



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA SÍNTESIS DE FOSFATIDIL INOSITOL
MANÓSIDOS EN *Streptomyces coelicolor*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. ANGÉLICA PALACIOS ADALID

TUTOR PRINCIPAL
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP
Centro de Ciencias Genómicas

DRA. MARÍA ELENA FLORES CARRASCO
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, enero de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres, por todo

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto **No. 220020** del Fondo de Ciencia Básica CB2013 del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Durante la realización del proyecto fui beneficiada con la beca para estudiantes de posgrado del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de registro **815711**

Agradecimientos al Programa Institucional para la Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Bacterias y Hongos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Luis Servín González, por permitirme trabajar en su laboratorio y por tantas enseñanzas.

A la Dra. María Elena Flores y al Dr. Christian Sohlenkamp, miembros del comité tutor, por sus aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Mario Sandoval Calderón por transmitirme sus conocimientos sobre extracción de lípidos y Cromatografía de Capa Fina y por resolver mis dudas técnicas.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su apoyo técnico y consejos en el laboratorio.

A la Dra. Gloria Soberón y sus alumnos por sus aportaciones durante los seminarios de grupo.

Al Dr. Roberto Arreguín y al Dr. Esteban López Sampedro por su ayuda en la extracción de lípidos, así como el préstamo de Rotavapor y análisis de los extractos.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular a cargo de la Dra. Laura Ongay Larios y de la Biól. Guadalupe Códiz Huerta, por los servicios de secuenciación para este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Laura Camarena, Dra. Soledad Funes, Dra. Gloria Soberón Dr. Sergio Sánchez y Dr. Carlos Muñoz por sus observaciones a este manuscrito.

Al Programa Institucional para la Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Bacterias y Hongos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

ABREVIATURAS

Ac₁PIM₁	Acil fosfatidilinositol monomanósido
Ac₁PIM₂	Acil fosfatidilinositol dimanósido
CDP-DAG	Difosfato de citidina-diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GDP	Guanosín difosfato
GDP-Man	Guanosín difosfato manosa
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
PatA	Fosfatidilinositol aciltransferasa
PI	Fosfatidil- <i>mio</i> -inositol o fosfatidilinositol
PIM₁	Fosfatidilinositol monomanósido
PIM₂	Fosfatidilinositol dimanósido
PimA	Fosfatidilinositol manosiltransferasa
PimB	Fosfatidilinositol monomanósido manosiltransferasa
PimC	Fosfatidilinositol dimanósido manosiltransferasa
PimE	Fosfatidilinositol tetramanósido manosiltransferasa
PIMs	Manósidos de fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol 1-fosfato
PIPS	Fosfatidilinositol 1-fosfato sintasa
Pmt	Manosiltransferasa de proteínas
PPM	Poliprenol fosfato β-D-manosa
TLC	Cromatografía de capa fina

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Características generales del género <i>Streptomyces</i>	3
2.2 Manoconjugados en <i>Streptomyces</i> y <i>Mycobacterium</i>	4
2.2.1 Proteínas manosiladas	4
2.2.2 Fosfatidil Inositol Manósidos (PIMs)	6
2.2.2.1. Biosíntesis	8
3. Antecedentes	11
4. Justificación	15
5. Hipótesis	15
6. Objetivos	16
General:.....	16
Particulares:	16
7. Materiales y métodos	16
7.1 Cepas.....	16
7.2 Oligonucleótidos utilizados	17
7.3 Plásmidos utilizados	18
7.4 Condiciones de crecimiento bacteriano	19
7.5 Construcción de cepas	19
7.6 Extracción de lípidos	21
7.7 Cromatografía de capa fina	21
7.8. Clonación del gen SCO1525 y complementación de la mutante IB101.....	21
7.9 Sobreexpresión del gen SCO1525	22
7.10 Ensayo de sensibilidad a antibióticos	22
8. Resultados	23
8.1 El gen SCO1525 no es esencial en <i>S. coelicolor</i>	23
8.2 La cepa mutante del gen SCO1525 es deficiente en la síntesis de PIMs.....	23
8.3 La sobreexpresión de <i>pimA</i> intensifica las señales de los PIMs en la placa de TLC.....	24
8.4 La cepa IB101 muestra un retraso en el desarrollo morfológico y una producción adelantada de actinorrodina	25
8.5 La cepa deficiente en la síntesis de PIMs y la doble mutante deficiente en la síntesis de PIMs y proteínas manosiladas son hipersensibles a antibióticos.....	26

8.6 Las cepas deficientes en la O-manosilación de proteínas y las mutantes en PimE en S. coelicolor no presentan un cambio en su perfil de PIMs.....	30
9. Discusión.....	31
10. Conclusión.....	35
11. Perspectivas.....	36
12. Bibliografía.....	37

1. Resumen

Los fosfatidil inositol manósidos (PIMs por sus siglas en inglés) comprenden una familia de glicolípidos que contienen un núcleo de fosfatidil inositol (PI) el cual puede estar decorado con 1 a 6 residuos de manosa y presentar diferentes grados de acilación. Estos son los fosfolípidos más abundantes en la envoltura celular de las micobacterias y se encuentran tanto en la membrana interna como en la membrana externa, en donde cumplen funciones estructurales y funcionan como precursores para la síntesis de lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM), dos lipoglicanos involucrados en la interacción patógeno-hospedero.

Las enzimas involucradas en la vía biosintética de los PIMs que se han caracterizado hasta el momento son la sintasa de fosfatidil inositol fosfato (PIP sintasa), las manosiltransferasas PimA y PimB, responsables de la síntesis de PIM₁ y PIM₂ respectivamente, la aciltransferasa PatA que transfiere una cadena de palmitoil a PIM₁ y PIM₂ y finalmente la manosiltransferasa PimE que transfiere un residuo de manosa a partir de poliprenol fosfato manosa (PPM) hacia PIM₄. Es importante destacar que PimE también está involucrada en la vía de *O*-manosilación de proteínas. Todas estas proteínas (a excepción de PimE) son esenciales para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*.

El genoma de *Streptomyces coelicolor* presenta un homólogo cercano a la fosfatidil inositol fosfato sintasa (PIP sintasa) de *M. tuberculosis* con el cual comparte un 52% de identidad, que además presenta una gran conservación del contexto genómico, aparentemente formando parte de un operón junto con los genes ortólogos de la aciltransferasa PatA (SCO1526) y de la manosiltransferasa PimA (SCO1525). *S. coelicolor* también posee homólogos de PimE (SCO2335 y SCO3902). La presencia de estos genes predice que *S. coelicolor* puede sintetizar PIM₁, PIM₂ y sus formas aciladas, mismos que ya se han identificado en extractos lipídicos de esta especie.

Con el propósito de determinar si el gen SCO1525 es esencial para *S. coelicolor* así como el papel que desempeña en la síntesis de PIMs, se obtuvo una cepa mutante nula de este gen y se evaluó su fenotipo. Se encontró que dicha cepa mutante fue incapaz de sintetizar PIMs, y presentó un ligero retraso en su desarrollo morfológico, así como una mayor sensibilidad a antibióticos

que actúan a nivel de pared celular. Lo anterior implica que, a diferencia de lo que ocurre en las micobacterias, la síntesis de PIMs no es esencial en *Streptomyces*.

Además, se intentó determinar si PIMs polares, similares a aquellos encontrados en *Mycobacterium* (PIM3, PIM4, PIM5, PIM6 y sus formas aciladas) se encuentran en *S. coelicolor*. Sin embargo, no se pudieron detectar en las Cromatografías de Capa Fina (TLC). Finalmente, se observó que las cepas mutantes en los genes SCO2335 y SCO3902 tienen un patrón de PIMs idéntico a la cepa silvestre en las TLCs, lo cual indica que no tienen un papel en la síntesis de PIMs polares.

2. Introducción

2.1 Características generales de *Streptomyces coelicolor*

Los miembros del género *Streptomyces* son bacterias Gram positivas con alto contenido de G+C en su DNA, pertenecen al orden taxonómico Actinomycetales y se caracterizan por habitar el suelo y presentar una compleja diferenciación morfológica (Flärdh & Buttner, 2009). Poseen un metabolismo secundario complejo derivado de su estilo de vida saprótrofo consecuencia del ambiente que colonizan. Por tales motivos, producen una gran variedad de compuestos biológicamente activos, tales como antibióticos para defensa contra otras bacterias (Allen, 2010) y enzimas hidrolasas que degradan carbohidratos complejos, proteínas y lípidos, entre otros nutrientes; estas características les confieren gran importancia para la industria biotecnológica, así como para su ecosistema (Hopwood, 2007).

El ciclo de vida de *Streptomyces* inicia con la espora, que al germinar da lugar a uno o varios tubos germinales que crecen apicalmente y ramifican para constituir el micelio vegetativo; las hifas contienen varias copias del genoma en compartimentos sinciciales; eventualmente, debido a señales ambientales, se da la formación del micelio aéreo que coincide con la producción de metabolitos secundarios. Finalmente, las hifas aéreas septan sincrónicamente (Figura 1) para dar lugar a compartimentos unigenómicos ovales que al madurar darán lugar a esporas (Flärdh & Buttner, 2009).

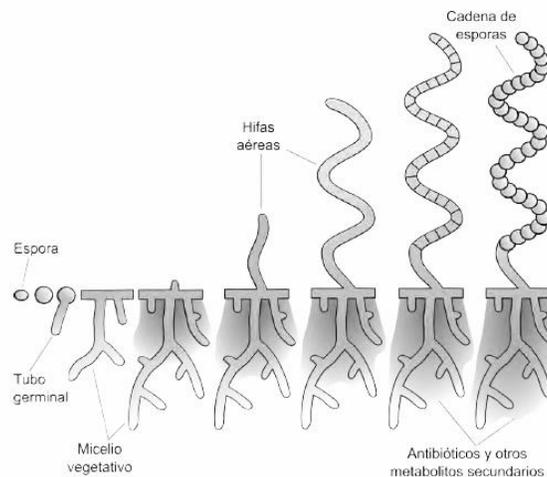


Figura 1. Etapas de diferenciación morfológica de *Streptomyces coelicolor* (Modificado de Flärdh & Buttner, 2009).

Dentro del grupo taxonómico de los estreptomicetos, *Streptomyces coelicolor* A3(2) es el miembro mejor caracterizado del género, tanto a nivel molecular como a nivel genético; esta especie cuenta con un genoma de 8,667,507 pares de bases, con un contenido de guanina y citosina en el DNA del 72%. Su cromosoma es lineal y contiene una región central con la mayoría de los genes esenciales para el mantenimiento del organismo o “housekeeping”, que es flanqueada por regiones menos conservadas e inestables; al hacer la comparación del genoma de *S. coelicolor* con los de otros actinomicetos, tales como *Mycobacterium tuberculosis* o *Corynebacterium glutamicum*, se observa que existe un alto grado de sintenia en la región cromosómica central, en donde se encuentran principalmente los genes asociados con el metabolismo primario, por lo que se sugiere que los genes localizados en los brazos cromosómicos de *S. coelicolor* fueron adquiridos mayoritariamente por transferencia horizontal, así como por eventos de recombinación. En estas regiones se localizan fundamentalmente genes para la adaptación a diversas condiciones ambientales (Bentley *et al.*, 2002).

Adicionalmente a la producción de metabolitos secundarios variados, que les confieren importancia biotecnológica e industrial, las especies del género *Streptomyces* se han utilizado para expresar proteínas heterólogas tanto de origen procarionte como eucarionte. Una particularidad es que poseen la capacidad de modificación postraduccional de proteínas por glicosilación, específicamente por *O*-manosilación (Espitia *et al.*, 2010).

2.2 Manoconjugados en *Streptomyces* y *Mycobacterium*

2.2.1 Proteínas manosiladas

Las proteínas *O*-manosiladas son particularmente importantes en las especies patógenas de *Mycobacterium*, ya que algunas tienen un papel inmuno-modulador. Éstas se han encontrado con base en el ensayo de unión a la lectina Concanavalina A (Espitia & Mancilla, 1989; González-Zamorano *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013) o mediante análisis bioinformáticos (Steentoft, *et al.*, 2013), sin embargo, sólo a 3 de éstas se les ha caracterizado detalladamente la estructura de su parte glicosídica; una de ellas es la proteína Apa (proteína secretada de *M. tuberculosis*) también conocida como antígeno de 45/47 kDa, la cual se encuentra modificada en residuos de treonina con una cadena de oligomanósidos lineal de 1 a 3 moléculas de manosa en enlaces α -(1-2) (Dobos *et al.*, 1995). Vale la pena notar que esta proteína puede ser expresada de manera

Hasta hace poco la única proteína manosilada caracterizada de *S. coelicolor* era PstS (SCO4142) la cual forma parte de un operón de transporte de fosfatos y tiene un homólogo en *M. tuberculosis*; otra glicoproteína es el receptor de fago ϕ C31 (un actinofago que infecta a varias especies del género *Streptomyces*), ya que cepas mutantes en los genes SCO1423 o SCO3154 (codificantes para Ppm1 y Pmt, respectivamente) son resistentes a la infección del fago, lo cual nos indica que dicho receptor debe estar manosilado para realizar su función. Sin embargo, el gen codificante para dicho receptor no se ha identificado aún (Cowlshaw & Smith, 2001; 2002). Recientemente se identificó, mediante un análisis proteómico, a un grupo de 37 nuevas glicoproteínas de membrana, que incluye varias proteínas involucradas en el mantenimiento de la pared celular (Keenan *et al.*, 2019).

