Como puede observarse en la Fig. 28, en medio mínimo el crecimiento es menor comparado con el caso anterior, cuando se empleó medio completo. En el caso de glucosa el crecimiento si es marcadamente mayor comparado con el crecimiento en arabinosa (Figs. 28 y 29). Sin embargo, el carbohidrato tampoco se consume totalmente pero corresponde con el comportamiento observado en las cepas control (datos no mostrados). Los cambios en el pH no son significativos y es otra de las características de referencia de *S. peucetius* subsp. *peucetius* creciendo en dicho carbohidrato. En la parte inferior de la figura, se muestra el western-blot con las muestras cosechadas a diferentes intervalos. Así, independientemente de que la cepa sea cultivada en medio mínimo o medio complejo suplementado con extracto de levadura, se observa expresión de la proteína verde desde las 2 h en glucosa (Fig. 28).

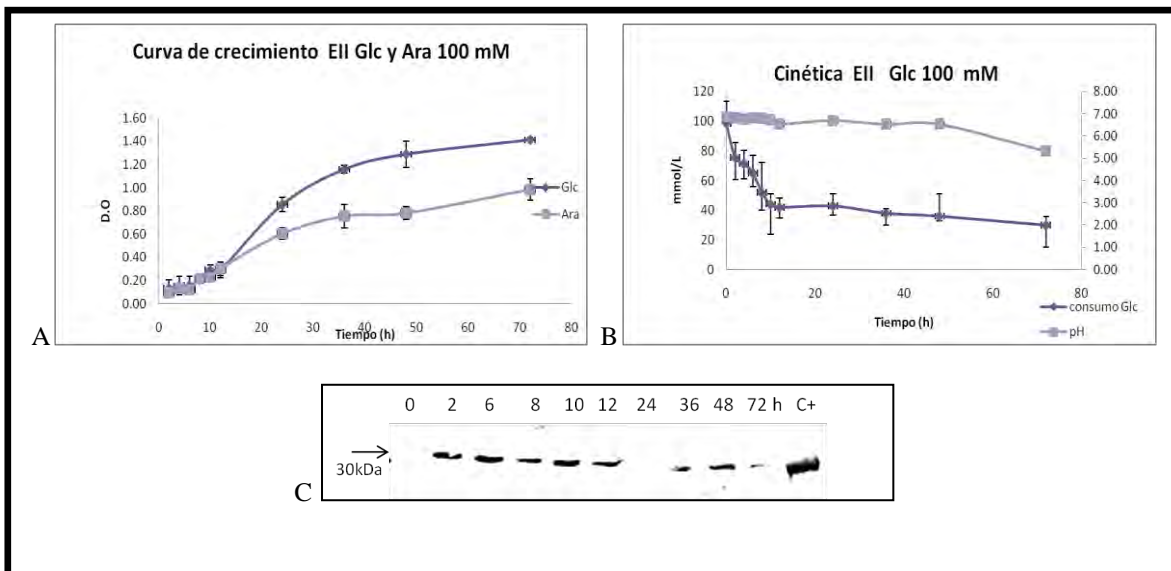


Figura 20. En A se muestra la cinética de crecimiento de la cepa EII (*Streptomyces peucetius* subsp. *caesiusspIJ7066*) cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa ó arabinosa 100 mM. En B se muestra el consumo de glucosa así como los cambios en el pH. C: Inmuno-blot que, muestra la expresión de la proteína verde fluorescente en glucosa, los tiempos corresponden a horas. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

En el caso de arabinosa como fuente de carbono, el carbohidrato tampoco se consume del todo a las 72 h que fue el último tiempo de muestreo. En el caso de pH, este carbohidrato se metaboliza vía pentosas fosfato y se observa la acidificación del medio de cultivo. En el inmuno-blot, no se aprecian bandas que correspondan con el peso de la proteína verde fluorescente comparándolas con el control positivo (Fig. 29).

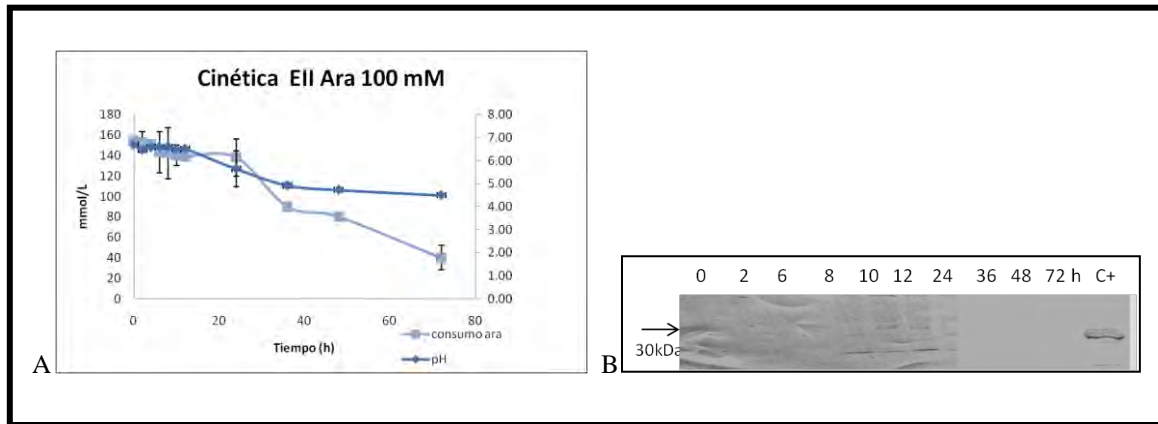


Figura 21. (A) Consumo de carbohidrato y cambio de pH exhibido por la cepa EII crecida en arabinosa 100 mM. En B se muestra el inmuno-blot con la expresión de la proteína verde fluorescente en arabinosa. Los tiempos corresponden a horas de crecimiento. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

6. Ensayos de inducción.

Efecto de la fuente de carbono

Los ensayos de inducción se realizaron creciendo a las bacterias en medio mínimo suplementado con 100 mM de arabinosa como fuente de carbono, se les permitió crecer durante 36 h. Una vez transcurridas las 36 h a cada matraz se le agregó el volumen correspondiente de la fuente de carbono a evaluar para una concentración final de 100 mM. Se cosecharon muestras cada 15 minutos después de la adición del pulso de la fuente de carbono y se procedió con el protocolo para la realización de los ensayos inmunológicos.

En la figura 30 se observan los resultados obtenidos al inducir a las células con D-glucosa y 2-desoxiglucosa. En ambos casos se observa producción de la proteína desde los 15 minutos de la inducción. El tiempo 0 corresponde a las muestras sin inducir. La Dog al carecer solamente de un grupo -OH en la posición 2 es capaz de inducir la expresión de

sp7066. Esto también se ha observado en el transportador de glucosa de hígado de pollo Ch-GT2 (Wang, 1994).

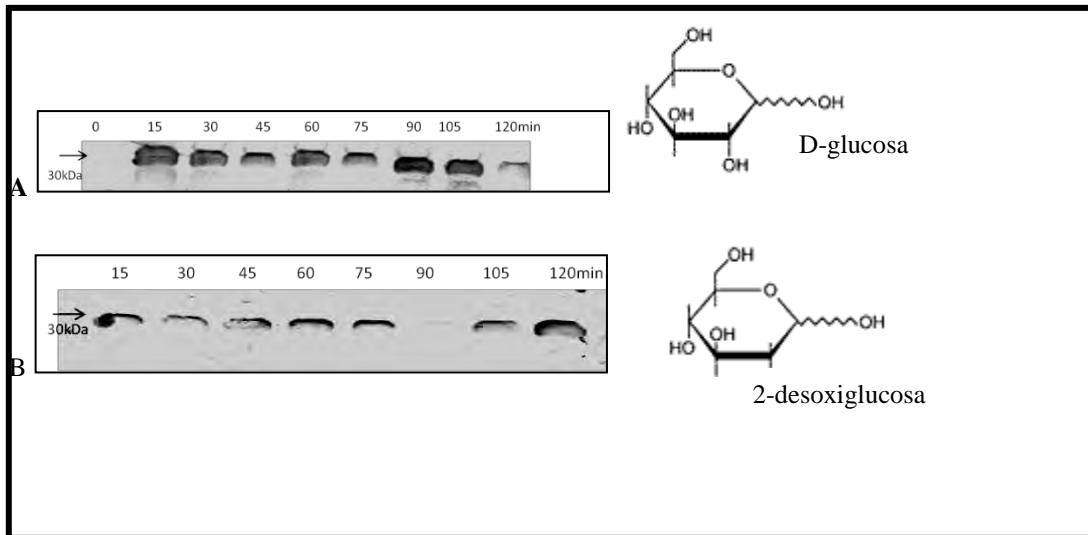


Figura 22. Ensayos de inducción con fuentes de carbono inductoras. El tiempo 0 corresponde a la muestra sin inducir que se empleó para sembrar tanto los matraces para los pulsos de glucosa como para los de desoxiglucosa. En A se muestran los resultados empleando glucosa como inductor y en B empleando desoxiglucosa. Ambos carbohidratos se emplearon a una concentración de 100mM. Adicionalmente, se muestran las estructuras cíclicas de ambos carbohidratos. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Se probaron otra serie de carbohidratos para verificar la inducibilidad del promotor del gen *sp7066*, entre ellos arabinosa, fructosa y glicerol. Se hace énfasis especial en la fructosa, ya que las permeasas de glucosa de *Synechocystis* y *Zimomonas mobilis* sí son capaces de transportar dicho carbohidrato, pero no así el GlcP de *S. coelicolor*. Con ninguna de las fuentes anteriores se obtuvo inducción de la proteína verde (Fig. 31).

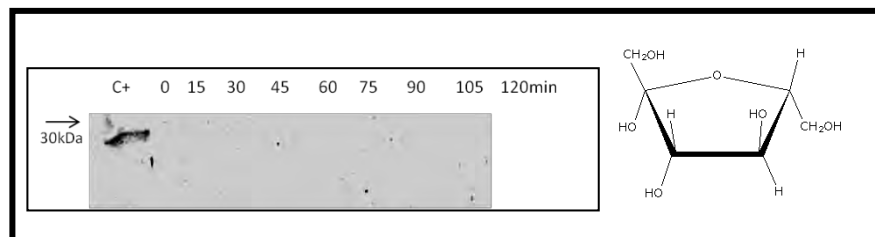


Figura 23. Ensayos de inducción empleando fructosa 100 mM como fuente de carbono. Los carriles corresponden a los diferentes tiempos de muestreo (t 0 hasta 120 min). Se muestra el control positivo. Los mismos se resultados fueron observados cuando se empleaba arabinosa, glicerol y N- acetil glucosamina como fuente de carbono. La estructura corresponde a la fructosa. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Por otra parte, como ha sido mencionado, en algunas especies de estreptomicetos se ha descrito un sistema PTS activado por NacGlc y con la finalidad de determinar si la presencia de esta fuente en el medio de cultivo podría afectar la fuente de expresión del gen *sp7066*, determinado mediante la expresión de la proteína verde se realizó un experimento donde se dieron pulsos con dos diferentes condiciones, una con condiciones altas de NacGlc (100 mM) y bajas de Glc (10 mM) y viceversa. En la Fig. 32 se observa que la inducción de la proteína verde se lleva a cabo independientemente de la presencia de NacGlc en el medio de cultivo. Por lo anterior, parece ser que a pesar de que la NacGlc es un carbohidrato del sistema PTS, éste no es capaz de regular negativamente la expresión de la probable permeasa de glucosa en *S. peucetius* subsp. *caesius*.

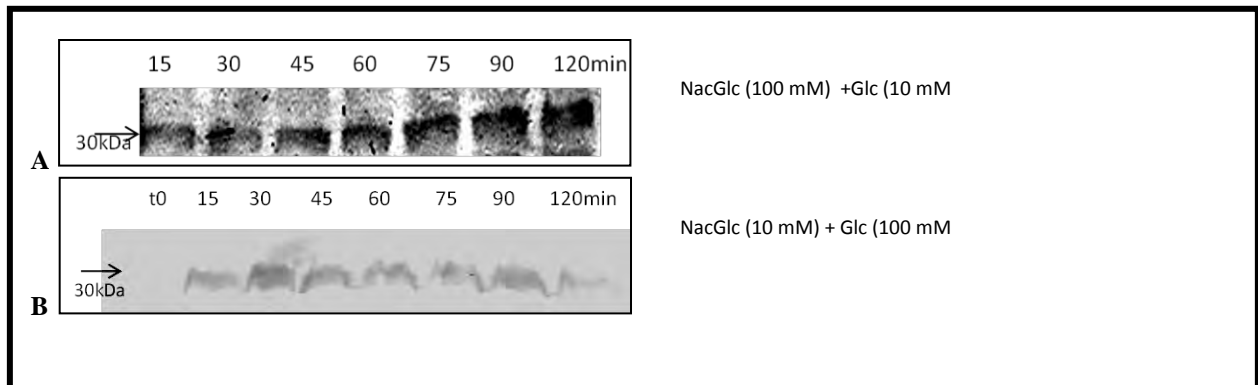


Figura 24. Ensayo donde se empleó combinaciones altas y bajas de glucosa y N-acetilglucosamina como inductores. En A se observan los resultados cuando se empleó la combinación de glucosa baja (10mM) y Nac alta (100 Mm). En B, se muestra el inmunoblot del caso contrario, glucosa alta, Nac baja. Independientemente de la concentración de NacGlc aún a concentraciones bajas de Glc, la síntesis de la proteína verde se induce mediada por el promotor de *sp7066*. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Efecto del pH sobre la expresión de *sp7066*.

A pesar de no encontrar en el análisis *in silico* regiones reconocidas por factores transcripcionales de cualquier forma se decidió hacer un análisis de efecto del pH sobre la expresión del transportador de glucosa. En algunos estudios de sistemas de transporte de la familia MFS, particularmente en hongos, donde el transporte de carbohidratos u otras moléculas se encuentran acoplados al simporte de protones, se han encontrado regiones capaces de responder a reguladores transcripcionales de respuesta a pH (van Kuyk, 2004). En la Fig. 33 se muestra que el promotor parece no responder a los cambios de pH en el medio extracelular. A ningún pH ensayado se activa la transcripción de la proteína verde pero, comparando con el control crecido en glucosa, tampoco se inhibe la síntesis a ningún pH. Estos resultados son solo un indicio, sin embargo es probable que el gen si tenga los elementos de control de regulación a pH pero que no se hayan incluido cuando se realizó la amplificación de la presunta región promotora, o bien que este sistema bacteriano carezca de tal tipo de respuesta. Sin embargo, para confirmar cualquiera de las suposiciones anteriores se requieren más estudios.

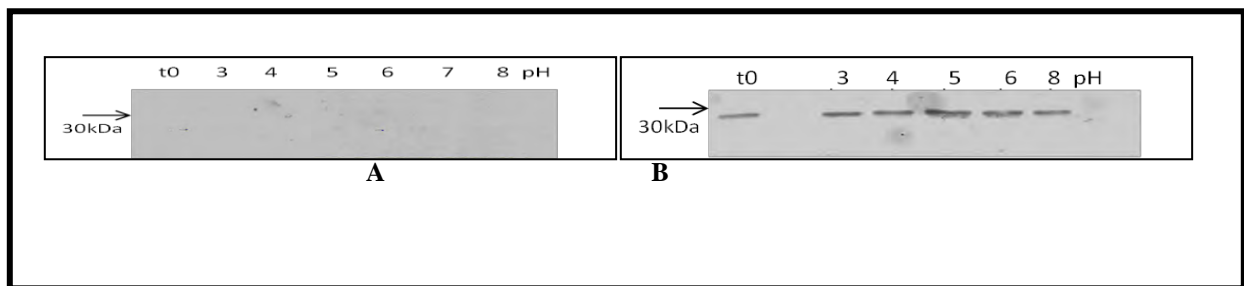


Figura 25 Efecto del pH. Del lado izquierdo se muestra los resultados obtenidos al crecer a la cepa EII en un carbohidrato no inductor y posteriormente cambiarlo a diferentes condiciones de pH. Como puede observarse no se produce inducción bajo ninguno de los pHs probados (Panel A). Del lado derecho (B) los resultados de expresión de la cepa EII creciendo en condiciones inductoras Glc 100 mM y su paso a diferentes pHs.

Efecto del producto del gen *sco2127*.

La complementación de las mutantes Dog^R de *S. coelicolor* exclusivamente con el gen de glK no revierte el fenotipo completamente sino que es necesaria la complementación tanto

con el gen *glk* como con la región *sco2127*. De igual manera, en el caso de las mutantes Dog^R de *S. peucetius* subsp. *caesius* para corregir la actividad de Glk y el transporte de glucosa la región *sco2127* parece tener un papel relevante. En estudios de dot-blot se sugirió una posible regulación a nivel transcripcional de la expresión de los genes *glk* y *sp7066*. Sin embargo, estudios *in silico* no predicen la existencia de motivos de unión a DNA del producto del gen *sco2127* de manera que un efecto directo sobre los promotores de la glucosa cinasa o el transportador de glucosa no parecen ser muy probables. De hecho la proteína hipotética no presenta dominios conservados que coincidan con proteínas de función conocida y, por tanto, resulta complicado determinar el papel de la misma en el fenómeno de RCC.

Con la finalidad de verificar, de manera cualitativa, un posible efecto del gen *sco2127* a nivel transcripcional sobre la expresión del transportador de glucosa, el sistema reportero promotor *sp7066*-EGFP fue introducido mediante conjugación intergenérica a una mutante Δ SCO2127 *S. coelicolor* (Forero, resultados no publicados).

Como puede observarse en la Fig. 34 la proteína verde fluorescente se expresa en la cepa M145 a pesar de que el promotor es el del transportador de *sp7066*, indicando el reconocimiento de la secuencia promotora en ambas especies. Como control positivo para verificar la expresión de la proteína se utilizó un extracto conocido de *S. peucetius* subsp. *caesius* cuya expresión de EGFP había sido verificada anteriormente.

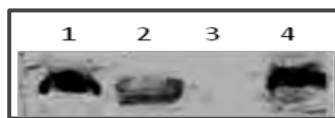


Figura 26. Western-blot de la proteína EGFP. En el carril 1 se muestra el control positivo que corresponde a un lisado bacteriano de EII que anteriormente se comprobó expresaba la proteína verde. En el carril 2 se observa el lisado de la mutante conteniendo el plásmido pIJ7066 (denominada Δ 4); carril 3 se muestra el control negativo (cepa ScoM145 con el plásmido pIJ8660). En el carril 4 se muestra a la cepa ScoM145 conteniendo el plásmido pIJ7066.

Con los resultados obtenidos, a nivel cualitativo, parece no haber un efecto de SCO2127 sobre la transcripción del gen *sp7066*. Si el producto de *sco2127* fuera un factor de transcripción activador de la transcripción del gen *sp7066*, en su ausencia el gen no podría

transcribirse o la expresión sería muy baja. Pero, de acuerdo a las predicciones *in silico*, el producto del gen *sco2127* no parece ser un activador transcripcional, o al menos no el único. Cabe resaltar que éste es sólo un estudio cualitativo, peculiarmente de todo o nada y para obtener información más fina tendrían que realizarse otros estudios o verificar los niveles de expresión a nivel de mRNA.

Por otra parte, en estudios recientes en nuestro grupo de trabajo se ha postulado que el efecto sobre la actividad de la Glk y el transportador de glucosa puede ser el resultado de una interacción proteína-proteína creando un complejo proteico de transporte y fosforilación concomitante en la membrana de estos organismos.

CONSIDERACIONES FINALES

En el presente trabajo se logró identificar a la región denominada *sp7066* como la permeasa putativa de glucosa en *S. peucetius* subsp. *caesius*. Bajo este nuevo conocimiento sería necesario deletar dicho gen y hacer estudios adicionales para corroborar que constituye el transportador principal de glucosa de dicho microorganismo. A la par se realizaron experimentos que permitieron obtener una fusión con un gen reportero funcional para evaluar la regulación transcripcional del gen *sp7066*. De esta manera, con dicha herramienta, se encontró que el gen *sp7066* sólo responde a glucosa (incluyendo el análogo no metabolizable, 2-desoxiglucosa) y no a otros carbohidratos. Además, encontramos que la región promotora no responde a cambios de pH extracelular como en el caso de otros microorganismos (hongos). Si bien, la regulación transcripcional de los genes procariotas es más simple que en muchos eucariotas, considerando el tipo de cajas presentes en los promotores de estos últimos, no podemos descartar que en regiones distales del gen *sp7066* se puedan encontrar elementos reconocidos por factores transcripcionales de respuesta a pH, no observados en este estudio ya que sólo se amplificó la región promotora básica. Esto considerando que muchos genes bacterianos son también regulados por elementos distales al promotor.

Por otra parte, en este estudio cualitativamente se evaluó el efecto del gen *sco2127* sobre el gen *sp7066* en ausencia del primero la expresión de *sp7066* no parece ser modificada, lo que podría indicar que los efectos observados de *SCO2127* sobre la incorporación de glucosa tal vez no son resultado de un aumento en la expresión del transportador de glucosa mediada por la influencia de *SCO2127* sino tal vez, por interacciones proteína-proteína o algún otro mecanismo importante para la incorporación eficiente de la fuente de carbono como para el fenómeno de represión catabólica por carbono.

CONCLUSIONES

- Se identificó a la región *sp7066* como un transportador de glucosa putativo perteneciente a la familia MFS.
- Se definió y clonó la región promotora del gen *sp7066* que contiene los elementos responsivos a carbohidrato (glucosa).
- El promotor analizado responde exclusivamente a glucosa y 2-desoxiglucosa cuando ésta se añade al medio como fuente de carbono ya que no responde a otras fuentes carbonadas como la fructosa, arabinosa y glicerol.
- Carbohidratos del sistema PTS no evitan la inducción del gen reportero mediada por la región promotora de *sp7066*.
- La región amplificada no parece tener elementos regulatorios de respuesta al pH extracelular.
- En las mutantes Δ *sco2127* no se observa, cualitativamente, un efecto sobre la transcripción de *sp7066*, en conjunto con la evidencia acumulada hasta el momento parecen sugerir un papel del producto del gen *sco2127* a otro nivel.

