



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis funcional de *sco2127*, su posible intervención en la RCC y la producción de actinorrodina en *Streptomyces coelicolor*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

FABIÁN MAURICIO SÁNCHEZ CARRILLO

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dra. Carmen Wachter Rodarte, Facultad de Química, UNAM](#)

[Dra. Romina Rodríguez-Sanoja, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad de México. octubre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el laboratorio de Microbiología Industrial (Departamento de Biología Molecular y Biotecnología) del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, CDMX, 04510, México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel                      Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Carmen Wachter Rodarte                                              Facultad de Química, UNAM

Dra. Romina Rodríguez-Sanoja                      Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Durante 2 años dentro del programa de estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas, recibí una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) como apoyo para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en \_\_\_\_\_

El jurado de Examen estuvo dirigido por:

Presidente: Dr. Ruiz Terán Francisco

Secretario: Dr. Escalante Lozada José Adelfo

Vocal: Dr. Segura Gonzáles Daniel Genaro

Vocal: Dr. Mejía Álvarez Armando

Vocal: Dr. Trujillo Roldán Mauricio Alberto

Tutor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Sustentante:

\_\_\_\_\_  
Fabián Mauricio Sánchez Carrillo



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su incansable paciencia y respaldo durante la presente investigación.

A la Dra. Romina Rodríguez-Sanoja por sus críticas constructivas y consejos tan útiles para la realización de esta tesis.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por su guía académica y por recordarme la importancia del rigor científico.

A la Dra. Carmen Wachter Rodarte por ser un ejemplo de fortaleza ante la vida, sus invaluable consejos, su motivación e impulso.

A mis compañeros de laboratorio de Microbiología Industrial en el IIB “Angie”, “Caty”, Daniel, Brenda, Diana, Alba, Víctor, Adán, *Lalo*, Paola, Aurora, Tania, “Yolis”, Jesús, “Rickhard”, Itzel, Paloma, “Susie”, Alonso, Silvia, Alfredo, Hugo, por su amistad y respaldo incondicional.



## DEDICATORIAS

A mi padre, a quien extraño y espero se sienta tan orgulloso de mí, como me siento yo de él.

A mi madre, por mostrarme que una actitud positiva es la llave del éxito.

Para Amelia, por rescatarme siempre en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi abuela Manuela, por darme asilo en su gran corazón.

A mis tíos Laura Sánchez y Francisco Guevara, por su respaldo moral e incondicional; así como a mis primos/hermanos Berenice, Álvaro, Francisco, y Edgar.

A mis hermanos Oscar, Blanca Iveth y Alejandro, a quienes adoro y admiro.

A Bety "*Master*" por ser mi guía y permitirme aprender de ti, pues eres una maravillosa persona.

A mi tío Manuel, por tratar de llenar a su modo el inmenso vacío que deja un padre cuando ya no está con nosotros.

A mi tío Simón, por demostrar que la constancia y el trabajo comprometido son medios para desarrollar una vida digna.

A Daniela, por acompañarme en este viaje; porque tu amor es mi mayor recompensa.



*"La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda"*  
**Voltaire** (1694-1778)

*"La ignorancia engendra más confianza de la que con frecuencia engendra el conocimiento: son aquellos que saben poco, y no aquellos que saben mucho, los que afirman positivamente que tal o cual problema jamás podrá ser resuelto por las ciencias"*  
**Charles Darwin** (1809 –1882)

*"La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real"*  
**Max Planck** (1858-1947)

*"Nada en la Biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución"*  
**Theodosius Dobzhansky** (1900-1975)

*"El aspecto más triste de la vida en este momento es que, la ciencia reúne el conocimiento más rápidamente de lo que la sociedad reúne sabiduría"*  
**Isaac Asimov** (1920 -1992)

*"La ciencia es una forma de pensar, mucho más que un cuerpo de conocimientos"*  
**Carl Sagan** (1934-1996)



## Abreviaturas

RCC	Represión Catabólica por Carbono
RCG	Represión Catabólica por Glucosa
RC	Represión Catabólica
CGM	Cepa Genéticamente Modificada
PTS:PEP	Sistema de Fosfotransferasas de azúcares dependiente de fosfoenol piruvato. (por sus siglas en inglés: Phosphotransferase Sugar System: Phosphoenolpyruvate dependent PEP).
HPr	Proteína que contiene histidina transportadora de fosfato.
EIIA, EIIB, EIIC y EIID	Dominios funcionales de permeasas específicas del sistema PTS, están compuestas por 4 Proteínas o dominios proteínicos, de los cuales por lo menos uno de ellos se halla unido a membrana. Para indicar especificidad de sustrato, una abreviatura de tres letras del sustrato transportado, o de la función reguladora asociada, se agrega como superíndice al componente E correspondiente; por ejemplo, EIIA <sup>Glc</sup> corresponde al dominio EIIA específico de la glucosa y EIIA <sup>Ntr</sup> al EIIA del regulador de nitrógeno PTS.
HPrK / P	HPr quinasa / fosforilasa
“~”	El símbolo “~” indica un enlace de fosforilo de alta energía, para diferenciarlo, por ejemplo, de las proteínas fosforiladas en el residuo Serina, que se escriben como P-Ser
ATP	El trifosfato de adenosina (adenosín trifosfato, del inglés adenosine triphosphate)
AC	Adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1), también conocida como ciclasa de adenilato o Adenil ciclasa.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico (cAMP, AMP cíclico o adenosín monofosfato-3',5' cíclico) Es un derivado del adenosín trifosfato (ATP), y se produce mediante la acción de la enzima adenilato ciclasa a partir del adenosín trifosfato
CRP	Del inglés <i>CyclicAMP Receptor Protein</i> ; proteína receptora de AMPc, también conocido bajo el nombre de proteína activadora de catabolitos CAP ( <i>Catabolite Activator Protein</i> )
CcpA	Regulador transcripcional proteína-A de control de catabolitos (del inglés <i>Control catabolite pretein A</i> )
Cre	Del inglés <i>Catabolite Responsive Element</i> . Sitios (ADN) de operador específicos, llamados elementos sensibles (o de repuesta) a catabolitos.

Crh	Del inglés <i>Catabolite repression HPr</i> . Proteína similar a HPr capaz de inducir la unión de CcpA a sitios Cre.
PRD	Algunos reguladores de la transcripción controlados por PTS poseen un dominio (o dos) específico, llamado dominio de regulación por PTS (En inglés PRD: <i>PTS Regulation Domain</i> ),
MtIR	Del inglés <i>Mannitol regulator</i> . Es un Tipo de regulador PRD que exhibe una prioridad para familias específicas de PTS; fructosa/manitol.
LicR	Del inglés <i>Lic Operon Regulator</i> es un tipo de regulador PRD que exhibe una prioridad para familias específicas de PTS; lactosa/celobiosa y galacticol.
RAT	Del inglés <i>Ribonucleic AntiTerminator sequence</i> . Secuencia antiterminador ribonucleico.
ROK	Del Inglés Represor Open Reading Frame Kinases. Familia de proteínas cinasas represoras de marco de lectura.
Glk	Glucosa cinasa de <i>Streptomyces coelicolor</i> (miembro de la Familia ROK)
<i>glkA</i>	Gen de la Glk
<i>sco2127</i>	Nombre dado a la secuencia de nucleótidos ubicado en 2,286,991 <- 2,287,566 en el genoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> . Sinónimo SC6E10.21c.
SCO2127	Proteína hipotética del gen <i>sco2127</i>
GlcP	Permeasa simportadora de glucosa y protones (H <sup>+</sup> ) en <i>Streptomyces coelicolor</i> ; de la Superfamilia de Facilitadores Principales, en inglés: <i>Glucose Permease Mayor Facilitator Superfamily</i>
<i>dog</i>	Molécula 2-desoxiglucosa, un análogo de la glucosa no asimilable, pero capaz de activar el sistema de regulación por carbono en <i>Streptomyces coelicolor</i> .
<i>dogR</i>	Nombre del genotipo de cepa capaz de crecer en presencia de la molécula 2-desoxiglucosa.
Mutantes <i>Streptomyces DogR</i>	Fenotipo de cepas de <i>Streptomyces</i> capaces de crecer en presencia de <i>dog</i> .



# Índice general

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES .....	3
2.1 Biología general del Phylum Actinobacteria.....	3
2.2 Modelo de estudio: <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	5
2.3 Represión catabólica por carbono.....	7
2.3.1 RCC dirigida por PTS:PEP en procariontes .....	9
2.3.2 Mecanismo de RCC en <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.3.3 Mecanismo de RCC en <i>Bacillus subtilis</i> .....	15
2.4 La regulación del PTS trasciende la RCC .....	19
2.4.1 Factores transcripcionales que contienen PRD .....	20
2.4.2 Mecanismo de regulación de los antiterminadores que contienen PRD .....	22
2.4.3 Mecanismo de regulación de los activadores transcripcionales de tipo MtlR / LicR ..	23
2.4.4 Regulación de los activadores transcripcionales de tipo LevR.....	24
2.5 PTS en <i>Streptomyces</i> .....	25
2.6 RCC en <i>Streptomyces</i> .....	26
2.6.1 El papel de Glk en la RCC de <i>Streptomyces</i> .....	28
3. Justificación.....	32
4. HIPÓTESIS .....	33
5. OBJETIVO GENERAL .....	34
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6. ESTRATEGIA GENERAL .....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
8.1 Amplificación del gen <i>sco2127</i> por PCR.....	45
8.2 Clonación del gen <i>sco2127</i> en el vector pGEM®-T-Easy.....	46

8.3 Construcción de pSET2127.....	47
8.4 Amplificación incompleta del gen de higromicina.....	48
8.5 La CGM $\Delta sco2127$ cicatriz en efecto carecen del gen deletado.....	49
8.6 Obtención de variantes cortas de <i>sco2127</i> por PCR.....	50
8.7 <i>S. coelicolor</i> $\Delta sco2127$ :: <i>apra</i> presenta sobreproducción de actinorrodina.....	51
8.8 <i>S. coelicolor</i> $\Delta sco2127$ cicatriz presenta una disminución en la producción de actinorrodina.....	52
8.9 La delección de <i>sco2127</i> parece afectar el crecimiento de <i>S. coelicolor</i> .....	53
8.9.1 <i>Streptomyces coelicolor</i> $\Delta sco2127$ transformada con el pSET2127 presenta reversión de fenotipo en medio complejo sólido.....	54
8.9.2 La proteína SCO2127 presenta características similares a una <i>proteína/sensor</i> citoplasmática.....	58
9. CONCLUSIONES:.....	62
10. PERSPECTIVAS.....	63
Referencias.....	64
ANEXO A. Ubicación en el genoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> y de <i>sco2127</i> , secuencias y genes adyacentes.....	74
ANEXO B. MODELO de RCG propuesto en <i>S. coelicolor</i> .....	84
ANEXO C. Medios de Cultivo y soluciones.....	85

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Diversidad y distribución del phylum actinobacteria .....	Página 3
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida <i>S. coelicolor</i> y ubicación taxonómica .....	Página 5
<b>Figura 3.</b> PTS en <i>Escherichia coli</i> . .....	Página 9
<b>Figura 4.</b> PTS en <i>Bacillus subtilis</i> .....	Página 11
<b>Figura 5.</b> RCG controlada por PEP-PTS de <i>E.coli</i> .....	Página 13
<b>Figura 6.</b> RCG controlada por PEP-PTS de <i>E.coli</i> para maltosa .....	Página 14
<b>Figura 7.</b> RCC / PEP-PTS / P-Ser-HPr / CcpA / cre ternario en <i>B. subtilis</i> .....	Página 16
<b>Figura 8.</b> Funciones celulares en las que participa el PTS. ....	Página 19
<b>Figura 9.</b> Dominios: activadores/antiterminadores transcripcionales PRD .....	Página 21
<b>Figura 10.</b> Regulación del antiterminador transcripcional LicT .....	Página 22
<b>Figura 11.</b> Regulación del activador transcripcional MtlR de <i>B. subtilis</i> .....	Página 23
<b>Figura 12.</b> Regulación del activador transcripcional LevR de <i>B. subtilis</i> .....	Página 24
<b>Figura 13.</b> Sistemas de transporte de carbohidratos en <i>S. coelicolor</i> .....	Página 27
<b>Figura 14.</b> Plásmidos y cepas para este estudio. ....	Página 36
<b>Figura 15.</b> Esquema de temperaturas amplificación por PCR .....	Página 40
<b>Figura 16.</b> Electroforesis PCR de <i>sco2127</i> .....	Página 45
<b>Figura 17.</b> Electroforesis digestión de pGEM2127. ....	Página 46
<b>Figura 18.</b> Construcción del plásmido pSET2127. ....	Página 47
<b>Figura 19.</b> identificación del gen de higromicina .....	Página 48
<b>Figura 20.</b> Electroforesis en gel de agarosa PCR de productos cicatriz. ....	Página 49
<b>Figura 21.</b> Mapa verificación de ausencia <i>sco2127</i> .....	Página 49
<b>Figura 22.</b> Electroforesis Productos PCR de las versiones cortas de <i>sco2127</i> ... ..	Página 50
<b>Figura 23.</b> Sobreproducción de actinorrodina en la CGM $\Delta$ <i>sco2127::apra</i> .....	Página 51
<b>Figura 24.</b> Producción de actinorrodina M145 vs $\Delta$ <i>sco2127</i> .....	Página 52
<b>Figura 25.</b> Crecimiento M145 y $\Delta$ <i>sco2127</i> en medio R5 con arabinosa .....	Página 53
<b>Figura 26.</b> Diferencias en la esporulación de M145 y $\Delta$ <i>sco2127</i> .....	Página 54
<b>Figura 27.</b> Redes reguladoras de la producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> ... ..	Página 56
<b>Figura 28.</b> Dominios y estructuras secundarias de la proteína SCO2127 .....	Página 58

## Índice de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Efecto de los genes <i>sco2127</i> y <i>glkA</i> <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> ...	Página 31
<b>Tabla 2.</b> Cepas empleadas en el desarrollo del presente trabajo .....	Página 37
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos empleados para el desarrollo de este trabajo .....	Página 37
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para ligación con pGEM-T Easy .....	Página 42

## RESUMEN

En *Streptomyces coelicolor* se ha propuesto que el producto del gen *sco2127* (del cual se desconoce su función) es necesario para ejercer el fenómeno de represión catabólica por carbono. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo específico de este fenómeno. El objetivo general del presente trabajo consistió en determinar la intervención del gen *sco2127* en la represión catabólica por carbono observando la producción de actinorrodina como indicador de metabolismo secundario en *S. coelicolor*. Inicialmente, se analizó la organización genética inmediata más próxima de *sco2127* utilizando las secuencias de nucleótidos reportadas en las bases de datos para el genoma de *S. coelicolor* A 3(2). Se encontró que el gen *sco2127* se encuentra ubicado entre los nucleótidos 2,287,566 y el 2,286,991 del genoma *S. coelicolor*. Por otro lado, fue interesante observar que la región entre el gen que codifica para la enzima glucosa cinasa (*glkA*) y el gen *sco2127* es muy pequeña (solo 54 pb) lo que parece sugerir que su expresión es simultánea, o cuando menos coordinada. SCO2127 presentó características similares a una proteína/sensor citoplásmico; los ensayos bioinformáticos así lo sugirieron. Mediante un análisis de secuencia de un fragmento DNA obtenido por PCR se demostró que el gen *sco2127* se encuentra ausente en la CGM  $\Delta$ *sco2127*. La biosíntesis de actinorrodina en la CGM  $\Delta$ *sco2127* fue insensible al efecto represor de la glucosa en medio complejo lo cual apoyó la hipótesis de que SCO2127 tiene un efecto en la producción de antibióticos. La esporulación de la CGM  $\Delta$ *sco2127* se vio acelerada con respecto a la cepa silvestre ya que, a las 48 y 72 horas de crecimiento, se observó al microscopio que la esporulación inició antes en la CGM. Esto puede sugerir que el producto del gen *sco2127* tiene alguna función relacionada con la señalización, activación o represión de los operones y genes responsables de estos fenómenos. Se propone que SCO2127 se transcribe junto a *glkA* y se asocia con la proteína Glk, hasta que el cambio conformacional provocado por la catálisis de la enzima provoca una reconfiguración liberando y activando a SCO2127. El cual podría funcionar como una señal intracelular (un inductor), que asociado con otros reguladores y provoca los fenómenos observados en la producción de antibióticos como la actinorrodina y la esporulación. En apoyo a esta hipótesis, se ha descrito que estos productos se transcriben de manera simultánea. Además, se ha observado que *glkA* sufre modificaciones postraduccionales; y se sabe que Glk realiza su función enzimática mientras permanece unida a Glcp. Por otro lado, en este trabajo encontramos que la producción de actinorrodina y la esporulación en la CGM  $\Delta$ *sco2127* presentan insensibilidad a glucosa, lo que parece respaldar la hipótesis de que *sco2127* codifica una proteína sensor de glucosa intracelular. Si bien existen un gran número de proteínas reportadas con gran similitud a SCO2127 en otros genomas del género *Streptomyces*; hay poca información sobre las mismas. No obstante, su presencia y ubicación en el genoma soporta la hipótesis de su importancia para este género. Es mucho lo que aún se desconoce de la participación de *sco2127* en la represión catabólica por carbono en *S. coelicolor*. Este estudio es tan solo una aproximación que brinda elementos que pueden ser puntos de partida para futuros estudios.



# 1. INTRODUCCIÓN

Investigaciones como la presente aspiran a generar un mejor entendimiento de la naturaleza; en correspondencia con el principal objetivo de la ciencia básica (observando la debida proporción de diminuto impacto; correspondiente al ámbito de nuestra inmensa área de conocimientos). Por otro lado, las posibles aplicaciones prácticas de nuevos descubrimientos son sin duda una razón más que justifica nuestras exploraciones.

La biotecnología contemporánea se sustenta en el consumo de componentes orgánicos provenientes de diversos seres vivos; dichas sustancias son el resultado de las actividades metabólicas dentro de las células de arqueobacterias, plantas, animales, hongos y eubacterias; estos componentes a su vez se utilizan para comercializar una amplia variedad de productos, mismos que son aprovechados por otras industrias como son las de alimentos y farmacéuticas (Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. 2000).

Desde el último cuarto del siglo XX, los productos microbianos han tenido un éxito preponderante en nuestra sociedad, principalmente los metabolitos secundarios, por su gran aceptación y sus diversas aplicaciones (Demain 2014).

Entre los metabolitos secundarios microbianos más importantes se encuentran los antibióticos (Demain 2006). Se calcula que aproximadamente el 75% de los antibióticos descubiertos son producidos por actinobacterias, de estos el 75% se origina por miembros del género *Streptomyces* (Demain 2014).

Las actinobacterias del género *Streptomyces* producen, además, agentes antitumorales, insecticidas y enzimas extracelulares (celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, etc.) (Sánchez y Demain 2011). Por lo anterior, se hace evidente la importancia científica y económica de este género para diversas industrias a nivel mundial (Demain 2014).

Se ha reportado que el genoma de algunos de estos microorganismos codifica para 4 ó 5 veces más metabolitos secundarios que los conocidos previamente (Bentley et al., 2002) (Ikeda et al., 2003) (Ohnishi et al., 2008) lo que confirma el potencial de estas actinobacterias para la caracterización y el desarrollo de nuevos productos naturales.

En la naturaleza, la síntesis de esta amplia gama de compuestos está sujeta a distintos e intrincados mecanismos de regulación para evitar el desperdicio de materia y energía dentro de las células (Goraya et al. 2017); dicha regulación es controlada finalmente por los genes que programan todas sus actividades biológicas (Parekh, et al., 2000).

Por esta razón, los microorganismos aislados de la naturaleza producen generalmente bajos niveles de metabolitos secundarios, así, la sobreproducción debe lograrse en un laboratorio, antes de llevarse a una planta piloto para su escalamiento (Demain 2006). Actualmente la producción a gran escala de dichos productos sirve como testimonio del importante papel que representa el “*mejoramiento de cepas*” (Demain 2014).

Actualmente además de la aplicación de mutagénesis aleatoria, la biología molecular es la principal herramienta en el área de investigación de las industrias farmacéuticas, para el mejoramiento de cepas, (Demain, 2006); en consecuencia, se ha desarrollado un mejor entendimiento de su fisiología, genética y regulación de rutas biosintéticas, entre otros factores (Parekh et al., 2000). En adelante el lector se encontrará en repetidas ocasiones con el concepto de represión catabólica por fuente de carbono (RCC) y la definición de referencia que se considerará para este objeto es la de Brückner y Titgemeyer (2002).

*“Mecanismo de regulación donde la presencia de una fuente de carbono fácilmente metabolizable es capaz de inhibir la expresión y/o actividad de ciertos genes y operones, que están relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas y la producción de metabolitos secundarios”*

Dada la relevancia del género *Streptomyces*, desde hace varias décadas se ha estudiado el mecanismo de RCC con la finalidad de optimizar la producción de metabolitos secundarios. A pesar de los avances que se han realizado por más de dos décadas hacia la comprensión del fenómeno de represión catabólica por carbono en *Streptomyces*, es poco lo que se sabe del mismo. Existen fuertes evidencias de la existencia de este fenómeno y su relación con la diferenciación morfológica, producción de metabolitos secundarios y otros aspectos del ciclo de vida en dicho género.

Por los estudios de complementación de mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* resistentes al efecto de la 2-desoxiglucosa, se cree que el producto del gen *sco2127* es capaz de restaurar la sensibilidad a RCC reflejada en la producción de metabolitos secundarios; la actividad de la enzima Glk y el transporte de glucosa.

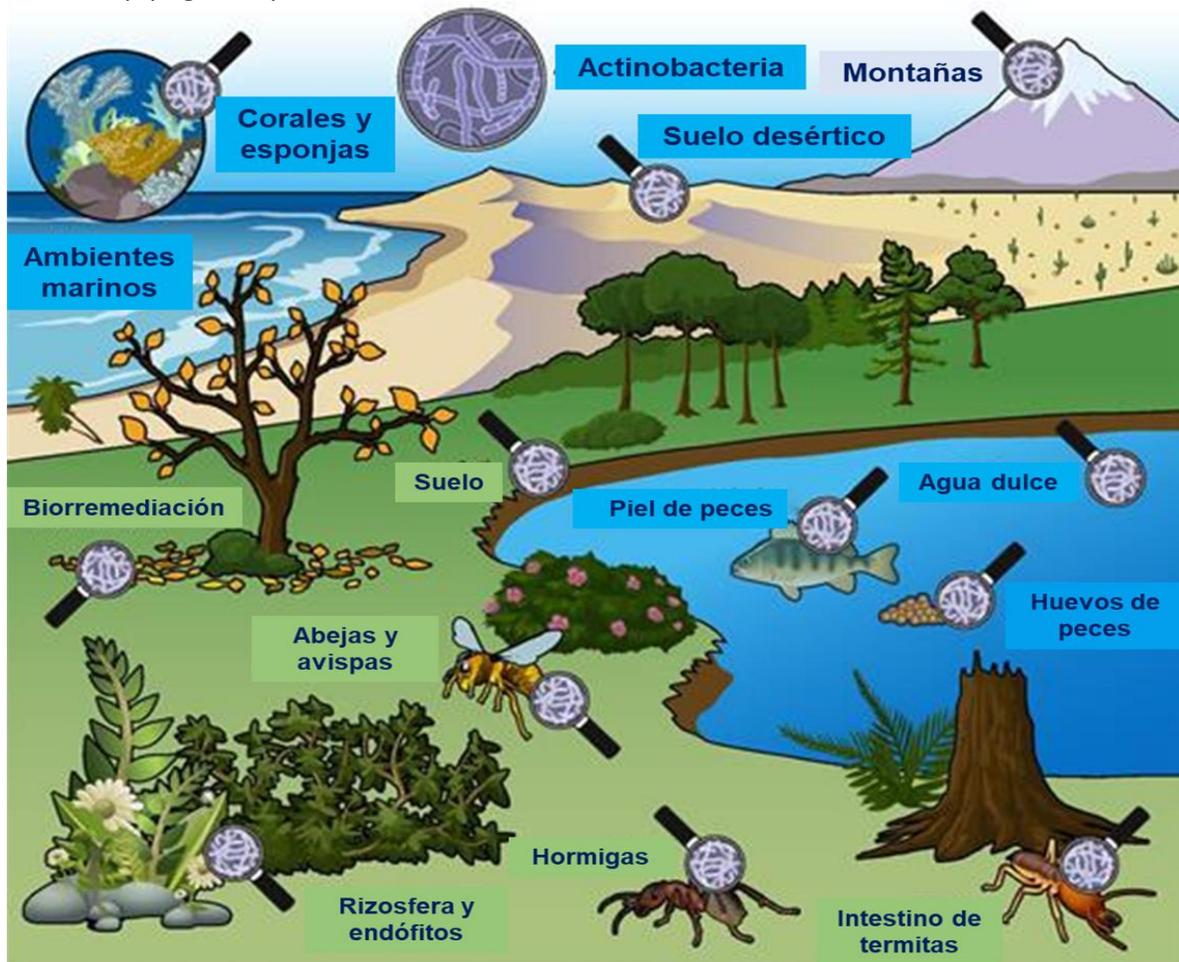
En el microorganismo modelo *Streptomyces coelicolor* (una de las actinobacterias mejor caracterizadas genéticamente), se ha propuesto que el gen *sco2127* es necesario para ejercer el fenómeno de RCC, sin embargo, aún se desconoce su función y su intervención específica en este proceso.

Considerando lo anterior, el objeto de este proyecto fue realizar una investigación sobre la función del gen *sco2127* en el contexto del fenómeno de represión catabólica por carbono (RCC) y su relación con el metabolismo secundario en *S. coelicolor*.

## 2. ANTECEDENTES TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES

### 2.1 Biología general del phylum Actinobacteria.

El Género *Streptomyces* se clasifica dentro del phylum actinobacteria. Este grupo se encuentra entre los linajes más grandes como unidad taxonómica del dominio Bacteria (Lawson, 2018). Los genomas del grupo hasta ahora secuenciados y reportados muestran gran heterogeneidad dentro del phylum; en concordancia con su gran diversidad (Lawson, 2018). La mayor parte de los integrantes de este taxón son organismos de vida libre en ecosistemas terrestres y acuáticos (Barka et al., 2016) (Figura 1).



**Figura 1.** Diversidad y distribución del phylum actinobacteria (Modificado de Barka et al., 2016)

Entre las características más generales se puede mencionar que; son bacterias filamentosas; Grampositivas; con alto contenido GC en su genoma (entre 60-70% en promedio) (Barka et al., 2016). Los microorganismos de este grupo tienen una gran importancia ambiental, pues contribuyen a la degradación de compuestos insolubles, muy abundantes en el medio ambiente, como son la celulosa y la quitina, contribuyendo así con diversos ciclos biogeoquímicos (como el ciclo de carbono) (Lawson, 2018).

El phylum actinobacteria tiene gran importancia médica y económica, pues producen 2 terceras partes de todos los antibióticos, que se usan actualmente en tratamientos clínicos (Barka et al., 2016).

Se encuentran principalmente en suelos alcalinos, con gran abundancia de materia orgánica, donde constituyen una importante proporción de las comunidades microbianas (Lawson 2018). La densidad de población en las actinobacterias depende de su hábitat y las condiciones climáticas, están típicamente presentes en una densidad de  $10^6$  - $10^9$  células por gramo de suelo y se pueden encontrar hasta 2 metros de profundidad (Barka et al., 2016). Otros factores como el pH, la temperatura y humedad cuentan para el desarrollo de estas comunidades bacterianas. De las muestras aisladas del suelo el 95% pertenecen al orden de los actinomicetales (Barka et al., 2016).

En décadas pasadas se les consideraba formas transitorias entre hongo y bacteria por lo que se les llamó actinomicetos (nombre que deriva del griego *aktis*: radio o rayo y *micete* o *miceto*: hongo; *hongos radiados*); ya que se desarrollan por la combinación de crecimiento radial apical y ramificaciones de hifas (Barka et al., 2016). Se sabe ahora que poseen una pared celular que contiene peptidoglicano y que tienen todas las características procariontes por lo que se les denomina actinobacterias (Barka et al., 2016).

Las actinobacterias muestran una gran variedad de morfologías entre sus respectivos ciclos de vida; difieren principalmente con respecto a la presencia o ausencia de un micelio vegetativo o aéreo, el color del micelio, la producción de pigmentos, así como la estructura y apariencia de sus esporas (Goodfellow et al., 2012).

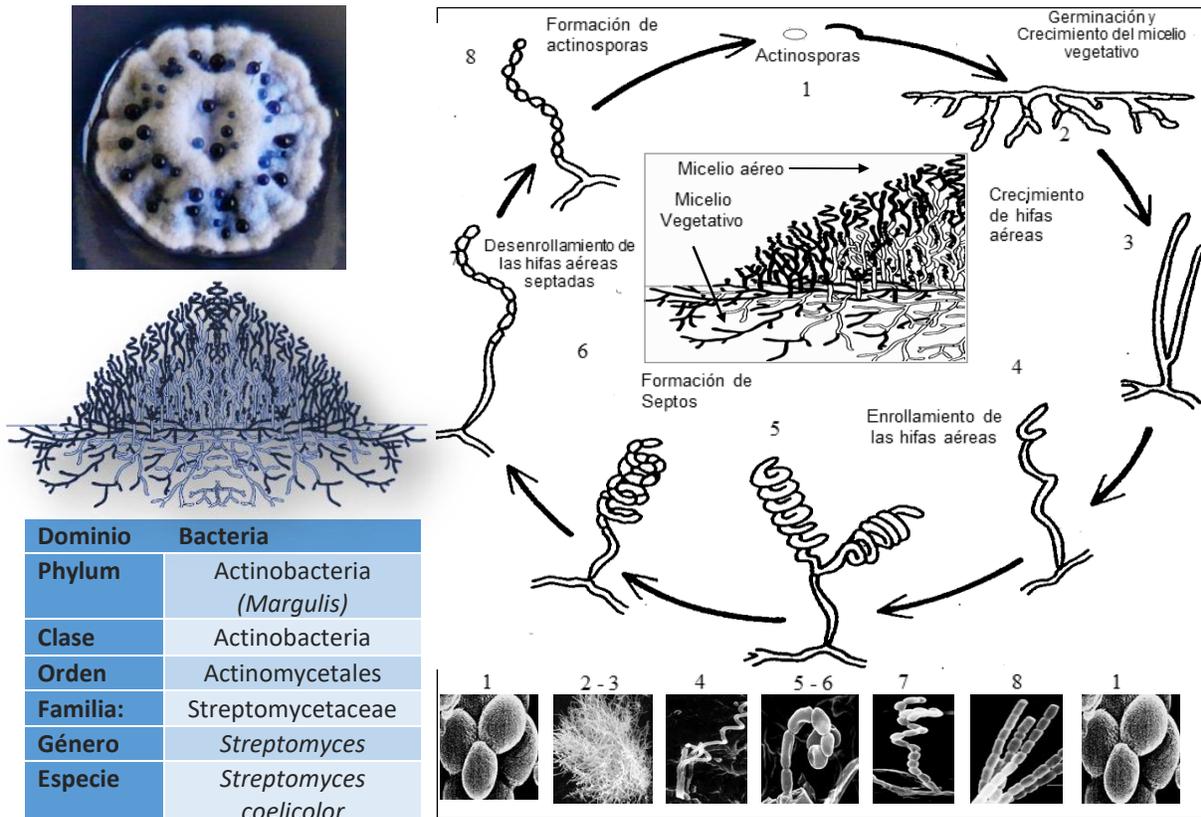
En lugar de bacterias de vida libre, muchas actinobacterias han evolucionado para vivir en simbiosis con otras plantas, hongos, insectos y esponjas. Como tema común, estos organismos se benefician de los productos naturales y las enzimas producidas por los actinobacterias, por ejemplo, para la protección contra microbios patógenos, para la promoción del crecimiento o para la degradación de polímeros naturales complejos como la lignocelulosa (Barka et al., 2016).

Al mismo tiempo, los actinobacterias se benefician de los recursos de los anfitriones con los que interactúan. Se está acumulando evidencia de que estas interacciones controlan la expresión de grupos de genes biosintéticos y han desempeñado un papel importante en la evolución de la alta diversidad química de los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias (Barka et al., 2016).

Muchos de los grupos de genes biosintéticos para antibióticos se expresan pobremente en condiciones de laboratorio, pero probablemente se expresan en respuesta a las demandas específicas del huésped (Barka et al., 2016).

## 2.2 Modelo de estudio: *Streptomyces coelicolor*

El modelo biológico *Streptomyces coelicolor*, tiene un ciclo de vida característico y representativo del taxón actinobacteria. Su diferenciación morfológica es peculiar entre los procariontes (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida (Modificado de Barka et al., 2016 ) y ubicación taxonómica de la actinobacteria *Streptomyces coelicolor*

El Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* comienza cuando una actinoespora germina para formar hifas que crecen por extensión apical, ramificándose hasta formar un micelio vegetativo, el cual se nutre de compuestos insolubles presentes en el suelo, produciendo una variedad de enzimas extracelulares (Chater, 2016).

Una vez que los nutrientes comienzan a agotarse, la diferenciación de las hifas aéreas comienza, creciendo a partir de la lisis del micelio vegetativo (Jakimowicz y van Wezel 2012). Posteriormente las hifas aéreas comienzan a enrollarse y septarse para formar actinoesporas para comenzar un nuevo ciclo (Jakimowicz y van Wezel 2012). La formación de antibióticos coincide con la formación del micelio aéreo (Goodfellow et al., 2012).

Cabe resaltar que las actinoesporas son diferentes de las endosporas bacterianas (las endosporas bacterianas se forman dentro de una célula madre y luego se liberan) y a los conidios (los verdaderos conidios son esporas eucariotas haploides diseñados para la propagación de hongos ascomicetos y basidiomicetos), en el desarrollo de todas las actinoesporas, toda la célula se convierte en una espora resistente de paredes gruesas (Margulis y Schwartz 1985).