La glicosilación de proteínas en *Streptomyces* se da de manera homóloga a como se realiza en *Mycobacterium*, salvo por la proteína responsable de la elongación de la cadena de oligomanósidos (PimE), ya que el gen más parecido a PimE de *M. tuberculosis* (*Rv1159*) en *S. coelicolor* es SCO2335 (27% de similitud, valor $e= 3e^{-11}$), pero, una mutante nula en este gen presenta la misma sensibilidad al fago ϕ C31 (Tavares-Cornejo, datos no publicados). Un análisis bioinformático arrojó al gen SCO3902 (27% de similitud, valor $e= 0.27$), como otro posible candidato, ya que al obtener una mutante nula en este gen se encontró que su sensibilidad al fago ϕ C31 era 10 veces menor que la de la cepa silvestre y que el patrón de glicosilación (analizado mediante MALDI-TOF) de la glicoproteína Apa expresada en esta cepa, mostraba sólo una molécula de manosa en cada sitio de glicosilación, lo cual muestra que la proteína codificada por el gen SCO3902 es la responsable de la elongación de cadenas de manosa de las proteínas en *S. coelicolor* (Arroyo-Perez, 2017).

2.2.2 Fosfatidil Inositol Manósidos (PIMs)

Tanto el fosfatidil inositol (PI) como sus derivados fosforilados son moléculas ubicuas en organismos eucariontes por su rol en la señalización celular, sin embargo, en bacterias son moléculas poco comunes, siendo los actinomicetos uno de los pocos clados que sintetizan PI y además a sus derivados manosilados (PIMs).

Los PIMs comprenden una familia de glicolípidos cuyo núcleo consiste en una molécula de PI que puede presentar de 1 a 6 residuos de manosa y diferentes grados de acilación (hasta 2 cadenas

de acilo adicionales a las del PI), son los fosfolípidos más distintivos y abundantes en la compleja envoltura celular de las micobacterias, y además proveen el anclaje lipídico para el lipomanano y lipoarabinomanano, dos lipoglicanos con actividad inmuno-moduladora en las especies patógenas (Briken *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2011).

Las formas aciladas de PIM₂ y PIM₆ son las más abundantes tanto en *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG), *M. tuberculosis* H37Rv, *M. smegmatis* 607 y *M. smegmatis* mc² (Gilleron *et al.*, 2001). La forma tetra-acilada de PIM₂ (Ac₂PIM₂) se ha encontrado que representa el 42% del total de lípidos extraídos de la capa interna de la membrana interna de las micobacterias y también se pueden encontrar en la membrana externa y asociadas con la pared celular (Figura 3) (Bansal & Nikaido, 2014).

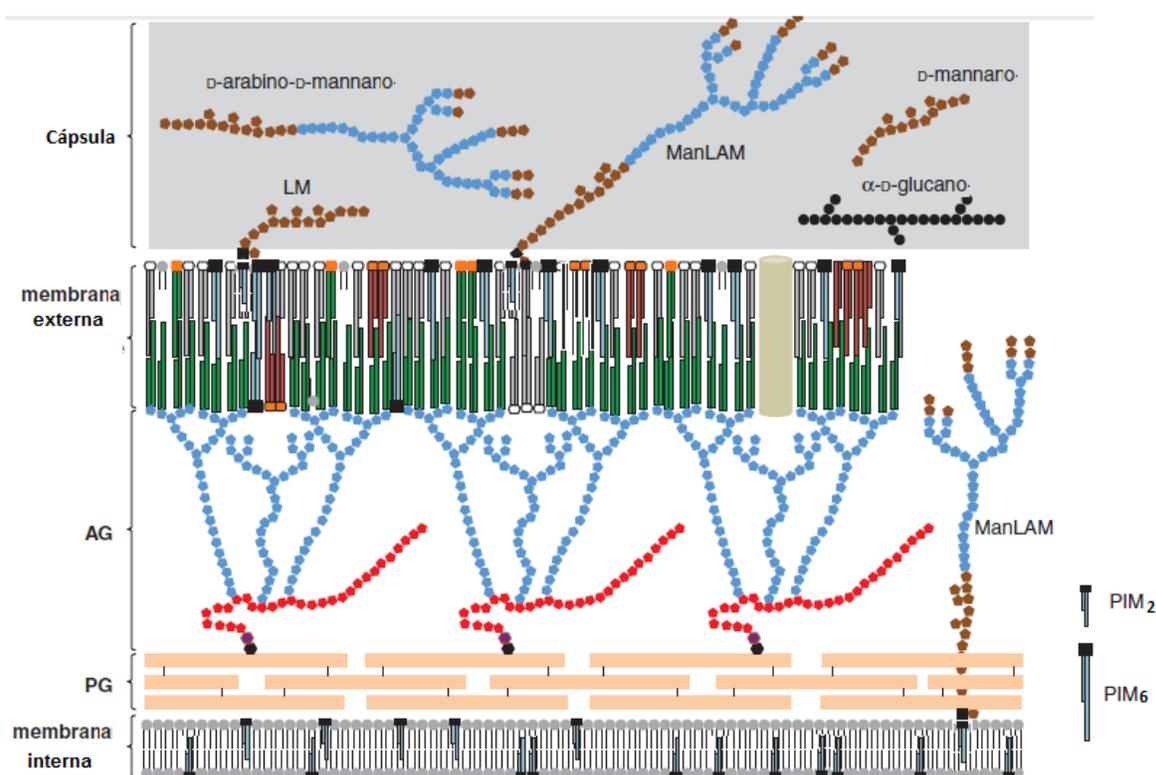


Figura 3. Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis* con sus cuatro principales componentes: membrana interna, complejo peptidoglicano-arabinogalactano (PG-AG), membrana externa y cápsula. Puntos azules representan residuos de arabinosa, rojos: galactosa, cafés: manosa. Modificado de Jackson (2014).

La estructura química de los PIMs se ha estudiado ampliamente desde su descubrimiento en 1964 por Ballou y colaboradores, quienes descubrieron las especies PIM₁ hasta PIM₅, en 1975 se descubrió PIM₆ y en 1992 se estableció la estructura de su parte glicosídica que consiste en el

primer residuo de manosa en la posición O-2 del anillo de inositol con un enlace α -(1-2) y una cadena de 5 manosas que parten de la posición O-6 del anillo de inositol con los enlaces de tipo α -(1-6), α -(1-6), α -(1-6), α -(1-2), α -(1-2). En cuanto a las cadenas de acilo adicionales a las del PI, se sabe que la primera se encuentra en la posición 6 de la manosa unida a la posición O-2 del inositol y la segunda está en el C-3 del anillo de inositol. Las cadenas de acilo pueden variar en su posición y número de carbonos (C16:0, C18:0, C18:1 y C19) de tal forma que dan heterogeneidad a los PIMs; por ejemplo, la familia de PIM₆ puede presentar de 10 a 12 formas (Hsu *et al.*, 2007).

A pesar de que se han hecho grandes avances en la elucidación de la estructura química de los PIMs aún hay algunos huecos en el conocimiento de su ruta biosintética.

2.2.2.1 Biosíntesis

La biosíntesis de PIMs se lleva a cabo por la adición secuencial de residuos de manosa al PI y el modelo actualmente aceptado indica que se lleva a cabo a ambos lados de la membrana interna (plasmática) en micobacterias (Sancho-Vaello *et al.*, 2016).

El proceso inicia en el lado citoplásmico con la síntesis de PI, que en actinomicetos y algunas arqueas se lleva a cabo en dos pasos, primero, el CDP-DAG es usado junto con el mio-inositol-1-fosfato para sintetizar fosfatidilinositol-fosfato (PIP) por la acción de la enzima PIP sintasa. Posteriormente el PIP es desfosforilado por una fosfatasa para dar lugar al PI (Morii *et al.*, 2013). La PIPS en *Mycobacterium tuberculosis* es codificada por el gen *Rv2612c* y ensayos en *M. smegmatis* muestran que es un gen homólogo a *Rv2612c* es esencial para su crecimiento (Jackson *et al.*, 2000). En cuanto al gen codificante para la PIP fosfatasa, no se ha identificado aún.

La vía biosintética de los PIMs propiamente dicha, inicia con la participación de dos manosiltransferasas que utilizan GDP-Man como sustrato donador. La primera es PimA que cataliza la adición de un residuo de Man a la posición 2 del anillo de mio-inositol del PI, dando lugar a PI-monomanósido o PIM₁; esta enzima es codificada por el gen *Rv2610c* en *M. tuberculosis* H37Rv y *MSMEG_2935* en *M. smegmatis* mc2155 y se ha encontrado que es esencial para el crecimiento de ambas cepas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Korduláková *et al.*, 2001; Boldrin *et al.*, 2014). La segunda manosiltransferasa es PimB (*Rv2188c*, *MSMEG_4253*) que cataliza la adición de un residuo de Man a la posición 6 del anillo de mio-inositol de PIM₁, dando

lugar a PI-dimanoído o PIM₂; se ha demostrado que esta enzima es esencial para *M. smegmatis* (Guerin *et al.*, 2009).

Tanto PIM₁ como PIM₂ pueden ser acilados para dar lugar a AcPIM₁ o AcPIM₂; esta acción se lleva a cabo por la aciltransferasa PatA (*Rv2611c*, *MSMEG_2934*) que transfiere un palmitato a partir de palmitoil-CoA a la posición 6 del residuo de manosa que está en la posición 2 del anillo de inositol (la manosa añadida por PimA). El gen de PatA es esencial para *M. tuberculosis* y la mutante de éste en *M. smegmatis* presenta severos problemas de crecimiento (Korduláková *et al.*, 2003). A pesar de que PatA puede actuar antes o después de PimB, ensayos *in vitro* evidencian que la ruta preferida para la síntesis de AcPIM₂ es PI→PIM₁→PIM₂→AcPIM₂ (Tersa *et al.*, 2018). La segunda acilación para dar lugar a Ac₂PIM₂ se da en la posición 3 del anillo de inositol, sin embargo, la aciltransferasa que lleva a cabo esta acción no se ha identificado (Figura 4).

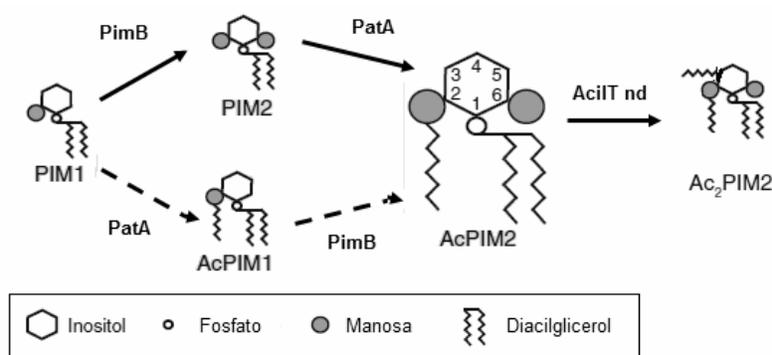


Figura 4. Acilación de PIMs. PatA cataliza la acilación en la manosa colocada en la posición 2 del anillo de inositol y puede actuar antes o después de PimB, sin embargo, la ruta favorecida es: PIM₁→PIM₂→Ac₁PIM₂. La aciltransferasa que cataliza la segunda acilación en la posición 3 del anillo de inositol no se ha identificado aún (AcilT nd). Modificado de Morita *et al.*, (2011).

La siguiente manosiltransferasa en la vía biosintética es PimC; ésta se identificó en la cepa *M. tuberculosis* CDC1551 y cataliza la adición de un residuo de manosa a partir de GDP-Man hacia la manosa añadida por PimB (aquella en la posición O-6 del anillo de inositol) en una orientación α-(1-6), de tal manera que elonga el glicolípidos a AcPIM₃. Sin embargo, esta enzima codificada por el gen *MT1800* sólo presenta ortólogos en el 22% de los aislados clínicos (Kremer *et al.*, 2002), por lo cual se propone que debe existir una ruta alterna con otra manosiltransferasa desconocida en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* que carecen de PimC.