PERSPECTIVAS

- Deletar o silenciar el gen *sp7066* para corroborar que es la permeasa más importante en el transporte de glucosa de *S. peucetius* subsp. *caesius*.
- Hacer más estudios *in silico* con el fin de determinar si en regiones río arriba del gen se encuentran sitios para la unión de factores transcripcionales, por ejemplo, sitios de respuesta a pH.
- Clonar el gen *sp7066* y caracterizarlo determinando sus propiedades, K_a , inhibición de transporte por inhibidores de potencial de membrana, transporte de otros carbohidratos, etc.
- Implementar un método cuantitativo para determinar la influencia de la región *sco2127* sobre la expresión de la permeasa de glucosa.
- Determinar las posibles interacciones proteína-proteína entre GlcP y la proteína SCO2127 considerando que el aumento en la incorporación de glucosa en presencia de la sobreexpresión de SCO2127, parece no ser debida a una regulación transcripcional.

REFERENCIAS

1. **Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H. and Iwata S.** (2009). Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. *Science*: 301, 610.
2. **Angell, S., Lewis, C., Buttner, M. and Bibb, M.** (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) a likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular and General Genetics*: 244, 135-43.
3. **Angell, S., Schwarz, E., and Bibb, M.** (1992). The glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular Microbiology*: 6, 2833-2844.
4. **Arcamone, F.; Cassinelli, G.; Fantini, G.** (1969). Adriamycin 1hydroxydaunomycin, A New Antitumor Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*: 11, 1101 – 1110
5. **Bentley, S., Chater K., Cerdeño-Tarraga A., Challis G., Thomson R., James K., Harris D., Quail M., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Cheng C., M. Collins M., A. Cronin A., Fraser A., Goble A.,Hidalgo J., Hornsby T.,Howarth S., Huang C., Kieser T.,Larke L., Murphy L.,Oliver K.,O’Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M., Rutherford K.,Rutter S.,Seeger K.,Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T.,Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B., Parkhill J. and Hopwood D.** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*: 417, 141-147.
6. **Bertram, R., Schlicht M., Mahr K., Nothaft H., Saier M., and Titgemeyer F.,** (2004). *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*: 1362-1373.
7. **Bibb, M.** (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*: 8 , 208-215.
8. **Blaesing, F., Agnes, M., Silke, V., Gunter, Z., Stefan, P., and Erich, L.** (2005). Introduction of DNA into *Actinomycetes* by bacterial conjugation from *E. coli* - An evaluation of various transfer systems. *Journal of Biotechnology*: 120, 146-161.
9. **Bourn, W., and Babb, B.** (1995). Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*: 23 (18), 3696-3703.
10. **Bruckner, R.** (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*: 209, 141-148.

11. **Challis, G.** (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*: 100 , 1455-1461.
12. **Chater, K.** (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*: 361 , 761-768.
13. **Chen, X., Mo, H., Liu, Y., and Xia F.** (2006). Development of a multifunctional and efficient conjugal plasmid for use in *Streptomyces* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 70, 705-710.
14. **Choi, S., Lee' C., Hwang, Y., Kinoshita' H., and Nihira, T.** (2004). Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer. *Archives of Microbiology*: 18,294-298
15. **Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.**(2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *TRENDS in Microbiology*: 16, 313-319.
16. **Davidson, M., Dassa, E., Orelle, C., and Chen J.** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 317–364
17. **Demain, A.** (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International. Microbiology*: 1, 259-264.
18. **Demain, A. and Sanchez, S.** (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*: 62, 5-16.
19. **Deutscher, J. C.** (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 4, 939-1031.
20. **Eng, C., Asthana, C., Aigle, B., Hergalant, S., Mari, S. and Leblond, P.** (2009) A new data mining approach for the detection of bacterial promoters combining stochastic and combinatorial methods. *Journal of Computational Biology*: 16, 1211-1225.
21. **Flardh, K., and Buttner M.** (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*: 7, 36-49.
22. **Görke, B. and Stülke J.** (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*: 6,613-624.

23. **Guzmán, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., López, R., Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Servín-González L., Sánchez, S. and Elizabeth Langley.** (2005). Pleiotropic effects of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*: 151, 1717-1723.
24. **Hillerich, B. and Westpheling, J.** (2006). A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *Journal of Bacteriology*: 188, 7477-7487.
25. **Hodgson, D.** (1982). Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology*: 128 , 2417-2430.
26. **Hodgson, D.** (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*: 42, 47-238.
27. **Hopwood, D.** (2006). Soil To Genomics: The Streptomyces Chromosome. *Annual Review of Genetics*: 40, 1-23.
28. **Huang, C., Lin, Y., Yang, Y., Chen, C., and Huan, S.** (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular Microbiology*: 28, 905-916
29. **Ikeda, H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. and Omura S.** (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature*: 21 , 526-531.
30. **Ikeda, H., Seno T., Bruton, C. and Chater K.** (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and General Genetics*: 196 , 501-507.
31. **Kieser, T., Chater, K., Bibb, M., Buttner, M. and Hopwood D.** (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. 2-33.
32. **Kim, E., Hong, H., Choi, C., and Cohen, S.** (2001) Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *Journal of Bacteriology*: 183, 2198-2203.
33. **Konings, W.** (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 90, 325-342.
34. **Law, C., Maloney, P. and Wang, D.** (2008) Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annual Reviews of Microbiology*: 62,289–305.

35. **Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M., and Tieleman, D.** (2008). ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1778, 1757–1771
36. **Monedero, V., Hazé, A., Boel, G., Zúñiga, M., Beaufils, S., Hartke, A., Deutscher, J.** (2007) The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*. Regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*: 12, 20–32.
37. **Nothaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M. and Titgemeyer, F.** (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for *N*-acetylglucosamine metabolism. *Journal of Bacteriology*: 185, 7019-7023.
38. **Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A. and Horinouchi, S.** (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*: 3, 431-439
39. **Pao, S., Paulsen, I., and Saier, M.** (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 1, 1-34.
40. **Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R. and Stassi, D.** (2003). *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*: 23, 1-27.
41. **Parche, S., Schmid, R., Titgemeyer, F.** (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *European Journal of Biochemistry*: 265, 308-317.
42. **Rigali, S., Schlicht, M., Hoskisson, P., Nothaft, H., Merzbacher, M., Joris, B. and Titgemeyer, F.** (2004). Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new *cis/trans* relationships. *Nucleic Acids Research*: 32, 3418-3426.
43. **Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E. and Sánchez, S.** (2010). Metabolites: Regulation by the Carbon Source. *Critical Reviews in Microbiology*. En prensa.

44. **Sambrook, J., MacCallum, P. and Russell, D.**(2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
45. **Schrey, S., and Tarkka, M.** (2008). Friends and foes: *Streptomyces* as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 94, 11-19.
46. **Segura, D., González, R., Rodríguez, R., Sandoval, T., Escalante, L. and Sanchez, S.** (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*: 4, 30-36.
47. **Siebold, C., Flukiger K., Beutler R., and Erni B.** (2004).Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Letters*: 504,104-111.
48. **Strhol, W.** (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*: 20, 961-974.
49. **Sun, J., Kelemen, G. H., Fernandez, J. M., and Bibb, M.** (1999). Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*: 145, 2221-2227.
50. **Takano, E.** (2006) Y-Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology*: 9, 287-294.
51. **Titgemeyer, F. and Hillen, W.** (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek*: 82, 59-71.
52. **van Wezel, G., Konig, M., Mahr,K., Traag, B., Pimentel-Schmitt, E., Willimek, A., and Titgemeyer, F.** (2005). GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*: 55 , 624-636.
53. **van Wezel, G., Konig, M., Mahr,K., Nothaft, H. Thomoe, A., Bibb, M., and 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, 67-74
54. **vanKuyk, P., Diderich, J., Mac Cebes, O., Herrero, O., Ruijter, G., and Visser, J.** (2004) *Aspergillus niger mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter wich is regulated in reponse to extracelular pH. *Biochemistry*: 379, 375-383.

55. **Venancio, T. and Aravind L.** (2009). Reconstructing prokaryotic transcriptional regulatory networks: lessons from actinobacteria. *Journal of Biology*: 8,29,35
56. **Wang, F., Tsai, M., and Wang, C.** (1994). Identification of a chicken liver glucose transporter. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 310,172-179.
57. **Wang, F., Xiao, X., Saito, A. and Schrempf, H.** (2002). *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of *N*-acetylglucosamine. *Molecular Genetics and Genomics*: 268, 344-351.
58. **Watve, M., Tickoo, R., Jog, M., and Bhole, B.** (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*: 176 , 386-390.
59. **Wolfgang, T. F.** (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 82 , 59-71.

Medios electrónicos

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

www.enzim.hu/hmmtop/index

www.sbc.su.se

www.softberry.com

APÉNDICE

I. Medios de cultivo.

i. Medio Luria-Bertani.

Componente	Concentración
Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

ii. Medio SOC.

Componente	Concentración
Triptona	20 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	0.5845 g/L
KCl	0.185 g/L
MgCl ₂ -6H ₂ O	2.03 g/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	2.46 g/L
Glucosa	3.60 g/L

iii. Medio YMG

Componente	Concentración
Extracto de levadura	4 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Glucosa	4 g/L

iv. Medio mínimo definido en nitratos (NDM)

Componente	Molaridad	Concentración
NaNO ₃	10 mM	0.85 g/L
K ₂ HPO ₄	1	0.1742
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	10 mL stock 50Mm
Glucosa	100	
Elementos traza		20 mL/L
Extracto de levadura		2 g/L

Elementos traza	Concentración mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	200
ZnCl ₂	40
CuCl ₂ .2H ₂ O	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	10
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O	10
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10
Los elementos traza se disuelven individualmente en 5 mL de agua, se juntan y se aforan a los mililitros deseados. Esterilizar por filtración y almacenar en frasco ámbar.	

v. Medio NMMP

Reactivo	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Difco Casaminoacidos	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.6 g
PEG 6000	50 g
Solución de elementos menores	1 ml
Agua destilada	800 ml

Solución de elementos menores

Reactivo	Concentración g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	1
CaCl ₂	1
Al momento de usar agregar: 15 ml de buffer NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.1 M, pH 6.8) 2.5 ml Fuente de carbono (20%)	

vi. Medio MS

Componente	Concentración
Agar	20 g/L
Manitol	20 g/L
Harina de soya	20 g/L

II. Protocolos para ADN

I. EXTRACCIÓN DE DNA *Streptomyces*

1. Sembrar al estreptomiceto en 25 mL de medio YMG (por duplicado en matraces de 125 mL con 3 perlas de vidrio c/u). Incubar a 29°C con agitación, 200 rpm, durante 48 h.
2. El preinóculo se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min. Lavar dos veces con 6 mL de solución salina estéril.
3. Resuspender en 6 mL de la SSI. Tomar 3 mL para inocular en 2 matraces bafleados de 250 mL que contienen 50 mL de medio TSB con glicina 0.5%.
4. Incubar 48 h, mismas condiciones del punto 1.
5. Juntar los dos cultivos (100 mL) y centrifugar a 5000 rpm por 5 min.
6. Lavar 2x con 25 mL de sacarosa 10.3% (15 min, 5000 rpm).
7. Resuspender el micelio en 50 mL de Buffer P con lisozima (2 mg/mL). Incubar en movimiento a 30°C hasta la formación de protoplastos (aprox. 1 h).
A PARTIR DE ESTE PUNTO SE PUEDE TRABAJAR FUERA DEL ÁREA ESTÉRIL
8. Centrifugar a 6,000 por 10 min.
9. Resuspender los protoplastos en 10 mL de sacarosa 10.3%. Adicionar 200 µL de EDTA 0.5 M.
10. Agregar 2 mL SDS 20%. Agitar suavemente con una pipeta. Adicionar inmediatamente 10 mL de fenol y 1.5 mL NaCl 5 M. Mezclar por 20 min.
11. Agregar 10 mL de cloroformo pH7 (10 ml) mezclar por 5 min y centrifugar a 8,000 rpm/10 min.
12. Repetir la adición de fenol y cloroformo a la fase superior. Mezclar y centrifugar 10,000 rpm/15 min
13. Mantener en hielo el centrifugado. Transferir con mucho cuidado la fase superior con una micropipeta de 1 mL y transferirla a un nuevo tubo.
14. Agregar 1 vol de isopropanol cuidando que queden dos fases.
15. Enredar en DNA con una pipeta pasteur (spooling). Lavar con etanol 70%. Dejar secar.
16. Resuspender en el menor volumen de buffer T.E. si el DNA no está completamente disuelto disolver a 30 C.
17. Adicionar RNAsa a una concentración final de 20 µg/mL. Incubar 30 min a 37°C.
18. Agregar pronasa a una concentración final de 100 µg/mL. Incubar 15 min.
19. Adicionar 20 µL de NaCl 5 M y 40 µL de SDS 0.4%. Incubar 37°C por una h.
20. Agregar 1 vol de fenol. Mezclar y centrifugar (8,000 rpm/10 min).
21. Extraer la fase acuosa, poner 1 vol de fenol-cloroformo, centrifugar a 8000 rpm por 10 min. Separar la fase acuosa.
22. Adicionar 1 vol de cloroformo (500 µL), mezclar, centrifugar (8,000 rpm, 10 min) y separar la fase acuosa
23. A esta fase adicionar (1/10 vol.) de CH₃COONA 3 M mezclar y adicionar 2.5 vol de etanol absoluto. Incubar 30 min en congelador -20°C.
24. Centrifugar a 10,000 x 30 min a 4°C.
25. Desechar el sobrenadante y agregar 1 vol de etanol 70%. Mezclar. Centrifugar 10,000 rpm x 10 min a 4°C (x2)
26. Secar. Resuspender en el menor volumen de buffer T.E. y almacenarlo a -20°C.

Buffer P (Protoplastos)	
Componente	Concentración
Sacarosa	103 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	2.02 g/L
Elementos traza	2 mL/L
H ₂ O	800 mL
Dividir en alícuotas de 80 mL y esterilizar en autoclave. Antes de usar agregar por cada 100 mL lo siguiente (2)	

Por cada 100 mL (2)	Cantidad
Componente	
KH ₂ PO ₄	1 mL
CaCl ₂ . H ₂ O	10 mL
Buffer TES	10 mL
Se prepara cada solución por separado y se esterilizan en autoclave.	

Buffer TE			
	Concentración	Solución stock	Volumen stock/L
Tris-HCl	10 mM	2 M (pH8)	5 mL
EDTA	1 mM	0.25 M (pH8)	4 mL

II. Extracción de plásmido a pequeña escala (miniprep).

1. Se inoculan 5 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se transfiere el medio de cultivo a tubos de 1.5 mL y se centrifuga a 12000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C.
3. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón celular en 100 µL de la solución I, en seguida se adicionan 200 µL de solución II y se mezclan por inversión cuidando de abarcar toda la superficie del tubo, posteriormente se agregan 150 µL solución III y se vortexea gentilmente el tubo en posición invertida durante 10 s. Se deja reposar el tubo en hielo de 3 a 5 min.
4. Al sobrenadante se le adicionan dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja a -20°C por 30 min y se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Se retira el sobrenadante y se agrega al botón 1 vol de etanol al 70% a R.T. hasta que se desprenda del fondo del tubo, después se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.
6. El sobrenadante es retirado y se deja secar el botón a 37°C, por último se resuspende el botón en 10 µL de TE (pH 8.0), conteniendo RNAasa (20 µg/mL), y se incuba a 55°C por 30 min.

Solución I	Solución II	Solución III
50 mM Glucosa	0.2 NaOH	5 M CH ₃ COOK 60mL
25 mM Tris-HCl pH 8	1% SDS	CH ₃ COOH 11.5 mL
10 mM EDTA pH 8		H ₂ O 28.5 mL

III. Extracción de plásmido a gran escala (maxiprep).

1. Como preinóculo se siembran 5 mL de medio LB-amp al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se inoculan 250 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
3. Se transfiere el medio de cultivo a botellas de 250 mL y se centrifugan a 10000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retira y el botón se mantiene en hielo.
4. El botón se resuspende en 30 mL de solución I adicionando 250 µL de RNAsa (10 mg/mL), posteriormente se agregan 60 mL de solución II se mezcla bien y en seguida se añaden 50 mL de solución III. La mezcla se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 20°C.
5. El sobrenadante se recupera, y se le añade un volumen de isopropanol para precipitar el ADN, la muestra se deja reposar 30 min y después se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 20°C
6. Se retira el sobrenadante, y posteriormente se lava el botón en etanol al 70%, centrifugar a 12000 rpm 15 min a 20°C y el etanol al 70% se retira y se deja secar el botón a 37°C por 30 min-1 h.
7. El botón se resuspende en 5 mL de Sol. MOPS, agregando 100 µL de RNAsa pancreática (10 mg/mL) dejándolo reposar 1 h a temperatura ambiente, consecutivamente se adicionan 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubar a 55°C 1 h (opcional).

Solución I	Solución II	Solución III	Solución de MOPS
5 mM sacarosa	0.2 N NaOH	3 M acetato de sodio pH 4.8	750 mM NaCl
10 mM EDTA	1% (w/v) SDS		2 mM EDTA
25 mM Tris pH 8.0			50 mM MOPS pH 7.0

IV. Limpieza de ADN con fenol-cloroformo

1. Se colocan 0.5 mL de ADN en tubos eppendorf, adicionando 0.5 mL de fenol-cloroformo 1:1 a la muestra y se agita hasta que se forme una suspensión.
2. Se centrifuga 5 min a 13000 rpm y posteriormente se recupera la fase acuosa.

3. El paso 1 y 2 se repiten hasta que se halla eliminado el exceso de proteína que se acumula entre las dos fases.
4. Se agregan 0.5 mL de cloroformo isoamílico 24:1, agitando para que se forme la suspensión y se centrifuga 3 min a 13000 rpm.
5. La fase acuosa se recupera y se le añade un décimo de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla para homogenizar.
6. Se deja precipitar el ADN a -20°C durante 1 h, a continuación se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante es eliminado.
7. El botón se lava con 0.25 mL de etanol al 70% hasta que se despenda del tubo eppendorf, se centrifuga 15 min a 13000 rpm y se retira el sobrenadante.
8. Se deja secar el botón a 37°C y se resuspende en un volumen adecuado de agua estéril o buffer TE (pH 8.0).

V. Purificación de plásmido Mini Kit (Qiagen)

Permite la purificación de ADN usando columnas de gravedad donde la purificación del ADN plásmidico se lleva a cabo por intercambio aniónico. Las propiedades del ADN purificado son equivalentes o superiores a los que se obtienen por gradiente de CsCl, además de que no se utilizan sustancias toxicas como el fenol, cloroformo, bromuro de etidio y CsCl. Este método solo se utiliza para purificar el ADN que se secuenció.

1. Se reparte la muestra (ADN plasmídico) en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifuga 10 s a 12000 rpm, después se guarda una alícuota de 50 μL de muestra para su posterior análisis.
2. A continuación el tip (columna de gravedad) es equilibrado con 1mL de tampón QBT, y después se hacer pasar por la columna la muestra ADN plasmídico, una vez que la muestra ya pasó se guarda una alícuota de 50 μL de muestra.
3. La columna se lava 4 veces con 1 mL de tampón QC (este se recupera y guarda en tubos eppendorf).
4. Se pone 0.8 mL de tampón QF (incubado previamente a 65°C antes de la elusión) y se recupera el ADN eluido en tubos eppendorf y se guarda una alícuota de 50 μL .
5. Se precipita el ADN con 700 μL de isopropanol, dejándolo reposar 30 min y después se centrifuga a 12000 rpm 15 min a temperatura ambiente.
6. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón en 100 μL de etanol 70% y se centrifuga 15 min a 12000 rpm.
7. El botón se dejar secar a temperatura ambiente ó a 37°C durante 1 h y por último se resuspende cada botón en 20 μL de agua ultra pura estéril.

VI. Electroforesis de Agarosa

1. Se prepara una solución de agarosa 0.8% (para fragmentos de menor tamaño se incrementa la concentración de agarosa) en el buffer TAE, la solución se calienta para que se disuelva, evitando la presencia de sólidos suspendidos, posteriormente se adiciona el bromuro de etidio a una concentración final de (0.5 µg/mL).
2. Se coloca la solución en la cámara de electroforesis y se deja que solidifique.
3. La muestra de ADN se mezcla con tampón de carga a una concentración final 1X, y esta es colocada en el gel.
4. La electroforesis se lleva a cabo a 6 v/cm hasta que el pigmento haya migrado a ¾ partes a lo largo del gel y después se puede observar en el transiluminador de UV para examinar la migración de fragmentos de ADN y su peso molecular.

Geles de agarosa		Cantidad
Componente		
Agarosa		
Buffer de carga 6X	0.25% azul de bromofenol	
Tipo III	0.25% Cianol FF de xileno	
	4°C	
	30% glicerol en agua	
Buffer	TAE	245 g Tris base
(Tris.acetatos-		57.1 mL ácido acético glacial
EDTA) 50X:		100 mL EDTA 0.5 M (pH 8.0)

VII. Producción de células de *E. coli* electrocompetentes.

Preparación de células electrocompetentes.

1. Se inocula 400 mL de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37°C con agitación continua por 3 h hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a 10000 rpm por 15 min a 4°C.
3. Se retira el sobrenadante (medio) y resuspende el botón en un volumen de agua mega pura estéril y fría, después se centrifuga como en el paso 2.
4. El sobrenadante se retira y resuspende en $\frac{1}{2}$ del volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15min.
4. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 8 mL de glicerol al 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15 min.
5. Por último se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en un volumen final de 1.2 mL de glicerol al 10% frío, se alícuota la muestra en tubos eppendorf con 50 μ L cada uno, almacenándolos a -70°C.

Electro-Transformación.

1. A 50 μ L de células competentes se les adiciona de 1-2 μ g de plásmido y se incuba en hielo por 1 min.
2. La mezcla de ADN y células se colocan en una cubeta de electroporación fría de 0.1 cm.
3. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5 ms y 12.5 kV/cm, y se le da un pulso de 1.25 V. Inmediatamente después se le adicionan 950 μ L de medio SOC y rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta.
4. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y se incuban a 37°C en agitación continua por 1 h, después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa.