*Streptomyces coelicolor* produce cuatro antibióticos, actinorrodina (llamado comúnmente pigmento azul), undecilprodigiosina (pigmento rojo), metilenomicina (codificada en el plásmido SCP1) y un metabolito dependiente de calcio (Lal et al., 2000). De los cuatro, el más estudiado es la actinorrodina, un compuesto derivado de 16 unidades de acetato producido por las policétidos sintetetasas tipo II (Lal et al., 2000).

La actinorrodina es capaz de funcionar como indicador de pH del medio en el cual crece el microorganismo (no debe ser confundido con la undecilprodigiosina). Se observa en rojo a pH por debajo de 7.0, encontrándose de forma intracelular, y azul, por encima de pH 7.0 liberándose al medio de cultivo como  $\gamma$ -actinorrodina (Bystrykh et al., 1996).

La biosíntesis de la actinorrodina está codificada por un clúster de genes denominados *act*, los cuales se localizan en una región de 26 kb en el genoma (Malpartida y Hopwood, 1996). La presencia de glucosa en el medio, limitaciones de amonio, nitratos y fosfatos, así como de pH en el medio de cultivo pueden afectar la producción de dicho pigmento (Coisne et al., 1999).

La producción de antibióticos sucede durante la transición de la fase de crecimiento exponencial hacia la fase estacionaria, incluso se ha reportado que el micelio vegetativo (en medio sólido) corresponde con la formación de agregados celulares durante la fase de crecimiento exponencial (en medio líquido), mientras que la formación de micelio aéreo y esporulación (en medio sólido) corresponden con la fase de crecimiento estacionario (en medio líquido) (Manteca et al. 2008).

La producción de actinorrodina está sujeta al mecanismo de RCC y se sabe que este mecanismo puede operar a distintos niveles (transcripción, procesamiento de RNA, traducción y modificación de proteínas), generando respuestas que afectan directa o indirectamente la actividad de las enzimas sensibles al fenómeno (exclusión de inductores, represión transcripcional o interrupción de la traducción de proteínas) (Brückner y Titgemeyer 2002).

## 2.3 Represión catabólica por carbono

Un entorno estable generalmente favorece a los organismos que están bien adaptados a ese nicho específico. Sin embargo, en muchos casos la adaptación a determinado entorno conlleva costos para el *fitness* (aptitud: capacidad de una población para mantener o aumentar su número en las generaciones sucesivas, también llamada *fitness darwiniana*) en nichos alternativos (Kussell y Leibler 2005).

Aparte de las concesiones de *fitness*, la adaptación a través de la mutación es relativamente lenta. Por lo tanto, para lidiar con ciertos cambios ambientales recurrentes, muchos organismos han desarrollado la capacidad de cambiar la expresión de los genes en respuesta al ambiente, reduciendo la necesidad de adaptación genética (Shoval et al., 2012).

Por ejemplo, cuando células de una población del modelo eucarionte (ampliamente estudiado) *Saccharomyces cerevisiae*, crecen en una mezcla de diferentes nutrientes, reprimen el metabolismo de los nutrientes no preferidos, como los carbohidratos complejos (polímeros generalmente), hasta que los nutrientes preferidos como la glucosa se agotan. Este proceso tiene un costo porque, el cambio a nutrientes no preferidos requiere la liberación de represión de genes específicos, y durante esta transición, las células deben dejar de dividirse temporalmente (New et al., 2014).

En este escenario se podría esperar que, las células de *S. cerevisiae* activen los genes necesarios para reanudar el crecimiento en el nuevo entorno lo más rápido posible. Sin embargo, New et al. (2014) reportan que, la duración del retraso de crecimiento que se produce, cuando las células de levadura se cambian de la fuente de carbono preferida a la de nutrientes alternativos (como la maltosa, galactosa o etanol), difiere entre las cepas de levadura salvaje.

Concluyen en su reporte que, la velocidad de la reprogramación metabólica frente al cambio ambiental es un rasgo altamente regulado a nivel genético unicelular. Además, las poblaciones de *S. cerevisiae* pueden implementar estrategias reguladoras de represión catabólica estricta (la cual parece favorable en ambientes relativamente estables), mientras que una regulación menos estricta, puede aumentar su *fitness* en condiciones ambientales variables (donde las células a menudo necesitan cambiar su metabolismo) (New et al., 2014).

La represión catabólica por carbono es un mecanismo (que en esencia implica la expresión diferenciada de ciertos genes en respuesta al ambiente) muy importante en la administración metabólica celular; permite la utilización preferencial y secuencial de fuentes de alta energía de base carbono, disponibles en un medio cambiante y así, mantener un metabolismo eficiente (Adnan et al., 2017).

El mecanismo de RCC se sustenta en la lógica de la eficiencia. Cuando un determinado organismo, se encuentra en un medio ambiente con diversas fuentes de carbono disponibles, la RCC prioriza el consumo de la máxima cantidad de glucosa y otros carbohidratos energéticamente más favorables (para el crecimiento y diversas funciones celulares), antes de cambiar a fuentes de carbono menos convenientes (desde un punto de vista energético), tales como los ácidos orgánicos y alcoholes (Galinier 2018).

La RCC en los hongos filamentosos se ha estudiado más ampliamente en el organismo modelo *Aspergillus nidulans*. Los hongos filamentosos degradan los polímeros de la pared celular de las plantas (como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina) al secretar enzimas hidrolíticas. La producción de estas enzimas se reduce o se suprime, cuando la glucosa está fácilmente disponible en el medio ambiente; debido a la supresión o represión de la expresión de los genes que codifican dichas enzimas (Khosravi et al. 2015).

Los componentes de RCC están integrados para la regulación del crecimiento, desarrollo y patogénesis de los hongos, donde la presencia de la glucosa es una señal que, transmite información sobre el medio ambiente. La ubiquitinación juega un papel importante durante la RCC, al alterar la función de la proteína durante el ensamblaje macromolecular (Adnan et al., 2017).

La ubiquitina actúa como un marcador, ya sea modificando la función de una proteína o etiquetándola, para su destrucción por un proteosoma específico. Las enzimas de des-ubiquitinación, activan factores de transcripción específicos al dirigirse a sus dominios. Las ligasas de ubiquitinación y las enzimas de des-ubiquitinación, interactúan entre sí, y controlan los factores de transcripción del mecanismo de RCC en hongos filamentosos (Adnan et al., 2017). La regulación génica también implica un segundo nivel de complejidad regido por la epigenética y el acceso a la cromatina (como la acetilación, la metilación y la modificación de histonas) (Adnan et al., 2017).

En procariontes, por ejemplo, los mecanismos que conducen al estado de represión pueden ser muy diversos, pero la diferencia posiblemente más indicativa, sea la entrada de los carbohidratos en forma fosforilada o desfosforilada, lo que es especialmente importante en la RCC (Brückner y Titgemeyer, 2002).

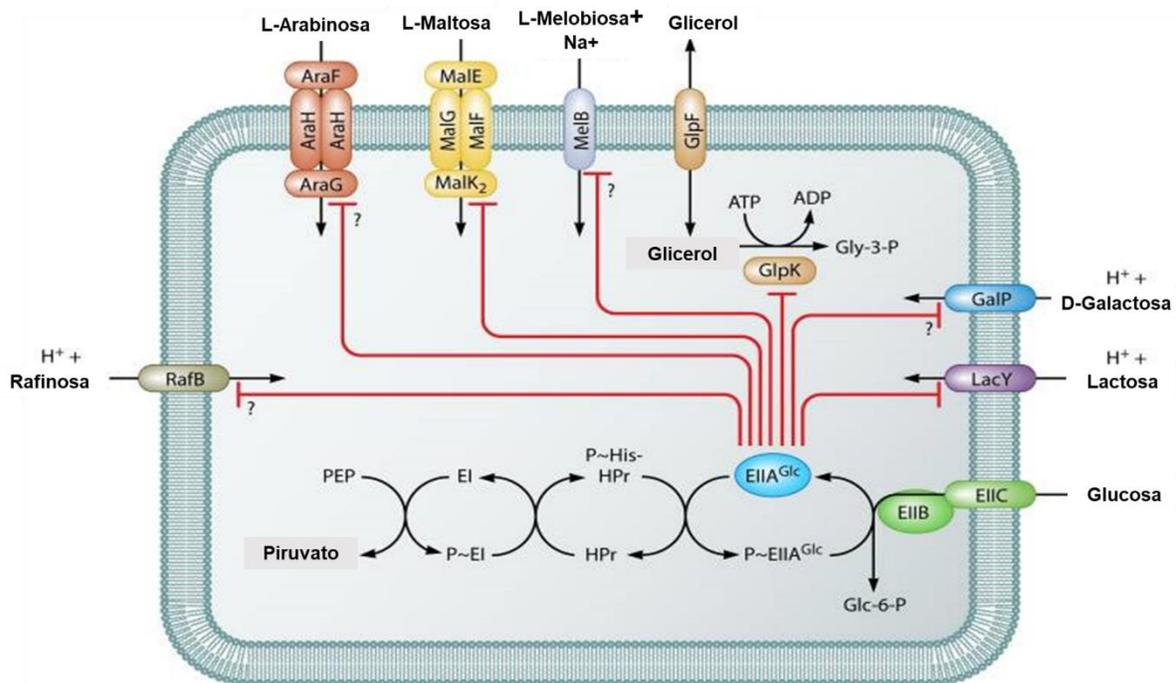
El mecanismo de RCC mejor conocido en procariontes es el de *Escherichia coli* (Choe et al., 2017), esta bacteria posee el Sistema de Fosfotransferasas de azúcares dependiente de fosfoenol piruvato PTS: PEP (por sus siglas en inglés de *sugar phosphotransferase system*: dependiente de Phosphoenolpyruvate PEP). La actividad de PTS, tiene un papel crucial en el sistema de señalización global que, controla el consumo preferencial de glucosa sobre otras fuentes de carbono en *E. coli* (Escalante et al. 2012).

### 2.3.1 RCC dirigida por PTS:PEP en procariontes

El PTS:PEP está ampliamente distribuido en el dominio bacteria y en algunas arqueas, además de funcionar como un transportador de carbohidratos, regula numerosos procesos celulares, ya sea mediante la fosforilación de sus proteínas objetivo o mediante la interacción con estas de una manera dependiente de la fosforilación (Galinier, 2018).

El sistema PTS consiste en permeasas específicas, también conocidas como enzimas II (EII); y dos proteínas generales, la enzima I (EI) y HPr (proteína que contiene histidina transportadora de fosfato), las cuales participan en la fosforilación de todos los sustratos transportados a través del sistema PTS o un pequeño grupo de carbohidratos estrechamente relacionados (Galinier y Deutscher 2017).

Las permeasas específicas están compuestas por cuatro proteínas o dominios proteínicos (EIIA, EIIB, EIIC y EIID), de los cuales por lo menos uno de ellos se halla unido a membrana (Galinier y Deutscher 2017) (Figura 3).



**Figura 3.** PTS en *Escherichia coli* (modificado de Deutscher et al. 2014). Se muestra además represión catabólica por glucosa (Vía PTS EII<sup>Glc</sup>) para 7 carbohidratos diferentes. En *E. coli* y en *Enterobacteriaceae*, el jugador principal en la RCC es EIIA<sup>Glc</sup>. Cuando hay disponible un carbohidrato rápidamente metabolizable, como la glucosa, EIIA<sup>Glc</sup> se mantiene principalmente en la forma no fosforilada, por lo tanto, la expresión de operones sensibles a RC no se induce, incluso cuando el inductor correspondiente está presente en el medio. La RCC se debe pues a la ausencia de activación transcripcional. Para indicar especificidad de sustrato en EII, una abreviatura de tres letras del sustrato transportado, o de la función reguladora asociada, se agrega como superíndice al dominio EII correspondiente; por ejemplo, EIIAGlc corresponde al componente EIIA específico de la glucosa y EIINtr al EIIA del regulador de nitrógeno PTS.

Dado que no todos los carbohidratos son transportados/fosforilados por medio del PTS, (en los reportes revisados para este trabajo) se hace una distinción entre los *azúcares PTS* (azúcares transportados por medio del PTS) y los *azúcares no PTS*. Los sustratos que no son PTS, como glicerol, glucuronato (derivado ácido de la glucosa, generado por oxidación del grupo ácido del carbono 6), D-arabinosa, entre otros, se transportan mediante permeasas de transportadores ABC o facilitadores de carbohidratos (Saier et al., 2002).

Las proteínas EI y HPr generalmente se sintetizan de forma constitutiva, mientras que la síntesis de los complejos EII se inducen por la presencia del azúcar PTS en el medio extracelular (Galinier y Deutscher, 2017).

El primer paso en el transporte y la fosforilación concomitante de carbohidratos PTS, es la autofosforilación de EI desde el donante fosfato de alta energía (Figura 3), el PEP (El símbolo “~” indica un enlace de fosforilo de alta energía, para diferenciarlo, por ejemplo, de las proteínas fosforiladas en el residuo Serina, que se escriben como P-Ser) (Galinier, 2018).

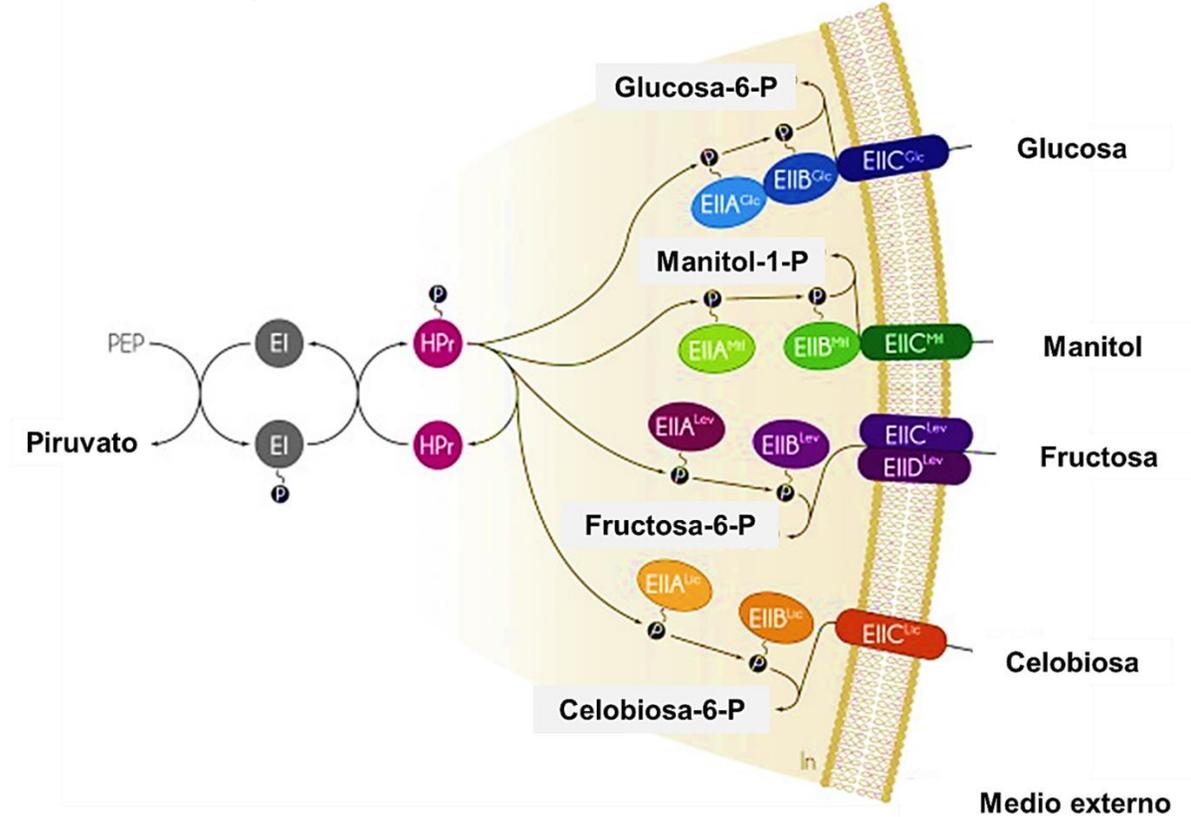
La EI fosforilada (P~EI) transfiere su grupo fosfato a HPr (P~HPr) que a su vez transmite su fosfato a EIIA (P~EIIA), la cual fosforila a la EIIB (P~EIIB) correspondiente (Figura 3). Todas estas fosfotransferencias de alta energía son reversibles y se producen a nivel de residuos de histidinas, con la excepción de las proteínas EIIB para las cuales, generalmente la fosforilación se da en un residuo de cisteína (Galinier, 2018).

En la última cesión, P~EIIB transfiere su grupo fosfato a la molécula del carbohidrato unido y trasladado por EIIC a través de la membrana (Figura 3). En condiciones fisiológicas, esta última reacción es prácticamente irreversible, ya que la fosforilación del carbohidrato probablemente disminuye la afinidad de EIIC transmembranal por su sustrato, provocando la liberación de dicho carbohidrato fosforilado en el citoplasma (Galinier, 2018).

En firmicutes, la proteína HPr se fosforila no solo en la posición de histidina 15 (His-15), desde PEP y por EI, sino también en la serina en la posición 46 (Ser-46), desde ATP y HPr quinasa / fosforilasa (HPrK / P). La fosforilación de HPr a partir de ATP no está involucrada en la incorporación y fosforilación de azúcares, pero tiene funciones reguladoras, particularmente en la represión catabólica desarrollada por y para otros sustratos (Galinier y Deutscher, 2017) (Se describe más adelante).

Las enterobacterias como *E. coli* no tienen HPrK/P y la región alrededor de HPr Ser-46 no se conserva (Galinier 2018). En contraste, otras proteobacterias con un PTS incompleto generalmente poseen una HPrK/P, y el sitio de fosforilación dependiente de ATP para HPr se parece mucho al de firmicutes (Deutscher et al., 2014).

*Bacillus subtilis* contiene nueve PTS completos, seis PTS que carecen de un componente EIIA y un PTS que carece de componentes EIIA y EIIB (Deutscher, Galinier, Martin-Verstraete, 2002). En la figura 4 se representa el PTS para glucosa, manitol, fructosa y celobiosa de *B. subtilis*.



**Figura 4.** PTS específico para glucosa, manitol, fructosa y celobiosa en *B. subtilis* (Modificado de Galinier y Deutscher, 2017). El primer paso de la cascada de fosforilación catalizada por el PTS es la autofosforilación de la IE con PEP. Posteriormente, EI transfiere su grupo fosfato a HPr, que generalmente fosforila todos los EIIA presentes en un organismo. Los P~EIIA transfieren su grupo de fosforilo a sus EIIB afines. Cada EIIB fosforila irreversiblemente el hidrato de carbono unido a la EIIC o EIIC y EIID integrales de membrana correspondiente en el caso del PTS<sup>Lev</sup> que transporta fructosa. Entonces, el carbohidrato fosforilado se libera en el citoplasma. Recordemos que la organización de los dominios EII con la misma especificidad de sustrato puede ser diferente en otros organismos.

La regulación, el transporte y fosforilación de carbohidratos mediado por PTS, sigue el mismo mecanismo en las bacterias y arqueas que lo poseen. Por otro lado, las regulaciones de otros sustratos mediadas por PTS difieren drásticamente entre microorganismos incluso dentro del mismo phylum (Galinier y Deutscher, 2017).

Recordemos que existen variaciones sustanciales entre taxones, y lo que es cierto para una especie no es necesariamente cierto para otra (Västermark y Saier, 2014).

### 2.3.2 Mecanismo de RCC en *Escherichia coli*

En la gestión celular de la represión catabólica de *E. coli* y *Enterobacteriaceae*, es fundamental el estado de fosforilación del componente EIIA<sup>Glc</sup>. Para la expresión de los genes catabólicos de fuentes de carbono alternativas no preferenciales (por ejemplo, la lactosa), es imprescindible que EIIA<sup>Glc</sup> fosforilada active a la enzima adenilato ciclasa (AC), que dimana cAMP (Galiniér, 2018). Así el nivel de AMPc intracelular depende entonces de la actividad de la forma fosforilada de EIIA<sup>Glc</sup> (EIIA<sup>Glc</sup> - P) (Stülke et al., 1998) (Figura 5).

En presencia de azúcares PTS, el componente EIIA se encuentra mayoritariamente desfosforilado a causa de la transferencia del grupo fosfato hasta el carbohidrato transportado. Por otro lado se ha demostrado que el estado de fosforilación de EIIA, no solo depende del transporte a través de PTS, sino de la relación piruvato:PEP presente en la célula. Si la cantidad de piruvato es alta con respecto a la de PEP, el componente EIIA se encontrará mayoritariamente desfosforilado, y viceversa (Hogema et al., 1998).

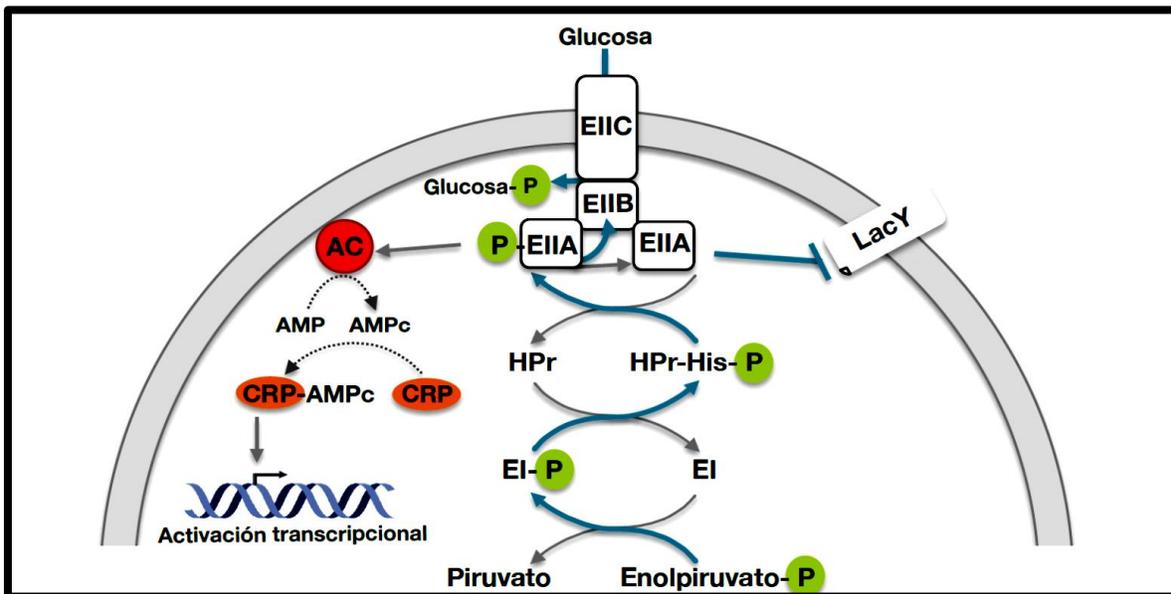
Cuando se dispone de un azúcar rápidamente metabolizable, como la glucosa, la proporción [PEP] / [piruvato] es baja, y la EIIA<sup>Glc</sup> está presente principalmente en su forma no fosforilada (Bettenbrock et al., 2007). Por lo tanto, no puede estimular la enzima adenilato ciclasa (AC) y/o inhibir a la AMPc fosfodiesterasa. En consecuencia, la concentración de AMPc intracelular también es baja (Amin y Peterkofsky, 1995); de tal forma que la expresión de los operones sensibles a RC no es inducida (Figura 5).

La razón por la cual la concentración de AMPc es tan relevante para la expresión de genes sensibles a la represión catabólica por glucosa (RCG) se debe al regulador transcripcional CRP (del inglés *CyclicAMP Receptor Protein* proteína receptora de AMPc, también conocido bajo el nombre de proteína activadora de catabolitos CAP *Catabolite Activator Protein*), pues este se une al AMPc, lo que provoca su cambio conformacional, para formar un complejo que se adhiere a ADN, lo que a su vez aumenta la afinidad de la ARN polimerasa por los promotores específicos de los genes catabólicos que controlan en conjunto (Lawson et al., 2004) y, por lo tanto, inducir la expresión de los genes y operones sensibles a RC en presencia de inductores específicos (Figura 5).

Tradicionalmente, se pensaba que en *E.coli* el uso de azúcares PTS generaría alta concentración intracelular de EIIA desfosforilada y, por tanto, bajos niveles de AMPc y poca expresión de operones catabólicos alternativos. De tal forma que, el uso de azúcares no preferenciales (no PTS) provocaría una mayoría de EIIA fosforilada (debido a la ausencia de transporte PTS), altos niveles de AMPc e incremento de la activación transcripcional mediada por CRP. Sin embargo, se ha demostrado que el porcentaje de EIIA desfosforilada es muy similar en presencia de azúcares PTS (manitol, fructosa) y no PTS (lactosa, melobiosa) (Hogema et al., 1998; Galiniér, 2018) y, además, que los niveles de AMPc no siempre cumplen una relación directa con los niveles de fosforilación de EIIA ni con el tipo de transporte de los azúcares.

Así, las células poseen concentraciones menores de AMPc en presencia de glucosa-6-fosfato que en presencia de glucosa y, en presencia de gluconato, los niveles de AMPc son casi idénticos a los característicos del crecimiento en glucosa, pero EIIA permanece mayoritariamente fosforilada (Hogema et al., 1997; Galinier, 2018 ).

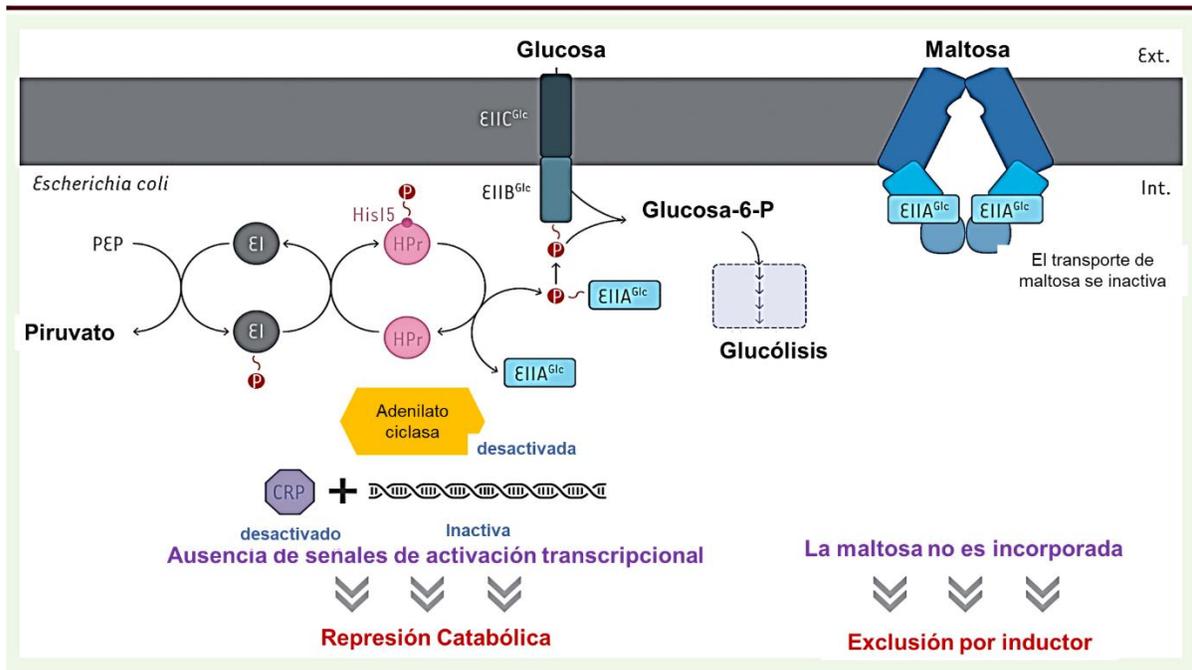
Esto se explica porque EIIA se encuentra mayoritariamente desfosforilado no sólo cuando *E.coli* se cultiva en presencia de azúcares PTS como glucosa o manitol sino también con azúcares no PTS fácilmente metabolizables hasta piruvato como lactosa o melobiosa, por ejemplo, pues a pesar de acceder a la célula a través de transportadores alternativos, incrementan la relación piruvato: PEP (Hogema et al., 1998; Galinier, 2018 ).



**Figura 5.** Esquema de la RCG controlada por PEP-PTS de *E.coli* (Tomado de Gómez H., 2014). Se representa con flechas azules la cascada de fosforilación durante el transporte glucosa. En presencia de altos niveles de glucosa, el transporte de otros metabolitos es inhibido (se señala a modo de ejemplo el transportador de lactosa LacY). Para la expresión de genes implicados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas resulta imprescindible la presencia del inductor de la ruta (en este ejemplo lactosa) y la activación por CRP en presencia de AMPc (producido por la enzima adenilato ciclasa señalada dentro de un círculo rojo AC).

La represión de algunos operones catabólicos (por ejemplo, del operón *lac*) no está, por tanto, principalmente dirigida por los niveles de AMPc, ya que niveles de este metabolito similarmente bajos a los registrados en presencia de glucosa aún permiten la activación mediada por CRP. En su lugar, cobra gran importancia el mecanismo de “exclusión del inductor” mediado por EIIA desfosforilada. En ese estado, EIIA interacciona (entre otros transportadores) con el transportador LacY y lo inactiva, impidiendo la entrada de lactosa. Puesto que la lactosa funciona como inductor de su propia ruta de degradación, la interrupción de su transporte implica una represión de los genes *lac* (Inada et al., 1996; Galinier, 2018) (figura 5).

Este mecanismo de “exclusión del inductor” es también aplicable al metabolismo de la maltosa (Figura 6), melobiosa, rafinosa y galactosa (Titgemeyer et al., 1994). Sin embargo es de gran importancia el complejo AMPc-CRP, ya que se requiere para la expresión de los genes catabólicos y, además, contribuye a la represión catabólica a través de la activación de la expresión de los genes para los componentes EIIB y EIIC del transportador de glucosa (potenciando su entrada en la célula) (Kimata et al., 1997; Galinier, 2018).



**Figura 6.** Esquema de la RCG controlada por PEP-PTS de *E.coli* para maltosa (Modificado de Galinier, 2018). Se representa con flechas azules la cascada de fosforilación durante el transporte glucosa. En presencia de altos niveles de glucosa, el transporte de otros metabolitos es inhibido (se señala a modo de ejemplo el transportador de maltosa). La EIIA<sup>Glc</sup>, desfosforilada puede interactuar con MalK, la proteína de unión a nucleótidos (NBP) del transportador ABC de maltosa, y así inhibir el transporte de este carbohidrato. Como la maltosa ya no está incorporada dentro de la bacteria, no habrá inducción de genes involucrados en el uso de este azúcar. Este es el fenómeno de exclusión por inductor.

Finalmente, el complejo AMPc-CRP no sólo regula la expresión de genes codificantes de proteínas, sino también genes que codifican para pequeños ARN reguladores, como es el caso de CyaR o Spot42 (De Lay et al., 2009; Polayes et al., 1988). Spot42 está implicado en la regulación de la expresión de genes necesarios para el metabolismo primario y secundario, el balance redox y el consumo de diversas fuentes de carbono no preferenciales (Beisel et al., 2011). Por su lado, CyaR es un pequeño ARN que se une a la proteína Hfq y que regula post-transcripcionalmente la expresión de una variedad de genes.

### 2.3.3 Mecanismo de RCC en *Bacillus subtilis*

En el modelo procarionte gram-positiva *B. subtilis*, la glucosa (como en *E. coli*) constituye la fuente de carbono preferencial de su PEP:PTS para desarrollar el fenómeno de RCC. Sin embargo, en esta bacteria y en otros firmicutes, no son el AMPc ni CRP los protagonistas del mecanismo de RCC.

Los componentes ejecutores del mecanismo de RCC en *B. subtilis* son los intermediarios glucolíticos fructosa-1,6-bisfosfato y glucosa-6-fosfato, la proteína HPr del sistema PTS y el represor transcripcional CcpA.

El componente HPr de PTS desempeña el papel central en la RCC de *B. subtilis*, su estado de fosforilación específicamente (Figura 7), debido a que su estado de fosforilación es dependiente de ATP y parece estar determinado principalmente por la concentración intracelular de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) (Jault et al. 2000).

Cuando está disponible un carbohidrato PTS rápidamente metabolizable (como la glucosa), la glucólisis está activa y la concentración de FBP es alta, este metabolito es capaz de interactuar con HprK/P lo cual estimula fuertemente su actividad quinasa (Jault et al. 2000) (Figura 7).

Además de su fosforilación en His-15 en presencia de un azúcar PTS durante las fosfotransferencias (descritas anteriormente), la proteína HPr también puede ser fosforilada en la Ser-46 a partir de ATP por la enzima HPrK/P. Cabe recordar que, esto puede variar en otras especies, ya que estas dos fosforilaciones no siempre son compatibles *in vivo* (Kravanja et al. 2000).

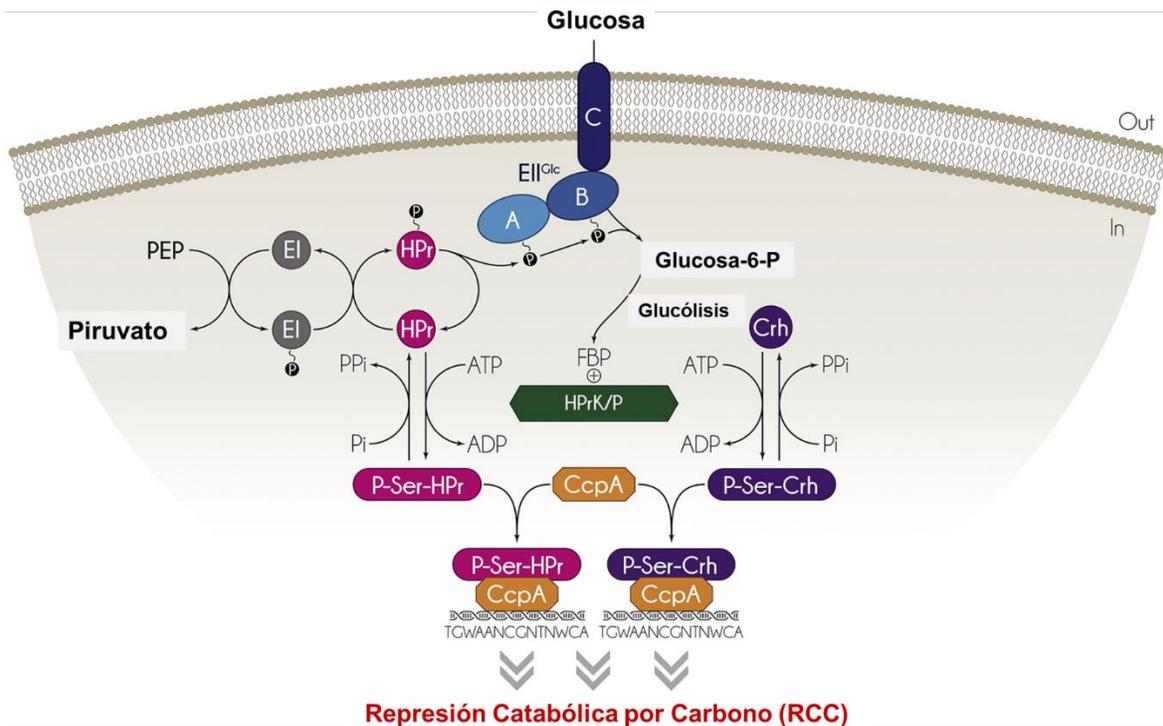
Cuando la concentración intracelular de FBP es alta, la HPr está presente principalmente en su forma fosforilada en el residuo Ser-46, y esta condición molecular, le permite interactuar con el regulador transcripcional proteína-A de control de catabolitos CcpA (del inglés *Control catabolite protein A*) (Titgemeyer y Hillen 2002) (Figura 7).

