



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**OPTIMIZACIÓN DE LA CONJUGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE  
DOS MUTANTES EN GENES *GLK* Y SU EFECTO EN LA FISIOLÓGÍA DE *Streptomyces  
peucetius* var. *caesius***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Doctora en Ciencias**

PRESENTA:

**Diana Ivonne Rocha Mendoza**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Dr. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad de México. Sep., 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

Dr. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ	PRESIDENTE
Dr. ARMANDO MEJIA ÁLVAREZ	VOCAL
Dra. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA	VOCAL
Dr. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN	VOCAL
Dr. FRANCISCO RUIZ TERÁN	SECRETARIO

Esta tesis fue desarrollada bajo la asesoría del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por los proyectos de PAPIIT IN-201413 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM y CONACYT, México 2013-CB-219686.

Durante la realización de esta tesis fui beneficiada por una beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

# AGRADECIMIENTOS

- ✓ Agradecimiento al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia a los congresos internacionales:
  1. 12th International Meeting on the Genetics of Industrial Microorganisms, GIM. Cancún, México, 23-28 junio, 2013.
  2. 6th Congress of European Microbiologists, FEMS. Maastricht, Holanda, 7-11 junio, 2015.
  
- ✓ A la Bióloga Yolanda Hornelas Orozco, Técnica Académica Titular C del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por su apoyo para la obtención de micrografías realizadas con el microscopio electrónico de barrido.
  
- ✓ Al comité tutorial por el tiempo y los consejos recibidos a lo largo de este trabajo.
  
- ✓ Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por la oportunidad, el apoyo y la asesoría invaluable que me brindó a lo largo de mi estancia en su laboratorio.
  
- ✓ A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por todo el apoyo, asesoría y tiempo dedicado a mi persona y a este trabajo.
  
- ✓ A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por los consejos dedicados a este trabajo.

- ✓ A la Dra. Alba Romero Rodríguez con quien compartí mucho tiempo en el laboratorio y quien fue un gran apoyo durante la realización de este trabajo y que me ayudo a no rendirme. ¡Hicimos un excelente equipo!
- ✓ A todas las personas que conocí durante mi estancia en el laboratorio, de todos aprendí algo. La mejor parte es la amistad que construimos en estos años.

# DEDICATORIAS

Para Silvia, algún día nos volveremos a ver.

Para mi familia, con la que naces y la que encuentras en el camino, con todo mi cariño y agradecimiento por el esfuerzo y el amor de cada uno de ustedes para formarme y guiarme. No podía ser de otra forma, de lo contrario no estaríamos aquí.

Para Israel que es mi amigo y compañero, con quien camino de la mano por este paseo llamado vida, con todo el amor que puedo sentir. De aquí hasta el fin del mundo.

A todos los seres que han marcado mi vida de la forma más positiva y que están en mi mente y corazón.

Gracias

# CONTENIDO

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN .....	2
El PTS y la RCC en <i>Escherichia coli</i> .....	5
El PTS y la RCC en <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
ANTECEDENTES .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	26
OBJETIVO .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
ESTRATEGIA .....	29
METODOLOGÍA .....	31
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	31
Plásmidos .....	32
Determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos (MIC) .....	35
Construcción de los plásmidos para el reemplazo de los genes <i>glk</i> .....	36
Reemplazo de los genes <i>ATPglk</i> y <i>PPglk</i> .....	39
Conjugación intergenérica .....	41
Preparación de las células receptoras.....	41
Preparación de las células donadoras .....	42
Condiciones del pre-inóculo cepa parental y mutantes .....	43
Efecto de la glucosa en el crecimiento .....	45
Determinación de glucosa residual.....	45
Obtención de extracto citosólico.....	45
Determinación de proteína .....	46
Actividad de glucosa-cinasa.....	46
Efecto de la RCC sobre la actividad de amilasa .....	46
Determinación de almidón residual.....	46
Actividad amilolítica .....	47
Uso de diferentes fuentes de carbono .....	47
Determinación de la fuente de carbono residual .....	48
Medición de antraciclinas.....	48
Preparación de muestras para micrografía .....	49
Análisis estadístico .....	50



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
Concentración mínima inhibitoria .....	51
Determinación de la formación de esporas a través de microscopía electrónica .....	53
Construcción de los plásmidos usados en el reemplazo de los genes <i>glk</i> .....	55
Conjugación intergenérica .....	58
Análisis de las mutantes $\Delta glk$ .....	63
Efecto de la glucosa sobre el crecimiento y la producción de antraciclinas en las mutantes $\Delta glk$ .....	64
Actividad específica de glucosa-cinasa.....	71
Efecto de la RCC sobre la actividad de amilasa .....	73
Efecto del reemplazo de los genes ATP- y PP <i>glk</i> sobre el uso de diferentes fuentes de carbono .....	79
Efecto de las mutantes $\Delta glk$ sobre la morfología de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> .....	87
CONCLUSIONES.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
ARTÍCULOS.....	93
.....	93
BIBLIOGRAFÍA .....	96

# RESUMEN

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* es una cepa no esporulante, de relevancia clínica por su capacidad de producir doxorubicina (antraciclina), un importante agente antitumoral usado para combatir diversos tipos de cáncer. Este microorganismo ha sido objeto de estudio con el fin de conocer a fondo su fisiología y las bases bioquímicas y moleculares de la síntesis de antraciclinas. Con este conocimiento se han podido sentar las bases para la manipulación y diseño de estrategias para aumentar la producción de estos compuestos. Como parte de los estudios realizados, se ha observado que la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo tiene una implicación directa en la producción del antitumoral. Este fenómeno está ligado directamente con un proceso de regulación conocido como represión catabólica por carbono (RCC), donde la enzima glucosa-cinasa (Glk), responsable de la fosforilación de la glucosa, juega un papel importante en la regulación. Recientemente se encontró que *Streptomyces peucetius* var. *caesius* tiene dos actividades de glucosa-cinasa (ATP-Glk y PP-Glk), pero se desconoce la importancia de cada una de ellas en la RCC. En este trabajo se establecieron las condiciones necesarias para obtener las mutantes nulas en los genes *glk* en esta cepa no esporulante. Adicionalmente, se evaluó el papel de cada gen *glk* en la fisiología de *S. peucetius* var. *caesius*. Se encontró que la actividad de PP-Glk fue dispensable para esta cepa, ya que en ausencia de esta enzima el microorganismo utilizó la glucosa como única fuente de carbono. Simultáneamente, se vio favorecido el uso de otras fuentes de carbono, en especial el glicerol, para la producción de antraciclinas. Se demostró que esta enzima no participa en el proceso de RCC. Por el contrario, al analizar a la mutante  $\Delta$ ATP*glk*, se observó una seria afectación en el uso de glucosa como única fuente de

carbono. Este resultado sugirió una estrecha relación de esta enzima con el transportador de glucosa. La ausencia de ATP-Glk, estimuló además el uso de otras fuentes de carbono y al parecer reguló su consumo aun en ausencia de glucosa. Finalmente, se vio disminuida la producción de antraciclinas. A pesar de que ATP-Glk y PP-Glk son proteínas de alta actividad enzimática y estrechamente relacionadas, la PP-Glk no suple la actividad enzimática de la ATP-Glk, tampoco su papel en el proceso de regulación en la RCC.

# INTRODUCCIÓN

Una fuente importante de compuestos bioactivos de alto valor comercial se encuentra en las Actinobacterias. El género *Streptomyces* es el más grande correspondiente a este filo, a partir del cual se han descrito más de 576 especies (Labeda, 2011). Así como el resto de las Actinobacterias, los *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas cuyos genomas tiene alto contenido de guanina-citosina (GC), bacterias filamentosas con un ciclo de vida complejo (Barka et al., 2016). Los *Streptomyces* son organismos reconocidos, de gran relevancia en el área de la biotecnología, medicina y agricultura por su capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios como anticancerígenos, antihelmínticos, antifúngicos, y producen dos terceras partes de los antibióticos usados en el sector clínico, químicos que normalmente producen las bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Muchas de estas especies están relacionadas con el proceso de descomposición de la materia orgánica del suelo, debido a su alta producción de enzimas hidrolíticas exógenas como amilasas, xilanasas, proteasas y lipasas (Chater et al., 2010). La producción de metabolitos secundarios normalmente ocurre durante etapas tardías de crecimiento. Las rutas están codificadas en el genoma, pero el inicio en la producción puede verse influenciado por cambios en el ambiente como, por ejemplo, el agotamiento de los nutrientes, la adición de un inductor o el cese en el crecimiento. Estos eventos prenden cascadas de señalización que resultan en cambios químicos (síntesis de metabolitos) y en la diferenciación morfológica (McCormick y Flärdh, 2011). La síntesis de metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con el desarrollo morfológico, el cambio del crecimiento vegetativo hacia la formación de estructuras aéreas reproductivas que

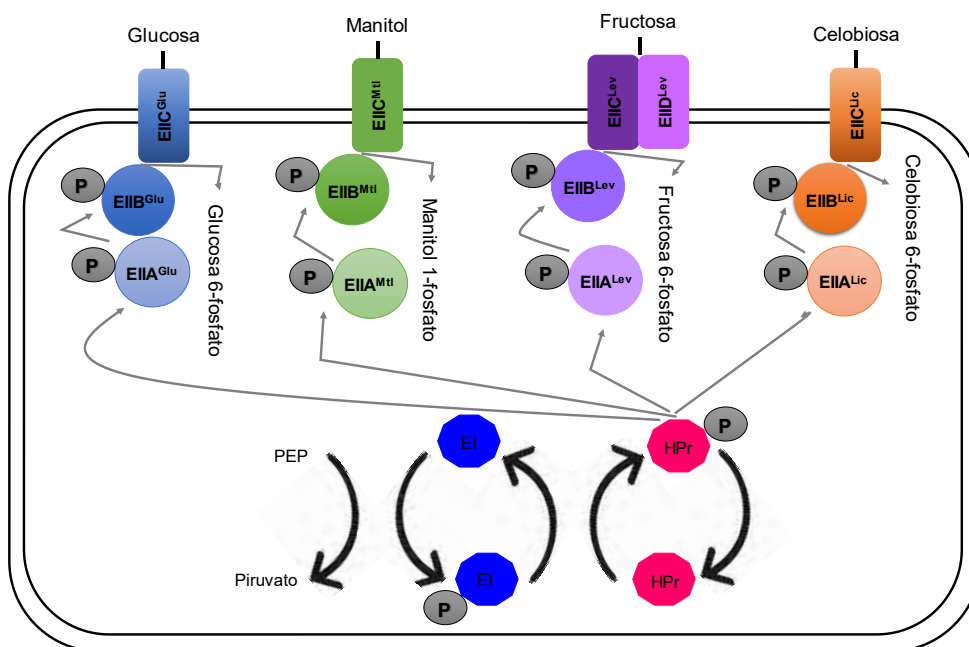
coincide con la producción de los metabolitos secundarios (McCormick y Flärdh, 2011). La producción de antibióticos también es regulada por nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono (Romero-Rodríguez et al., 2018). Respecto a los nutrientes, la fuente de carbono ha sido un tema de investigación de muchos grupos de trabajo. Con el objetivo de entender el mecanismo de represión catabólica por carbono (RCC), el cual controla la expresión de genes involucrados en el uso de fuentes de carbono alternas, y también tiene efecto sobre la síntesis de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica (Angell et al., 1994, Kwakman y Postma, 1994; van Wezel et al., 2007; Sánchez et al., 2010; Coze et al., 2013). Sin embargo, la expresión de los genes de metabolismo secundario no es afectada de igual forma por la misma fuente de carbono (Romero-Rodríguez et al., 2015).

Se conoce como RCC al proceso que permite a las bacterias usar sustratos selectivamente de una mezcla de diferentes fuentes de carbono. La presencia de una fuente de carbono preferente previene la expresión y, en algunos casos también la actividad, de sistemas catabólicos necesarios para el uso de fuentes de carbono secundarias (Görke y Stulke, 2008). Comúnmente, es la glucosa la molécula efectora en la RCC, pero también existen otras fuentes de carbono que pueden ser metabolizadas fácilmente y que pueden ejercer un efecto de represión como la fructosa, manosa, glicerol o N-acetilglucosamina (Kwakman y Postma, 1994).

El mecanismo de transporte de carbohidratos y sistema de fosforilación es conocido como sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) y está presente en todas las bacterias (Galinier y Deutscher, 2017). Usualmente está compuesto por tres proteínas principales: enzima I (EI), HPr y enzima II (EII), las cuales

son fosforiladas en un residuo de histidina o cisteína. En muchas bacterias la HPr puede ser fosforilada en un residuo de serina. El sistema PTS no sólo funciona como medio de transporte de carbohidratos, también regula numerosos procesos celulares ya sea fosforilando proteínas blanco o interaccionando con proteínas como transportadores, enzimas catabólicas o reguladores transcripcionales, de manera dependiente al estado de fosforilación (Galiniér y Deutscher, 2017).

El sistema PTS se basa principalmente en una cascada de fosforilación enzimática donde el principal sustrato es el fosfoenolpiruvato (PEP) y el producto final es un azúcar fosforilado (Figura 1).



**Figura 1.** Sistema PTS como principal medio de transporte de carbohidratos en bacterias Gram-positivas y enterobacterias. Imagen tomada y modificada de Galiniér y Deutscher, 2017.

El Sistema PTS lleva a cabo el transporte de glucosa, manitol, fructosa y celobiosa en *Bacillus subtilis*. El primer paso de la cadena de fosforilación consiste en la autofosforilación de la enzima EI con PEP. Posteriormente, se trasfiere el grupo fosfato hacia la enzima HPr, la cual usualmente transfiere el grupo fosfato a todas las enzimas EIIA presentes en el microorganismo. Estas enzimas transfieren el grupo fosfato a su respectiva contraparte EIIB. De manera irreversible EIIB transfiere el fosfato a la molécula de azúcar unida en la región transmembranal conocida como EIIC. Posteriormente, el azúcar fosforilado es liberado en el interior de la célula (Figura 1).

No todos los carbohidratos son transportados a través de PTS, moléculas como el glicerol, gluconato y D-arabinosa entre otros, son transportados por permeasas, transportadores tipo ABC o facilitadores (Titgemeyer et al., 2007).

Respecto a procesos de regulación, el PTS es el mecanismo de regulación de la RCC. En el caso de Firmicutes, la enzima HPr es fosforilada en el residuo de His-15 a partir de PEP, pero también puede ser fosforilada en Ser-46 a partir de ATP y por acción de la enzima HPr cinasa/fosfotasa (Hpr-KP), una enzima bifuncional. La fosforilación a partir de ATP no está involucrada en el proceso de transporte de carbohidratos y sólo tiene funciones reguladoras, particularmente en el metabolismo de carbono. Enterobacterias como *Escherichia coli* carecen de la enzima HPr-KP (Saier, 2016).

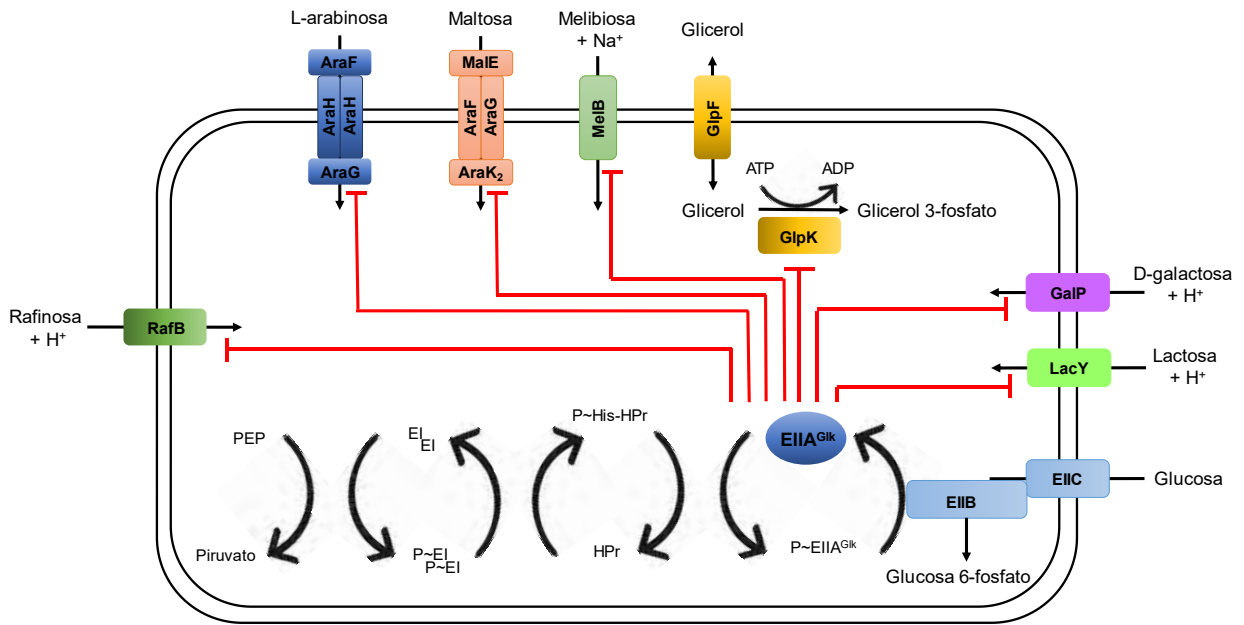
## El PTS y la RCC en *Escherichia coli*

En *E. coli* y otras enterobacterias, la proteína reguladora en la RCC es la EIIA<sup>Glu</sup>. Cuando se encuentra disponible un azúcar que es fácilmente metabolizable, como la glucosa, la enzima EIIA<sup>Glu</sup> se encuentra predominantemente en su forma no fosforilada

y se une a las permeasas que no pertenecen a PTS, como aquéllas del transporte de lactosa, maltosa, melibiosa, arabinosa, rafinosa y galactosa, inhibiendo el transporte de estos azúcares y en algunos casos se previene la formación del inductor (Figura 2). La proteína EIIA<sup>Glu</sup> no fosforilada se une a la enzima glicerol-cinasa previniendo la formación de glicerol 3-fosfato, el inductor del operón del catabolismo de glicerol. La concentración de cAMP es baja, la proteína activadora de catabolismo (CAP, también conocida como CRP), requiere interaccionar con cAMP para poder unirse al DNA, no puede reconocer las regiones blanco en el DNA y, por tanto, la expresión de operones sensibles de RCC no se induce, aún en presencia de la molécula inductora. La RCC se lleva a cabo debido a que no hay activación transcripcional de los operones necesarios para el catabolismo de otras fuentes de carbono (Somavanshi et al, 2016).

Por el contrario, cuando se encuentra presente una fuente de carbono que no es metabolizada rápidamente, la enzima EIIA<sup>Glu</sup> se encuentra predominantemente fosforilada, promueve la síntesis de cAMP. El complejo cAMP-CAP se une en regiones promotoras específicas interaccionando con la RNA polimerasa y promoviendo la transcripción de operones requeridos para metabolizar aquellas fuentes de carbono que no son metabolizadas rápidamente por la célula y cuya molécula inductora se encuentra presente. La proteína CAP activa la transcripción de más de 100 promotores, su regulación global responde a los niveles de cAMP. El nivel intracelular de cAMP es equilibrado por la enzima adenilato ciclasa, cuya actividad depende del estado de fosforilación de EIIA<sup>Glu</sup> (P-EIIA<sup>Glu</sup>) (Deutscher et al., 2014).



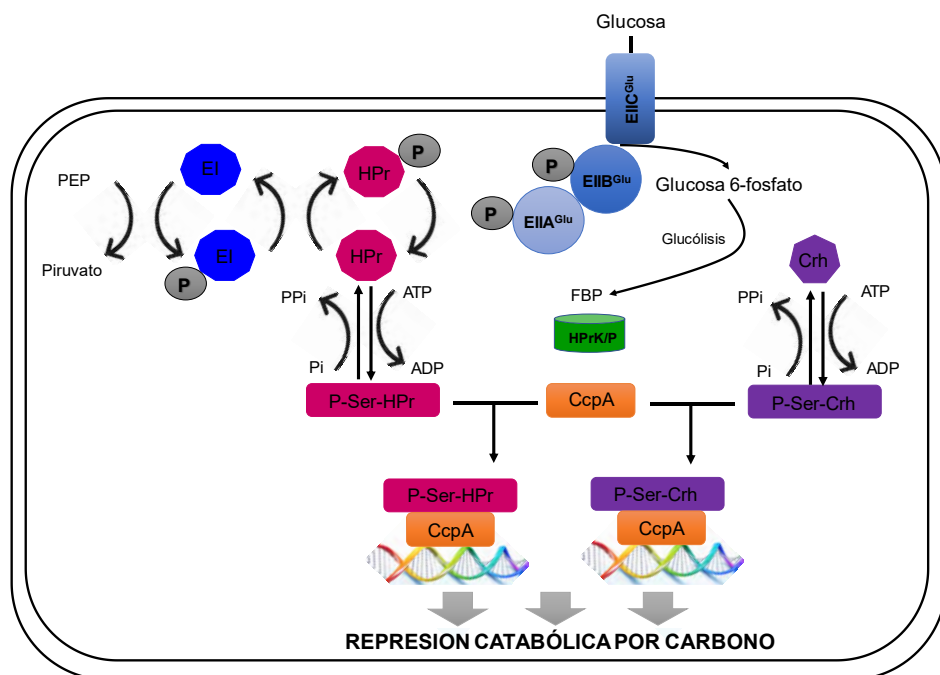


**Figura 2.** Mecanismo de RCC en *E. coli*. Imagen tomada y modificada de Deutscher et al., 2014.

Datos recientes acerca de *Vibrionaceae*, al igual que *E. coli*, pertenece a las  $\gamma$ -proteobacterias sugieren un papel diferente de CAP y el cAMP en la RCC. El complejo de cAMP-CAP en *Vibrionaceae* no solo tiene su rol en el metabolismo, también regula procesos como la competencia por la colonización de animales hospederos. Sin embargo, la regulación principal de la concentración intracelular de cAMP difiere el modelo canónico descrito. Los cambios en la concentración de cAMP parecen no verse afectados por regulación de  $EII^{Glu}$  sobre la enzima adenilato-ciclasa, sino por procesos de exportación y degradación. Además, CAP requiere de cAMP para su actividad, pero también es regulada por glucosa por un mecanismo aún desconocido pero independiente de cAMP. Estos resultados inesperados sugieren un rol diferente de CAP y de cAMP al ya descrito en el modelo de RCC (Colton y Stabb, 2016).

## El PTS y la RCC en *Bacillus subtilis*

El transporte de una fuente de carbono rápidamente metabolizable como la glucosa o la fructosa lleva a un incremento intracelular de la concentración de fructosa 1,6-bifostato (FBP), este metabolito estimula la actividad de la enzima Hpr-KP e induce la fosforilación dependiente de ATP de la enzima HPr y Crh en el residuo Ser-46. Las formas fosforiladas de P-Ser46-HPr y P-Ser46-Crh interactúan con la proteína CcpA, y el complejo P-Ser46-HPr-CcpA o P-Ser46-Crh-CcpA se unen en regiones de DNA conocidas como *cres* para regular la expresión de genes catabólicos (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismo de RCC en *B. subtilis*. Imagen tomada y modificada de Galinier y Deutscher, 2017.

Moléculas como FBP y glucosa 6-fosfato promueven la interacción del complejo P-Ser46-HPr-CcpA en las regiones *crs*. La proteína Crh está presente sólo en algunos *Bacillus* y *Clostridium* (Galiniér y Deutscher, 2017).

Además del sistema PTS como principal mecanismo de transporte y fosforilación de carbohidratos, cuentan con otro sistema de fosforilación para la glucosa, mediante la actividad de la glucosa-cinasa, tal como ha sido reportado para *B. subtilis*, *Staphylococcus xylosus* (Wagner et al., 1995), *Bacillus megaterium* (Späth et al., 1997) y *Corynebacterium glutamicum* (Park et al., 2000). En mutantes  $\Delta glk$  de estas bacterias Gram-positivas se ha observado que la ausencia de Glk provoca una disminución en la sensibilidad hacia la RCC. Sin embargo, el efecto observado solo es parcial, y hasta el momento no se ha descrito cómo es el mecanismo mediante el cual esta enzima afecta dicho sistema de regulación. Se ha descrito que algunas enzimas glucosa-cinasas juegan un papel dual dentro del organismo que las contienen, es decir, además de su actividad catalítica pueden llegar a desempeñar alguna función de regulación en la RCC.

Para el filo más grande de las bacterias, las Actinobacterias, se ha encontrado que el transporte de carbohidratos puede ser muy variado y que el sistema PTS es diferente al descrito para otras bacterias Gram-positivas. Por ejemplo, en *C. glutamicum* la glucosa es transportada y fosforilada por el sistema PTS, pero también presenta dos actividades enzimáticas de Glk capaces de fosforilar a la glucosa entrante, una de ellas dependiente de ATP (Park et al., 2000), y otra dependiente de polifosfato-ATP (Lindner et al., 2010).