1. Protocolos para proteínas.

III.A Geles SDS-PAGE.

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. En la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel; el tamaño de los poros disminuye con altas concentraciones de acrilamida. La combinación del tamaño del poro del gel y la carga de la proteína, tamaño y forma determinan el tipo de migración de la proteína.

SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS está cargado negativamente. En este sistema las proteínas tienen carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema.

a) Preparación del gel:

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, se marcan los niveles de separación de los geles y se comprueba de que no haya fugas.
2. Se prepara el gel de acrilamida al 12% (gel de separación) y se coloca dentro de las placas, aproximadamente abarcando 5cm de altura.
3. Para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.
4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vacía en las placas el gel de concentración, evitando que se formen burbujas dentro las separaciones y entre un gel y otro. Después de la polimerización, los geles están listos para la electroforesis.
6. Se recorren los geles 15 min a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

b) Preparación de las muestras

1. Se colocan las muestras (en este caso botón celular) en tubos eppendorff, las células se disuelven en tampón de muestra a una concentración final de 2X y se hierven durante 5 min. Se colocan en hielo mientras son cargadas en el gel.

c) Condiciones de migración para 2 geles de acrilamida:

1. Los geles se corren a 20 mA, durante 1.5 h, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con tampón de migración 1X.

Geles de acrilamida (2) 30%/Bis:

Reactivo	Gel de Concentración 4%	Gel de Separación 10%
Acrilamida/Bis 30%	532 µL	3.32 mL
Tris.HCl 0.5 M, pH 6.8	1.0 mL	—
Tris.HCl 1.5 M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10%	40 µL	100 µL
Agua destilada	2.42 mL	4 mL
Temed	4.4 µL	5.5 µL
Persulfato de amonio 10%	22 µL	55 µL
Total	4 mL	10mL

Tampón de muestra 4x:

Componente	Cantidad
H ₂ O destilada	8.5 mL
Tris.HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL
Glicerol	2 mL
SDS 10%	4 mL
2-β mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	500 µL

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Composición	Cantidad
Tri.base 125 M	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

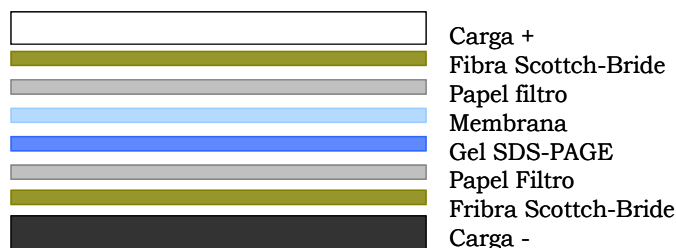
Pasos y soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie:

Solución	Cantidad	Tiempo
Solución Stock I	0.2 % Azul de Coomasie 90% Etanol	
Solución Stock II	20% Ácido acético	
Pasos de tinción		
1. Fijación	Etanol 40% Ácido acético glacial 10%	30 min
2. Tinción	Stock I 50% Stock II 50%	20 min
3. Desteñir I	Solución de fijación	30 s
4. Desteñir II	Etanol 20% Ácido acético glacial 10%	Inspección visual

III.B Western Blot

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100 mL del buffer 10x + 100 mL de metanol y se afora a 1 L.
2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con tampón de transferencia.
3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma:



Si al colocar la membrana sobre el gel SDS-PAGE se forman burbujas, estas deben ser eliminadas haciendo rodar una pipeta pauster sobre la superficie de la membrana.

4. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque del aparato de Western, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.
5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.
6. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 h, 1 h a 37°C o se puede guardar durante algunos días.

Solución	Concentración
TBS	0.05 M Tris-HCl 0.15 M NaCl pH 7.5
TBST	TBS-0.05% Tween-20
Solución bloqueo	5% (w/v) leche descremada en TBST

Determinación de crecimiento por peso seco

1. Secar los papeles filtro Wathman No.1 a 60°C durante 12 h ó 80°C por 2 horas
2. Colocar en un desecador hasta que los papeles se encuentre a temperatura ambiente. Pesar y registrar el peso (peso inicial)
3. Centrifugar alícuota de cultivo a 7000 rpm por 15 min
4. Descartar el sobrenadante y agregar solución salina isotónica (lavado)
5. Centrifugar
6. Filtrar con el papel filtro.
7. Dejar secar los papeles filtro con la muestra a 60°C durante 48 h ó a 80°C por 2 horas
8. Pesar los papeles filtro y registrar el peso (peso final)

- Determinar la biomasa por diferencia de peso

Conjugación intergénica *S. peucetius*

- Diluir 1 mL de cultivo de *S. peucetius* en 9 mL de medio TSB y cultivarlo por 18 h a 30°C en agitación.
- Homogenizar el cultivo anterior y mezclar 2 mL con 18 mL de medio TSB. Cultivar 16 h a 30°C en agitación.
- Diluir 1 mL del cultivo y diluirlo en 9 mL de medio TSB incubar la suspensión 3 h a 30°C en agitación. Recuperar el micelio por centrifugación, lavando con medio TSB. Resuspender el pellet en 2 mL de medio TSB.
- Mezclar en un tubo 100 µL de células donadoras y 100 µL de fragmentos miceliares. Sembrar lamezcla en placas con medio MS siplementado con 10mM de MgCl₂ e incubar a 30°C por 18 h.
- Adicionar 1 mL de ácido nalidíxico y 1 mg de apramicina.
- Mantener las placas a 30°C por 5 días. Contar las exconjugantes.

Revelado anti-GFP

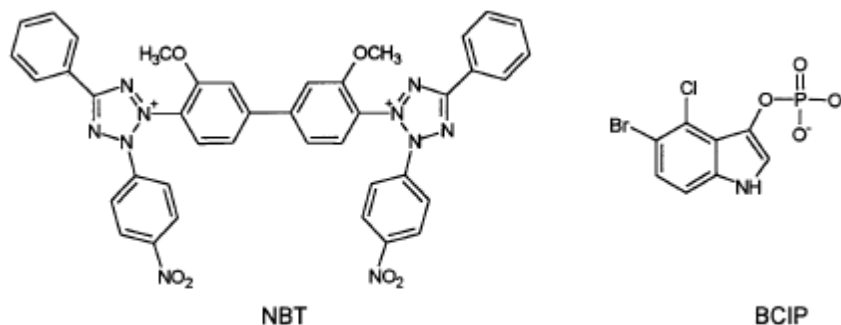
Anticuerpo monoclonal anti-GFP 3E6 (Invitrogen)

- Colocar la membrana en buffer de bloqueo e incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Decantar la solución de bloqueo.
- Lavar dos veces con TBST en agitación constante por 1 min cada uno.
- Preparar el anticuerpo a una dilución 1:1000
- Decante el TBST y adicione la solución del anticuerpo anti-GFP diluido. Incubar 2h a temperatura ambiente bajo agitación suave. Decante la solución de anticuerpo.
- Lavar la membrana 2 veces con TBST con agitación suave durante 1 min.
- Preparar el conjugado del segundo anticuerpo. Anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina.
- Decantar el TBST. Adicionar la solución del anticuerpo secundario e incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- Lavar la membrana tres veces con TBST con agitación suave durante 5.10 min cada uno.
- Continuar con el protocolo, de acuerdo al conjugado utilizado.

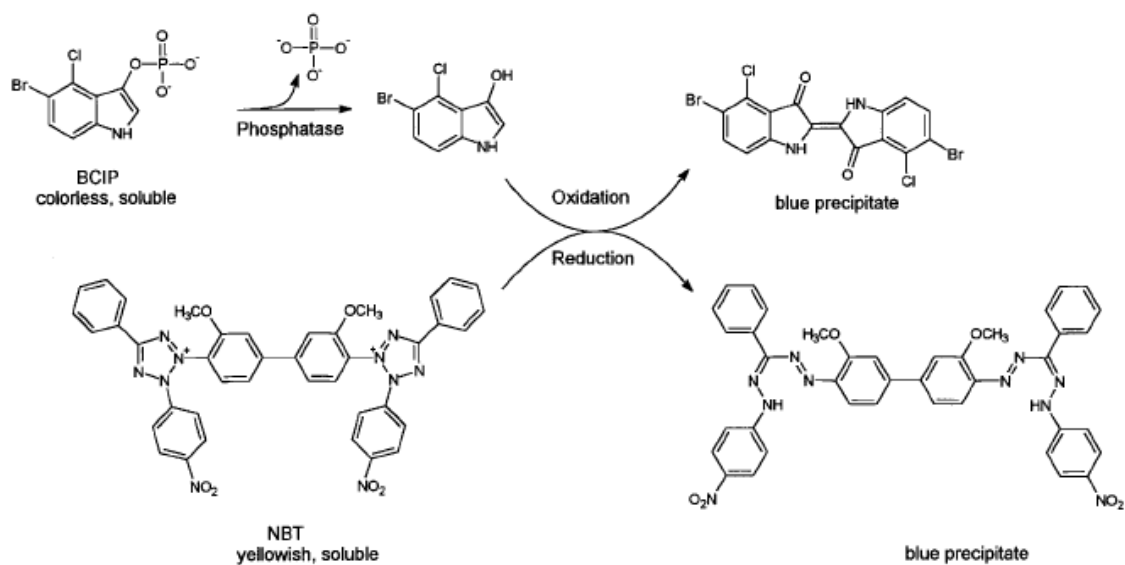
Visualización mediante reacción colorimétrica

Si se utiliza un conjugado acoplado a fosfatasa alcalina, se puede utilizar como sustrato la mezcla comercial con las moléculas NBT/BCIP.

El BCIP es un sustrato para la fosfatasa alcalina que al reaccionar posterior a la desfosforilación produce una coloración azul oscuro-azul índigo como producto de la oxidación. La molécula de NBT sirve como oxidante y también produce un color azul oscuro. De tal manera, que intensifica el color y hace a la reacción más sensible.



El mecanismo de reacción, es el siguiente:



Incubar la membrana con el sustrato y cuando la reacción se haya realizado (verificar por inspección visual) detener la reacción lavando la membrana con agua.

OBJETIVOS

Objetivo General

- **Clonar y caracterizar el promotor de un gen homólogo a *glcP* en *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius***

- **Objetivos particulares**
 - ✓ Identificar en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* el homólogo al gen *glcP* (*sco5578*) de *S. coelicor* y amplificar su región promotora

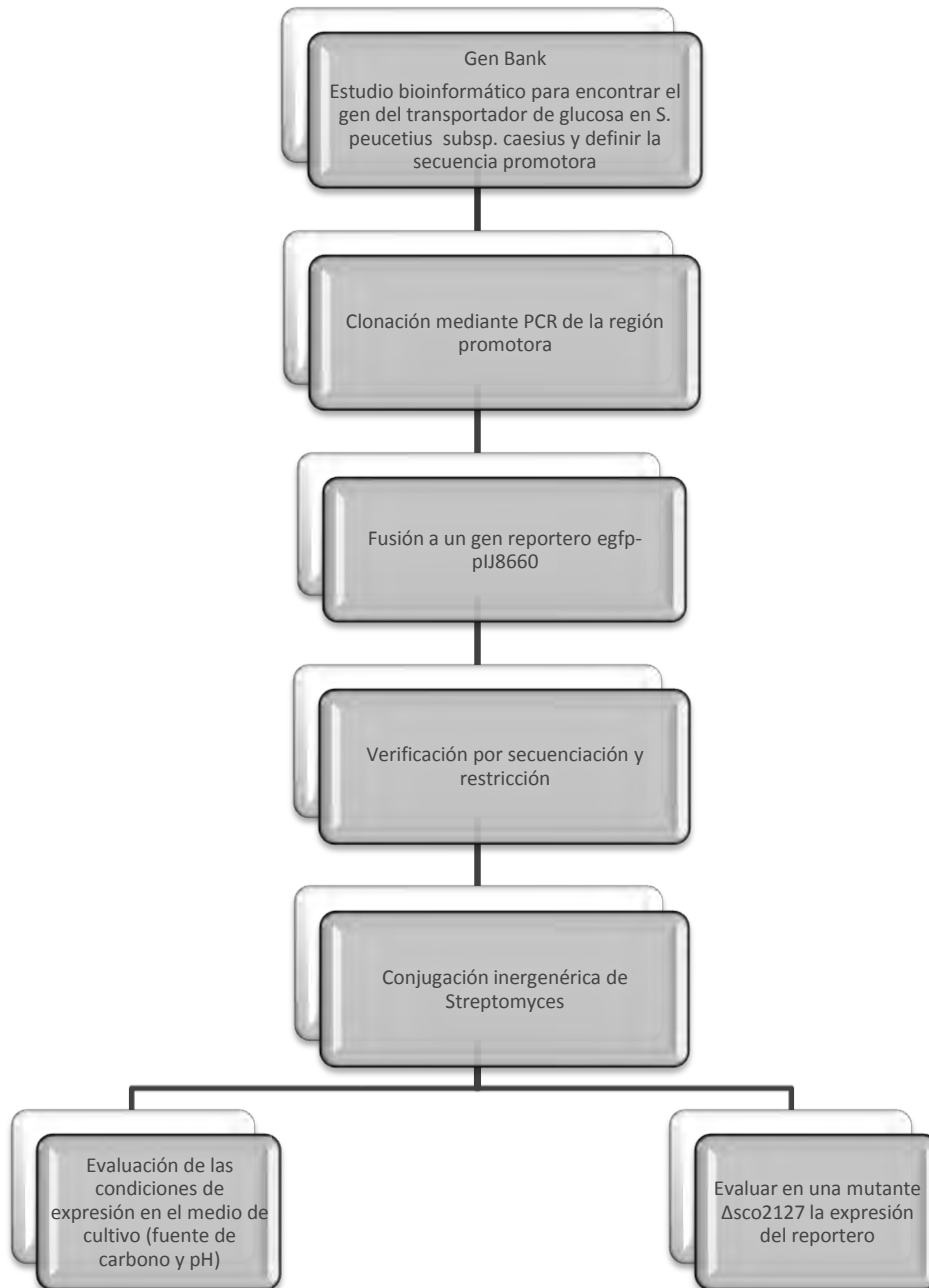
 - ✓ Clonar la región del promotor del gen homólogo a *glcP* de *S. peucetius* subsp. *caesius* y generar una fusión a un gen reportero *gfp* donde la región promotora regule la expresión de la proteína reportera.

 - ✓ Analizar la respuesta del promotor a diferentes fuentes de carbono y pH en el medio de cultivo

 - ✓ Determinar la respuesta del promotor en una mutante *scoΔ2127* de *S. coelicor*.

METODOLOGÍA

Estrategia General



A continuación, se describen brevemente las metodologías empleadas. Para mayor detalle, consultar el apéndice.

1. Búsqueda *in silico* del gen homólogo a *glcP* de *S. coelicolor* en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius*.

Partiendo de las secuencias del genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* (Sohng, comunicación personal) se hizo una búsqueda bioinformática en la base de datos de secuencias genómicas de actinomicetos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando la herramienta blastn. Posteriormente, se seleccionaron las secuencias con mayor porcentaje de identidad y se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W.

La secuencia de nucleótidos se tradujo a secuencia de aminoácidos, se realizó un blastp y un alinamiento múltiple.

Además, se procedió a realizar un ensayo de hidrofobicidad y de localización celular con la secuencia teórica de proteínas, utilizando los programas HMMTOP (www.enzim.hu/hmmtop/index), TopPred (www.sbc.su.se) y ProtComp Version 8 (www.softberry.com).

Para la clonación del promotor putativo del gen *glcP* se analizó la región río arriba del sitio del inicio de la traducción en busca de las secuencias consenso σ^{70} de promotores de estreptomicetos (www.softberry.com).

2. Corroboración de las regiones promotoras.

Una vez identificado el gen putativo del transportador de glucosa en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* como el ORF *sp7066*, se procedió a diseñar cebadores con el fin de amplificar la región promotora. Por otro lado se obtuvo el gen del transportador del grupo del Dr. Sohng (University Sun Korea).

Por tanto, la clonación de la región promotora putativa se realizó utilizando dos acercamientos diferentes. El primero, mediante la amplificación de la presunta región promotora contenida en el plásmido donado y la segunda, mediante la amplificación de DNA genómico.

Para ambos templados se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieran la amplificación de las secuencias promotoras mediante PCR y su ligación posterior al vector reportero.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la putativa región promotora del gen para permeasa de glucosa. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Promotor	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Fragmento esperado pb
Promotor <i>sp7066</i> a partir de plásmido	FW GTGGATCCCGTCGTGAAGCTGTGCA RV AGCATATGTTTCGTAGCGGTCCCGGAT	265
Promotor <i>sp7066</i> a partir de DNA genómico	FW TGATCGTGATATCGCACCAGAAGCGGACCA RV CGCAGCCGCCACCGGCACTAGAGCCCGCT	374

Los cebadores fueron diseñados con sitios de corte para enzimas de restricción que posteriormente permitieran clonar y direccionar la región promotora en el plásmido reportero pIJ8660. En el primer caso, se emplearon los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*; para el otro fragmento se seleccionaron los sitios *XbaI* y *EcoRV*.

Los productos de PCR se ligaron al vector pGEM-T Easy, se verificaron por restricción y por secuenciación.

Las secuencias resultantes, fueron nuevamente examinadas *in silico* buscando secuencias consenso de promotores bacterianos con el programa Softberry. Además, de manera manual se buscó un sitio probable del inicio de la transcripción.

3. Conservación de las cepas y medios de cultivo.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo fueron la DH5 α para la clonación de las regiones promotoras en el plásmido pGEM-T Easy y en el plásmido pIJ8660. Para los ensayos de conjugación intergenérica se emplearon cepas de *E. coli* ET 12567.

En general, las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a 37°C por 12 h con agitación. En el caso de *Streptomyces* se emplearon medios YMG, TSB, MS agar y medios químicamente definidos. En la tabla siguiente se muestran las características de las cepas empleadas en este trabajo

Todos los microorganismos se conservaron en glicerol 4% a -70°C.

Tabla 2. Cepas microbianas empleadas en este trabajo.

Cepas microbianas	Características genéticas/ inserto	Fuente
<i>E. coli</i> DH5-α	<i>supE44, ΔlacU169(ϕ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Sambrook, <i>et al.</i> , (2001) Invitrogene
<i>E. coli</i> ET12567	<i>F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44</i>	Choi <i>et al.</i> (2004) Donada por el Dr. Luis Servin
<i>E. coli</i> DH5α-pG7066	Cepa de <i>E. coli</i> conteniendo el plásmido pGEM-T7066	Donado por el Dr. Sohng
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145	SCP-1, SCP-2	Donada por el Dr. Luis Servin
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145 ΔSCO2127	<i>S. coelicolor</i> con un casete de resistencia a apramicina interrumpiendo el gen <i>sco2127</i>	Forero y col. Sin publicar
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145-p7066	Cepa conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145 ΔSCO2127-p7066	Mutante Δ SCO2127 conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	Cepa obtenida por tratamiento mutagénico de <i>S. peucetius</i> con N-nitroso-N-metil uretano	Arcamone, <i>et al.</i> , 1969
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>-p8660	Cepa conteniendo el plásmido pIJ8660	Este trabajo
<i>S. peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>-p7066	Cepa conteniendo el plásmido pIJ7066	Este trabajo

En la tabla 5 se muestran las características de los plásmidos utilizados en la realización de este trabajo.

Tabla 3. Características de los plásmidos empleados en la realización de este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente
pGEM –T Easy	Plásmido para clonación de productos de PCR MCS, promotor SP6, <i>lacZ</i> , operador Lac, Amp ^R , oriF1.	Promega
pGEM-T7066	Plásmido pGEM-T donde se encuentra clonado el gen <i>sp7066</i>	Donado por el Dr. Sohng
pIJ8660	Plásmido reportero conteniendo el gen de la <i>egfp</i> . pUC18, <i>aac(3)</i> , MCS, oriT, Φ C31.	Sun <i>et al.</i> , 1999. Donado por el Dr. Justin Nodwell
pIJ7066	Plásmido derivado de pIJ8660 con el promotor del gen <i>sp7066</i>	Este trabajo

4. Extracción de DNA.

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de *S. peucetius* subsp. *caesius* se realizó con solventes orgánicos mediante la técnica fenol-cloroformo (Hopwood, 2006) a partir de cultivos bacterianos .

Extracción de DNA plásmidico

Para todos los procedimientos de extracción de plásmidos de *E. coli* se utilizó la técnica de lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 2001), dependiendo del volumen de cultivo de partida se realizó mini extracción (miniprep) o extracción a gran escala (maxiprep).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las diferentes PCRs se realizaron empleando como cebadores a los oligonucleótidos diseñados. En el caso de la amplificación a partir del plásmido pGEM-T/*sp7066* se utilizaron 100 ng de plásmido utilizando el kit AmpliTaq (Applied Biosystems). Para la amplificación a partir de DNA genómico, se utilizó 1 µg del material genómico y el mismo kit de PCR. El perfil de PCR para cada par de oligonucleótidos fue estandarizado para definir las condiciones de amplificación.

6. Clonación y secuenciación de las regiones promotoras.

Una vez amplificados mediante PCR los fragmentos de interés se ligaron al vector para productos de PCR pGEM-T Easy (Promega). Utilizando el protocolo recomendado por el proveedor.

A la serie de plásmidos pGEM-T y pGEM-T Easy se les ha incorporado una 3' OH timidina a ambos extremos del plásmido (Fig. 11) facilitando la ligación de productos de PCR amplificados con polimerasas termoestables que al final de la amplificación en el 3'OH agregan una desoxiadenina, de forma independiente al molde.

Como se observa en la Fig. 11, dentro de la región de clonación múltiple se encuentra la región codificante para la enzima β -galactosidasa. Así, la inactivación insercional del α -péptido permite reconocer directamente a las clonas recombinantes mediante un screening por color, en placas con indicador.