Hasta este punto todas las manosiaciones se han llevado a cabo en el lado citoplásmico de la membrana plasmática, con la participación de PimA y PimB pertenecientes a la familia de glicosiltransferasas GT-B, clasificadas así por su configuración tridimensional, ya que son proteínas anfitrópicas periféricas con un plegamiento de Rossmann, que a su vez se clasifican en la familia GT-4 por utilizar GDP-Man como sustrato donador (Sancho-Vaello *et al.*, 2016). De manera contrastante, existen las glicosiltransferasas de la familia GT-C que son proteínas integrales politópicas que reconocen a un lípido-fosfo-azucarado como sustrato donador y ese es el caso de la siguiente manosiiltransferasa en la ruta biosintética.

Se sugiere que AcPIM₃ se transloca a través de la membrana (aunque el mecanismo exacto aún se desconoce), de tal forma que su porción glicosídica queda hacia el lado periplásmico, en donde se le añade el 4° residuo de manosa con un enlace α -(1-6) por una manosiiltransferasa que aún queda por identificar (PimD). AcPIM₄ es el punto de ramificación de la vía hacia AcPIM₆ o hacia LM/LAM con la ayuda de la lipoproteína LpqW, la cual se cree que une al glicolípido para dirigirlo hacia la vía de síntesis de LM/LAM (Kovacevic *et al.*, 2006; Crellin *et al.*, 2008). PimE (Rv1159) es la única glicosiltransferasa GT-C identificada en la ruta biosintética de los PIMs y es responsable de la adición del 5° residuo de manosa con una orientación α -(1-2) utilizando poliprenol-fosfato-manosa (PPM) como sustrato donador (Figura 5), la mutante de PimE en *M. smegmatis* mc2155 no presenta pérdida de viabilidad o crecimiento, pero muestra cambios en la hidrofobicidad de su envoltura celular (Morita *et al.*, 2006). Finalmente se añade el sexto residuo de manosa con una orientación α -(1-2) por una manosiiltransferasa que tampoco se ha identificado aún.

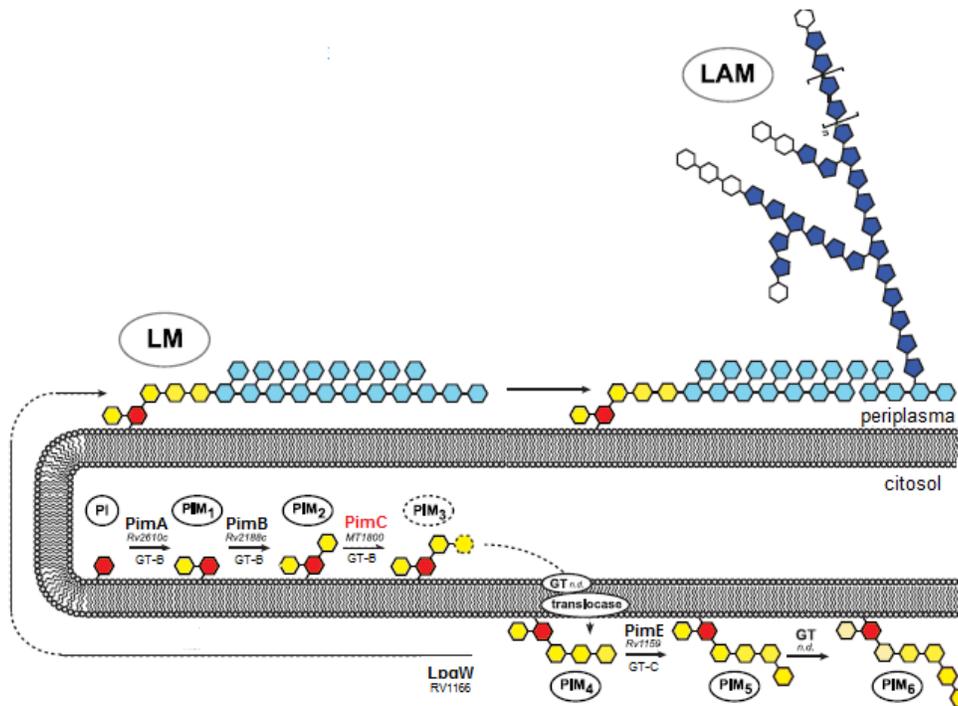


Figura 5. Biosíntesis de PIMs. Esquema que muestra las manosiltransferasas involucradas en la vía y los productos obtenidos. PimA y PimB catalizan las primeras dos manosilaciones consecutivas del lado citoplásmico de la membrana plasmática, la identidad de la tercer y cuarta manosiltransferasa aún está en debate ya que PimC no se encuentra en todas las micobacterias. PIM4 es el punto de divergencia de la vía hacia la síntesis de LM/LAM con la participación de la proteína LpqW. PimE añade el 5º residuo de manosa del lado periplásmico de la membrana y la identidad de la sexta manosiltransferasa aún está por descubrirse Modificado de Guerin *et al.*, (2010).

3. Antecedentes

El genoma de *S. coelicolor* presenta un homólogo cercano a PimA de *M. tuberculosis* con el cual comparte un 54% de identidad y presenta una gran conservación del contexto genómico, aparentemente formando parte de un operón junto con el gen homólogo a la aciltransferasa PatA (SCO1526, 49% de identidad) y con el gen homólogo a la PIP sintasa (SCO1527, 43% de identidad) (Zhang *et al.*, 2012). *S. coelicolor* también posee homólogos a PimB (SCO2132) y a PimE (SCO2335 y SCO3902) localizados en otro punto del cromosoma. La presencia de estos genes predice que *S. coelicolor* puede sintetizar PIM₁, PIM₂ y sus formas aciladas, mismos que ya se han identificado en extractos lipídicos de esta especie (Figura 6A,B) (Sandoval-Calderón *et al.*, 2017). Además, se conocen las condiciones de crecimiento en el que los PIMs son más

abundantes (Figura 6C), las cuales son en medio sólido MS (manitol-soya) en cultivos de 8 días en los que el micelio se encuentra esporulado (Sandoval-Calderón *et al.*, 2015).

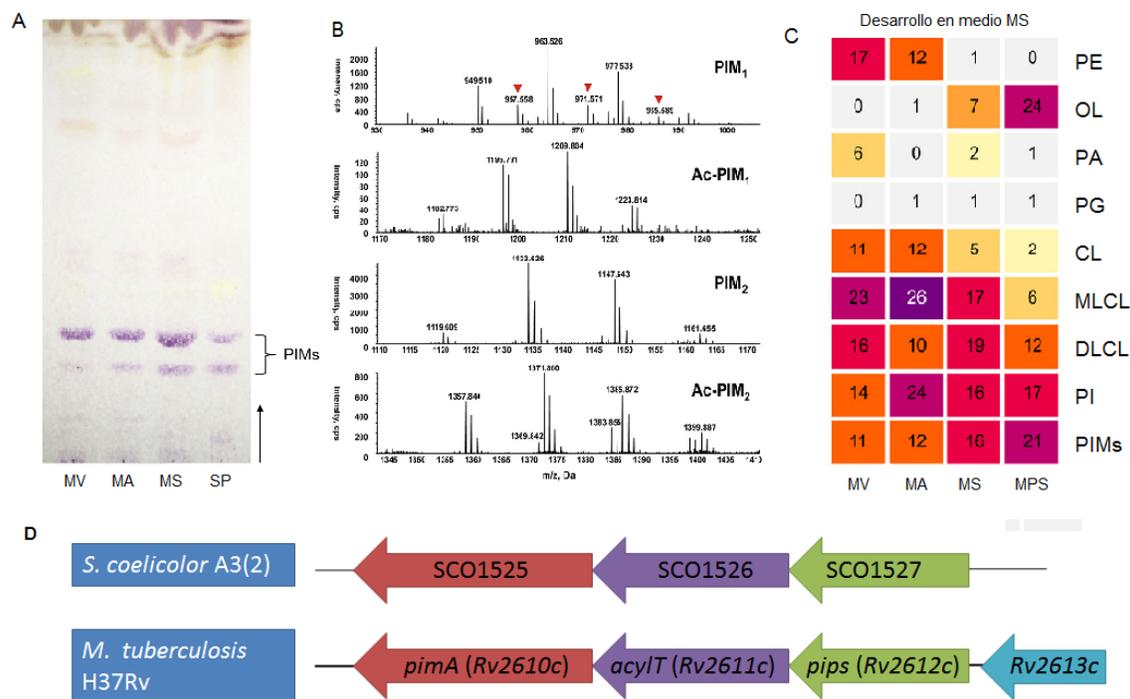


Figura 6. Presencia de PIMs en *S. coelicolor*. **A.** Cromatografía de capa fina teñida con solución de orcinol mostrando el perfil de PIMs de *S. coelicolor* crecido en medio Manitol-Soya, las muestras fueron tomadas en diferentes días para obtener micelio vegetativo (MV), micelio aéreo (MA), micelio iniciando esporulación (MS), preparación de esporas (SP) o micelio plenamente esporulado (MPS). **B.** Espectros de masas de las muestras mostradas en el primer inciso. **C.** Mapa de calor de los lípidos polares de *S. coelicolor* durante su desarrollo en medio sólido Manitol-Soya, los números dentro de los recuadros indican el porcentaje con respecto al total de lípidos extraídos. PE, fosfatidiletanolamina, OL, lípidos de ornitina, PA, ácido fosfático, PG, fosfatidilglicerol, CL, cardiolipina, MLCL, monoliso de cardiolipina, DLCL, diliso de cardiolipina, PI, fosfatidilinositol, PIMs, fosfatidilinositol manósidos. Modificado de Sandoval-Calderón *et al.* (2015; 2017). **D.** Organización genética de la región cromosómica del operón putativo conformado por los genes *pimA*, *acyIT* y *pips* en *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*.

Por otro lado, el gen *inoA* que codifica para la *mio*-inositol 1-fosfato sintasa es esencial en *S. coelicolor*, la mutante condicional de este gen además de ser auxótrofa para inositol, presenta defectos en la diferenciación morfológica, quedando arrestada en fases intermedias del desarrollo. Es importante destacar que la expresión del gen *inoA* se encuentra regulada por la acción combinada de un regulador sensible a metabolito (*inoR*) y de un regulador del desarrollo (*WhiI*), de tal forma que *WhiI* media una fuerte sobreexpresión de *inoA* que coincide con la esporulación, ésta es una estrategia nunca descrita para el suministro de una sustancia (inositol) para la formación de las cadenas de esporas (Zhang *et al.*, 2012). Estos datos combinados pueden

reflejar un incremento en la demanda de PI o de PIMs durante la septación y esporulación de *S. coelicolor*.

Recientemente, Howlet y colaboradores (2018) mostraron que las cepas mutantes en las proteínas Pmt (manosiltransferasa de proteínas) y Ppm (poliprenol fosfato manosa sintasa) y, por ende, deficientes en la manosilación de proteínas, presentan un incremento en la sensibilidad a una variedad de antibióticos, de los cuales, la mayoría actúa en alguna etapa de la biogénesis de la pared celular (a excepción de la rifamicina). La sensibilidad de la cepa mutante en la proteína Pmt denota que la pérdida de proteínas manosiladas contribuye a dicho fenotipo, sin embargo, vale la pena notar que la hipersensibilidad es más marcada y a mayor cantidad de antibióticos en la cepa deficiente en la síntesis de poliprenol fosfato manosa (Figura 7), lo cual sugiere que PPM pudiera estar siendo utilizado como donador de manosas para otras macromoléculas en *S. coelicolor*. Un análisis transcripcional de la cepa mutante en *ppm1* mostró un cambio en el metabolismo de ácidos grasos en esta cepa, además, de un cambio en su composición lipídica que fue confirmado por espectroscopía de Raman. Como recordaremos el poliprenol fosfato manosa es el sustrato donador utilizado por manosiltransferasas que actúan en el lado extracitoplásmico y que transfieren manosa a polímeros de envoltura celular, tales como las proteínas y los glicolípidos (PIMs polares, sin embargo, dichas especies de PIMs no se han encontrado en *S. coelicolor*).