En *Mycobacterium tuberculosis*, se realizó el análisis de la actividad dual de las enzimas glucosa-cinasas (Marrero et al., 2013). El agente causante de la tuberculosis

presenta una adaptación metabólica al ambiente nutricional de su hospedero. La producción de biomasa y energía es principalmente por el consumo preferencial de lípidos. Sin embargo, el transporte de carbohidratos parece ser importante para mantener su patogenicidad. Los autores comenzaron la evaluación del metabolismo de glucosa y su posible implicación en la patogenicidad de esta bacteria. *M. tuberculosis* tiene una enzima Glk, que presenta la capacidad de usar diferentes donadores del grupo fosfato, preferencialmente el polifosfato inorgánico (PP), además de una alta afinidad por glucosa (Hsieh et al., 1996). Al analizar la mutante nula de este gen, observaron que disminuía su crecimiento en glucosa, pero aun así podía utilizar el carbohidrato. Esta observación los condujo al hallazgo de una segunda actividad de glucosa-cinasa (ATP-Glk). Ambas enzimas se encuentran funcionales para el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, la capacidad de utilizar la glucosa recae principalmente en aquella dependiente de PP. La mutante nula en ambos genes mostró incapacidad para sobrevivir durante la infección en pulmón de ratones. Estos resultados sugieren que *M. tuberculosis* depende de la fosforilación de la glucosa dada por la Glk dependiente de polifosfato para mantener su patogenicidad (Marrero et al., 2013).

En *Streptomyces*, el género más grande perteneciente al filo de las Actinobacterias difiere mucho del modelo PTS y RCC descrito para *B. subtilis*. Puede usar diversas fuentes de carbono (Hodgson, 1982). Sin embargo, se tiene poco conocimiento acerca del transporte y metabolismo de todas ellas (Bertram et al., 2004). El sistema PTS no es el principal mecanismo de transporte de carbohidratos ni de regulación de RCC. Se realizaron diversos estudios en busca de las actividades de las enzimas que conforman el sistema PTS en *S. aureofaciens* (Novotná y Hostalek, 1985), *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. griseofuscus*, para las cuales se encontró que el sistema PTS sólo funciona para el

transporte y fosforilación de fructosa y de N-acetilglucosamina (GlcNAc). El sistema PTS-fructosa está conformado por las enzimas EI (*psfI*), HPr (*psfH*) y EII (*crr*) y carece de la proteína HPr-KP, enzima clave en la regulación en *B. subtilis* (Titgemeyer et al., 1995; Butler et al., 1999; Parche et al., 1999; Wang et al., 2002).

*Streptomyces* no tiene el ortólogo de la proteína CcpA, también elemento clave de la regulación en otras bacterias Gram-positivas. Pero cuenta con la proteína Crp, ortóloga en enterobacterias, la cual no participa en el proceso de regulación de la RCC (Piette et al., 2005). El sistema PTS-fructosa es inducible en *S. coelicolor*, *S. lividans* y constitutivo en *S. griseofuscus* (Titgemeyer et al., 1995). La enzima HPr no tiene un efecto global en la RCC, mutantes  $\Delta ptsH$  no tienen cambio en la represión que la glucosa ejerce sobre la actividad de agarasa y galactosa-cinasa en *S. lividans* (Butler et al., 1999), pero sí se ve afectada la represión que ejerce la fructosa sobre la enzima glicerol-cinasa (Nothaft et al., 2003). En *Streptomyces* el sistema PTS está limitado al transporte y no tiene un rol general en el proceso de RCC.

En la mayoría de las cepas analizadas de *Streptomyces*, es la glucosa el carbohidrato preferencial. La glucosa puede reprimir la expresión de las enzimas necesarias para el uso fuentes de carbono como fructosa, galactosa, glicerol y arabinosa, y carbohidratos complejos como el agar y almidón (Hodgson, 1982). En la siguiente tabla se ejemplifica algunas de las enzimas necesarias para el uso de alguna fuente de carbono alterna que has sido reportadas como sujetas de represión por glucosa principalmente.

**Tabla 1.** Enzimas sujetas de regulación por RCC en *Streptomyces*.

Cepa	Enzima regulada por RCC	Fuente represora	Referencia
<i>Streptomyces halstedii</i> JM8	Endo-xilanasas	Glucosa	Rodríguez et al., 2005
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Glicerol-cinasa	Glucosa	Kwakman y Postma 1994
<i>Streptomyces lividans</i>	Quitinasa	Glucosa, N-acetilglucosamina, glicerol, arabinosa, fructosa	Ni y Westpheling, 1997 Saito et al., 1998 Miyashita et al., 2000
<i>Streptomyces violaceus</i>	Permeasa de galactosa	Glucosa	Sánchez y Hardisson 1980
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Xilosa isomerasa ( <i>xyIA</i> ) Xilulosa cinasa ( <i>xyIB</i> )	Glucosa	Wong et al., 1991
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Amilasa	Glucosa	Violle et al., 1988
<i>Streptomyces limosus</i>	Amilasa	Manitol	Long et al., 1987
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Amilasa	Glucosa y glicerol	Flores et al., 1993

En *Streptomyces* la glucosa no es transportada vía PTS sino a través de un simportador perteneciente a la familia MFS (van Wezel et al., 2005), y posteriormente es fosforilada por la acción de una glucosa-cinasa (Glk), liberando glucosa 6-fosfato en el interior de la célula. El donador del grupo fosfato puede ser el ADP, ATP o polifosfato inorgánico (PP) (Romero-Rodríguez et al., 2015). La clasificación hecha por Kawai et al., 2005, arrojó que las proteínas Glk de bacterias Gram-positivas forman un grupo específico, con base en su estructura primaria y al tamaño de la proteína, principalmente. La Glk de *S. coelicolor* se encuentra estrechamente relacionada con otras Glks como la de *B. subtilis* (Rosana-Ani et al., 1999), *B. megaterium* (Späth et al., 1997) y *S. xylosus* (Wagner et al., 1995). Para estas proteínas en particular, se ha propuesto que

además de su actividad catalítica, también participan en la regulación del proceso de RCC.

Con respecto a la RCC, el modelo más estudiado ha sido el de *S. coelicolor*. Se obtuvieron mutantes denominadas DogR de esta cepa que fueron seleccionadas por su resistencia al análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (Hodgson 1982). El análisis de estas mutantes reveló que no tenían actividad de Glk (Seno y Chater, 1983) y que eran insensibles a la RCC. El fenotipo de las mutantes DogR fue revertido al ser complementadas con un fragmento de su propio DNA de 2.9 kb, cuya secuencia incluía al gen *glkA* (Ikeda et al., 1984; Angell et al., 1992). Las mismas mutantes fueron complementadas con el gen *glk* de *Zymomonas mobilis* (bacteria Gram-negativa), obteniéndose la reversión parcial del fenotipo. Las clonas complementadas podían utilizar la glucosa como única fuente de carbono, tenían actividad de Glk, pero prevalecía la insensibilidad a la RCC, lo cual demostró que en *S. coelicolor*, el efecto que la GlkA tiene sobre la RCC no es debido solo a su actividad sino a la presencia de la proteína (Angell et al., 1994). Posteriormente, se realizó un estudio con la mutante DogR de *S. coelicolor* donde se evaluó la RCC midiendo la actividad de glicerol-cinasa y de agarasa. En la cepa parental las enzimas glicerol-cinasa y agarasa son reprimidas en presencia de glucosa, galactosa y arabinosa. En la mutante DogR, la glicerol-cinasa es insensible de represión en presencia de glucosa, galactosa o arabinosa, lo mismo sucedió con la actividad de agarasa. Se concluyó que la GlkA tiene un efecto global en el proceso de RCC, ya que su ausencia afecta a otras fuentes de carbono que no son metabolizadas a través de la actividad enzimática de GlkA y que normalmente son represoras como la glucosa (Kwakman y Postma 1994).

La GlkA pertenece a una familia de proteínas reguladoras ROK (Repressor, Open reading frame, Kinases), familia a la cual pertenecen reguladores transcripcionales que tienen el sitio clásico de unión a DNA (hélice-vuelta-hélice), y cinasas que han sido reportadas por participar en procesos de regulación. Sin embargo, la GlkA al igual que otras cinasas de esta familia carecen del sitio de unión a DNA, así que no pueden ejercer su papel regulatorio uniéndose directamente al DNA (Titgemeyer et al., 1994). Se ha especulado que la forma en la que GlkA actúa como proteína de regulación es estableciendo uniones con otras proteínas efectoras. Mediante metodología de biosensores se identificó una interacción con una proteína citosólica. Sin embargo, no se ha podido identificar dicha proteína buscada por ensayos de pull-down, inmunoprecipitación y sistema de doble híbrido (Mahr et al., 2000). El trabajo de van Wezel et al., (2007) y colaboradores demostró la interacción de GlkA con el transportador de glucosa GlcP ubicado en la membrana. Sin embargo, dicha interacción no explica como la GlkA puede modificar la expresión de otros genes.

Los hallazgos de Kwakman y Postma, (1994), mostraron que la sobreexpresión de GlkA provocaba un fenotipo muy parecido a la mutante DogR, los autores sugieren que quizá la GlkA es sujeta de alguna modificación postraduccional para ejercer su papel regulador. Así, cuando la célula tiene alrededor de 10 veces más de la misma enzima, compete con la proteína que ya ha sido modificada y por ello se comporta como la cepa mutante. Mediante análisis de western-blot se detectó una señal cuyo peso corresponde al monómero de Glk, pero también a proteínas cuyo tamaño es inferior al esperado para esta molécula, lo que sugiere una proteólisis como posible modificación postraduccional (van Wezel et al., 2007).



Estudios recientes de mutantes  $\Delta glkA$  de *S. coelicolor* demostraron que la RCC tiene dos vertientes, una de ellas dependiente de GlkA y otra de glucosa. Estudios de transcriptoma y proteoma demostraron que el mayor cambio observado se obtiene por efecto de la glucosa al comparar con la ausencia de *glkA* (Gubbens et al., 2012; Romero-Rodríguez et al., 2016). Del estudio de proteoma se observó que la glucosa estimula la glucólisis y la vía de pentosas fosfato y que dicha señal es mediada por el transportador GlcP (Gubbens et al., 2012). Al mismo tiempo, se estimula de forma negativa a las enzimas de metabolismo y transporte de aminoácidos. De forma sorprendente, se observó una activación importante del sistema de transporte de xilosa en presencia de glucosa y de forma independiente con GlkA, así también el regulador Rok7B7, activador de la biosíntesis de actinorrodina (Świątek et al., 2013). La gluconeogénesis es afectada directamente por la GlkA, y como se esperaba, el proceso de exclusión del inductor de diferentes carbohidratos y aminoácidos es un proceso dependiente de GlkA (Gubbens et al., 2012).

El estudio de transcriptoma de la  $\Delta glkA$  de *S. coelicolor* demostró que alrededor de 500 genes modificaron su expresión únicamente debido a la presencia de glucosa, y contrario a lo que se ha creído durante mucho tiempo, la ausencia de GlkA sólo modificó la expresión de 43 genes (Romero-Rodríguez et al., 2016). Concordando con el estudio de proteoma, la glucólisis y la vía de pentosas fosfato se afectaron de forma positiva por la presencia de glucosa al mismo tiempo que fue reprimida la gluconeogénesis. Se reprimió la expresión de genes necesarios para el transporte y uso de otras fuentes de carbono. Dentro de los genes que modificaron su expresión por la ausencia de *glkA* se encuentran proteínas de unión a DNA, lo que sugiere que el efecto regulador que la GlkA tiene en el proceso de RCC sea debido a una acción en conjunto de la GlkA con factores

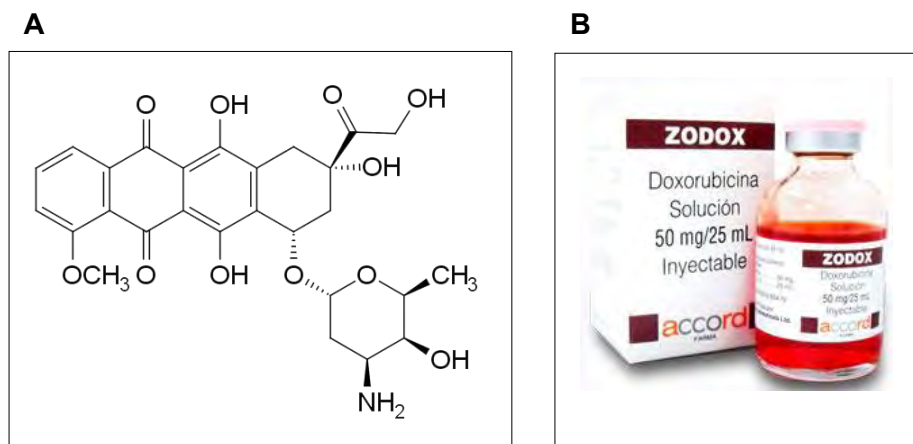
transcripcionales (Romero-Rodríguez et al., 2016). Estos estudios demuestran cuan complejo es el proceso de RCC en *Streptomyces* y abren la posibilidad de estudiar dicho proceso desde el enfoque de los reguladores transcripcionales y su posible correlación con la proteína Glk.

# ANTECEDENTES

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* es una mutante no caracterizada cuya selección se hizo con base en su capacidad de producir doxorubicina. Dicha mutante fue generada a partir de *Streptomyces peucetius* (Arcamone et al., 1969). Esta cepa produce una familia de policétidos con actividad antibiótica conocida como antraciclinas. Entre estas, la daunomicina, pero sobre todo la doxorubicina, es de relevancia clínica debido a su actividad antitumoral. La doxorubicina ha sido reconocida como uno de los más potentes agentes antitumorales por la FDA, y es usada para combatir diversos tipos de cáncer como el cervical, endometrial, pancreático y de próstata, entre otros (Minotti et al., 2004). Se ha reportado que la forma en la que actúan como agentes antitumorales es por el daño que generan al DNA, inhibiendo a la DNA topoisomerasa II, a la generación de radicales libres, la unión al DNA, la alquilación y el intercalamiento (Minotti et al., 2004). Se ha reportado que un gran número de cepas producen daunomicina, pero únicamente *S. peucetius* var. *caesius* produce doxorubicina (Niraula et al., 2010). La doxorubicina contiene en su estructura una aglicona y un residuo de azúcar. La aglicona está compuesta por un anillo de tetraciclina con grupos quinina-hidroquinona, un sustituyente metoxilo. El azúcar (también conocido como daunosamina) está unido a uno de los anillos mediante un enlace glucosídico (Tacar et al., 2013).

El clúster de genes que involucra la síntesis de doxorubicina y daunomicina (DXR-DNR) es uno de los más estudiados debido al potencial de su aplicación en el sector clínico. El clúster DXR-DNR codificado en *S. peucetius* 29050 fue descrito en 1999

(Lomovskaya et al., 1999), tiene un tamaño aproximado de 40 kb, está formado de 37 marcos de lectura abiertos. Para esta cepa, la ruta de biosíntesis consiste en tres pasos: (a) la formación de la aglicona ( $\epsilon$ -rodomicinona) formada a partir de una molécula de propionil-coenzima A y nueve de malonil-coenzima A, (b) la formación del residuo de azúcar ( timidina difosfato (TDP)-L-daunosamina) cuya síntesis comienza a partir de la glucosa 1-fosfato, y (c) el proceso de glicosilación seguida de modificaciones de la estructura (metilación, descarboxilación e hidroxilación) del residuo de aglicona (Malla et al., 2010).



**Figura 4.** (A) Estructura química de la doxorubicina y (B) Un ejemplo de marca comercial del fármaco.

En el grupo de investigación del Dr. Sergio Sánchez Esquivel, se ha trabajado durante mucho tiempo con la cepa de *S. peucetius* var. *caesius* para tratar de comprender el proceso de RCC, y su relación con la síntesis de antraciclinas y el uso de diferentes fuentes de carbono.

En 1996, Segura y colaboradores reportaron que en *S. peucetius* var. *caesius* el glutamato, la arabinosa, así como la glucosa son fuentes de carbono que tienen un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas. En el caso de las actividades enzimáticas que se han medido para evaluar la RCC en *S. peucetius* var. *caesius*, sólo se reportado la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Sin embargo, la lactosa no es un azúcar que *Streptomyces* encuentre de manera natural en su ambiente (Segura et al., 1996).

Se aislaron mutantes DogR resistentes a la 2-desoxiglucosa, las cuales presentaron resistencia a la RCC. Se identificó que la mutante (2-dog<sup>R</sup>-21) presentó consumo únicamente del 30% de la glucosa total que consume la cepa original, que la actividad del transportador de glucosa se redujo al 50%, se observó también una disminución en la actividad de ATP-Glk en 85%. De este trabajo se concluyó que el efecto negativo observado sobre la síntesis de antraciclinas podría estar estrechamente relacionado con el transporte de la glucosa y la fosforilación de esta molécula (Escalante et al., 1999). La actividad de Glk se restableció en su totalidad o incluso con valores superiores al complementar a la mutante DogR con el gen *glkA* y con el gen *sco2127* ubicado río arriba de *glkA* en *S. coelicolor*, cuya función sigue siendo desconocida (Guzmán et al., 2005a; Guzmán et al., 2005b). El transporte de glucosa solamente se restableció en su totalidad al transformar con el gen *sco2127* y la RCC se restableció tanto por *glkA* como por *sco2127*. Es decir, se observó que la RCC no recae únicamente en la GlkA. Partiendo de esta información se estudió la ATP-Glk y al transportador de glucosa (GlcP) (Romero et al., 2015).

En *S. coelicolor*, se demostró que aun cuando tiene dos genes codificantes para glucosa permeasa del tipo H<sup>+</sup>/simportador y pertenecientes a la familia MFS (Major

Facilitator Superfamily) (SCO5578, *glcP1* y SCO7153, *glcP2*), únicamente se encuentra activo GlcP1 (van Wezel et al., 2005). En *S. peucetius* var. *caesius* se reportó el ortólogo a *glcP1*, denominado *sp7066*, que presenta el 85% de identidad con *glcP1* de *S. coelicolor*, y que mediante análisis *in silico* se identificó como único gen codificante de glucosa permeasa (Romero et al., 2015). De igual forma, en cepas como *S. avermitillis* (Ikeda et al., 2003), *S. lividans* (van Wezel et al., 2005) y *S. clavuligerus* (Pérez-Redondo et al., 2010) se ha identificado sólo un gen codificante para permeasa de glucosa. Se demostró que *sp7066* se expresa en presencia de glucosa y de su análogo no metabolizable, 2-desoxiglucosa, y que no es inducido en presencia de otros carbohidratos como arabinosa, fructosa y N-acetilglucosamina. Lo que sugiere que la expresión de GlcP sea un proceso estrechamente relacionado con la entrada y fosforilación de la glucosa, y con la actividad enzimática de Glk.

Respecto a la actividad enzimática de la ATP-Glk, se hizo la caracterización bioquímica de la enzima de *S. peucetius* var. *caesius* (ATP-Glk<sup>Spvc</sup>) y se comparó con la enzima de *S. coelicolor* (ATP-Glk<sup>Sc</sup>) (Imriskova et al. 2001; Mahr et al. 2000). Ambas enzimas pertenecen a la familia de proteínas ROK, cuya identidad es del 98%, son enzimas citosólicas que de forma nativa se encuentran formando homotetrámeros. Durante la purificación de la ATP-Glk<sup>Spvc</sup> se identificó que se disocia fácilmente, pero en presencia de glucosa 100 mM el homotetrámero es más estable. Del análisis bioquímico se pudo identificar que el pH óptimo y el pI son muy parecidos, pero presentan un cambio significativo en la temperatura óptima, de 33 °C y 42 °C para ATP-Glk<sup>Sc</sup> y ATP-Glk<sup>Spvc</sup>, respectivamente. Son enzimas constitutivas cuya actividad enzimática es modulada por la fuente de carbono que se encuentre presente (van Wezel et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente la ATP-Glk<sup>sc</sup> ha sido estudiada por varios grupos de investigación y se ha llegado al conocimiento de que esta enzima está directamente involucrada en el proceso de RCC. En el caso de *S. peucetius* var. *caesius*, los resultados obtenidos sugieren que además de la ATP-Glk, hay otros factores (quizá proteínas) que en conjunto están regulando la RCC.

En 2014 Ruiz-Villafán y colaboradores reportaron que *S. peucetius* var. *caesius*, tiene otra enzima capaz de fosforilar la glucosa y cuya actividad enzimática medida *in vitro* es mayor a la ya conocida ATP-Glk. Dicha enzima usa polifosfato como sustrato preferencial y se nombró como PP-Glk. La PP-Glk se encontró por secuenciación de una misma banda de proteína compartida con la ATP-Glk e identificadas a través de un ensayo de zimografía. Posteriormente, se evaluó la actividad de Glk dependiente de PP en el extracto citosólico de *S. peucetius* var. *caesius* crecida en diferentes fuentes de carbono. Se encontró una actividad basal usando glutamato como fuente de carbono en el medio de cultivo. Sin embargo, la actividad de PP-Glk es mayor incluso que la de ATP-Glk, cuando se usa glucosa como fuente de carbono. Se hizo la búsqueda de actividad de PP-Glk en otras cepas de *Streptomyces* y como se puede observar en la (Figura 5), se obtuvo una actividad basal muy baja para cada una de las cepas evaluadas, donde siempre es mayor la actividad de ATP-Glk, incluso en *S. peucetius*, la cepa parental de *S. peucetius* var. *caesius*. Únicamente en *S. peucetius* var. *caesius* se observa lo contrario, la relación de las actividades PP-Glk/ATP-Glk, es mayor a 1 (Ruiz-Villafán et al., 2014).

**Figura 5.** Actividad específica de ATP-Glk y PP-Glk medida en el citosol de diferentes cepas de *Streptomyces* crecidas con glucosa como fuente de carbono. (Sp) *S. peucetius*, (Spvc) *S. peucetius* var. *caesius*, (Sco) *S. coelicolor*, (Sli) *S. lividans*, (Sth) *S. thermocarboxydus*. Datos tomados de Ruiz-Villafán et al., 2014.

El polifosfato (PP) es un polímero lineal compuesto de cientos de residuos de ortofosfatos (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídridos tal como ocurre en la molécula de ATP. El PP se encuentra presente en todas las células vivas que han sido examinadas en busca de dicha molécula (Gray y Jacob, 2016). Las cadenas de PP cumplen varias funciones dentro de la células, como ser una fuente de fosfatos y de energía, son importantes en la respuesta al estrés y virulencia (Jahid et al., 2006; Rao et al., 2009; Kumar et al., 2016). Se ha considerado que el PP es la molécula ancestro del ATP como fuente de energía, y el uso de ATP es más evolucionado respecto al uso de PP (Kornberg et al., 1999; Gray y Jacob, 2016).



La glucosa-cinasa dependiente de polifosfato (PP-Glk) o glucosa fosfotransferasa es responsable de transferir un grupo fosfato terminal del PP (poli[Pi]) hacia la glucosa para generar glucosa 6-fosfato. Debido a que el PP puede ser encontrado de forma abundante en condensados volcánicos y en salidas de vapor en la profundidad del océano, se ha descrito que únicamente aquellos organismos considerados como ancestrales puedan usar el polifosfato de forma preferente sobre el ATP en su metabolismo (Oyserman et al., 2016).

La primera actividad de PP-Glk fue descrita en 1957 para *Mycobacterium phlei* (Szymona et al., 1957). Posteriormente el mismo grupo de investigación realizó una búsqueda de la misma actividad en diferentes organismos, encontrándola en *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia minima* (Phillips et al., 1999), *Propionibacterium shermanii* (Pepin y Wood 1986), *Mycococcus coralloudes* (Gonzales et al. 1990), *Microtholunatus phosphovorius* (Tanaka et al. 2003), y *Arthrobacter* sp. (Mukai et al. 2003). Los resultados obtenidos mostraron que esta actividad se encuentra principalmente, en bacterias filogenéticamente antiguas pertenecientes al filo de Actinobacterias.

Respecto al género de *Streptomyces* hay pocos reportes acerca de la enzima PP-Glk. El primero reporte corresponde a *S. aureofaciens*, cepa productora del antibiótico clortetraciclina (CTC). Se ha reportado que posee dos actividades, una de ATP-Glk y otra de PP-Glk. La ATP-Glk se expresa principalmente durante la fase exponencial de crecimiento. La disminución en la actividad de ATP-Glk, coincide con un aumento en los niveles de actividad de PP-Glk manteniéndose constante durante la fase estacionaria. La actividad de PP-Glk correlaciona con la producción CTC (Hostalek et al. 1976). Los

autores de este estudio sugieren que la actividad de PP-Glk pueda estar estrechamente relacionada con la producción de CTC.