El complejo proteico P-Ser-HPr / CcpA se puede unir de manera eficiente a sus sitios (ADN) de operador específicos, llamados elementos sensibles (o de respuesta) a catabolitos Cre (del inglés *Catabolite Responsive Element*) (Figura 7).

Un análisis bioinformático indica que el genoma de *B. subtilis* tiene aproximadamente 126 sitios Cre (Miwa et al., 2000). Otro análisis transcriptómico de un mutante *ccpA*, cultivada en presencia o ausencia de glucosa, mostró que el 10% de los genes de *B. subtilis* (cerca de 300) estaban regulados por CcpA y sometidos a RCC, de manera directa o indirecta (Moreno et al. 2001).

CcpA funciona principalmente como represor de la transcripción (Figura 7), aunque la activación transcripcional también ha sido documentada (Egeter y Brückner 1996). En algunos organismos, el gen *ccpA* está sujeto a autorregulación (Mahr, Hillen y Titgemeyer 2000).

La proteína CcpA es de importancia global para el control transcripcional en la RCC (Henkin 1996, Galinier A. 2018 ) (Figura 7). La afinidad del complejo P-Ser-HPr / CcpA por sus dianas de ADN depende de las características particulares de la secuencia Cre como su ubicación en relación con el sitio de inicio de la transcripción, o la posición específica de ciertas bases (Marciniak et al. 2012).



**Figura 7.** Esquema del mecanismo de RCC, controlada por PEP-PTS, mediado por el complejo P-Ser-HPr / CcpA / cre ternario, en *B. subtilis* (Modificado de Galinier y Deutscher 2017). La captación de una fuente de carbono rápidamente metabolizable, como la glucosa o la fructosa, conduce a un aumento de la concentración intracelular de FBP. Este metabolito, estimula la actividad quinasa de HprK / P, e induce la fosforilación dependiente de ATP de HPr y Crh en Ser-46. Sólo las formas fosforiladas en serina de HPr y Crh pueden interactuar con CcpA. El complejo P-Ser-HPr / CcpA o P-Ser-Crh / CcpA se une a los cre sobre el ADN, así regulan la expresión de genes. Además, FBP y glucosa-6-fosfato estimulan la unión del complejo P-Ser-HPr / CcpA a Cres. Crh está presente solo en algunos bacilos y algunos clostridios.

*B. subtilis* al igual que otros bacilos y clostridios existe una proteína similar a HPr llamada Crh (del inglés *Catabolite repression HPr*) capaz de inducir la unión de CcpA a sitios Cre (Galinier et al. 1997) (Figura 7). Compuesta de 85 aminoácidos Crh también es conocida como *HPr-like protein* pues exhibe una identidad de secuencia de aminoácidos del 45% con HPr, pero el sitio activo de fosforilación dependiente de PEP, His-15 de HPr se reemplaza con una glutamina, tiene el sitio Ser-46 que se fosforila a partir de ATP por HPrK/P en respuesta a las altas concentraciones de fructosa-1,6-bisfosfato (Galinier et al. 1997). Por lo tanto, Crh no es fosforilado por PEP y/o EI. Lo que significa que, no está involucrado en el transporte de azúcares-PTS, pero tiene funciones reguladoras.

La función reguladora principal de Crh es el control de la formación del metabolito metilglicoxal (Sintetizado por la enzima metilglicoxal sintasa MgsA), un compuesto derivado de dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, ambos intermediarios de la glucólisis. MgsA convierte la dihidroxiacetona-fosfato en metilglicoxal y, por lo tanto, inicia un bypass glicolítico que evita la acumulación perjudicial de fosfo-azúcares en condiciones de desbordamiento de carbono (Landmann et al. 2011).

El metilglicoxal es tóxico y su producción requiere control, y es exclusivamente a través de la forma no fosforilada de Crh interactuando con MgsA que se inhibe la actividad de MgsA. Por consiguiente, Crh inhibe la formación de metilglicoxal in vivo en condiciones de hambruna nutricional que favorecen una baja actividad de la quinasa HPr (Landmann et al. 2011).

Crh detecta el estado metabólico de la célula, como se refleja en su estado de fosforilación, y en consecuencia controla el flujo a través de la vía del metilglicoxal dañino. HPr no puede enlazar ni regular MgsA, lo que hace que esta sea la función auténtica de Crh (Landmann et al. 2011).

P-Ser-Crh participa en la RCC, a un nivel menos importante que P-Ser-HPr (Galinier et al. 1997) . Por ejemplo, la inactivación de *crh* por sí misma no tiene efecto en la RCC. Sin embargo, en CGM *ptsH1* (gen Hpr) y, en las cepas en las que se evitó la fosforilación de HPr dependiente de ATP (reemplazando su Ser-46-Hpr por una Alanina), algunos operones catabólicos todavía estaban parcialmente reprimidos, continuando con la investigación, se eliminaron completamente en estas CGM también el gen *ccpA* lo que detuvo completamente la RCC (Galinier, Deutscher y Martin-Verstraete 1999).

La RCC residual observada en la cepa CGM *ptsH1* desapareció cuando se interrumpió además el gen *crh*, demostrando la intervención de P-Ser-Crh en la RCC (Galinier et al. 1999).

*HPr regula las propiedades de unión al ADN de otros reguladores transcripcionales.*

En general, los efectores de los reguladores transcripcionales son pequeños compuestos orgánicos. La unión del efector induce cambios estructurales que modifican las propiedades de unión al ADN del regulador. En firmicutes, el efector principal de CcpA es P-Ser-HPr y, en menor medida, P-Ser-Crh. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que CcpA también puede interactuar con moléculas pequeñas como NADP, glucosa-6-fosfato o FBP que modulan sus propiedades de unión. Por lo tanto, la regulación por la unión de proteínas o ligandos pequeños no es exclusiva. Sin embargo, hasta ahora, P-Ser-HPr (y P-Ser Crh) es el único ejemplo conocido en el que una proteína funciona como un corepresor. para modular la unión al ADN de un regulador transcripcional de la familia LacI-GalR, pero CcpA no es el único regulador transcripcional que usa HPr como corepresor (Martin-Verstraete , Deutscher y Galinier 1999).

*P-ser-HPr induce la unión de RbsR a su objetivo de ADN.*

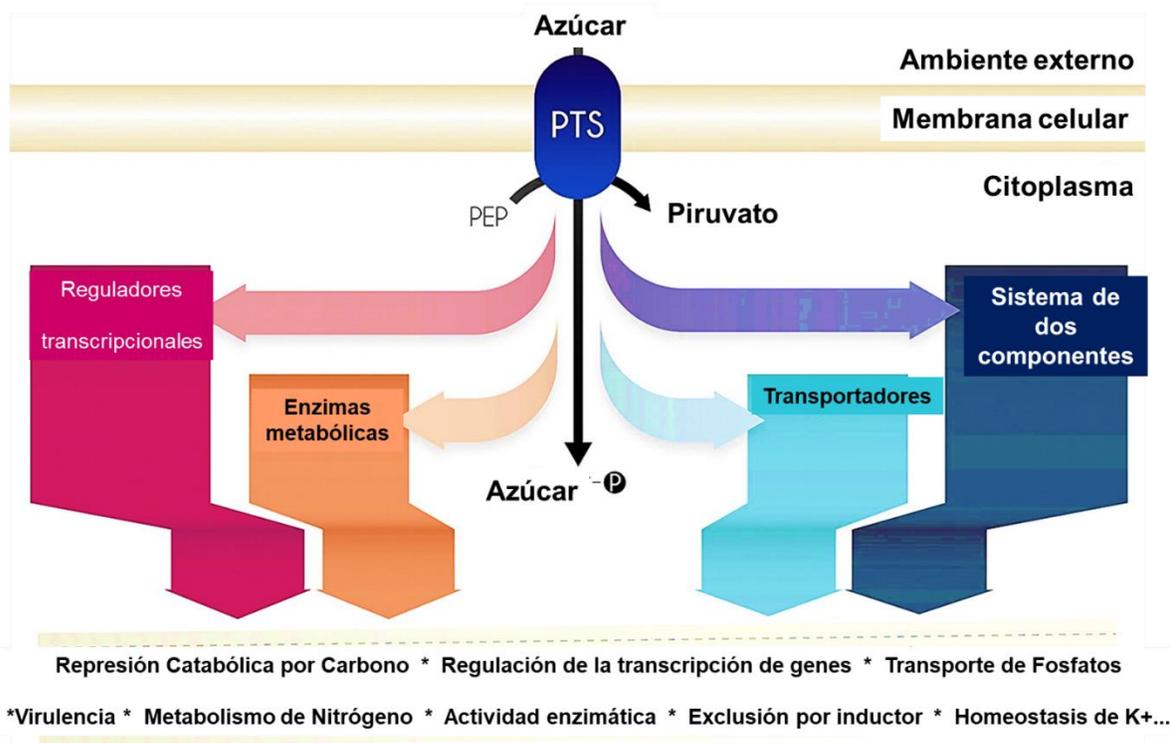
Para encontrar nuevas proteínas que pudieran interactuar con HPr (Müller et al., 2006) llevaron a cabo un *escaneo* computacional basado en estructura. Usando datos estructurales del complejo P-Ser-HPr / CcpA, el objetivo fue identificar proteínas que exhiben propiedades similares a sus interfaces de proteínas. Usando este método, los autores encontraron que RbsR, el represor del operón ribosa en *B. subtilis* y un miembro de la familia de reguladores LacI-GalR, posee el potencial para interactuar con HPr. Esta interacción se confirmó posteriormente experimentalmente, y P-Ser-HPr induce la unión al ADN de *B. subtilis*. RbsR, mientras que la HPr no fosforilada no tiene ningún efecto. Los análisis estructurales y de acoplamiento de CcpA y RbsR en complejos con P-Ser-HPr revelaron que, en ambos complejos, los aminoácidos básicos están presentes en la interfaz, formando interacciones electrostáticas favorables con el grupo fosfato de P-Ser-HPr. La relevancia fisiológica de esta interacción no se estudió más a fondo, pero es tentador suponer que esta interacción vincula la expresión del operón ribosa al estado de fosforilación de HPr y, por lo tanto, a la disponibilidad de fuentes de carbono extracelulares de metabolismo rápido.

## 2.4 La regulación del PTS trasciende la RCC

Actualmente se sabe que además del fenómeno de RCC el PTS regula numerosas e importantes funciones celulares en diversos taxones; el metabolismo de nitrógeno; de fosfato; transporte de potasio; respuesta rigurosa (respuesta al estrés en reacción a la falta de aminoácidos, la limitación de los ácidos grasos, la limitación de hierro, el choque térmico y otras condiciones de estrés), formación de biofilm, virulencia de patógenos, quimiotaxis; transporte de potasio, entre muchas más. Además, se siguen reportando nuevas, todo el tiempo (Deutcher et al. 2014, Galinier y Deutcher 2017, Galinier 2018) (Figura 8).

Para estos diferentes procesos reguladores, la señal es proporcionada por el estado de fosforilación de los componentes de PTS, que fluctúa según la disponibilidad de sustratos de PTS y el estado metabólico de la célula (Galinier 2018).

Dado el extenso impacto fisiológico que todas estas regulaciones dependientes de PTS producen, en una gran variedad de microorganismos, el PTS debe considerarse como un sistema de amplio e importante impacto fisiológico, dadas sus capacidades reguladoras (Galinier y Deutcher 2017).



**Figura 8.** Funciones celulares en las que participa el PTS (modificado de Galinier y Deutcher 2017). Para regular numerosas funciones celulares, los componentes de PTS interactúan o fosforilan a proteínas diana (Joyet et al. 2013, Galinier 2018). Estos objetivos pueden ser: reguladores de la transcripción, histidina quinasa de sistemas de transducción de señales de dos componentes, enzimas catabólicas y transportadores, entre otras (Galinier y Deutcher 2017).

## 2.4.1 Factores transcripcionales que contienen PRD

Algunos reguladores de la transcripción controlados por PTS poseen un dominio (o dos) específico, llamado dominio de regulación por PTS (siglas en inglés PRD: *PTS Regulation Domain*), que puede ser fosforilado por tres componentes diferentes de PTS. La regulación de los factores transcripcionales que contienen PRD es ciertamente el mecanismo más interrelacionado con el PTS. Estos reguladores de la transcripción que contienen PRD participan en mecanismos de regulación que son independientes de las proteínas CcpA o CRP (Galinier 2018).

Los activadores de la transcripción que contienen PRD se encuentran principalmente en firmicutes y en actinobacteria, son menos frecuentes en proteobacteria. Algunas de estas bacterias poseen activadores de transcripción que pueden contener hasta tres dominios EIIA y EIIB (Deustcher et al. 2014) (Figura 9).

Se pueden distinguir dos tipos de activadores de transcripción que contienen el dominio EII. De acuerdo con los primeros miembros descritos para esta familia de reguladores de transcripción, se les llama reguladores de tipo MtlR del inglés *Mannitol regulator* (Henstra et al. 1999) y LicR, del inglés *Lic Operon Regulator* (Tobisch, Stülke, Hecker 1999).

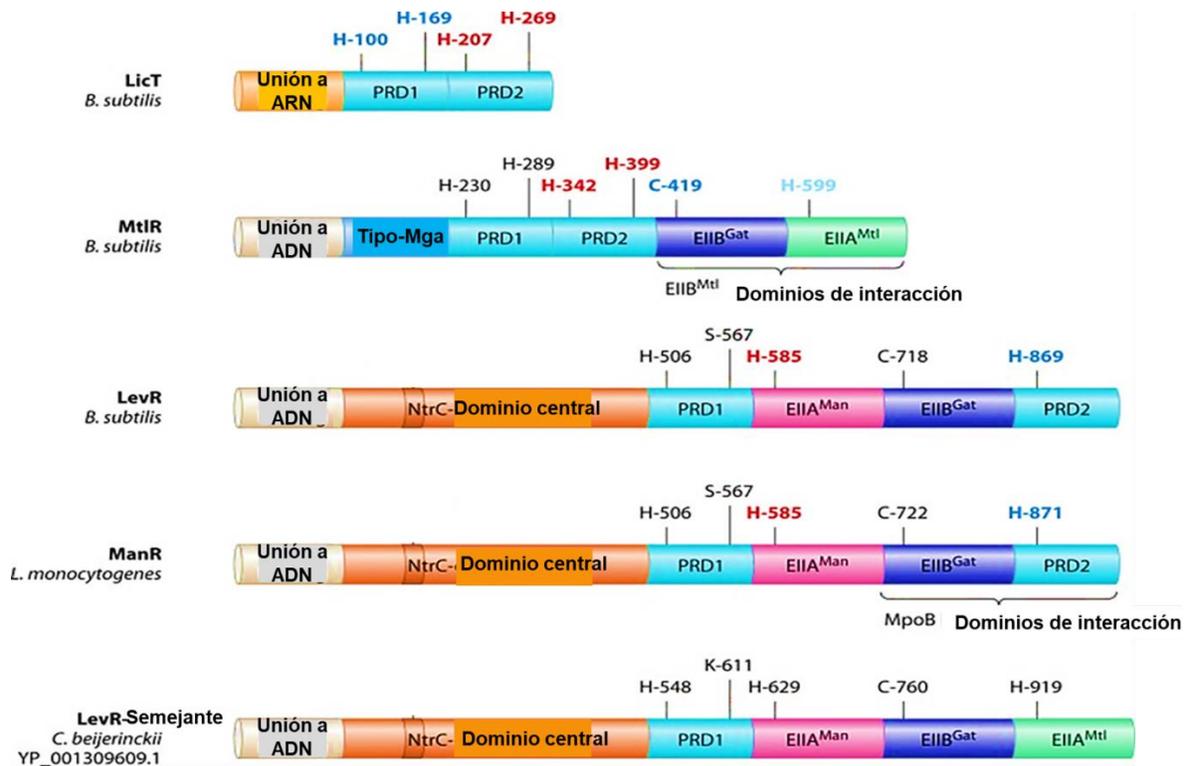
Cada tipo de regulador exhibe una prioridad para familias específicas de PTS; para las familias de fructosa/manitol reguladores de tipo MtlR, y para lactosa/celobiosa y galactitol; Principalmente son LicR. Estos activadores de transcripción contienen otros dominios reguladores.

Por ejemplo, los activadores de tipo LevR del orden *Clostridiales*, poseen además del motivo de hélice-giro-hélice de unión al ADN, un homólogo del dominio central que contiene casetes de unión a ATP de reguladores de tipo NtrC, seguido de cuatro dominios reguladores; dos o, en algunos casos, tres de los dominios reguladores son los dominios EIIA y EIIB de las clases PTS de manosa / glucosa, galactitol y manitol / fructosa (Figura 9)

Los reguladores de tipo NtrC que contienen tres dominios EII pertenecen principalmente a *Clostridiales*, incluidos *Clostridia*, *Thermoanaerobacter*, *Carboxydibrachia* y algunos otros firmicutes (Figura 9).

En algunos reguladores de tipo LevR, el PRD2 *truncado* puede reemplazarse con un dominio similar a EIIA<sup>Mtl</sup>, como es el caso de la proteína con número de identificación YP\_001309609.1 de *C. beijerinckii* (Figura 9) (Deustcher et al. 2014).

Con algunas excepciones, los factores transcripcionales que contienen PRD controlan la expresión de los operones *pts*. La fosforilación de estos factores transcripcionales por los componentes EIIA o EIIB del PTS relacionado inhibe su actividad y, por lo tanto, la transcripción de genes.

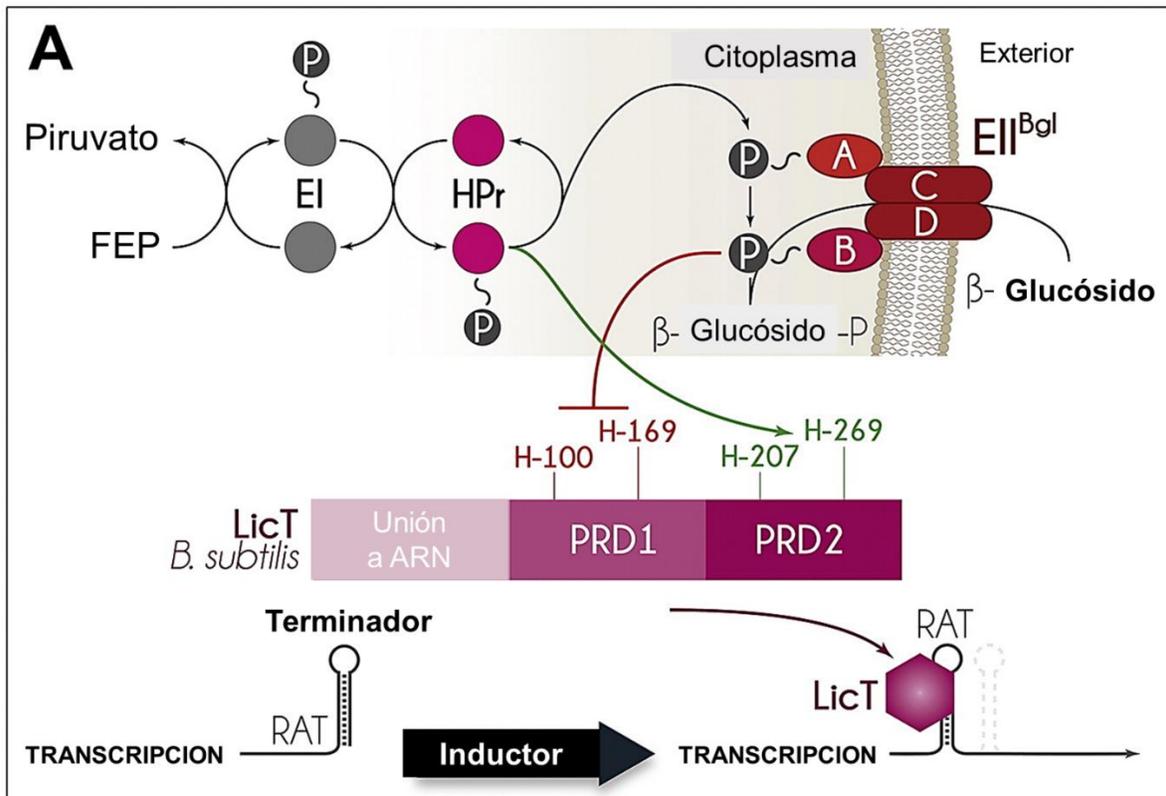


**Figura 9.** Representación esquemática de la constitución por dominios funcionales, de Proteínas; activadores/antiterminadores transcripcionales que, contienen PRD (modificado de Deustcher et al. 2014). Se muestran el antiterminador de *B. subtilis* LicT (que se une al ARN) y varios activadores de la transcripción (que se unen al ADN), incluidos los reguladores de *B. subtilis* MtlR y LevR. Los antiterminadores se componen de dos PRD fusionados al dominio de unión a ARN. En el antiterminador de *B. subtilis* LicT los mencionados dos PRD, generalmente contienen cuatro sitios potenciales de fosforilación mediada por PTS. Los activadores de la transcripción de tipo MtlR contienen dos PRD fusionados a los dominios de unión a ADN y similares a Mga (dominio que se asemeja al gen Mga de *Streptococcus pyogenes* regulador de la virulencia); seguidos por un dominio de tipo EIB<sup>Gat</sup> y un dominio de tipo EIIA<sup>Mtl</sup>. *B. subtilis* MtlR debe activarse tanto por la fosforilación en His-342 como por la interacción de sus dominios similares a EIB<sup>Gat</sup> C-terminal y EIIA<sup>Mtl</sup> (marcados con un corchete) con el dominio EIB<sup>Mtl</sup> de la PTS MtlA específica de manitol permeasa (Bouraoui et al. 2013). En todas las proteínas presentadas, los sitios de fosforilación estimulantes conocidos (por P~His-HPr) están indicados por números rojos, y los sitios de fosforilación inhibitoria (por P~EIIA o P~EIB) están escritos en azul (azul pálido en MtlR indica leve fosforilación). También se presenta en esta figura el activador de la transcripción de tipo LevR ManR de *L. monocytogenes*.

En todas las proteínas presentadas (Figura 9), los sitios de fosforilación estimulantes conocidos (por P~His-HPr) están indicados por números rojos, y los sitios de fosforilación inhibitoria (por P~EIIA o P~EIB) están escritos en azul (azul pálido en MtlR indica leve fosforilación). También se representa (en la figura 9) el activador de la transcripción de tipo LevR y ManR de *L. monocytogenes*. Cabe señalar que los sitios de fosforilación no siempre se conservan entre especies (Xue y Miller 2007).

## 2.4.2 Mecanismo de regulación de los antiterminadores que contienen PRD

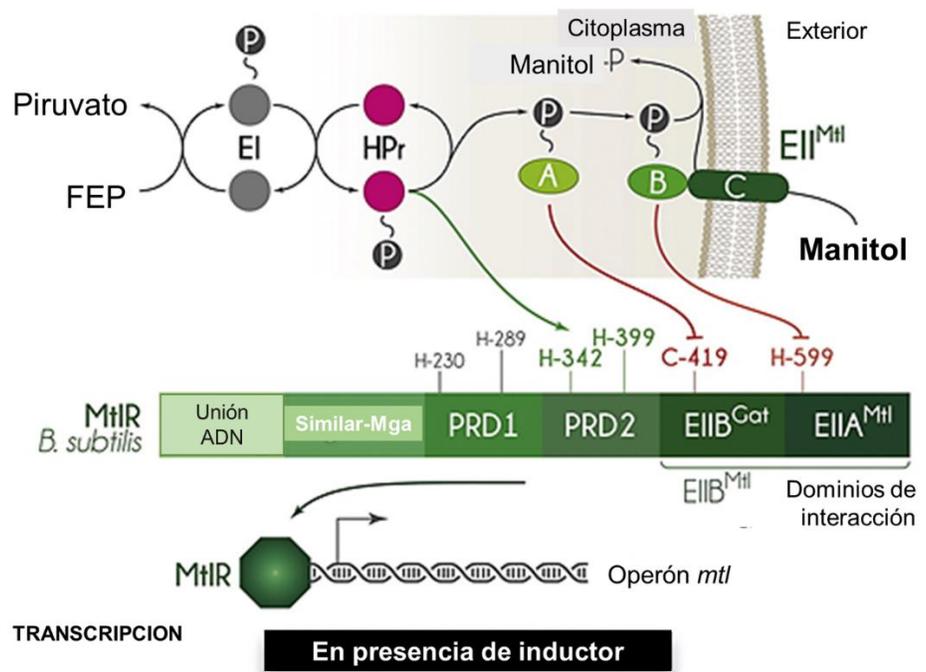
Los antiterminadores son proteínas de unión a ARN, que evitan la formación de estructuras terminadoras en la parte no traducida del ARN nascente al favorecer la formación de estructuras de ARN alternativas. Los antiterminadores controlados por PTS forman dímeros y poseen un dominio de unión a ARN N-terminal seguido de dos PRD (Figura 10). La fosforilación por el EIIb afín en las histidinas conservadas en PRD1 generalmente inhibe el antiterminador y la fosforilación en PRD2 por P~His-HPr lo estimula (Deustcher et al. 2014, Galinier y Deustcher 2017).



**Figura 10.** Regulación del antiterminador transcripcional LicT de *B. subtilis* (Modificado de Galinier y Deustcher 2017). LicT contiene cuatro residuos histidina fosforilables conservados. La fosforilación en PRD1 inhibe la actividad de LicT; catalizada por P~EIIb<sup>Bgl</sup> y ocurre en ausencia de β-glucósidos. En contraste, cuando los β-glucósidos están presentes, preferiblemente están fosforilados por EIIb<sup>Bgl</sup>, y una parte importante del antiterminador permanece sin fosforilar. Esta forma aún no es funcional hasta que la fosforilación en PRD2, que es catalizada por P~His-HPr. En ausencia de β-glucósidos, la transcripción comienza pero termina prematuramente en la región líder que precede a los genes estructurales. En presencia de β-glucósidos y en ausencia de un PTS-azúcar represor, EII Bgl y, por lo tanto, His-100 y His-169 en PRD1 no están fosforilados, y uno o ambos His conservados en PRD2 están fosforilados (Linder et al. 1999). El LicT se activa y se une al ARN en el antiterminador ribonucleico RAT (Ribonucleic AntiTerminator sequence). Esta unión estabiliza la estructura secundaria del ARN envolviendo la RAT, lo que previene la formación del terminador superpuesto, y la transcripción continúa en los genes estructurales.

## 2.4.3 Mecanismo de regulación de los activadores transcripcionales de tipo MtlR / LicR

Los dos PRD generalmente presentes en los activadores transcripcionales de tipo MtlR / LicR están precedidos por un dominio de unión a ADN y uno similar a Mga y seguidos por dos dominios, que se parecen a los dominios PTS EIIB<sup>Gat</sup> y EIIA<sup>Mtl / Fru</sup> (Figura 11). Por lo tanto, estos reguladores pueden contener hasta seis sitios de fosforilación (Galinier y Deustcher 2017).

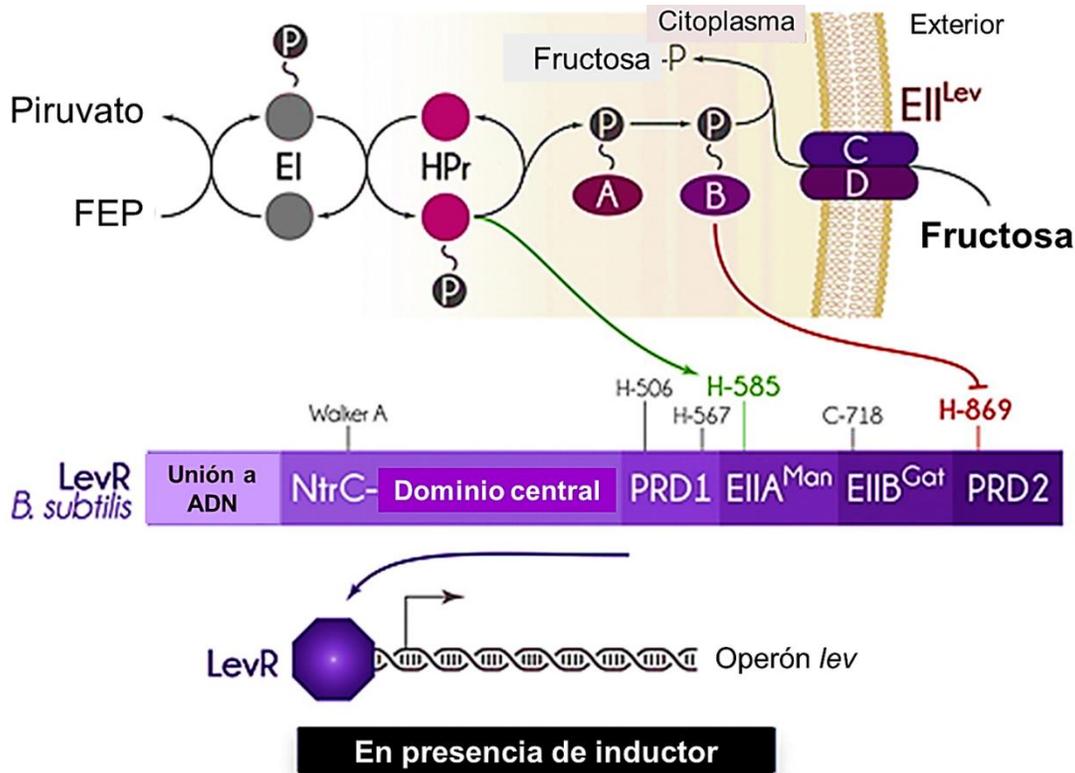


**Figura 11.** Regulación del activador transcripcional MtlR de *B. subtilis* (Modificado de Galinier y Deustcher 2017). En MtlR, los dos PRD son seguidos por un dominio de tipo EIIB<sup>Gat</sup> y un dominio de tipo EIIA<sup>Mtl</sup>. La fosforilación en PRD2 a través de P~His-HPr tiene un efecto estimulante sobre la actividad de MtlR. En ausencia de manitol, se propuso que la fosforilación en Cys-419 del dominio de tipo EIIB<sup>Gat</sup> por P~EIIA<sup>Mtl</sup> y en His-599 en el dominio de tipo EIIA<sup>Mtl</sup> por P~EIIB<sup>Mtl</sup> tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de MtlR. En contraste, en presencia de manitol, P~EIIB<sup>Mtl</sup> transfiere su grupo fosfato principalmente al azúcar, lo que lleva a la desfosforilación de MtlR. Además, la activación de MtlR requiere que la parte C-terminal de MtlR se una a EIIB<sup>Mtl</sup> sin fosforilar. MtlR segregado de la membrana se une a su diana de ADN y estimula la transcripción del operón *mtl* (Joyet et al. 2010).

Aunque las proteínas MtlR de diferentes bacterias muestran una identidad de secuencia significativa, su modo de regulación puede variar en gran medida. Por ejemplo, a diferencia de MtlR *B. subtilis*, la fosforilación inactivadora en MtlR de *G. stearothermophilus* es catalizada por P~EIIB<sup>Mtl</sup> en un dominio similar a EIIA<sup>Mtl / Fru</sup>. Además, su activación no requiere una interacción con EIIB<sup>Mtl</sup> no fosforilado (Henstra, Duurkens, Robillard 2000). Se observó una regulación idéntica para MtlR de *L. casei*, excepto que esta proteína no necesita ser fosforilada por P~His-HPr para estar activa. En consecuencia, la expresión del operón *mtl* en *L. casei* no está sometido a RCC (Joyet et al. 2015).

## 2.4.4 Regulación de los activadores transcripcionales de tipo LevR

Los reguladores de tipo LevR también contienen un dominio de unión a ADN N-terminal y cuatro dominios reguladores, aunque su orden y tipo de dominios PTS son ligeramente diferentes (Figura 12)



**Figura 12.** Regulación del activador transcripcional LevR de *B. subtilis* (Modificado de Galinier y Deustcher 2017). LevR contiene un dominio central similar a NtrC y dominios similares a EIIA<sup>Man</sup> y EIIB<sup>Gat</sup> insertados entre el PRD1 completo y un PRD2 truncado. La fosforilación en His-585 es catalizada por P~His-HPr y estimula la actividad de LevR. La fosforilación en His-869 es catalizada por P~EIIB<sup>Lev</sup> e inhibe la actividad de LevR. En ausencia de fructosa o manosa, EIIB<sup>Lev</sup> está presente principalmente en su forma fosforilada. Esto permite la fosforilación e inactivación de LevR por P~EIIB<sup>Lev</sup>, y el operón *lev* está mal expresado. En contraste, en presencia de fructosa, P~EIIB<sup>Lev</sup> transfiere su grupo fosfato principalmente al azúcar entrante, lo que lleva a la desfosforilación y activación de LevR, lo que conduce a la inducción del operón *lev*.