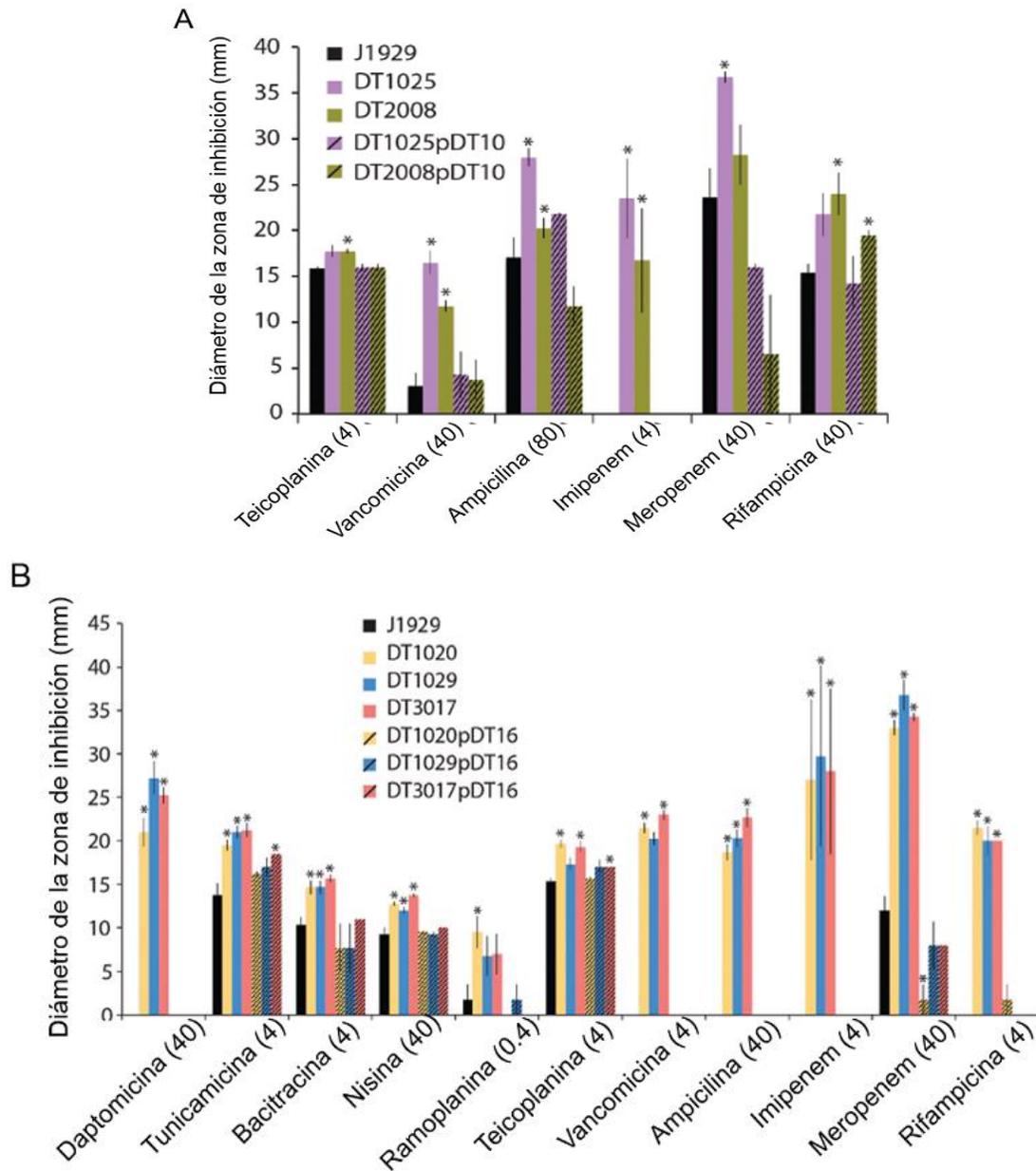


Figura 7. Cepas de *S. coelicolor* deficientes en la glicosilación de proteínas son hipersensibles a variedad de antibióticos. **A.** Diámetro de los halos de inhibición de las cepas *pmt*⁻, DT1025 y DT2008 comparado con la cepa parental J1929 y las cepas complementadas DT1025:pDT10 y DT2008:pDT10. **B.** Diámetro de los halos de inhibición de las cepas *ppm1*⁻, DT1020, DT1029 y DT3017 contra la cepa parental J1929 y las cepas complementadas DT2010:pDT16, DT1029:pDT16 y DT3017:pDT16. Se muestran los promedios de 4 réplicas con el error estándar, el asterisco indica que las muestras son estadísticamente distintas y la concentración de los antibióticos utilizados se encuentra entre paréntesis (Modificado de Howlet *et al.*, 2018).

4. Justificación

El estudio de los PIMs se ha hecho principalmente en el género *Mycobacterium* en donde se sabe que son conjugados esenciales que forman parte del lipomanano y arabinomanano. Aunque estos últimos no se han encontrado en *Streptomyces*, se sabe que *S. coelicolor* posee genes homólogos de los genes codificantes para las manosiltransferasas PimA (SCO1525), PimB (SCO2132) y la aciltransferasa PatA (SCO1527) y que sintetiza PIM₁, PIM₂ y sus formas aciladas (Sandoval-Calderón *et al*, 2017). A pesar de conocer las condiciones de crecimiento en las que se puede obtener mayor cantidad de PIMs, el papel fisiológico de estos manoconjugados en *S. coelicolor* aún es una pregunta abierta.

Vale la pena notar que el genoma de *S. coelicolor* también posee 2 genes homólogos (SCO2335 y SCO3902) al codificante para la proteína PimE de *Mycobacterium*, que como recordaremos, es una manosiltransferasa dependiente de poliprenol fosfato manosa involucrada tanto en la vía de manosilación de proteínas como de PIMs (PIM₄, PIM₅), aunque no se ha observado la presencia de PIM₃, PIM₄, PIM₅, PIM₆ y sus formas aciladas (PIMs mayores) en *S. coelicolor*. Es posible que la alta polaridad de estas moléculas cause que sean difíciles de extraer con las técnicas estándar y queden asociadas a la interfase durante los métodos de extracción.

5. Hipótesis

El gen SCO1525 codifica para la manosiltransferasa PimA, por lo tanto, al construir una mutante nula de este gen la cepa resultante no será capaz de sintetizar PIMs y tendrá defectos en su crecimiento y desarrollo.

6. Objetivos

General

Caracterizar el efecto de la delección del gen SCO1525 en la síntesis de PIMs y sus efectos fisiológicos en *S. coelicolor*.

Particulares:

- ❖ Demostrar experimentalmente si el gen SCO1525 (homólogo a PimA) tiene un papel en la síntesis de PIMs
- ❖ Determinar si PimA es esencial para el crecimiento de *S. coelicolor*
- ❖ Investigar la función de los PIMs en el crecimiento y/o desarrollo en *S. coelicolor*
- ❖ Observar si las cepas mutantes en los genes homólogos a PimE tienen un cambio en su patrón de PIMs analizado por TLC

7. Materiales y métodos

7.1 Cepas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo pertenecen a la especie *Streptomyces coelicolor* y a *Escherichia coli* K12; las cepas *S. coelicolor* fueron utilizadas para la extracción de lípidos de membrana, mientras las cepas de *E. coli* fueron empleadas tanto para la extracción de DNA plasmídico como para llevar a cabo clonaciones y conjugaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y de *Streptomyces* utilizadas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>S. coelicolor</i> M145	A3(2) SCP1-, SCP2- Cepa silvestre	Kieser <i>et al.</i> , 2000
<i>S. coelicolor</i> IB100	M145 Δ SCO1525::apra	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> IB101	M145 Δ SCO1525::scar	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> IB101/pIJ6902-pimA	IB101 con una copia del gen SCO1525 clonado en el vector de expresión integrativo pIJ6902	Este trabajo

<i>S. coelicolor</i> IB101/pIJ6902	IB101 con el vector pIJ6902 vacío	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> IB101/pIJ6021-pimA	IB101 con una copia del gen SCO1525 clonado en el vector de expresión multicopia pIJ6021.	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145/pIJ6021-pimA	M145 con una copia del gen SCO1525 clonado en el vector de expresión multicopia pIJ6021.	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> IB74	M145ΔSCO2335::scar	Tavares-Cornejo, datos no publicados
<i>S. coelicolor</i> IB82	M145ΔSCO3902::scar	Arroyo-Pérez, 2017
<i>S. coelicolor</i> IB84	ΔSCO2335::scar ΔSCO3902::scar	Arroyo-Pérez, 2017
<i>S. coelicolor</i> IB11	ΔPmt (Manosil transferasa de proteínas)	Córdova-Dávalos, 2014
<i>S. coelicolor</i> IB23	ΔPpm (Poliprenol Fosfato Manosa Sintasa)	Córdova-Dávalos, 2014
<i>S. coelicolor</i> IB11ΔpimA	ΔPmt, ΔSCO1525::apra	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR λ</i> (φ80dlacZΔM15)	Grant, <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> BW25113	F-, Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (::rrnB-3), λ, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Datsenko & Wanner, 2000
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam</i> -13::Tn9, <i>dcm</i> -6, <i>hsd</i> -M. Cepa deficiente en los sistemas de metilación de DNA. Contiene al plásmido auxiliar pUZ8002 con los elementos necesarios para la conjugación con <i>Streptomyces</i> y Kan ^R	McNeil <i>et. al.</i> , 1992

7.2 Oligonucleótidos utilizados

Se diseñaron oligonucleótidos con la ayuda del programa Primer 3 plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) para obtener la mutante nula del gen SCO1525 y para la complementación de dicha mutante. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los sitios de restricción introducidos se indican en negritas

NOMBRE DEL PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	REFERENCIA
SCO1525FOR	GGCGCCGGGGGCGGCCGACGGGCGGGGCGGCG CGTCGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Este trabajo
SCO1525REV	CGAGCGCGTCCGGTGGGCCCGTGCGCGCCGGT GGGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTC	Este trabajo
SCO1525UP	GAGGTGCCCGAGTCAGGT	Este trabajo
SCO1525DOWN	CAGGATCCAGATGAGGGTTG	Este trabajo
SCO1525_Bam/ NdeI	GTATGGATCCCATATGAGGATCGGCATCGTCTG C	Este trabajo
SCO1525_EcoRI	GCTCGAATTCAGTCCCTCGCCAGGCCGA	Este trabajo

7.3 Plásmidos utilizados

Los cósmidos que se utilizaron para la mutagénesis sitio dirigida del gen SCO1525 provienen de la librería de cósmidos construida por Redenbach *et al.*, (1996). Se utilizaron plásmidos de expresión para la complementación de la cepa mutante en PimA, así como para la sobreexpresión de tal gen. Los diferentes plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos y cósmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
StL2	Cósmido derivado de SuperCos 1, Kan ^R Ap ^R , que comprende desde el gen SCO1513 hasta el SCO1545	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
StL2ΔSCO1525::apra	Cósmido StL2 con el gen 1525 sustituido por el cassette de apramicina aac(3)IV-oriT	Este trabajo
StL2ΔSCO1525::scar	Cósmido StL2 con el gen 1525 sustituido por la secuencia cicatriz producto de la recombinación de sitios FRT	Este trabajo
pIJ773	Apra ^R , fragmento con cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , con sitios FRT en los extremos.	Gust <i>et al.</i> , 2004
pIJ784	Apra ^R , fragmento con cassette <i>aac(3)IV-oriT</i> , flanqueado por las regiones aledañas del gen <i>bla</i> del SuperCos 1	Gust <i>et al.</i> , 2004
pIJ790	Cm ^R , Plásmido de recombinación de λ-RED inducible por L-arabinosa, replicación sensible a temperatura	Gust <i>et al.</i> , 2004

pCP20	Apra ^R , Cm ^R , codifica la recombinasa sitio específica FLP, replicación sensible a temperatura	Datsenko & Wanner, 2000
pBlueScript II SK+	Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i> con resistencia a ampicilina.	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pBlueScript- <i>pimA</i>	Vector pBlueScript II SK con el gen SCO1525 clonado en el sitio para EcoRV	Este trabajo
pIJ6902	Vector replicativo en <i>E. coli</i> con resistencia a apramicina. Vector de expresión integrativo inducible con tioestreptón en <i>Streptomyces</i> .	Huang <i>et al.</i> , 2005
pIJ6902- <i>pimA</i>	Vector pIJ6902 con el gen SCO1525 clonado en los sitios para EcoRI y NdeI bajo el promotor P _{tipA}	Este trabajo
pIJ6021	Vector replicativo en <i>S. coelicolor</i> de alto número de copias, inducible con tioestreptón y resistencia a kanamicina	Takano <i>et al.</i> , 1995
pIJ6021- <i>pimA</i>	Vector replicativo en <i>S. coelicolor</i> de alto número de copias inducible con tioestreptón, con el gen SCO1525 clonado en los sitios para EcoRI y NdeI	Este trabajo

7.4 Condiciones de crecimiento bacteriano

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó LB líquido y sólido, así como YT2X (Sambrook & Russell, 2001). La temperatura de incubación fue de 37, 30 o 42°C según el caso. Para el cultivo de *S. coelicolor* se utilizaron los medios YEME líquido y sólido, Manitol-Soya (MS), R2YE y Agar Nutritivo Difco (DNA) (Kieser *et al.*, 2000). Los cultivos fueron incubados a 30°C entre 1 y 8 días. La obtención de preparaciones de esporas, transformaciones con polietilenglicol y conjugaciones se hicieron con base en Kieser *et al.*, (2000).