Mediante un estudio de proteoma se encontró en la mutante nula de *ATPglk* de *S. coelicolor* que la proteína SCO5059 (PP-Glk) aumento su expresión alrededor de 16 veces (Gubbens et al. 2012). Sin embargo, aun cuando se haya incrementado la expresión de SCO5059, no implica que ésta sea activa, ya que en trabajos previos donde se evaluaron mutantes de *S. coelicolor* afectadas en el gen *ATPglk*, se buscó alguna actividad enzimática que supliera la misma función sin encontrar a la PP-Glk (Angell et al., 1994). La enzima SCO5059 expresada de forma heteróloga y purificada mediante afinidad al tallo de histidinas, mostró una  $K_m$  de 12 y 14  $\mu\text{M}$  por glucosa y polifosfato (poli(P)6), respectivamente, siendo más activa en pH alcalinos. Se obtuvo también un valor de  $k_{cat}$  de  $0.3 \text{ s}^{-1}$  (pH de 7.7 y 28 °C), características similares obtenidas para la ATP-Glk de *S. griseus*  $k_{cat}$  de  $0.5 \text{ s}^{-1}$  (pH de 8.0 y 30 °C). Estos datos indican que SCO5059 puede trabajar en condiciones donde la glucosa es baja, por ejemplo, cuando los nutrientes se están agotando en el medio de cultivo. El peso de un monómero es de 28 kDa, en este estudio encontraron que presenta un estado de oligomerización tal que se tiene una proteína con un tamaño aproximado a 200 kDa. Es posible que moléculas como la glucosa, ATP o PP estén modificando el estado de oligomerización, la actividad enzimática y la regulación de dicha proteína (Koide et al., 2013). Hasta el momento no se cuenta con la caracterización bioquímica de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*.

Se ha identificado que el gen *PPglk* se encuentra codificado en el genoma de otros *Streptomyces* como *S. avermitilis* (sav3209), *S. griseus* (sgr2471), *S. venezuelae* (sve4723),

*S. lividans* (sli5337) y *S. clavuligerus* (sclav3958), por mencionar algunos. Sin embargo, con la poca información que se cuenta hasta el momento, son pocas las especies para las cuales parece ser relevante la actividad enzimática de PP-Glk *in vivo*. Estrictamente, sólo se tienen dos reportes de *S. aureofaciens* y *S. peucetius* var. *caesius* como cepas con una alta actividad enzimática de PP-Glk. Ambas cepas son sobre-productoras de su metabolito secundario, la clortetraciclina y la doxorubicina, respectivamente.

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* produce una mayor cantidad de antraciclinas comparando con *S. peucetius*, su cepa parental. Aun cuando ambas cepas consumen el total de glucosa añadida al medio de cultivo, aparentemente *S. peucetius* var. *caesius* usa preferencialmente el carbono consumido para la síntesis de antraciclinas, mientras que *S. peucetius* usa el carbono consumido preferencialmente para la síntesis de proteínas (Ruiz-Villafán et al., 2014). Estas observaciones indican que quizá la PP-Glk pudiera estar involucrada en la síntesis de metabolitos secundarios para esta cepa.

# JUSTIFICACIÓN

Se tiene el conocimiento de que la proteína ATP-Glk, en el género *Streptomyces*, juega un papel dual en la fisiología de estos microorganismos. Por una parte, su actividad enzimática es requerida en el metabolismo de glucosa, y por otra, de forma independiente a dicha actividad, tiene una importante participación en la regulación del proceso de RCC, y de forma indirecta sobre la síntesis de metabolitos secundarios y en la diferenciación morfológica (Kwakman y Postman, 1994; Romero-Rodríguez et al., 2016).

Sin embargo, durante el extenso análisis de la ATP-Glk se ha trabajado con mutantes afectadas en el gen que codifica a dicha proteína. No obstante, dichas mutantes pierden la capacidad de usar la glucosa como fuente de carbono, a pesar de tener al menos otro gen (*PPglk*) que pudiera suplir la actividad, lo que no ocurre de forma natural (Hodgson 1982; Seno y Chater, 1983).

La cepa de *S. peucetius* var. *caesius* se seleccionó de un proceso de mutación con N-nitroso-N-metiluretano, por presentar una mayor producción de antraciclinas. Aún se desconoce la serie de mutaciones que contiene esta cepa en particular. Una diferencia encontrada con su cepa parental es la actividad de la PP-Glk. La cepa parental (*S. peucetius*), tiene una actividad basal muy baja de PP-Glk comparada con la actividad encontrada en *S. peucetius* var. *caesius*. Esta característica es compartida con *S. aureofaciens*, ambas cepas sobre productoras de su metabolito secundario (policétidos). Es posible que la actividad de PP-Glk se encuentre estrechamente relacionada con la síntesis de metabolitos secundarios, tal como lo propuso Hostalek et al. (1976), y que

en combinación con la actividad de ATP-Glk contribuya al proceso de regulación de la RCC.

Con estos antecedentes nos hicimos las siguientes preguntas acerca de *S. peucetius* var. *caesius*:

- i. ¿Su actividad de PP-Glk estará directamente relacionada con la síntesis de antraciclinas?
- ii. ¿La proteína PP-Glk estará involucrada en el proceso de regulación de la RCC?
- iii. ¿La actividad de la PP-Glk puede suplir la actividad de ATP-Glk?
- iv. ¿La ATP-Glk y la PP-Glk regulan el uso de fuentes de carbono alternas?
- v. ¿La actividad de PP-Glk es indispensable en la fisiología general de *S. peucetius* var. *caesius*?

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar en *S. peucetius* var. *caesius* el papel que desempeñan las proteínas ATP-Glk y PP-Glk en el metabolismo de glucosa y el uso de otras fuentes de carbono, así como su posible participación en el proceso de regulación de la RCC y sobre la síntesis de antraciclinas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Encontrar las condiciones de cultivo que nos permitan obtener esporas de *S. peucetius* var. *caesius*.

2. Obtener las construcciones que contengan los genes *ATPglk* y *PPglk* que nos permitan llevar a cabo las mutaciones de interés.
3. Encontrar las condiciones ideales de conjugación para *S. peucetius* var. *caesius* y *E. coli* que permita obtener las mutantes de interés.
4. Evaluar el impacto de cada mutante  $\Delta glk$  sobre:
  - a. El uso de glucosa.
  - b. La RCC a través de la actividad de amilasa.
  - c. El uso de otras fuentes de carbono que no son metabolizadas a través de la actividad enzimática de Glk.
  - d. La cantidad de antraciclinas producidas.
  - e. La morfología de *S. peucetius* var. *caesius* a través de microscopía electrónica.

# ESTRATEGIA

1. Se buscó en diferentes medios de cultivo las condiciones necesarias que nos permitieran obtener esporas de *S. peucetius* var. *caesius*.
2. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de diferentes antibióticos hacia *S. peucetius* var. *caesius* para seleccionar el cassette de resistencia que sería usado.
3. Se obtuvieron las construcciones que nos permitirían realizar el reemplazo de cada gen *glk* por un cassette de resistencia a antibiótico.
4. Se buscaron las condiciones óptimas de conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius* usando un plásmido de referencia.
5. Se obtuvieron las mutantes  $\Delta$ ATP*glk* y  $\Delta$ PP*glk* de *S. peucetius* var. *caesius*.
6. Se evaluó en las mutantes  $\Delta$ *glk* el uso de la glucosa como única fuente de carbono, modificando la concentración del carbohidrato en el medio de cultivo y se midió:
  - El crecimiento (peso seco), velocidad específica de crecimiento y pH
  - El consumo de glucosa
  - La actividad enzimática de ATP-Glk y PP-Glk
  - La cantidad de antraciclinas sintetizadas
7. Se evaluó el efecto de las mutantes  $\Delta$ *glk* sobre la RCC a través de la actividad de amilasa:
  - Se midió el consumo de almidón como única fuente de carbono.
  - El consumo de almidón en presencia de glucosa.
  - La actividad específica de amilasa.

- La cantidad de antraciclinas sintetizadas
8. El efecto sobre el uso de otras fuentes de carbono y se midió:
- El crecimiento (peso seco), velocidad específica de crecimiento y pH
  - El consumo de cada fuente de carbono
  - La cantidad de antraciclinas sintetizadas
9. El efecto de las mutantes  $\Delta glk$  sobre la morfología de *S. peucetius* var. *caesius* a través de microscopía electrónica.



# METODOLOGÍA

## Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Todas las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este proyecto se encuentran descritos en la Tabla 1. La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se utilizó como hospedera de las clonaciones en general. La cepa de *E. coli* BW25113 se empleó como hospedera para la recombinación  $\lambda$  Red (Datsenko & Wanner, 2000) y para la propagación del plásmido pIJ790 (Gust et al., 2003). La cepa de *E. coli* ET12567, hospedera del plásmido pUZ8002 y afectada en el sistema de metilación (*dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdS*), se usó como donadora durante la conjugación intergenérica (MacNeil et al., 1992). El plásmido pUZ8002, derivado del plásmido RK2, está afectado en *oriT*, lo que lo hace no auto-transmisible, pero suple la función en *trans* de transferir aquellos plásmidos que contienen *oriT* (Paget et al., 1999). Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.0) líquido o sólido. Cuando fue necesario, este medio se complementó con apramicina (50  $\mu$ g/mL), cloranfenicol (25  $\mu$ g/mL), ampicilina (150  $\mu$ g/mL) y kanamicina (50  $\mu$ g/mL). Las cepas de *E. coli* usadas como células competentes se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta obtener DO<sub>600nm</sub> de 0.4-0.6 (Rocha et al., 2018).

La cepa de *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 fue donada por el Departamento de Agricultura de E.U. (Peoria, IL), “The Agriculture Research Service Culture Collection”. Esta cepa se conservó en medio YMG con 20% de glicerol (v/v) a -70 °C como fue reportado previamente por Imriskova et al., 2005. Los cultivos sumergidos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL bafleados conteniendo 50 mL de medio YMG (0.4%

extracto de levadura, 1% extracto de malta y 0.4% glucosa, pH 7.2) (Ruiz-Villafán et al., 2014) inoculados con 200  $\mu$ L de la cepa conservada en glicerol e incubados a 30 °C en agitación rotatoria de 200 rpm durante 48 h.

Para los estudios de microscopía electrónica y los de conjugación intergenérica, se obtuvo el micelio de *S. peucetius* var. *caesius* del medio SM (1% glucosa, 2% almidón, 0.5% extracto de levadura, 0.5 % caseína digerida, 0.1% CaCO<sub>3</sub> y 2% agar) modificado de Segura et al., 1996.

Para el proceso de conjugación se utilizó el medio líquido 2xYT (1.6% bacto-triptona, 1% extracto de levadura, 0.5% NaCl) y el medio sólido MS (2% manitol, 2% harina de soya y 2% agar) (Kieser et al., 2000) complementado con 20 mM de MgCl<sub>2</sub> (Du et al., 2012).

## Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran enlistados en la Tabla 1. Para estandarizar las condiciones de conjugación entre la cepa de *E. coli* ET12567-pUZ8002 y *S. peucetius* var. *caesius* se utilizó como control positivo el plásmido pIJ8660 (Sun et al., 1999), un derivado del plásmido conjugativo e integrativo pSET152 que contiene el origen de replicación pUC18 y un gen de resistencia a apramicina para mantenerse y ser seleccionado en *E. coli*, un origen de transferencia, *oriT*, que le permite ser movilizado con eficiencia hacia *Streptomyces* con ayuda de un plásmido de ayuda, como pUZ8002. Contiene un promotor *tip Ap* inducible por tioestreptón (Sun et al., 1999).

**Tabla 2.** Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo (Rocha et al., 2018).

Cepas	Descripción	Referencia
<b><i>Streptomyces</i></b>		
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> NRRL B-5337	Cepa parental	NRRL, Peoria IL
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> $\Delta$ ATPglk	Mutante de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> donde el gen ATPglk se reemplazó por un cassette Am <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> $\Delta$ PPglk	Mutante de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> donde el gen PPglk se reemplazó por un cassette Am <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Cepa de clonación	Stratagene, La Jolla, CA
BW25113	Hospedero del sistema de recombinación $\lambda$	Datsenko & Wanner 2000
ET12567	Hospedero no metilante	John Innes Centre, UK
BW-pATP307	Cepa BW25113 que contiene los plásmidos pIJ790 y pATP307, Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
BW-pPP127	Cepa BW25113 que contiene los plásmidos pIJ790 and pPP127, Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
ET-pATP163	Cepa ET12567 que contiene los plásmidos pUZ8002 y pATP163, Km <sup>R</sup> , Am <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
ET-pPP448	Cepa ET12567 que contiene los plásmidos pUZ8002 y pPP448, Km <sup>R</sup> , Am <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

Plásmidos	Descripción	Referencia
pCR2.1 TOPO	Vector de clonaciones generales en <i>E. coli</i> Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> *	Invitrogen
pIJ773	Vector templado que contiene el cassette de reemplazo de apramicina, Ap <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner 2000
pIJ790	Vector que contiene la maquinaria para la recombinación $\lambda$ Red, Cm <sup>R</sup> *	Datsenko & Wanner 2000
pIJ8660	Vector derivado de pSET152, Am <sup>R</sup> *	Bierman et al. 1992
pATP307	Fragmento de 6 kb de DNA donde el gen <i>ATPglk</i> se encuentra codificado en la región central, clonado en el vector pCR2.1 TOPO	Este trabajo
pPP127	Fragmento de 6 kb de DNA donde el gen <i>PPglk</i> se encuentra codificado en la región central, clonado en el vector pCR2.1 TOPO	Este trabajo
pATP163	Vector pATP307 donde el gen <i>ATPglk</i> se reemplazó por el cassette <i>aac(3)IV</i> , Am <sup>R</sup>	Este trabajo
pPP448	Vector pPP127 donde el gen <i>PPglk</i> se reemplazó por el cassette <i>aac(3)IV</i> , Am <sup>R</sup>	Este trabajo

\*Resistencia a apramicina (Am<sup>R</sup>), kanamicina (Km<sup>R</sup>), ampicilina (Ap<sup>R</sup>), cloranfenicol (Cm<sup>R</sup>).

Los plásmidos pATP307 y pPP127, cuya construcción se describe más adelante, se utilizaron para reemplazar los genes *ATPglk* y *PPglk* respectivamente en *S. peucetius* var. *caesius* (Rocha et al., 2018). Se utilizó el plásmido de 3.9 kb pCR2.1-TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pATP307 y pPP127. Las técnicas estándares de manipulación genética utilizadas en *E. coli* son las descritas por Sambrook et al., 2006. La purificación de DNA total de *Streptomyces* se realizó siguiendo el método descrito previamente (Kieser et al., 2000).

## **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos (MIC)**

Se evaluó la sensibilidad de la cepa *S. peucetius* var. *caesius* a los diferentes antibióticos utilizados en este trabajo, se determinó la MIC de cada antibiótico. Primero se evaluó el rango de sensibilidad para cada compuesto sobre micelio homogenizado de *S. peucetius* var. *caesius*. Para ello, el micelio obtenido del crecimiento de 48 h en YMG líquido incubado como ya fue descrito, se cosechó por centrifugación a 12000 x g a 4 °C durante 10 min., se lavó dos veces con un volumen de agua desionizada estéril. Se llevó a un volumen final de 50 mL y el pellet celular se disgregó con un homogeneizador. Se utilizó 500 µL de la suspensión celular para inocular una caja Petri que contenía 30 mL de medio YMG sólido, el micelio se extendió con ayuda de un asa bacteriológica. Se analizaron seis concentraciones diferentes para cada antibiótico colocando 20 µL de cada dilución en sensidiscos de marca Schleicher & Schuell de 6.35 mm de diámetro, se dejaron secar y posteriormente fueron posicionados sobre la caja Petri con medio YMG que ya contenía micelio homogenizado de *S. peucetius* var. *caesius*. Las cajas se

incubaron durante 3 h a 4 °C y posteriormente 48 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo, se realizó la medición de las zonas de inhibición. Los antibióticos se evaluaron utilizando las concentraciones como se describe a continuación: apramicina (Am), [0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 µg/mL], tioestreptón (Th), [0, 0.05, 0.15, 0.3, 0.9, 1.5 µg/mL], higromicina B (Hy), [0, 0.125, 0.5, 1.5, 3, 6 µg/mL], estreptomina (Sm), [0, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/mL], espectinomicina (Sp), [0, 1.5, 3, 6, 9, 12 µg/mL], gentamicina (Gm), [0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 µg/mL], kanamicina (km), [0, 0.125, 0.5, 1, 2, 4 µg/mL] y neomicina (Nm), [0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 µg/mL] (Rocha et al., 2018).

## Construcción de los plásmidos para el reemplazo de los genes *glk*

Debido a que no se contaba con una biblioteca de cósmidos que contuviera el genoma de *S. peucetius* var. *caesius*, se clonaron las regiones que contenían cada uno de los genes *glk* y sus secuencias flanqueantes. Cada región se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) el cual no es replicativo en *Streptomyces*.

El gen ATP*glk* y 2.5 kb río arriba y río abajo, se amplificó por PCR a partir de DNA total de *S. peucetius* var. *caesius*. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir del consenso observado en los alineamientos hechos a partir de las secuencias de diferentes especies de *Streptomyces*, obtenidas de la página [Strepdb.streptomyces.org.uk](http://Strepdb.streptomyces.org.uk). Los oligonucleótidos diseñados fueron ATP-F1 y ATP-R1 (Tabla 2).

**Tabla 3.** Secuencia de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

Propósito	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
Amplificación de <i>ATPglk</i> y sus secuencias flanqueantes (6kb)	ATP-F1	CGATGGCGGAACACACCAGCTCGAGCA	Este trabajo
	ATP-R1	GCCTGGCAGGACTGGTACGCGGAGGTG	Este trabajo
Amplificación de <i>ATPglk</i> (1kb)	GLK1	ACTCTAGAACATATGGGTCTGACCATCGGCGTCGACATCGG	Mahr et al., 2000
	GLK2	GTCGCTCGAGGATCCTCACATGATCGGGTCGGGTTC	Mahr et al., 2000
Amplificación de <i>PPglk</i> y sus secuencias flanqueantes (6kb)	PP-F2	CCGCTCCAGCTCCTCGCCGACGTC	Este trabajo
	PP-R3	ACGTTGAAGCGGAACTCCACCACG	Este trabajo
Amplificación de <i>PPglk</i> (750 pb)	PPGlk-fwd2	CCATGCAGATCTTCGGTGTGGACATCGGTGGATCC	Ruiz-Villafán et al., 2014
	PPGlk-rev2	CATCGCCGCTCCCACGATCCCCGCGTTGTTCTG	Ruiz-Villafán et al., 2014
Reemplazo de <i>ATPglk</i> por <i>aac(3)IV</i>	DATPglkF	GGCCCTAGCGGGGCTCGACCGAAAAGTGGAGGATAACATGATTCCG GGGATCCGTCGACC	Este trabajo
	DATPglkR	GCCAGGTCGGCGGCGCCGACCAGGCCGGCCTGGTGGCCGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC	Este trabajo
Reemplazo de <i>PPglk</i> por <i>aac(3)IV</i>	DPPglkF	ACCGTGGGTCCCATGCAGATCTTCGGCGTGGACATCGGCATTCCG GGGATCCGTCGACC	Este trabajo
	DPPglkR	GCGTGCATCGCCGCTCCCACGATCCCCGCGTTGTTCTGCTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	Este trabajo

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific). La reacción de PCR se realizó en dos etapas: una desnaturalización inicial a 94 °C (5 min), seguida por la primera etapa de 10 ciclos de desnaturalización a 94 °C (20 s), un alineamiento a 76 °C (30 s) y una extensión a 68 °C (7 min). En la segunda etapa se aplicó 20 ciclos con desnaturalización a 94 °C (20 s), un alineamiento a 76 °C (30 s) y una extensión a 68 °C (9:30 min). Se aplicó una extensión final a 68 °C por 10 min. El producto esperado cercano a 6 kb se purificó a partir de gel de agarosa usando el kit de purificación Wizard PCR Clean-Up System (Promega).

Posteriormente, el producto se clonó en el vector pCR2.1-TOPO siguiendo las condiciones descritas por el fabricante. El producto de ligación se utilizó para transformar por electroporación la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De las clonas obtenidas se purificó la construcción mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 2006). Las construcciones purificadas se evaluaron primero mediante digestión con *EcoR1*, y posteriormente mediante PCR.

Para corroborar que la secuencia de 6 kb clonada contiene el gen *ATPglk*, se amplificó la secuencia correspondiente únicamente a *ATPglk* usando los oligonucleótidos nombrados GLK1 y GLK2 (Mahr et al., 2000). La reacción de PCR se realizó con la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), usando una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C (3 min), seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C (20 s), un alineamiento a 65 °C (30 s), una extensión a 72 °C (1 min) y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto esperado se purificó a partir de un gel de agarosa y se envió a secuenciación para corroborar la identidad del producto. La construcción obtenida se nombró pATP307 (Rocha et al., 2018).



Para la clonación de *PPglk* y la región que lo flanquea se siguió el mismo procedimiento descrito para *ATPglk*. Los oligonucleótidos diseñados se nombraron PP-F2 y PP-R3 (Tabla 2). Para la reacción de PCR se utilizó la enzima Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific). Las dos etapas para la amplificación fueron una temperatura de desnaturalización inicial a 94 °C (5 min), seguido de la primera etapa de 10 ciclos con desnaturalización a 94 °C (20 s), alineamiento y extensión a 68 °C (7 min.). La segunda etapa de 20 ciclos con desnaturalización a 94 °C (20 s), alineamiento, extensión a 68 °C (7:30 min) y una extensión final a 68 °C (10 min). El producto de PCR se trató de la misma manera para ser clonado en el plásmido pCR2.1-TOPO, así como se realizó para el gen *ATPglk*. De igual forma, las construcciones obtenidas se analizaron por digestión con *EcoR1*. Para corroborar que la secuencia de 6 kb clonada contiene el gen *PPglk*, se amplificó la secuencia correspondiente únicamente al gen utilizando los oligonucleótidos nombrados PPGlk-fwd2 y PPGlk-rev2. La reacción de PCR se sometió a las condiciones descritas por Ruiz-Villafán et al., 2014, se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El producto esperado medía alrededor de 750 pb, el cual se envió a su secuenciación en Laragen, Inc. (Culver City, CA). La construcción obtenida se nombró pPP127 (Rocha et al., 2018).

## Reemplazo de los genes *ATPglk* y *PPglk*

Las construcciones pATP307 y pPP127 se utilizaron para llevar a cabo el reemplazo de los genes *ATPglk* y *PPglk* en *S. peucetius* var. *caesius* siguiendo el fundamento de la metodología descrita por Gust et al., 2003 con algunas modificaciones.

El reemplazo con el cassette de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) se realizó dentro de la región que codifica para cada gen *glk*. Los oligonucleótidos se diseñaron 50 nucleótidos dentro de la secuencia encontrada en GenBank correspondiente a cada gen (*ATPglk*, AY651851.1, GI: 50263005) y (*PPglk*, KF184976.1, GI: 523328802). Dichos oligonucleótidos se nombraron DATPglkF-DATPglkR, y DPPglkF-DPPglkR, respectivamente (Tabla 2).

Los oligonucleótidos DATPglkF y DATPglkR se utilizaron para amplificar la región *aac(3)IV* a partir del plásmido pIJ773. El producto esperado (1482 pb), se purificó a partir de un gel de agarosa, se sometió a digestión con la enzima *DpnI* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las condiciones del fabricante para eliminar el DNA metilado y finalmente se purificó nuevamente a partir de un gel de agarosa para garantizar la ausencia del plásmido pIJ773 que podría generar falsos positivos después del proceso de recombinación homóloga (Rocha et al., 2018).

Para el proceso de recombinación homóloga se utilizó la cepa de *E. coli* BW25113 que contiene los elementos de recombinación  $\lambda$  codificados en el plásmido pIJ790 (Datsenko & Wanner, 2000). La cepa de *E. coli* BW25113-pIJ790 se transformó con cada plásmido pATP307 y pPP127, las clonas obtenidas se nombraron *E. coli* BW-pATP307 y BW-pPP127, respectivamente (Tabla 1). Se usó 100 mM de L-arabinosa para la inducción de los elementos  $\lambda$ , previamente a generar células competentes de *E. coli* BW-pATP307. Estas células se usaron para transformar por electroporación con el producto de PCR *aac(3)IV* ya purificado. Después de ello, las células recuperadas del proceso de transformación se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche, para dar

tiempo al proceso de recombinación. Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas para inocular medio LB sólido y realizar la selección de las clonas Am<sup>R</sup>.

El mismo proceso se realizó para el reemplazo del gen *PPglk*, usando la cepa y los oligonucleótidos correspondientes. Para analizar la interrupción de cada gen se hizo PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos GLK1-Glk2 y PPGlk-fwd2-PPGlk-rev2 descritos anteriormente.