El primer PRD es seguido por un dominio EIIA de la familia PTS de manosa y un dominio similar a EIIB<sup>Gat</sup>. El último dominio regulador suele ser un PRD incompleto que contiene solo el primer residuo His fosforilable pero, en algunos casos, puede ser un EIIA de la familia PTS de manitol / fructosa. La diferencia más importante, sin embargo, es la inserción de un dominio entre la secuencia de unión al ADN y PRD1, que se asemeja al dominio central en las proteínas de unión al potenciador de tipo NifA / NtrC con algunas excepciones (Mazé et al. 2004).

## 2.5 PTS en *Streptomyces*.

La presencia del PTS en *S. coelicolor* fue reportada por primera vez en el año 1995 (Titgemeyer et al., 1995). En 1999 dos grupos reportaron la clonación del gen *ptsH* cuyo producto es la fosfotransferasa HPr (Butler et al., 1999, Parche et al., 1999).

En el año 2000, Parche et al., reportaron la existencia de tres genes de *S. coelicolor* que codifican para proteínas homólogas no específicas del PTS y 6 genes que codifican para proteínas homólogas específicas, *S. coelicolor* tiene menos genes *pts* que la gran cantidad que posee *E. coli* y los que contiene *B. subtilis*.

Se conoce la existencia del sistema PTS para internalizar la fructosa en *S. coelicolor* y también los genes que codifican, tanto para las enzimas EI, EIIA<sup>Crr</sup> y HPr, como para permeasas de N-acetilglucosamina (GlcNAc), y una posible permeasa de maltosa (NagE1, NagE2 y MalX1) (Parche et al., 2000).

En 2004, Derouaux et al., caracterizaron la proteína receptora de catabolito Crp, la cual está involucrada en el sistema PTS de *S. coelicolor*. La inactivación de dicha proteína genera una deficiencia en la germinación de esporas y un fenotipo similar al de la CGM en el gen que codifica para la adenilato ciclasa (*cya*), que imposibilita la producción de AMP cíclico (AMPc). Esto sugiere que el AMPc puede ser una molécula clave para iniciar los eventos de germinación pues, el sistema adenilato ciclasa-AMPc-Crp, activa el proceso de desarrollo. En dicho trabajo se comprobó por tres métodos distintos que la proteína Crp de *S. coelicolor* es capaz de unirse a AMPc.

La eliminación de los genes *pts* generales (*ptsH*, *ptsI* y *crr* que codifican HPr, EI y EIIA, respectivamente), conducen a una detención del desarrollo del micelio vegetativo y, en consecuencia, las CGM tienen un fenotipo no esporulante (*bold*:calvo) (Nothaft et al., 2003a; Rigali et al., 2006).

Este fenómeno es más probable que se asocie con la producción alterada de sideróforo desferrioxamina, que es esencial para el desarrollo adecuado, especialmente en medios que contienen glucosa (Yamanaka et al., 2005; Traxler et al., 2012; Lambert et al., 2014). Esta observación revela un vínculo directo entre la utilización de carbono, la homeostasis del hierro y el control del desarrollo, pero actualmente se desconoce cómo está mediado esto.

Así mismo, la actividad cinasa de HPr-K/P parece estar ausente en *S. coelicolor* (Stülke y Hillen, 1999). En 2003, Nothaft et al. sugirieron que la fuente de carbono N-acetilglucosamina podía ser el posible sustrato de NagE1 o NagE2 y se comprobó, por caracterización *in vitro*, que la enzima EIIA<sup>Crr</sup> funcionaba como una proteína EIIA específica para N-acetilglucosamina. La expresión de *ccr-pstI* y *ptsH* son inducidos juntos como un operón, por la presencia de N-acetilglucosamina.

## 2.6 RCC en *Streptomyces*.

Al parecer y sorprendentemente el PTS no desempeña un papel central en la RCC de *Streptomyces*, pues la eliminación de los genes *pts* en general no tiene efecto sobre este mecanismo de regulación (Butler et al., 1999; Nothaft et al., 2003) y aunque el complejo cAMP-CRP, tiene un impacto global en la producción de antibióticos, no parece tener un papel central en este fenómeno (Derouaux et al., 2004; Gao et al., 2012).

Un análisis mutacional del gen *ccr-pstI*, demostró que EI y EIIA<sup>Crr</sup> son parte del sistema PTS de *S. coelicolor* para N-acetilglucosamina, y que, si falta uno u otro, las células no pueden crecer en presencia de este aminoglucósido, mientras que la utilización de galactosa, glucosamina, glucosa, glutamato, glicerol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa, no parece verse afectada.

Está bien establecido que la glucosa y otras fuentes de carbono favorables, reprimen la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Sanchez et al. 2010), y se han realizado observaciones similares para el nitrógeno (Reuther y Wohlleben 2007).

Sorprendentemente, en *Streptomyces*, la N- acetilglucosamina y el glutamato son sustratos altamente preferidos; por ejemplo en cultivos tanto con glucosa como con glutamato, *S. coelicolor* consume todo el glutamato antes de que se metabolice la glucosa (van Wezel et al., 2006a; Romero-Rodríguez et al., 2016).

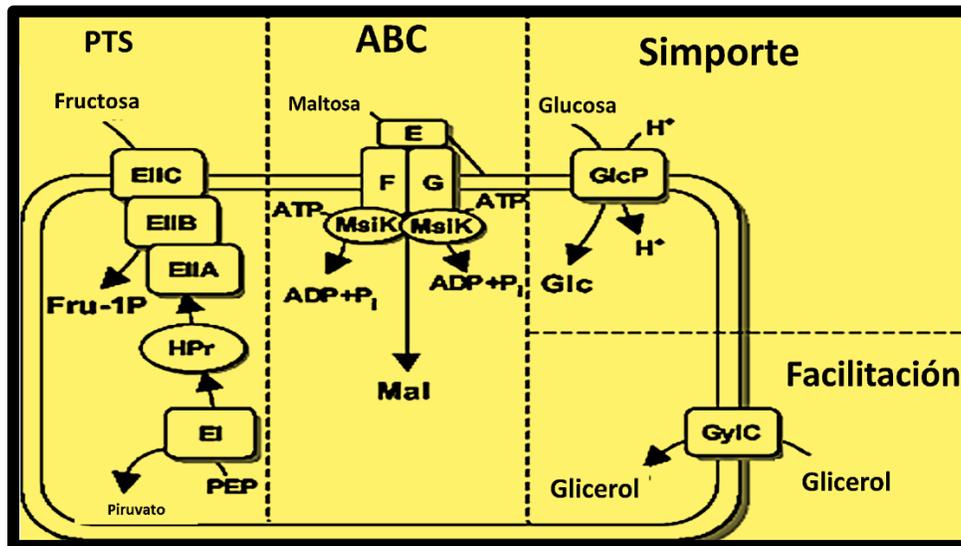
Aun así, como en otras bacterias, la glucosa exhibe RCC sobre otras fuentes de utilización de otras fuentes de carbono, como glicerol, arabinosa, fructosa y galactosa.

Por lo anterior se considera actualmente, que la proteína central en la RCC de *Streptomyces* es la glucosa quinasa (Glk fosforila la glucosa internalizada para iniciar la glucólisis) (Angell et al., 1994 ; Kwakman y Postma 1994 ), ya que el papel clave en la RCC en estas bacterias por parte del PTS aún se desconoce (si es que existe).

La glucosa quinasa Glk (codificada por el gen *glkA* en *Streptomyces coelicolor*) realiza el primer paso en la glucólisis mediante la fosforilación de la glucosa a glucosa-6P. Glk es miembro de la familia ROK (Represor ORF Kinases); proteínas cinasas represoras de marco de lectura (Titgemeyer et al., 1994).

Desde que, en 1982 David Hodgson reportó que la glucosa generaba represión catabólica sobre diferentes clases de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa y glicerol) en *S. coelicolor*, a la fecha, existen numerosos estudios que sugieren que la Glk juega un papel central en la represión catabólica.

Otro hecho interesante es que, en *Streptomyces*, la glucosa no se transporta a través del PTS, sino a través de la permeasa denominada GlcP de la Superfamilia de Facilitadores Principales (Glucose Permease: *Mayor Facilitator Superfamily*) (van Wezel et al., 2005); Pérez- Redondo et al., 2010; Romero et al., 2015) (Figura 13)



**Figura 13.** Sistemas de transporte de carbohidratos en *S. coelicolor* (Modificado de Bertram et al. 2004). Un análisis in “*silico*” del genoma de *S. coelicolor*, predice la existencia de diversos genes para la incorporación de carbohidratos, como posibles componentes de PTS, sistemas de transporte ABC (ATP Binding Cassete), transporte facilitado y simporte. Se muestra al sistema PTS, con sus componentes transportando fructosa (Fru) y fosforilando a fructosa-1fosfato. El sistema ABC se muestra transportando maltosa (Mal). Así mismo se observa el transporte de glicerol (Gly) por difusión facilitada y a la glucosa (Glc) transportándose por medio de un sistema de simporte acoplado a protones.

En *Streptomyces* los sistemas ABC son utilizados para la incorporación de maltodextrinas, xilósidos, glucósidos, quitobiosa, lactosa, ribosa, entre otros (Bertram et al. 2004).

Se ha señalado a GlcP como el principal transportador de glucosa en *S. coelicolor*, (Wezel et al. 2005) el cual es inducido por D-glucosa, este sistema se codifica por dos genes; *glcP1* y *glcP2* que transcriben para proteínas simportadoras dependientes de protones (Wezel et al., 2005).

En el 2007 Wezel et al., reportaron que la actividad catalítica de la glucosa cinasa (Glc) en *S. coelicolor*, se modula en una forma dependiente de la fuente de carbono, y que tanto la actividad como su localización celular correlaciona muy bien con la actividad que muestra GlcP.

Lo anterior sugiere que ambos componentes generan un complejo Glc-GlcP activo, tipo permeasa, y que este complejo es necesario para el transporte de glucosa intracelular en dicho microorganismo (Wezel et al. 2007).

### 2.6.1 El papel de Glk en la RCC de *Streptomyces*.

La RCC se estudió en *S. coelicolor* desde inicios de la década de los 80 cuando David Hodgson creció células de *S. coelicolor* en presencia de arabinosa, una fuente de carbono cuya utilización es reprimida en presencia de glucosa, y de 2-desoxiglucosa (*dog*), un análogo de la glucosa no asimilable, pero capaz de activar el sistema de regulación por carbono.

Como resultado de esta fuerte presión selectiva, aparecieron mutantes resistentes a *dog* (*dogR*) que formaban halos que indicaban la utilización de agar, a pesar de la presencia de glucosa, es decir, eran mutantes insensibles a represión por carbono (Hodgson 1982).

Aunque la mayoría de estas mutantes eran incapaces de crecer en glucosa como única fuente de carbono (mutantes *dogR* G<sup>-</sup>), Hodgson también obtuvo mutantes *dogR* capaces de usar glucosa (G<sup>+</sup>) y con una capacidad intermedia (G<sup>+/-</sup>) para usar dicho carbohidrato como única fuente de carbono.

El fenotipo de las mutantes G<sup>+</sup> y G<sup>+/-</sup> podría haberse explicado si estas mutantes hubieran mostrado deficiencias en su capacidad para transportar glucosa, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el consumo de glucosa de las mutantes G<sup>+</sup> y G<sup>+/-</sup>, y la cepa silvestre, al menos durante las primeras 12 horas de su medición.

En cambio, después de 24 horas, pudo observarse una disminución en la velocidad de consumo de glucosa de estas mutantes, sugiriendo que habían sufrido afectaciones en su metabolismo. Debido a que estas mutantes también eran capaces de usar galactosa, la cual es metabolizada a través de la glucosa-6-fosfato (G6P), y tomando en cuenta que la única reacción de la glucólisis entre el transporte de glucosa y la formación de G6P es la fosforilación de la glucosa, la cual está mediada por la glucosa cinasa, se postuló que las mutantes *dogR* debían tener mutaciones en el gen que codifica dicha enzima (Hodgson 1982).

En consistencia con esto, Seno y Chater demostraron solamente un año después que, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes *dogR* de *S. coelicolor* habían perdido su actividad glucosa cinasa (Seno and Chater 1983).

Para identificar las mutaciones presentes en las mutantes *dogR*, se realizaron experimentos de complementación genética. Estos experimentos consistieron en transformar las mutantes *dogR* G<sup>-</sup> con fragmentos de DNA de 30 kb del cromosoma de *S. coelicolor*.

Después de la transformación, algunas mutantes *dogR* recuperaron su habilidad para crecer en glucosa como única fuente de carbono, y su actividad glucosa cinasa, sugiriendo fuertemente que el DNA introducido debía contener el gen que codifica para la glucosa cinasa (*glk*) (Ikeda, Seno et al. 1984).

El análisis de las construcciones obtenidas de algunas de estas mutantes reveló la presencia recurrente de un fragmento de DNA de 2.9 kb que, según las observaciones previas, debía contener el gen que codifica para la glucosa cinasa (*glkA*) (Ikeda et al. 1984).

La secuencia de este fragmento no solo descubrió la presencia del gen *glkA*, sino también, y de manera inesperada, la presencia un segundo gen: *sco2127* que codifica para una proteína de función desconocida (Angell et al. 1992).

Debido a esto, se propuso que el gen *glk* era el único responsable de la RCC en *S. coelicolor*, sin embargo, la transformación de algunas mutantes *dogR* únicamente con este gen (clonado en un vector de bajo número de copias) no fue suficiente para restablecer la RCC, analizada en función de la expresión del gen que codifica para la agarasa (*dag*).

En cambio, la transformación de dichas mutantes con un fragmento de DNA que contenía los genes *sco2127* y *glkA*, si logró restablecer la represión del gen *dag* (Angell et al. 1994). A pesar de estas observaciones, Angell y colaboradores ignoraron la participación del gen *sco2127* en el fenómeno de RCC.

Propusieron que, como el gen *glkA* también se transcribe desde el promotor localizado río arriba del gen *sco2127* (Angell et al. 1992), las mutantes *dogR* transformadas únicamente con el gen *glkA* no habían complementado debido al bajo número de copias del vector utilizado en un principio.

Por lo tanto, se planteó que un incremento en la expresión del gen *glkA* restablecería la represión por carbono. Aunque la sobreexpresión del gen *glkA* en distintas mutantes *dogR* ayudó a restablecer la sensibilidad a *dog*, la utilización de glucosa y por lo tanto, la actividad glucosa cinasa, sorpresivamente no restableció la represión por glucosa (Angell et al., 1994).

En contraste, la transformación de dichas mutantes con una sola copia de los genes *sco2127* y *glkA* fue suficiente para evitar la expresión del gen *dag*. Además de señalar que el gen *glkA*, y la actividad glucosa cinasa no eran suficientes para reprimir la expresión del gen *dag* en presencia de glucosa, estos resultados advirtieron por primera vez que el gen *sco2127* jugaba un papel importante en la regulación por carbono en *S. coelicolor* (Angell et al. 1994).

Similar a lo ocurrido con la expresión del gen *dag* en *S. coelicolor*, distintos autores observaron que en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* la glucosa disminuye considerablemente la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la formación de antraciclinas (Segura et al. 1996; Escalante et al. 1999; Ramos et al. 2004).

Demostrando que en *S. peucetius* var. *caesius* la formación de enzimas extracelulares y antibióticos también está sujeta a represión por carbono. De acuerdo con estas observaciones, la formación de  $\beta$ -galactosidasa y antraciclinas en distintas mutantes *dogR* de *S. peucetius* var. *caesius* incrementó con respecto a los niveles mostrados por la cepa silvestre, a pesar de la presencia de glucosa (Segura et al. 1996).

Confirmando que las mutantes *dogR* de *S. peucetius* var. *caesius*, al igual que las mutantes *dogR* de *S. coelicolor*, son insensibles a represión por glucosa (Segura et al. 1996; Escalante et al. 1999).

Estas observaciones sugieren que el proceso de RCC se conserva entre los organismos del género *Streptomyces*, sin embargo, a diferencia de lo observado en *S. coelicolor*, en *S. peucetius* var. *caesius* se obtuvieron mutantes insensibles a RCC con una actividad glucosa cinasa similar a la de la cepa silvestre (Ramos et al. 2004), descartando que hubiera una relación directa entre la actividad glucosa cinasa y la RCC.

Adicionalmente, estos resultados confirmaron que ni el gen *glk*, ni la actividad glucosa cinasa (por sí solos) eran responsables de la RCC. De acuerdo con lo anterior, la secuencia del gen *glk* de distintas mutantes insensibles a RCC no presentó deleciones ni mutaciones puntuales. A pesar de esto y con la intención de identificar algún vínculo entre el fenómeno de regulación por carbono y el fenotipo de las mutantes insensibles a dicho proceso, se midió el transporte de glucosa en distintas mutantes insensibles a RCC.

Este análisis reveló que, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC mostraban una disminución considerable en el transporte de glucosa (Ramos et al. 2004), lo cual advertía la presencia de una correlación directa entre el fenómeno de RCC y el transporte de glucosa.

En el 2007, van Wezel et al., propusieron que la cantidad de proteína Glk es más o menos independiente de la fase de crecimiento, pero su actividad catalítica depende de la presencia de glucosa en el medio (van Wezel et al., 2007). Asimismo, reportan que el transporte de glucosa y la actividad de Glk presentan perfiles similares, lo que indica una posible relación funcional entre ellos. Prueba de ello es que la incorporación de glucosa en una cepa mutada en Glk decae drásticamente (van Wezel et al., 2007).

Análisis de qRT-PCR muestran que tanto el nivel de expresión basal como el nivel de expresión inducida por glucosa del gen *glcP1*, son similares en la cepa mutante en *glkA* y en la cepa silvestre, lo que demuestra que la expresión de *glcP1* no depende de la presencia de *glkA*. Es decir, la diferencia en las actividades de transporte entre la cepa silvestre y la mutante en *glkA* no generan diferencias en la expresión de *glcP1* (van Wezel et al., 2007).

Una probable explicación es que la incorporación de la glucosa en la mutante es inhibida por la acumulación de glucosa intracelular. Una reducción en la incorporación de glucosa fue observada en una mutante en *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* (Ramos et al., 2004). Estos datos hicieron pensar que los productos *glkA* y *glcP* operan en conjunto y quizás interactúan entre sí (van Wezel et al., 2007).

Para examinar si Glk se une a GlcP, se realizaron pruebas de western blot con anticuerpos anti-Glk, mostrando que cuando las células son crecidas en glicerol como única fuente de carbono, la Glk es encontrada únicamente en la fracción citoplásmica, pero cuando las células se crecen en glucosa, una cantidad significativa de Glk es encontrada en la fracción membranal (van Wezel et al., 2007).

Esta observación ha generado un modelo en el que se propone que el tetrámero de la Glk forma un complejo con la proteína de transporte de glucosa glcP en la membrana celular, mientras que la forma citoplásmica de la Glk actúa en respuesta a la presencia de glucosa, ATP u otros metabolitos aún desconocidos (van Wezel et al., 2007).

Guzmán et al. (2005) verificaron la presencia de genes homólogos a *SCO2127* y *glk* en el genoma de *S. peucetius* var. *caesius* a través de un Southern blot usando como sondas los genes en cuestión de *S. coelicolor*.

Los resultados mostraron que dichos genes se encuentran adyacentes en el genoma de *S. peucetius* var. *caesius*, como sucede en los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (Guzmán et al., 2005). Así mismo, utilizaron los genes *sco2127* y *sco2126* para transformar tres mutantes Dog<sup>R</sup> de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistentes a RCC (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de la complementación de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre transporte, actividad de Glk y sensibilidad a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*.

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa % <sup>a</sup>	Actividad de Glk % <sup>b</sup>	Sensibilidad a RCC <sup>c</sup>
<b>Original</b>	-----	100	100	Sensible
<b>Dog<sup>R</sup></b>	-----	51	15	Resistente
<b>SDR-1</b>	<i>glkA</i>	49	95	Sensible
<b>SDR-2</b>	<i>sco2127</i>	108	115	Sensible
<b>SDR-3</b>	<i>sco2127+glkA</i>	113	331	Sensible

(a) Incorporación de glucosa: 100% (2.21 μmol/mg de micelio seco). (b) Glk: 100% (170 U/mg de proteína). (c) La sensibilidad a RCC se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí Modificado de Guzmán et al. 2005.

Estos datos (tabla 1) sugieren que el producto del gen *sco2127* tiene un efecto positivo sobre la actividad de Glk y el transporte de glucosa (Guzmán et al. 2005). Esto es sorprendente, por el hecho de que no parece que la secuencia de *sco2127* codifique para una proteína transportadora de glucosa u otra Glk (Angell et al. 1992).

### 3. Justificación

Con base en lo anterior, se ha sugerido que el gen *sco2127* está involucrado en el mecanismo de RCC de metabolitos especializados (como la actinorrodina). Sin embargo, aún no existe un modelo que explique satisfactoriamente este mecanismo de regulación. Debido a esto, es necesario realizar estudios que permitan elucidar la función del gen *sco2127* en la represión catabólica por carbono y su probable relación con la biosíntesis de metabolitos especializados como la actinorrodina en *S. coelicolor*. Forero et al. (2012) desarrollaron una CGM que carece del gen *sco2127* denominada  $\Delta$ *sco2127*. El estudio del efecto de la mutación por delección específica de *sco2127* brindará mayores evidencias del papel que podría tener el producto codificante de este gen en la RCC y producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*.

## 4. HIPÓTESIS

El gen *sco2127* tiene una función cuya actividad influye en la represión catabólica por glucosa y que la producción de actinorrodina, sujeta a dicha represión en *Streptomyces coelicolor*, puede funcionar como señal colorida para identificar la sensibilidad a RCG en una CGM  $\Delta$ *sco2127*.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Establecer si el gen *sco2127* tiene un papel en la represión catabólica por glucosa en *Streptomyces coelicolor*.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer diferencias entre el fenotipo de la CGM  $\Delta$ *sco2127* y la cepa tipo silvestre de *Streptomyces coelicolor*.
- Identificar efectos en la represión catabólica por glucosa de la CGM  $\Delta$ *sco2127* de *S. coelicolor* observando la producción de actinorrodina como indicador de metabolismo secundario.
- Determinar posibles dominios funcionales de SCO2127 utilizando herramientas bioinformáticas.

## 6. ESTRATEGIA GENERAL

Mientras se realizaba la presente investigación, de manera sincrónica se diseñaba por parte de nuestro equipo de investigación una CGM de *Streptomyces coelicolor* M145, a la cual le fue extraído el gen *sco2127* de su cromosoma bacteriano (referida aquí como *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127*) (ver tabla 2 para características y referencias). Nuestra contribución implicaba construir un plásmido que incluyera el gen *sco2127* para poder generar una cepa revertante; de tal forma que nos permitiera atribuir el fenotipo observado en la CGM  $\Delta$ *sco2127* exclusivamente al gen *sco2127* y descartar efectos polares o colaterales debidos a las técnicas de manipulación del cromosoma.

Como parte de esta estrategia general empleamos el plásmido pSET152 (ver tabla 2 para características y referencias) para insertar dentro de este el gen *sco2127*. A este plásmido se le denominó pSET2127 (ver resultados). Además dicho plásmido nos permitiría desarrollar mutaciones puntuales o deleciones en la secuencia ADN del gen *sco2127*, para identificar los posibles dominios funcionales de la proteína SCO2127, los cuales comprobaríamos transformando la CGM nula en *sco2127* para extrapolar su función con los fenotipos encontrados.

Debido a que pSET2127 tenía como marcador de selección el gen de resistencia a apramicina, al igual que la CGM mencionada, (pues como parte de la técnica utilizada para obtener la CGM, un gen de resistencia a apramicina debía ser colocado en sustitución del gen *sco2127* como marcador de selección) y dado que la construcción del plásmido pSET2127 ya estaba lista al momento de recibir la CGM con la misma resistencia a apramicina se decidió rediseñar el plásmido incorporando el gen de resistencia a higromicina proveniente de otro plásmido denominado pMS82 (ver tabla 2 para características y referencias), al cual llamaríamos pSETH2127.

Aunque se buscó inicialmente transferir solamente el gen *sco2127* a pMS82, los sitios de restricción no correspondían en ambos plásmidos, para la simple digestión y reconstrucción. Afortunadamente ni lo anterior ni la obtención incompleta del gen de higromicina por PCR (ver resultados), tuvieron repercusión, pues se consiguió terminar el proceso por parte de nuestro grupo de trabajo y se obtuvo la CGM  $\Delta$ *sco2127* al retirar el gen de resistencia a apramicina de su cromosoma bacteriano.

Debido lo anterior se hace una distinción entre las cepas utilizadas en la presente investigación de la manera siguiente: La CGM *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *sco2127*::*apra* contiene el gen de resistencia a apramicina en sustitución del gen *sco2127* en su genoma; mientras que la cepa denominada “CGM cicatriz” carece del gen *sco2127* y del gen de resistencia a apramicina denominada *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco2127*cicatriz, o simplemente  $\Delta$ *sco2127* pues contiene (en sustitución del gen *sco2127*) una secuencia específica no codificante que se puede identificar por secuenciación a la cual se le denominó cicatriz “scar”.

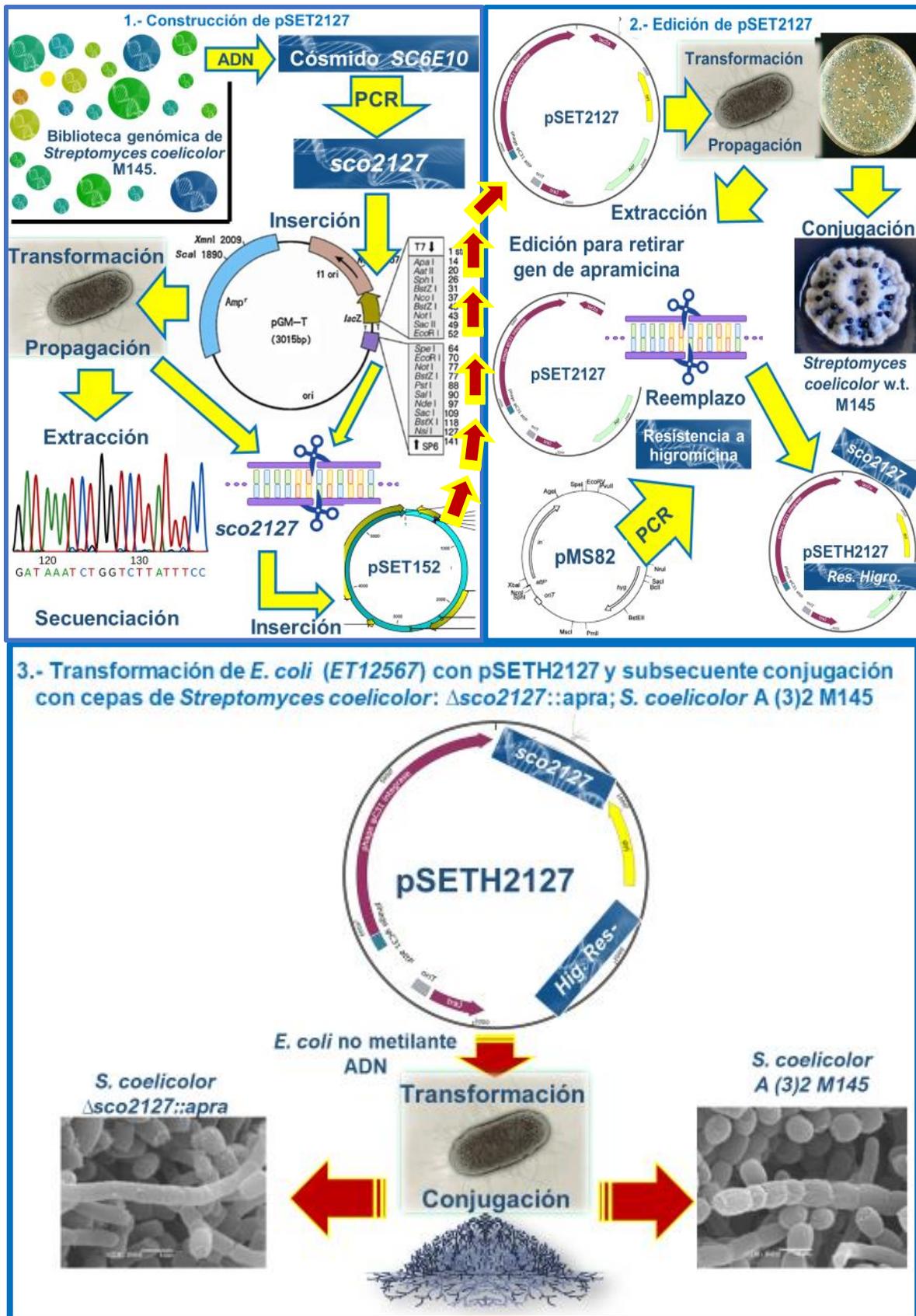


Figura 14. Estrategia general para la obtención de plásmidos y cepas para este estudio.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presentan las cepas (Tabla 2) y plásmidos (Tabla 3) empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

**Tabla 2.** Cepas empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

Cepas	Características	Referencias
<i>Streptomyces coelicolor</i> $\Delta$ sco2127::apra	SCP-1, SCP-2, $\Delta$ sco2127::apra	Obtenida mediante recombinación homóloga (Gust et al. 2003) por la Dra. Ángela Forero y donada por el Dr. Luis Servín.
<i>Streptomyces coelicolor</i> $\Delta$ sco2127 cicatriz	SCP-1, SCP-2, $\Delta$ sco2127scar	Obtenida mediante recombinación homóloga (Gust et al. 2003) por la Dra. Ángela Forero y donada por el Dr. Luis Servín.
<i>S. coelicolor</i> A (3)2 M145	SCP-1, SCP-2, WT (tipo silvestre).	Donada por el Dr. Luis Servín
<i>Streptomyces coelicolor</i> $\Delta$ sco2127 pSET2127	SCP-1, SCP-2, pSET2127	Este trabajo
<i>Streptomyces coelicolor</i> $\Delta$ sco2127, pSET152	SCP-1, SCP-2, pSET152	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> A (3)2 M145-pSET2127	SCP-1, SCP-2, pSET2127	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> A (3)2 M145-pSET152	SCP-1, SCP-2, pSET152	Este Trabajo
<i>Escherichia coli</i> ET12567	recA dam::Tn9 dcm-6. No metila DNA	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-,mk+), relA1, supE44, $\Delta$ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIq Z $\Delta$ M15]	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> JM109		Promega

**Tabla 3.** Plásmidos empleados para el desarrollo de este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencias
pSET152	Plásmido integrativo que contiene funciones de integración al genoma en <i>Streptomyces</i> $\phi$ C31 <i>int</i> y <i>att</i> y resistencia a apramicina para conjugación intergenérica <i>E.coli</i> ET12567/ <i>Streptomyces</i>	Donado por el Dr. Servín.
pSET2127	Plásmido pSET152 que contiene el gen <i>sco2127</i> con su región promotora.	Este trabajo
pGEM®-T Easy	Vector de clonación alta eficiencia para productos PCR, AmpR	Promega
pGEM2127	Plásmido pGEM®-T Easy que contiene el gen <i>sco2127</i> y su promotor obtenidos por PCR	Este Trabajo
pMS82	Plásmido integrativo que contiene funciones de integración al genoma en <i>Streptomyces</i> $\phi$ C31 <i>int</i> y <i>att</i> y resistencia a higromicina para conjugación intergenérica <i>E.coli</i> ET12567/ <i>Streptomyces</i>	Donado por el Dr. Servín

### **Condiciones de crecimiento de las cepas de *Streptomyces*.**

En este estudio se empleó la cepa *S. coelicolor* M145 (que carece de los plásmidos SCP1 y SCP2) como cepa silvestre. La CGM nula  $\Delta sco2127$  se obtuvo mediante recombinación homóloga (Gust et al. 2002) por la Dra. Ángela Forero y el Dr. Luis Servín, resistente a apramicina  $\Delta sco2127::aac(3)IV$ . Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL con 50 mL de medio YMG (ver anexo C). Para determinar la cantidad de esporas viables, se hicieron diluciones 1:10 en agua destilada que se sembraron en placas con medio sólido con la finalidad de obtener colonias sencillas que pudieran contarse. El medio fue inoculado con aproximadamente  $200 \times 10^6$  esporas, incubado a 30°C y agitado a 200 rpm (Kieser et al., 2000).

### **Preparación de células electro competentes de *E. coli* JM109.**

Dos matraces (1 L. de capacidad) con 500 mL de medio LB (anexo C) se inocularon en proporción 1/100 (cultivo/volumen de medio), con un cultivo de *E. coli* JM109, crecido durante una noche. Las células se incubaron a 37°C y 200 rpm en un Orbital Shaker-Flask Clamp Platform hasta tener una absorbancia (a 600 nm) entre 0.5 U.A. y 0.7 U.A. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se reservó en hielo entre 15-30 min, se centrifugó a 10,000 rpm en tubos cónicos de 50 ml (Corning™ Falcon™ 352098 de centrifuga estériles) por 15 min, en un rotor JLA500 para centrifuga Beckman-Coulter (previamente enfriado). Se removió el sobrenadante completamente y se resuspendieron los botones en 45 ml agua Mili Q fría (aprox. 12° a 15° C), Se repitió la centrifugación y en esta ocasión se resuspendió en 20 mL de glicerol al 10% frío (aprox. 12° a 15° C). Esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue removido y el botón resuspendido en un volumen final de 3 mL de glicerol al 10%. De la suspensión anterior se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ L y se conservaron a -70°C en tubos eppendorf 1.5 mL (Sambrook 2001).

### **Preservación de células de *Streptomyces*.**

De la cepa por preservar, se inocularon 200  $\mu$ L (del cultivo proveniente en medio líquido), en medio YMG con glicerol al 10% (40 mL) y el cultivo se incubó en matraces Erlenmeyer bafleados durante 48 h a 30°C y agitación de 200 rpm (Orbital Shaker-Flask Clamp Platform). Las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con solución salina isotónica (SSI) (NaCl 8.5 g/L) y resuspendidas en 10 mL de esta solución. Del cultivo anterior, se utilizó 1 mL para inocular 40 mL de medio YMG contenido en un matraz Erlenmeyer Bafleado Pyrex de 250 mL. El cultivo fue incubado a 30°C con agitación de 200 rpm durante 48 h. De nuevo, las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con SSI y resuspendidas en 6 mL de SSI adicionales y 4 mL de glicerol 100%. Se reservaron alícuotas de 1 mL y se congelan a -70°C (Kieser 2001).