7.5 Construcción de cepas

La mutagénesis para obtener una mutante nula del gen SCO1525 se realizó con el protocolo Redirect (Gust *et al.*, 2003), que es una adaptación del método de “PCR-targeting” descrito por Datsenko & Wanner (2000) para ser utilizada en *Streptomyces*.

En este caso el cósmido en el que se realizó el “PCR targeting” fue el StL2, los oligonucleótidos que se diseñaron para la sustitución del gen SCO1525 fueron SCO1525FOR y SCO1525REV (Tabla 3) para amplificar el casete de resistencia a apramicina a partir del plásmido pIJ773, este casete extendido se introdujo por electroporación a la cepa BW25113/pIJ790-StL2 crecida en

presencia de *L*-arabinosa 10 mM, para poder obtener el cósmido recombinante StL2ΔSCO1525::*apra* (Tabla 2) y posteriormente introducirlo a *S. coelicolor* M145 mediante conjugación con la cepa ET12567/pUZ8002. Se seleccionaron transconjugantes Apra^R Kan^S que indicaban el reemplazo del gen SCO1525 por el casete *aac(3)IV-oriT* en el cromosoma; dicho reemplazo se confirmó por PCR. Se prosiguió con la escisión del casete en el cósmido recombinante mediante su introducción a la cepa DH5α/pCP20, que se incubó a 42°C para inducir la expresión de la recombinasa FLP que reemplazó la región correspondiente al cassette *aac(3)IV-oriT* por la secuencia "cicatriz" (que no tiene efectos polares al carecer de codones de paro); este reemplazo se identificó mediante réplica de las colonias al buscar Kan^R Apra^S y a partir de éstas se obtuvo el cósmido StL2ΔSCO1525::*scar* al cual se le sustituyó el gen *bla* por el fragmento de pIJ784 *aac(3)IV-oriT* para finalmente ser introducido por conjugación a *S. coelicolor*, seleccionando la integración del cósmido mediante resistencia a kanamicina. Posteriormente se permitió el crecimiento de las transconjugantes en ausencia de antibióticos y se replicaron colonias individuales para buscar aquellas Apra^S Kan^S que indicaban el reemplazo del alelo ΔSCO1525::*apra* por el ΔSCO1525::*scar*. Todas las mutaciones se confirmaron por PCR con los oligonucleótidos SCO1525UP y SCO1525DOWN (Tabla 3).

Las cepas de *S. coelicolor* IB74, IB82 e IB88 son mutantes nulas en los genes SCO2335, SCO3902 o ambos, respectivamente (Tabla 1), y se utilizaron en trabajos anteriores para determinar si el producto de los genes SCO2335 o SCO3902 eran responsables de la elongación de la cadena de manosas en la glicosilación de proteínas (Arroyo-Pérez, 2017), ya que se sabía que el primer residuo lo pone la proteína Pmt; estas cepas se recuperaron de esporas conservadas a -20°C en glicerol y para reactivarlas se estriaron en medio MS enriquecido con extracto de levadura al 10%.

Para obtener la cepa IB11Δ*pimA* se realizaron los últimos pasos del protocolo REDIRECT (introducción del cósmido StL2ΔSCO1525::*apra* a la cepa IB101 y selección de colonias resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina).

Las construcciones y procesos de purificación de DNA se hicieron con base en Sambrook & Russell (2001). La amplificación de genes por PCR se realizó utilizando la enzima DNA polimerasa Pfu Ultra AD (*Agilent technologies*).

7.6 Extracción de lípidos

Para obtener los lípidos se utilizaron muestras sin marcaje radioactivo provenientes de 10 cajas de medio MS sólido, en las que la superficie del agar se recubrió con discos de celofán esterilizado en agua destilada. Sobre los discos de celofán se esparció la cantidad de esporas necesarias para formar un tapete confluyente de micelio. Tras el tiempo deseado de incubación, las muestras de micelio se recuperaron raspando la superficie del celofán con una espátula de acero inoxidable, dependiendo del volumen de la pastilla de micelio se resuspendió en agua destilada. Las muestras se congelaron a -20°C , tras descongelar, se añadió lisozima a una concentración de 2 mg/mL y las muestras se incubaron a 37°C durante una hora. Posteriormente se procedió con el protocolo de extracción de Bligh & Dyer (1959), que consiste en la homogenización de la muestra biológica en una mezcla monofásica de metanol/cloroformo/agua, a la que posteriormente se le añade metanol/cloroformo para inducir su separación en una fase acuosa y orgánica. Este proceso se realizó dos veces, se combinaron las fases orgánicas obtenidas y se colocaron en la campana de extracción para evaporar el solvente. Finalmente se determinó la masa del extracto y los lípidos extraídos se disolvieron en metanol/cloroformo (1:1) (Sandoval-Calderón, 2016).

7.7 Cromatografía de capa fina

Se utilizó un sistema de separación de cromatografía de capa fina (TLC) de una dimensión, este se realizó en capas finas para TLC de alto rendimiento (Silica gel 60 sobre aluminio, Merck), con una mezcla de cloroformo/metanol/ácido acético/agua (8:3:2:1, v/v) como fase móvil (Sandoval-Calderón, 2017)

Para la detección de los PIMs, las capas finas fueron rociadas con una solución de orcinol al 0.2% en ácido sulfúrico al 5% o de α -naphthol, se dejó secar la capa fina en la campana de extracción y posteriormente se horneó a 100°C por unos minutos, de tal forma que las pentosas o hexosas (en el caso de los PIMs, manosas) aparecen teñidos de color azul o púrpura.

7.8 Clonación del gen SCO1525 y complementación de la mutante IB101

El gen SCO1525 se amplificó a partir de DNA genómico de *S. coelicolor* M145 utilizando los oligonucleótidos SCO1525_BamNdeI y SCO1525_EcoRI (Tabla 3). La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa de alta fidelidad Pfu Ultra AD (*Agilent Technologies*) con un programa

tipo “*touchdown*” (Korbie & Mattick, 2008). El producto de PCR de 1185 pb se ligó con el plásmido pBlueScript II SK+ digerido con la enzima EcoRV. La ligación se transformó por electroporación en células de *E. coli* DH5 α . El plásmido obtenido se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

El análisis de la secuencia con los programas Chromas lite (Technelysium) y DNAMAN (Lynnon Corporation, Canada), reveló que el gen SCO1525 se amplificó y clonó sin mutaciones, y por lo tanto se prosiguió a digerir los plásmidos pBlueScript-*pimA* y pIJ6902 con las enzimas NdeI y EcoRI para la posterior purificación de los fragmentos de interés por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

El fragmento correspondiente al gen SCO1525 se clonó en el vector de expresión pIJ6902 dando como resultado al plásmido pIJ6902-*pimA* el cual se transfirió por medio de conjugación con la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 hacia *S. coelicolor* IB101.

Adicionalmente se introdujo por conjugación el vector vacío pIJ6902 a *S. coelicolor* IB101 como control.

7.9 Sobreexpresión del gen SCO1525

Se clonó el gen SCO1525 en el vector multicopia pIJ6021 en los sitios para las enzimas NdeI y EcoRI. Dicha construcción se introdujo a las cepas M145 e IB101 por transformación de protoplastos.

7.10 Ensayo de sensibilidad a antibióticos

Se plaquearon de manera uniforme cajas con Agar Nutritivo Difco (DNA) con aproximadamente 10^7 esporas de las cepas correspondientes. Se colocaron discos de papel filtro estériles (6mm de diámetro) en la superficie de las cajas inoculadas y se les agregó 10 μ l de la solución de antibiótico para lograr una determinada concentración final del antibiótico según el caso. Las cajas se dejaron en incubación a 30°C por 48 hrs y se midieron las zonas de inhibición. Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada cepa para cada antibiótico.

8. Resultados

8.1 El gen SCO1525 no es esencial en *S. coelicolor*

El gen que codifica la proteína PimA ha sido reportado como esencial en las micobacterias. Para determinar si ocurría lo mismo en *S. coelicolor*, lo primero que se realizó fue obtener una cepa de *S. coelicolor* con dicho gen eliminado. Mediante el método REDIRECT se logró construir una mutante nula del gen SCO1525 sin la necesidad de proveer una copia del gen en *trans*. En la figura 8 se muestran los productos de PCR que indican los loci correspondientes al gen SCO1525 en la cepa silvestre M145 y en las mutantes IB100, IB101 e IB11 Δ pimA.

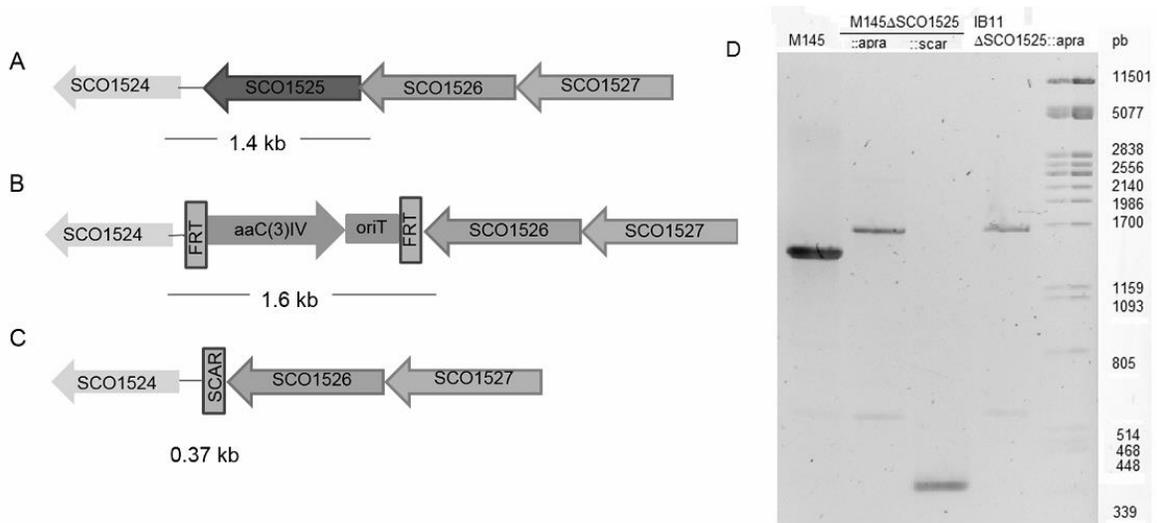


Figura 8. Organización genética de la región cromosómica del gen SCO1525. **A.** Cepa silvestre M145. **B.** Cepa IB100 con el gen SCO1525 reemplazado por el cassette de resistencia a apramicina. **C.** Cepa IB101 producto de la recombinación de los sitios FRT. **D.** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR obtenidos del DNA genómico de cada una de las cepas, usando como marcador DNA del fago lambda digerido con la enzima PstI.

8.2 La cepa mutante del gen SCO1525 es deficiente en la síntesis de PIMs

Para observar si la cepa mutante nula sin el gen SCO1525 (IB101) era capaz de sintetizar PIMs se procedió a la extracción de sus lípidos de membrana, a la separación de estos por cromatografía de capa fina y a la tinción de las capas finas para revelar los carbohidratos con una solución de orcinol (Figura 9). El perfil lipídico de la cepa mutante IB101 se diferencia del de la cepa silvestre por carecer totalmente de las señales correspondientes a los PIMs. Se confirmó que el fenotipo carente de PIMs de la cepa mutante se debe a la ausencia del gen SCO1525, ya que al clonar este gen en el en el vector integrativo pIJ6902, bajo el control del promotor inducible *PtipA* e

introducirlo a la cepa IB101, se complementó el fenotipo de la mutante y fue posible observar la presencia de PIMs. En contraste, la misma cepa transformada con el vector vacío no mostró complementación de la mutación, y no tuvo cambios en su perfil lipídico respecto a la mutante IB101 sin complementar.