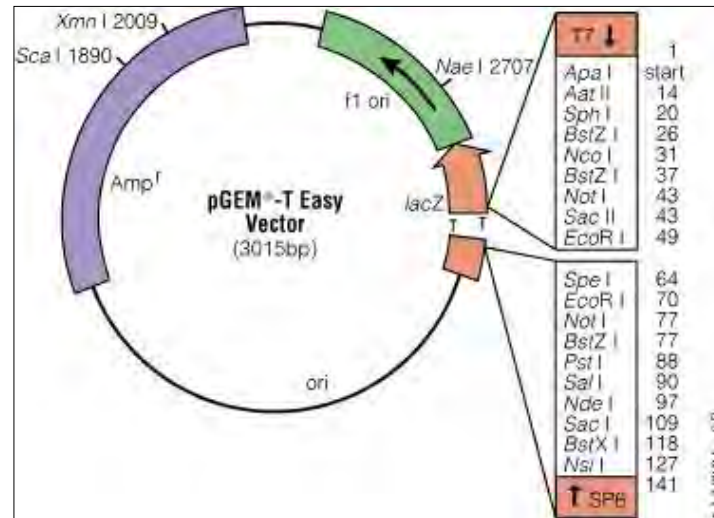


Figura 1. Mapa circular y puntos de referencia del plásmido pGEM-T Easy. Se resalta el sitio de clonación múltiple, el gen de resistencia a ampicilina y el gen para la β -galactosidasa.

Las reacciones de ligación se incubaron toda la noche a 4°C. Dichas ligaciones fueron introducidas por corriente eléctrica (electroporación) (ver apéndice) en células de *E. coli* DH5- α . Las células se sembraron en cajas petri con medio LB conteniendo 0.5 mM IPTG, 80 μ g/mL y 100 μ g/mL ampicilina. Las placas se incubaron 12 h a 37°C.

De las colonias obtenidas, se seleccionaron al azar colonias blancas para resembrarlas en medio LB líquido con 100 μ g/mL ampicilina. Después de 12 h de crecimiento se extrajo el plásmido y con la enzima *EcoRI* se digirió para determinar la presencia del fragmento de interés. Tanto el plásmido sin digerir como el digerido fueron observados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

7. Construcción de la fusión del la región promotora *sp7066* al gen reportero de *egfp* en pIJ8660.

La región promotora, clonada en el plásmido pGEM-T Easy, fue subclonada en el vector para estreptomicetos pIJ8660 (Sun, *et al.*, 1999), el cual contiene el gen *egfp*, que permite la detección de transformantes mediante fluorescencia o determinación de la proteína verde fluorescente por técnicas inmunológicas.

En diversos organismos se ha empleado exitosamente a la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero. La GFP es una proteína de 27 kDa extraída de la medusa *Aequorea victoria* con un fluoróforo constituido por los aminoácidos Ser65-Tyr66-Gly67. En su detección no requiere de la aplicación de ningún sustrato o cofactor y puede ser detectada por un microscopio de fluorescencia. La GFP silvestre absorbe luz azul y UV, con un pico de absorbancia mayor a los 395 nm y un pico menor a los 470 nm; así mismo, emite luz verde a 509 nm (Sun, *et al.*, 1999).

Sin embargo, los primeros intentos para expresar a la proteína verde fluorescente en *S. coelicolor* no fueron exitosos incluso cuando el gen se insertaba en un plásmido multicopia (aprox. 150 copias de plásmido/cromosoma). Posiblemente esto se debía a la naturaleza del gen GFP, que es relativamente, rico en AT (38 mol % G+C comparado con la estimada 74 mol% G+C de *S. coelicolor*) y el consecuente uso de diferencial codones entre el gen GFP y el hospedero. En el plásmido pIJ8660 se ha insertado la versión modificada del gen de la proteína verde fluorescente, denominado EGFP (enhanced GFP). EGFP contiene dos sustituciones de aminoácidos, Ser65 por Thr y Phe64 por Leu, con eso se incrementa la fluorescencia alrededor de 35 veces con respecto a la proteína silvestre. Sin embargo, de mayor relevancia para su uso en *Streptomyces*, son los cambios de nucleótidos que generan mutaciones silenciosas en la región codificante (más de 190 cambios de nucleótidos) basadas en el uso preferencial de codones del humano. Dado que el nuevo uso de codones corresponde más cercanamente con el de los genes de los estreptomicetos (sólo siete de 239 codones presentes en el gen EGFP terminan en A ó T comparados con los 163 de 238 del gen silvestre, y todos los codones TTA han sido removidos).

Así, el plásmido pIJ8660 con el gen *egfp* es útil como gen reportero para el análisis de la expresión génica de *Streptomyces*, dado que anteriormente contaba con otras características deseables de un vector reportero (Fig. 12). Dentro de dichas características se pueden mencionar las siguientes:

- pUC18 origen de replicación para la propagación en *E. coli*

- gen de resistencia a apramicina (*aac* (3)IV) para la selección en *E. coli* y *Streptomyces* sp.
- *oriT*(RK2) para la conjugación entre *E. coli* y los estreptomicetos
- Φ C31 región att-int para su integración estable en el cromosoma, aparentemente en un solo número de copias.
- Casete de EGFP flanqueado por terminadores transcripcionales
- Sitio de clonación múltiple con los sitios *XhoI*, *BglII*, *EcoRV*, *BamHI*, *XbaI*, *NsiI*, *KpnI*, *BglII*
- Codones de paro en los tres marcos de lectura entre el MCS y el codón de inicio de EGFP para evitar la formación de fusiones traduccionales no deseadas.

El plásmido pIJ8660 se extrajo de células de *E. coli* DH5- α y por restricción se verificó la identidad del mismo. A la par, el plásmido pGEM-T Easy con el fragmento de interés también se extrajo y ambos plásmidos fueron digeridos con las enzimas *EcoRV* y *XbaI* (Fermentas). El plásmido digerido y el fragmento del promotor *sp7066* se recuperaron de un gel de agarosa utilizando columnas de fibra de vidrio.

Las condiciones de ligación entre el plásmido pIJ8660 y el promotor putativo fueron estandarizadas. Células DH5- α fueron electrotransformadas con la fusión anterior y se sembraron en cajas con medio LB suplementado con apramicina 50 μ g/mL.

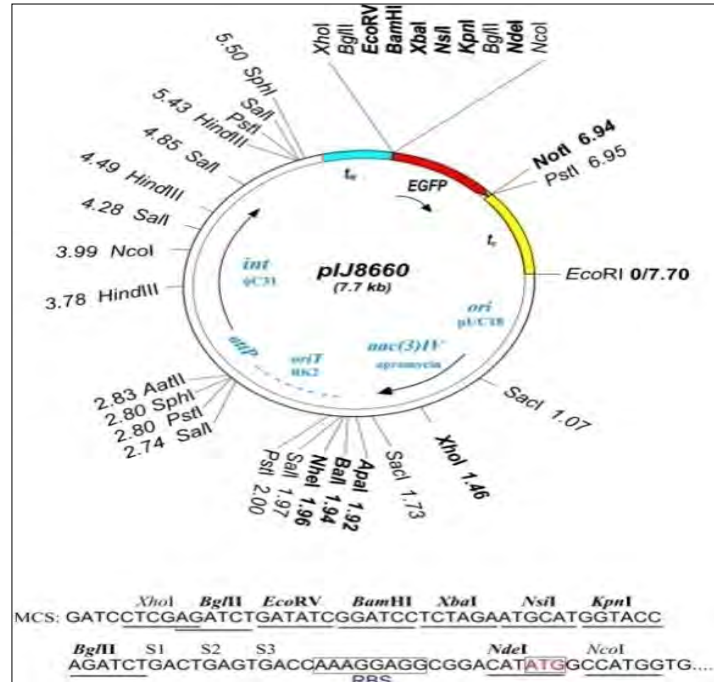


Figura 2. Mapa del plásmido pIJ8660. Se resalta el sitio múltiple de clonación (Sun, et al., 1999)

De las colonias obtenidas en caja, se seleccionaron 5 clonas al azar, se sembraron en medio LB líquido (50 µg/mL apramicina) y después de 12 h de crecimiento se extrajo el plásmido y se verificó por restricción la presencia del fragmento correspondiente al promotor.

8. Transformación de células de *E. coli* y conjugación intergenérica.

Una vez corroborada la fusión, denominada ahora pIJ7066, el plásmido se extrajo y se transformó con él a la cepa *E. coli* ET12567 (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsd*⁻) deficiente en sistemas de metilación de conteniendo el plásmido pUZ8002.

Se ha comprobado que varias cepas del género *Streptomyces* tienen sistemas que restringen DNA metilado en adeninas y citosinas y, por tanto al introducir un DNA metilado en estos organismos, los sistemas de restricción se activan provocando la degradación del material genético. Con la finalidad de poder introducir ácidos nucleicos a las bacterias con estos sistemas se emplea a la cepa de *E. coli* ET12567 debido a que al carecer de los tres sistemas de metilación (Dam, Dcm y Hsd) es posible amplificar o replicar material genético en ella sin que este sea metilado, facilitando así la introducción de DNA foráneo en cepas con tales sistemas de restricción.

Además, la cepa *E. coli* ET12567 posee el plásmido pUZ8002 plásmido conjugativo derivado del plásmido RP4. Los plásmidos pueden ser transferidos de *E. coli* a *Streptomyces* de manera dependiente al origen de transferencia (*oriT*) del plásmido IncP RK2 y a la función del gen *tra* del plásmido RP4 (Blaesing, 2005; Chen, 2006).

Las células de *E. coli* ET12567/pIJ7066 y de *E. coli* ET12567/pIJ8660 (plásmido original) se conjugaron con las diferentes cepas de *Streptomyces*. En el cuadro se resumen las conjugaciones realizadas.

Tabla 4. Cepas de *Streptomyces* y el plásmido que se les transfirió mediante conjugación. pIJ8660 plásmido original. pIJ7066 plásmido pIJ8660+promotor *sp7066*.

Microorganismos	Plásmido	Tipo
<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	pIJ8660	Control negativo
<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i>	pIJ7066	A evaluar
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	pIJ8660	Control negativo
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	pIJ7066	A evaluar
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 Δ 2127	pIJ7066	A evaluar

De todas las exconjugantes obtenidas, se seleccionaron al azar en promedio 10 colonias por cada placa de conjugación y se sembraron en agar nutritivo con apramicina 50 μ g/mL. Nuevamente al azar se seleccionaron clonas para cultivarlas en medio líquido, YMG y TSB para *S. peucetius* subsp. *caesius* y *S. coelicolor* respectivamente, apramicina 5 μ g/mL. De las colonias que mostraron mejor crecimiento en medio líquido se seleccionaron 3 para verificar la expresión de la proteína verde fluorescente.

9. Regulación transcripcional del promotor de *sp7066*.

Expresión de la proteína verde fluorescente

Con el objetivo de demostrar que el fragmento del promotor *sp7066* amplificado y clonado es inducido por glucosa, las exconjugantes de *S. peucetius* subsp. *caesius* 7066 y 8660 se cultivaron en medio químicamente definido NDM suplementado con 100 mM de glucosa como fuente de carbono. Las células se cosecharon a intervalos definidos, se centrifugaron y lavaron en una solución 0.75% NaCl. Para extraer la proteína total, las células se

sonicaron en frío 5 veces durante 30 s con descansos de 60 s a una amplitud de 60A, utilizando amortiguador PED. Las muestras sonicadas se centrifugaron en frío a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Además, se evaluó el crecimiento, el consumo de carbohidrato y el cambio de pH en el medio. Las mismas determinaciones se realizaron utilizando arabinosa 100 mM como fuente de carbono, siendo ésta una de las fuentes de referencia cuando se trabaja con *S. peucetius* subsp. *caesius*.

Una vez que se corroboró la expresión de la EGFP en las células del estreptomiceto pIJ7066 y no en las conjugantes control (pIJ8660) se realizaron ensayos de expresión de la proteína. Las bacterias se cultivaron en medios químicamente definidos NDM para *S. peucetius* suplementados con 100 mM de arabinosa. Una vez que las bacterias estaban al final de la fase exponencial de crecimiento ≈ 36 h, se le agregó al medio, cada 15 min, la fuente de carbono a evaluar. Se cosecharon las células y se siguió el protocolo anteriormente descrito.

En el caso de la influencia de pH las células se cultivaron hasta las 36 horas, se cosecharon y se transfirieron a matraces con medio mínimo utilizando una fuente de carbono no inductora (Ara 100 mM) cada uno con un pH diferente. Como control positivo se empleó en los mismos valores de pH el medio mínimo suplementado con glucosa.

Para evaluar el efecto del gen *sco2127*, las exconjugantes Δ SCO2127/7066, M145/7066 y M145/8660 se sembraron en medio mínimo NMMP con 100 mM de glucosa. Las muestras se cosecharon a intervalos definidos y se realizó el mismo tratamiento anteriormente descrito.

10. Determinación de proteína total.

Para todos los sobrenadantes obtenidos, se determinó proteína total por el método de Bradford, según lo recomendado por el proveedor (BIORAD). Las curvas para llevar a cabo la interpolación de los resultados se consideraron como adecuadas con un valor de R^2 0.99, utilizando como estándar albumina sérica bovina (BSA).

11. Determinación de crecimiento.

Para las determinaciones de crecimiento se tomaron muestras de 1 mL del cultivo microbiano a intervalos determinados. Dichas muestras fueron lavadas con solución isotónica y macerada en un homogenizador manual para determinar espectrofotométricamente la D.O a 550 nm. Se realizaron las diluciones pertinentes en los casos necesarios.

Para corroborar la correspondencia de los resultados obtenidos por D.O. también se determinó el crecimiento por peso seco, técnica usual para la determinación del crecimiento de bacterias miceliares (consultar apéndice).

12. Determinación de carbohidrato residual.

Determinación de glucosa

Cada muestra de cultivo se centrifugó para obtener el sobrenadante. El sobrenadante se trato según las recomendaciones del proveedor para la determinación de glucosa por el método enzimático de glucosa oxidasa (Spinreact).

Determinación de arabinosa

La determinación de arabinosa en el sobrenadante de las muestras se realizó utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico para la determinación de carbohidratos. A 0.5 mL de muestra se les agregó 0.5 mL de fenol 5% w/v y 2.5 mL de ácido sulfúrico. Los tubos se llevaron a baño maría hirviendo durante 15 min. Se enfriaron en agua-hielo y se determinó la absorbancia a 40 nm.

1. Preparación de geles SDS-PAGE y Western-blot.

Se realizaron geles de acrilamida-SDS al 10% (ver apéndice), para cada muestra se utilizaron 100 µg de proteína total. Los geles se transfirieron a membranas de celulosa utilizando una cámara húmeda.

Las membranas se dejaron secar toda la noche y se continuó con el proceso de revelado utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Invitrogen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Búsqueda *in silico* del gen homólogo a *glcP* de *S. coelicolor* en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius*.

Con los análisis bioinformáticos realizados (blastn y alineamientos) dentro de la base de datos del NCBI, se determinó que en el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius*, la región correspondiente al ORF denominado *sp7066* sea la que probablemente codifique para el transportador de glucosa, .

Con una cobertura del 99% para *S. coelicolor* la región *sp7066* tiene una identidad máxima del 85% con el gen *glcP*, que corresponde a la región codificante para el principal transportador de glucosa en esa bacteria. Con respecto a *S. griseus* con la misma cobertura la identidad máxima corresponde a un 87% para un transportador putativo de glucosa. En el caso de *S. lividans*, con una cobertura menor, también se obtuvo un 85% de identidad con el transportador de glucosa de esta bacteria.

Tabla 1. Alineamiento múltiple del gen *sp7066*.

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350 DNA, complete genome	1602	1602	99%	0.0	87%
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome <i>glcP</i> gene	1461	1461	99%	0.0	85%
<i>Streptomyces lividans</i> glucose transport protein <i>glcP</i> gene	1456	1456	99%	0.0	85%
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 DNA, complete genome	1426	1426	96%	0.0	85%

Sin embargo, para hacer una comparación a un nivel funcional, la secuencia nucleotídica se tradujo *in silico* a secuencia de aminoácidos para realizar otro acercamiento, utilizando la herramienta blastp y además, estudios bioinformáticos de localización subcelular y análisis de hidrofobicidad.

Con respecto al blastp y los alineamientos con secuencias de aminoácidos, evidentemente los porcentajes de identidad fueron mayores y se obtuvieron comparaciones con

secuencias de bacterias fuera del género *Streptomyces* correspondientes con transportadores de carbohidratos y glucosa, putativos o bien caracterizados (Fig. 13). Este resultado proporciona un indicio más de que la secuencia determinada como un posible transportador de glucosa era una buena aproximación dado que los miembros de la familia MFS, se encuentran ampliamente difundidos en todos los reinos.

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value	
ref ZP_05803386.1 	sugar transporter [Streptomyces flavogrise...		842	0.0	
ref ZP_04696542.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		838	0.0	
ref YP_001823412.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		833	0.0	G
ref ZP_05514513.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		806	0.0	
ref NP_629713.1 	sugar transporter [Streptomyces coelicolor A...		793	0.0	G
ref ZP_04705082.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		790	0.0	
ref ZP_05534484.1 	sugar transporter [Streptomyces viridochro...		784	0.0	
ref ZP_05018692.1 	sugar transporter [Streptomyces sviveus AT...		783	0.0	
ref ZP_05538487.1 	sugar transporter [Streptomyces griseoflav...		783	0.0	
emb CBG69736.1 	glucose transport protein GlcP [Streptomyces ...		782	0.0	
ref ZP_04685650.1 	sugar transporter [Streptomyces ghanaensis...		779	0.0	
ref NP_823833.1 	L-arabinose permease [Streptomyces avermitil...		775	0.0	G
ref ZP_05521977.1 	sugar transporter [Streptomyces lividans T...		755	0.0	
emb CAY39209.1 	glucose permease [Streptomyces clavuligerus A...		753	0.0	
ref ZP_05509313.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		747	0.0	
ref ZP_04998650.1 	sugar transporter [Streptomyces sp. Mgl] >...		747	0.0	
ref ZP_04683750.1 	sugar transporter [Streptomyces ghanaensis...		738	0.0	
ref ZP_04683604.1 	putative glucose transporter [Streptomyces...		626	2e-177	
ref ZP_04477955.1 	MFS transporter, sugar porter family [Stre...		590	1e-166	
ref ZP_04333462.1 	MFS transporter, sugar porter family [Noca...		536	1e-150	
ref YP_001109306.1 	major facilitator superfamily sugar trans...		531	8e-149	G
ref YP_289726.1 	sugar transporter [Thermobifida fusca YX] >g...		529	3e-148	G
ref YP_003111108.1 	sugar transporter [Catenulispora acidiphi...		501	1e-139	G
ref YP_002766284.1 	sugar transporter [Rhodococcus erythropol...		498	7e-139	G
ref ZP_04385121.1 	arabinose-proton symporter [Rhodococcus er...		498	8e-139	
ref YP_003155168.1 	MFS transporter, sugar porter family [Bra...		457	2e-126	G
ref YP_003147922.1 	MFS transporter, sugar porter family [Kyt...		444	1e-122	G
ref ZP_04367340.1 	MFS transporter, sugar porter family [Cell...		437	9e-121	
ref ZP_04031916.1 	MFS transporter, sugar porter family [Ther...		437	1e-120	
ref YP_001222123.1 	putative sugar MFS permease [Clavibacter ...		431	8e-119	G
ref YP_062390.1 	sugar transporter [Leifsonia xyli subsp. xyl...		430	1e-118	G
emb CAA34119.1 	unnamed protein product [Synechocystis sp. PC...		426	3e-117	
ref NP_442047.1 	glucose transport protein [Synechocystis sp....		425	4e-117	G

Figura 1. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de *sp7066 (blastp)*. Los alineamientos resaltados coinciden con secuencias de transportadores de glucosa putativos y de otros ya caracterizados dentro y fuera del género *Streptomyces*.

Con respecto al estudio de localización subcelular se predijo como localización de la secuencia examinada, la membrana (Fig. 14).

```

ProtComp Version 8. Identifying sub-cellular location Bacterial
Seq name: test sequence, Length=473
Significant similarity in Location DB - Location:Membrane
Database sequence: AC=P15729 Location: Membrane DE GLUCOSE TRANSPORT
PROTEIN.
Score=10820, Sequence length=468, Alignment length=437
Predicted by Neural Nets - Outer Membrane with score 3.0
***** Transmembrane segments are found: .+61:87o..o155:181o..o346:370.
Integral Prediction of protein location: Outer Membrane with score 10.0
Location weights:          LocDB / PotLocDB / NNets / Pentamers /
Integral
Cytoplasmic                0.00 / 0.00 / 0.00 / 2.33 /
0.00
Membrane                   10.00 / 3.00 / 2.97 / 2.67 /
9.99
Secreted                   0.00 / 0.00 / 0.03 / 0.00 /
0.01
Periplasmic                0.00 / 0.00 / 0.00 / 0.00 /
0.00
    
```

Figura 2. Análisis *in silico* de localización subcelular de la secuencia de aminoácidos del gen *sp706* (ProtComp Version 8).

Con respecto al análisis de hidrofobicidad, como se observa en la Fig. 15 la secuencia de aminoácidos de SP7066 se predice la formación de 12 dominios transmembranales característicos de los sistemas de transporte de la familia MFS.