Los plásmidos donde se llevó a cabo el primer paso de recombinación para el reemplazo de cada gen *glk* fueron nombrados pATP163 (*ATPglk::aac(3)IV*) y pPP448 (*PPglk::aac(3)IV*), los cuales se transfirieron por electroporación a la cepa no metilante de *E. coli* ET12567-pUZ8002. La función del plásmido pUZ8002 fue movilizar los plásmidos no metilados hacia *Streptomyces* mediante conjugación. Después del proceso de transformación, se nombró a las cepas como ET-pATP163 y ET-pPP448. Posteriormente, se establecieron las condiciones de conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius* para obtener las mutantes  $\Delta glk$ .

## Conjugación intergenérica

### Preparación de las células receptoras

Para la preparación de las células receptoras de DNA se utilizó micelio aéreo de *S. peucetius* var. *caesius* obtenido de 10 cajas Petri con medio SM, cuyo inculo se realizó de acuerdo con la metodología descrita para la microscopía. La obtención de dicho micelio se realizó después de 36 h de incubación a 30 °C siguiendo la metodología descrita para la cosecha de esporas (Kieser et al., 2000). De la cosecha se obtuvo micelio

que fue resuspendido en glicerol al 20% para su conservación a -70 °C en alícuotas de 50 µL. Se realizó una estimación y en promedio se obtuvo alrededor de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

Antes del proceso de conjugación, a 50 µL del micelio conservado se le adicionó 1 mL de medio YMG, el microtubo se incubó en agitación a 30 °C durante 26 h. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 15,000 rpm durante 1 min para obtener la masa celular, la cual se lavó tres veces con 1 mL de medio 2xYT. Las células se resuspendieron en 500 µL del mismo medio.

### **Preparación de las células donadoras**

Para las células donadoras de DNA, las cepas de *E. coli* ET-pATP163 y ET-pPPP448 (Tabla 1) se incubaron en medio LB con apramicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL) durante toda la noche. De este cultivo se tomó 1 mL para inocular 100 mL de LB con los mismos antibióticos hasta obtener un valor de  $DO_{600nm}$  de 0.4-0.5. Las células se cosecharon por centrifugación a 12000 x g a temperatura ambiente durante 10 min, se hicieron tres lavados con un volumen de medio LB libre de antibióticos. Al final, las células de *E. coli* cosechadas se resuspendieron en 500 µL de medio 2xYT.

Para llevar a cabo el proceso de conjugación intergenérica se modificaron las proporciones usadas del protocolo descrito por Gust et al., 2003. La conjugación intergenérica se realizó adicionando 500 µL de células donadoras a 500 µL de células receptoras, se mezclaron agitando gentilmente, se centrifugó a 22,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular completo se resuspendió en 100 µL de medio 2xYT, se mezcló con micropipeta para lograr la

incorporación adecuada de una cepa con otra. Se hicieron diluciones de la mezcla de células de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en un volumen máximo de 200  $\mu\text{L}$  de medio 2xYT. El volumen total de cada dilución se inoculó en 30 mL de medio MS, complementado con 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Las cajas se incubaron a 30 °C durante 30 h. Después se adicionó en 1 mL de agua estéril que contenía 33.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido nalidíxico, se dejó secar y después se añadió 1 mL de agua con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Am. Se continuó la incubación a 30 °C hasta la aparición de células exconjugantes.

Las condiciones de conjugación se establecieron utilizando el plásmido pIJ8660 como control del proceso. Se obtuvieron colonias  $\text{Am}^{\text{R}}$  en un periodo entre 9 y 12 días de incubación. Una vez establecidas las condiciones, se repitió el proceso con los plásmidos pATP163 y pPP448 para obtener las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius*  $\Delta\text{ATP}glk$  y  $\Delta\text{PP}glk$ , respectivamente. Se obtuvieron exconjugantes, de aquellas que presentaron el fenotipo  $\text{Km}^{\text{s}}$  y  $\text{Am}^{\text{R}}$ , se purificó DNAG de acuerdo con la metodología descrita por Kieser et al. 2000. Para evaluar el reemplazo de cada gen *glk* se realizó PCR con oligonucleótidos que hibridan en el inicio y final de cada gen (Tabla 2), los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar para corroborar el reemplazo.

## Condiciones del pre-inóculo cepa parental y mutantes

La mutante  $\Delta\text{ATP}glk$  presentó dificultad para crecer en medio YMG, medio usado para la conservación de la cepa parental. Tomando como base el mismo medio, se cambió la glucosa por fructosa y se evaluó el crecimiento de ambas mutantes y de la cepa parental.

Se realizó un primer cultivo inoculando 200  $\mu$ L del micelio conservado en glicerol en 50 mL de medio YMF (0.4% extracto de levadura, 1% extracto de malta y 1% fructosa, pH 7.2) contenido en un matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL, se incubó en agitación rotatoria a 200 rpm a 30 °C durante 48 h. Se recuperó la masa celular centrifugando a 12000 x g a 4 °C durante 10 min. Se lavó la masa celular dos veces usando SSI, y finalmente se resuspendió en 25 mL de SSI. Para realizar una cuantificación de la suspensión celular se realizó una determinación rápida de peso seco. Para ello, se filtró 1 mL de esta suspensión celular en papel Whatman No. 1, por triplicado, se colocaron los papeles en una estufa a 80 °C durante 30 min, posteriormente se transferidos a un desecador por 30 min y posteriormente se pesaron. A partir de esta suspensión celular, se inoculó 8 mg de micelio en 50 mL de medio fresco YMF, se incubó bajo las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo en un periodo de 8 a 10 h, las tres cepas se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. Se realizó la cosecha del paquete celular, centrifugando, lavando y haciendo la determinación rápida del peso seco. A partir de esta suspensión de células se inoculó 2 mg de micelio por matraz para el resto de los análisis de comparación entre las mutantes  $\Delta glk$  y su cepa parental *S. peucetius* var. *caesius*.

Para el resto de las determinaciones se utilizó el medio definido NDYE (10 mM  $\text{NaNO}_3$ , 1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.2% extracto de levadura) complementado con solución de elementos traza, vitaminas y fuente de carbono (Dekleva et al. 1985). La incubación se realizó en agitación rotatoria de 200 rpm, a 30 °C durante el tiempo de análisis requerido.

## Efecto de la glucosa en el crecimiento

Se evaluó el crecimiento de *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental y mutantes  $\Delta glk$  en diferentes concentraciones de glucosa. El medio NDYE se complementó con tres concentraciones diferentes de glucosa 50, 100 y 300 mM. Se evaluó la formación de biomasa, el consumo de glucosa, la producción de antraciclinas y la actividad de ATP-Glk y PP-Glk.

### Determinación de glucosa residual

La glucosa remanente en el medio de cultivo se determinó a través de la reacción acoplada a glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD-POD de Spinreact). La producción de biomasa se estimó como peso seco como fue reportada previamente por (Ruiz-Villafán et al., 2014).

### Obtención de extracto citosólico

Las células se recuperaron por centrifugación 12000 x g a 4 °C durante 10 min, se lavaron por duplicado con SSI y finalmente se resuspendieron en 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7.2, conteniendo Protease Inhibitor Cocktail Powder siguiendo las condiciones del fabricante (Sigma-Aldrich). El extracto citosólico se obtuvo sonicando las células a 50 W, 4 pulsos de 1 min con 30 s de intervalo entre cada uno. Posteriormente, se centrifugó 12000 x g a 4 °C durante 10 min, se recuperó el sobrenadante para medir proteína y actividad enzimática (Ruiz-Villafán et al. 2014).

### **Determinación de proteína**

Se utilizaron diluciones apropiadas de los extractos citosólicos para medir proteína a través de la reacción con el reactivo de Bradford, utilizando albúmina bovina sérica como estándar (Bio-Rad).

### **Actividad de glucosa-cinasa**

La actividad de glucosa-cinasa se determinó de forma indirecta midiendo la formación de NADPH (340 nm) debido a la reacción acoplada con la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Roche). Se utilizó ATP para medir la actividad de ATP-Glk y cadenas de polifosfato inorgánico para la actividad de PP-Glk como fue descrito por Ruiz-Villafán et al., 2014.

## **Efecto de la RCC sobre la actividad de amilasa**

Se evaluó la capacidad de las tres cepas de consumir almidón como única fuente de carbono. Posteriormente, se estimó el efecto de la glucosa sobre la actividad de amilasa. Para ello, se analizaron dos condiciones, en la primera, el medio NDYE se complementó con 1% de almidón (almidón de papa, Sigma). En la segunda condición, el medio se complementó con 1% de almidón y 300 mM de glucosa.

### **Determinación de almidón residual**

Se midió el almidón residual en el medio de cultivo de cada cepa a través del tiempo. Se cuantificó a través de una reacción colorimétrica con yodo, se midió la absorbancia a 620 nm. La reacción se llevó a cabo al mezclar 0.1 mL de la dilución adecuada del sobrenadante del medio de cultivo con 2.4 mL de la solución de yodo (30 g/L de KI y 3



g/L de I<sub>2</sub>), previamente diluida al 4% (v/v), frente a una curva patrón de almidón de 0 a 12 g/L (Giraud et al., 1993).

### **Actividad amilolítica**

La actividad amilolítica se midió en el sobrenadante del cultivo de cada cepa, para ello se utilizó el kit Randox amylase assay (Randox Laboratories, Antrim, UK) donde se midió la absorbancia a 405 nm debida a la liberación del p-nitrofenol a partir de la hidrólisis del 4-Nitrofenil-1,4- $\alpha$ -D-maltoheptaosido realizada por la amilasa de la muestra y acoplado a una  $\alpha$ -glucosidasa, con un coeficiente de extinción molar de 18.5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lorentz K, 2000). Para llevar a cabo la reacción, se mezcló 50  $\mu$ L del sobrenadante del medio de cultivo con 500  $\mu$ L del reactivo, se incubó a 37 °C y se midió la absorbancia cada minuto durante 10 min. Se definió una unidad de actividad amilolítica (U) como nmol de p-nitrofenol liberado en un min por mg de proteína.

### **Uso de diferentes fuentes de carbono**

Se evaluó el crecimiento de las tres cepas en diferentes fuentes de carbono. Para ello, se usó el medio NDYE complementado con 100 mM de xilosa, 100 mM de fructosa, 100 mM de manosa, 100 mM de galactosa, 100 mM de glicerol, y 20 mM de lactosa. Se midió la formación de biomasa como peso seco (Ruiz-Villafán et al., 2014).

### **Determinación de la fuente de carbono residual**

Los carbohidratos residuales se midieron a través de su poder reductor al reaccionar con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller, 1959, para cada carbohidrato se hizo una curva patrón empleando una solución patrón del mismo analito a evaluar. El glicerol residual fue medido como lo reportó Kuhn et al., 2015.

### **Medición de antraciclinas**

Las antraciclinas se midieron después de un proceso de extracción a partir del micelio de cada cepa. Se recuperó la masa celular de 10 mL de cultivo centrifugando a 12000 x g a 4 °C durante 10 min. El paquete celular se lavó por duplicado usando 15 mL de SSI. Después de eliminar la solución de lavado, el paquete celular se resuspendió en 5 mL de una mezcla de acetona y 0.05 M de ácido sulfúrico en proporción (4:1). Posteriormente, la suspensión celular se sometió a un proceso de sonicación para extraer las antraciclinas. Después de centrifugar a 12000 x g a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se recuperó en tubos de ensaye con rosca. Se repitió el proceso de sonicación con solución fresca de acetona-ácido sulfúrico. El proceso completo se llevó a cabo cuantas veces fue necesario hasta la extracción total de antraciclinas. Finalmente, se midió el volumen obtenido de mezcla de extracción recuperada y se midió la absorbancia a 495nm. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de 11,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Ruiz-Villafán et al., 2014) para obtener la concentración de antraciclinas en cada muestra.

## Preparación de muestras para micrografía

Se evaluó la formación de esporas de *S. peucetius* var. *caesius* en diferentes medios sólidos. El único medio donde se observó una estructura aparente a la presencia de esporas fue el medio SM. Con el fin de verificar que lo observado eran esporas de *S. peucetius* var. *caesius*, se realizaron análisis al microscopio electrónico siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Se realizó el inóculo de *S. peucetius* var. *caesius* en el medio YMG como ya fue descrito, después de 48 h de incubación, se recuperó el micelio por centrifugación a 12000 x g a 4 °C durante 10 min. y se lavó con un volumen de solución salina isotónica 0.85% de NaCl (SSI) por duplicado. El micelio se resuspendió en 25 mL de SSI. Se realizó una estimación rápida del peso seco como fue descrito anteriormente. Se inoculó con 8 mg de micelio un matraz bafleado de 250 mL que contenía 50 mL de YMG. Se incubó bajo las mismas condiciones durante un periodo de 8-10 h, se determinó que en este tiempo *S. peucetius* var. *caesius* se encuentra en fase logarítmica temprana de crecimiento. Transcurrido el tiempo, el micelio se cosechó de la forma ya descrita, se estimó el peso seco y se inoculó 0.02 mg micelio en una caja Petri que contenía 30 mL de medio SM, se incubó a 30 °C por 50 h. En este tiempo se tomaron las muestras para su observación a través de microscopía electrónica (MOE).

Se cortó un fragmento de agar de la muestra que se desea observar al microscopio utilizando un sacabocado No. 2 (3 mm de diámetro). Con ayuda de un bisturí se eliminó la mayor cantidad de agar. El fragmento se colocó en un microtubo de 1.5 mL. El material utilizado para el corte se enjuagó previamente con etanol absoluto (ACS reagent JT Baker). Todas las soluciones empleadas se prepararon con agua desionizada que se esterilizó y filtró a través de un filtro de 0.22 µm. El etanol utilizado fue grado reactivo

analítico. Para fijar la muestra, se añadió 1 mL de la solución de fijación (formaldehído al 3% disuelto en amortiguador PBS [130 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, pH 7.3]), y se incubó a temperatura ambiente por 24 h. Sin dejar secar la muestra, se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. Se lavó cinco veces con PBS, en agitación suave durante 5 min entre cada lavado. Posteriormente, para deshidratar la muestra se realizaron lavados consecutivos con concentraciones crecientes de etanol, 30, 50, 70 y 100%; se realizaron dos lavados con cada concentración agitando suavemente durante 10 min. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> en un equipo Samdri-795 (Tousimis E.U.A), se recubrieron con oro empleando el equipo JEOL JF-1100 ion sputter (JEOL E.U.A.), y finalmente observadas al microscopio, se utilizó un equipo JEOL JSM-6360LV Scanning Electron Microscope (JEOL E.U.A.).

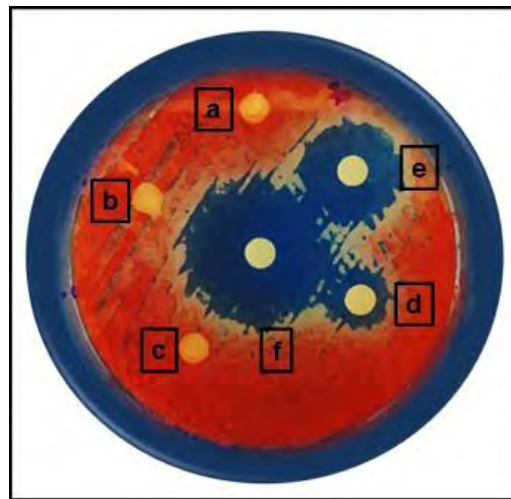
## **Análisis estadístico**

Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a triplicados de dos experimentos realizados de forma independiente, es decir, se contó con seis datos experimentales de cada punto presentado. Para el análisis estadístico se hicieron ANOVAS.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Concentración mínima inhibitoria

Se realizó una evaluación para conocer la sensibilidad de la cepa *S. peucetius* var. *caesius* a diferentes antibióticos y así hacer uso correcto de estos agentes para esta cepa en particular. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), usando micelio que se encontraba en fase exponencial temprana, cuya ausencia de color evidenció la ausencia de una alta concentración de antraciclinas. Se usaron diferentes concentraciones de tioestreptón, higromicina B, espectinomina, apramicina, neomicina y estreptomicina aplicadas en sensidiscos. Después de 48 h de incubación se determinó el efecto de cada antibiótico midiendo zonas de inhibición de crecimiento (Figura 6).



**Figura 6.** Prueba de sensibilidad de *S. peucetius* var. *caesius*, (a) 0  $\mu\text{g/mL}$ , (b) 3  $\mu\text{g/mL}$ , (c) 30  $\mu\text{g/mL}$ , (d) 94  $\mu\text{g/mL}$ , (e) 375  $\mu\text{g/mL}$  y (f) 1500  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina.

Los valores obtenidos de MIC para *S. peucetius* var. *caesius* a diferentes antibióticos se muestran en la Tabla 3. Se encontró que presenta mayor resistencia a espectinomicina y estreptomina y que es más sensible a gentamicina y apramicina. Estos resultados mostraron que apramicina es una buena opción como gen marcador para realizar el reemplazo de los genes *glk* en *S. peucetius* var. *caesius*.

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de diferentes antibióticos para *S. peucetius* var. *caesius*, comparando con lo reportado para *S. avermitilis* K139 (Komatsu et al., 2013), *S. lividans* TSK1 (Skeggs et al., 1985) y *S. hygrosopicus* FC904 (Cheng et al., 2001).

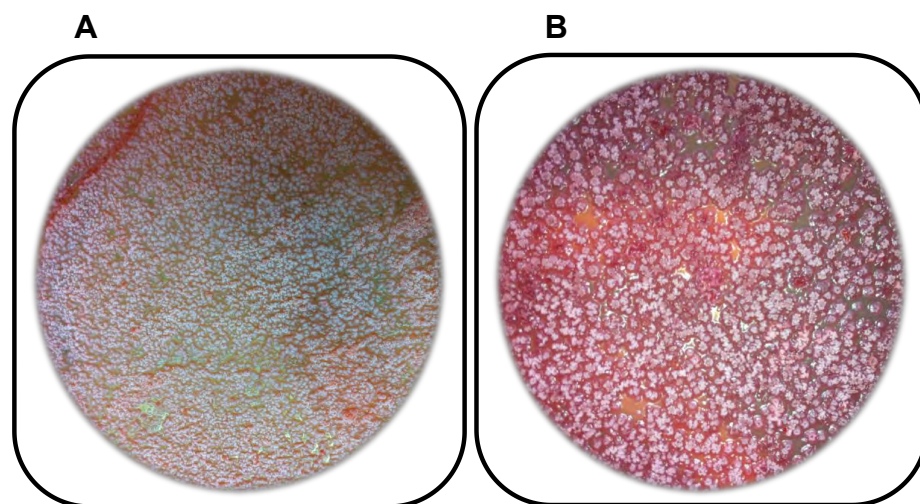
Antibiótico	Concentración mínima inhibitoria [µg/mL]			
	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<i>S. avermitilis</i> K139	<i>S. lividans</i> TSK1	<i>S. hygrosopicus</i> FC904
<b>Gentamicina</b>	0.034 + 0.002	NR	2-5	0.1
<b>Tioestreptón</b>	0.241 + 0.01	0.78	NR	NR
<b>Apramicina</b>	0.268 + 0.037	0.39	<1	NR
<b>Neomicina</b>	0.321 + 0.035	<0.1	<1	NR
<b>Kanamicina</b>	0.588 + 0.08	NR	10-30	0.1
<b>Higromicina B</b>	0.749 + 0.09	6.25	NR	NR
<b>Estreptomina</b>	5.412 + 1.66	0.1	NR	3
<b>Espectinomicina</b>	6.005 + 0.79	25	NR	NR

NR: No reportados

Como podemos observar en la Tabla 4, los valores de MIC pueden variar mucho de cepa a cepa, por ello, es muy importante conocer esta información antes de comenzar este estudio.

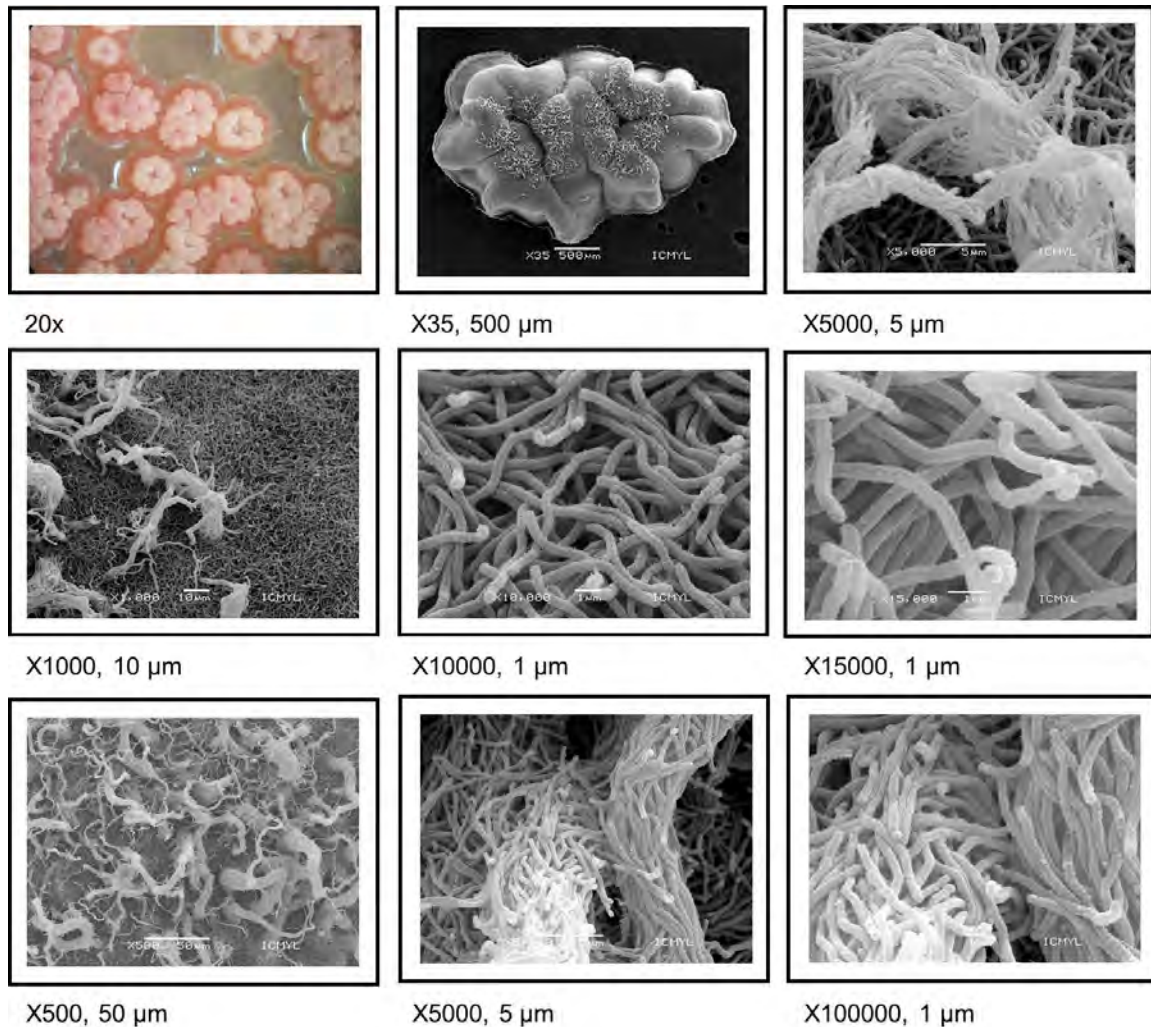
## Determinación de la formación de esporas a través de microscopía electrónica

Para el protocolo de conjugación intergenérica reportado para muchas cepas de *Streptomyces* se requiere de esporas de la cepa receptora. Sin embargo, ninguna de las condiciones de crecimiento evaluadas previamente había permitido obtener esporas. Se evaluaron diferentes medios reportados para otras cepas, agar MS, YMG, ISP4 (Kieser et al. 2000), YMPD (Tezuka et al., 2009), R2YE (Chouayekh et al., 2007), medios en los cuales no se obtuvo esporas de *S. peucetius* var. *caesius*. También se evaluó el medio SM Modificado de Segura et al., 1996. A partir de 36 h de incubación en medio SM, se comenzó a observar coloración blanca sobre las colonias, similar a la coloración debida al micelio diferenciado en *S. coelicolor*. Sin embargo, este hecho ocurría en poco tiempo de incubación, después la coloración blanca desaparecía y las colonias se tornaban totalmente rojizas debido a la presencia de antraciclinas (Figura 7).



**Figura 7.** *S. peucetius* var. *caesius* en medio SM a 36 h (A) y 50 h (B) de incubación, visto a través del microscopio estereoscópico (40x).

Se tomaron muestras para microscopía electrónica al tiempo de 50 h de incubación, para evaluar las estructuras de color blanco ubicadas en la parte superior de las colonias (Figura 8).