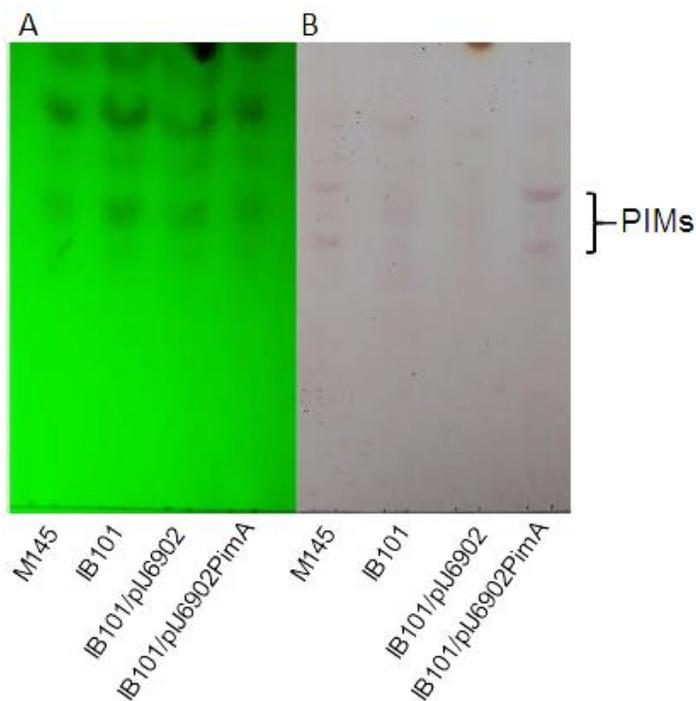


Figura 9. Perfil de PIMs en la mutante IB101. Cromatografía de capa fina de una dimensión de extractos de lípidos de diferentes cepas de *S. coelicolor* crecidas en medio MS por 7 días. A) Placa iluminada con luz UV para corroborar la presencia de muestra. B) Placa teñida con orcinol para revelar las hexosas de los PIMs.

8.3 La sobreexpresión de *pimA* intensifica las señales de los PIMs en la placa de TLC

Para observar las señales correspondientes a los PIMs con mayor intensidad, se clonó el gen SCO1525 en el vector multicopia pIJ6021 bajo el promotor inducible *PtipA* y se introdujo tanto a la cepa mutante IB101, como a la cepa silvestre. Se extrajeron los lípidos a partir de medio sólido al que se adicionó el inductor tioestreptón, y se analizaron los extractos de lípidos mediante cromatografía de capa fina (Figura 10) en la que se observó que las señales correspondientes a las PIMs se notaban con mayor intensidad.

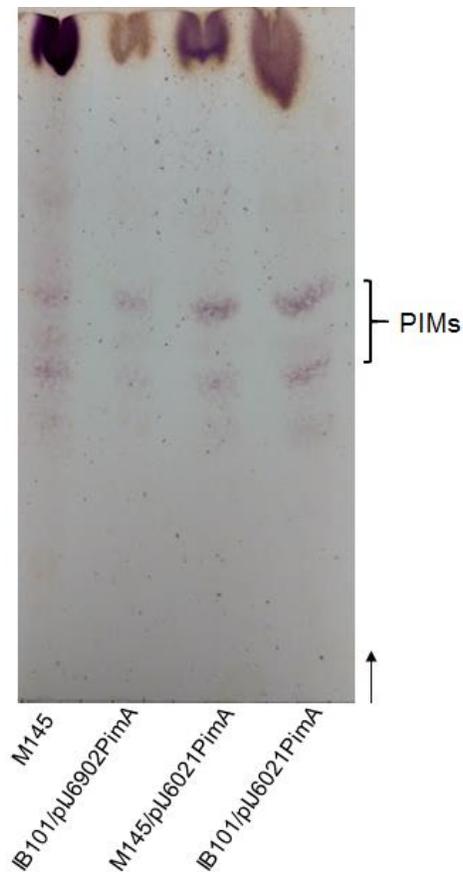


Figura 10. Perfil de PIMs en cepas con el gen SCO1525 sobreexpresado. Cromatografía de capa fina que muestra el perfil de PIMs de varias cepas crecidas en medio MS por 7 días. En el caso de las cepas con el plásmido pIJ6902-*pimA* y pIJ6021-*pimA* se indujo la expresión mediante la adición de tioestreptón 10 µg/ml. Placa teñida con orcinol para revelar las hexosas de los PIMs.

8.3. La cepa IB101 muestra un retraso en el desarrollo morfológico y una producción adelantada de actinorrodina

Para explorar otros aspectos del fenotipo de la mutante nula en *PimA* de *S. coelicolor*, se plaquearon las cepas M145, IB11, IB101 e IB101/pIJ6902-*pimA* en medio MS para observar si había diferencias en el desarrollo morfológico y/o metabólico. Se observó que la cepa IB101 presentaba un retardo en la erección de hifas aéreas y una producción precoz y en mayor cantidad de actinorrodina, de manera similar a la cepa IB11 aunque en menor grado (Figura 11).

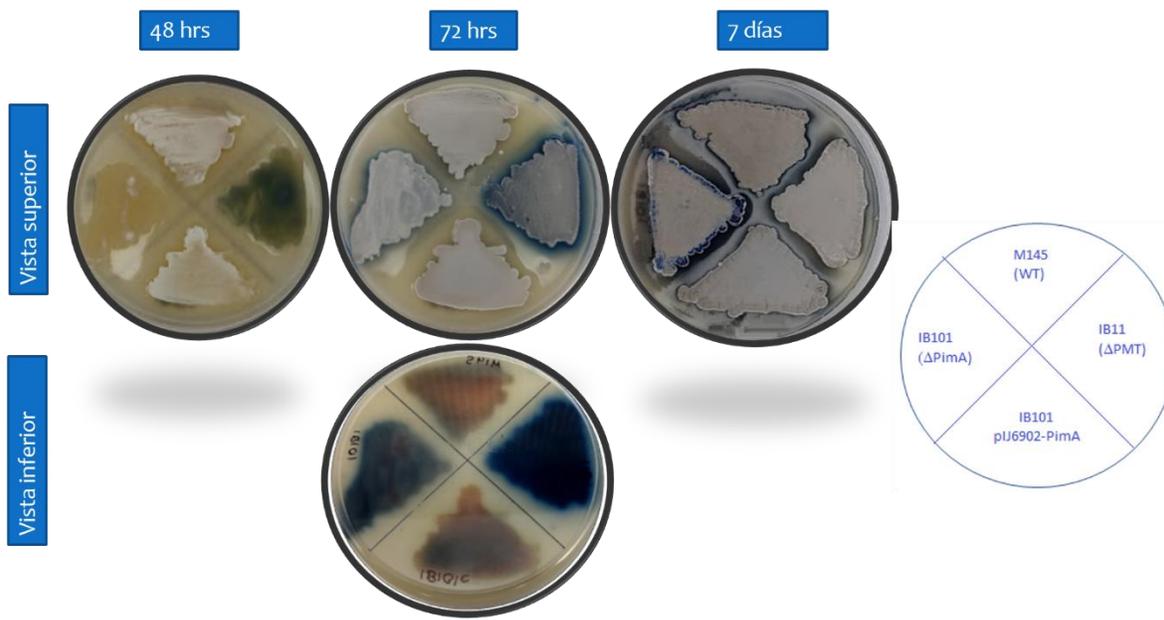


Figura 11. Desarrollo morfológico de la cepa mutante IB101. Cajas con cultivos de las cepas M145, IB11, IB101 e IB101/pIJ6902-PimA crecidas en medio MS. La cepa IB101 presenta un retraso en la erección de hifas aéreas a las 48 hrs y una producción anticipada y abundante de actinorrodina, en comparación con la cepa silvestre; dicho fenotipo se revierte en la cepa complementada. El tiempo de esporulación de las cepas fue muy similar, sin embargo, IB101 presentó acumulación de gotas de antibióticos en la superficie.

8.4 La cepa deficiente en la síntesis de PIMs y la doble mutante deficiente en la síntesis de PIMs y proteínas manosiladas son hipersensibles a antibióticos.

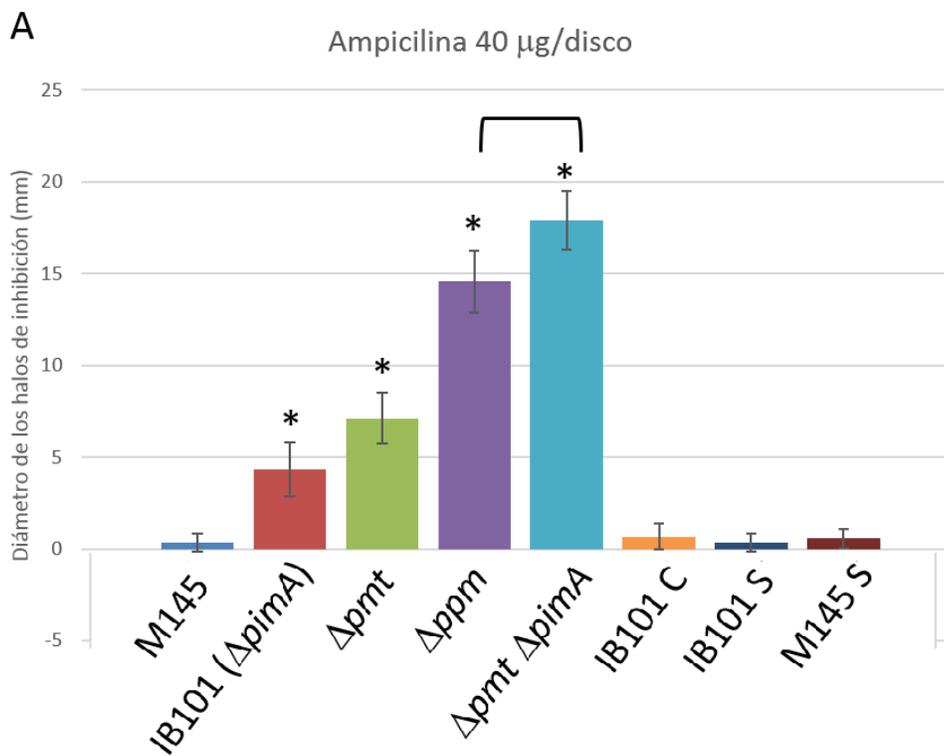
Para observar si la carencia de PIMs tiene una contribución en el fenotipo de hipersensibilidad a antibióticos mostrada por las mutantes en *ppm* respecto a la sensibilidad mostrada por las mutantes en *pmt* (Howlett *et al.*, 2018a), se realizaron ensayos con diferentes antibióticos a diferentes concentraciones. Se observó que la cepa IB101 ($\Delta pimA$) presentó unos halos de inhibición significativamente mayores a los antibióticos ampicilina, vancomicina, meropenem y rifamicina respecto a los de la cepa silvestre M145 (Figura 12A, B, C y D). Este fenotipo se revirtió al complementar a la mutante con una copia del gen SCO1525 (cepas IB101C, IB101SE).

Posteriormente, se eliminó el gen SCO1525 (*pimA*) en la cepa IB11 (Δpmt) para observar si el efecto aditivo de la deficiencia de PIMs y de proteínas manosiladas iguala a la hipersensibilidad observada en la cepa mutante Δppm . Se observó que, en el caso de la ampicilina, rifamicina y meropenem no hay diferencias significativas en el diámetro de los halos de inhibición entre la

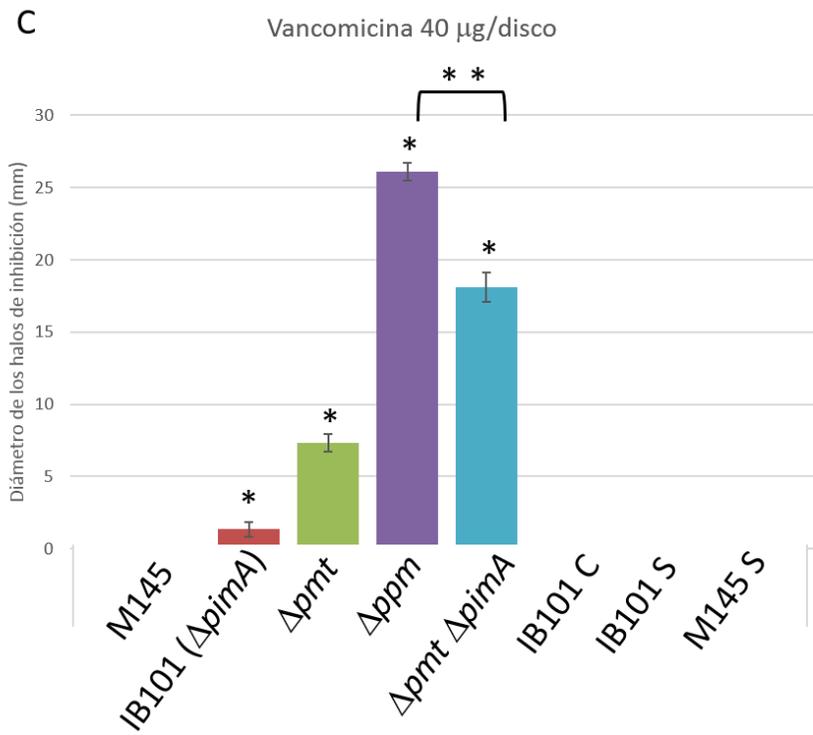
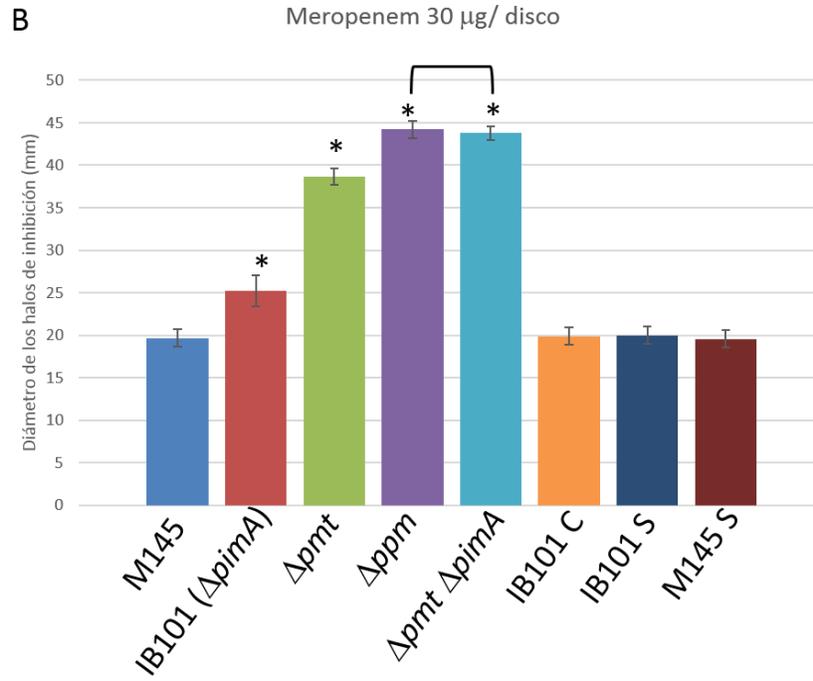
cepa IB23 (Δppm) e IB11 $\Delta pimA$, sin embargo, en el caso de la vancomicina la cepa IB11 $\Delta pimA$ es significativamente menos sensible a ésta (Figura 12A, B, C y D).