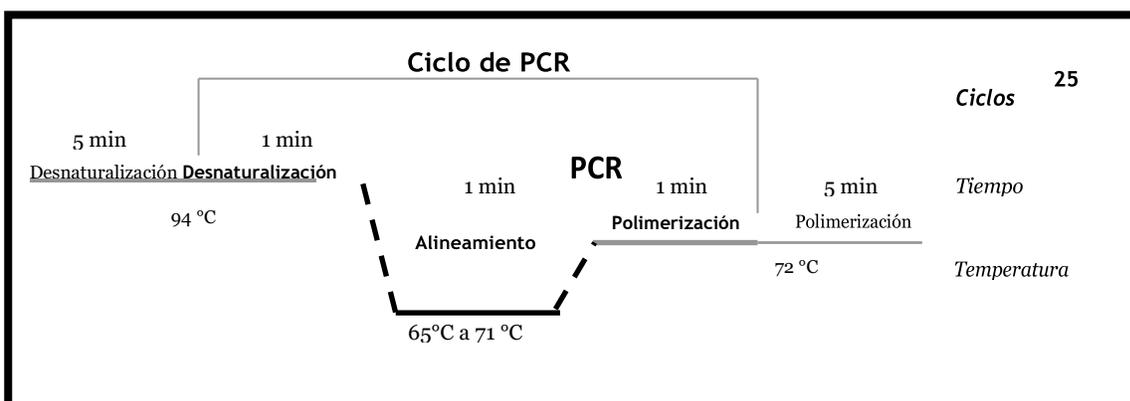
## **Aislamiento de DNA genómico de *Streptomyces*.**

Se preparó un preinóculo, adicionando 500 µL de cepa en glicerol en un matraz de 125 mL con 25 mL de TSB (Anexo C) y 3 perlas de vidrio. Dicho matraz se incubó a 29°C con agitación de 180 rpm durante 48 h, se recuperó el microorganismo por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min en una centrifuga Beckman J2-MC y un rotor JA20. El micelio se lavó dos veces con 15 mL de SSI y se resuspendió en 6 mL de la misma solución. Posteriormente, dos matraces con 50 mL de TSB más glicina al 0.5% fueron inoculados con 3 mL de la suspensión anterior e incubados a 29°C con agitación de 180 rpm durante 48 h. El micelio fue recuperado bajo las mismas condiciones, lavado dos veces con 25 mL de sacarosa al 10.3% y resuspendido en 25 mL de buffer P (Anexo C) suplementado con 2 mg/mL de lisozima. Se incubó a 37°C hasta la formación de protoplastos, los cuales fueron recuperados por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min y resuspendidos en 50 mL de buffer P (Anexo C). Nuevamente los protoplastos fueron recuperados bajo las condiciones anteriores y resuspendidos en 10 mL de sacarosa 10.3% adicionada con 200 µl de EDTA 0.5 M. La suspensión anterior se distribuyó por igual en dos partes y se le adicionó a cada una, 1 mL de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20%. Se agitó suavemente por inversión del tubo y de inmediato se realizó una extracción con fenol saturado con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-álcool isoamílico (24:1). A la fase acuosa se le añadió un volumen de isopropanol cuidando de mantener las 2 fases y se recuperó el DNA con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. El DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril grado Milli-Q y se trató con RNasa a una concentración final de 50 µg/mL durante 1h a 50°C, al finalizar este tiempo, se añadió pronasa a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 37°C durante 1 h. Al final de la incubación se agregaron SDS y NaCl a una concentración final de 0.4% y 100 mM respectivamente. Posteriormente y con el fin de limpiar el DNA de las enzimas anteriores, se volvió a realizar una extracción con un volumen de fenol saturado con TE, otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-álcool isoamílico (24:1). Posteriormente el DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto. El DNA se centrifuga (Beckman Coulter ultracentrifuge XL-100 K) a 10 000 rpm durante 10 minutos y el botón (En tubos de centrifuga de 50mL para rotor Beckman JLA500 de ángulo fijo) se volvió a lavar con etanol al 70% (v/v) y se dejó secar perfectamente para eliminar completamente los residuos del mismo. Finalmente, el DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril desionizada (Kieser 2001). Se determinó su pureza y concentración mediante la relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando un biofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer® basic), el estado del DNA fue corroborado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% según los protocolos estándar usando TAE 1X como amortiguador de corrida (Sambrook et al. 2001).

## Amplificación del gen *sco2127* por PCR de gradiente.

La estrategia inicial para la amplificación por PCR de nuestro gen diana, consideraba utilizar como templado, el DNA genómico de *Streptomyces coelicolor* M145, aplicando las condiciones de amplificación para el gen *sco2127* reportadas (Guzmán et al. 2005). Las condiciones de amplificación para dicho gen fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y treinta ciclos que comprenden: 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a 58.3°C para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización y por último, 5 min a 72°C, para la extensión final (Guzmán et al. 2005).

El gen *sco2127* incluyendo su promotor fueron amplificados mediante PCR en un termociclador de gradiente Corbett Research Palm-Cycler™ y usando DNA genómico de *S. coelicolor* como templado. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y veinticinco ciclos que comprenden: 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a un gradiente de temperaturas desde 65°C hasta 72°C para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización y por último, 5 min a 72°C, para la extensión final Figura 15. Se probaron los diferentes *primers* para la obtención de productos de amplificación.



**Figura 15.** Esquema de temperaturas aplicadas al sistema para amplificación por PCR. En esta figura se describen las temperaturas a las cuales se expusieron las reacciones con cada par de *primers*, siendo para cada caso un gradiente de temperaturas de alineamiento, tal y como se muestra en la línea del centro titulada "Alineamiento".

Una vez estandarizada la mejor temperatura de alineamiento, se realizó un PCR aplicando la temperatura que mostró mejor definición en electroforesis en gel de agarosa, y con la finalidad de obtener mayor cantidad de producto de amplificación, el sistema de reacción consistió en: dNTP's 0.2 µM, amortiguador 10X para AmpliTaq de Applied Biosystems, DMSO 5% ó 10%, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, 2 mM ó 3mM; 250 ng de DNA genómico, oligonucleótidos 0.4 µmol/mL de cada uno, 0.4 unidades de Taqpolimerasa de Applied Biosystems y agua grado Milli-Q para completar un volumen final de 50 µL (Sambrook et al. 2001).

## **Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.**

Para los fragmentos de ADN fue necesario purificar a partir de geles de agarosa utilizando el sistema de purificación Qiaquick de Qiagen. Se cortaron los trozos de gel de agarosa que contienen los fragmentos de ADN (genes y plásmidos) y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agregan 3 volúmenes de solución QG se mezclan e incubaron a 50°C durante 10 minutos, con agitación suave cada 2 minutos. La muestra adquiere color amarillo cuando cambia a morado se agregaron 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 para degradar la agarosa y el DNA quedó libre para precipitar posteriormente con isopropanol. EL kit Qiaquick proporciona columnas de sílica y se hace pasar a través de esta membrana por centrifugación a 13,000rpm (Eppendorf Centrifuge 5425) durante 1 minuto para lavar con 750 µL de solución PE. Se centrifugó nuevamente durante 1 minuto y el filtrado es desechado. La columna se centrifugó una vez más a 13,000 rpm durante 1 minuto (Eppendorf Centrifuge 5425) para eliminar restos de buffer PE. Se liberó de la membrana el DNA aplicando 50 µL de solución EB (1:10) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto más para obtener el DNA en solución (Cat No./ID: 28506 QIAquick PCR y Gel Cleanup Kit (100)).

## **Ligación del gen *sco2127* al plásmido pGEM-T Easy**

El pGEM-T Easy Vector es un plásmido de alto número de copias utilizado para clonar productos de PCR. El DNA recuperado del gel de agarosa fue clonado en el pGEM-T Easy Vector (Promega) con el fin de obtener mayor cantidad de DNA y poder secuenciarlo empleando los cebadores del fago M13, que flanquean al sitio múltiple de clonación (polilinker) donde se encuentra insertado el gen.

El sitio de inserción del fragmento de DNA está flanqueado por una timina que aparea con la adenina que la TaqDNA polimerasa normalmente añade al fragmento amplificado. El vector contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina además de un sitio múltiple de clonación formado por sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción, las cuales, al corte, permiten liberar al inserto.

El sitio múltiple de clonación se encuentra flanqueado por los promotores T7 y SP6, dentro del gen *lacZ* aunque, como ya se mencionó, también contiene sitios para secuenciación con los oligos del fago M13. La inactivación del gen *lacZ*, causada por la inserción de un fragmento, permite identificar las clonas recombinantes mediante el color que desarrollan en placas adicionadas con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β- galactósido) e IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido).

Para ligar el producto de PCR al plásmido se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla 4. Una vez mezclados los componentes de la reacción de ligación, ésta se incubó toda la noche a 4°C. Con 1 µL de la mezcla de ligación se transformaron por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* JM109.

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para ligación con pGEM-T Easy.

Reactivos	Reacción estándar (µL)
Amortiguador de ligación 2x, para T4 DNA ligasa (Promega)	5
pGEM-T Easy vector (50 ng)	1
Producto de PCR	1
DNA ligasa de T4	1
Agua desionizada	2
Volumen final	10

Se muestran los componentes de la reacción para insertar el producto de PCR en el plásmido mencionado. En la columna denominada “Reactivos” se muestra los componentes de la mezcla de ligación y en la columna “Reacción estándar” se indica la cantidad en microlitros (µL) que se agregaron para dicha reacción.

### **Electroporación de células *E. coli* JM109.**

Se colocaron 2 µL de la reacción de ligación mas 50 µL de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 en una celda fría de 0.1 mm. La celda se colocó en la ranura de un electroporador 15427220 Fisher (BTX™ ECM™ 399 Exponential Decay Wave Electroporator) y se le aplicó una descarga de 1250 V, inmediatamente después se le adicionó medio SOC (1mL), las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 h a 200 rpm. Posteriormente, de la suspensión celular se plaquearon, 1, 5 y 10 µL de las células de *E. coli* JM109 electrotransformadas, se sembraron en cajas con agar y medio LB suplementado con ampicilina (Amp) (100 µg/mL), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β-galactósido) 20 µg/mL e IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) 10 mM y se incubaron a 29°C durante 16 h. Las clonas positivas (color blanco) fueron seleccionadas y resembradas en el mismo medio; de aquí, por lo menos 20 clonas fueron elegidas al azar para extraerles el plásmido.

### **Aislamiento del plásmido en pequeña escala (Miniprep).**

Para comprobar la presencia del gen amplificado dentro del plásmido pGEM-T-Easy Vector, se aisló al plásmido recombinante en pequeña escala y se realizó un análisis por restricción. Para ello las colonias fueron inoculadas en 3 mL de medio LB con Amp 100 µg/mL e incubadas a 37°C con agitación de 180 rpm por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se recuperaron por centrifugación a 4°C, 13 000 rpm por 10 min (Eppendorf Centrifuge 5425), se resuspendieron en 200 µL de solución A (Apéndice C) fría (4°C), se agregaron 400 µL de la solución B (Apéndice C) preparada en fresco y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 300 µL de solución C (Apéndice C) fría se agitó y se centrifugó a 13 000 rpm a 4°C por 20 min (Eppendorf Centrifuge 5425). Al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de isopropanol y el DNA se dejó precipitar durante 25 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó

a 13 000 rpm durante 30 min (4°C) (Eppendorf Centrifuge 5425), el botón obtenido se lavó con 300 µL de EtOH al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, el DNA se secó y resuspendió en 20 µL de agua, para después ser incubado por 1 h a 40°C con RNAsa a una concentración de 50 µg/mL y posteriormente a 37°C con proteinasa K, 25 µg/mL a partir de un stock de 100 µg/mL. Después de la incubación, se lavó 1 vez con un volumen de fenol-cloroformo y 2 veces con cloroformo: alcohol isoamílico.

### **Análisis de restricción (patrón de corte) con la enzima *EcoRI***

El análisis de restricción de los plásmidos se realizó con la enzima *EcoRI* (Invitrogen), esta enzima permite la liberación del fragmento (previa verificación), el cual no tiene sitios de restricción para esta enzima. Una vez que se obtuvo la colonia que contiene al plásmido recombinante, se escaló la técnica anterior a un volumen de 100 mL de medio de cultivo (Midiprep). Después de la incubación con RNAsa, se añadió proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1) y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (1:1). El DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 vol. NaCl 5 M y 1 vol. de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente 25 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos (Eppendorf Centrifuge 5425), posteriormente el DNA fue lavado con 500 µL de EtOH al 70% y se centrifugó 10 minutos a 13 000 rpm. Al eliminar el sobrenadante el botón se secó perfectamente para ser resuspendido en 50 µL de agua y nuevamente se realizó el análisis de restricción.

### **Purificación de plásmidos y bandas ADN a partir del gel de agarosa.**

Una vez terminada la electroforesis en gel con la muestra resultante de plásmidos (digeridos respectivamente); se cortaron las bandas de interés a partir de gel de agarosa al 0.8% de electroforesis, y se colocaron en columnas de fibra de vidrio adaptada a tubos eppendorf de 1.5mL, éstas se centrifugaron por 1 min a 3 000 rpm por dos veces, el filtrado se recolecta y se extrae dos veces con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA recuperado se precipita de la fase acuosa agregando 1/10 de volumen de NaCl 1 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto, se deja precipitar 20 min y se centrifuga 30 min a 13 000 rpm. El botón de DNA se lava con EtOH 70%, se deja secar perfectamente y se resuspende en 10 µL de agua.

## **Secuenciación.**

El fragmento de DNA clonado en el plásmido pGEM-T-Easy se secuenció en los laboratorios Laragen (USA) en ambas direcciones (5'→ 3' y 3'→ 5' ) por el método de didesoxiterminación de la cadena, usando como primers T7 y SP6 que flanquean el sitio múltiple de clonación de este plásmido. El análisis de la secuencia obtenida se realizó con ayuda del software de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos.

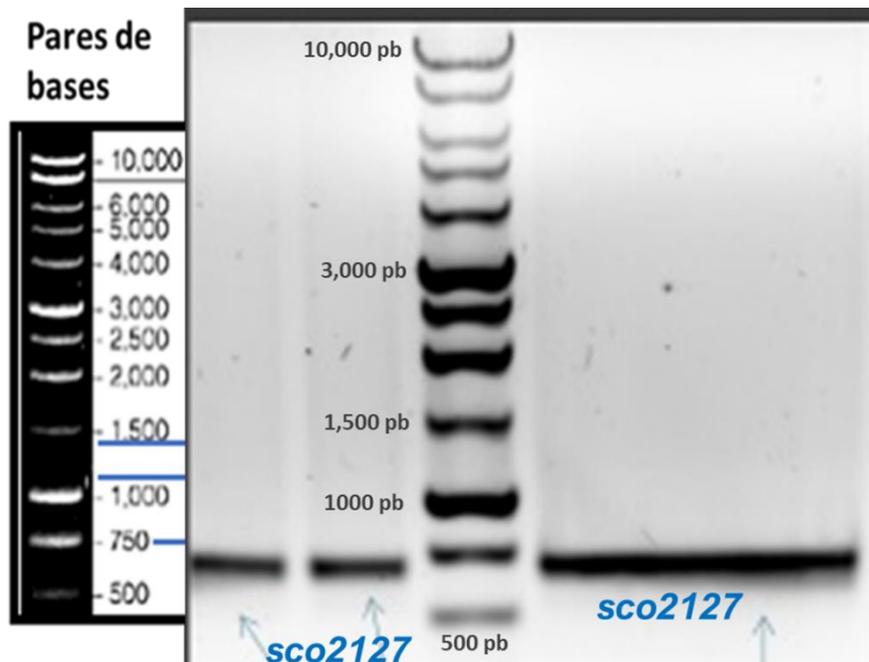
## **Vigilancia y actualización bioinformática utilizando las secuencias de nucleótidos del gen *sco2127*.**

La obtención de secuencias en formato FASTA se realizó en la página software de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Amplificación del gen *sco2127* por PCR.

En la figura 16 se presenta la electroforesis en gel de agarosa, del producto de la reacción en cadena de polimerasa PCR. Las tres bandas corresponden la obtención de copias del gen *sco2127* que incluye su región promotora.

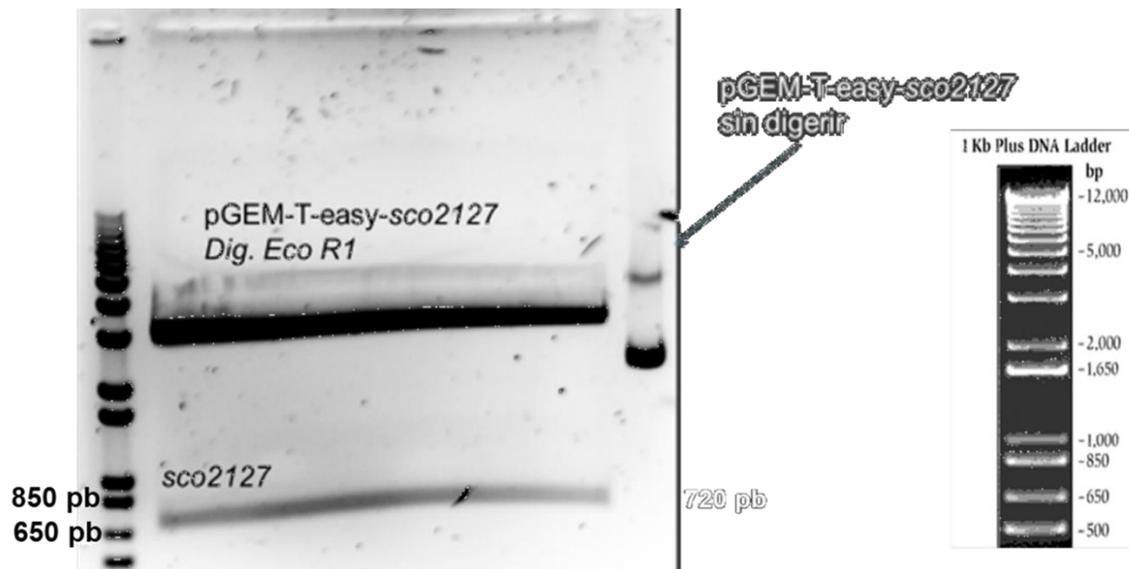


**Figura 16.** Electroforesis del gen *sco2127* obtenido por PCR usando como templado DNA genómico de *Streptomyces coelicolor* M145. El gen *sco2127* tiene un tamaño de 576 pb. El fragmento que se observa en los 3 carriles tiene un tamaño aproximado de 714 pb pues el diseño de los oligonucleótidos incluye la región promotora de *sco2127* (68 pares de bases y la región de 70pb entre *sco2128* y *sco2127*).

Este producto de PCR se extrajo del gel de agarosa y se insertó en el plásmido pGEM®-T-Easy para su clonación y posterior secuenciación, para finalmente comprobar que el amplificado de PCR correspondía a *sco2127*.

## 8.2 Clonación del gen *sco2127* en el vector pGEM®-T-Easy.

Después de la reacción de ligación se transformó por electroporación en *E. coli* JM109 y se aislaron las colonias blancas resistentes a ampicilina, para posteriormente extraer el DNA plasmídico total de dichas cepas y verificar por análisis de restricción y electroforesis en agarosa, que el fragmento del tamaño correspondiente a *sco2127* se hallaba en el plásmido pGEM2127, de tal manera que se pudiera enviar a secuenciar para confirmación final.

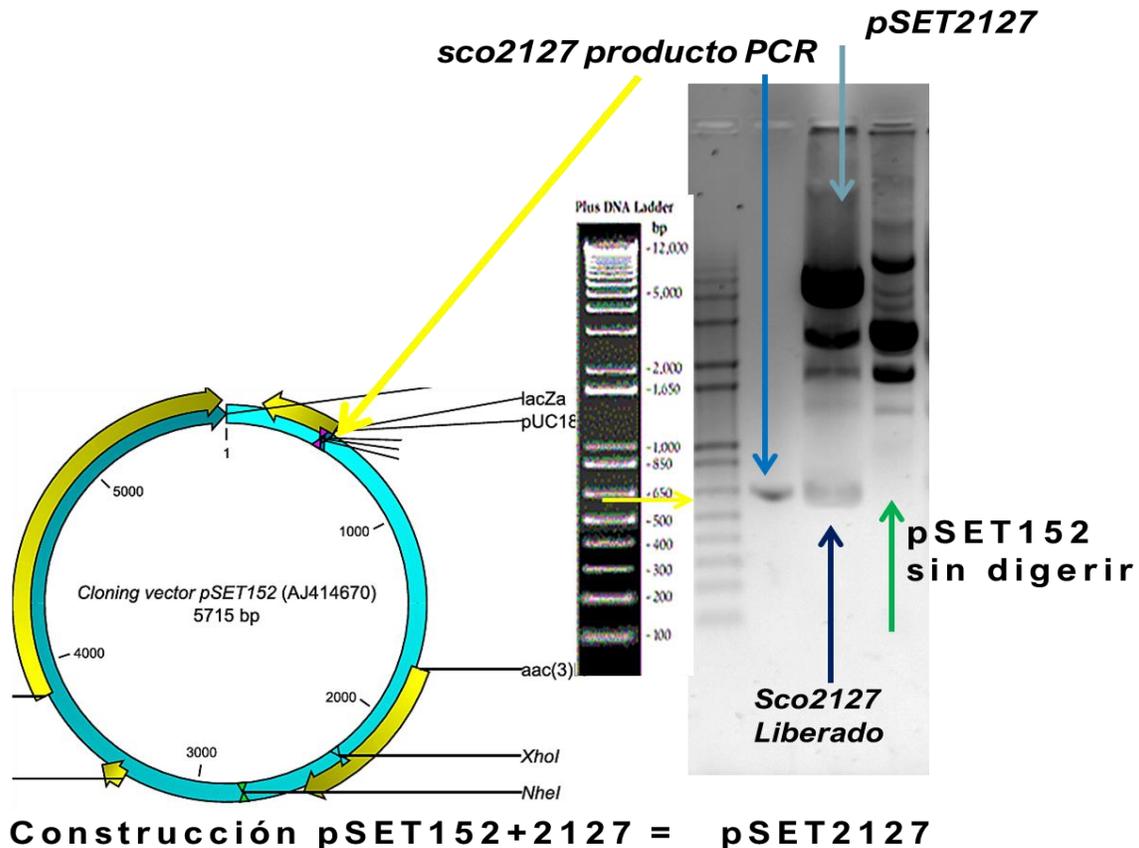


**Figura 17.** Electroforesis (gel de agarosa) de digestión de pGEM2127. Se muestra la liberación de *sco2127* por de restricción con *EcoRI*. Después de realizar el aislamiento de DNA plasmídico por maxiprep. *sco2127* se extrajo directamente del gel para integrarlo posteriormente a pSET152 por reacción de ligación.

Los resultados de la secuenciación demostraron que la banda liberada de pGEM2127 corresponde al gen *sco2127*. Para poder insertar el gen *sco2127* se agregaron sitios de restricción específicos para que concordaran con los sitios de restricción policlonal (polilinker) de pSET152.

### 8.3 Construcción de pSET2127

Una vez realizadas las digestiones apropiadas, tanto de pSET152 y pGEM2127, se realizó la reacción de ligación para integrar el gen *sco2127* en el plásmido pSET152, como se muestra en la figura 18 después de un ensayo de restricción se consiguió obtener el plásmido pSET2127.

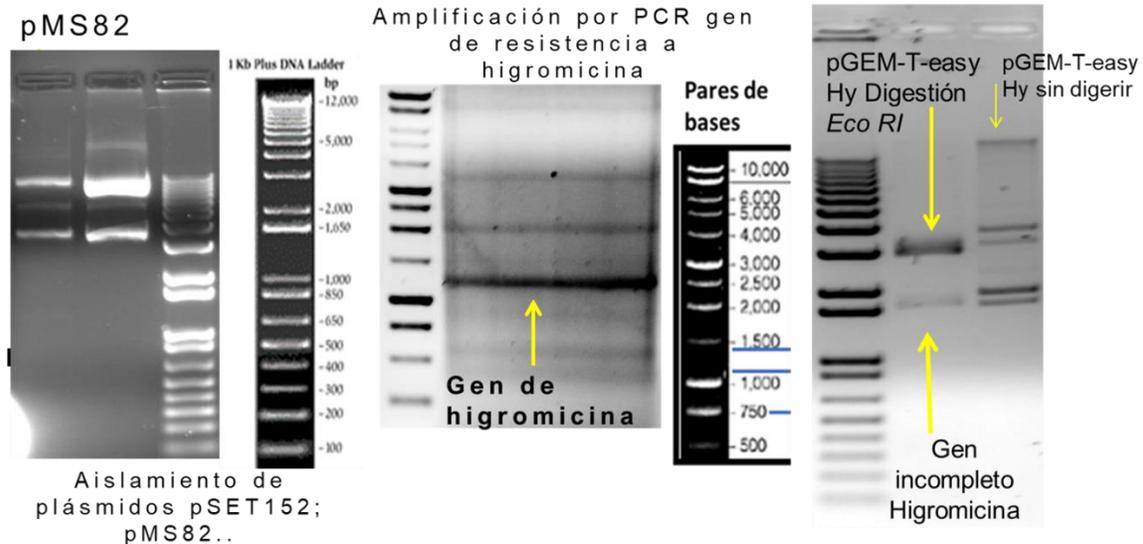


**Figura 18.** Construcción del plásmido pSET2127. El vector construido pSET2127, es un plásmido de bajo número de copias, el cual contiene un gen de resistencia a apramicina (Bierman et al., 1992), un gen de integración al genoma del fago  $\phi$ C31, el cual se integra a sitios *attP* en el genoma de *S. coelicolor* (Se ha reportado que no afectan regiones esenciales en el genoma de este género). Este plásmido contiene el gen *sco2127* con su región promotora incluida, es integrativo al genoma y confiere resistencia a apramicina como marcador de selección. Se muestra que contiene el fragmento  $\alpha$  del gen *lacZ* donde se encuentra el sitio de inserción policlonal, mismo al que por reacción de ligación se introdujo el gen *sco2127*.

Debido a que la CGM  $\Delta$ *sco2127::apra* contenía en su genoma el gen de resistencia a apramicina como marcador de selección, se decidió sustituir dicho gen (*apra*), del vector pSET2127 cambiándolo por el gen de resistencia a higromicina. Este último se obtendría del vector pMS82 (Gregory et al., 2003). Para ello se diseñaron oligonucleótidos cebadores basándonos en la secuencia del gen en cuestión, agregando sitios de corte compatibles con los sitios disponibles en pMS82 (mismos que deletaban el 60% del gen de resistencia a apramicina en pSET152).

## 8.4 Amplificación incompleta del gen de higromicina.

En la figura 19 se muestra la electroforesis del producto obtenido por PCR, usando como templado el plásmido pMS82, para el gen de higromicina. El tamaño del amplificado era el correcto, por lo que se decidió al clonar en pGEM®-T-Easy para enviar a secuenciar; los resultados del amplificado reportaron que correspondía al gen de higromicina, sin embargo, estaba incompleto.



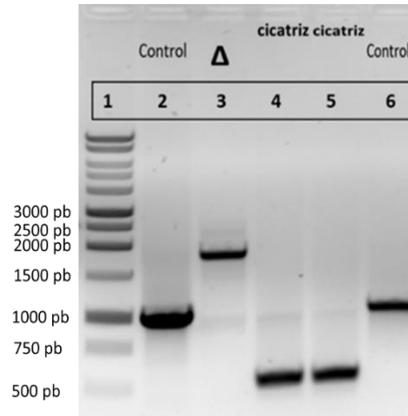
Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Plant expression vector pDuExp (pDuExAn6), complete sequence	652	740	96%	0.0	94%
Plant expression vector pDuExAn1, complete sequence	652	740	96%	0.0	94%
Cloning vector pGEM-WIZ, complete sequence	640	718	94%	5e-180	94%
Cloning vector pGEM-S1, complete sequence	640	718	94%	5e-180	94%
Cloning vector pLucFXR, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
Cloning vector pLucGAL4, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
Cloning vector pdLucFXR, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
Cloning vector pdLucGAL4, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
PGeneClip Puromycin Vector, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
PGeneClip Neomycin Vector, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
PGeneClip Hygromycin Vector, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
PGeneClip hMGFP Vector, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%
PGeneClip Basic cloning vector, complete sequence	640	640	88%	5e-180	81%

**Figura 19.** identificación del gen de higromicina. Se presenta la liberación del fragmento del plásmido pGEM-T easy con una ligera diferencia de tamaño, el fragmento fue liberado con la enzima *Eco RI*. La secuencia indica que el gen de higromicina estaba incompleto.

Afortunadamente para entonces se desarrolló la CGM  $\Delta$ sco2127 cicatriz, por lo que ya no fue necesario obtener el gen de higromicina para construir el plásmido pSETH2127.

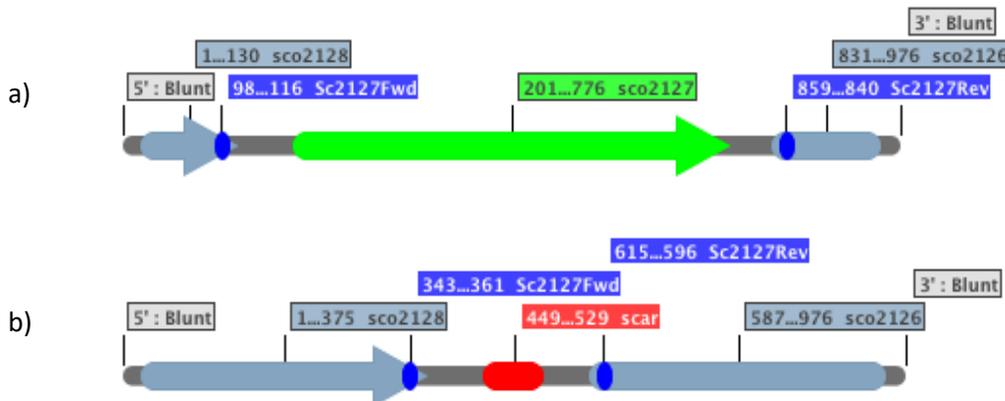
### 8.5 La CGM $\Delta$ *sco2127*cicatriz en efecto carecen del gen deletado.

Se comprobó que la CGM  $\Delta$ *sco2127*cicatriz ya no contenía el gen de resistencia apramicina. Utilizando los *primers* (Figura 20) proporcionados por nuestra colaboradora, la Dra. Angela Forero y el ADN genómico de la CGM cicatriz por el Dr. Luis Servín, como controles se utilizaron el ADN genómico de la cepa WT (tipo silvestre) M145, el cósmido *SC6E10* (biblioteca genómica) y el ADN genómico de la CGM que aún contenía el gen de resistencia a apramicina que también fue proporcionado por la Dra. Angela Forero. Por PCR se amplificaron las regiones correspondientes.



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa PCR de productos cicatriz. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular; carril 2 control: el producto PCR obtenido usando como templado ADN genómico de *S. coelicolor* WT M145, se esperaba un producto de amplificación de 1004 pb, como se observa su tamaño corresponde. En el carril 3 se observa el producto de PCR obtenido usando como templado el ADN genómico de la CGM de *S. coelicolor* que contiene el gen de resistencia a apramicina de 1804 pb en lugar del gen *sco2127*. En el carril 4 y 5 se presentan los productos obtenidos usando como templado de amplificación el ADN genómico de dos cepas CGM carentes de *sco2127* que presentan una secuencia cicatriz de 500 pb en su lugar. En el carril 6 se observa otro control, el producto obtenido usando como ADN molde el cósmido *SC6E10*.

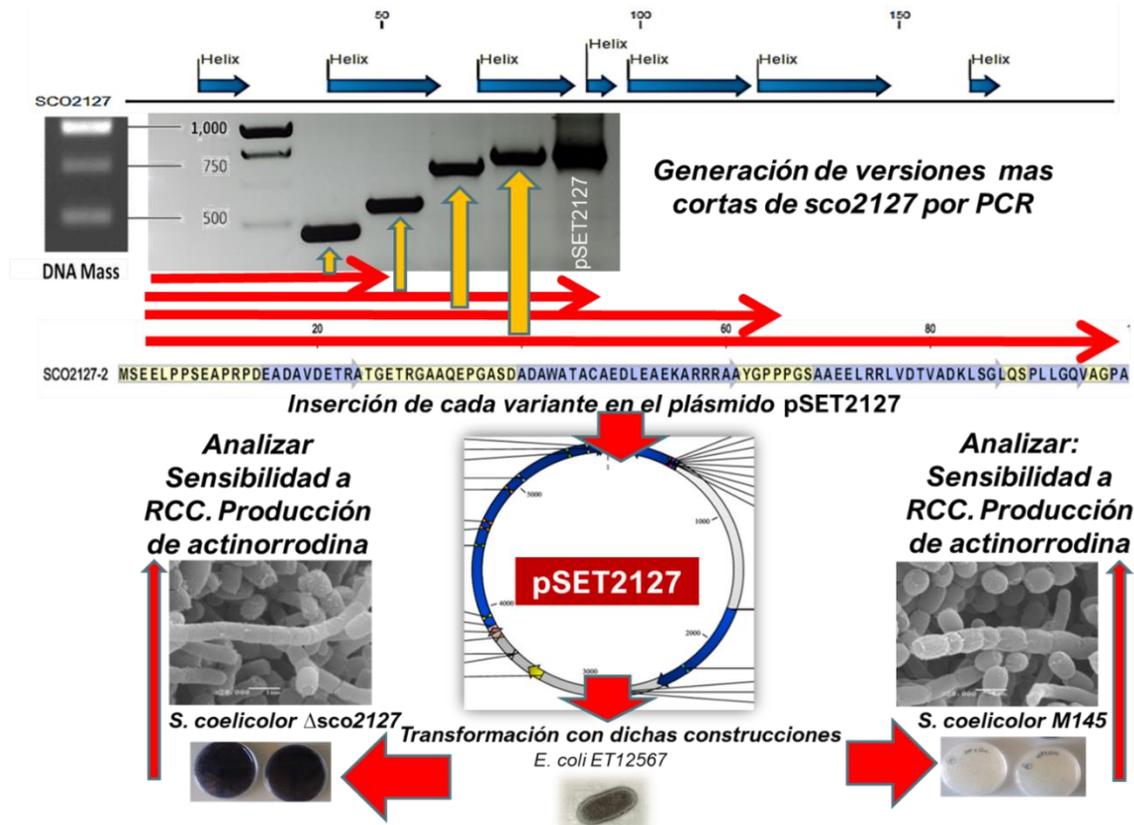
Los productos de PCR obtenidos en el carril 4 y 5 se extrajeron directamente del gel de agarosa y se ligó al vector para productos de PCR pGEM-T easy, con el fin de clonarlo y posteriormente secuenciar para verificar la secuencia cicatriz (figura 21).