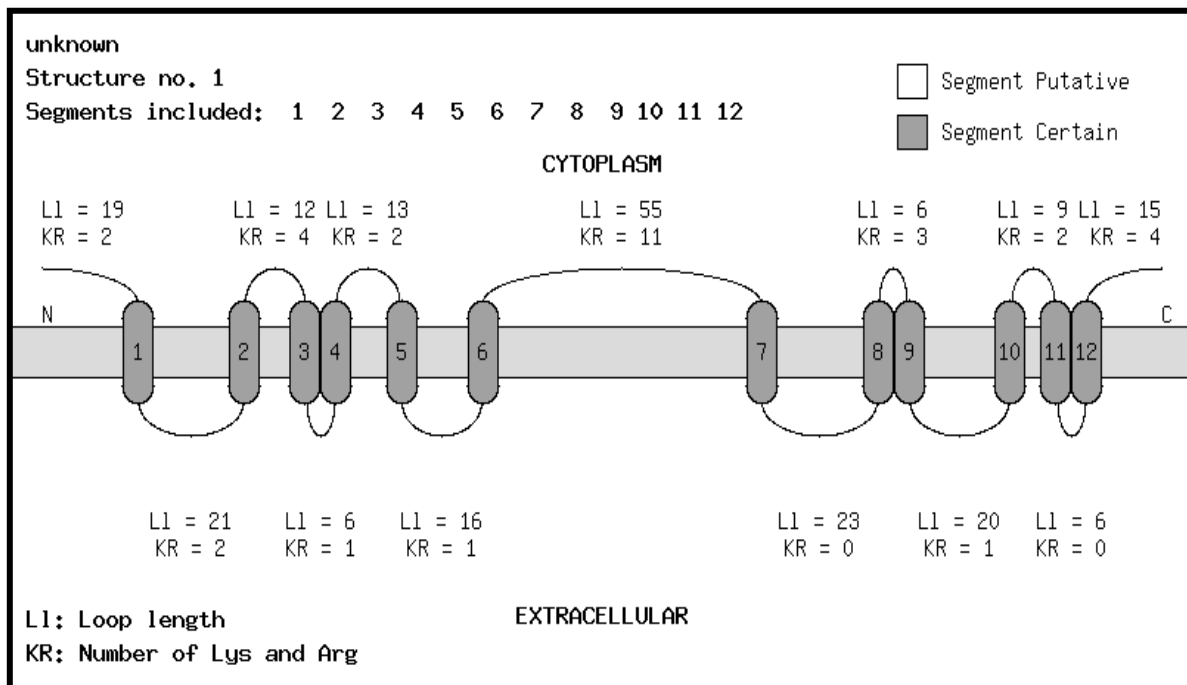


Figura 3. Análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos del gen *sp7066*. Se muestran los 12 segmentos transmembranales característicos de los transportadores de la familia MFS (HMMTOP).

Con toda la evidencia bioinformática acumulada, una vez identificada a la región *sp7066* como el homólogo al transportador de glucosa de *S. coelicolor* y un posible transportador de carbohidratos, se decidió a proceder con la búsqueda, amplificación y clonación de una región promotora putativa de dicho gen.

2. Amplificación y análisis de la región promotora.

Amplificación del promotor putativo

A partir del plásmido pGEM – sp7066

Como se ha mencionado, el grupo del Dr. Sohng (University Sun, Korea) encargado de secuenciar el genoma de *S. peucetius* subsp. *caesius* nos proporcionó el plásmido pGEM-T donde se encuentra clonado el gen *sp7066* (Fig. 16).

El plásmido se electroporó en células competentes DH5 α . De las colonias en placa se seleccionó una y se hizo crecer en medio LB líquido. Se extrajo el plásmido y a partir de éste se procedió con la amplificación de la región promotora.

Los cebadores para amplificar la región promotora a partir del plásmido se diseñaron de la siguiente forma. Para el oligo forward se tomó en cuenta la secuencia del oligonucleótido forward con el que se clonó el gen (Dr.Sohng) y su presunta región promotora en el plásmido pGEM-T, con la única variación de que el oligonucleótido original contenía la secuencia para la enzima de restricción KpnI y ese sitio fue modificado para introducir un sitio BamHI (Tabla 8).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en la amplificación de la región promotora putativa de *sp7066* utilizando el plásmido pGEM/*sp7066* como molde. Se resalta los sitios de restricción *BamHI* y *NdeI* para los oligos FW y RV, respectivamente.

Inserto	Secuencia del oligonucleótido 5' 3'	Fragmento esperado pb
Promotor <i>sp7066</i> a partir de plásmido	FW GTGGATCCCGTCGTGAAGCTGTGCA RV AGCATATGTTTCGTAGCGGTCCCGGAT	265

En el caso del cebador reverse se tomó en cuenta la secuencia codificante del gen *sp7066*. (Fig. 16).

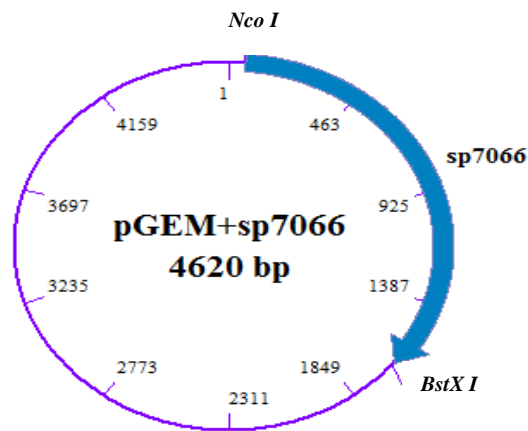


Figura 4. Gen *sp7066* clonado en el plásmido pGEM.

Con los oligonucleótidos anteriores, se realizó un PCR de gradiente para optimizar la temperatura de alineamiento para la amplificación del fragmento de 260 pb. Como puede observarse en el gel (Fig. 17) la temperatura óptima para la amplificación del fragmento de interés corresponde a 61°C. Una vez establecida la temperatura óptima para amplificación se procedió a realizar otro ciclo de PCR para obtener amplificado en concentración suficiente para proceder a ligarlo en el vector correspondiente. En total, la amplificación consistió en 25 ciclos, según las condiciones del esquema 18.

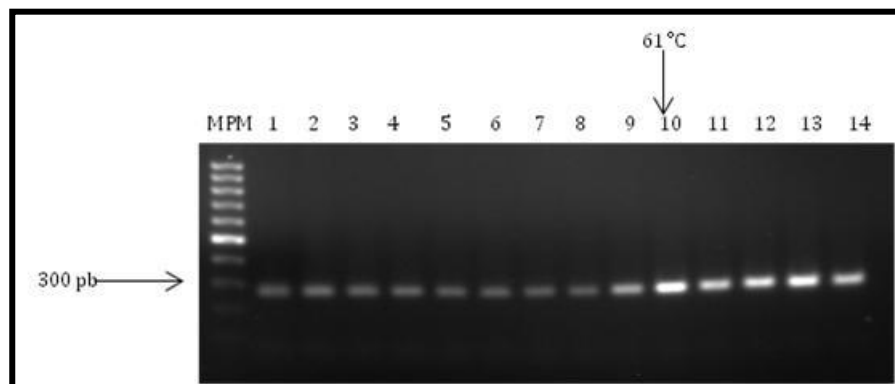


Figura 5. PCR de gradiente para la amplificación del promotor de *sp7066*. Tamaño esperado 260pb. Gel de agarosa 2%.

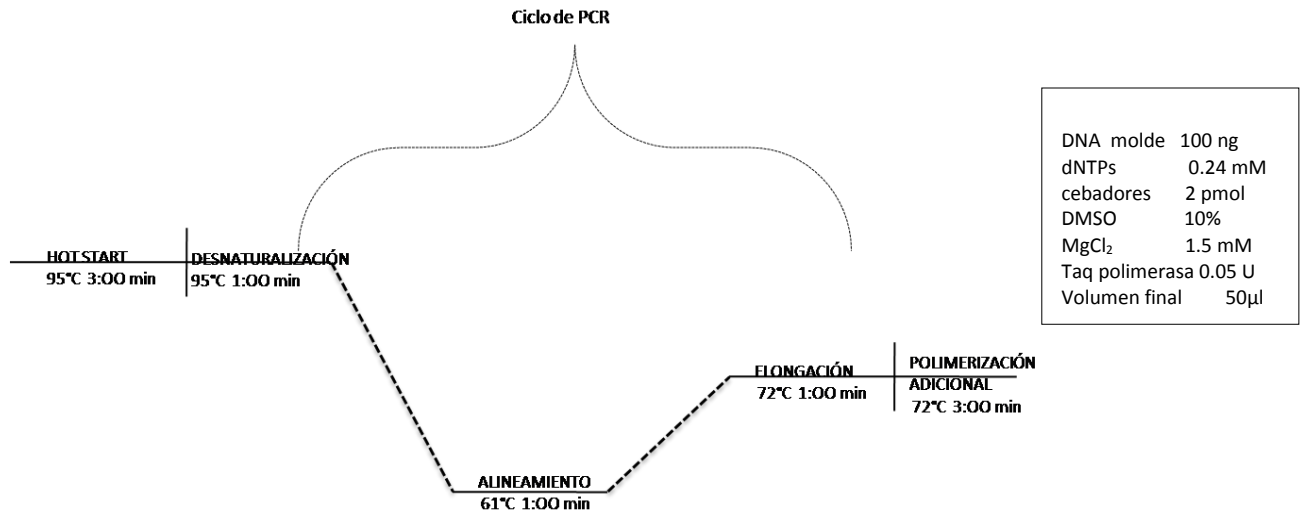


Figura 6. Ciclo de PCR y condiciones para la amplificación de la región promotora del gen *sp7066* a partir de plásmido.

A partir de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico se realizó según lo descrito en la metodología, corroborándose la concentración y pureza del DNA mediante espectrofotometría. También se verificó la integridad del DNA mediante un gel de agarosa al 0.75% y no se observaron bandas resultado de la degradación del DNA (resultados no mostrados).

El DNA genómico obtenido se utilizó como molde para la amplificación de la región putativa del promotor de *sp7066*. Dado que el genoma de *Streptomyces* es rico en GC, el protocolo para la amplificación del fragmento tuvo que ser estandarizado desde la temperatura hasta la concentración de ión magnesio y DMSO en el medio de reacción. En la figura 19 se muestra el gel de agarosa, se observa un gradiente de temperatura y además, dos concentraciones de ión magnesio.

El fragmento obtenido a partir de la amplificación utilizando como molde DNA genómico fue designado fragmento B 7066.

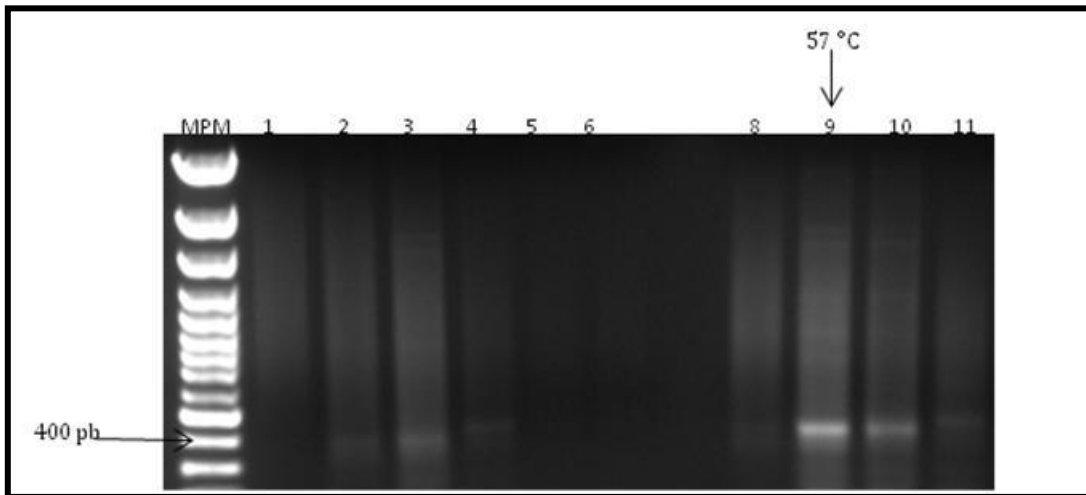


Figura 7. PCR de gradiente para la amplificación del promotor del gen SP7066 (a partir de DNA genómico). Del carril 1-6 con 2.5 mM [Mg²⁺] y carriles 8-11, 3 mM [Mg²⁺] Producto esperado 375 pb.

Como se observa en el gel, la amplificación a partir de DNA genómico es menos eficiente y específica comparada con la amplificación a partir de DNA plasmídico. A pesar de que se ajustaron los parámetros de amplificación (Fig. 20) generalmente se amplificaba el producto esperado junto con otros productos no específicos razón por la cual el producto deseado se escindió del gel de agarosa y se limpió empleando columnas de fibra de vidrio y fenol-cloroforno. Posteriormente se volvió a correr un gel de agarosa para verificar que únicamente se encontrara presente el fragmento de 375 pb.

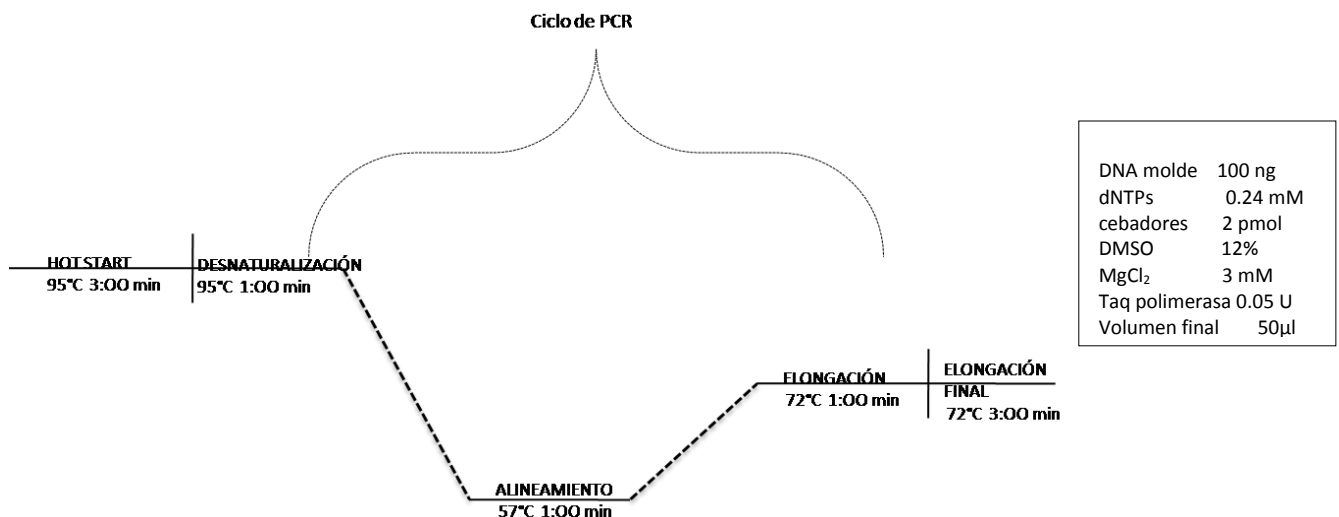


Figura 8. Ciclo de PCR y condiciones para la amplificación de la región promotora del gen *sp7066* a partir de DNA genómico

Los productos de PCR se limpiaron y espectrofotométricamente se determinó su concentración y se verificó, en un gel de agarosa, que no hubiera otros fragmentos contaminantes.

Los fragmentos A7066 y B7066 fueron ligados directamente al vector para productos de PCR pGEM-T Easy. La ligación se llevó a cabo según las recomendaciones del proveedor. Dicha construcción se electroporó en células competentes y se sembró en caja con agar LB

ampicilina. De las colonias blancas obtenidas, se seleccionaron al azar 10 para la extracción del plásmido. En la Fig. 21 se muestra la digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas.

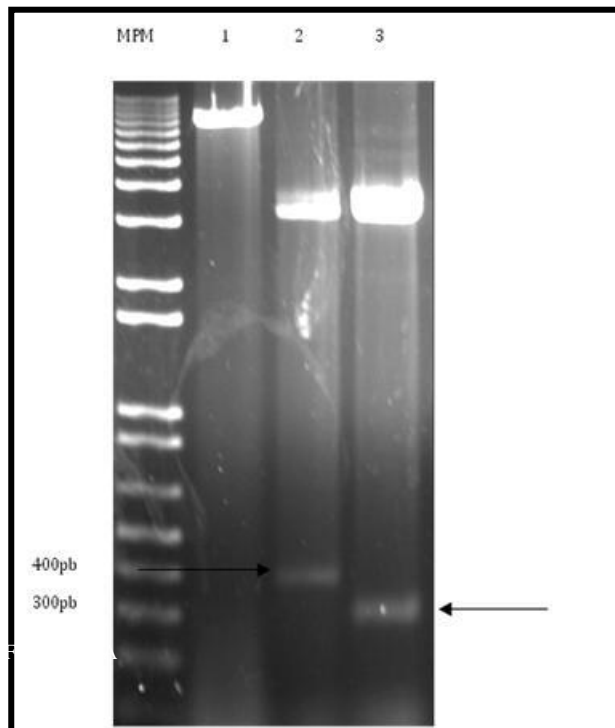


Figura 9. Gel de agarosa donde se muestra la digestión de los plásmidos pGEM-T Easy conteniendo los fragmentos de interés con la enzima *EcoRI*. En el carril 2 se observa la liberación del fragmento B7066 de 375 pb y en el carril 3 la liberación del fragmento A7066 de 260 pb.

Ambos plásmidos, plásmido pGEM-T Easy -A7066 y el plásmido pGEM-T Easy B7066 se secuenciaron. Con las secuencias obtenidas se hizo un análisis *in silico* para verificar la presencia de las secuencias consenso de los promotores bacterianos. Las secuencias se analizaron de forma manual y en el programa Softberry BPR0M (www.softberry.com) con ninguno de los métodos se encontraron secuencias consenso putativas de un promotor bacteriano en el caso del fragmento A (no mostrado). Para el fragmento B se encontraron las secuencias putativas de los promotores bacterianos de σ^{70} de bacterias Gram-negativas pero estos datos sirvieron como un primer acercamiento para delimitar la zona de búsqueda del promotor (Fig. 22).

```

> test sequence
Length of sequence-      374
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      226 LDF- 1.74
-10 box at pos.      211 AGGAATAGT Score      29
-35 box at pos.      194 TTGACT      Score      61

      Oligonucleotides from known TF binding sites:

No such sites for promoter at      226
    
```

Figura 10. Predicción de promotores utilizando el programa Softberry www.softberry.com. La secuencia analizada es la correspondiente al fragmento B7066. Se muestra que la secuencia tiene una región promotora putativa y la localización de las cajas consenso -35 y -10.

Partiendo de que en la secuencia del fragmento B sí había un presunto promotor, con base en la secuencia consenso de los promotores de *Streptomyces* se realizó otra búsqueda y se encontraron las secuencias consenso tipo -10 y -35 para los promotores σ^{70} de *Streptomyces* (Strohl, 1992). Para determinar el sitio de inicio de la transcripción probable, se partió del principio de que dichas regiones están generalmente conformadas por dos pirimidinas, en este caso dos adeninas adyacentes. Además, se realizó un alineamiento para comparar el sitio de inicio de la transcripción de otros genes de *S. coelicolor* determinados experimentalmente observado que el sitio señalado es el más probable, dando como resultado la región promotora descrita en la figura 23.

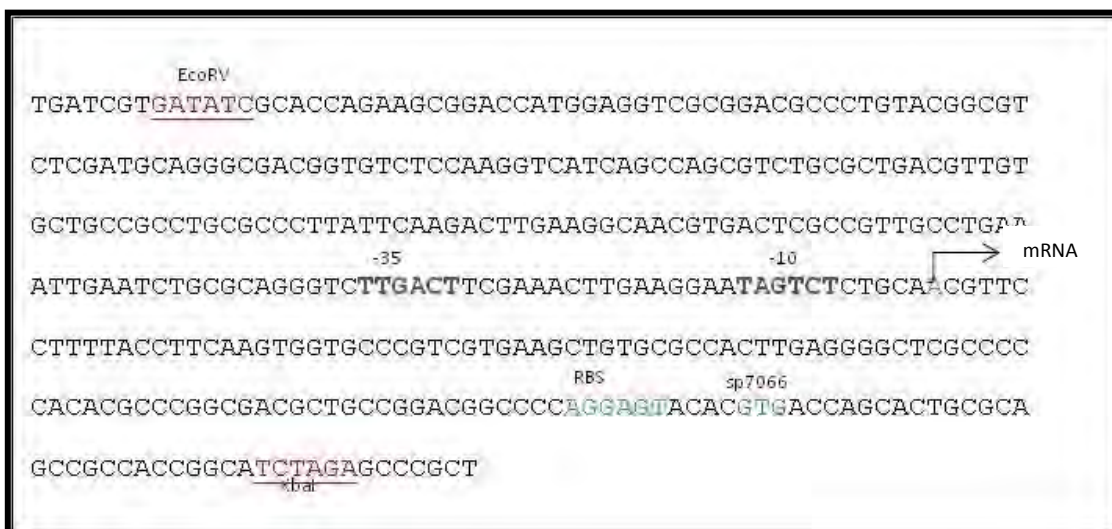


Figura 11. Análisis de la secuencia del promotor putativo del gen *sp7066*. En rojo y subrayado se muestran los sitios de restricción insertados mediante la amplificación por PCR. En azul se muestra el sitio de unión al ribosoma (RBS), en verde el codón de inicio del gen. Las regiones consenso -10 y -35 se encuentran señaladas. La flecha indica el sitio probable de inicio de la transcripción.

Con los resultados anteriores, se corroboró que la región denominada B7066 tenía buenas probabilidades de ser una región promotora, en cambio, la región denominada A7066 no contaba con las secuencias consenso de un promotor y por tanto fue descartada. A partir de este momento, el fragmento B7066 será denominado como el promotor o el promotor putativo.

3. Construcción de la fusión de la región promotora *sp7066* al gen reportero de *EGFP* en *pIJ8660*.

El promotor putativo se liberó del plásmido pGEM-T Easy con los sitios de corte *EcoRV* y *XbaI*. El plásmido pIJ8660 extraído de células *E. coli* DH5- α digerido con las mismas enzimas se ligó al fragmento del promotor. Al nuevo plásmido (pIJ8660+promotor *sp7066*) se le denominó pIJ7066.

La construcción, plásmido pIJ7066, se verificó por restricción usando las enzimas *XbaI* y *EcoRV*, liberándose el fragmento correspondiente al promotor 310 pb (Fig. 24)

Se seleccionó la colonia correspondiente al carril 4 para volver a sembrarla y extraer nuevamente el plásmido.