También se realizó el ensayo con ertapenem, bacitracina y tetraciclina con los cuales se puede notar que la cepa IB101 es más sensible a estos antibióticos que la cepa silvestre, la cepa IB11 $\Delta pimA$ muestra sensibilidad similar a ertapenem y bacitracina, mientras que muestra una mayor sensibilidad con tetraciclina, estos datos no muestran desviación estándar porque sólo se realizó una réplica técnica (Figura 12,E).

Similar a como se reporta en Howlett *et al*, 2018, las cepas analizadas no mostraron cambios en su sensibilidad a kanamicina, cloranfenicol, neomicina y tiostreptón.



*



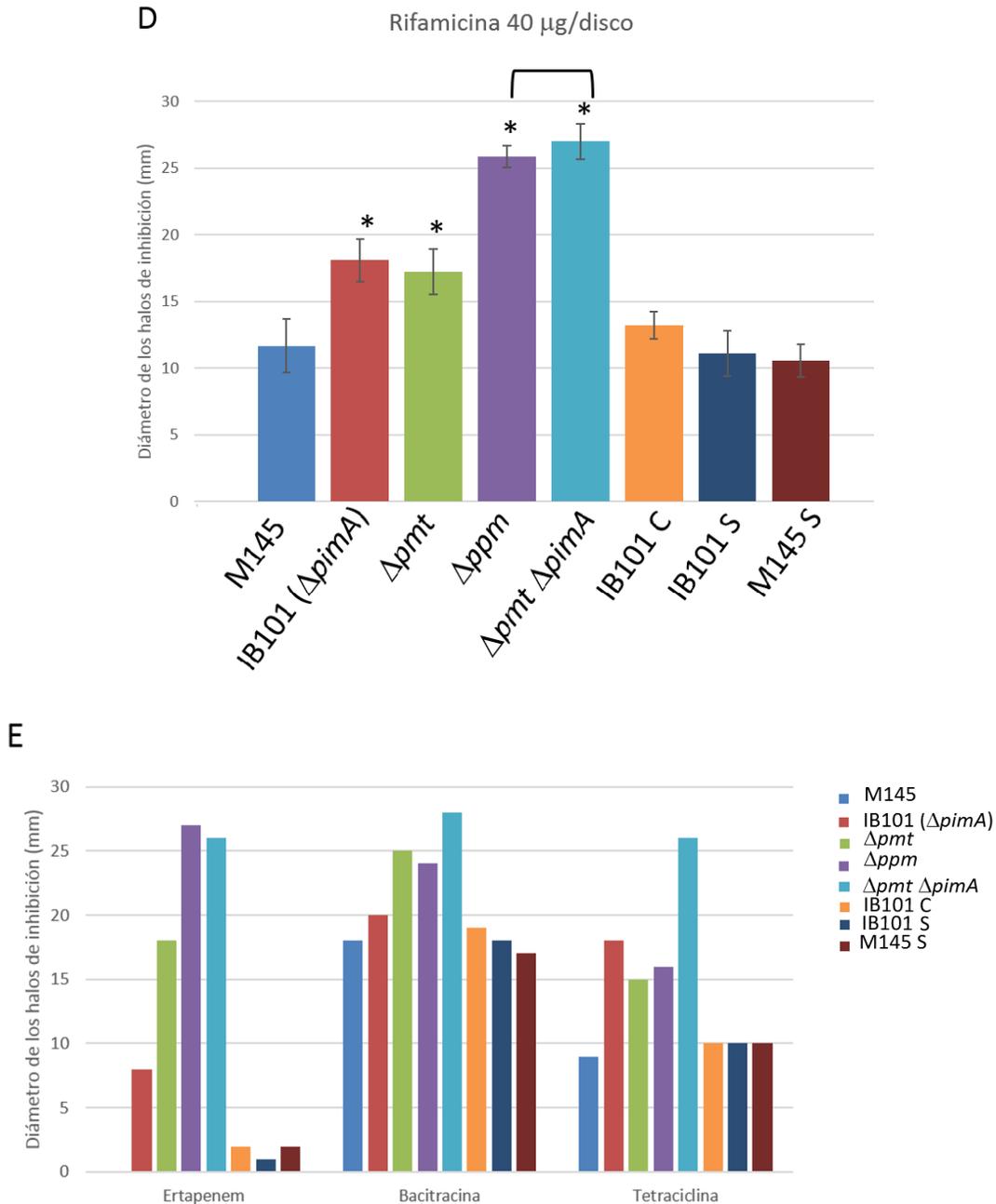


Figura 12. Ensayo de sensibilidad a antibióticos de las cepas deficientes en la síntesis de PIMs, proteínas manosiladas y con ambas deficiencias en *S. coelicolor*. Diámetro de la zona de inhibición de las cepas mutantes IB101 ($\Delta pimA$), IB11 (Δpmt), IB23 (Δppm) e IB11 $\Delta pimA$ ($\Delta pmt \Delta pimA$) en comparación con la cepa silvestre M145 y las cepas complementadas IB101C (IB101/pIJ6902-*pimA*), IB101S (IB101/pIJ6021-*pimA*) y M145S (M145/pIJ6021-*pimA*). Se muestran los promedios con desviación estándar. *Indica $P < 0.05$ que la diferencia observada entre M145 y las cepas mutantes haya ocurrido por casualidad. **Indica $P < 0.05$ que la diferencia observada entre IB23 e IB11 $\Delta pimA$ haya ocurrido por casualidad. Se utilizó la prueba de *t* de Student. **A.** Ampicilina. **B.** Meropenem. **C.** Vancomicina. **D.** Rifamicina. **E.** Varios antibióticos con los cuales sólo se realizó una réplica biológica por lo cual no presentan barras de error.

8.5. Las cepas deficientes en la *O*-manosilación de proteínas y las mutantes en PimE en *S. coelicolor* no presentan un cambio en su perfil de PIMs.

Para observar si las cepas mutantes que carecen de los genes homólogos a PimE (IB72, IB82 e IB84) y las cepas deficientes en la *O*-manosilación de proteínas (Δppm y Δpmt) presentan un cambio en su patrón de PIMs, se procedió a la extracción de sus lípidos de membrana, separación de éstos por cromatografía de capa fina y tinción de las capas finas para revelar los carbohidratos con una solución de orcinol. Los perfiles de PIMs de las cepas mencionadas no presentaron diferencias notables con respecto a la cepa silvestre (Figura 13B)

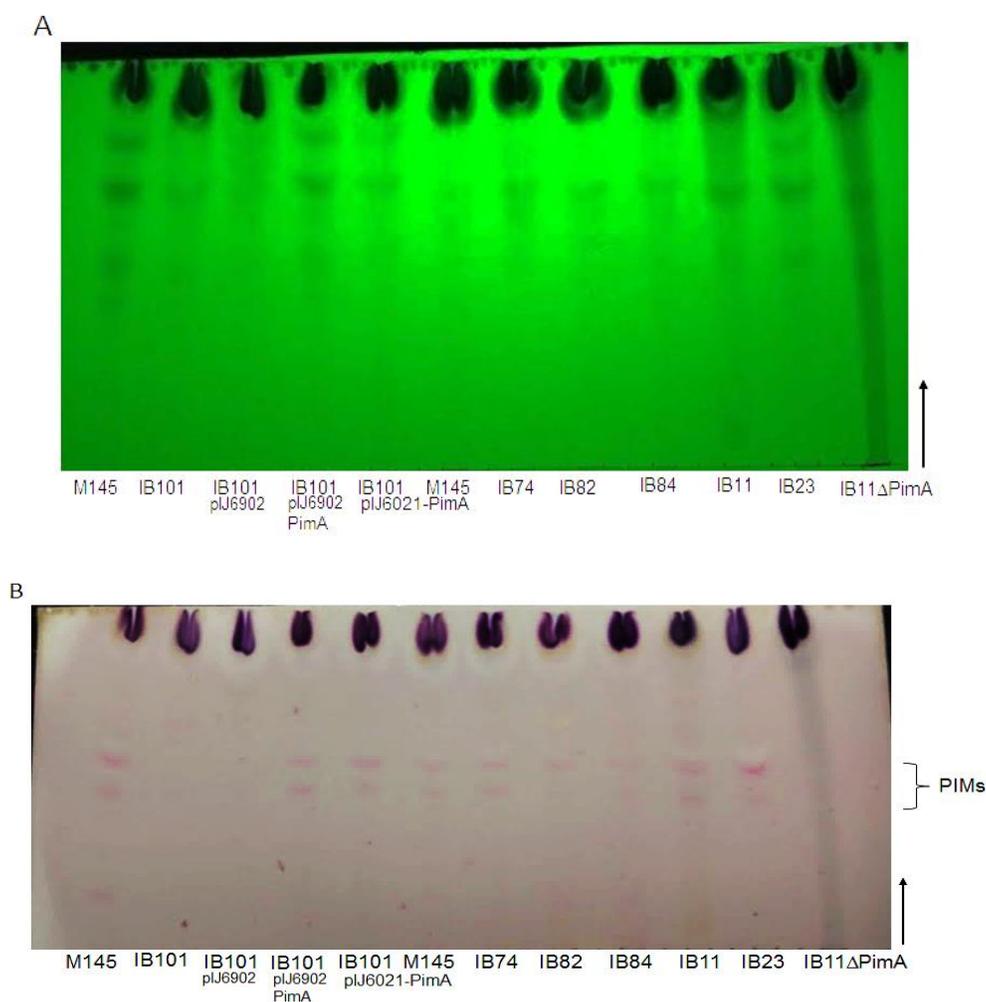


Figura 13. Patrón de PIMs en mutantes carentes de homólogos de PimE. TLC de una dimensión de extractos de lípidos de diferentes cepas de *S. coelicolor* crecidas en medio MS por 7 días. A) Placa iluminada con luz UV para corroborar la presencia de muestra. B) Placa teñida con orcinol para revelar las hexosas de los PIMs.

9. Discusión

Este trabajo se enfocó en el análisis de la función del gen SCO1525 de *S. coelicolor* y su producto, la proteína PimA, la cual comparte 54% de identidad con la proteína PimA de *M. tuberculosis* (Rv2610c). Dada la esencialidad de *pimA* para la viabilidad y desarrollo en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (Korduláková *et al.*, 2001; Boldrin *et al.*, 2014), esperábamos que SCO1525 fuera esencial para *S. coelicolor*. Sin embargo, la cepa con una mutación nula del gen SCO1525 se obtuvo con facilidad utilizando el método REDIRECT (Gust *et al.*, 2002).