**Figura 21.** Mapa de amplificación por PCR para verificar la ausencia *sco2127* y el gen de resistencia a apramicina. **a)** la cepa silvestre M145 y **b)** la CGM  $\Delta$ *sco2127*.

## 8.6 Obtención de variantes cortas de *sco2127* por PCR

Para continuar con la estrategia de identificación de posibles dominios o regiones funcionales del gen *sco2127*, se desarrollaron versiones más cortas del gen, a la espera de la detección de alteraciones en el fenotipo, atribuibles a la ausencia de dicho gen en  $\Delta sco2127$ . Dichos efectos específicos se usarían como reporteros para identificar la región de la proteína o residuos de aminoácidos que confirieran una función a SCO2127.

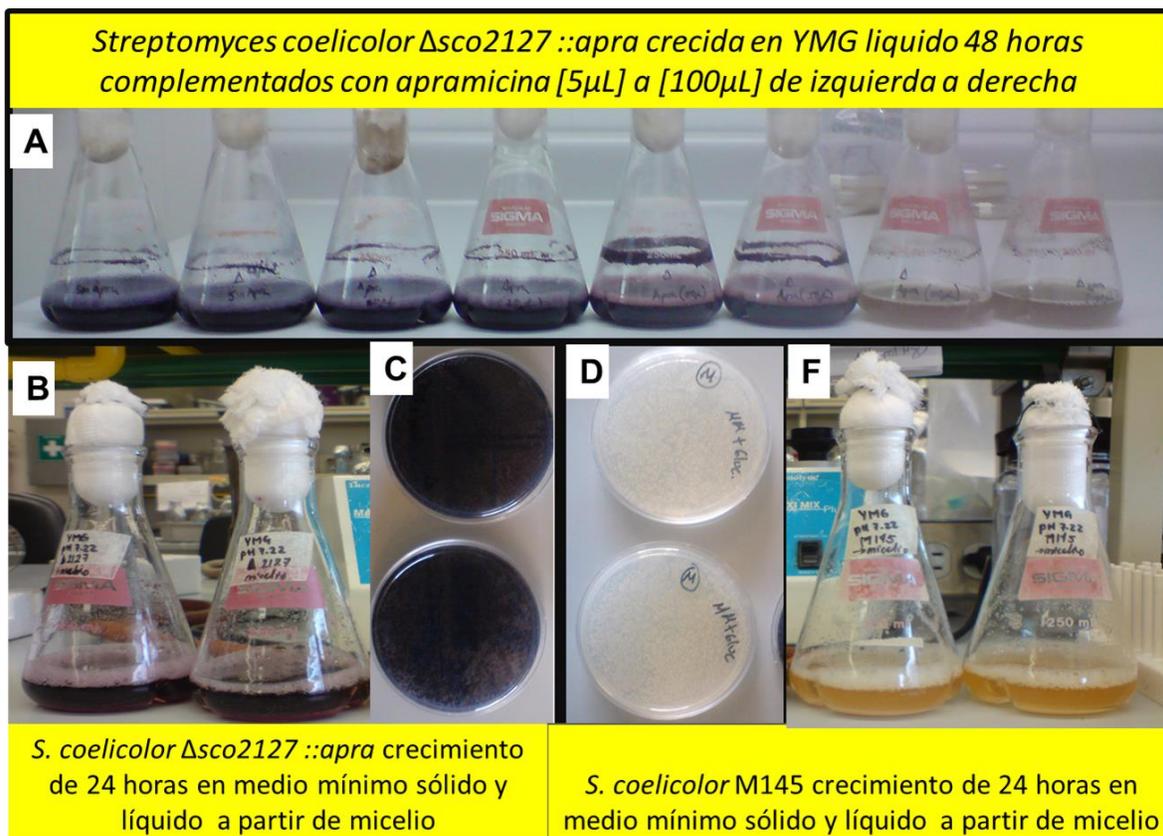


**Figura 22.** Electroforesis de los productos PCR de las versiones cortas de *sco2127*. Usando como plataforma el plásmido *pSET2127*, se realizaron ensayos de reacciones en cadena de polimerasa, para hacer fragmentos de *sco2127* que carecieran de las hélices alfa predichas en el análisis bioinformático. En la figura se muestra la electroforesis de los fragmentos resultantes del PCR y el esquema de la estrategia de análisis.

La hipótesis del presente trabajo es que el gen *sco2127* tiene una función cuya actividad influye en la Represión Catabólica por Glucosa y que la producción de actinorrodina, sujeta a dicha represión en *Streptomyces coelicolor*, puede funcionar como señal colorida para identificar la sensibilidad a RCC en una CGM  $\Delta sco2127$ . La razón para realizar versiones cortas del gen *sco2127*, tiene su fundamento en la idea de que la región o dominio del gen se encuentra en la región amino terminal de la proteína SCO2127; pues de acuerdo con la investigación bioinformática (más adelante indicada). Para poder continuar con la identificación de la función de *sco2127* se analizó el fenotipo de las CGM  $\Delta sco2127::apra$  y  $\Delta sco2127::cicatriz$ .

### 8.7 *Streptomyces coelicolor* $\Delta$ *sco2127* ::*apra* presenta sobreproducción de actinorrodina.

Antes de recibir la CGM cicatriz se nos proporcionó la CGM *Streptomyces coelicolor*  $\Delta$ *sco2127* ::*apra* la cual presentaba una sobreproducción de actinorrodina en comparación con la cepa tipo silvestre M145 de *Streptomyces coelicolor* (Figura 23) cuando se hacía crecer en medio complejo YMG.

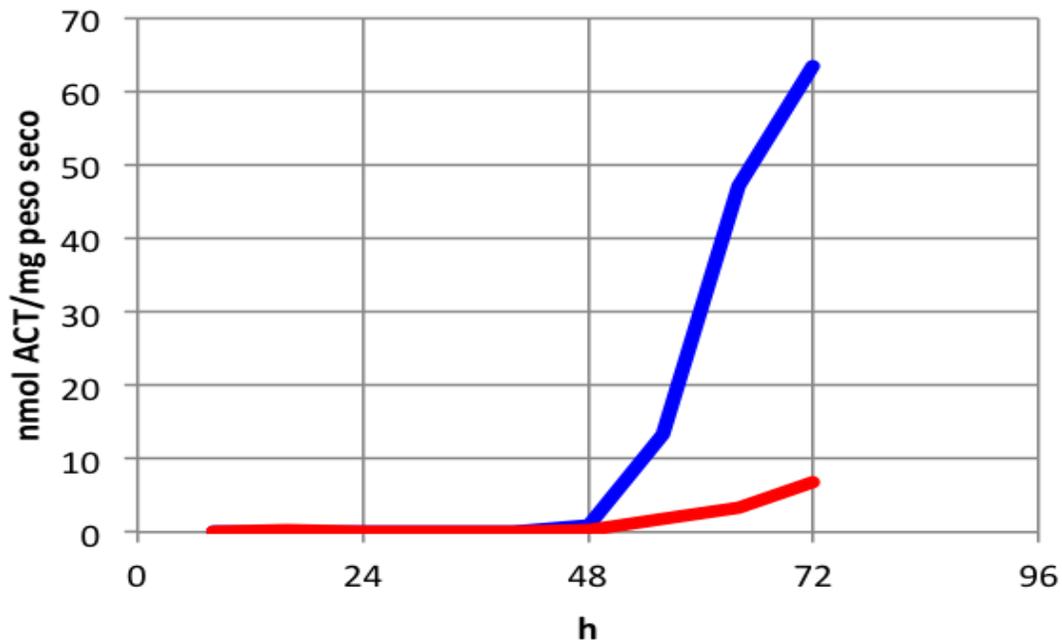


**Figura 23.** Sobreproducción de actinorrodina en la CGM  $\Delta$ *sco2127* ::*apra*. A) Se muestra  $\Delta$ *sco2127* ::*apra* crecida en medio YMG complementado con apramicina: de izquierda a derecha los 2 primeros matraces complementados con 5 $\mu$ L de apramicina, los pares siguientes con 20 $\mu$ L, 50 $\mu$ L y 100 $\mu$ L respectivamente. B) Crecimiento de  $\Delta$ *sco2127* ::*apra* en medio líquido sin apramicina después de 24 horas. C) CGM  $\Delta$ *sco2127* ::*apra* en medio sólido mínimo sin apramicina con 100mM de glucosa después de 24 horas de crecimiento D) Cepa tipo wt M145 *Streptomyces coelicolor* crecida en medio mínimo sólido con 100mM de glucosa. F) Cepa tipo wt M145 *Streptomyces coelicolor* crecida en medio YMG después de 24 horas.

La evidente sobreproducción del pigmento actinorrodina en la CGM  $\Delta$ *sco2127* ::*apra* parece corresponder con la hipótesis de que *sco2127* tiene un papel en la RCC. Siguiendo con esta idea parece ser que la eliminación del gen del genoma de *Streptomyces coelicolor*, la hace insensible a la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Figura 23 A), B) y C)) y consecuentemente permite la producción de metabolitos especializados sujetos a represión catabólica por glucosa (RCG).

## 8.8 *Streptomyces coelicolor* $\Delta$ sco2127 cicatriz presenta una disminución en la producción de actinorrodina.

En contraste con lo observado en la CGM  $\Delta$ sco2127::apra la CGM  $\Delta$ sco2127 cicatriz presentó una disminución en su producción del pigmento azul actinorrodina. Se encontró que la CGM  $\Delta$ sco2127 produjo menos actinorrodina que su parental M145. No obstante que la formación del pigmento inició a las 48 h en ambos cultivos, a las 72 h la CGM mostró una disminución del 90% en la formación de actinorrodina con respecto a la cepa silvestre (Tierrafría et al. 2016).

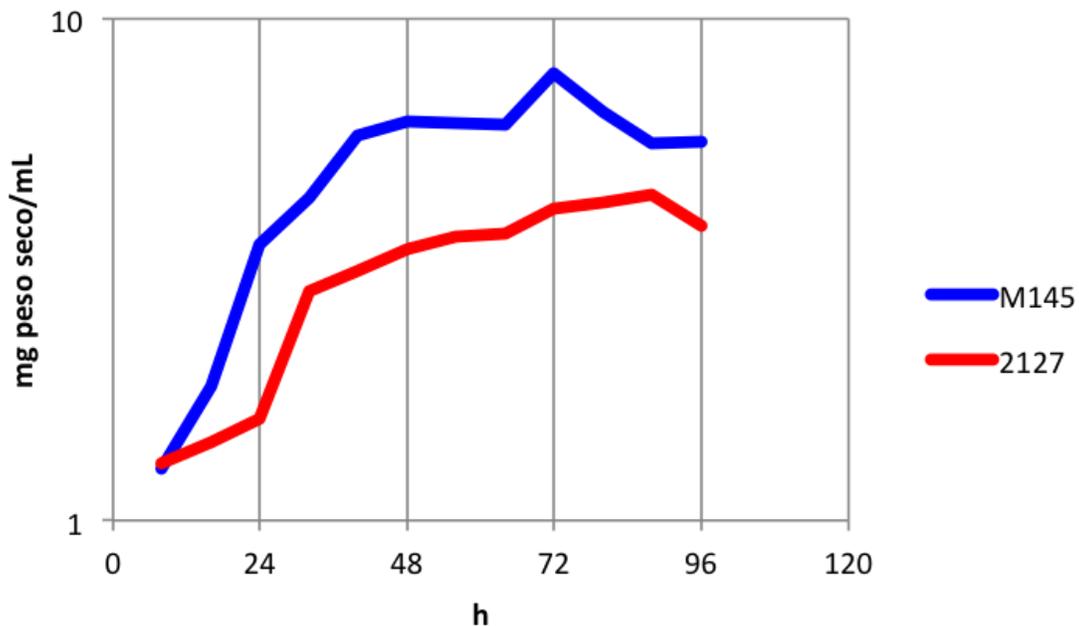


**Figura 24.** Producción de actinorrodina cepa tipo silvestre M145 y la CGM  $\Delta$ sco2127 de *Streptomyces coelicolor* en medio rico adicionado con arabinosa (55 mM) como única fuente de carbono.

Esta disminución se mantuvo sin importar el incremento en la concentración de glucosa como fuente de carbono adicional, lo que permite descartar la posibilidad de que el gen *sco2127* sea el único responsable de la represión por carbono en *S. coelicolor*.

## 8.9 La delección de *sco2127* parece afectar el crecimiento de *S. coelicolor*.

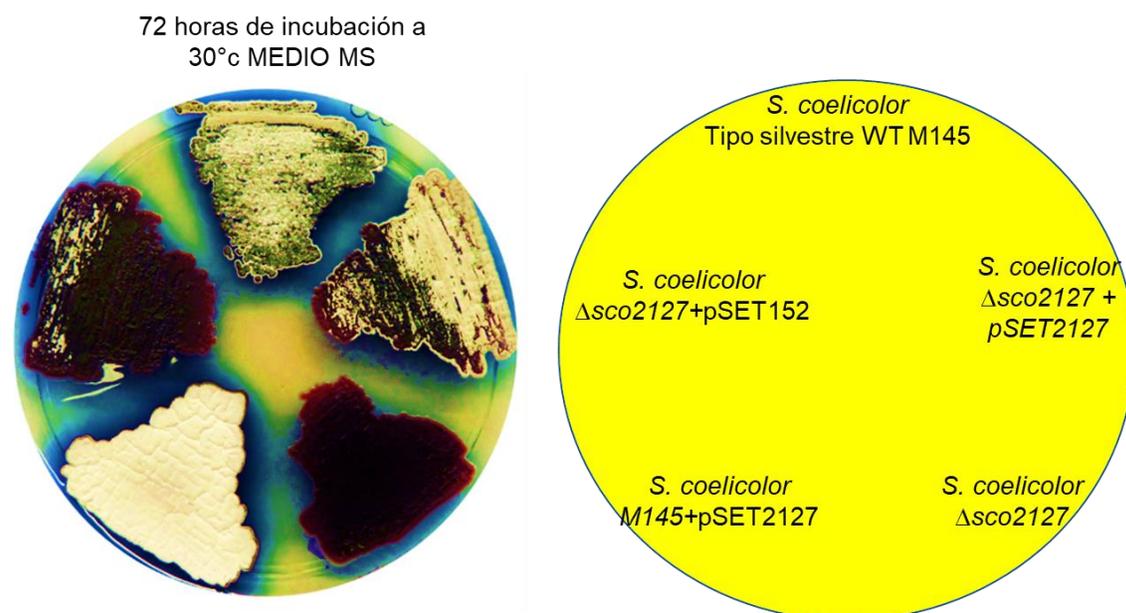
Comparando cinéticas de crecimiento con peso seco (datos no mostrados), no se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento de M145 vs  $\Delta sco2127::apra$  o  $\Delta sco2127$  de *Streptomyces coelicolor*, en medio complejo YMG. Sin embargo, Tierrafría et al. (2016) (comunicación directa) encontraron que las cepas de estudio se cultivaron en 50 mL de medio rico adicionado con arabinosa como única fuente de carbono. Mostraba que la cepa silvestre M145 alcanzó la fase de crecimiento exponencial a las 16 h de cultivo, mientras que la CGM  $\Delta sco2127$  lo hizo hasta las 24 h, es decir, la CGM mostró un retraso de 8 h en alcanzar la fase de crecimiento exponencial que posiblemente ocasionó una disminución en la biomasa final del cultivo comparado con la cepa silvestre M145 (Figura 25). Esta observación sugiere que el producto del gen *sco2127* juega algún papel en el crecimiento de *S. coelicolor*.



**Figura 25.** Crecimiento de la cepa silvestre M145 y la CGM  $\Delta sco2127$  en medio R5 adicionado con arabinosa 55 mM como única fuente de carbono.

### 8.9.1 *Streptomyces coelicolor* $\Delta sco2127$ transformada con el pSET2127 presenta reversión de fenotipo en medio complejo sólido.

Además de lo descrito hasta aquí, se observó que la CGM presentaba diferencias en la capacidad de esporulación en medio sólido. Tal y como describe Forero et al. (2012), en su desarrollo morfológico. Se realizaron las transformaciones con el plásmido pSET2127, buscando revertir el fenotipo observado en cultivo sólido, hasta ese momento.



**Figura 26.** Diferencias en la esporulación de la cepa silvestre M145 y la CGM  $\Delta sco2127$  en medio

De acuerdo con nuestros resultados, el retardo en la esporulación se puede entender como parte de un proceso de RCC, pues finalmente fue en presencia de glucosa que se observó dicho fenotipo en la CGM carente de *sco2127*.

La RCC también reprime la producción de antibióticos (Sánchez *et al.*, 2010). En el suelo, los azúcares se controlan de cerca y la presencia de nutrientes de alta energía promueve el crecimiento y suprime los procesos de desarrollo, así como la producción de antibióticos, por lo que muchos antibióticos están sujetos a CCR (Hostalek, 1980; Sanchez *et al.*, 2010).

Los ejemplos incluyen la producción de cloranfenicol por *Streptomyces venezuelae* (Bhatnagar *et al.*, 1988), cephamycin por *Streptomyces clavuligerus* (Cortes *et al.*, 1986), eritromicina por *Saccharopolyspora erythraea* (Escalante *et al.*, 1982) y estreptomina por *Streptomyces griseus* (Demain and Inamine, 1970).

En el caso de la CGM carente de *sco2127* que además tenía el gen de resistencia a apramicina en su genoma esto no parecía corresponder en medio líquido o sólido pues sobre producía actinorrodina (observación a nivel cualitativo).

Por otro lado, cuando se eliminó dicho casete (gen) de resistencia a apramicina por la Dra. Forero y nos fue posible evaluar a la CGM, esta presentaba un retardo en su desarrollo morfológico y una disminución de actinorrodina, lo que nos hace pensar que posiblemente la diferencia entre ambas CGMs se debía a la presencia del gen de resistencia *apra* más que a la presencia o ausencia de *sco2127*.

No obstante, lo anterior, cuando se transformó a la cepa silvestre con el plásmido pSET2127, se observó una mayor producción de esporas, como si su desarrollo estuviera acelerado (figura 26).

Esto se debe sin duda al gen *sco2127* pues cuando se transformó a la CGM carente del gen ( $\Delta$ *sco2127*) se consiguió un fenotipo similar a la cepa tipo silvestre, aunque esta presentaba una esporulación normal (figura 26).

Respecto a la producción de actinorrodina, en la CGM con resistencia a apramicina se observaba una sobreproducción en medio líquido, sin embargo, cuando se obtuvo la CGM cicatriz esto se revirtió.

La producción de actinorrodina está sujeta a múltiples factores y regulaciones, no es posible atribuirle a un solo gen su actividad de forma directa, pues como se describe a continuación el metabolismo y producción de metabolitos especializados en *Streptomyces* depende de múltiples redes de interacción molecular.

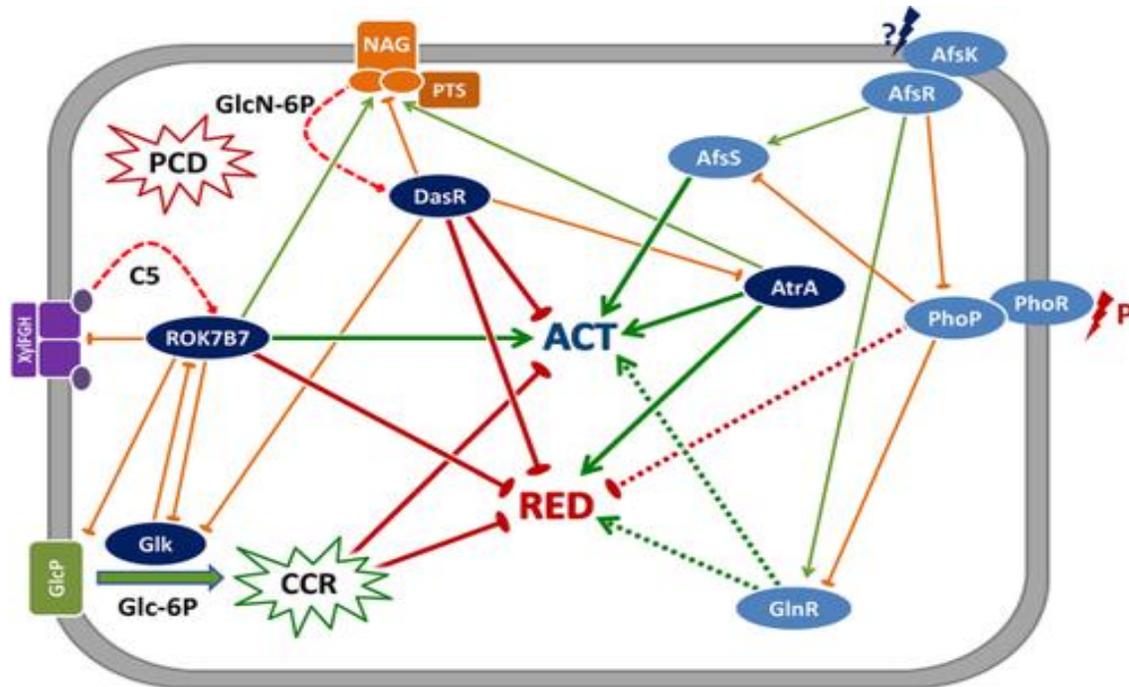
En *Streptomyces lividans*, la glucosa inhibe la producción de actinorrodina al reprimir el gen *afsR2*, que codifica una proteína reguladora global involucrada en la activación de la biosíntesis de metabolitos especializados en diversas especies de *Streptomyces* (Kim et al., 2001).

En *S. coelicolor*, el homólogo de AfsR2, AfsS, se une a una proteína de unión a soluto secretada putativa codificada por SCO6569. La sobreexpresión de esta proteína recién caracterizada redujo significativamente la producción de actinorrodina, mientras que la alteración de los genes condujo a la producción acelerada de antibióticos (Lee et al., 2009).

Esto sugiere que SCO6569 es un regulador descendente dependiente de AfsS de la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*. El flujo de carbono a través de la glucólisis también influye en la producción de antibióticos. La eliminación de *pfkA2*, que codifica una de las tres fosfofructoquinasas en *S. coelicolor*, conduce a una mayor producción de los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina (Borodina et al., 2008).

Las simulaciones metabólicas a escala genómica sugirieron que la disminución de la actividad de la fosfofructoquinasa conduce a un aumento en el flujo a través de la vía de fosfato de pentosa, que luego estimula el flujo hacia los antibióticos pigmentados (Borodina *et al.* 2008).

Se sabe que en *Streptomyces coelicolor* existe una red de regulación muy intrincada que controla la producción de antibióticos. En la Figura 27 se presentan como flechas verdes gruesas la activación de la producción de antibióticos y la represión mediante líneas rojas gruesas con una elipse.



**Figura 27.** Redes reguladoras de nutrientes que controlan la producción de antibióticos en *S. coelicolor* (Obtenido de Urem *et al.* 2016). Las redes reguladoras globales traducen las señales ambientales y el estado metabólico de la célula a respuestas metabólicas secundarias. Solo se muestran las redes reguladoras que controlan los genes biosintéticos de actinorodina (Act) y prodigininas (Red). La biosíntesis de antibióticos está bajo el control de reguladores transcripcionales específicos, situados dentro de los grupos de biosíntesis, que a su vez están bajo control global. Las proteínas de control de carbono fundamentales se presentan como óvalos de color azul oscuro, otros reguladores de color azul claro. Las líneas de puntos indican incertidumbre de control (directa o indirecta).

Además del control regulador de la producción de antibióticos, Los reguladores globales de la transcripción también controlan las enzimas involucradas en las vías metabólicas, así como otros reguladores globales de la transcripción. Esto está representado por líneas finas; Control positivo por flechas verdes, control negativo por líneas naranjas con una elipse. RCC, represión del catabolito de carbono, muerte celular programada. Las líneas rojas discontinuas indican la inhibición por ligandos (Rok7B7 por azúcares C5 (C5); DasR por GlcN-6P).

En *Streptomyces*, el GlcN-6P desempeña muchas funciones clave, incluido un papel central en el control de la producción de antibióticos, que conecta directamente el control del metabolismo primario con el del metabolismo secundario. GlcN-6P, junto con GlcNAc-6P, actúa como un efector alostérico del regulador sensorial de nutrientes DasR.

La estructura cristalina de DasR en *S. coelicolor* y su ortólogo distante NagR de *Bacillus subtilis* en complejo con GlcN (Ac) -6P se han dilucidado (Fillenberg et al., 2015; Fillenberg et al., 2016). DasR deriva su nombre del operón *dasABC* adyacente involucrado en metabolismo de N - N'-Diacetylchitobiose (GlcNAc), pero también es importante para el desarrollo (*das* del inglés *deficient aerial and sporulation* para deficiente en micelio aéreo y la formación de esporas) (Seo et al., 2002; Colson et al., 2008). DasR es un represor de la familia GntR con un papel pleiotrópico en la regulación del metabolismo primario, el desarrollo y la producción de antibióticos. El extenso análisis del régimen DasR mostró que DasR controla directamente genes, *nag* y *chi*. (para el sistema quitinolítico) y reprime la producción de antibióticos mediante la unión directa a las regiones promotoras de los genes reguladores específicos de la vía para todos los grupos de genes biosintéticos de antibióticos en *S. coelicolor* (Rigali et al., 2006; Rigali et al., 2008; Nazari et al., 2012; Swiatek-Polatynska et al., 2015). Un papel pleiotrópico similar de DasR también se ha informado en el productor de eritromicina *Saccharopolyspora erythraea* (Liao et al., 2015). Recientemente, también se demostró que DasR reprime indirectamente la biosíntesis de sideróforos quelantes de hierro mediante el control directo del regulador de la homeostasis del hierro *dmdR1* en *S. coelicolor* (Craig et al. 2012; Lambert et al., 2014).

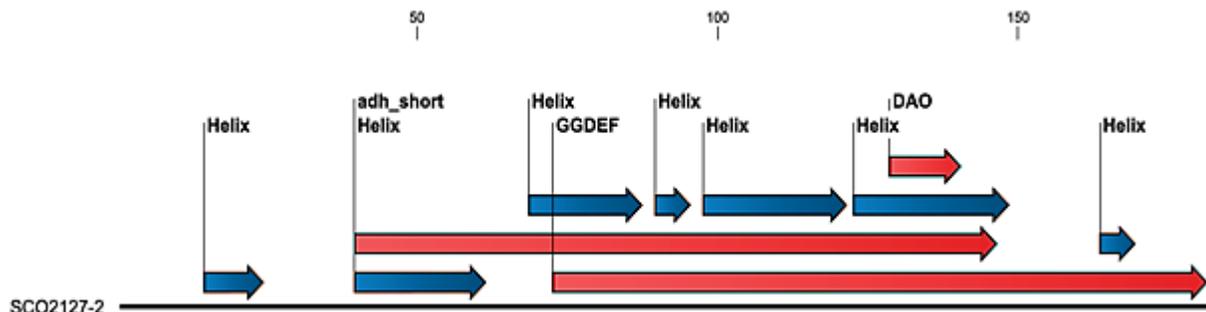
Recientemente se estableció un nuevo vínculo entre el metabolismo C y el N, cuando se demostró que GlnR no solo controla el metabolismo del nitrógeno, sino también la captación y el metabolismo del carbono (Liao et al., 2015). *S. coelicolor* puede usar una amplia gama de fuentes de nitrógeno, incluyendo amoníaco, nitrato (Wang y Zhao, 2019), nitrito, urea (Tiffert et al., 2008), amino azúcares y aminoácidos (Reuther y Wohlleben, 2007). La utilización de diferentes fuentes de nitrógeno está controlada por el regulador de respuesta huérfano GlnR cuya expresión génica es dependiente del nitrógeno (Tiffert et al., 2008). En *Saccharopolyspora erythraea*, la mayoría de los transportadores ABC están bajo control de GlnR y su alteración conduce a un deterioro en el crecimiento de los azúcares, incluida la maltosa, manitol, manosa, sorbitol y trehalosa (Liao et al., 2015) y en su análisis transcripcional de CCR en *S. coelicolor*, Romero - Rodríguez y sus colegas también observaron la regulación positiva de GlnR por la glucosa (Romero - Rodríguez et al., 2016).

## 8.9.2 La proteína SCO2127 presenta características similares a una *proteína/sensor* citoplasmático.

Reconociendo que la proteína SCO2127 hipotética presenta probables estructuras secundarias  $\alpha$  hélices y que estas estructuras podrían formar un dominio, se realizaron corridas de búsqueda en programas disponibles para reconocer dichos dominios que; si bien no podrían predecir la función de la proteína completamente, pueden ayudar a explicar los efectos del gen en el fenómeno de RCC reportados anteriormente.

La razón para buscar dominios radica en que la proteína no se parece a nada reportado con una función conocida, pero tal vez secuencias pequeñas de 10 a 20 residuos de aminoácidos podrían tener algún parecido con otros dominios reportados dado su tamaño aún más pequeño que el de una proteína completa.

El análisis bioinformático básico de la proteína hipotética SCO2127, Con el programa CLC WorkBench (2008), predice una estructura secundaria conformada por 7  $\alpha$  hélices. Los dominios a los que tiene semejanza son *adh\_short* (Figura 28) que es un dominio de la cadena corta de la familia de las deshidrogenasas. Se encontró semejanzas con un dominio DAO, que pertenece a una oxidoreductasa dependiente de FAD. Así mismo se encontró similitud con un dominio GGDEF que pertenece a una diguanilato ciclasa. SCO2127 contiene 191 aminoácidos y esta altamente conservado en miembros del género *Streptomyces*



**Figura 28.** Predicción de dominios y estructuras secundarias de la proteína SCO2127. Se pueden observar 7 posibles  $\alpha$  hélices, así como tres posibles dominios denominados como *adh\_short*, GGDEF y DAO.

En la base de datos NCBI se indica que SCO2127 pertenece a una familia clasificada como DUF (Domain Unknown Function), ampliamente conservada entre los genomas reportados de las especies del género *Streptomyces*, también comparte similitudes parciales con dominios CHASE (Common Extracellular Sensory Domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea), Específicamente los dominios CHASE se encuentran en cinasas histidina, adenilato ciclasas, posibles diguanilato ciclasas/fosfodiesterasas y proteínas sensoras de grupos hemo (hemotaxis).

Recordemos que un dominio es la unidad estructural y funcional más pequeña capaz de evolucionar y plegarse de forma independiente dentro de la proteína a la que pertenece. En este sentido las regiones de baja complejidad identificadas por SMART (ver ANEXO A) a pesar de no encontrarse anotadas (dentro de las bases de datos) con una función determinada, podrían tener funciones específicas que contribuyen a la intervención de SCO2127 en los fenómenos de RCC descritos anteriormente.

Utilizando SMART para la identificación de dominios utilizando la secuencia de aminoácidos de SCO2127. Mostró que las secuencias de aminoácidos altamente conservadas en la proteína SCO2127 pertenecen a los aminoácidos  $\alpha$  hélices y aunque el programa los clasifica como regiones de poca complejidad, especulamos que estas secuencias de aminoácidos podrían formar dominios dentro de la proteína SCO2127.

Si se desea establecer regiones funcionales de la proteína estas secuencias son los candidatos ideales, que se pueden deletar o mutar en la familia de genes y seguramente se podrá modificar o afectar su actividad. Teniendo la CGM delta *sco2127* se pueden realizar experimentos para identificar estas mutaciones e identificar si estas regiones funcionales le confieren la actividad al gen.

CATH (ver Anexo A) mostró que la secuencia SCO2127 tenía algunas regiones similares a la proteína Aldolasa que se encuentra casi en el centro de la proteína SCO2127.

En segundo lugar, se identifica una región similar a una proteína Aldo/Ceto reductasa (oxidoreductasa NADP-dependente) cuya estructura presenta regiones transmembranales. La proteína de referencia se obtuvo de *E. coli*. En tercer y cuarto lugar, otras Aldo/Ceto reductasa, cuya estructura presenta regiones transmembranales  $\alpha$  hélices y hojas beta Barril.

En quinto lugar, en una región cercana al extremo amino terminal de la proteína se encontró similitud con una peptidasa cuyo inhibidor pertenece a un actinomiceto. La información obtenida del sistema CATH afortunadamente cae dentro del Dominio Bacteria, lo que nos da mayor confianza en la probable función de la proteína.

Tierrafría et al. (2016) reportaron que la CGM  $\Delta$ *sco2127* de *Streptomyces coelicolor* presentaba un retardo en su desarrollo morfológico, (lo que concuerda con la hipótesis de que *sco2127* es una proteína señalizadora de la condición energética intracelular, específicamente de la presencia de glucosa en *Streptomyces*) además de mostrar una baja producción de actinorrodina.

Por otro lado, el reporte Tierrafría et al. (2016) identifica en su análisis proteómico que dicha CGM mostraba un incremento en la concentración intracelular de enzimas relacionadas con la gluconeogénesis, así como una disminución de proteínas relacionadas con glucólisis y la acetil-CoA carboxilasa (lo que concuerda con los dominios putativos encontrados para SCO2127).

Así mismo se concluye en dicho trabajo que la disminución en la producción de actinorrodina se debía probablemente a las altas concentraciones de óxido nítrico (citotóxico) presente por la acumulación de nitritos, que de acuerdo con Weiss (2006) provocan un retraso en el desarrollo de *S. coelicolor*.