Dado los sistemas de restricción metilo sensibles presentes en ciertas especies de estreptomicetos particularmente para fines de este estudio en *S. coelicolor*, la construcción se introdujo mediante electrotransformación en células competentes de *E. coli* ET12567. De manera adicional, esta cepa bacteriana contiene el plásmido pUZ8002, que es un derivado del plásmido RK2. Cabe hacer mención que los plásmidos pueden ser transferidos desde *E. coli* a cepas de *Streptomyces* en forma dependiente del origen de transferencia (*oriT*) de los plásmidos RK2 del grupo IncP α y a la función del gen *tra* del plásmido RP4. Los sistemas de conjugación con dichas características, no son sólo útiles para la transferencia de genes entre diferentes especies bacterianas sino también en otro tipo de células como levaduras y células de mamífero (Blaesing *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006)

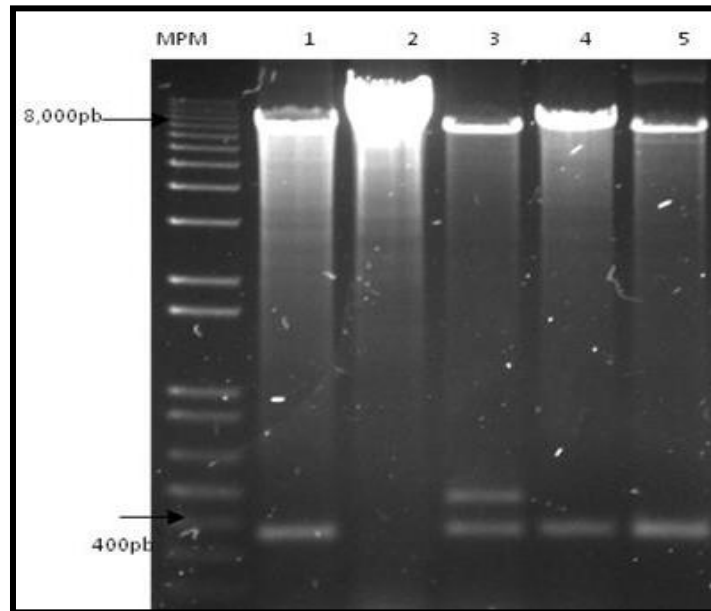


Figura 12. Se muestra el resultado de las digestiones de clonas de *E. coli* electrotransformadas con el plásmido pIJ7066. Las bandas cercanas a 8 kb corresponden al plásmido pIJ8660 en tanto las bandas del fragmento del promotor corresponden a las bandas cercanas a 400 pb.

Las células ET12567/pIJ7066 se cultivaron en las mismas condiciones que cualquier cepa de *E. coli* para extracción de plásmido por miniprep. Se verificó la presencia del plásmido mediante la visualización de un gel de agarosa (no mostrado). Al mismo tiempo, células ET12567 se electrotransformaron con el plásmido pIJ8660 (plásmido original sin promotor) para servir como control negativo y verificar que la expresión de la proteína verde fluorescente fuera por la regulación del promotor.

4. Conjugación intergenérica.

Una vez corroborada la presencia del plásmido pIJ7066 en las células conjugativas ET12567 éstas se pusieron en contacto con fragmentos miceliares de *S. peucetius* subsp. *caesius* o con esporas de *S. coelicolor* sobre una placa de agar MS (consultar el apéndice). Transcurridos 7 días posteriores a la conjugación se seleccionaron 20 colonias exconjugantes para ser sembradas nuevamente en medio MS con apramicina (Fig. 25). De las colonias sobrevivientes del paso anterior se resembraron en medio nutritivo con el antibiótico correspondiente mediante la formación de parches.

El mismo procedimiento se realizó para la transferencia del plásmido control pIJ8660 a dichos microorganismos.

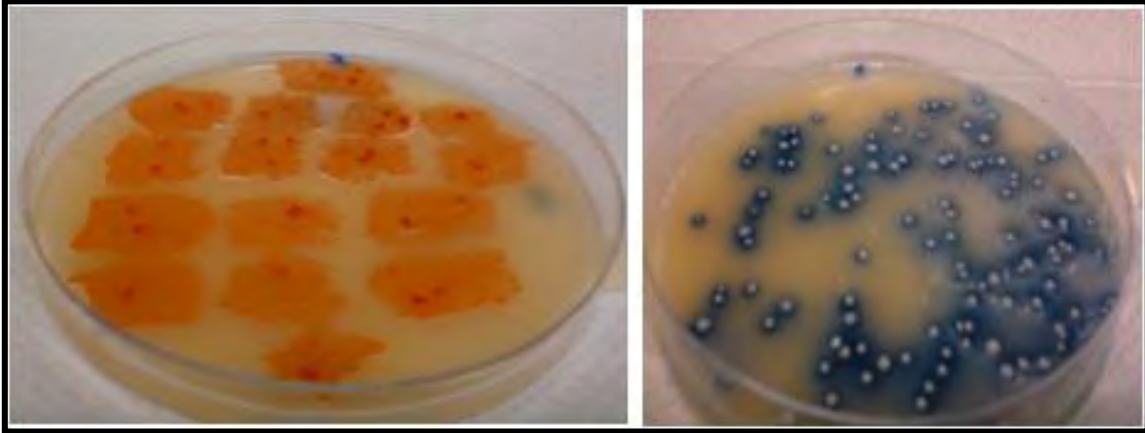


Figura 13. Colonias de exconjugantes creciendo en medio MS (AM 25 µg/ml). A la derecha colonias de *S. coelicolor* y a la izquierda colonias de *S. peucetius* subsp. *caesius* sembradas en forma de parches. De las colonias obtenidas en una tercera resiembra, se seleccionaron 5 para ser crecidas en medio líquido con 5 µg/mL de apramicina, TSB para *S. coelicolor* y YMG para *S. peucetius* subsp. *caesius*.

5. Expresión de la proteína verde fluorescente.

Las colonias con mejor crecimiento en medio líquido se seleccionaron para hacer un ensayo rápido de expresión de la proteína verde fluorescente. Para dicho ensayo, las bacterias fueron sembradas en medio mínimo suplementado con glucosa 100 mM, se colectaron muestras a las 8 h. Las muestras se lisaron por sonicación y se determinó la concentración de proteína en cada una de las muestras. Se procedió a realizar geles de acrilamida 10% y la transferencia a membranas de celulosa. Posteriormente, se realizó un Western-blot anti-GFP.

En la Fig. 26 se muestra el inmuno-blot de 3 de las colonias seleccionadas. Como control positivo se empleó una cepa de *E. coli* conteniendo un plásmido pBad con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) inducida con IPTG y cosechada a las 8 h. El control negativo corresponde a la misma cepa pero sin inducir. De las tres colonias probadas se observa que dos presentan una banda cercana a 30 kDa al tiempo que fueron colectadas.

Con todas las exconjugantes probadas se obtuvieron datos similares (resultados no mostrados) así que se seleccionó a la que mostró un mejor crecimiento, promedio de tres diferentes matraces y tres experimentos independientes, en medio líquido. De acuerdo al sistema para discriminar entre las colonias probadas la que fue seleccionada correspondía a la exconjugante denominada EII.

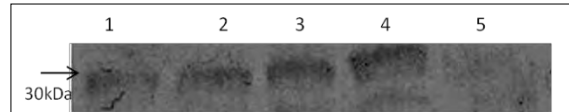


Figura 14 Western-blot anti-GFP para corroborar la expresión de la proteína por *S. peucetius* subsp. *caesius*. En el carril 1-3 se muestran los lisados de las colonias exconjugantes conteniendo el plásmido pIJ7066, el carril 4 corresponde al C+ lisado de células de *E. coli* pBad/gfp inducidas; el carril 5, control negativo, corresponde a la misma cepa pero sin inducir.

Con la exconjugante seleccionada se procedió a realizar una cinética de crecimiento en medio completo con el fin de comparar el crecimiento de ésta y la cepa control *S. peucetius* subsp. *caesius* pIJ8660. Los resultados se muestran en la Fig. 27.

Con respecto al crecimiento, en las condiciones probadas, la cepa EII muestra un mejor crecimiento aparente que la cepa control, sin embargo no se realizó análisis estadístico para corroborar la significancia de las diferencias observadas. De manera cualitativa, a pesar de que sí hubo un mayor crecimiento de la cepa EII, el micelio se observaba más disgregado e incluso lisado con respecto al control. A las 72 h en ambas cepas se ha consumido completamente el carbohidrato, la cepa EII parece consumir el carbohidrato más rápido que la cepa control.

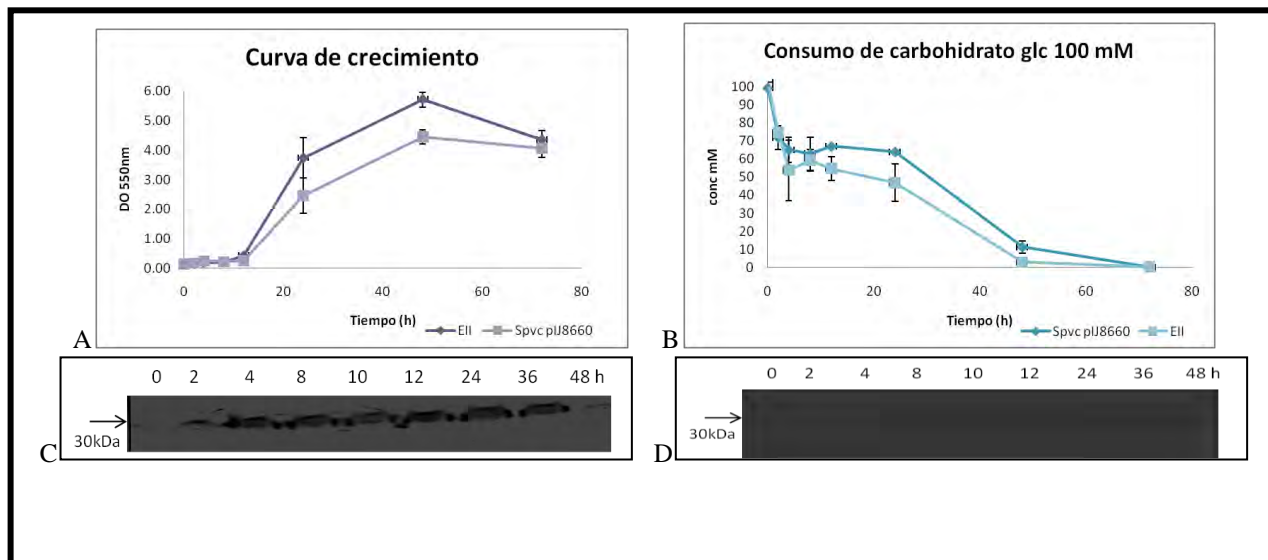


Figura 15. En A se observa la curva de crecimiento comparativa de SpvIJ8660 y EII en medio completo. En B se observa la curva de consumo de glucosa de ambas cepas. En C y D se observan los inmuno-blots para las cepas anteriores. Resultados representativos de dos experimentos independientes. Con el inmunoblot anti-proteína verde fluorescente, se observa expresión de la proteína verde desde las 2 h. A las 48 h cuando la glucosa se ha terminado, prácticamente no se observa expresión de la proteína. En el caso de la cepa transformada con el plásmido pIJ8660 (plásmido sin promotor), cultivada a las mismas condiciones que la cepa anterior y empleando las mismas condiciones para el ensayo inmunológico no se aprecia expresión de la proteína.

Una vez corroborada la expresión de la proteína verde fluorescente, se procedió a realizar una cinética de crecimiento en medio mínimo empleando como fuentes de carbono glucosa y arabinosa 100 mM. Como puede observarse en la Fig. 28, en medio mínimo el crecimiento es menor comparado con el caso anterior, cuando se empleó medio completo. En el caso de glucosa el crecimiento si es marcadamente mayor comparado con el crecimiento en arabinosa (Figs. 28 y 29). Sin embargo, el carbohidrato tampoco se consume totalmente pero corresponde con el comportamiento observado en las cepas control (datos no mostrados). Los cambios en el pH no son significativos y es otra de las características de referencia de *S. peucetius* subsp. *peucetius* creciendo en dicho carbohidrato. En la parte inferior de la figura, se muestra el western-blot con las muestras cosechadas a diferentes intervalos. Así, independientemente de que la cepa sea cultivada en medio mínimo o medio complejo suplementado con extracto de levadura, se observa expresión de la proteína verde desde las 2 h en glucosa (Fig. 28).

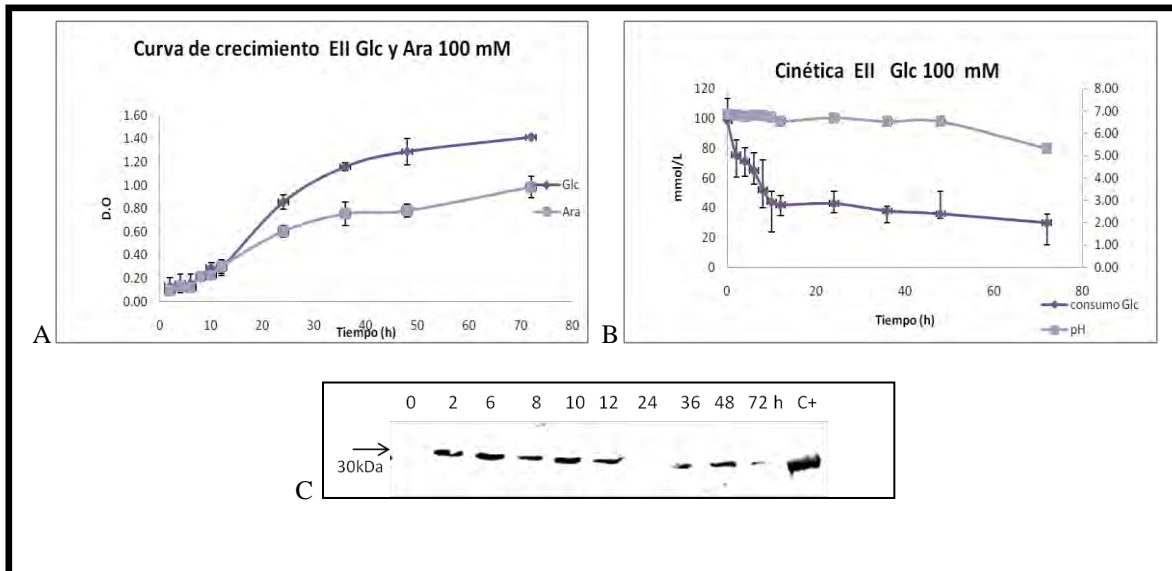


Figura 16. En A se muestra la cinética de crecimiento de la cepa EII (*Streptomyces peucetius* subsp. *caesiussp*IJ7066) cultivada en medio mínimo suplementado con glucosa ó arabinosa 100 mM. En B se muestra el consumo de glucosa así como los cambios en el pH. C: Inmuno-blot que, muestra la expresión de la proteína verde fluorescente en glucosa, los tiempos corresponden a horas. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

En el caso de arabinosa como fuente de carbono, el carbohidrato tampoco se consume del todo a las 72 h que fue el último tiempo de muestreo. En el caso de pH, este carbohidrato se metaboliza vía pentosas fosfato y se observa la acidificación del medio de cultivo. En el inmuno-blot, no se aprecian bandas que correspondan con el peso de la proteína verde fluorescente comparándolas con el control positivo (Fig. 29).

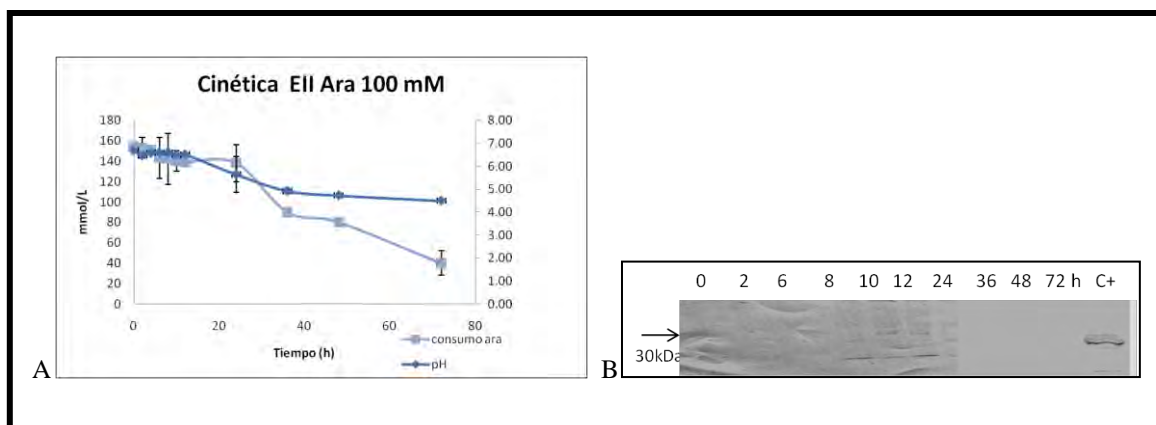


Figura 17. (A) Consumo de carbohidrato y cambio de pH exhibido por la cepa EII crecida en arabinosa 100 mM. En B se muestra el inmuno-blot con la expresión de la proteína verde fluorescente en arabinosa. Los tiempos corresponden a horas de crecimiento. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

6. Ensayos de inducción.

Efecto de la fuente de carbono

Los ensayos de inducción se realizaron creciendo a las bacterias en medio mínimo suplementado con 100 mM de arabinosa como fuente de carbono, se les permitió crecer durante 36 h. Una vez transcurridas las 36 h a cada matraz se le agregó el volumen correspondiente de la fuente de carbono a evaluar para una concentración final de 100 mM. Se cosecharon muestras cada 15 minutos después de la adición del pulso de la fuente de carbono y se procedió con el protocolo para la realización de los ensayos inmunológicos.

En la figura 30 se observan los resultados obtenidos al inducir a las células con D-glucosa y 2-desoxiglucosa. En ambos casos se observa producción de la proteína desde los 15 minutos de la inducción. El tiempo 0 corresponde a las muestras sin inducir. La Dog al carecer solamente de un grupo -OH en la posición 2 es capaz de inducir la expresión de *sp7066*. Esto también se ha observado en el transportador de glucosa de hígado de pollo Ch-GT2 (Wang, 1994).

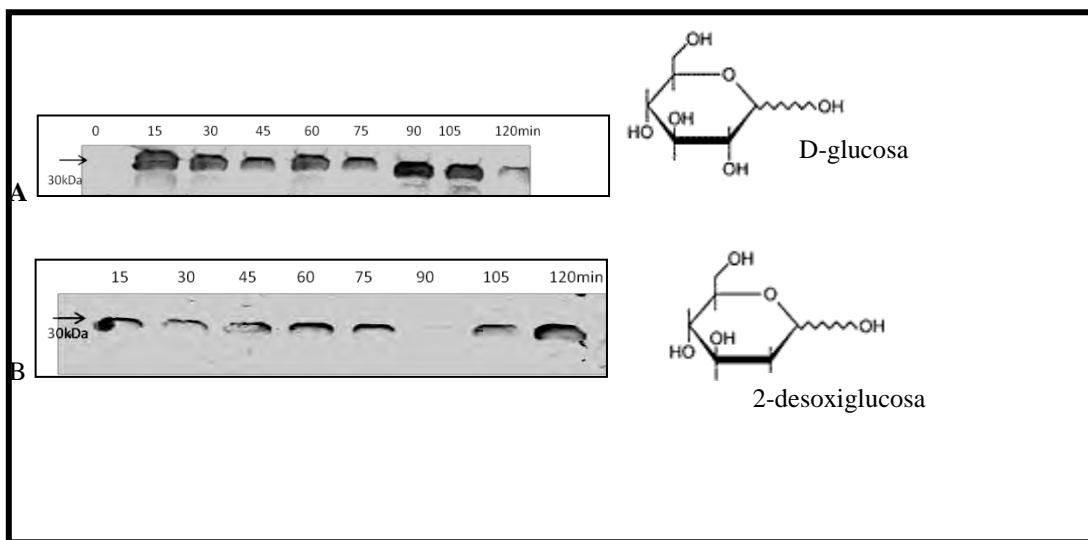


Figura 18. Ensayos de inducción con fuentes de carbono inductoras. El tiempo 0 corresponde a la muestra sin inducir que se empleó para sembrar tanto los matraces para los pulsos de glucosa como para los de desoxiglucosa. En A se muestran los resultados empleando glucosa como inductor y en B empleando desoxiglucosa. Ambos carbohidratos se emplearon a una concentración de 100mM. Adicionalmente, se muestran las estructuras cíclicas de ambos carbohidratos. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Se probaron otra serie de carbohidratos para verificar la inducibilidad del promotor del gen *sp7066*, entre ellos arabinosa, fructosa y glicerol. Se hace énfasis especial en la fructosa, ya que las permeasas de glucosa de *Synechocystis* y *Zimomonas mobilis* sí son capaces de transportar dicho carbohidrato, pero no así el GlcP de *S. coelicolor*. Con ninguna de las fuentes anteriores se obtuvo inducción de la proteína verde (Fig. 31).

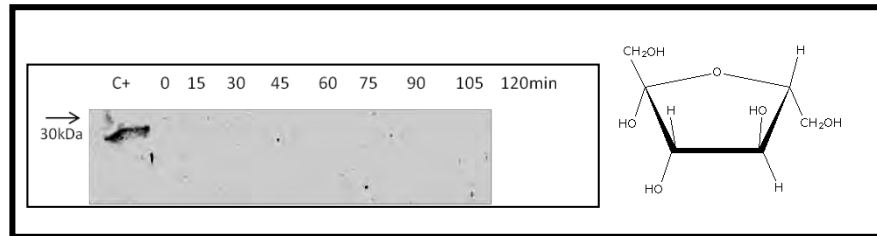


Figura 19. Ensayos de inducción empleando fructosa 100 mM como fuente de carbono. Los carriles corresponden a los diferentes tiempos de muestreo (t 0 hasta 120 min). Se muestra el control positivo. Los mismos se resultados fueron observados cuando se empleaba arabinosa, glicerol y N- acetil glucosamina como fuente de carbono. La estructura corresponde a la fructosa. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Por otra parte, como ha sido mencionado, en algunas especies de estreptomicetos se ha descrito un sistema PTS activado por NacGlc y con la finalidad de determinar si la presencia de esta fuente en el medio de cultivo podría afectar la fuente de expresión del gen *sp7066*, determinado mediante la expresión de la proteína verde se realizó un experimento donde se dieron pulsos con dos diferentes condiciones, una con condiciones altas de NacGlc (100 mM) y bajas de Glc (10 mM) y viceversa. En la Fig. 32 se observa que la inducción de la proteína verde se lleva a cabo independientemente de la presencia de NacGlc en el medio de cultivo. Por lo anterior, parece ser que a pesar de que la NacGlc es un carbohidrato del sistema PTS, éste no es capaz de regular negativamente la expresión de la probable permeasa de glucosa en *S. peucetius* subsp. *caesius*.