**Figura 8.** *S. peucetius* var. *caesius* (cepa parental) visto al microscopio estereoscópico (cuadro superior izquierdo) y al microscopio electrónico de barrido (resto de las imágenes).

La estructura de tono blanco que se pensaba correspondía a la presencia de esporas, en realidad corresponde únicamente a micelio aéreo, éste no diferencia hacia

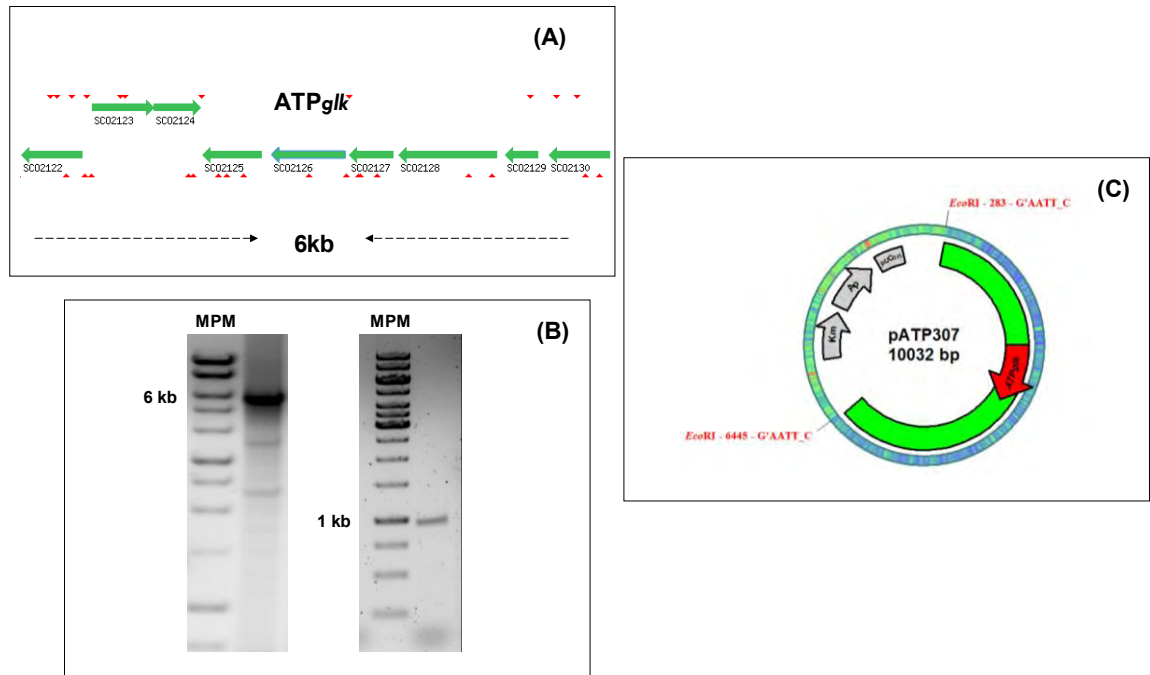


la formación de esporas (Figura 8). La ausencia de color naranja es debida a que esta parte del micelio aún no contiene antraciclinas. *S. peucetius* var. *caesius* debe de tener mutaciones en alguno o algunos de los genes involucrados en el proceso de esporulación ya bien caracterizados en otras cepas de *Streptomyces* (McCormick y Flärdh, 2011).

## Construcción de los plásmidos usados en el reemplazo de los genes *glk*

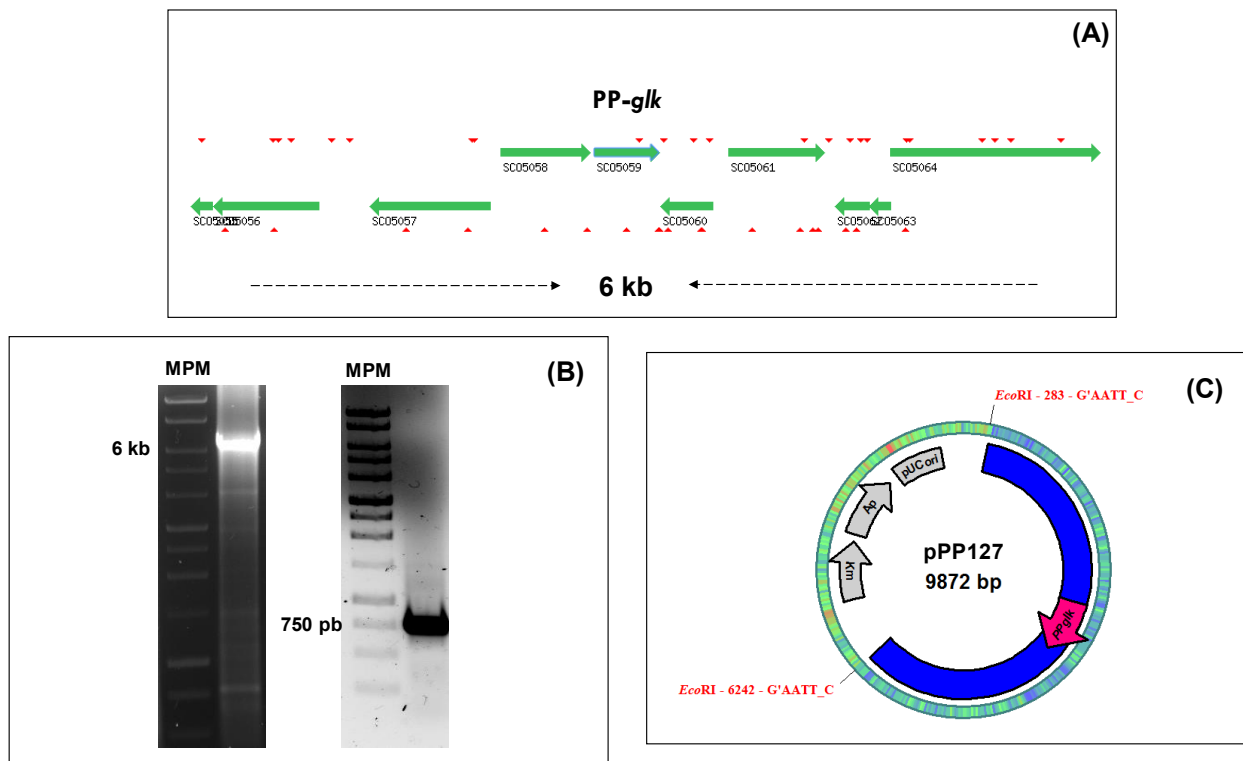
Para obtener las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* afectadas en los genes *glk* no contábamos con una biblioteca genómica que nos permitiera seguir el procedimiento de recombinación homóloga para obtener las mutantes, así como fue descrito por Gust et al., 2003. Para ello, se hicieron construcciones que contenían cada uno de los genes a reemplazar para obtener las mutantes. Se realizó la clonación de los genes *ATPglk* y *PPglk* con sus respectivas secuencias flanqueantes. Se usó un plásmido comercial que se replica en *E. coli*, lo que permitió realizar el primero proceso de recombinación en esta cepa. El plásmido usado no se replica en *Streptomyces*, lo que le permitió ser sólo un vehículo de la secuencia de DNA que se desea transferir hacia *Streptomyces* y poder llevar a cabo el proceso de mutación deseado.

La construcción obtenida para el gen *ATPglk* se nombró pATP307 (Figura 9). Para corroborar la identidad de la construcción, se amplificó el gen *ATPglk* a partir de pATP30. Se usaron cebadores que hibridan justo en el inicio y final del gen *ATPglk* (Figura 9), la construcción pATP307 de aproximadamente 10 kb contiene el gen *ATPglk*.



**Figura 9.** Construcción pATP307. (A) Marco genético de *ATPglk* y sus secuencias flanqueantes basado en la secuencia de *S. coelicolor*. (B) Productor de PCR de 6 kb (izquierda) que contiene el gen *ATPglk* de 1 kb (derecha). (C) Representación gráfica de la construcción pATP307.

Todo el proceso descrito para obtener la construcción pATP30 se repitió con el gen *PPglk*, éste se clonó con sus secuencias flanqueantes en el plásmido pCR2.1 TOPO y se obtuvo la construcción nombrada pPP127 (Figura 10).

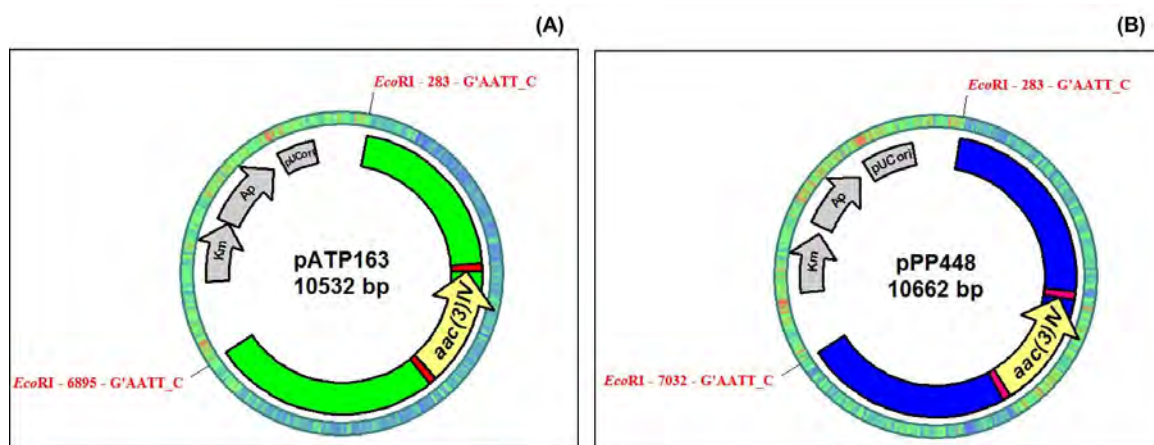


**Figura 10.** Construcción pPP127. (A) Marco genético de *PP-glk* y sus secuencias flanqueantes basado en la secuencia de *S. coelicolor*. (B) Producto de PCR de 6 kb (izquierda) que contiene el gen *PP-glk* de 750 pb (derecha). (C) Representación gráfica de la construcción pPP127.

Las construcciones pATP307 y pPP127 se utilizaron para reemplazar los genes *glk* por el cassette de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) en *E. coli*. Mediante PCR se evaluó la interrupción adecuada, se utilizaron oligonucleótidos que hibridan en las secuencias no reemplazadas, así se esperaba un cambio en el tamaño del producto obtenido. En el caso de *ATP-glk*, la diferencia en tamaño era de aproximadamente 500 pb, el gen generaría un producto de 1000 pb y el cassette uno de 1500 pb. En el caso de *PP-glk*, la diferencia es del doble de tamaño, el gen generaría un producto de 750 pb aproximadamente y el cassette uno de 1500 pb. En ambos casos se obtuvo el producto correspondiente al cassette interrumpiendo la secuencia de *glk*. Los plásmidos mutados se nombraron

pATP163 y pPP448 correspondientes a *ATPglk::aac(3)IV* y *PPglk::aac(3)IV*, respectivamente (Figura 11).

Posteriormente, se movilizaron hacia *S. peucetius* var. *caesius* mediante conjugación intergenérica.



**Figura 11.** Reemplazo de los genes *glk* en *E. coli*. (A) El plásmido pATP163 contiene el marco genético flanqueante del gen *ATPglk*, pero este gen ha sido reemplazado por *aac(3)IV*, representado en color amarillo. (B) El plásmido pPP448 contiene el marco genético flanqueante del gen *PPglk*, pero este gen ha sido reemplazado por *aac(3)IV*, representado en color amarillo.

## Conjugación intergenérica

El proceso de conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius* tenía que realizarse con micelio de la cepa receptora debido a su incapacidad de formar esporas. Para ello, se buscaron las condiciones más adecuadas para el intercambio de material genético usando el plásmido pIJ8660, el cual tiene resistencia a apramicina (Sun et al., 1999), para la selección de las exconjugantes  $Am^R$ , se utilizó 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del antibiótico, que corresponde alrededor de 100 veces el valor de MIC obtenida.

El proceso de conjugación usando micelio ya ha sido reportado para otras cepas de *Streptomyces* (Bierman et al., 1992; Paranthaman y Dharmalingam, 2003; Hamano et al., 2005; Phornphisutthimas et al., 2010, Du et al., 2012). Se evaluó el procedimiento usando micelio fragmentado mediante sonicación y homogenización como fue descrito para *S. peucetius* (Paranthaman y Dharmalingam, 2003). Para ello, se cosecharon las células crecidas en medio YMG durante la fase exponencial de crecimiento, después de haber sido lavadas, las células se sometieron por separado a proceso de homogeneizador o sonicación para reducir el tamaño del micelio, donde se varió el tiempo de proceso; éstas se utilizaron como cepa receptora en el proceso de conjugación con *E. coli*. Al mismo tiempo se evaluaron diferentes medios de cultivo, la mezcla de *S. peucetius* var. *caesius* y *E. coli* se inoculó en placa en los medios YMG, MS, R2 y R5 (Kieser et al. 2000), todos complementados con 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. En las condiciones donde se usaron los medios R2 y R5 no se obtuvieron colonias Am<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius*, la composición de estos medios es muy parecida y ambas contienen sacarosa, componente que puede llegar a inhibir el crecimiento de *E. coli* quizá por ello no obtuvimos colonias exconjugantes en R2 y R5. De los medios YMG y MS se obtuvieron pocas colonias Am<sup>R</sup>. Sin embargo, no se pensó que fueran las condiciones ideales si se consideraba que la frecuencia del reemplazo por recombinación homóloga sólo corresponde al 10% aproximadamente del total de las colonias obtenidas. Las metodologías que incluían sonicación y homogenización no nos permitieron obtener conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius* así como fue descrito para *S. peucetius* (Paranthaman y Dharmalingam, 2003).

Decidimos evaluar el micelio que emerge en medio sólido antes de comenzar a observar la presencia evidente de antraciclinas. Para ello, se cosechó el micelio a partir

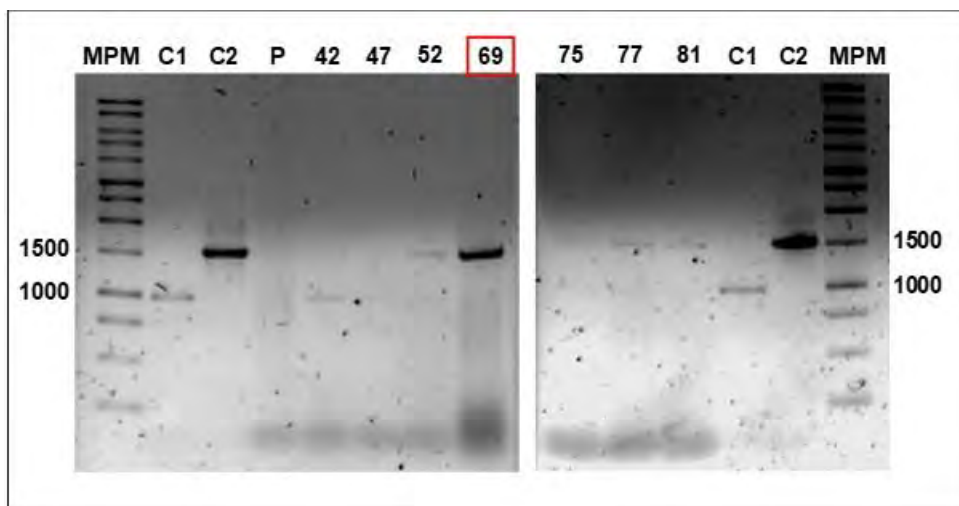
de medio SM siguiendo el protocolo estándar de cosecha de esporas (Kieser et al. 2000), se obtuvo micelio fragmentado libre de antraciclinas. Este micelio se incubó en medio YMG durante 26 h y se utilizó para conjugar con *E. coli*. Se utilizaron diferentes proporciones de la cepa donante, lo equivalente al total de células provenientes de 10, 50 y 100 mL de cultivo LB donde *E. coli* creció hasta D.O.<sub>600nm</sub> de 0.4. Se hicieron las mezclas de las células donantes y receptoras, se realizaron diluciones que se incubaron en medio MS complementado con diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>: 10, 20, 30, 40 y 50 mM (Guan y Pettis, 2009).

De las condiciones evaluadas, se obtuvo mayor número de células exconjugantes conforme aumentaba la proporción de células donantes probadas en cada serie. El mayor número se obtuvo al utilizar la cantidad de células de *E. coli* provenientes de 100 mL de cultivo y la mayor eficiencia, en medio MS complementado con 20 mM de MgCl<sub>2</sub> que fue de  $4.7 \times 10^{-4}$  (UFC exconjugantes/UFC receptoras). Resultados similares se observaron en la conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Kitasatospora setae* (Choi et al., 2004), y *E. coli* con *Streptomyces natalensis* (Enríquez et al., 2006), donde el exceso de las células donadoras permite una conjugación eficiente. Los fragmentos miceliales obtenidos a partir de medio sólido y pre-crecidos en medio YMG durante 26 h, resultaron en un método eficiente de conjugación para *S. peucetius* var. *caesius* (Rocha et al., 2018), así como lo reportado para *S. rimosus* (Phornphisutthimas et al., 2010).

Después de haber encontrado las mejores condiciones de conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius*, se usó el mismo protocolo para transferir los plásmidos pATP163 y pPP448 y así obtener las mutantes  $\Delta$ ATPglk y  $\Delta$ PPglk, respectivamente. La eficiencia de conjugación fue muy similar a la obtenida con el plásmido pIJ8660. Sin

embargo, al considerar únicamente aquellas clonas donde se llevó a cabo el reemplazo de los genes de interés por las secuencias entrantes, las eficiencias obtenidas fueron de  $5.6 \times 10^{-5}$  y  $3.3 \times 10^{-6}$  (UFC exconjugantes/UFC receptoras), respectivamente. La eficiencia de conjugación es baja comparada con la obtenida con otras especies de *Streptomyces*, donde la mayor eficiencia de conjugación se obtiene al realizar el procedimiento usando esporas de la cepa receptora (Phornphisutthimas et al., 2010).

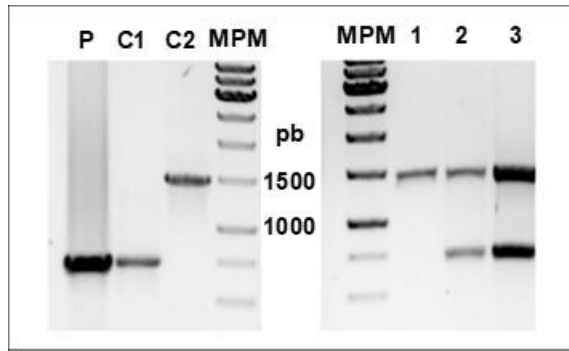
Después del proceso de conjugación se buscaron las células exconjugantes de *S. peucetius* var. *caesius* Am<sup>R</sup>, Km<sup>S</sup>, mediante varios pases en medio MS complementado con los mismos antibióticos tal como fue descrito por (Gust et al., 2003). Cada clona que correspondía con el fenotipo Am<sup>R</sup>, Km<sup>S</sup> se analizó mediante PCR de colonia usando los mismos oligonucleótidos usados en el análisis de los plásmidos. Como se observa en la (Figura 12), se tiene los productos esperados en los controles y se muestran algunas de las clonas analizadas, la clona 42 y 47 muestran el producto correspondiente al gen *ATPglk*. Las clonas 75, 77 y 81 mostraron el producto correspondiente al gen y al cassette, no se reemplazó el gen de interés. Las clonas 52 y 69 muestran el producto correspondiente al cassette Am<sup>R</sup> reemplazando al gen *ATPglk*. Se eligió la clona No. 69 como la mutante  $\Delta$ *ATPglk*.



**Figura 12.** Análisis de la mutante  $\Delta ATPglk$ . C1: amplificación de *ATPglk* a partir de pATP307. C2: amplificación de *aac(3)IV* a partir de pATP163. P: amplificación de *ATPglk* a partir de DNAg de *S. peucetius* var. *caesius*. Los números corresponden a diferentes clonas putativas como mutantes  $\Delta ATPglk$ .

Para evaluar la mutante  $\Delta PPglk$  se esperaba un producto de 750 pb en presencia del gen, si el gen ya había sido reemplazado por el cassette  $Am^R$ , se espera un producto cuyo tamaño es de aproximadamente 1500 pb (Figura 13). A diferencia de lo que ocurrió con la mutante  $\Delta ATPglk$ , las exconjugantes presentaban el fenotipo  $Am^R$  y  $Km^R$ , lo cual era un indicativo de que contenían el plásmido pPP448 integrado en el genoma, y que concuerda al obtener dos productos en el análisis de PCR, el correspondiente al gen *PPglk* y el correspondiente al cassette que lo interrumpió en el plásmido pPP448. De las clonas mostradas en la (Figura 13) únicamente la No. 1 muestra el producto equivalente al reemplazo del gen *PPglk* por *aac(3)IV*, ésta fue la clona elegida como la mutante  $\Delta PPglk$ .





**Figura 13.** Análisis de la mutante  $\Delta PPglk$ . P: amplificación de *PPglk* a partir de DNAg de *S. peucetius* var. *caesius*. C1: amplificación de *PPglk* a partir de pPP127. C2: amplificación de *aac(3)IV* a partir de pPP448. Los números corresponden a diferentes clonas putativas como mutantes  $\Delta PPglk$ .

Posteriormente, se hicieron mezclas de oligonucleótidos que hibridan en las secuencias de los genes *glk* y oligos que hibridan en el cassette *aac(3)IV* usando el DNAg de las mutantes seleccionadas. Con esto se corroboró que *aac(3)IV* se encuentra interrumpiendo a cada gen. Los productos de PCR obtenidos correspondientes a la interrupción de cada gen se secuenciaron por Laragen, Inc. (Culver City, CA).

## Análisis de las mutantes $\Delta glk$

Se observó que la mutante  $\Delta ATPglk$  presentaba dificultad para crecer en medio YMG, el cual se usó como medio de conservación y pre-inóculo en la cepa parental. Tomando como base este medio se cambió la glucosa por fructosa y se observó que las tres cepas pueden crecer sin dificultad. Se hicieron determinaciones de peso seco encontrándose que, en el tiempo de cultivo de 8 a 10 h de un segundo pre-inóculo, se

tenía a las tres cepas en fase de crecimiento exponencial temprana (Figura 14). A partir de éste se inició el cultivo en medio definido NDYE.

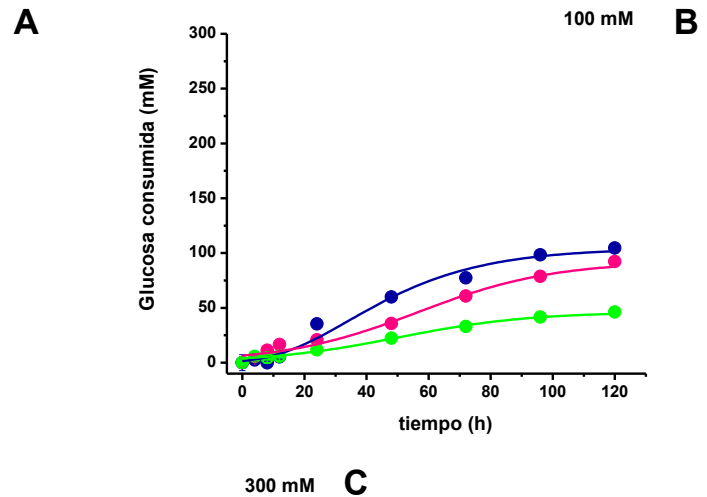
**Figura 14.** Pre-inóculo en medio YMF de *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta$ ATP*glk* (verde) y mutante  $\Delta$ PP*glk* (rosa).

## Efecto de la glucosa sobre el crecimiento y la producción de antraciclinas en las mutantes $\Delta$ *glk*

Para valorar la capacidad de las cepas parental y mutantes de usar la glucosa como única fuente de carbono, se evaluó el efecto de tres concentraciones diferentes, 50 mM que se considera una baja concentración para la cepa parental, 100 mM que es la concentración óptima para el crecimiento de la cepa *S. peucetius* en el medio definido NDYE (Dekleva et al., 1985), y 300 mM concentración a la cual se observa un efecto negativo de la glucosa sobre la síntesis de antraciclinas (Escalante et al., 1999). Se evaluó

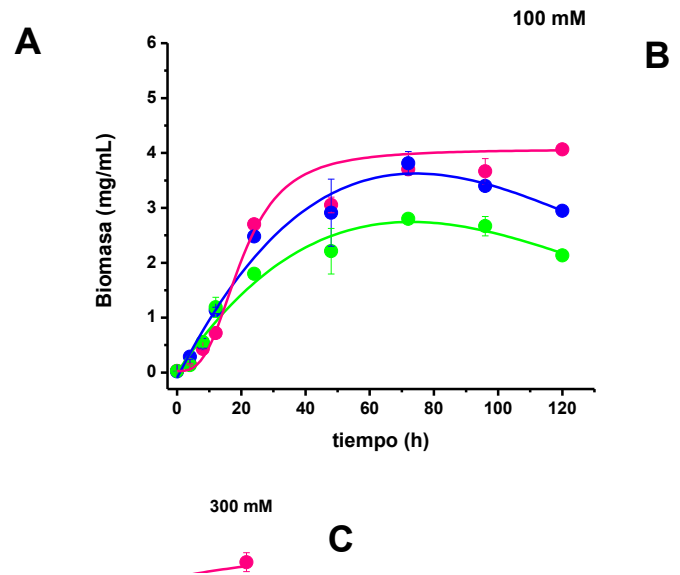
la formación de biomasa, el consumo de glucosa, la producción de antraciclinas y la actividad de glucosa-cinasa.