Esto contrasta con el reporte de Romero et al. (2016) en el que se reporta que la glucosa incrementa el flujo de actividad de las enzimas de glucólisis y la ruta de pentosa fosfatasa pero la gluconeogénesis fue inhibida. Así mismo se reporta que la glucosa genera RC para algunos probables transportadores y la transcripción de enzimas que catalizan la utilización de fuentes alternativas de carbono.

Además, los autores concluyen que, aunque la glucosa por sí misma generaba RC contra la agarasa (Angel et al. 1992) su influencia no es tan global como se tenía pensado de acuerdo a sus resultados. De acuerdo con esto, proponemos (especulando) que SCO2127 es una proteína que interviene en el transporte de glucosa como un sensor intracelular (Ver modelo en Anexo B). Como argumento retomamos lo descrito anteriormente:

En *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* se obtuvieron mutantes insensibles a RCC con una actividad glucosa cinasa similar a las de las cepas tipo silvestre respectivamente (Ramos et al. 2004), descartando que hubiera una relación directa entre la actividad glucosa cinasa y la RCC.

Adicionalmente, estos resultados confirmaron que ni el gen *glk*, ni la actividad glucosa cinasa (por sí solos) eran responsables de la RCC. De acuerdo con lo anterior, la secuencia del gen *glk* de distintas mutantes insensibles a RCC, no presentaba deleciones ni mutaciones puntuales.

A pesar de esto y con la intención de identificar algún vínculo entre el fenómeno de regulación por carbono y el fenotipo de las cepas insensibles a dicho proceso, se midió el transporte de glucosa en dichas mutantes insensibles a RCC.

Este análisis reveló que, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* insensibles a RCC mostraban una disminución considerable en el transporte de glucosa (Ramos et al. 2004), lo cual advertía la presencia de una correlación directa entre el fenómeno de RCC y el transporte de glucosa.

De aquí se desprende la hipótesis de que la función de SCO2127 es la de sensar la presencia de glucosa-6-P, pues un mecanismo posible implica que SCO2127 interactúa con Glk y GlcP cuando forman el complejo Glk/GlcP cerca de la membrana (Anexo B).

En el 2007, van Wezel et al., propusieron que la cantidad de proteína Glk es más o menos independiente de la fase de crecimiento, pero su actividad catalítica depende de la presencia de glucosa en el medio (van Wezel et al., 2007). Asimismo, reportan que el transporte de glucosa y la actividad de Glk presentan perfiles similares, lo que indica una posible relación funcional entre ellos. Prueba de ello es que la

incorporación de glucosa en una cepa mutada en Glk decae drásticamente (van Wezel et al., 2007). Para examinar si Glk se une a GlcP, se realizaron pruebas de western blot con anticuerpos anti-Glk, mostrando que cuando las células son crecidas en glicerol como única fuente de carbono, la Glk es encontrada únicamente en la fracción citoplásmica, pero cuando las células se crecen en glucosa, una cantidad significativa de Glk es encontrada en la fracción membranal.

Esta observación ha generado un modelo en el que se propone que el tetrámero de la Glk forma un complejo con la proteína de transporte de glucosa glcP en la membrana celular, mientras que la forma citoplásmica de la Glk actúa en respuesta a la presencia de glucosa, ATP u otros metabolitos aún desconocidos (van Wezel et al., 2007). Volviendo a *sco2127* es sorprendente (dada la gran cantidad de información y bases de datos disponibles) que la proteína SCO2127 no presente similitudes significativas con algún gen o proteína de los que se conozca su función. La eliminación o mutación de *glkA* da como resultado la pérdida de la capacidad para utilizar glucosa, así como la pérdida de represión catabólica por glucosa de los genes controlados por otros catabolitos, incluidos aquellos para la utilización de agar (*dagA*), glicerol (*glyCABX*), galactosa (*galP*), maltosa (*malEFG*) y quitina (*chi*) (Angell et al., 1992; Angell et al., 1994; Hindle y Smith, 1994; van Wezel et al., 1997; Saito et al., 2000). ¿Cómo es que SCO2127 participa en estos procesos? Eso está aún por descubrirse.

La actividad enzimática de Glk depende en gran medida de la fuente de carbono y de la fase de crecimiento, con una alta actividad de Glk en cultivos de glucosa y baja actividad en cultivos de la fuente de carbono no represora manitol, por lo que la actividad de Glk se modula a través de metabolitos dependientes Activación y / o modificación post-traducciona l de la enzima (van Wezel et al., 2007). Por esto último proponemos que SCO2127 tiene algo que ver con esta modificación postraducciona l (ver modelo Anexo B). En *Streptomyces lividans*, se ha reportado una proteína reguladora que participa en la RCC de la producción actinorrodina. En este microorganismo, la glucosa inhibe la producción de antibiótico mediante la represión de la síntesis de mRNA de *afsR2*, que codifica una proteína reguladora global implicada en la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kim et al. 2001). Lee et al. 2009 sugiere que esta proteína es un regulador río abajo dependiente de *AfsR2* para la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor*. De este modo, aunque la función del gen *sco2127* aún se desconoce, su co-transcripción con *glkA* sugiere que existe una conexión funcional entre los dos productos.

Por otro lado la sobreproducción del pigmento azul por parte de la CGM *Streptomyces coelicolor*  $\Delta$ *sco2127::apra* podría tener aplicaciones industriales, ya que el pigmento ha demostrado en pruebas preliminares la capacidad para teñir textiles diversos con un ahorro significativo en el uso de agua. Esto sin duda podría tener un impacto positivo en la sustentabilidad de la posible utilización a nivel industrial de este pigmento bacteriano.

## 9. CONCLUSIONES:

- La proteína SCO2127 está involucrada RCG en *Streptomyces coelicolor*, pero el mecanismo de acción es aún desconocido.
- Existen diferencias en la regulación de la producción del pigmento actinorrodina y esporulación entre las CGMs:  $\Delta sco2127::apra$ ;  $\Delta sco2127$  y la cepa tipo silvestre *Streptomyces coelicolor* M145.
- SCO2127 presenta características similares a una proteína/sensor citoplásmico.

## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos experimentales para comprobar actividades enzimáticas correspondientes con los dominios putativos encontrados para SCO2127 en el análisis bioinformático de este trabajo.
- Diseñar experimentos para determinar la posibilidad de que el PTS en *Streptomyces* tenga un papel global en la RCC interactuando con metabolitos intermediarios de glucolisis.
- Mutación del gen homólogo a *sco2127* en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y comparar de su fenotipo con las mutantes *Dog*<sup>R</sup>
- Cuantificación de otros metabolitos secundarios (ej. Undecilprodigiosina y antibiótico dependiente de calcio) producidos por la cepa silvestre de *S. coelicolor* y por la CGM  $\Delta$ *sco2127*.
- Generación de anticuerpos monoclonales anti-*sco2127* que permitan realizar estudios de tipo inmunohistoquímico.
- Obtener, purificar y cristalizar la proteína de *sco2127* y/o el posible complejo SCO2127/Glk/GlcP

## Referencias

- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., y Lu, G. (2017). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International J. M. S.*,19(1), 48.
- Amin, N., y Peterkofsky, A. (1995). A dual mechanism for regulating cAMP levels in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 11803–11805.
- Angell, S., Schwarz, E., y Bibb, M.J. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6, 2833–2844.
- Angell, S., Lewis, C.G., Buttner, M.J., y Bibb, M.J. (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244,135–143.
- Barka, E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff JP, Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., y Van Wezel G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol.* 25 (1)1-43.
- Bentley, S.D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. y Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W., y Gilles E-D. (2007). Correlation between growth rates, EIIA Crr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 189 (19) 6891-6900.
- Bhatnagar, R.K., Doull, J.L., y Vining, L.C. (1988). Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. *Can. J. Microbio.* 34, 1217–1223.
- Bierman, M., Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene.* 116 (1):43-49.

Borodina, I., Siebring, J., Zhang, J., Smith, C.P., van Keulen, G., Dijkhuizen, L., y Nielsen, J. (2008). Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mediated by phosphofructokinase deletion. *J. Biol. Chem.* 283, 25186–25199.

Bourauoi, H., Ventroux, M., Noiro-Gros, M.-F., Deutscher, J., y Joyet, P. (2013). Membrane sequestration by the EIB domain of the mannitol permease MtlA activates the *Bacillus subtilis* mtl operon regulator MtlR. *Mol. Microbiol.* 87, 789–801.

Brückner, R., y Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 141-148.

Brückner, R., y Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization, *FEMS Microbiol. Lett.*, 209, (2) 141–148.

Butler, M.J., Deutscher, J., Postma, P.W., Wilson, T.J., Galinier, A., y Bibb, M.J. (1999). Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 279-288.

Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A., y Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 178, 2238-2244.

Chater, K.F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000 Research*, 5, 2795.

Coisne, S., Béchet, M., Blondeau, R. (1999). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media. *Lett. in Appl. Microbiol.* 28, 199-202.

Cortes, J., Liras, P., Castro, J.M., y Martin, J.F. (1986). Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1805–1814.

Demain, A. L. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 486-495.

Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their Discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 185–201.

Demain, A.L., y Inamine, E. (1970). Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (alpha-D-mannosidase) formation. *Bacteriol Rev* 34, 1–19.

Derouaux, A., Dehareng, D., Lecocq, E., Halici, S., Nothaft, H., Giannotta, F., Moutzourelis, G., Dusart, J., Devreese, B., Titgemeyer, F., Beeumen, J.V., y Rigali S. (2004). Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind AMPc. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 325, 983-990.

Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J. (2004b). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 186, 1893–1897.

Deutscher, J., Galinier, A., y Martin-Verstraete, I. (2002). Carbohydrate uptake and metabolism in *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. *ASM Press, Washington, DC.*, 129–150.

Deutscher, J., Aké, F. M., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., y Joyet, P. (2014). The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 78(2), 231-56.

Egeter, O., y Brückner R. (1996). Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* 21, 739-749.

Escalante, A., Salinas-Cervantes, A., Gosset, G. (2012). Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 94(6), 1483–1494.

Escalante L., Lopez, H., del Carmen Mateos, R., Lara, F., y Sánchez, S. (1982). Transient repression of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. *J. Gen. Microbiol.* 128(9), 2011–2015.

Fernández, E., Weissbach, U., Sánchez Reillo, C., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., y Salas, J. A. (1998). Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* 180(18), 4929–4937.

Forero, A., Sánchez, M., Chávez, A., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R., Servín-González, L., y Sánchez, S. (2012). Possible Involvement of the *sco2127* gene product in glucosa represión of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol.* 58(10), 1195-1201.

Galinier, A., Deutscher, J., Martin-Verstraete, I. (1999). Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J. Mol. Biol.* 286(2),307-314.

Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J., y Martin-Verstraete, I. (1997). The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(16), 8439–8444.

Galinier, A., y Deutscher, J. (2017). Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J.m.b.* 429(6), 773-789.

Galinier, A. (2018). La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés. *Med. Sci.* 34 (6), 531-539.

Gao, C., Hindra, Mulder, D., Yin, C., y Elliot, M.A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *m.Bio.* 3 (6)1–12. doi:10.1128/mBio.00407-12

Gómez A.H. (2014). Represión catabólica de la ruta de degradación de tetralina en *Sphingopyxis macrogolita* TFA. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica Universidad Pablo de Ovide, Sevilla España.

Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Whitman W.B. (2012). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. The Actinobacteria, part A and B. Springer, New York, NY.

Goraya, A., Asghar, F., Javaid, I., y Ali, S. (2017). Microbial strain improvement for overproduction of industrial products. *J.B.S.* 3(5), 10-29.

Gregory, M. A., Till, R., y Smith, M. C. (2003). Integration site for *Streptomyces phage phiBT1* and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.*, 185 (17), 5320–5323. doi:10.1128/JB.185.17.5320-5323.2003

Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., y Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(4), 1541-1546. doi:10.1073/pnas.0337542100.

Guzman, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., Lopez, R., Rodriguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Servín-González, L., Sanchez, S. S., y Langley, E. (2005). Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiol.* 151, 1717–1723. doi: 10.1099/mic.0.27557-0.

Henstra, S.A., Duurkens, R.H., y Robillard, G.T. (2000). Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the

*Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.*, 275(8), 7037-7044.

Hogema, B.M., Arents, J.C., y Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., y Postma, P.W. (1998). Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA<sub>Glc</sub>. *Mol. Microbiol.* 30(3):487-498.

Hostalek, Z. (1980). Catabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Folia Microbiol.* 25 (5) 445-450.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., y Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnol.* 21, 526-531.

Inada, T., Kimata, K., y Aiba, H. (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to cells* 1(3), 293-301.

Jakimowicz D., y van Wezel P. (2012). Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Mol. Microbiol.* 85 (3), 393-404.

Jault, J.M., Fioulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J., y Galinier, A. (2000). The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J. Biol. Chem.*, 275(3), 1773-1780.

Joyet, P., Bouraoui, H., Aké, F.M., Francine, M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Ventroux, M., Nessler, S., Noirot-Gros, M-F., Deutscher, J., y Milohanic, E. (2013). Transcription regulators controlled by interaction with enzyme IIB components of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *B.B.A.*, 1834(7), 1415-1424.

Joyet, P., Derkaoui, M., Bouraoui, H., Deutscher J. (2015). PTS-mediated regulation of the transcription activator MtlR from different species: surprising differences despite strong sequence conservation *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 25(2-3), 94-105.

Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S., y Deutscher, J. (2010). Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol. Microbiol.*, 76(5), 1279-1294.

Khosravi, C., Benocci, T., Battaglia, E., Benoit, I., y de Vries, R.P., Chapter One - Sugar catabolism in *Aspergillus* and other fungi related to the utilization of plant biomass. *Adv. Appl. Microbiol.* 90,1-28. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.09.005.

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., y Hopwood D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, U.K.

Kim, E.S., Hong, H.J., Choi, C.Y., y Cohen, S.N. (2001). Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *J. Bacteriol.* 182(7), 2198–2203.

Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P., y Aiba, H. (1997). cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(24):12914-12919.

Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., y Hengstenberg, W. (1999). The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol. Microbiol.* 31(1) 59-66.

Kussell, E., Leibler, S. (2005). Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 309 (5743), 2075–2078.

Kwakman, J.H., Postma, P.W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176(9), 2694-2698.

Lal, R., Kumari, R., Kaur, H., Khanna, R., Dhingra, N., y Tuteja, D. (2000). Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type-I PKSs. *Trends. Biotechnol.* 18(6), 264-274.

Lambert, S., Traxler, M.F., Craig, M., Maciejewska, M., Ongena, M., y van Wezel, G.P., Kolter, R., Rigali, S. (2014). Altered desferrioxamine-mediated iron utilization is a common trait of bald mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics* 6(8), 1390–1399.

Landmann, J.J, Busse, R.A., Latz, J.H, Singh, K.D., Stülke, J., y Görke, B. (2011). Crh, the paralogue of the phosphocarrier protein HPr, controls the methylglyoxal bypass of glycolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 82(3), 770–787.

Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M., y Ebright, R.H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14(1) 10–20.

Lawson P. A. (2018). *The Bifidobacteria and Related Organisms*, Chapter 1 - The Phylum Actinobacteria, Editors: Paola Mattarelli, Bruno Biavati, Wilhelm H. Holzapfel, Brian J.B. Wood, *Academic Press*. Pag. 1-8, ISBN 9780128050606.

Lee, H., Im, J., Lee, M., Lee, S., y Es, K. (2009). A putative secreted solute binding protein, SCO6569 is a possible AfsR2-dependent down-regulator of actinorhodin

biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Process. Biochem.* 44(3) 373–377. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.12.002

Liao, C.H., Yao, L., Xu, Y., Liu, W.B., Zhou, Y., y Ye, B.C. (2015). Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes. *P.N.A.S.* 112(51), 15630–15635.

Lindner, C., Galinier, A., Hecker, M., Deutscher, J., (1999). Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. *Mol. Microbiol.* 31(3), 995–1006.

Mahr K., Hillen, W., y Titgemeyer, F. (2000). Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1), 277-283.

Malpartida, F. y Hopwood, D.A. (1996). Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 205(1), 66-73.

Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P. Sanchez J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 74(12), 3877–3886. doi:10.1128/AEM.02715-07

Marciniak, B. C., Pabijaniak, M., de Jong, A., Dühring, R., Seidel, G., Hillen, W., y Kuipers, O. P. (2012). High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *B.M.C. genomics*, 13, 401. doi:10.1186/1471-2164-13-401

Margulis, L. y Schwartz, K. V. (1985). Los Cinco Reinos. Actinobacterias. Editorial Labor. Barcelona. P. 60.

Martin-Verstraete, I., Deutscher, J., y Galinier, A. (1999). Phosphorylation of HPr and Crh by HprK, early steps in the catabolite repression signalling pathway for the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J. Bacteriol.* 181(9), 2966–2969.

Mazé, A., Boël, G., Poncet, S., Mijakovic, I., Le Breton, Y., Benachour, A., Monedero, V., Deutscher, J. y Hartke, A. (2004). The *Lactobacillus casei ptsHI47T* mutation causes overexpression of a LevR-regulated but RpoN-independent operon encoding a mannose class phosphotransferase system. *J Bacteriol.* 186(14), 4543–4555. doi:10.1128/JB.186.14.4543-4555.2004.

Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, et al. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* (2000). 28, 1206–1210.

Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M., y Fujita, Y. (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic. Acids Res.*, 28(5), 1206–1210. doi:10.1093/nar/28.5.1206

Moreno, M.S., Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W., y Saier, M.H. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* 39(5), 1366-1381.

Müller W., Horstmann N., Hillen W., Sticht H. (2006). The transcription regulator RbsR represents a novel interaction partner of the phosphoprotein HPr-Ser46-P in *Bacillus subtilis* FEBS J., 273: 1251-1261

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2019 Apr 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

New, A. M., Cerulus, B., Govers, S. K., Perez-Samper, G., Zhu, B. Boogmans, S., y Verstrepen, K. J. (2014). Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS. Biol.* 12(1). DOI: e1001764. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001764>.

Nothhaft, H., Dresel, D., Willimek, A., Mahr, K., Niederweis, M., y Titgemeyer, F. (2003). The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185(23), 7019–7023. doi:10.1128/jb.185.23.7019-7023.2003

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., y Horinouchi, S. (2008). Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190 (11), 4050–4060. doi: 10.1128/JB.00204-08

Parche S., Schmid, R., y Titgemeyer, F., (1999). The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*: identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur. J. Biochem.* 265(1), 308-317.

Parekh, S., Vinci, V., y Strobel, R. (2000). Improvement of microbial strain and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 287-301.

Postma P.W., Lengeler J.W. y Jacobson G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57-3: 543-594.

Reuther, J., y Wohlleben, W. (2007). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 12(1-2), 139–146.

Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H. K., Hopwood, D. A., Titgemeyer, F. y Van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molec. Microb.* 61(5), 1237-1251.

Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafan, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D., y Sánchez, S. (2016). Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. *B.M.C. Microbiol.* 16 (77). 1-16. Doi: doi: 10.1186/s12866-016-0690-y.

Saier, M.H., Goldman, S.R., Maile, R.R., Moreno, M.S., Weyler, W., Yang, N., (2002). Transport capabilities encoded within the *Bacillus subtilis* genoma. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 4(1), 37-67.

Sambrook, J. y Russell, D., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed.. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, NY, Cold Spring Harbor.

Sanchez, S. y Demain, A. L. (2011). Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *organic process research y development* 15(1), 224-230.

Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Avalos, M., Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., y Ruiz, B. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* 63(8), 442–459. doi: 10.1038/ja.2010.78.

Shoval, O., Sheftel, H., Shinar, G., Hart, Y., Ramote, O., Mayo, A., Dekel, E., Kavanagh, K., y Alon, U. (2012). Evolutionary trade-offs, pareto optimality, and the geometry of phenotype space. *Science* 336(6085), 1157–1160.

Stülke, J., y Hillen, W. (1998). Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85(12), 583-592.

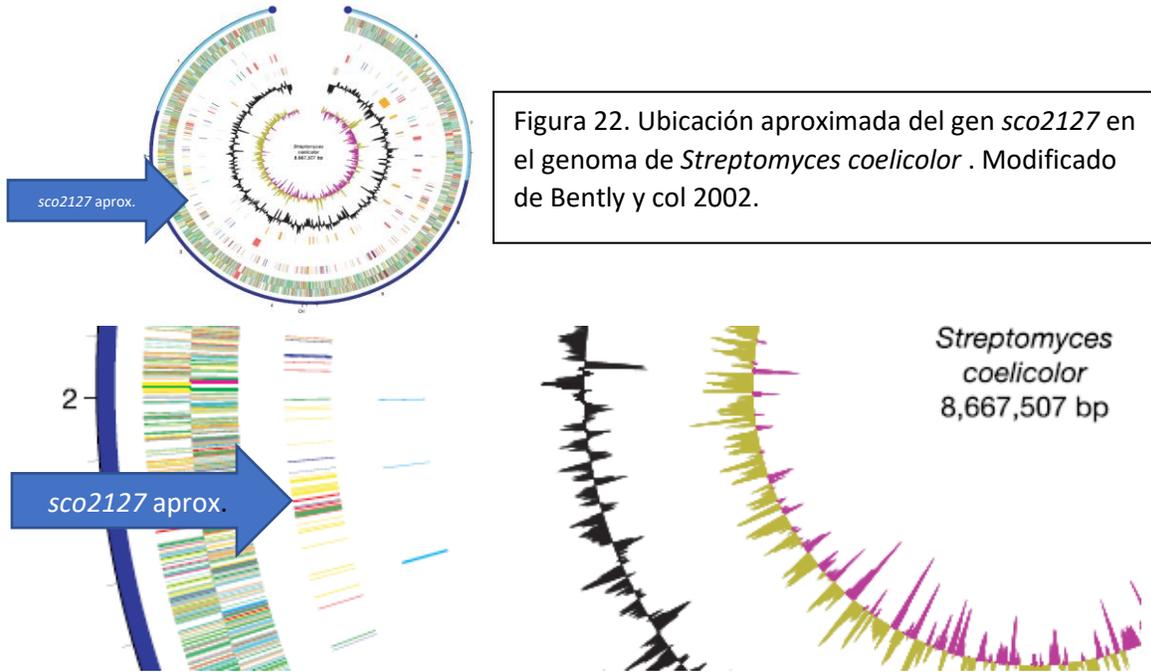
Stülke J., Arnaud M., Rapoport G., y Martin-Verstraete I. (1998). PRD-a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 28(5), 865-874.

Tierrafría, V., Licona-Cassani, C., Maldonado-Carmona, N., Romero-Rodríguez, A., Centeno-Leija, S., Marcellin, E., Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz-Villafán, B., Nielsen, L., K., Sánchez, S. (2016). Deletion of the hypothetical protein SCO2127 of *Streptomyces coelicolor* allowed identification of a new regulator of actinorhodin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(21), 9229-9237.

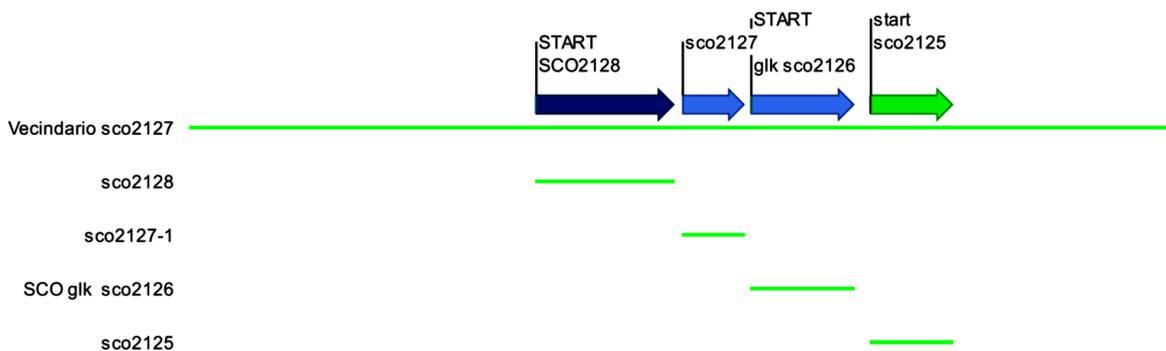
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R., y Reuther, J. (2008). The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* 67(4), 861–880.
- Titgemeyer, F., Mason, R.E., y Saier, M.H., Jr. (1994). Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 176(2), 543-546.
- Titgemeyer, F., Walkenhorst, J., Reizer, J., Stuiver, M.H., Cui, X., y Saier, M.H., Jr. (1995). Identification y characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology*, 141, 51-58.
- Titgemeyer, F., y Hillen, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Anton van Leeuwenhoek* 82, 59-71.
- Tobisch, S., Stülke, J., y Hecker, M., (1999). Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 181, 4995–5003.
- Traxler, M.F., Seyedsayamdost, M.R., Clardy, J., y Kolter, R. (2012). Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Mol. Microbiol.* 86(3), 628–644.
- Urem, M., Świątek-Połatyńska, M. A., Rigali, S. y van Wezel, G. P. (2016). Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* 102(2), 183-195.
- Västermark A., y Saier M.H., Jr. (2014). The involvement of transport proteins in transcriptional and metabolic regulation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 18, 8-15.
- Wang, J., y Zhao, G.P. (2009). GlnR positively regulates *nasA* transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386(1), 77–81.
- Xue, J., y Miller, K. W. (2007). Regulation of the *mpt* operon in *Listeria innocua* by the ManR protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(17), 5648–5652.
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, y T., Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* 151(9), 2899–2905.

## ANEXO A. Ubicación del gen *sco2127* dentro del genoma de *Streptomyces coelicolor*; genes adyacentes; secuencias de ADN y aminoácidos.

El genoma de *S. coelicolor* tiene 8,667,507pb; *sco2127* se encuentra entre la posición 2,287,566 y 2,286,991 del genoma *S. coelicolor*



A continuación, representación gráfica del contexto genético más próximo a *sco2127*. Se muestran esquemáticamente las regiones codificantes del segmento del cromosoma de *S. coelicolor* que colindan con *sco2127* y *glk*



Representación del segmento del genoma de *S. coelicolor* que contiene a los genes inmediato anterior (*sco2128*) e inmediato posterior a *glkA*.

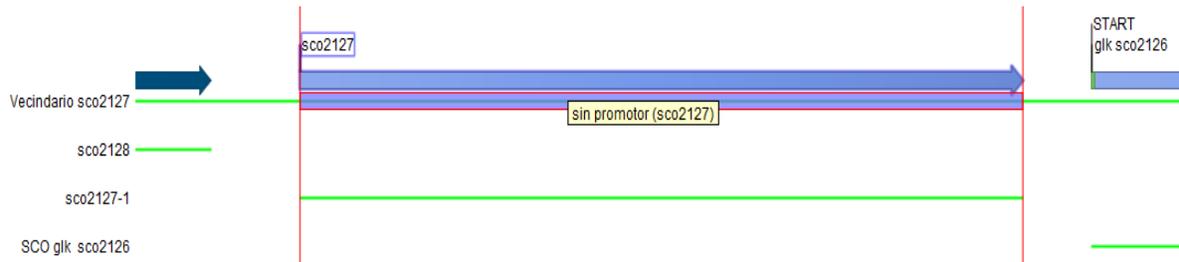
Las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_003888.3?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_003888.3?report=graph)) muestran que cada región codificante (gen hipotético) presenta un codón de inicio y de paro para su transcripción.

Secuencia completa del gen *sco2127*, compuesto de 576 nucleótidos sin su promotor (resaltado en rosa); en amarillo su codón de inicio y de paro.

```

ATGAGCGAAGAGCTCCCCCGTCCGAGGCCCCCGCCCGACGAGGCCGACGCGGTTCGACGAGACGCAGCGACCCGGCGAG
ACGCGCGGGGGCGGCGCAGGAGCCGGGTGCGAGCGACGCCGACGCCTGGGCGACCGCGTGCGCCGAGGACCTGGAGGCCGAG
AAGGCCCGCCGCGGGCCGCGTACGGGCCCGCCCGGCTCGGCCGCCGAGGAGCTGCGCCGGCTCGTCGACACCGTCGCG
GACAAGCTGTCCGGTCTCCAGTCCCCCTGCTCGGCCAGGTTGCCGGACCCGCCGCCAGCAGGTGGTCCGGCAGGTTCGTC
CAGCAGGCCAAGGCCGCGCGTCAACCGGTCATCGAGCGCAACCCGGACCTGTTGACCACTCGCCCGCCCGGTGGTGAA
CTGCTCGCCGCCTACCGCTCCGCCGTCCAGAACCAGGAACGCCGCTGGACCACCGGGGACACCGCGCCAAGGACCCGAGC
GACCCACGTGACCTGGACGAACGCGGCACCGACGGCCGCGACGAGGGCGACGGAGGCACCGGCCCGGGGCAGCGCATCGAC
CTGGACTGA
    
```

En la siguiente figura (abajo) se puede observar a *sco2127* sin su promotor; su región promotora se encuentra entre los nucleótidos 2,287,567 – 2,287, 635. El gen podría codificar para una proteína de aproximadamente 20.1 kD de acuerdo con las referencias en la base de datos origen.



Se muestra esquemáticamente al gen *sco2127* sin incluir la región promotora.

La anotación en la base de datos del NCBI presenta al gen *sco2127* como una proteína hipotética cuya función es desconocida. A continuación, se presenta la región y secuencia que incluye la región intergen de 70 pb que seguramente incluye el promotor de *sco2127*.



Se muestra un esquema al gen *sco2127* incluyendo su región promotora en el genoma de *S. coelicolor*.

En amarillo se resaltan los codones de inicio y término, así como los nucleótidos -10 y -35.

```

CCCGCGGAGCCCCGAGCGCGGGCCCCGCGGTTCCGGGTAACGTCGTAAGGACGAACCGTAGTCAGGAGTCCGTCATGAGCGAAGA
GCTCCCCCGTCCGAGGCCCCCGCCCGACGAGGCCGACGCGGTTCGACGAGACCGGAGCGACCCGGCGAGACGCGCGGGGGC
    
```

```

GGCGCAGGAGCCGGGTGCGAGCGACGCCGACGCCCTGGGCGACCGCGTGCGCCGAGGACCTGGAGGCCGAGAAGGCCCGCCG
CCGGGCCCGGTACGGGCCCGCCCGCCCGGCTCGGCCGCCGAGGAGCTGCGCCGGCTCGTCGACACCGTCGCGGACAAGCTGTC
CGGTCCTCCAGTCCCCCTGCTCGGCCAGGTTGCCGGACCCGCCGCCAGCAGGTGGTCCGGCAGGTGCTCCAGCAGGCCAA
GGCCGCGTCCGACCGGTCATCGAGCGCAACCCGGACCTGTTTCGACCACCTCGCCGCCCGCGGTGGTGAAGTCTCGCCGC
CTACCGCTCCGCGCTCCAGAACCAGGAACCGCGCTGGACCACCGGGGACACCGCGCCAAGGACCCGAGCGACCCACGTGA
CCTGGACGAACGCGGCACCGACGGCCGCGACGAGGGCGACGGAGGCACCGGCCCGGGCAGCGCATCGACCTGGACTGA

```

Se puede considerar que la distancia entre estos genes es también bastante corta, lo que podría significar que se transcriben (y traducen) con poca o nula diferencia temporal.

La distancia entre *sco2127* y *sco2128* es de 70 pb



Distancia entre *sco2127* y su gen más contiguo.

El gen *sco2128* está anotado como una proteína de 390 pb cuya función no ha sido descubierta, pero presenta una similitud de 27% con la mitad amino terminal de proteínas ATPasa transportadora activadas por arseniatos.

Secuencia *sco2127* con región intergen *glk* es decir con región promotora de *glkA*:

```

ATGAGCGAAGAGCTCCCCCGTCCGAGGCCCGCCCGCCCGACGAGGCCGACGCGGTTCGACGAGACGCGAGCGACCGGGCGAG
ACGCGCGGGGCGGCGCAGGAGCCGGGTGCGAGCGACGCCGACGCCCTGGGCGACCGCGTGCGCCGAGGACCTGGAGGCCGAG
AAGGCCCGCCCGCGGGGCCGCTACGGGCCCGCCCGGCTCGGCCGCCGAGGAGCTGCGCCGGCTCGTCGACACCGTCGCG
GACAAGCTGTCCGGTCTCCAGTCCCCCTGCTCGGCCAGGTTGCCGGACCCGCCGCCAGCAGGTGGTCCGGCAGGTGCTC
CAGCAGGCCAAGGCCCGCTCGAACCGGTCATCGAGCGCAACCCGGACCTGTTTCGACCACCTCGCCGCCCGCGGTGGTGA
CTGCTCGCCGCTACCGCTCCGCGCTCCAGAACCAGGAACCGCGCTGGACCACCGGGGACACCGCGCCAAGGACCCGAGC
GACCCACGTGACCTGGACGAACGCGGCACCGACGGCCGCGACGAGGGCGACGGAGGCACCGGCCCGGGCAGCGCATCGAC
CTGGACTGAGTCTCTGCCTCGGGTACGGTTGCCCTTAGCGGGGCTCGACCGAACGAGGGATTC

```

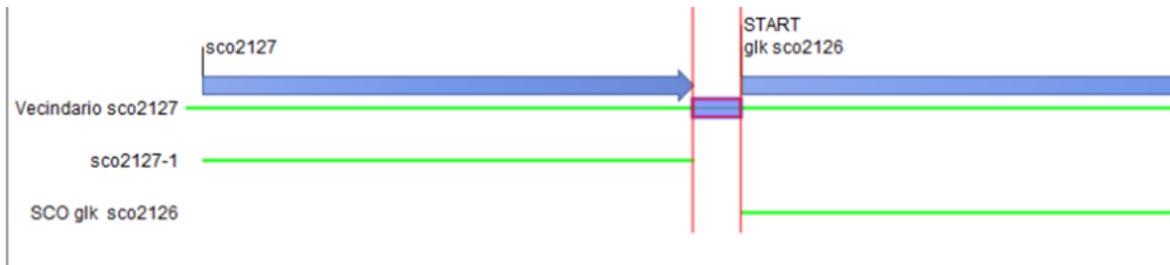


Secuencia de *sco2127* que incluye el promotor de *glkA*.