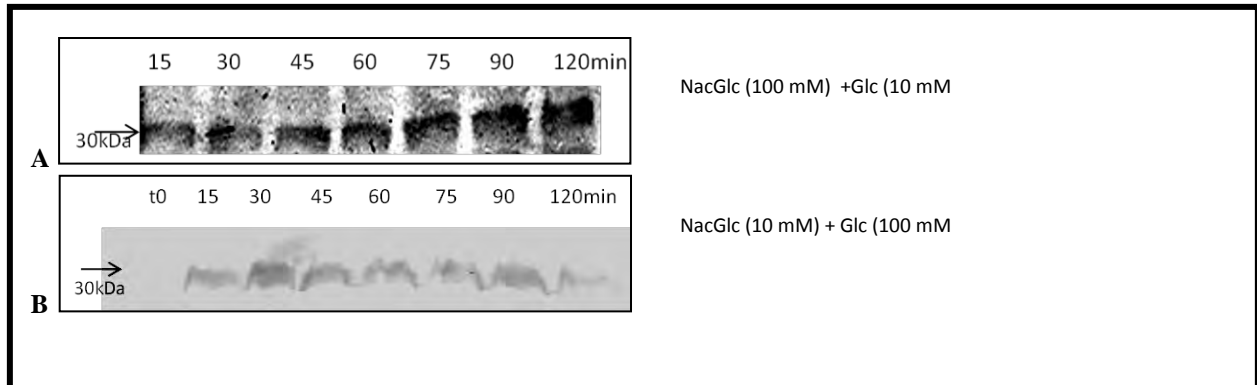


Figura 20. Ensayo donde se empleó combinaciones altas y bajas de glucosa y N-acetilglucosamina como inductores. En A se observan los resultados cuando se empleó la combinación de glucosa baja (10mM) y Nac alta (100 Mm). En B, se muestra el inmunoblot del caso contrario, glucosa alta, Nac baja. Independientemente de la concentración de NacGlc aún a concentraciones bajas de Glc, la síntesis de la proteína verde se induce mediada por el promotor de *sp7066*. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Efecto del pH sobre la expresión de *sp7066*.

A pesar de no encontrar en el análisis *in silico* regiones reconocidas por factores transcripcionales de cualquier forma se decidió hacer un análisis de efecto del pH sobre la expresión del transportador de glucosa. En algunos estudios de sistemas de transporte de la familia MFS, particularmente en hongos, donde el transporte de carbohidratos u otras moléculas se encuentran acoplados al simporte de protones, se han encontrado regiones capaces de responder a reguladores transcripcionales de respuesta a pH (van Kuyk, 2004).

En la Fig. 33 se muestra que el promotor parece no responder a los cambios de pH en el medio extracelular. A ningún pH ensayado se activa la transcripción de la proteína verde pero, comparando con el control crecido en glucosa, tampoco se inhibe la síntesis a ningún pH. Estos resultados son solo un indicio, sin embargo es probable que el gen si tenga los elementos de control de regulación a pH pero que no se hayan incluido cuando se realizó la amplificación de la presunta región promotora, o bien que este sistema bacteriano carezca de tal tipo de respuesta. Sin embargo, para confirmar cualquiera de las suposiciones anteriores se requieren más estudios.

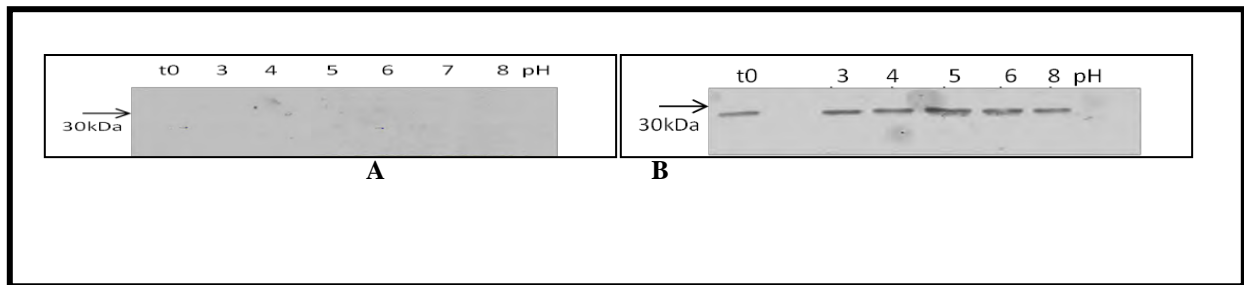


Figura 21 Efecto del pH. Del lado izquierdo se muestra los resultados obtenidos al crecer a la cepa EII en un carbohidrato no inductor y posteriormente cambiarlo a diferentes condiciones de pH. Como puede observarse no se produce inducción bajo ninguno de los pHs probados (Panel A). Del lado derecho (B) los resultados de expresión de la cepa EII creciendo en condiciones inductoras Glc 100 mM y su paso a diferentes pHs.

Efecto del producto del gen *sco2127*.

La complementación de las mutantes *Dog^R* de *S. coelicolor* exclusivamente con el gen de *glk* no revierte el fenotipo completamente sino que es necesaria la complementación tanto con el gen *glk* como con la región *sco2127*. De igual manera, en el caso de las mutantes *Dog^R* de *S. peucetius* subsp. *caesius* para corregir la actividad de *Glk* y el transporte de glucosa la región *sco2127* parece tener un papel relevante. En estudios de dot-blot se sugirió una posible regulación a nivel transcripcional de la expresión de los genes *glk* y *sp7066*. Sin embargo, estudios *in silico* no predicen la existencia de motivos de unión a DNA del producto del gen *sco2127* de manera que un efecto directo sobre los promotores de la glucosa cinasa o el transportador de glucosa no parecen ser muy probables. De hecho la proteína hipotética no presenta dominios conservados que coincidan con proteínas de función conocida y, por tanto, resulta complicado determinar el papel de la misma en el fenómeno de RCC.

Con la finalidad de verificar, de manera cualitativa, un posible efecto del gen *sco2127* a nivel transcripcional sobre la expresión del transportador de glucosa, el sistema reportero promotor *sp7066*-EGFP fue introducido mediante conjugación intergenérica a una mutante Δ *SCO2127* *S. coelicolor* (Forero, resultados no publicados).

Como puede observarse en la Fig. 34 la proteína verde fluorescente se expresa en la cepa M145 a pesar de que el promotor es el del transportador de *sp7066*, indicando el reconocimiento de la secuencia promotora en ambas especies. Como control positivo para verificar la expresión de la proteína se utilizó un extracto conocido de *S. peucetius* subsp. *caesius* cuya expresión de EGFP había sido verificada anteriormente.

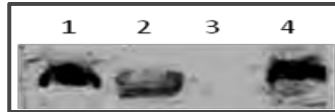


Figura 22. Western-blot de la proteína EGFP. En el carril 1 se muestra el control positivo que corresponde a un lisado bacteriano de EII que anteriormente se comprobó expresaba la proteína verde. En el carril 2 se observa el lisado de la mutante conteniendo el plásmido pIJ7066 (denominada $\Delta 4$); carril 3 se muestra el control negativo (cepa ScoM145 con el plásmido pIJ8660). En el carril 4 se muestra a la cepa ScoM145 conteniendo el plásmido pIJ7066.

Con los resultados obtenidos, a nivel cualitativo, parece no haber un efecto de SCO2127 sobre la transcripción del gen *sp7066*. Si el producto de *sco2127* fuera un factor de transcripción activador de la transcripción del gen *sp7066*, en su ausencia el gen no podría transcribirse o la expresión sería muy baja. Pero, de acuerdo a las predicciones *in silico*, el producto del gen *sco2127* no parece ser un activador transcripcional, o al menos no el único. Cabe resaltar que éste es sólo un estudio cualitativo, peculiarmente de todo o nada y para obtener información más fina tendrían que realizarse otros estudios o verificar los niveles de expresión a nivel de mRNA.

Por otra parte, en estudios recientes en nuestro grupo de trabajo se ha postulado que el efecto sobre la actividad de la Glk y el transportador de glucosa puede ser el resultado de una interacción proteína-proteína creando un complejo proteico de transporte y fosforilación concomitante en la membrana de estos organismos.

CONSIDERACIONES FINALES

En el presente trabajo se logró identificar a la región denominada *sp7066* como la permeasa putativa de glucosa en *S. peucetius* subsp. *caesius*. Bajo este nuevo conocimiento sería necesario deletar dicho gen y hacer estudios adicionales para corroborar que constituye el transportador principal de glucosa de dicho microorganismo. A la par se realizaron experimentos que permitieron obtener una fusión con un gen reportero funcional para evaluar la regulación transcripcional del gen *sp7066*. De esta manera, con dicha herramienta, se encontró que el gen *sp7066* sólo responde a glucosa (incluyendo el análogo no metabolizable, 2-desoxiglucosa) y no a otros carbohidratos. Además, encontramos que la región promotora no responde a cambios de pH extracelular como en el caso de otros microorganismos (hongos). Si bien, la regulación transcripcional de los genes procariotas es más simple que en muchos eucariotas, considerando el tipo de cajas presentes en los promotores de estos últimos, no podemos descartar que en regiones distales del gen *sp7066* se puedan encontrar elementos reconocidos por factores transcripcionales de respuesta a pH, no observados en este estudio ya que sólo se amplificó la región promotora básica. Esto considerando que muchos genes bacterianos son también regulados por elementos distales al promotor.

Por otra parte, en este estudio cualitativamente se evaluó el efecto del gen *sco2127* sobre el gen *sp7066* en ausencia del primero la expresión de *sp7066* no parece ser modificada, lo que podría indicar que los efectos observados de *SCO2127* sobre la incorporación de glucosa tal vez no son resultado de un aumento en la expresión del transportador de glucosa mediada por la influencia de *SCO2127* sino tal vez, por interacciones proteína-proteína o algún otro mecanismo importante para la incorporación eficiente de la fuente de carbono como para el fenómeno de represión catabólica por carbono.

CONCLUSIONES

- Se identificó a la región *sp7066* como un transportador de glucosa putativo perteneciente a la familia MFS.
- Se definió y clonó la región promotora del gen *sp7066* que contiene los elementos responsivos a carbohidrato (glucosa).
- El promotor analizado responde exclusivamente a glucosa y 2-desoxiglucosa cuando ésta se añade al medio como fuente de carbono ya que no responde a otras fuentes carbonadas como la fructosa, arabinosa y glicerol.
- Carbohidratos del sistema PTS no evitan la inducción del gen reportero mediada por la región promotora de *sp7066*.
- La región amplificada no parece tener elementos regulatorios de respuesta al pH extracelular.
- En las mutantes Δ *sco2127* no se observa, cualitativamente, un efecto sobre la transcripción de *sp7066*, en conjunto con la evidencia acumulada hasta el momento parecen sugerir un papel del producto del gen *sco2127* a otro nivel.

PERSPECTIVAS

- Deletar o silenciar el gen *sp7066* para corroborar que es la permeasa más importante en el transporte de glucosa de *S. peucetius* subsp. *caesius*.
- Hacer más estudios *in silico* con el fin de determinar si en regiones río arriba del gen se encuentran sitios para la unión de factores transcripcionales, por ejemplo, sitios de respuesta a pH.
- Clonar el gen *sp7066* y caracterizarlo determinando sus propiedades, K_a , inhibición de transporte por inhibidores de potencial de membrana, transporte de otros carbohidratos, etc.
- Implementar un método cuantitativo para determinar la influencia de la región *sco2127* sobre la expresión de la permeasa de glucosa.
- Determinar las posibles interacciones proteína-proteína entre GlcP y la proteína SCO2127 considerando que el aumento en la incorporación de glucosa en presencia de la sobreexpresión de SCO2127, parece no ser debida a una regulación transcripcional

REFERENCIAS

1. **Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H. and Iwata S.** (2009). Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. *Science*: 301, 610.
2. **Angell, S., Lewis, C., Buttner, M. and Bibb, M.** (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) a likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular and General Genetics*: 244, 135-43.
3. **Angell, S., Schwarz, E., and Bibb, M.** (1992). The glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular Microbiology*: 6, 2833-2844.
4. **Arcamone, F.; Cassinelli, G.; Fantini, G.** (1969). Adriamycin 1hydroxydaunomycin, A New Antitumor Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*: 11, 1101 – 1110
5. **Bentley, S., Chater K., Cerdeño-Tarraga A., Challis G., Thomson R., James K., Harris D., Quail M., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Cheng C., M. Collins M., A. Cronin A., Fraser A., Goble A.,Hidalgo J., Hornsby T.,Howarth S., Huang C., Kieser T.,Larke L., Murphy L.,Oliver K.,O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M., Rutherford K.,Rutter S.,Seeger K.,Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T.,Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B., Parkhill J. and Hopwood D.** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*: 417, 141-147.
6. **Bertram, R., Schlicht M., Mahr K., Nothaft H., Saier M., and Titgemeyer F.,** (2004). *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*: 1362-1373.
7. **Bibb, M.** (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*: 8 , 208-215.
8. **Blaesing, F., Agnes, M., Silke, V., Gunter, Z., Stefan, P., and Erich, L.** (2005). Introduction of DNA into *Actinomycetes* by bacterial conjugation from *E. coli* - An evaluation of various transfer systems. *Journal of Biotechnology*: 120, 146-161.
9. **Bourn, W., and Babb, B.** (1995). Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*: 23 (18), 3696-3703.

10. **Bruckner, R.** (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*: 209, 141-148.
11. **Challis, G.** (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*: 100 , 1455-1461.
12. **Chater, K.** (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*: 361 , 761-768.
13. **Chen, X., Mo, H., Liu, Y., and Xia F.** (2006). Development of a multifunctional and efficient conjugal plasmid for use in *Streptomyces* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 70, 705-710.
14. **Choi, S., Lee' C., Hwang, Y., Kinoshita' H., and Nihira, T.** (2004). Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer. *Archives of Microbiology*: 18,294-298
15. **Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.**(2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *TRENDS in Microbiology*: 16, 313-319.
16. **Davidson, M., Dassa, E., Orelle, C., and Chen J.** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 317–364
17. **Demain, A.** (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International. Microbiology*: 1, 259-264.
18. **Demain, A. and Sanchez, S.** (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*: 62, 5-16.
19. **Deutscher, J. C.** (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 4, 939-1031.
20. **Eng, C., Asthana, C., Aigle, B., Hergalant, S., Mari, S. and Leblond, P.** (2009) A new data mining approach for the detection of bacterial promoters combining stochastic and combinatorial methods. *Journal of Computational Biology*: 16, 1211-1225.
21. **Flardh, K., and Buttner M.** (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*: 7, 36-49.

22. **Görke, B. and Stülke J.** (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*: 6,613-624.
23. **Guzmán, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., López, R., Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Servín-González L., Sánchez, S. and Elizabeth Langley.** (2005). Pleiotropic effects of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*: 151, 1717-1723.
24. **Hillerich, B. and Westpheling, J.** (2006). A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source. *Journal of Bacteriology*: 188, 7477-7487.
25. **Hodgson, D.** (1982). Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology*: 128 , 2417-2430.
26. **Hodgson, D.** (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*: 42, 47-238.
27. **Hopwood, D.** (2006). Soil To Genomics: The Streptomyces Chromosome. *Annual Review of Genetics*: 40, 1-23.
28. **Huang, C., Lin, Y., Yang, Y., Chen, C., and Huan, S.** (1998).The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular Microbiology*: 28, 905-916
29. **Ikeda, H. Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M. and Omura S.** (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature*: 21 , 526-531.
30. **Ikeda, H., Seno T., Bruton, C. and Chater K.** (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and General Genetics*: 196 , 501-507.
31. **Kieser, T., Chater, K., Bibb, M., Buttner, M. and Hopwood D.** (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. 2-33.
32. **Kim, E., Hong, H., Choi, C., and Cohen, S.** (2001) Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *Journal of Bacteriology*: 183, 2198-2203.

33. **Konings, W.** (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 90, 325-342.
34. **Law, C., Maloney, P. and Wang, D.** (2008) Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annual Reviews of Microbiology*: 62,289–305.
35. **Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M., and Tieleman, D.** (2008). ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1778, 1757–1771
36. **Monedero, V., Hazé, A., Boel, G., Zúñiga, M., Beaufils, S., Hartke, A., Deutscher, J.** (2007) The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*. Regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*: 12, 20–32.
37. **Nothaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M. and Titgemeyer, F.** (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for *N*-acetylglucosamine metabolism. *Journal of Bacteriology*: 185, 7019-7023.
38. **Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A. and Horinouchi, S.** (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*: 3, 431-439
39. **Pao, S., Paulsen, I., and Saier, M.** (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 1, 1-34.
40. **Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R. and Stassi, D.** (2003). *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*: 23, 1-27.
41. **Parche, S., Schmid, R., Titgemeyer, F.** (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *European Journal of Biochemistry*: 265, 308-317.
42. **Rigali, S., Schlicht, M., Hoskisson, P., Nothaft, H., Merzbacher, M., Joris, B. and Titgemeyer, F.** (2004). Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new *cis/trans* relationships. *Nucleic Acids Research*: 32, 3418-3426.

43. **Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E. and Sánchez, S.** (2010). Metabolites: Regulation by the Carbon Source. *Critical Reviews in Microbiology*. En prensa.
44. **Sambrook, J., MacCallum, P. and Russell, D.**(2001). Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
45. **Schrey, S., and Tarkka, M.** (2008). Friends and foes: *Streptomyces* as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 94, 11-19.
46. **Segura, D., González, R., Rodríguez, R., Sandoval, T., Escalante, L. and Sanchez, S.** (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*: 4, 30-36.
47. **Siebold, C., Flukiger K., Beutler R., and Erni B.** (2004). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Letters*: 504,104-111.
48. **Strhol, W.** (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*: 20, 961-974.
49. **Sun, J., Kelemen, G. H., Fernandez, J. M., and Bibb, M.** (1999). Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*: 145, 2221-2227.
50. **Takano, E.** (2006) γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology*: 9, 287-294.
51. **Titgemeyer, F. and Hillen, W.** (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek*: 82, 59-71.
52. **van Wezel, G., König, M., Mahr, K., Traag, B., Pimentel-Schmitt, E., Willimek, A., and Titgemeyer, F.** (2005). GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*: 55, 624-636.
53. **van Wezel, G., König, M., Mahr, K., Nothaft, H. Thomoe, A., Bibb, M., and 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, 67-74

54. **vanKuyk, P., Diderich, J., Mac Cabe, O., Herrero, O., Ruijter, G., and Visser, J.** (2004) *Aspergillus niger mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochemistry*: 379, 375-383.
55. **Venancio, T. and Aravind L.** (2009). Reconstructing prokaryotic transcriptional regulatory networks: lessons from actinobacteria. *Journal of Biology*: 8,29,35
56. **Wang, F., Tsai, M., and Wang, C.** (1994). Identification of a chicken liver glucose transporter. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 310,172-179.
57. **Wang, F., Xiao, X., Saito, A. and Schrempf, H.** (2002). *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of *N*-acetylglucosamine. *Molecular Genetics and Genomics*: 268, 344-351.
58. **Watve, M., Tickoo, R., Jog, M., and Bhole, B.** (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*: 176 , 386-390.
59. **Wolfgang, T. F.** (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of International and General Microbiology*: 82 , 59-71.

Medios electrónicos

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

www.enzim.hu/hmmtop/index

www.sbc.su.se

www.softberry.com

APÉNDICE

I. Medios de cultivo.

i. Medio Luria-Bertani.

Componente	Concentración
Triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

ii. Medio SOC.