En la figura 15 está representado el consumo de glucosa y en la figura 16 la formación de biomasa para las tres cepas en 50, 100 y 300 mM de glucosa.



**Figura 15.** Uso de glucosa como única fuente de carbono. Glucosa consumida en el medio NDYE complementado con (A) 50 mM, (B) 100 mM y (C) 300 mM de glucosa, medio inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa).

La pendiente inicial de crecimiento observada presenta valores muy similares, aun cuando la glucosa no es consumida a la misma velocidad por las mutantes y la cepa parental, como se muestra en la (Figura 15).



**Figura 16.** Uso de glucosa como única fuente de carbono. Biomasa formada en el medio NDYE complementado con (A) 50 mM, (B) 100 mM y (C) 300 mM de glucosa, medio inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa).

En 50 mM de glucosa, se obtuvieron valores muy cercanos respecto a la biomasa máxima alcanzada, las tres cepas consumieron toda la glucosa disponible, aunque no a la misma velocidad.

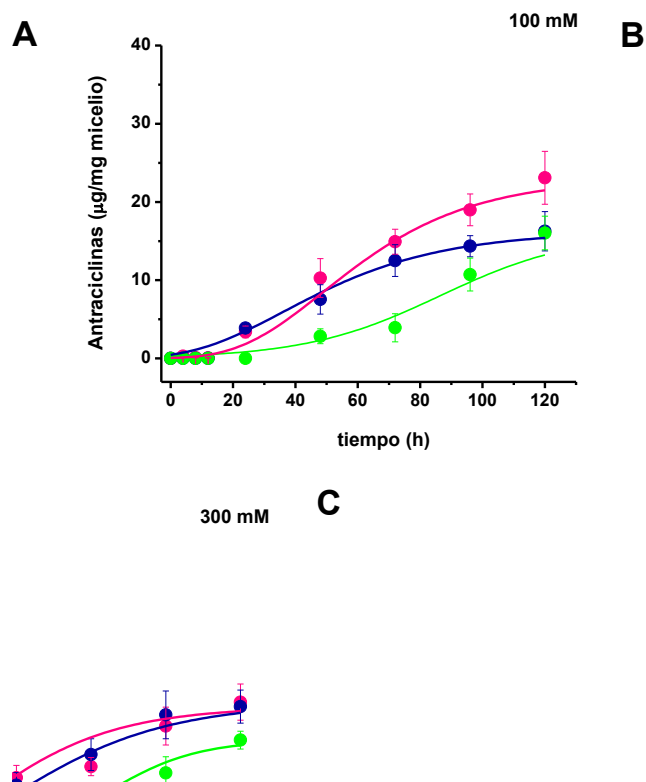
La cepa parental y la mutante  $\Delta PPglk$  formaron una mayor cantidad de biomasa en relación con el aumento de glucosa en el medio. Sin embargo, la mutante  $\Delta PPglk$  consumió menos glucosa que la cepa parental en 100 y 300 mM. Se observó que la cepa parental consumió más glucosa conforme ésta fue más alta en el medio de cultivo (300 mM), probablemente debido a la presencia de dos actividades de glucosa-cinasa.

La cepa  $\Delta ATPglk$  presentó un consumo máximo de glucosa alrededor de 50 mM independientemente de la concentración disponible en el medio de cultivo, lo cual explica que en las tres condiciones de cultivo se obtuvo la misma cantidad de biomasa para esta cepa en particular.

A las mutantes  $\Delta ATPglk$  y  $\Delta PPglk$ , la presencia de sólo una glucosa-cinasa les permitió utilizar la glucosa como única fuente de carbono, presentando afectación comparado con su cepa parental. El mayor cambio se observó en la mutante  $\Delta ATPglk$  donde el consumo de glucosa y la biomasa formada se ven reducidas drásticamente en concentraciones superiores a 50 mM. Aparentemente ATP-Glk y PP-Glk trabajan en conjunto para mantener el nivel en el consumo de glucosa, afectando directamente la expresión del transportador GlcP.

El proceso de RCC se encuentra estrechamente relacionado con la producción de metabolitos secundarios. Teniendo el antecedente de que la ATP-Glk se encuentra formando parte del proceso de regulación en la RCC, se decidió evaluar el efecto de las

mutante  $\Delta glk$  sobre el grupo de metabolitos secundarios de principal relevancia industrial para esta cepa, las antraciclinas.

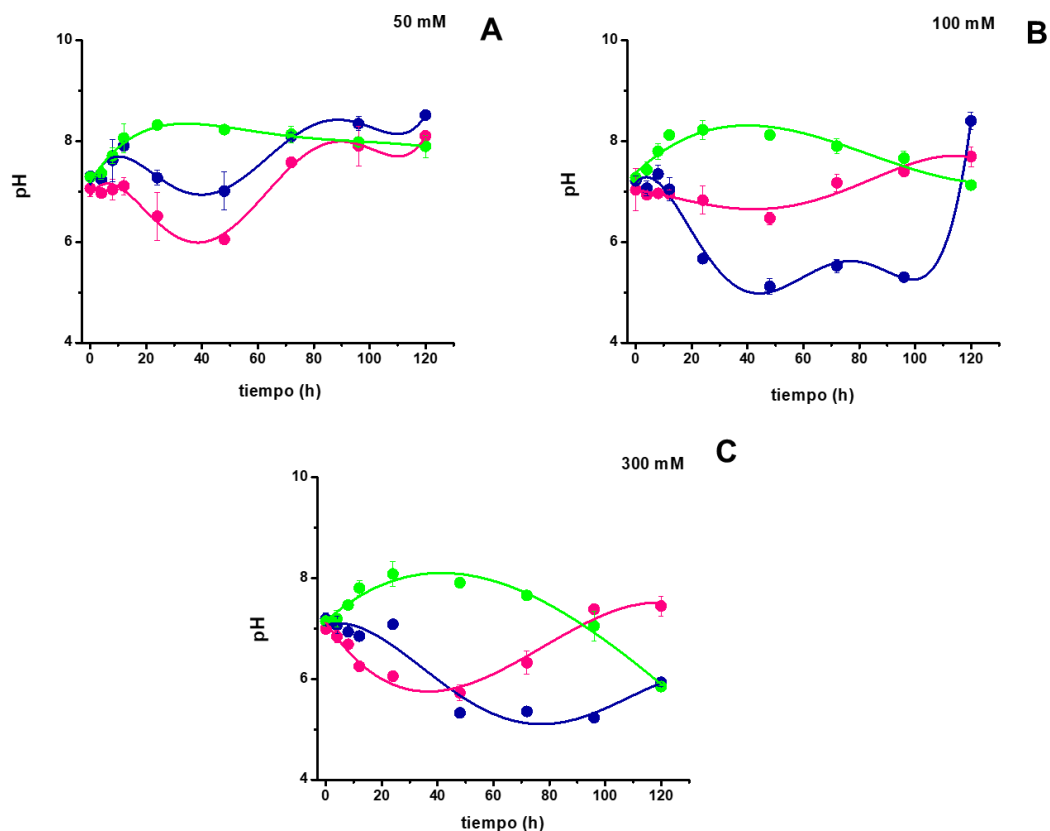


**Figura 17.** Uso de glucosa como única fuente de carbono. Antraciclinas producidas en el medio NDYE complementado con (A) 50 mM, (B) 100 mM y (C) 300 mM de glucosa, medio inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPGlk$  (rosa).

La producción de dichas moléculas con actividad antitumoral es afectada por la presencia de glucosa en el medio de cultivo en *S. peucetius* var. *caesius*, cepa parental (Figura 17). En 50 mM consume la glucosa en su totalidad a las 48 h de incubación, que

corresponde con el aumento en la síntesis de antraciclinas, y en esta condición fue donde se obtuvo la mayor cantidad de antraciclinas. En 100 y 300 mM de glucosa, la cepa parental produjo la mitad de antraciclinas obtenidas en 50 mM debido al efecto negativo que la glucosa ejerce, como fue reportado por Escalante et al., 1999.

La mutante  $\Delta ATPglk$  produjo una menor cantidad de antraciclinas comparando con su cepa original, y la presencia de una mayor concentración de glucosa en el medio, no provocó un cambio en la producción de estos metabolitos, lo cual puede ser explicado por la limitación en el consumo de glucosa que presentó esta cepa en particular.



**Figura 18.** Uso de glucosa como única fuente de carbono. El pH del medio NDYE complementado con (A) 50 mM, (B) 100 mM y (C) 300 mM de glucosa, medio inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa).

El pH en el medio de cultivo donde creció la mutante  $\Delta\text{ATP}glk$  se modificó en el rango de 7.0 a 8.3 en las tres concentraciones evaluadas. No hubo acidificación del medio en ninguna de las condiciones como ocurrió para la cepa parental (Figura 18).

Para la cepa de *S. peucetius* 343 ATCC 29050, se demostró que el efecto negativo sobre la producción de antraciclinas en presencia de glucosa se debe principalmente, al descenso del pH en el medio de cultivo, debido a la presencia de moléculas como piruvato, 2-oxoglutarato y citrato excretado durante el crecimiento (Dekleva y Strohl, 1987).

En la mutante  $\Delta\text{PP}glk$ , la cantidad de antraciclinas es mayor comparando con la mutante  $\Delta\text{ATP}glk$ , incluso en la condición donde ambas consumen 50 mM de glucosa. Así como para la cepa  $\Delta\text{ATP}glk$ , para la mutante  $\Delta\text{PP}glk$  no hay un cambio significativo en la producción de antraciclinas entre las condiciones de glucosa evaluadas.

La mutante  $\Delta\text{PP}glk$  presentó variaciones de pH entre 6.0-8.1 en 50 y 100 mM de glucosa. Sólo en 300 mM tuvo un descenso a 5.7 a las 48 h, posteriormente el pH comenzó a subir hasta un valor final de 7.4 a las 120 h de crecimiento, lo que podría explicar el cambio observado en el total de antraciclinas obtenidas en 300 mM, un efecto dado por el cambio de pH.

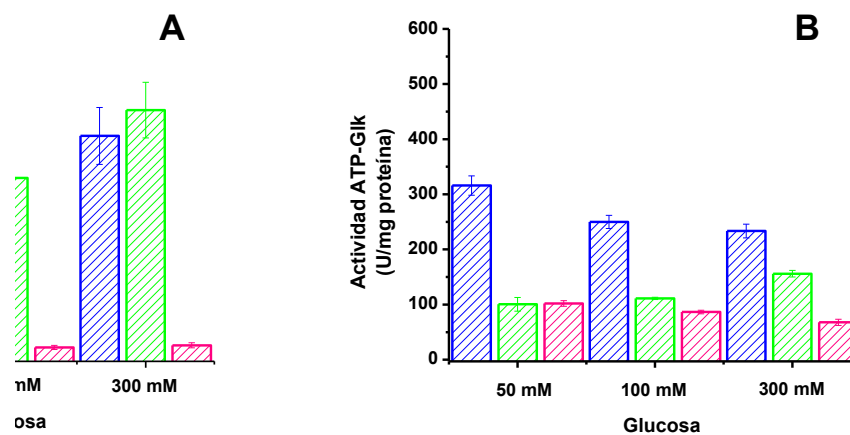
En la cepa original, en altas concentraciones de glucosa se ve disminuida la síntesis de antraciclinas, aunque no se han medido las moléculas que se encuentran acidificando el medio de cultivo, se observa un descenso en el pH, así como fue reportado para *S. peucetius* (Dekleva y Strohl, 1987), cuyo efecto parece estar relacionado con la velocidad de consumo de glucosa donde se ve involucrado el transporte y la velocidad de



fosforilación. En ambas mutantes se observó que altas concentraciones de glucosa no tienen un efecto negativo sobre la síntesis de antraciclinas, que el medio de cultivo no acidifica y quizá sea una consecuencia del nivel de transporte y fosforilación de la glucosa que está afectado en ambas cepas.

### **Actividad específica de glucosa-cinasa**

Se midió la actividad de PP-Glk (Figura 19), y como se esperaba, la mutante  $\Delta PPglk$  presentó una disminuida actividad basal en cualquier concentración de glucosa, correspondiente al 5% aproximadamente de la actividad medida en la cepa parental. La cepa parental y la mutante  $\Delta ATPglk$  presentaron un pico máximo de actividad de PP-Glk a las 24 h del cultivo en 50 mM de glucosa (no mostrado), que corresponde con la mayor pendiente en el consumo de dicho carbohidrato. En 100 y 300 mM de glucosa, el valor máximo de actividad se obtiene a las 8 h de crecimiento y de ahí se mantiene constante mientras hay glucosa en el medio. En las tres condiciones evaluadas, la cepa parental y la mutante  $\Delta ATPglk$ , presentaron la mayor actividad alrededor de 400 U/mg. Es decir, la actividad de PP-Glk es mayor a la de ATP-Glk, tal como lo había reportado Ruiz-Villafán et al. 2014 previamente.



**Figura 19.** Uso de glucosa como única fuente de carbono. (A) Actividad de PP-Glk y (B) actividad de ATP-Glk determinadas a partir de las cepas *S. peuceitius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa) crecidas en medio NDYE complementado con diferentes concentraciones de glucosa a las 24 h del cultivo.

Respecto a la actividad de ATP-Glk, la mutante  $\Delta ATPglk$  presentó una actividad basal cuyo valor osciló en 100 U/mg de proteína, aun cuando se esperaba que esta actividad resultara nula. Sin embargo, la actividad basal obtenida podría deberse a la presencia de otras hexosa-cinasas que hasta el momento no han sido consideradas, también es posible que la enzima PP-Glk pueda utilizar ATP como donador de grupo fosfato, similar a lo ya reportado para las enzimas PP-Glk caracterizadas en otras Actinobacterias como *S. coelicolor* (Koide et al. 2013), *M. tuberculosis* (Hsieh et al. 1996) y *C. glutamicum* (Lindern et al. 2010).

La actividad de ATP-Glk observada en la cepa original y la mutante  $\Delta PPglk$  (Figura 19) presentan un valor máximo que corresponde con el consumo de glucosa. La mayor actividad observada es alrededor de 300 U/mg, 100 U menos comparando con la actividad de PP-Glk.

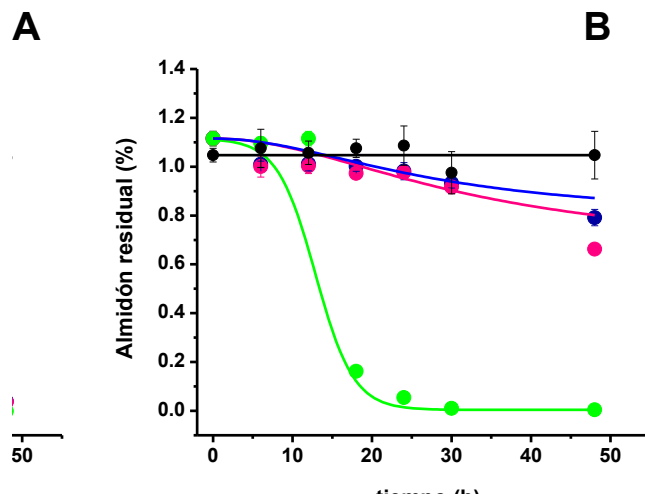
Los análisis *in vitro* demostraron que la actividad de PP-Glk es mayor a la actividad medida de ATP-Glk. Sin embargo, este estudio sugiere que *in vivo* ocurre lo contrario, ya que la mayor afectación en cuanto al uso de la glucosa ocurre en la mutante nula del gen *ATPglk*, y aunque la ausencia de *PPglk* demuestra afectación en el uso de glucosa como fuente de carbono, el fenotipo se asemeja más al de la cepa original.

## Efecto de la RCC sobre la actividad de amilasa

Las amilasas se encuentran ampliamente distribuidas entre las especies del género *Streptomyces*. Se ha reportado actividad de amilasa, sujeta de regulación por represión por glucosa en las cepas de *S. venezuelae* A6 (Virolle et al., 1988), *S. kanamyceticus* B42 (Flores et al., 1993) y *Streptomyces* sp. IMD 2679 (McMahon et al., 1999). Hasta el momento se desconocía acerca de la capacidad de *S. peucetius* var. *caesius* para degradar almidón. Por ello, se decidió evaluar el uso de dicho polisacárido como única fuente de carbono en medio NDYE complementado con 1% de almidón. Después de 18 h de incubación se observó crecimiento evidente de la cepa parental, lo cual demostró que *S. peucetius* var. *caesius* tiene la capacidad de usar el almidón como fuente de carbono, lo cual implica que debe de tener al menos una actividad amilolítica que le permita asimilar dicho carbohidrato.

Al mismo tiempo se monitoreó la presencia de almidón residual en el medio de cultivo, observándose que conforme iba creciendo *S. peucetius* var. *caesius*, el almidón iba disminuyendo, después de 96 h de incubación, el almidón se consumió en su totalidad (Figura 20 A).

Posteriormente, se repitió el experimento aumentando una condición, en la cual además de 1% de almidón se usó 300 mM de glucosa para complementar el medio NDYE. Se observó que en ambas condiciones *S. peucetius* var. *caesius* creció. En la condición donde sólo hay almidón, la cepa parental lo consumió en su totalidad a las 24 h de incubación (Figura 20 A). En presencia de glucosa, se observó represión en el uso de almidón hasta después de las 24 h de incubación. Al tiempo de 48 h consumió únicamente alrededor de 0.3% de almidón (Figura 20 B). Este experimento demostró que en *S. peucetius* var. *caesius*, el uso de almidón como fuente de carbono está sujeto de represión por glucosa.



**Figura 20.** Ensayo de RCC. Determinación de almidón remanente en el medio NDYE inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde), mutante  $\Delta PPglk$  (rosa) y el control sin inóculo (negro) complementado con (A) almidón y (B) almidón + glucosa como fuentes de carbono.

Posteriormente, se buscó la localización de la hidrolasa. Para ello, se evaluaron diferentes fracciones celulares después de un proceso de sonicación, el sobrenadante, la fracción de membranas y el citosol, mediante una reacción espectrofotométrica usando el kit Amylase assay (Randox). Se encontró que la mayor actividad se encontraba en el sobrenadante del medio de cultivo. Una vez estandarizadas las condiciones de cultivo y la medición de la actividad amilolítica, se realizó la comparación de las cepas mutantes  $\Delta glk$  con la cepa parental.

Se encontró que la cepa parental y la mutante  $\Delta PPglk$  presentan un patrón de consumo del almidón muy similar: al tiempo de 48 h de incubación ya no hay almidón en el medio de cultivo (Figura 20 A). La mutante  $\Delta ATPglk$  presentó un ligero retraso en el consumo, a pesar de ello, a las 30 h ya no hay almidón en el medio de cultivo.

En el medio de almidón-glucosa (Figura 20 B), la cepa parental y la mutante  $\Delta PPglk$  consumieron alrededor de 0.2-0.3% de almidón, mientras que la cepa  $\Delta ATPglk$  presenta el mismo patrón de consumo que presentó cuando no hay glucosa. Estos resultados demuestran que para la cepa parental la glucosa es un carbohidrato preferencial sobre el almidón y que la mutante  $\Delta PPglk$  mantiene este fenotipo. Sin embargo, en la mutante  $\Delta ATPglk$  se pierde esta preferencia, consume el almidón de igual forma en presencia de una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo.

**Figura 21.** Ensayo de RCC. Determinación de actividad amilolítica medida en el sobrenadante del medio NDYE inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutante  $\Delta ATPglk$  (verde), mutante  $\Delta PPglk$  (rosa) complementado con almidón (barra rellena) y almidón + glucosa (barra rayada) como fuentes de carbono. \*\*\* P < 0.001, la diferencia se calculó respecto a la cepa parental.

Para determinar la sensibilidad de la amilasa a la RCC, medimos la actividad amilolítica en el sobrenadante del medio. El valor máximo de actividad amilolítica se encontró a las 18 h de cultivo (Figura 21). La cepa parental y la mutante  $\Delta PPglk$  tienen un patrón de actividad de amilasa semejante, alrededor de 60 U/mg proteína en el medio con almidón como única fuente de carbono, actividad que presenta una evidente reducción hasta 6 U/mg proteína en presencia de glucosa en el medio, indicativo del efecto de RCC ejercida por la glucosa sobre la actividad de amilasa.

Para la mutante  $\Delta ATPglk$  se obtuvieron los resultados que concuerdan con lo observado en el consumo de almidón, la actividad de amilasa es la misma en ambas

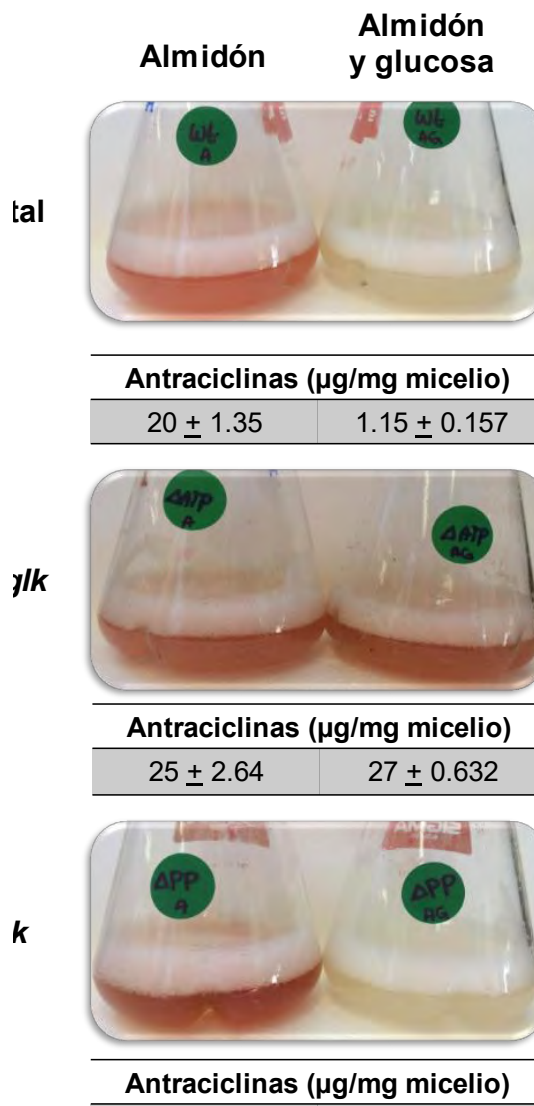
condiciones de incubación, con almidón y con almidón-glucosa, corroborando que en esta cepa se ha perdido la RCC sobre la actividad de amilasa.

Además de ello, la actividad obtenida es mayor a lo observado en la cepa parental cuando hay inducción por almidón. La actividad de amilasa en la mutante  $\Delta ATPglk$  es aproximadamente 6 veces mayor comparando con la encontrada en la cepa parental y en la mutante  $\Delta PPglk$  (Figura 21).

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros grupos (Virolle y Bibb, 1988; Virolle et al., 1988), donde se demuestra que se requiere de la presencia de la ATP-Glk para ejercer RCC sobre los genes de amilasa (*amI*) de *S. limosus* y *S. venezuelae* expresados en *S. coelicolor*.

En *S. lividans*, el análisis del regulador *reg1*, demostró un incremento en la expresión del gen de la amilasa en la mutante nula en *reg1* aún en ausencia del inductor (maltosa o almidón), demostrando que *reg1* controla la expresión del gen amilasa (Nguyen et al., 1997).

Nosotros obtuvimos el mismo perfil de actividad de amilasa en la mutante  $\Delta ATPglk$ , lo cual podría sugerir que *reg1* y ATP-Glk podrían regular en conjunto la expresión del gen amilasa en el proceso de RCC.



**Figura 22.** Ensayo de RCC. Antraciclinas producidas por *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental, mutantes  $\Delta$ ATP*glk* y  $\Delta$ PP*glk* en almidón y almidón + glucosa como fuentes de carbono en el medio NDYE.

Bajo las mismas condiciones de cultivo se evaluó el efecto sobre la síntesis de antraciclinas (Figura 22). La cepa parental y la mutante  $\Delta$ PP*glk* presentan una evidente coloración debida a la presencia de antraciclinas a la 36 h de incubación en el medio



donde sólo se tiene almidón como fuente de carbono, los valores de antraciclinas totales obtenidas son muy similares.