En la anotación en la base de datos consultada menciona que el gen codifica para la Glucosa cinasa Glk que es una proteína de la familia ROK (Represor Open Reading Frame Kinase) con una similitud del 34%. Estas proteínas están catalogadas como proteínas de control transcripcional, que son capaces de controlar operones en diversas especies bacterianas. Estas proteínas además de tener dominios para

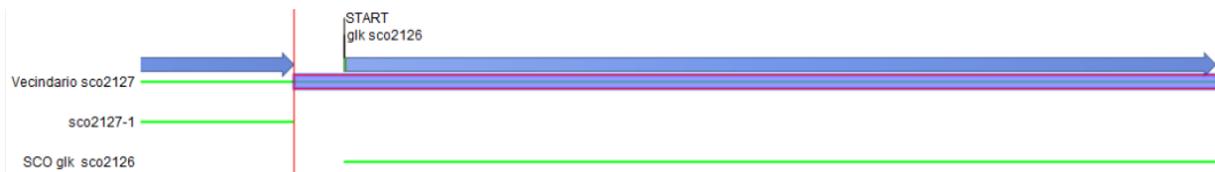
realizar la fosforilación de D-glucosa (catalizando a glucosa-6-fosfato), tienen estructuras que permiten unirse a secuencias DNA para cumplir su función reguladora, sin embargo, Glk no presenta los dominios de unión a DNA.

La distancia entre *sco2127* y *glkA* es de 54 pb lo que implica que prácticamente se transcriben de manera simultánea, probablemente porque sus funciones y actividades están relacionadas.



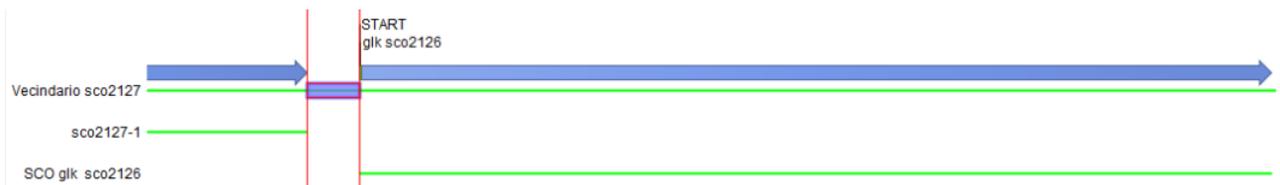
Distancia entre *glkA* y *sco2127*. Secuencia de nucleótidos de *glkA* con región intergen (probable región promotor).

Como se puede observar en la figura 28 la región entre *sco2127* y *glk* es muy pequeña, prácticamente se enciman, se muestra en amarillo los codones de inicio y de termino, así como su nucleótidos -10 y -35 en la siguiente secuencia.



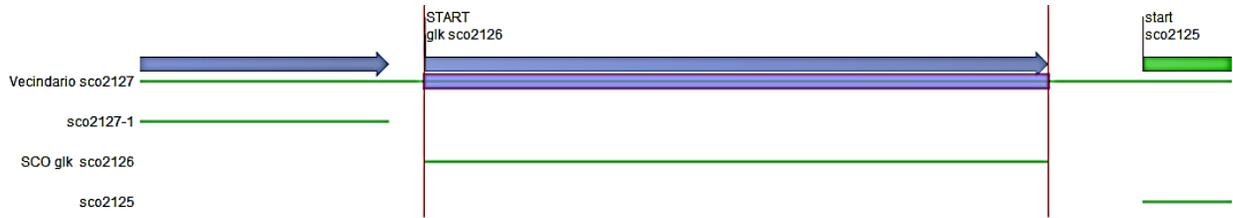
```
GTCCTGCCTCGGGTACGGTGGCCCTTAGCGGGGCTCGACCGAACGGAGGATTATGGGACTCACCATCGGCGTCGACATC
GGCGGCACGAAGATCGCGGCCGGCGTGGTCGACGAGGAAGGCAACATCCTCTCGACCACAAGGTGCCGACCCACCACA
CCCGAGGCCATCGTGGACGCCATCGCCTCCGCGGTCGAGGGGGCGCGAGTGGGGCACGAGATCGTCGCAGTGGGCATCGGC
GCCGCCGATACGTCAACCGCCAGCGCTCCACGGTCTACTTCGCGCCCAACATCGACTGGCGCCAGGAGCCGCTCAAGGAG
AAGGTCGAGGCCCGCTCGGCCTCCCGGTCGTCGTCGGAGAACGACGCCAACGCCCGGCGCTGGGGCAGTACAAGTTCGGC
GGCGCAAGGGCCACCGCAACGTCATCTGCATCACCTCGGCACCGGCTCGGCGGGGCATCATCATCGGCAACAAGCTG
CGCCGCGGCCACTTCGGCGTGGCCGCGGAGTTTCGGCCACATCCGCATGGTGCCGGACGGCCTGCTGTGCGGCTGCGGCTCG
CAGGGCTGCTGGGAGCAGTACGCGTCGGGGCGGGCGCTGGTGAGGTACGCCAAGCAGCGGCCAACGCCACCCCGAGCGC
GCCGAGGTGCTGCTCGCCCTCGGCGACGGCACCCCGACGGCATCGAGGGCAAGCACATCTCGGTGCGCCCGCCAGGGC
TGCCCGTGCCTGCGACTCCTACCGGAGCTGGCCCGCTGGGCCGGGGCCGGTCTCGCCGACCTGGCCTCGCTCTTCGAC
CCGTCCGCTTCATCGTCGGCGGGCCCTCTCGGACGAGGGCGACCTGGTCTCGACCCGATCCGCAAGTCTTACAAGCGC
TGGCTGGTCGGCGGCAACTGGCGCCCGGTCGCCGACGTGATCGCCGCCAACTCGGCAACAAGGCCGGCCTGGTCGGCGCC
GCCGACTGGCGAGAGAACCCGACCCGATCATGTGA
```

La región promotora *glkA* se encuentra entre el nucleótido 2,285,983 a 2,286,037



Esquema de la región intergen *sco2127* y *glkA*.

Secuencia *glkA* sin promotor únicamente el gen *sco2126* se encuentra entre los nucleótidos: 2,285,983 – 2,286,936

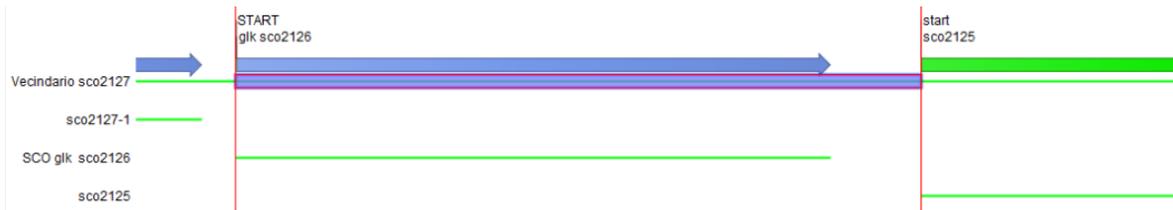


Secuencia codificante de la glucosa cinasa de *Streptomyces coelicolor*.

```

ATGGGACTCACCATCGGCGTCGACATCGGCGGCACGAAGATCGCGGCCGGCGTGGTTCGACGAGGAAGGCAACATCCTCTCG
ACCCACAAGGTGCCGACCCACCACACCCGAGGCCATCGTGGACGCCATCGCCTCCGCGGTTCGAGGGGCGCGAGTGGGG
CACGAGATCGTTCGAGTGGGCATCGGCGCCGCGGATACGTCAACCGCCAGCGCTCCACGGTCTACTTCGCGCCCAACATC
GACTGGCGCCAGGAGCCGCTCAAGGAGAAGGTTCGAGGCCGCGTTCGGCTCCCGGTTCGTCGAGGAGAACGACGCCAACGCC
GCGGCCCTGGGGCGAGTACAAGTTTCGGCGCGGCAAGGGCCACCGCAACGTCATCTGCATCACCCCTCGGCACCGGCCCTGGC
GGCGGCATCATCATCGGCAACAAGCTGCGCCGCGGCCACTTCGGCGTGGCCGCGGAGTTCGGCCACATCCGATGGTGCCG
GACGGCTGCTGTGCGGCTGCGGCTCGCAGGGCTGCTGGGAGCAGTACGCGTTCGGGGCGGGCGCTGGTGAGGTACGCCAAG
CAGCGGCCAACGCCACCCCGAGCGCGCCGAGGTGCTGCTCGCCCTCGGCGACGGCACCCCGACGGCATCGAGGGCAAG
CACATCTCGGTTCGCGCCCGCCAGGGCTGCCCGGTTCGCGTTCGACTCCTACCGGGAGCTGGCCCGCTGGGCCGGGGCCGGT
CTCGCCGACCTGGCCTCGCTCTTCGACCCGTCGCCCTTCATCGTTCGGCGCGGCCCTCTCGGACGAGGGCGACCTGGTCCTC
GACCCGATCCGCAAGTCTACAAGCGCTGGCTGGTTCGGCGGCAACTGGCGCCCGGTTCGCCGACGTGATCGCCGCCCAACTC
GGCAACAAGGCCGGCCTGGTTCGGCGCCCGGACCTGGCGAGAGAACCCGACCCGATCATGTGA
    
```

La Secuencia *glk* con región intergen con *sco2125* (sección entre *glk* y *sco2125* que incluye el promotor de *sco2125*)



Secuencia *glk* incluyendo región intergen *sco2125*

```

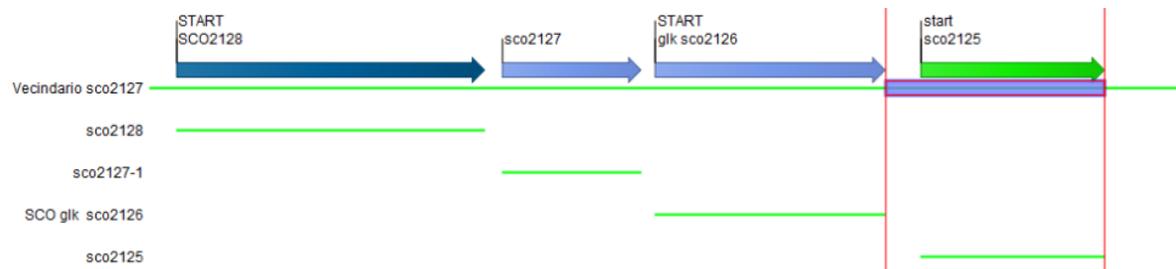
ATGGGACTCACCATCGGCGTCGACATCGGCGGCACGAAGATCGCGGCCGGCGTGGTTCGACGAGGAAGGCAACATCCTCTCG
ACCCACAAGGTGCCGACCCACCACACCCGAGGCCATCGTGGACGCCATCGCCTCCGCGGTTCGAGGGGCGCGAGTGGGG
CACGAGATCGTTCGAGTGGGCATCGGCGCCGCGGATACGTCAACCGCCAGCGCTCCACGGTCTACTTCGCGCCCAACATC
GACTGGCGCCAGGAGCCGCTCAAGGAGAAGGTTCGAGGCCGCGTTCGGCTCCCGGTTCGTCGAGGAGAACGACGCCAACGCC
GCGGCCCTGGGGCGAGTACAAGTTTCGGCGCGGCAAGGGCCACCGCAACGTCATCTGCATCACCCCTCGGCACCGGCCCTGGC
GGCGGCATCATCATCGGCAACAAGCTGCGCCGCGGCCACTTCGGCGTGGCCGCGGAGTTCGGCCACATCCGATGGTGCCG
GACGGCTGCTGTGCGGCTGCGGCTCGCAGGGCTGCTGGGAGCAGTACGCGTTCGGGGCGGGCGCTGGTGAGGTACGCCAAG
CAGCGGCCAACGCCACCCCGAGCGCGCCGAGGTGCTGCTCGCCCTCGGCGACGGCACCCCGACGGCATCGAGGGCAAG
CACATCTCGGTTCGCGCCCGCCAGGGCTGCCCGGTTCGCGTTCGACTCCTACCGGGAGCTGGCCCGCTGGGCCGGGGCCGGT
CTCGCCGACCTGGCCTCGCTCTTCGACCCGTCGCCCTTCATCGTTCGGCGCGGCCCTCTCGGACGAGGGCGACCTGGTCCTC
GACCCGATCCGCAAGTCTACAAGCGCTGGCTGGTTCGGCGGCAACTGGCGCCCGGTTCGCCGACGTGATCGCCGCCCAACTC
GGCAACAAGGCCGGCCTGGTTCGGCGCCCGGACCTGGCGAGAGAACCCGACCCGATCATGTGACGATCACTTCCCGACTCC
GGGAGCTGCGCTCACCCGAGGGGCGCGGGGAAGTGC GCGACAGCCACGACGAACCGGCAGTTCGCCAGGAACCCCGCGCC
CCGACCCATGAGGGCGCCTGATCATGCGTTCCCGTAAATTGACGGC
    
```

La distancia entre *glkA* y *sco2125* es de 144pb.



Distancia entre *glkA* y *sco2125* 144pb.

De los 4 genes observados es la región de mayor distancia en pares de bases.  
Secuencia gen *sco2125* con promotor (región intergen *glkA* y *sco2125*)

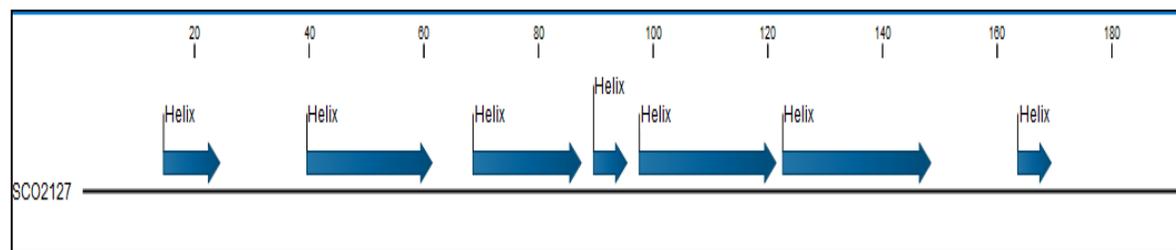


Secuencia de *sco2125* incluyendo su promotor.

El gen *sco2125* está anotado en la base de datos como una proteína cuya función no ha sido comprobada, pero presenta una similitud de 28% con una proteína de *C. elegans* cuya función es la reparación de DNA por estrés oxidativo.

```
CGATCACTTCCCGACTCCGGGAGCTGCGCTCACCCGAGGGGCGCGGGAACTGCGCGACCAGCCACGACGAACCGGCAGTC
GCCCAGGAACCCCGCGCCCCGACCCATGAGGCGCCTGATCATGCGTTCCCGTAAATGACGGCAATGCAACATCCCTCCCG
GCGCTCCCCAACTCCCGCACGGAACCCGACGGTTCCCGGGTCATCCCGCTCCTGAGCTACAACATCCGCTCACTGCGCGAC
GACACCGACGCCCCTCGCCCGCTCATCAAGGCCTGCGCGCCCCGACCTGGTCTCTCCAGGAGGCCCGCTTCTTCCGC
TGGCGCAAGAAGATCACCCGGCTCGCCGCGCCGGCGATCTGGTCTGCTCTCCGGCGCGGAACCCCGGCCCGCGG
CTGCTCTGCTCCCTGCGGGCCACCGTGGAGCGCACCGAGGACGTGCTGCTCCCGCTACCCCGCGGCACCGCCGGGG
ATCGCCGCGCGCTGGTCCGGATCGGGCGCGCCCGCATCGGCGTACTCAGCTCCCACCTGTCCCTGGACGCGGACGAGCGC
CACGAACAGGCCGGGTGCTCCTCGACCACCTGGCCGCCCTCGGCGTGAAGCACGCCGTGGCGGGCGGGACCTGAACGAG
CGCCCCGCGGCGCCGACCTTCCGGCGGCTCGGCGAAGGGCTGCGCGACTGCTGGACCOCGCGCCCTGGGGCGGCGAGTAC
ACCTTCCCCGCGACCGCCCCGACCGCCGGATCGACGCGGTCTTCGTCACCGAGGGCATCGAGGTGCTGGGCTGCGGAGTG
CCGTGCGGACTGGCCGGGGTGGCCGAGGACGACCTGAGGGCGGCCACGGACCACCTTCCGGTCTGACCGCCCTCCGCGTA
CCCGCAGCCGCTGA
```

Fuente: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_003888.3?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_003888.3?report=graph)





Low complexity region
This is a region of low compositional complexity, as detected by the <a href="#">SEG</a> program. The region starts at position <b>37</b> and ends at position <b>50. (14 aa):</b>
ASDADAWATACAED
Low complexity region
This is a region of low compositional complexity, as detected by the <a href="#">SEG</a> program. The region starts at position <b>94</b> and ends at position <b>115. (22 aa):</b>
QVAGPAAQQVVRQVVQQAKAAV
Low complexity region
This is a region of low compositional complexity, as detected by the <a href="#">SEG</a> program. The region starts at position <b>129</b> and ends at position <b>139. (11 aa):</b>
LAAAGGELLAA
Low complexity region
This is a region of low compositional complexity, as detected by the <a href="#">SEG</a> program. The region starts at position <b>168</b> and ends at position <b>183. (16 aa):</b>
DERGTDGRDEGDGGTG

Secuencias aminoácidos altamente conservadas en la proteína SCO2127. Estas regiones podrían ser dominios funcionales dentro de la proteína. Dichas regiones conservadas con potencial para ser estudiadas como posibles residuos catalíticos o funcionales de SCO2127. Este párrafo parece fuera de contexto. Revisa la redacción.

Recordemos que un dominio es la unidad estructural y funcional más pequeña capaz de evolucionar y plegarse de forma independiente dentro de la proteína a la que pertenece. En este sentido las regiones de baja complejidad identificadas por SMART (figura 38) a pesar de no encontrarse anotadas (dentro de las bases de datos) con una función determinada, podrían tener funciones específicas que contribuyen a la intervención de SCO2127 en los fenómenos de RCC descritos anteriormente.

Si se desea establecer regiones funcionales de la proteína estas secuencias son los candidatos ideales, que se pueden deletar o mutar en la familia de genes y seguramente se podrá modificar o afectar su actividad. Teniendo la CGM delta *sco2127* se pueden realizar experimentos para identificar estas mutaciones e identificar si estas regiones funcionales le confieren la actividad al gen.

Continuando con la indagación preliminar y la búsqueda de dominios se realizaron ensayos *in silico* con programas de bioinformática de predicción estructural como CATH (\*).

La base de datos CATH es una clasificación jerárquica de dominio de estructuras de proteínas en el banco de datos de proteínas. Las estructuras de proteínas se clasifican utilizando una combinación de procedimientos automatizados y manuales. Hay cuatro niveles principales en esta jerarquía: (CATH= Class, Architecture, Topology, Homologous superfamily)

Las estructuras de *clase* se agrupan según su composición de estructura secundaria (en su mayoría  $\alpha$ , mayoritariamente beta ( $\beta$ ), mixta  $\alpha / \beta$  beta o pocas estructuras secundarias).

Arquitectura: las estructuras se clasifican según su forma general según lo determinado por las orientaciones de las estructuras secundarias en el espacio 3D, pero ignora la conectividad entre ellas.

Topología (familia de plegado): las estructuras se agrupan en grupos de plegado en este nivel según la forma general y la conectividad de las estructuras secundarias.

Superfamilia homóloga: este nivel agrupa los dominios de proteínas que se cree que comparten un ancestro común y, por lo tanto, se pueden describir como homólogos.

Utilizando CATH se analizó la secuencia SCO2127. Como se puede observar en la figura 36 la región similar a la proteína Aldolasa se encuentra casi en el centro de la proteína SCO2127.

Search CATH

>SCO2127  
 MSEELPFEAEPFDEADAVDETRATGETRGAQQEPGASDADAWATAAEEDLEAEKARRRAAYGFFPFSAAEELRLVD  
 TVADKLSGLQSPILLGQVAGPAAQQVVRVUQQAKAAVEFVIERMFDLFDHLAAAGSELLAAYRSVAVQNGERRMTTGD  
 AFKDPSPFDLDERGTGDRDEGGDGTGPGRIDLD

Search CATH by protein sequence (FASTA)  
 Locate the position of structural domains on your protein sequence.  
 Examples: FASTA sequence ID: A0A0Q0Y989

Search by Text or ID Search by Sequence Search by Structure

Progress Matching Domains Matching FunFams

Match	Matching Regions	Evalue
<a href="#">3qfeB00</a>		2.8e+0
<a href="#">4aubE01</a>		3.7e+0
<a href="#">4astH01</a>		3.7e+0
<a href="#">3n6qB01</a>		3.7e+0
<a href="#">5H4A01</a>		8.2e+0

5 dominios CATH: En primer lugar identifica una proteína Clase 1 Aldolasa que contiene una región transmembranal. Esta es una proteína putativa de la que se obtuvo la estructura cristalina, la proteína pertenece al hongo terrestre patógeno [Coccidioides immitis](#).

En segundo lugar, se identifica una región similar a una proteína Aldo/Ceto reductasa (oxidoreductase NADP-dependente) cuya estructura presenta regiones transmembranales. La proteína de referencia se obtuvo de *E. coli*.

En tercer y cuarto lugar, otras Aldo/Ceto reductasa, cuya estructura presenta regiones transmembranales  $\alpha$  hélices y hojas beta Barril.

(\*) CATH es una clasificación de estructuras de proteínas descargadas del Banco de Datos de Proteínas. Agrupa los dominios de proteínas en superfamilias cuando hay pruebas suficientes de que se han separado de un ancestro común. CATH: un recurso ampliado para predecir la función de la proteína a través de la estructura y la secuencia. Dawson NL, Lewis TE, Das S, Lees JG, Lee D, Ashford P, Orengo CA, Sillitoe I. Nucleic Acids Res. 2017 Ene doi: 10.1093 / nar / gkw1098  
 Fuente: [http://www.cathdb.info/version/v4\\_2\\_0/domain/3qfeB00](http://www.cathdb.info/version/v4_2_0/domain/3qfeB00)

CATH Domain 5I44A01 1 keywords

Home / Superfamily 1.10.1370.40 / Domain 5I44A01

DOMAIN LINKS

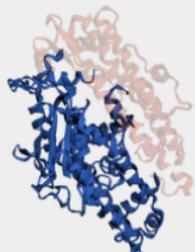
- Summary
- Structure
- Sequence
- Neighbourhood

### CATH Classification

Level	CATH Code	Description
1	1	Mainly Alpha
2	1.10	Orthogonal Bundle
3	1.10.1370	Neurolysin; domain 3
4	1.10.1370.40	

### Domain Context

View Domain in Chain ▾



### PDB Structure

PDB 5L44

External Links

- PDBSum
- Proteopedia

Method X-RAY DIFFRACTION

Organism

Primary Citation

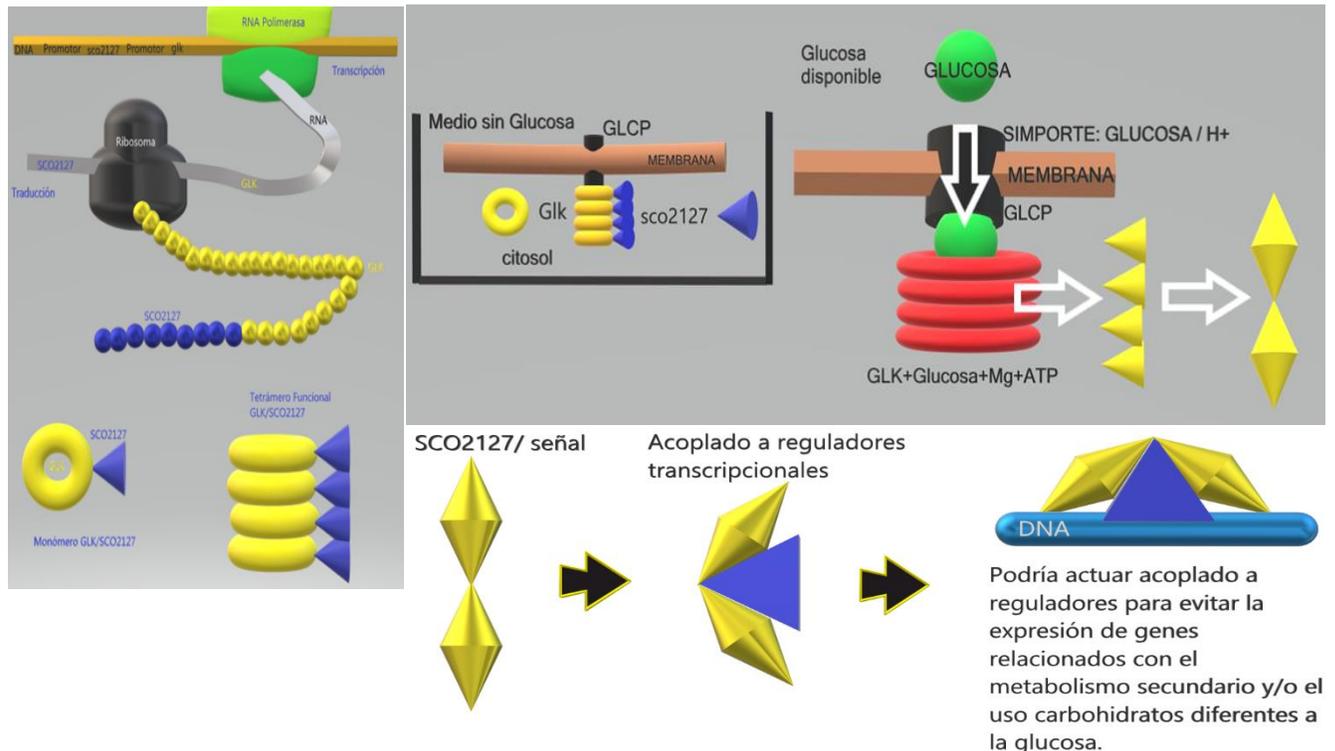
Crystal structure of a peptidyl-dipeptidase K-26-DCP from Actinomycete in complex with its natural inhibitor.  
Masuyer, G., Cozier, G.E., Kramer, G.J., Bachmann, B.O., Acharya, K.R.  
*FEBS J.*

Representación gráfica modelado de la proteína con similitud estructural con SCO2127 perteneciente a un Actinomiceto.

En quinto lugar, en una región cercana al extremo amino terminal de la proteína se encontró similitud con una peptidasa cuyo inhibidor pertenece a un actinomiceto. La información obtenida del sistema CATH afortunadamente cae dentro del Dominio Bacteria, lo que nos da mayor confianza en la probable función de las proteína.

## ANEXO B. Modelo de RCG propuesto para *S. coelicolor*.

En nuestra propuesta de mecanismo de regulación de la represión por glucosa, SCO2127 se transcribe junto a Glk y se asocia con esta proteína, hasta que el cambio conformacional provocado por la catálisis de la enzima provoca una reconfiguración liberando y activando a SCO2127, el cual funciona como una señal intracelular (un inductor) que asociado con otros reguladores provoca los fenómenos observados en la producción de antibióticos como la actinorrodina y la esporulación



Se ha reportado que Glk es una proteína homotetramérica, lo que nos permite pensar que SCO2127 también podría serlo ya que se transcriben y traducen (Angell 1992) prácticamente de manera simultánea. Kwakman y Postma (1994) reportaron que *glkA* sufre modificaciones postraduccionales que podrían explicarse si consideramos la idea de que Glk y SCO2127 forman una asociación y este último se libera y activa cuando Glk realiza su función enzimática mientras permanece unida a Glcp (Wezel v. et al. 2007). Glk al interactuar con glucosa, ATP y Mg<sup>+</sup>, se desprende de SCO2127 para que este se asocie con reguladores transcripcionales de producción de actinorrodina y esporulación; como los reportados por Yung-Hun et al. (2008) como SCO0608 un regulador de producción de actinorrodina y esporulación.

Existe por otro lado la posibilidad de que SCO2127 funcione directamente sobre proteínas y secuencias de DNA, siendo un regulador transcripcional por si mismo, aunque, la proteína no presentó regiones con homología a estructuras conocidas para esta función, esto podría deberse a lo poco que se sabe de estas proteínas reguladoras que se encuentran presentes en estos microorganismos.

En apoyo a esta hipótesis, Angell et al. (1992) describen que estos productos se transcriben prácticamente de manera simultánea; Kwakman y Postma (1994) reportaron que Glk sufre modificaciones postraduccionales; y se sabe que Glk realiza su función enzimática mientras permanece unida a Glcp (Wezel v. et al. 2007). Por otro lado, en este trabajo encontramos que la producción de actinorrodina y la esporulación en la CGM  $\Delta sco2127$  presentan insensibilidad a glucosa lo que parece respaldar la hipótesis de que SCO2127 es una proteína señalizadora de presencia de glucosa intracelular.

## ANEXO C. Medios de cultivo y soluciones

### LB Líquido

Composición	g/litro	Preparación
<b>Difco Bacto triptona</b>	10	Disolver en 800 ml de agua, agitar suavemente hasta homogeneizar, ajustar el pH, aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi). Para medio sólido agregar también 12g de agar por litro.
<b>Extracto de levadura</b>	5	
<b>Cloruro de sodio</b>	5	
<b>Glucosa</b>	1	

### YMG Líquido (Yeast Malt Extract Broth Merk Catalog No: Y3752-500G)

Composición	g/litro	Preparación
<b>Glucosa</b>	10	Disolver 21 gramos en 800 ml de agua, agitar suavemente hasta homogeneizar, ajustar el pH, aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi).
<b>Extracto Malta</b>	3	
<b>Peptona</b>	5	
<b>Extracto Levadura</b>	3	

### YMG Medio Sólido (Yeast Malt Extract Broth Merk Catalog No: Y3752-500G)

Composición	g/litro	Preparación
<b>Glucosa</b>	10	Agregar 21 gramos en 500 ml de agua, hervir mientras se agita suavemente hasta homogeneizar, ajustar el pH , luego aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi).
<b>Extracto Malta</b>	3	
<b>Peptona</b>	5	
<b>Extracto Levadura</b>	3	
<b>Agar</b>	20	

TSB: BD Tryptic Soy Broth SIGMA-ALDRICH (medio de digerido de soja y caseína) no animal.

Composición	g/litro	Preparación
<b>BactoTryptone (digerido pancreático de caseína)</b>	17	Agregar 30 gramos en 500 ml de agua, agitar suavemente hasta homogeneizar, ajustar el pH , luego aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi). Los digeridos enzimáticos de caseína y harina de soja proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas. La glucosa (dextrosa) es una fuente de energía. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico. El fosfato potásico dibásico actúa como tampón para controlar el pH.
<b>BactoSoytone (digerido péptico de harina de soja)</b>	3	
<b>Glucosa</b>	2.5	
<b>Cloruro sódico</b>	5	
<b>Fosfato dipotásico de hidrógeno</b>	25	

### Soluciones

Solución Salina Isotónica (SSI)

Composición	g/litro	Preparación
NaCl	8.5	Agregar 8.5 gramos en 500 ml de agua, agita suavemente hasta homogeneizar, aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave por 20 minutos mínimo a 121°C (15psi).

Buffer P (Okanishi et al. 1974, Hopwood y Wright 1978, Kieser 2000).

Composición	g/litro	Preparación
<b>Sacarosa</b>	103	Distribuir en alícuotas de 80 ml y esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi).
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0.25	
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	2.02	Antes de usar agregar a cada alícuota 1mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%), 10mL CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (3.68%) y 10 mL Buffer TES (5.73% pH 7.2) Esterilizados por ultrafiltración.
<b>Solución de elementos traza</b>	2 mL	
<b>Agua destilada</b>	800 ml	

Buffer P (Okanishi et al. 1974, Hopwood y Wright 1978, Kieser 2000).

Composición	g/litro	Preparación
<b>Sacarosa</b>	103	Distribuir en alícuotas de 80 ml y esterilizar en autoclave por 15 minutos mínimo a 121°C (15psi).
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0.25	
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	2.02	Antes de usar agregar a cada alícuota: 1mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5%), 10mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (3.68%) y 10 mL Buffer TES (5.73% pH 7.2) Esterilizados por ultrafiltración.
<b>Solución de elementos traza</b>	2 mL	
<b>Diluir con Agua destilada y llevar a:</b>	800 ml	La solución de elementos traza contiene por cada litro: 40 mg de ZnCl <sub>2</sub> , 200mg de FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 10 mg de CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 mg de MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 10 mg de Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O y 10 mg de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O.

#### Solución A

Composición	50 mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA pH=8,0	<b>Extracción de plásmidos. Mini y Midiprep</b>
<b>Para Gramnegativos:</b>	25 mM Tris (pH = 8), 50 mM glucosa, 1 mM EDTA, 5 mg/mL lisozima	Solución de lisis (Método de Kado y Liu): 3% SDS, 50mM Tris (pH =12,6). Para 100 mL: 3 g SDS + 0,605 g Tris + 98,4 mL de H <sub>2</sub> O. Añadir 1,6 mL de 2 N NaOH. No es necesario ajustar el pH utilizando estos componentes. Esta solución debe ser siempre preparada en el momento.
<b>Para Gram positivos:</b>	10 mM Tris (pH = 8), 1 mM EDTA suplementado de 25% (peso/volumen) sacarosa y 10 mg/mL de lisozima.	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico: (1:2:1) Para 100 mL: 50 g de cristales de fenol, 48mL de cloroformo, 2 mL de alcohol isoamílico, 10mL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH =8,0). Almacenar en botella topacio a 4°C.  Ribonucleasa (RNAsa-A, Sigma Aldrich Cat# 5503). Preparar una solución stock de 10mg/mL en agua destilada hirviendo durante 15 min para eliminar cualquier resto de actividad DNAsa. Dejar enfriar a temperatura ambiente, alícuotar y congelar.

### Solución B

Composición	<b>Solución de lisis</b>	<b>Extracción de plásmidos. Mini y Maxiprep</b>
	1 % SDS, 0.2 NaOH	Preparada en el momento de un stock 10N.

### Solución C

Composición	Solución de precipitación	<b>Extracción de plásmidos. Mini y Maxiprep</b>
<b>5 M acetato potásico</b>	60 mL	Solución es 5 M respecto al acetato y 3 M respecto al potasio.
<b>ácido acético glacial</b>	11,5 mL	
<b>agua destilada</b>	28,5 mL	