Componente	Concentración
Triptona	20 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	0.5845 g/L
KCl	0.185 g/L
MgCl ₂ -6H ₂ O	2.03 g/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	2.46 g/L
Glucosa	3.60 g/L

iii. Medio YMG

Componente	Concentración
Extracto de levadura	4 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Glucosa	4 g/L

iv. Medio mínimo definido en nitratos (NDM)

Componente	Molaridad	Concentración
NaNO ₃	10 mM	0.85 g/L
K ₂ HPO ₄	1	0.1742
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	10 mL stock 50Mm
Glucosa	100	
Elementos traza		20 mL/L
Extracto de levadura		2 g/L

Elementos traza	Concentración mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	200
ZnCl ₂	40
CuCl ₂ .2H ₂ O	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	10
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O	10
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10
Los elementos traza se disuelven individualmente en 5 mL de agua, se juntan y se aforan a los mililitros deseados. Esterilizar por filtración y almacenar en frasco ámbar.	

v. Medio NMMP

Reactivo	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Difco Casaminoacidos	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.6 g
PEG 6000	50 g
Solución de elementos menores	1 ml
Agua destilada	800 ml

Solución de elementos menores

Reactivo	Concentración g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	1
CaCl ₂	1
Al momento de usar agregar: 15 ml de buffer NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.1 M, pH 6.8) 2.5 ml Fuente de carbono (20%)	

vi. Medio MS

Componente	Concentración
Agar	20 g/L
Manitol	20 g/L
Harina de soya	20 g/L

II. Protocolos para ADN

I. EXTRACCIÓN DE DNA *Streptomyces*

1. Sembrar al estreptomiceto en 25 mL de medio YMG (por duplicado en matraces de 125 mL con 3 perlas de vidrio c/u). Incubar a 29°C con agitación, 200 rpm, durante 48 h.
2. El preinóculo se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min. Lavar dos veces con 6 mL de solución salina estéril.
3. Resuspender en 6 mL de la SSI. Tomar 3 mL para inocular en 2 matraces bafleados de 250 mL que contienen 50 mL de medio TSB con glicina 0.5%.
4. Incubar 48 h, mismas condiciones del punto 1.
5. Juntar los dos cultivos (100 mL) y centrifugar a 5000 rpm por 5 min.
6. Lavar 2x con 25 mL de sacarosa 10.3% (15 min, 5000 rpm).
7. Resuspender el micelio en 50 mL de Buffer P con lisozima (2 mg/mL). Incubar en movimiento a 30°C hasta la formación de protoplastos (aprox. 1 h).
A PARTIR DE ESTE PUNTO SE PUEDE TRABAJAR FUERA DEL ÁREA ESTÉRIL
8. Centrifugar a 6,000 por 10 min.
9. Resuspender los protoplastos en 10 mL de sacarosa 10.3%. Adicionar 200 µL de EDTA 0.5 M.
10. Agregar 2 mL SDS 20%. Agitar suavemente con una pipeta. Adicionar inmediatamente 10 mL de fenol y 1.5 mL NaCl 5 M. Mezclar por 20 min.
11. Agregar 10 mL de cloroformo pH7 (10 ml) mezclar por 5 min y centrifugar a 8,000 rpm/10 min.
12. Repetir la adición de fenol y cloroformo a la fase superior. Mezclar y centrifugar 10,000 rpm/15 min
13. Mantener en hielo el centrifugado. Transferir con mucho cuidado la fase superior con una micropipeta de 1 mL y transferirla a un nuevo tubo.
14. Agregar 1 vol de isopropanol cuidando que queden dos fases.
15. Enredar en DNA con una pipeta pasteur (spooling). Lavar con etanol 70%. Dejar secar.
16. Resuspender en el menor volumen de buffer T.E. si el DNA no está completamente disuelto disolver a 30 C.
17. Adicionar RNAsa a una concentración final de 20 µg/mL. Incubar 30 min a 37°C.
18. Agregar pronasa a una concentración final de 100 µg/mL. Incubar 15 min.
19. Adicionar 20 µL de NaCl 5 M y 40 µL de SDS 0.4%. Incubar 37°C por una h.
20. Agregar 1 vol de fenol. Mezclar y centrifugar (8,000 rpm/10 min).
21. Extraer la fase acuosa, poner 1 vol de fenol-cloroformo, centrifugar a 8000 rpm por 10 min. Separar la fase acuosa.
22. Adicionar 1 vol de cloroformo (500 µL), mezclar, centrifugar (8,000 rpm, 10 min) y separar la fase acuosa
23. A esta fase adicionar (1/10 vol.) de CH₃COONA 3 M mezclar y adicionar 2.5 vol de etanol absoluto. Incubar 30 min en congelador -20°C.
24. Centrifugar a 10,000 x 30 min a 4°C.
25. Desechar el sobrenadante y agregar 1 vol de etanol 70%. Mezclar. Centrifugar 10,000 rpm x 10 min a 4°C (x2)
26. Secar. Resuspender en el menor volumen de buffer T.E. y almacenarlo a -20°C.

Buffer P (Protoplastos)	
Componente	Concentración
Sacarosa	103 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	2.02 g/L
Elementos traza	2 mL/L
H ₂ O	800 mL
Dividir en alícuotas de 80 mL y esterilizar en autoclave. Antes de usar agregar por cada 100 mL lo siguiente (2)	

Por cada 100 mL (2)	Cantidad
Componente	
KH ₂ PO ₄	1 mL
CaCl ₂ . H ₂ O	10 mL
Buffer TES	10 mL
Se prepara cada solución por separado y se esterilizan en autoclave.	

Buffer TE			
	Concentración	Solución stock	Volumen stock/L
Tris-HCl	10 mM	2 M (pH8)	5 mL
EDTA	1 mM	0.25 M (pH8)	4 mL

II. Extracción de plásmido a pequeña escala (miniprep).

1. Se inoculan 5 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se transfiere el medio de cultivo a tubos de 1.5 mL y se centrifuga a 12000 rpm por 5 min a una temperatura de 4°C.
3. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón celular en 100 µL de la solución I, en seguida se adicionan 200 µL de solución II y se mezclan por inversión cuidando de abarcar toda la superficie del tubo, posteriormente se agregan 150 µL solución III y se vortexea gentilmente el tubo en posición invertida durante 10 s. Se deja reposar el tubo en hielo de 3 a 5 min.
4. Al sobrenadante se le adicionan dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja a -20°C por 30 min y se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Se retira el sobrenadante y se agrega al botón 1 vol de etanol al 70% a R.T. hasta que se desprenda del fondo del tubo, después se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4°C.
6. El sobrenadante es retirado y se deja secar el botón a 37°C, por último se resuspende el botón en 10 µL de TE (pH 8.0), conteniendo RNAasa (20 µg/mL), y se incuba a 55°C por 30 min.

Solución I	Solución II	Solución III
50 mM Glucosa	0.2 NaOH	5 M CH ₃ COOK 60mL
25 mM Tris-HCl pH 8	1% SDS	CH ₃ COOH 11.5 mL
10 mM EDTA pH 8		H ₂ O 28.5 mL

III. Extracción de plásmido a gran escala (maxiprep).

1. Como preinóculo se siembran 5 mL de medio LB-amp al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
2. Se inoculan 250 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer O.N. a 30°C.
3. Se transfiere el medio de cultivo a botellas de 250 mL y se centrifugan a 10000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retira y el botón se mantiene en hielo.
4. El botón se resuspende en 30 mL de solución I adicionando 250 µL de RNAsa (10 mg/mL), posteriormente se agregan 60 mL de solución II se mezcla bien y en seguida se añaden 50 mL de solución III. La mezcla se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 20°C.
5. El sobrenadante se recupera, y se le añade un volumen de isopropanol para precipitar el ADN, la muestra se deja reposar 30 min y después se centrifuga a 12000 rpm 30 min a 20°C
6. Se retira el sobrenadante, y posteriormente se lava el botón en etanol al 70%, centrifugar a 12000 rpm 15 min a 20°C y el etanol al 70% se retira y se deja secar el botón a 37°C por 30 min-1 h.
7. El botón se resuspende en 5 mL de Sol. MOPS, agregando 100 µL de RNAsa pancreática (10 mg/mL) dejándolo reposar 1 h a temperatura ambiente, consecutivamente se adicionan 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubar a 55°C 1 h (opcional).

Solución I	Solución II	Solución III	Solución de MOPS
5 mM sacarosa	0.2 N NaOH	3 M acetato de sodio pH 4.8	750 mM NaCl
10 mM EDTA	1% (w/v) SDS		2 mM EDTA
25 mM Tris pH 8.0			50 mM MOPS pH 7.0

IV. Limpieza de ADN con fenol-cloroformo

1. Se colocan 0.5 mL de ADN en tubos eppendorf, adicionando 0.5 mL de fenol-cloroformo 1:1 a la muestra y se agita hasta que se forme una suspensión.
2. Se centrifuga 5 min a 13000 rpm y posteriormente se recupera la fase acuosa.

3. El paso 1 y 2 se repiten hasta que se halla eliminado el exceso de proteína que se acumula entre las dos fases.
4. Se agregan 0.5 mL de cloroformo isoamílico 24:1, agitando para que se forme la suspensión y se centrifuga 3 min a 13000 rpm.
5. La fase acuosa se recupera y se le añade un décimo de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla para homogenizar.
6. Se deja precipitar el ADN a -20°C durante 1 h, a continuación se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min y el sobrenadante es eliminado.
7. El botón se lava con 0.25 mL de etanol al 70% hasta que se despenda del tubo eppendorf, se centrifuga 15 min a 13000 rpm y se retira el sobrenadante.
8. Se deja secar el botón a 37°C y se resuspende en un volumen adecuado de agua estéril o buffer TE (pH 8.0).

V. Purificación de plásmido Mini Kit (Qiagen)

Permite la purificación de ADN usando columnas de gravedad donde la purificación del ADN plásmidico se lleva a cabo por intercambio aniónico. Las propiedades del ADN purificado son equivalentes o superiores a los que se obtienen por gradiente de CsCl, además de que no se utilizan sustancias toxicas como el fenol, cloroformo, bromuro de etidio y CsCl. Este método solo se utiliza para purificar el ADN que se secuenció.

1. Se reparte la muestra (ADN plasmídico) en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifuga 10 s a 12000 rpm, después se guarda una alícuota de 50 μL de muestra para su posterior análisis.
2. A continuación el tip (columna de gravedad) es equilibrado con 1mL de tampón QBT, y después se hacer pasar por la columna la muestra ADN plasmídico, una vez que la muestra ya pasó se guarda una alícuota de 50 μL de muestra.
3. La columna se lava 4 veces con 1 mL de tampón QC (este se recupera y guarda en tubos eppendorf).
4. Se pone 0.8 mL de tampón QF (incubado previamente a 65°C antes de la elusión) y se recupera el ADN eluido en tubos eppendorf y se guarda una alícuota de 50 μL .
5. Se precipita el ADN con 700 μL de isopropanol, dejándolo reposar 30 min y después se centrifuga a 12000 rpm 15 min a temperatura ambiente.
6. El sobrenadante se retira y se resuspende el botón en 100 μL de etanol 70% y se centrifuga 15 min a 12000 rpm.
7. El botón se dejar secar a temperatura ambiente ó a 37°C durante 1 h y por último se resuspende cada botón en 20 μL de agua ultra pura estéril.

VI. Electroforesis de Agarosa

1. Se prepara una solución de agarosa 0.8% (para fragmentos de menor tamaño se incrementa la concentración de agarosa) en el buffer TAE, la solución se calienta para que se disuelva, evitando la presencia de sólidos suspendidos, posteriormente se adiciona el bromuro de etidio a una concentración final de (0.5 µg/mL).
2. Se coloca la solución en la cámara de electroforesis y se deja que solidifique.
3. La muestra de ADN se mezcla con tampón de carga a una concentración final 1X, y esta es colocada en el gel.
4. La electroforesis se lleva a cabo a 6 v/cm hasta que el pigmento haya migrado a ¾ partes a lo largo del gel y después se puede observar en el transiluminador de UV para examinar la migración de fragmentos de ADN y su peso molecular.

Geles de agarosa		Cantidad
Componente		
Agarosa		
Buffer de carga 6X	0.25% azul de bromofenol	
Tipo III	0.25% Cianol FF de xileno	
	4°C	
	30% glicerol en agua	
Buffer	TAE	245 g Tris base
(Tris.acetatos-		57.1 mL ácido acético glacial
EDTA) 50X:		100 mL EDTA 0.5 M (pH 8.0)

VII. Producción de células de *E. coli* electrocompetentes.

Preparación de células electrocompetentes.

1. Se inocula 400 mL de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37°C con agitación continua por 3 h hasta obtener una ABS_{600} de 0.5 a 0.7.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a 10000 rpm por 15 min a 4°C.
3. Se retira el sobrenadante (medio) y resuspende el botón en un volumen de agua mega pura estéril y fría, después se centrifuga como en el paso 2.
4. El sobrenadante se retira y resuspende en $\frac{1}{2}$ del volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15min.
4. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 8 mL de glicerol al 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 15 min.
5. Por último se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en un volumen final de 1.2 mL de glicerol al 10% frío, se alícuota la muestra en tubos eppendorf con 50 μ L cada uno, almacenándolos a -70°C.

Electro-Transformación.

1. A 50 μ L de células competentes se les adiciona de 1-2 μ g de plásmido y se incuba en hielo por 1 min.
2. La mezcla de ADN y células se colocan en una cubeta de electroporación fría de 0.1 cm.
3. La cubeta se deposita en el electroporador, el cual produce una constante de tiempo de 4-5 ms y 12.5 kV/cm, y se le da un pulso de 1.25 V. Inmediatamente después se le adicionan 950 μ L de medio SOC y rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta.
4. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y se incuban a 37°C en agitación continua por 1 h, después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa.

1. Protocolos para proteínas.

III.A Geles SDS-PAGE.

La electroforesis es usada para separar mezclas complejas de proteínas, identificar subunidades y verificar la homogeneidad de muestras de proteínas. En la electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz del gel; el tamaño de los poros disminuye con altas concentraciones de acrilamida. La combinación del tamaño del poro del gel y la carga de la proteína, tamaño y forma determinan el tipo de migración de la proteína.

SDS-PAGE es un sistema aniónico debido a que el SDS está cargado negativamente. En este sistema las proteínas tienen carga negativa lo que hace que migren del polo negativo que se encuentra en la superficie del tampón al polo positivo sujeto a la parte inferior del sistema.

a) Preparación del gel:

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, se marcan los niveles de separación de los geles y se comprueba de que no haya fugas.
2. Se prepara el gel de acrilamida al 12% (gel de separación) y se coloca dentro de las placas, aproximadamente abarcando 5cm de altura.
3. Para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.
4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos.
5. Posteriormente se vacía en las placas el gel de concentración, evitando que se formen burbujas dentro las separaciones y entre un gel y otro. Después de la polimerización, los geles están listos para la electroforesis.
6. Se recorren los geles 15 min a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

b) Preparación de las muestras

1. Se colocan las muestras (en este caso botón celular) en tubos eppendorff, las células se disuelven en tampón de muestra a una concentración final de 2X y se hierven durante 5 min. Se colocan en hielo mientras son cargadas en el gel.

c) Condiciones de migración para 2 geles de acrilamida:

1. Los geles se corren a 20 mA, durante 1.5 h, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con tampón de migración 1X.

Geles de acrilamida (2) 30%/Bis:

Reactivo	Gel de Concentración 4%	Gel de Separación 10%
Acrilamida/Bis 30%	532 µL	3.32 mL
Tris.HCl 0.5 M, pH 6.8	1.0 mL	—
Tris.HCl 1.5 M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10%	40 µL	100 µL
Agua destilada	2.42 mL	4 mL
Temed	4.4 µL	5.5 µL
Persulfato de amonio 10%	22 µL	55 µL
Total	4 mL	10mL

Tampón de muestra 4x:

Componente	Cantidad
H ₂ O destilada	8.5 mL
Tris.HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL
Glicerol	2 mL
SDS 10%	4 mL
2-β mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	500 µL

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Composición	Cantidad
Tri.base 125 M	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

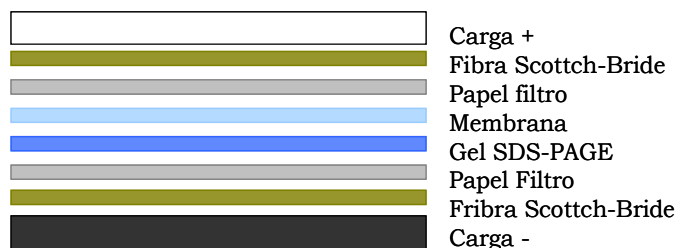
Pasos y soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie:

Solución	Cantidad	Tiempo
Solución Stock I	0.2 % Azul de Coomasie 90% Etanol	
Solución Stock II	20% Ácido acético	
Pasos de tinción		
1. Fijación	Etanol 40% Ácido acético glacial 10%	30 min
2. Tinción	Stock I 50% Stock II 50%	20 min
3. Desteñir I	Solución de fijación	30 s
4. Desteñir II	Etanol 20% Ácido acético glacial 10%	Inspección visual

III.B Western Blot

Transferencia

1. Se prepara el tampón de transferencia mezclando 100 mL del buffer 10x + 100 mL de metanol y se afora a 1 L.
2. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol, mientras que los demás componentes del sándwich se deben humedecer previamente con tampón de transferencia.
3. El sándwich se ensambla de la siguiente forma:



Si al colocar la membrana sobre el gel SDS-PAGE se forman burbujas, estas deben ser eliminadas haciendo rodar una pipeta pauster sobre la superficie de la membrana.

4. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque del aparato de Western, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.
5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.
6. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se deja secar sobre papel. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 h, 1 h a 37°C o se puede guardar durante algunos días.

Solución	Concentración
TBS	0.05 M Tris-HCl 0.15 M NaCl pH 7.5
TBST	TBS-0.05% Tween-20
Solución bloqueo	5% (w/v) leche descremada en TBST

Determinación de crecimiento por peso seco

1. Secar los papeles filtro Wathman No.1 a 60°C durante 12 h ó 80°C por 2 horas
2. Colocar en un desecador hasta que los papeles se encuentren a temperatura ambiente. Pesar y registrar el peso (peso inicial)
3. Centrifugar alícuota de cultivo a 7000 rpm por 15 min
4. Descartar el sobrenadante y agregar solución salina isotónica (lavado)
5. Centrifugar
6. Filtrar con el papel filtro.
7. Dejar secar los papeles filtro con la muestra a 60°C durante 48 h ó a 80°C por 2 horas
8. Pesar los papeles filtro y registrar el peso (peso final)

- Determinar la biomasa por diferencia de peso

Conjugación intergénica *S. peucetius*

- Diluir 1 mL de cultivo de *S. peucetius* en 9 mL de medio TSB y cultivarlo por 18 h a 30°C en agitación.
- Homogenizar el cultivo anterior y mezclar 2 mL con 18 mL de medio TSB. Cultivar 16 h a 30°C en agitación.
- Diluir 1 mL del cultivo y diluirlo en 9 mL de medio TSB incubar la suspensión 3 h a 30°C en agitación. Recuperar el micelio por centrifugación, lavando con medio TSB. Resuspender el pellet en 2 mL de medio TSB.
- Mezclar en un tubo 100 µL de células donadoras y 100 µL de fragmentos miceliares. Sembrar lamezcla en placas con medio MS siplementado con 10mM de MgCl₂ e incubar a 30°C por 18 h.
- Adicionar 1 mL de ácido nalidíxico y 1 mg de apramicina.
- Mantener las placas a 30°C por 5 días. Contar las exconjugantes.

Revelado anti-GFP

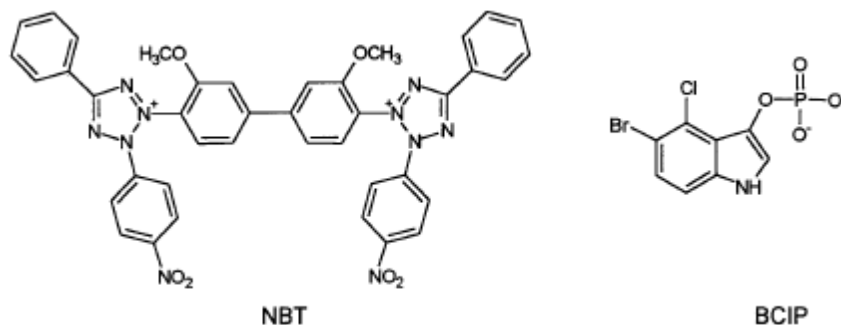
Anticuerpo monoclonal anti-GFP 3E6 (Invitrogen)

- Colocar la membrana en buffer de bloqueo e incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Decantar la solución de bloqueo.
- Lavar dos veces con TBST en agitación constante por 1 min cada uno.
- Preparar el anticuerpo a una dilución 1:1000
- Decante el TBST y adicione la solución del anticuerpo anti-GFP diluido. Incubar 2h a temperatura ambiente bajo agitación suave. Decante la solución de anticuerpo.
- Lavar la membrana 2 veces con TBST con agitación suave durante 1 min.
- Preparar el conjugado del segundo anticuerpo. Anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina.
- Decantar el TBST. Adicionar la solución del anticuerpo secundario e incubar 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- Lavar la membrana tres veces con TBST con agitación suave durante 5.10 min cada uno.
- Continuar con el protocolo, de acuerdo al conjugado utilizado.

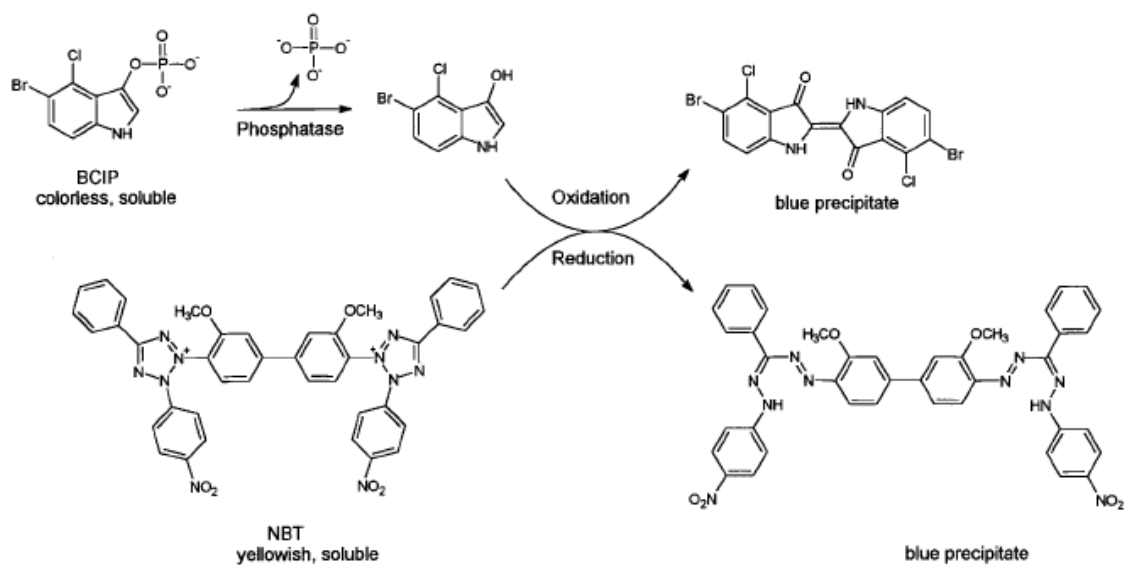
Visualización mediante reacción colorimétrica

Si se utiliza un conjugado acoplado a fosfatasa alcalina, se puede utilizar como sustrato la mezcla comercial con las moléculas NBT/BCIP.

El BCIP es un sustrato para la fosfatasa alcalina que al reaccionar posterior a la desfosforilación produce una coloración azul oscuro-azul índigo como producto de la oxidación. La molécula de NBT sirve como oxidante y también produce un color azul oscuro. De tal manera, que intensifica el color y hace a la reacción más sensible.



El mecanismo de reacción, es el siguiente:



Incubar la membrana con el sustrato y cuando la reacción se haya realizado (verificar por inspección visual) detener la reacción lavando la membrana con agua.