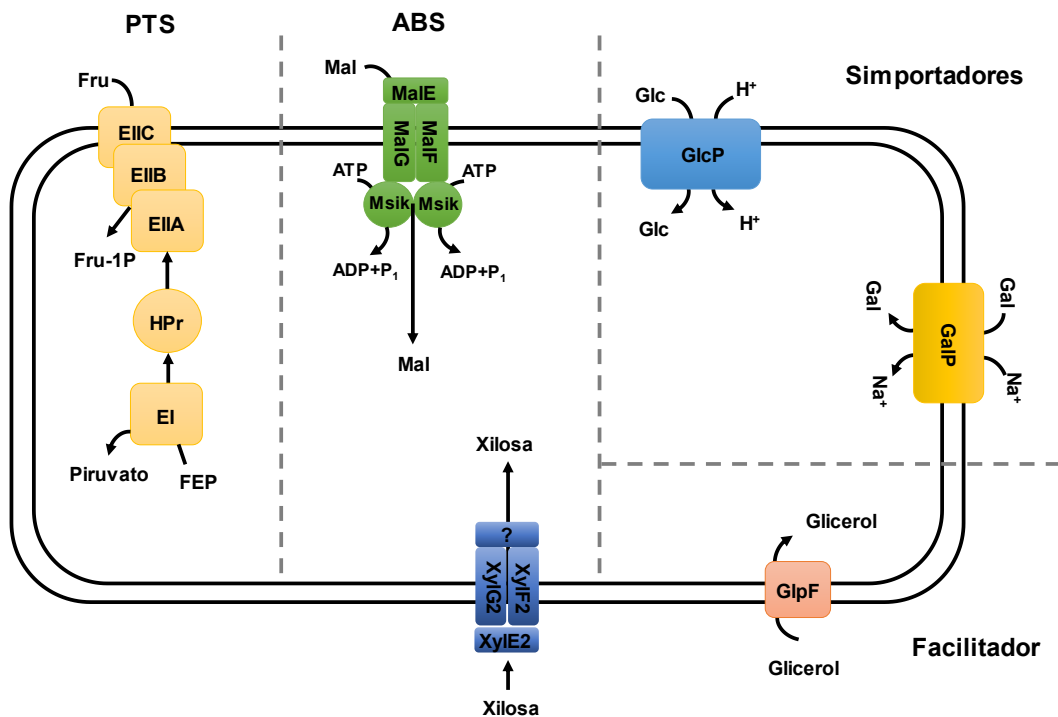
La síntesis de estos metabolitos se ve afectada negativamente en ambas cepas por la presencia de 300 mM de glucosa. Sin embargo, en la cepa  $\Delta$ ATP*glk* se perdió el efecto negativo de la glucosa sobre la síntesis de antraciclinas, ya que en ambas condiciones evaluadas se tiene la misma cantidad de antraciclinas totales (Figura 22).

## Efecto del reemplazo de los genes ATP- y PP*glk* sobre el uso de diferentes fuentes de carbono

En bacterias Gram positivas como *S. xylosus* (Wagner et al., 1995), *B. megaterium* (Späth et al., 1997) y *C. glutamicum* (Park et al., 2000) se observó que la delección del gen *glk* modificaba su capacidad de usar otros azúcares aún en ausencia de glucosa. Es por ello, que se evaluó si las mutantes  $\Delta$ *glk* tienen algún cambio en el uso de otros carbohidratos. Se utilizó el medio definido NDYE complementado con diferentes fuentes de carbono. Se evaluó la formación de biomasa, la fuente de carbono residual y la producción de antraciclinas.

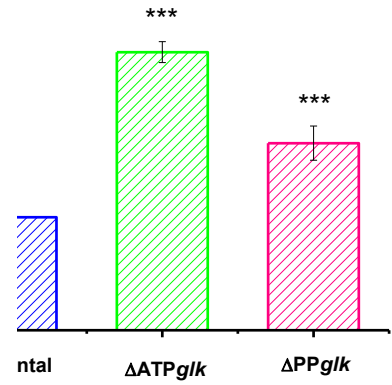
Los *Streptomyces* pueden metabolizar una amplia gama de fuentes de carbono que son internalizados por diferentes permeasas, su actividad y regulación estarán definiendo el estado nutricional de las células afectando directamente la producción de metabolitos secundarios. En la Figura 23 se encuentra representado el transporte de algunas de las fuentes de carbono evaluadas en esta parte del trabajo. Se sabe que la fructosa entra a la célula a través del sistema PTS, el cual no está involucrado con el

proceso de RCC en *Streptomyces*. La glucosa y galactosa son internalizadas por simportadores.

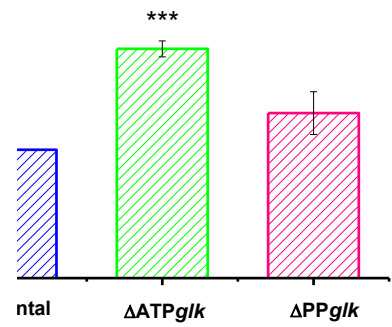


**Figura 23.** Representación de diferentes sistemas de transporte en *S. coelicolor*. Fructosa (PTS), Maltosa (ABC), Xilosa (ABC), Glucosa (simportador), Galactosa (simportador) y glicerol (difusión facilitada). Tomado y modificado de Bertram et al., 2004.

Como se puede observar en las Figuras 24 y 25, en las fuentes de carbono evaluadas se ve favorecido el crecimiento de las mutantes  $\Delta glk$  al comparar con la cepa parental.



osa



sa

\*\*\*  
\*\*\*  
T

**Figura 24.** Uso de diferentes fuentes de carbono. Crecimiento en medio NDYE inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutantes  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa) complementado con diferentes fuentes de carbono. \*\*\*  $P < 0.001$ , la diferencia se calculó respecto a la cepa parental.

No se puede hablar de un efecto de RCC debido a que no se evaluó una mezcla de fuentes de carbono. Inexplicablemente las mutantes tienen la capacidad de usar de una forma más eficiente otros carbohidratos.

**Figura 25.** Uso de diferentes fuentes de carbono. Crecimiento en medio NDYE inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutantes  $\Delta ATPglk$  (verde) y mutante  $\Delta PPglk$  (rosa) complementado con diferentes fuentes de carbono. \*\*\*  $P < 0.001$ , la diferencia se calculó respecto a la cepa parental.

La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), varió en cada condición. Sin embargo, en todas las fuentes de carbono evaluadas las mutantes alcanzaron una mayor biomasa final comparando con la cepa parental.

Para *S. peucetius* ATCC 29050, cepa origen de *S. peucetius* var. *caesius*, se reportó un crecimiento muy pobre en este medio de cultivo utilizando xilosa como única fuente de carbono (Dekleva et al., 1985).

Para *S. peucetius* var. *caesius* la cepa parental se obtuvieron resultados similares, dificultad para usar la xilosa como fuente de carbono al comparar con las mutantes. Sin embargo,  $\Delta PPglk$  y en particular la mutante  $\Delta ATPglk$  mostraron que pueden usar este azúcar alcanzando una mayor biomasa al comparar con la cepa parental (Figura 24).

El estudio de otro miembro de la familia ROK, la mutante nula de *rok7B7* en *S. coelicolor*, mostró aumentada la expresión del transportador de xilosa *xylFGH* y del crecimiento en la misma fuente de carbono (Świątek et al., 2013).

Por otra parte, de un estudio de proteoma realizado a la mutante  $\Delta ATPglk$  de *S. coelicolor*, se observó un aumento de 8 veces de la cantidad del transportador de xilosa al crecer a la mutante en medio con glucosa + fructosa. Estos resultados concuerdan también con lo reportado acerca del estudio de transcriptoma realizado sobre la mutante  $\Delta ATPglk$  de *S. coelicolor*, se encontró un aumento de 10 veces en la expresión del mismo transportador aún en ausencia de xilosa en el medio de cultivo (Romero-Rodríguez et al., 2016).

Estos resultados sugieren, en conjunto, la posible existencia de una red de regulación, donde la ausencia de *rok7B7* o *ATPglk*, dos miembros pertenecientes a la misma familia de proteínas ROK modifica la expresión para el consumo de xilosa.

En nuestros resultados, se observó que la ausencia de *ATPglk* o *PPglk* permite usar de forma más eficiente dicha pentosa como fuente de carbono. Quizá las mutantes  $\Delta glk$  de *S. peucetius* var. *caesius* presenten un fenotipo similar al reportado para la mutante de *S. coelicolor*, quizá también presenten un aumento en la expresión del transportador de xilosa. Aunado a estos resultados, es en xilosa donde se obtuvo el mayor rendimiento en la producción de antraciclinas en la mutante  $\Delta ATPglk$  (Figura 26).

La mutante  $\Delta ATPglk$  también mostró favorecido su crecimiento en galactosa, se obtuvo mayor biomasa comparado con la cepa parental y la mutante  $\Delta PPglk$  (Figura 24).

Para la mutante  $\Delta PPglk$  se obtuvo un mejor crecimiento comparando con las otras cepas en fructosa, manosa y glicerol. Es el glicerol, la condición donde dicha mutante obtuvo el mayor crecimiento de todas las condiciones evaluadas y también donde produjo el mayor rendimiento en la proporción de antraciclinas (Figura 26) de acuerdo con la fuente de carbono consumida (Tabla 5).

Bajo las condiciones evaluadas, la cepa parental generó la mayor formación de biomasa en el medio que contenía manosa, la mutante  $\Delta ATPglk$  en xilosa y  $\Delta PPglk$  en glicerol.

En relación con la cantidad producida de antraciclinas, la cepa parental produjo más en fructosa, la mutante  $\Delta ATPglk$  en xilosa y  $\Delta PPglk$  en glicerol (Figura 26).

**Figura 26.** Uso de diferentes fuentes de carbono. Producción de antraciclinas totales en medio NDYE inoculado con *S. peucetius* var. *caesius* cepa parental (azul), mutantes  $\Delta$ ATP*glk* (verde) y mutante  $\Delta$ PP*glk* (rosa) complementado con diferentes fuentes de carbono. \*\*\* P < 0.001, la diferencia se calculó respecto a la cepa parental.

Contrario a lo que pensábamos, aparentemente la enzima PP-Glk no contribuye directamente en la generación de esqueletos carbonatados para la síntesis de antraciclinas en esta cepa, ya que la mutante afectada en este gen produce una mayor cantidad de estos metabolitos secundarios al comparar con la cepa original en cualquiera de las condiciones evaluadas. La mutante  $\Delta PPglk$  usando glicerol como única fuente de carbono incrementa la síntesis de antraciclinas de una forma notable.

**Tabla 5.** Rendimiento de la producción de biomasa y de antraciclinas respecto a la fuente de carbono consumida.

Fuente de carbono	Cepa	$Y_{x/\text{carbono}}$ (mg/mg)	$Y_{\text{Antraciclinas}/\text{carbono}}$ (mg/mg)
Xilosa (100 mM)	Parental	0.214	1.43
	$\Delta ATPglk$	0.279	2.59
	$\Delta PPglk$	0.280	1.43
Galactosa (100 mM)	Parental	0.198	2.60
	$\Delta ATPglk$	0.205	1.75
	$\Delta PPglk$	0.229	1.82
Fructosa (100 mM)	Parental	0.196	3.77
	$\Delta ATPglk$	0.220	2.20
	$\Delta PPglk$	0.262	2.06
Manosa (100 mM)	Parental	0.288	3.01
	$\Delta ATPglk$	0.224	1.57
	$\Delta PPglk$	0.187	2.44
Glicerol (100 mM)	Parental	0.264	2.22
	$\Delta ATPglk$	0.394	4.26
	$\Delta PPglk$	0.525	8.25

Rendimiento de la formación de biomasa con base en la fuente de carbono consumida:  $Y_{x/\text{carbono}}$  (mg micelio/mg fuente de carbono consumida)

Rendimiento de la síntesis de antraciclinas con base en la fuente de carbono consumida:  $Y_{\text{Antraciclinas}/\text{carbono}}$  (mg Antraciclinas/mg fuente de carbono consumida)



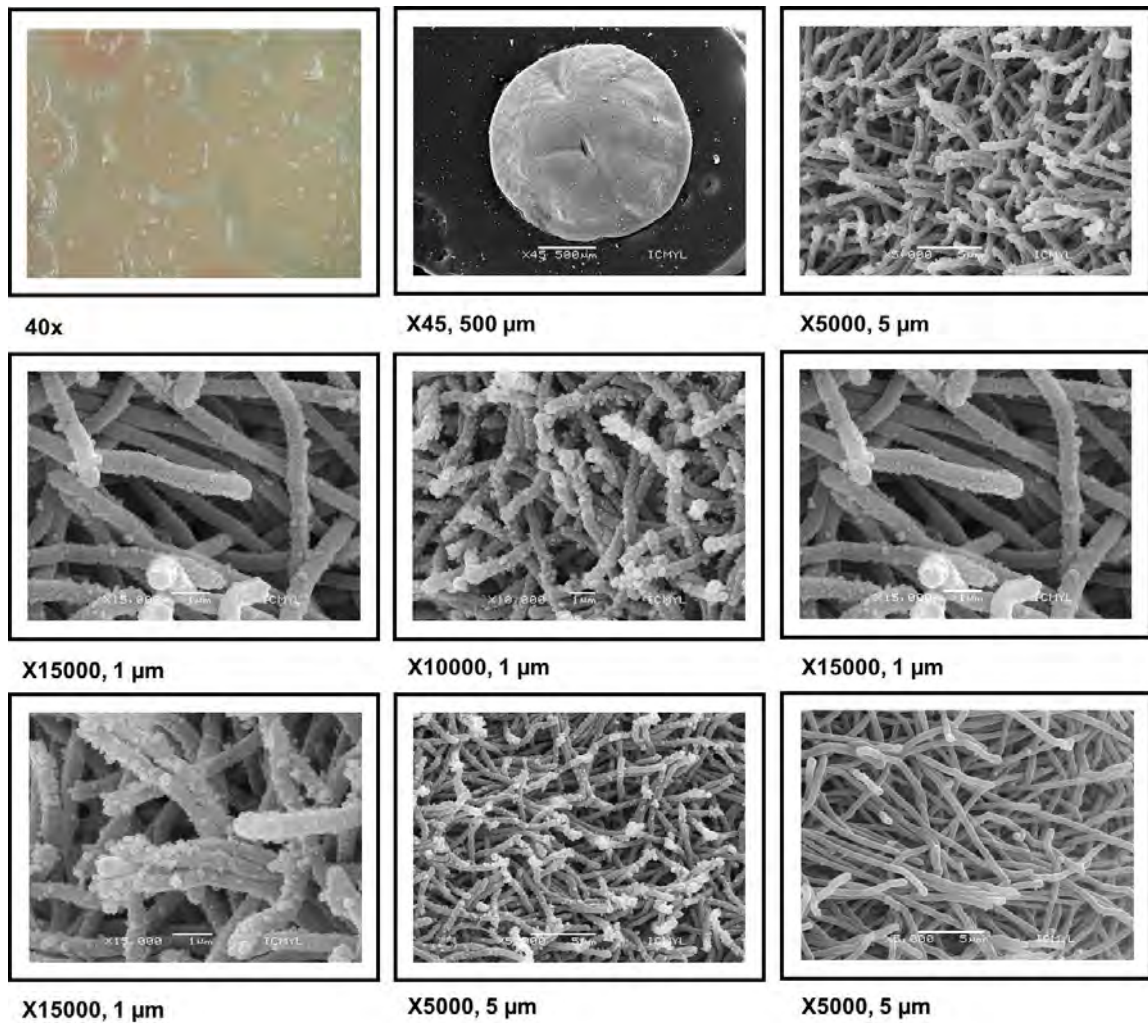
Con respecto a la cantidad de antraciclinas obtenidas en cada condición, no se tiene una correlación entre la fuente de carbono, el consumo y la síntesis de estos metabolitos secundarios. Pero se encontraron dos condiciones donde se sintetizan mayores proporciones de antraciclinas, fructosa para la cepa parental y glicerol para la mutante  $\Delta PPglk$ .

El crecimiento de las mutantes en diferentes fuentes de carbono se vio estimulado, aun cuando no son metabolizables a través de la actividad de Glk. Estos resultados apoyan la participación de ambas enzimas como moduladoras del crecimiento en diversas fuentes de carbono.

Contrario a lo que pensábamos, aparentemente la enzima PP-Glk no contribuye directamente en la generación de esqueletos carbonados para la síntesis de antraciclinas en esta cepa, ya que la mutante afectada en este gen produce una mayor cantidad de estos metabolitos secundarios al comparar con la cepa original en cualquiera de las condiciones evaluadas. La mutante  $\Delta PPglk$  usando glicerol como única fuente de carbono incrementa la síntesis de antraciclinas de una forma notable.

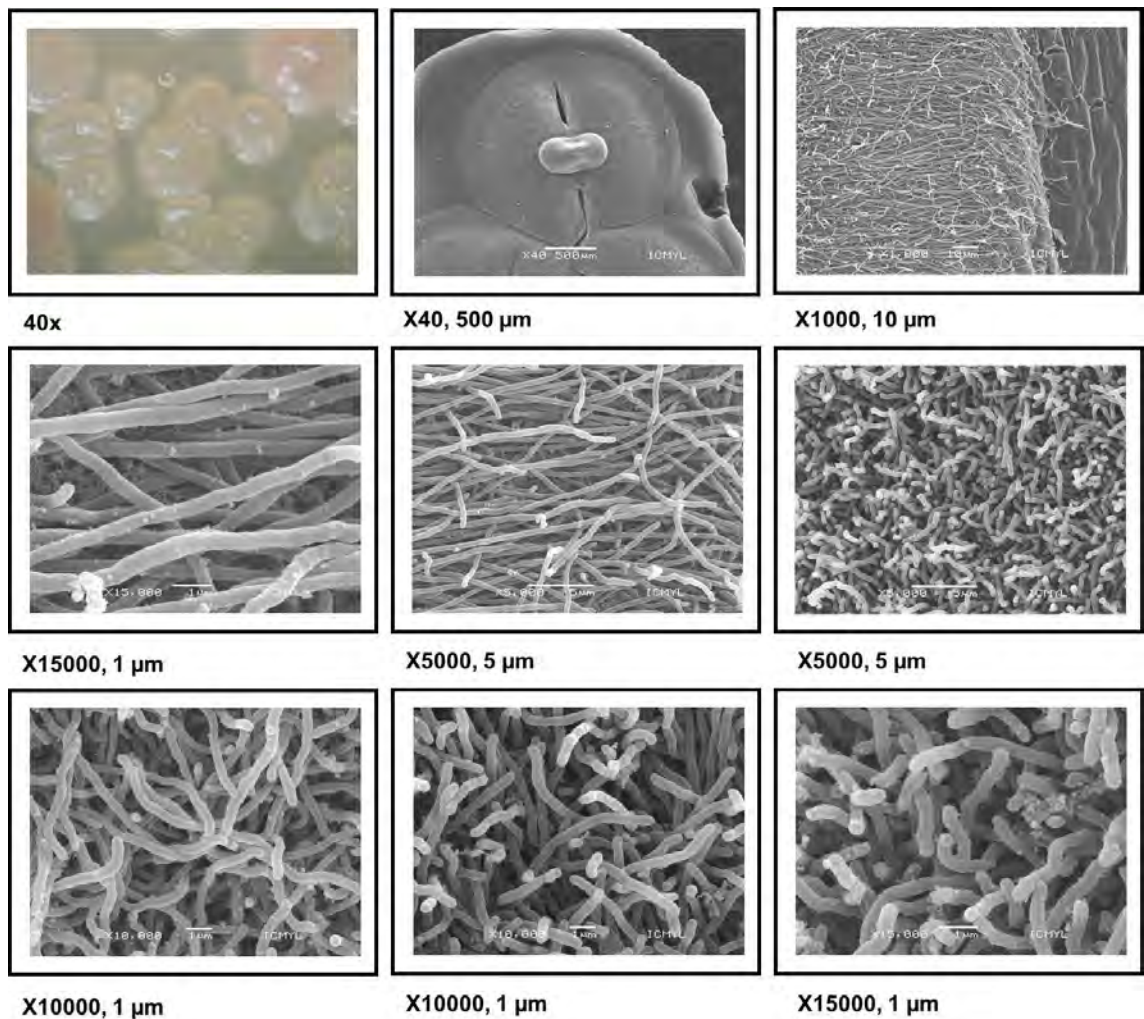
## **Efecto de las mutantes $\Delta glk$ sobre la morfología de *S. peucetius* var. *caesius***

Se ha reportado que la RCC, la síntesis de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica son procesos que se encuentran estrechamente relacionados. En medio sólido, las mutantes mostraron cambios en la estructura y coloración de las colonias, de forma más evidente  $\Delta ATPglk$ , por ello, decidimos evaluar las mutantes  $\Delta glk$  a través del microscopio electrónico de barrido y comparar con la cepa parental.



**Figura 27.** Mutante  $\Delta ATPglk$  de *S. peucetius* var. *caesius* vista al microscopio estereoscópico (cuadro superior izquierdo) y al microscopio electrónico de barrido (resto de las imágenes).

Ya se había estudiado la cepa parental mediante el uso de microscopía electrónica de barrido y se encontró que no forma esporas. La Figura 27 muestra que a pesar de que hay un cambio en la apariencia de las colonias, no hay un cambio evidente en la formación del micelio secundario entre las mutantes.



**Figura 28.** Mutante  $\Delta PPglk$  de *S. peuceitius* var. *caesius* vista al microscopio estereoscópico (cuadro superior izquierdo) y al microscopio electrónico de barrido (resto de las imágenes).

Quizá los cambios observados estén estrechamente relacionados con la proporción de antraciclinas que forma cada mutante, cómo ya se observó,  $\Delta ATPglk$  produce menos antraciclinas comparando con la cepa parental en algunas de las condiciones ya evaluadas. Para corroborar que pudiera haber una afectación en la diferenciación morfológica tendrían que hacerse otro tipo de estudios (Yagüe et al., 2013).

Para *S. peucetius var. caesius*, la PP-Glk no parece ser una enzima indispensable en su fisiología, ya que la mutante nula en este gen aún puede utilizar glucosa además de otras fuentes de carbono, no hay afectación en la RCC, y, por el contrario, la síntesis de antraciclinas se ve favorecida.

# CONCLUSIONES

- I. En este trabajo se obtuvieron las condiciones óptimas de conjugación entre *E. coli* y *S. peucetius* var. *caesius* que permitió obtener las mutantes  $\Delta$ ATP $glk$  y  $\Delta$ PP $glk$ .
- II. La enzima PP-Glk no contribuye directamente en la generación de esqueletos carbonados para la síntesis de antraciclinas en *S. peucetius* var. *caesius*.
- III. La mutante nula en PP-Glk sintetiza una mayor cantidad de antraciclinas al comparar con la cepa parental en el medio definido NDYE usando glicerol o almidón como fuente de carbono.
- IV. La enzima PP-Glk no participa en el proceso de regulación de la RCC en *S. peucetius* var. *caesius*.
- V. La enzima PP-Glk no suple la actividad enzimática y reguladora de la ATP-Glk.
- VI. La PP-Glk no es una proteína indispensable en *S. peucetius* var. *caesius* para el metabolismo de glucosa y otros azúcares, para la síntesis de antraciclinas y en la RCC.
- VII. Las enzimas ATP-Glk y PP-Glk modulan el uso de otras fuentes de carbono, de forma independiente a la glucosa.
- VIII. La ausencia de ATP-Glk reduce la capacidad de consumo de glucosa, quizá se requiere de esta enzima para interaccionar con el transportador GlcP para llevar a cabo el correcto transporte.
- IX. En ausencia de ATP-Glk, se ve reducida la actividad de PP-Glk, quizá sea también una afectación en el transportador de glucosa.
- X. La enzima ATP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius* participa en el proceso de RCC.
- XI. Estos resultados demuestran que en la cepa *S. peucetius* var. *caesius* es la ATP-Glk la principal actividad de glucosa-cinasa.

# PERSPECTIVAS

1. Obtener la doble mutante en *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*:

Preguntas:

- ¿Esta cepa aún puede crecer en glucosa como única fuente de carbono?
- ¿Hay algún cambio en el consumo de otras fuentes de carbono como ocurren con las mutantes sencillas?
- ¿Aumenta la síntesis de antraciclinas?
- ¿Hay un cambio en la RCC respecto a lo observado en la mutante  $\Delta\text{ATP}glk$ ?

2. La proteína ATP-Glk (V125A) tiene una mutación que provoca la pérdida de la actividad enzimática. Evaluar dicha proteína y su efecto sobre el proceso de RCC en la mutante  $\Delta\text{ATP}glk$  de *S. peucetius* var. *caesius*.

3. Evaluar cambios en la expresión del transportador de glucosa en las mutantes y su relación con cambios en el flujo de metabolitos de la glucólisis.

4. Realizar la caracterización bioquímica de la enzima PP-Glk.

5. ¿La ATP-Glk y/o la PP-Glk establecen alguna unión con el transportador de glucosa?

6. ¿La ATP-Glk y la PP-Glk formarán hetero-oligómeros?

7. Realizar la caracterización de la actividad amilolítica de *S. peucetius* var. *caesius*.

8. Evaluar la expresión del transportador de xilosa en la cepa parental y las mutantes  $\Delta glk$ .



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Development of an efficient conjugal DNA transfer system between *Escherichia coli* and a non-sporulating *Streptomyces* strain



Diana Rocha, Beatriz Ruiz-Villafán, Monserrat Manzo, Romina Rodríguez-Sanoja, Sergio Sánchez\*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Aerial mycelia  
Glucokinases  
Intergeneric conjugation  
*Streptomyces*  
Transformation

### ABSTRACT

Bacterial conjugation is a powerful tool used for DNA transfer from *Escherichia coli* into various bacteria including streptomycetes. In this methodology, spores are usually employed as recipient cells of the genetic information. However, some industrially important *Streptomyces* do not produce spores making difficult their genetic manipulation. In these strains, the use of mechanically fragmented mycelia allows DNA transfer with low efficiency. *Streptomyces peucetius* var. *caesius* is a non-sporulating bacteria which produces the antitumor compound doxorubicin. The use of aerial mycelia of this microorganism, failed to get intergeneric conjugation with *E. coli*. In the present work, by using young aerial mycelia of this microorganism and an excess of *E. coli* cells ( $\sim 7 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) in soybean-mannitol medium (MS) supplemented with 20 mM MgCl<sub>2</sub> resulted in a high number of exconjugant colonies ( $5 \times 10^{-4}$ ) when compared to other reports from this genus ( $1.1 \times 10^{-5}$  to  $2.5 \times 10^{-8}$ ). The effectiveness of these conditions was confirmed by isolating null mutants of two different glucokinases from *S. peucetius* var. *caesius*. The novelty in using young aerial mycelia as receptor cells, allowed an efficient conjugative process and opened the way for genetic manipulation of additional non-spore forming actinobacteria exhibiting natural resistance to be genetically manipulated.

### 1. Introduction

*Streptomyces* are Gram-positive microorganisms residing in different natural environments. They are the major producers of biologically active metabolites and exhibit remarkable industrial importance (Khan et al., 2011; Berdy, 2015). In this context, the influence of the streptomycetes genetic manipulation has been crucial for understanding the physiology, regulation and improvement of processes involved in the production of compounds with biological activity (Chen et al., 2010; Kunnari et al., 2000). Some transformation techniques have been developed in the model strain *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (Kieser et al., 2000). One is the protoplast transformation, commonly used to transfer foreign DNA to *Streptomyces*. However, due to interspecies variations this procedure results laborious since appropriate conditions for protoplast generation should be established for each particular strain (Baltz, 1998; Voeykova et al., 1998). The second one is the intergeneric conjugation between *Escherichia coli* cells and *Streptomyces* spores. This technique, initially described in 1989 (Mazodier et al., 1989), has been successfully used in several species of this genus and resulted highly efficient when compared to the genetic transfer obtained by protoplast

transformation. The procedure has been adapted to various actinobacteria, allowing the transfer of plasmids manipulated in *E. coli* into *Streptomyces* strains (Blaesing et al., 2005; Choi et al., 2004). However, this technique is hampered when the targeted strains do not produce spores. Nevertheless, in this situation intergeneric conjugation has been obtained by using mechanically fragmented mycelia (Bierman et al., 1992; Hamano et al., 2005; Paranthaman and Dharmalingam, 2003). However, the conjugation conditions resulted highly strain-specific and usually ineffective for different actinobacteria (Enríquez et al., 2006; Kim et al., 2008; Phornphisutthimas et al., 2010).

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* is an industrially relevant mutant, obtained from *S. peucetius* by N-nitroso-N-methyl urethane treatment, selected by its orange-red mycelium color, correlated to doxorubicin production, a derivative from daunomycin (Arcamone et al., 1969), which produces doxorubicin, a compound used in the treatment of different types of cancer (Tacar et al., 2013). To overproduce doxorubicin, this mutant has been genetically manipulated by protoplast fusion (Segura et al., 1997; Oh et al., 2010) and by transduction with  $\phi$ C31-derived phages (Lomovskaya et al., 1999). However, intergeneric conjugation between *E. coli* and *S. peucetius* var. *caesius* has not been

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [divonne29@comunidad.unam.mx](mailto:divonne29@comunidad.unam.mx) (D. Rocha), [beatrizruiz@biomedicas.unam.mx](mailto:beatrizruiz@biomedicas.unam.mx) (B. Ruiz-Villafán), [monse\\_briplac@msn.com](mailto:monse_briplac@msn.com) (M. Manzo), [romina@biomedicas.unam.mx](mailto:romina@biomedicas.unam.mx) (R. Rodríguez-Sanoja), [sersan@biomedicas.unam.mx](mailto:sersan@biomedicas.unam.mx) (S. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.006>

Received 28 September 2017; Received in revised form 6 November 2017; Accepted 7 November 2017

Available online 07 November 2017

0167-7012/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned

Alba Romero-Rodríguez<sup>1</sup> · Diana Rocha<sup>1</sup> · Beatriz Ruiz-Villafán<sup>1</sup> · Silvia Guzmán-Trampe<sup>1</sup> · Nidia Maldonado-Carmona<sup>1</sup> · Melissa Vázquez-Hernández<sup>1</sup> · Augusto Zelarayán<sup>1</sup> · Romina Rodríguez-Sanoja<sup>1</sup> · Sergio Sánchez<sup>1</sup>

Received: 3 June 2017 / Accepted: 30 July 2017  
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

**Abstract** One of the most significant control mechanisms of the physiological processes in the genus *Streptomyces* is carbon catabolite repression (CCR). This mechanism controls the expression of genes involved in the uptake and utilization of alternative carbon sources in *Streptomyces* and is mostly independent of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (PTS). CCR also affects morphological differentiation and the synthesis of secondary metabolites, although not all secondary metabolite genes are equally sensitive to the control by the carbon source. Even when the outcome effect of CCR in bacteria is the same, their essential mechanisms can be rather different. Although usually, glucose elicits this phenomenon, other rapidly metabolized carbon sources can also cause CCR. Multiple efforts have been put through to the understanding of the mechanism of CCR in this genus. However, a reasonable mechanism to explain the nature of this process in *Streptomyces* does not yet exist. Several examples of primary and secondary metabolites subject to CCR will be examined in this review. Additionally, recent advances in the metabolites and protein factors involved in the *Streptomyces* CCR, as well as their mechanisms will be described and discussed in this review.

**Keywords** *Streptomyces* · Regulatory mechanisms · Repression · Gene expression · Secondary metabolites · Morphological differentiation


### Introduction

#### Importance of carbon catabolite repression

In *Streptomyces* and other microorganisms, carbon source regulation, commonly known as carbon catabolite repression (CCR), is one of the most conserved mechanisms protecting the cells against wasting the protein-synthesizing machinery. CCR is an important mechanism for competition in natural environments, since the selection of preferred carbon sources is a major determining factor in the microbial growth rate and therefore, supports successful competition with other microorganisms (Gorke and Stülke 2008). This mechanism regulates the expression of genes involved in the uptake and utilization of alternative carbon sources and operates when more than one utilizable substrate is present in the environment. As many as 5–10% of all bacterial genes are subject to this type of regulation. While the cell produces specific enzymes to catabolize the rapidly assimilated carbon sources, the enzymes involved in other substrates utilization are repressed until the primary substrate is exhausted, and it is at that moment that the second best starts to be utilized. Although CCR is usually exerted by glucose, in different microorganisms other rapidly metabolized carbon sources can cause repression and, even, can repress the catabolism of glucose (Demain 1989).

Glucose, usually an excellent carbon source for growth, when used in high concentrations also interferes with the formation of many compounds, including secondary

Alba Romero-Rodríguez and Diana Rocha have contributed equally to this work.

 Sergio Sánchez  
sersan@biomedicas.unam.mx

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Exterior de Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico



## Trabajo sometido

### Applied Microbiology and Biotechnology

#### Dissecting the role of the two *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucokinases in the sensitivity to carbon catabolite repression

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Dissecting the role of the two <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> glucokinases in the sensitivity to carbon catabolite repression
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Applied microbial and cell physiology
Corresponding Author:	Sergio Sanchez, M.D., Ph.D. Universidad Nacional Autonoma de Mexico Mexico, CDMX MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Diana I. Rocha
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Diana I. Rocha Alba I. Romero-Rodríguez, PhD Beatriz Ruiz-Villafán, PhD Romina Rodríguez-Sanoja, PhD Sergio Sanchez, M.D., Ph.D.

# BIBLIOGRAFÍA

- Angell S, Schwarz E, Bibb M. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol Microbiol* 6(19):2833-44.
- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ. 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): A likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular and General Genetics MGG* 244(2):135-43.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 11(6):1101-10.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clement C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2015. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(1):1-43.
- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothaft H, Saier MH, Jr, Titgemeyer F. 2004. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 186(5):1362-73.
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno E, Rao RN, Schonher B. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116(1):43-9.
- Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TG, Galinier A, Bibb MJ. 1999. Analysis of a ptsH homologue from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *FEMS Microbiol Lett* 177(2):279-88.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34(2):171-98.
- Cheng YR, Huang J, Qiang H, LIN WL, Demain AL. 2001. Mutagenesis of the rapamycin producer *Streptomyces hygroscopicus* FC904. *J Antibiot* 54(11):967-72.
- Choi S, Lee C, Hwang Y, Kinoshita H, Nihira T. 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B1 producer. *Arch Microbiol* 181(4):294-8.
- Chouayekh H, Nothaft H, Delaunay S, Linder M, Payraastre B, Seghezzi N, Titgemeyer F, Virolle MJ. 2007. Phosphoinositides are involved in control of the glucose-dependent growth resumption that follows the transition phase in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 189(3):741-9.
- Colton DM and Stabb EV. 2016. Rethinking the roles of CRP, cAMP, and sugar-mediated global regulation in the *Vibrionaceae*. *Curr Genet* 62(1):39-45.

- Coze F, Gilard F, Tcherkez G, Virolle M, Guyonvarch A. 2013. Carbon-flux distribution within *Streptomyces coelicolor* metabolism: A comparison between the actinorhodin-producing strain M145 and its non-producing derivative M1146. PLoS One 8(12):e84151.
- Datsenko KA and Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97(12):6640-5.
- Dekleva ML and Strohl WR. 1987. Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. Can J Microbiol 33(12):1129-32.
- Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. Can J Microbiol 31(3):287-94.
- Deutscher J, Ake FM, Derkaoui M, Zebre AC, Cao TN, Bouraoui H, Kentache T, Mokhtari A, Milohanic E, Joyet P. 2014. The bacterial phosphoenolpyruvate:Carbohydrate phosphotransferase system: Regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. Microbiol Mol Biol Rev 78(2):231-56.
- Du L, Liu R, Ying L, Zhao G. 2012. An efficient intergeneric conjugation of DNA from *Escherichia coli* to mycelia of the lincomycin-producer *Streptomyces lincolnensis*. International Journal of Molecular Sciences 13(4):4797-806.
- Enríquez LL, Mendes MV, Antón N, Tunca S, Guerra SM, Martín JF, Aparicio JF. 2006. An efficient gene transfer system for the pimarin producer *Streptomyces natalensis*. FEMS Microbiol Lett 257(2):312-8.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S. 1999. Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Appl Microbiol Biotechnol 52(4):572-8.
- Flores M, Ponce E, Rubio M, Huitron C. 1993. Glucose and glycerol repression of  $\alpha$ -amylase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. Biotechnol Lett 15(6):595-600.
- Galinier A and Deutscher J. 2017. Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system. J Mol Biol 429(6):773-89.
- Giraud E, Gosselin L, Marin B, Parada J, Raimbault M. 1993. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. J Appl Microbiol 75(3):276-82.
- Görke B and Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. Nature Reviews Microbiology 6(8):613.
- Gray MJ and Jakob U. 2015. Oxidative stress protection by polyphosphate—new roles for an old player. Curr Opin Microbiol 24:1-6.

- Guan D and Pettis G. 2009. Intergeneric conjugal gene transfer from *Escherichia coli* to the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*. *Lett Appl Microbiol* 49(1):67-72.
- Gubbens J, Janus M, Florea BI, Overkleeft HS, Wezel GP. 2012. Identification of glucose kinase-dependent and-independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Mol Microbiol* 86(6):1490-507.
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. 2003. PCR-targeted streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):1541-6.
- Guzmán S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, Lopez R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sanchez S, Langley E. 2005a. Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology* 151(5):1717-23.
- Guzmán S, Ramos I, Moreno E, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Escalante L, Langley E, Sanchez S. 2005b. Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(2):200-6.
- Hamano Y, Nicchu I, Hoshino Y, Kawai T, Nakamori S, Takagi H. 2005. Development of gene delivery systems for the  $\epsilon$ -poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(6):636-41.
- Hodgson DA. 1982. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *Microbiology* 128(10):2417-30.
- Hošťálek Z, Tobek I, Bobyk M, Kulayev I. 1976. Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol (Praha)* 21(2):131-8.
- Hsieh PC, Shenoy BC, Samols D, Phillips NF. 1996. Cloning, expression, and characterization of polyphosphate glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 271(9):4909-15.
- Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ, Chater KF. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and General Genetics MGG* 196(3):501-7.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Ōmura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21(5):526.
- Imriskova I, Langley E, Arreguín-Espinosa R, Aguilar G, Pardo J, Sanchez S. 2001. Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch Biochem Biophys* 394(2):137-44.

- Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Sanchez S. 2005. Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res Microbiol* 156(3):361-6.
- Jahid IK, Silva AJ, Benitez JA. 2006. Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment. *Appl Environ Microbiol* 72(11):7043-9.
- Kawai S, Mukai T, Mori S, Mikami B, Murata K. 2005. Hypothesis: Structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(4):320-30.
- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. Practical *Streptomyces* genetics. 2000. Norwich: The John Innes Foundation Google Scholar .
- Koide M, Miyanaga A, Kudo F, Eguchi T. 2013. Characterization of polyphosphate glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Biosci Biotechnol Biochem* 77(11):2322-4.
- Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozone I, Izumikawa M, Hashimoto J, Takagi M, Omura S, Shin-ya K. 2013. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synthetic Biology* 2(7):384-96.
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riche D. 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* 68(1):89-125.
- Kuhn J, Müller H, Salzig D, Czermak P. 2015. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Ejb* 18(3):252-5.
- Kumar A, Gangaiah D, Torrelles JB, Rajashekara G. 2016. Polyphosphate and associated enzymes as global regulators of stress response and virulence in *Campylobacter jejuni*. *World J Gastroenterol* 22(33):7402-14.
- Kwakman JH and Postma PW. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 176(9):2694-8.
- Labeda DP. 2011. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(10):2525-31.
- Lindner SN, Knebel S, Pallerla SR, Schoberth SM, Wendisch VF. 2010. Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(2):703-13.
- Lomovskaya N, Otten SL, Doi-Katayama Y, Fonstein L, Liu XC, Takatsu T, Inveni-Solari A, Filippini S, Torti F, Colombo AL, and others. 1999. Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: Cloning and characterization of the dnrU ketoreductase and

- dnrV genes and the doxA cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J Bacteriol* 181(1):305-18.
- Lorentz K. 2000. Routine alpha-amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1, 4-alpha-D-maltoheptaoside and a novel alpha-glucosidase. *Clin Chem* 46(5):644-9.
- MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111(1):61-8.
- Mahr K, van Wezel GP, Svensson C, Kregel U, Bibb MJ, Titgemeyer F. 2000. Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Large-scale purification and biochemical analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(3-4):253-61.
- Malla S, Niraula NP, Singh B, Liou K, Sohng JK. 2010. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peuceitius*. *Microbiol Res* 165(5):427-35.
- Marrero J, Trujillo C, Rhee KY, Ehrt S. 2013. Glucose phosphorylation is required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence in mice. *PLoS Pathogens* 9(1):e1003116.
- McCormick JR and Flärdh K. 2011. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev* 36(1):206-31.
- McMahon HE, Kelly CT, Fogarty WM. 1999. High maltose-producing amylolytic system of a *Streptomyces* sp. *Biotechnol Lett* 21(1):23-6.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56(2):185-229.
- Miyashita K, Fujii T, Saito A. 2000. Induction and repression of a *Streptomyces lividans* chitinase gene promoter in response to various carbon sources. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(1):39-43.
- Mukai T, Kawai S, Matsukawa H, Matuo Y, Murata K. 2003. Characterization and molecular cloning of a novel enzyme, inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase, of *Arthrobacter* sp. strain KM. *Appl Environ Microbiol* 69(7):3849-57.
- Nguyen J, Francou F, Virolle MJ, Guerineau M. 1997. Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by reg1, a pleiotropic regulatory gene. *J Bacteriol* 179(20):6383-90.
- Ni X and Westpheling J. 1997. Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13116-21.

- Niraula NP, Kim S, Sohng JK, Kim E. 2010. Biotechnological doxorubicin production: Pathway and regulation engineering of strains for enhanced production. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(4):1187-94.
- Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F. 2003. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J Bacteriol* 185(23):7019-23.
- Novotná J and Hošťálek Z. 1985. Phosphorylation of hexoses in *Streptomyces aureofaciens*: Evidence that the phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system is not operative. *FEMS Microbiol Lett* 28(3):347-50.
- Oyserman BO, Moya F, Lawson CE, Garcia AL, Vogt M, Heffernan M, Noguera DR, McMahon KD. 2016. Ancestral genome reconstruction identifies the evolutionary basis for trait acquisition in polyphosphate accumulating bacteria. *The ISME Journal* 10(12):2931.
- Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^E$  is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* 181(1):204-11.
- Paranthaman S and Dharmalingam K. 2003. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene. *Appl Environ Microbiol* 69(1):84-91.
- Parche S, Schmid R, Titgemeyer F. 1999. The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*. *The FEBS Journal* 265(1):308-17.
- Park S, Kim H, Yoo S, Oh T, Lee J. 2000. Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 188(2):209-15.
- Pepin CA and Wood HG. 1986. Polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. kinetics and demonstration that the mechanism involves both processive and nonprocessive type reactions. *J Biol Chem* 261(10):4476-80.
- Perez-Redondo R, Santamarta I, Bovenberg R, Martín JF, Liras P. 2010. The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology* 156(5):1527-37.
- Phillips N, Hsieh PC, Kowalczyk T. 1999. Polyphosphate glucokinase. In: *Inorganic polyphosphates*. Springer. 101 p.
- Phornphisutthimas S, Sudtachat N, Bunyoo C, Chotewutmontri P, Panijpan B, Thamchaipenet A. 2010. Development of an intergeneric conjugal transfer system for rimocidin-producing *Streptomyces rimosus*. *Lett Appl Microbiol* 50(5):530-6.
- Piette A, Derouaux A, Gerkens P, Noens EE, Mazzucchelli G, Vion S, Koerten HK, Titgemeyer F, De Pauw E, Leprince P. 2005. From dormant to germinating spores of

- Streptomyces coelicolor* A3 (2): New perspectives from the crp null mutant. Journal of Proteome Research 4(5):1699-708.
- Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. 2009. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. Annu Rev Biochem 78:605-47.
- Rocha D, Ruiz-Villafán B, Manzo M, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. 2018. Development of an efficient conjugal DNA transfer system between *Escherichia coli* and a non-sporulating *Streptomyces* strain. J Microbiol Methods 144:60-6.
- Rodríguez S, Santamaría RI, Fernández-Ábalos JM, Díaz M. 2005. Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 xysA promoter. Gene 351:1-9.
- Romero A, Ruiz B, Sohng JK, Koirala N, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. 2015. Functional analysis of the GlcP promoter in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Appl Biochem Biotechnol 175(6):3207-17.
- Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. 2015. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1849(8):1017-39.
- Romero-Rodríguez A, Ruiz-Villafán B, Rocha-Mendoza D, Manzo-Ruiz M, Sánchez S. 2015. Biochemistry and regulatory functions of bacterial glucose kinases. Arch Biochem Biophys 577:1-10.
- Romero-Rodríguez A, Maldonado-Carmona N, Ruiz-Villafán B, Koirala N, Rocha D, Sánchez S. 2018. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. Antonie Van Leeuwenhoek :1-21.
- Romero-Rodríguez A, Rocha D, Ruiz-Villafán B, Tierrafría V, Rodríguez-Sanoja R, Segura-González D, Sánchez S. 2016. Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. BMC Microbiology 16(1):77.
- Romero-Rodríguez A, Rocha D, Ruiz-Villafán B, Guzmán-Trampe S, Maldonado-Carmona N, Vázquez-Hernández M, Zelarayán A, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. 2017. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: New insights and lessons learned. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33(9):162.
- Rosana-Ani L, Skarlatos P, Dahl MK. 1999. Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR): A link between enzymatic regulation and CCR? FEMS Microbiol Lett 171(2):89-96.
- Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Aguilar-Osorio G, Gosset G, Sanchez S. 2014. Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Appl Microbiol Biotechnol 98(13):6061-71.



- Saier MH, Jr. 2015. The bacterial phosphotransferase system: New frontiers 50 years after its discovery. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25(2-3):73-8.
- Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Miyashita K. 1998. *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 180(11):2911-4.
- Sambrook J and Russell DW. 2006. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual.
- Sánchez J and Hardisson C. 1980. Glucose inhibition of galactose-induced synthesis of  $\beta$ -galactosidase in *Streptomyces violaceus*. *Arch Microbiol* 125(1-2):111-4.
- Sanchez S, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Ávalos M, Guzmán-Trampe S. 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot* 63(8):442.
- Segura D, González R, Rodríguez R, Sandoval T, Escalante L, Sanchez S. 1996. *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol* 4(1):30-6.
- Seno E and Chater K. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* 129(5):1403-13.
- Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. 1985. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Molecular and General Genetics MGG* 200(3):415-21.
- Somavanshi R, Ghosh B, Sourjik V. 2016. Sugar influx sensing by the phosphotransferase system of *Escherichia coli*. *PLoS Biology* 14(8):e2000074.
- Spath C, Kraus A, Hillen W. 1997. Contribution of glucose kinase to glucose repression of xylose utilization in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 179(23):7603-5.
- Sun J, Kelemen GH, Fernández-Abalos JM, Bibb MJ. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* 145(9):2221-7.
- Swiatek MA, Gubbens J, Bucca G, Song E, Yang YH, Laing E, Kim BG, Smith CP, van Wezel GP. 2013. The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 195(6):1236-48.
- Szymona M. 1957. Utilization of inorganic polyphosphates for phosphorilation of glucose in *Mycobacterium phlei*. *Bull Acad Pol Sci Ser Sci Biol* 5:379-82.
- Szymona M and Ostrowski W. 1964. Inorganic polyphosphate glucokinase of *Mycobacterium phlei*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects* 85(2):283-95.

- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2013. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 65(2):157-70.
- Tanaka S, Lee SO, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda A. 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorius*. *J Bacteriol* 185(18):5654-6.
- Tezuka T, Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2009. Identification and gene disruption of small noncoding RNAs in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 191(15):4896-904.
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier Jr MH. 1994. Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology* 140(9):2349-54.
- Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuver MH, Cui X, Saier Jr MH. 1995. Identification and characterization of phosphoenolpyruvate: Fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology* 141(1):51-8.
- Titgemeyer F, Amon J, Parche S, Mahfoud M, Bail J, Schlicht M, Rehm N, Hillmann D, Stephan J, Walter B, and others. 2007. A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 189(16):5903-15.
- van Wezel GP, Mahr K, König M, Traag BA, Pimentel-Schmitt EF, Willimek A, Titgemeyer F. 2005. GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Mol Microbiol* 55(2):624-36.
- van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F. 2007. A new piece of an old jigsaw: Glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Microbiol Biotechnol* 12(1-2):67-74.
- Virolle M, Long CM, Shing C, Bibb MJ. 1988. Cloning, characterisation and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene* 74(2):321-34.
- Virolle M and Bibb M. 1988. Cloning, characterization and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces limosus*. *Mol Microbiol* 2(2):197-208.
- Wagner E, Marcandier S, Egeter O, Deutscher J, Gotz F, Bruckner R. 1995. Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* 177(21):6144-52.
- Wang F, Xiao X, Saito A, Schrempf H. 2002. *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Molecular Genetics and Genomics* 268(3):344-51.

- Wong HC, Ting Y, Lin HC, Reichert F, Myambo K, Watt KW, Toy PL, Drummond RJ. 1991. Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. J Bacteriol 173(21):6849-58.
- Yagüe P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca Á. 2013. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: State-of-the-art and future perspectives. FEMS Microbiol Lett 342(2):79-88.