El análisis del perfil de lípidos mediante TLC de la mutante nula en el gen SCO1525, mostró que ésta es deficiente en la síntesis de PIMs ya que no presentó las señales que corresponden a estos glicolípidos. La extracción de los lípidos se realizó en las condiciones en las que el porcentaje de PIMs era mayor (a partir de micelio mayormente esporulado crecido en medio sólido MS por ocho días). Sin embargo, estas condiciones de crecimiento favorecen la acumulación de actinorrodina y de prodigininas, metabolitos que son producidos por *S. coelicolor* de manera coordinada con la diferenciación morfológica (Van Wezel & Mc Dowall, 2011) y que se mantienen asociados al micelio dada su hidrofobicidad, de tal manera que se extraen junto con los lípidos de membrana y dificultan el procesamiento de las muestras, además, de saturar las placas finas para TLC (Sandoval-Calderón, 2016).

La eliminación del gen SCO1525 se realizó sin complicaciones y se obtuvo una cepa deficiente en la síntesis de PIMs. Esta deficiencia de PIMs tuvo un impacto en la fisiología de *S. coelicolor*, que se observa por un retraso en la erección de hifas aéreas, producción abundante y precoz de actinorrodina, así como una mayor sensibilidad a diversos antibióticos (principalmente beta lactámicos y otros que no actúan a nivel de pared celular como la Rifamicina) lo que indica que también tuvo un impacto en la integridad de la envoltura celular de *S. coelicolor*. Estos resultados indican que, la ausencia de los PIMs permite la viabilidad y la diferenciación celular de esta especie, sin embargo, estos lípidos tienen un papel en la esporulación.

El retraso en la erección de hifas aéreas de la mutante sin PimA, recuerda al fenotipo de la mutante en el gen *inoA* (que codifica para la mio-inositol 1-fosfato sintasa en *S. coelicolor*) que en medio mínimo presenta crecimiento débil e incapacidad de formar hifas aéreas, mientras que

en medio MS el desarrollo se queda detenido tras la erección de hifas aéreas y es incapaz de esporular (Zhang *et al.*, 2012). Aunque el fenotipo de la mutante carente de PimA es mucho menos drástico, es concordante con la idea de que existe una mayor demanda en la síntesis de PI y sus derivados durante la diferenciación morfológica de *Streptomyces*, específicamente durante la esporulación, ya que, vale la pena notar que las condiciones en las que se obtiene mayor cantidad de PIMs es a partir de micelio esporulado (Sandoval-Calderón *et al.*, 2015).

La anticipación e incremento en la producción de actinorrodina de la mutante nula del gen *pimA* con respecto a la cepa silvestre, es similar a la observada en las mutantes que carecen de Pmt y Ppm (deficientes en la manosilación de proteínas) y puede ser un indicativo de la activación de diversas señales de estrés en la envoltura celular de *S. coelicolor* (Howlett *et al.*, 2018a), denotando la importancia de estos manoconjugados en la integridad de la envoltura celular.

Otro fenotipo que comparten las cepas mutantes carentes de PimA, de Pmt o de Ppm es la hipersensibilidad a varios antibióticos, entre los que destacan beta lactámicos y vancomicina que actúan durante las etapas de la biogénesis de pared celular. En el artículo de Howlett y colaboradores (2018a) se descarta la idea de que esta hipersensibilidad sea causada por un aumento en la permeabilidad de la membrana de *S. coelicolor*, ya que la sensibilidad de las mutantes sin Pmt y Ppm, así como de PimA (en este estudio) a antibióticos tales como kanamicina, neomicina y tiostreptón (antibióticos que actúan uniéndose al ribosoma), no cambia con respecto a la cepa silvestre. Como se mencionó previamente, la enzima Ppm es la responsable de la síntesis de poliprenol fosfato manosa, molécula que funge como el donador de manosas para las glicosiltransferasas periplásmicas tales como Pmt y PimE. La mutante sin Pmt presenta una sensibilidad menor a la mostrada por la mutante sin Ppm, lo que indica que la deficiencia de proteínas manosiladas contribuye a este fenotipo, pero que existen otros factores que llevan a estos efectos pleiotrópicos que afectan las funciones membranales y del periplasma (Howlett *et al.*, 2018a). Para ahondar en este tema, Howlett y colaboradores (2018b) realizaron interrupciones en genes que están involucrados en la síntesis de GDP-Man en *S. coelicolor*, es decir, en los pasos previos al que lleva a cabo Ppm, y que sintetizan al sustrato utilizado por esta enzima. El único gen que pudieron mutar con éxito fue SCO3028 que codifica para ManB, una fosfomanomutasa que cataliza la conversión de D-manosa-6-fosfato hacia D-manosa-1-fosfato; observaron que esta mutante presentó un tamaño de colonias extra chico y que la sensibilidad de esta cepa hacia los

antibióticos antes mencionados era igual a la sensibilidad mostrada por la mutante sin Ppm. Cabe mencionar, que esta mutante en ManB, también estaría afectando la síntesis de PIMs, ya que las primeras manosiltransferasas de la vía (PimA y PimB) utilizan como sustrato GDP-manosa, por ende, la deficiencia total o parcial de PIMs en esta cepa (ya que mencionan que puede haber genes con actividad redundante a ManB) también tiene un componente en este fenotipo.

Una de las características reportadas de mutantes de *S. coelicolor* carentes de Ppm es la mayor sensibilidad a antibióticos sobre las cepas carentes de Pmt, por lo que se ha propuesto que el intermediario poliprenolfosfato-manosa sintetizado por esta enzima es necesario para donar residuos de manosa a otros componentes de la cubierta celular además de las glicoproteínas, lo que explicaría la mayor sensibilidad; dentro de estos componentes se han sugerido a los PIMs (Howlett et al., 2018). Sin embargo, la presencia de PIMs mayores que requieren de dicho intermediario para su síntesis (PIM3-PIM6) no se ha reportado en *S. coelicolor* y en este trabajo solamente pudimos visualizar los PIMs previamente descritos, tanto en la cepa silvestre como en las mutantes sin Pmt y sin los homólogos de PimE. A pesar de esto, decidimos obtener una doble mutante deficiente tanto en la síntesis de PIMs como de proteínas manosiladas (IB11ΔPimA) para observar si el efecto de estas dos deficiencias de manoconjugados iguala a la sensibilidad a antibióticos mostrada por la mutante en Ppm. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad mostrada a ampicilina, meropenem y rifamicina entre la cepa sin Ppm y la doble mutante carente de Pmt y PimA. Aunque este resultado pudiera ser tomado como evidencia indirecta de la presencia de PIMs mayores cuya síntesis requiere del intermediario poliprenolfosfato-manosa, pensamos que es más probable que se deba a la importancia estructural de los PIMs menores (cuya síntesis no depende de dicho intermediario) para la integridad de la membrana y de la pared celular de esta bacteria. Incluso, una posibilidad es que la ausencia total de PIMs en la membrana pudiera afectar la actividad de la enzima Ppm.

Otros ejemplos que demuestran la importancia de los PIMs en la integridad de la envoltura celular se remontan a 1997, en donde una cepa de *M. smegmatis* con niveles reducidos de PIM2 es más sensible a beta lactámicos, tales como ampicilina, cefaloridina y cloxacilina (Parish et al., 1997), lo que concuerda con el estudio de 2002 en donde se demuestra que PimA es esencial para *M. smegmatis*, y que su sobreexpresión aumenta la resistencia de esta cepa a ampicilina, pero la resistencia a isoniazida y a cloranfenicol no cambia (Kordulaková et al., 2002). Recientemente

se observó que la mutante en PimE de *M. smegmatis*, además de presentar invaginaciones en la membrana plasmática y cambios en la hidrofobicidad de ésta (Morita *et al.*, 2006), tiene un crecimiento defectuoso en la presencia de cobre y un incremento en la sensibilidad a vancomicina (Eagen *et al.*, 2018), lo que indica que esta alteración en el perfil de PIMs de *M. smegmatis* presenta defectos en la homeostasis de la membrana plasmática. Aunque los lipoglicanos LM y LAM no se han encontrado en *Streptomyces*, se ha observado que además de tener actividades inmunomoduladoras en las especies patógenas de *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, tienen un papel estructural en la pared celular, ya que un cambio en la estructura de estos lipoglicanos provoca pérdida de la tinción ácida en *M. smegmatis* y un incremento en la sensibilidad a beta lactámicos (ampicilina, vancomicina, meropenem carbenicilina, cefepime), tanto en *M. smegmatis* como en *M. tuberculosis* (Fukuda *et al.*, 2013).

Dado que una fracción significativa de PIMs (mayores y menores), LM y LAM pueden extraerse de membrana plasmática e incluso de la pared celular de *Mycobacterium* (Bansal & Nikaido, 2014) y por ende tienen sus porciones glicosídicas posicionadas para interactuar directamente con la pared celular o incluso atravesarla, se ha especulado que estos glicolípidos y lipoglicanos pueden tener un papel similar a los ácidos teicóicos y lipoteicóicos de Gram positivas (Fukuda *et al.*, 2013; Eagen *et al.*, 2018), los cuales actúan como fuertes barreras mecánicas que previenen el acceso de moléculas pequeñas, bloqueando las cavidades entre las cadenas de peptidoglicano o modificando las propiedades fisicoquímicas de la pared celular (Weidenmaier & Pesche, 2008). Esta hipótesis puede explicar el fenotipo de hipersensibilidad a antibióticos que actúan a nivel de biogénesis de pared celular de las cepas deficientes de PIMs, LM y LAM en *Mycobacterium* y la cepa deficiente de PIMs en *S. coelicolor* analizada en este trabajo.

10. Conclusión

En este trabajo se muestra evidencia genética de que el gen SCO1525 (*pimA*) codifica la manosiltransferasa involucrada en la primera manosilación del PI para dar lugar a PIM₁ y por consiguiente a la familia de PIMs en *S. coelicolor*, ya que la habilidad de una mutante en este gen para sintetizar PIMs fue dependiente de la presencia de una copia funcional del gen SCO1525.

El gen *pimA* no es esencial para el crecimiento de *S. coelicolor*, pero es necesario para un óptimo desarrollo morfológico, ya que la mutante nula en este gen presenta un retraso en la erección de hifas aéreas al crecer en medio sólido MS y una acelerada producción de actinorrodina.

La cepa mutante en el gen *pimA* es significativamente más sensible a varios antibióticos que actúan a nivel de pared celular (a excepción de la rifamicina), posiblemente por el rol estructural de los PIMs en la integridad de la envoltura celular de *S. coelicolor*, haciéndola más vulnerable a compuestos antimicrobianos.

La cepa deficiente tanto en la manosilación de proteínas como en la síntesis de PIMs (IB11Δ *pimA*) iguala la sensibilidad a algunos antibióticos mostrada por la mutante Δ*ppm*, que es deficiente en la síntesis del intermediario lipídico poliprenol fosfato manosa, mismo sustrato que también es utilizado para la síntesis de PIMs mayores (PIM3-PIM6) en micobacterias, a pesar de que estos PIMs mayores no se han encontrado en *S. coelicolor*.

No se observaron diferencias en el perfil de PIMs entre la cepa silvestre y las mutantes que carecen de los genes homólogos a PimE de *S. coelicolor*.

En síntesis, la delección del gen *pimA* causa ligeros defectos de crecimiento en *S. coelicolor* en condiciones óptimas de crecimiento y hace a su envoltura celular más vulnerable a algunos antibióticos, por tanto, se concluye que la función de los PIMs en *S. coelicolor* es estructural.

11. Perspectivas

- ❖ Realizar la espectrometría de masas para caracterizar de manera más precisa los PIMs de *S. coelicolor*
- ❖ Utilizar métodos de extracción de lípidos más exhaustivos en conjunto con un sistema de fase móvil específico para PIMs, con el objetivo de observar las señales con mayor claridad y separadas unas de otras.
- ❖ Esta última perspectiva también tiene el objetivo de discriminar la presencia o ausencia de PIMs mayores en *S. coelicolor*, cuya presencia llevaría a la hipótesis de una posible participación de alguno de los dos genes homólogos a *pimE* de *S. coelicolor* en la síntesis de PIMs.

12. Bibliografía

1. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J & Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8: 251–259
2. Bansal-Mutalik, H. Nikaido. 2014. Mycobacterial outermembrane is a lipid bilayer and the innermembrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 4958–4963.
3. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147
4. Briken, S.A. Porcelli, G.S. Besra, L. Kremer, Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response, *Mol. Microbiol.* 53 (2004) 391–403.
5. Boldrin, M. Ventura, G. Degiacomi, S. Ravishankar, C. Sala, Z. Svetlikova, A. Ambady, N. Dhar, J. Kordulakova, M. Zhang, A. Serafini, K.G. Vishwas, G.S. Kolly, N. Kumar, G. Palù, M.E. Guerin, K. Mikusova, S.T. Cole, R. Manganelli. 2014. The phosphatidyl-myo-inositol mannosyltransferase PimA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth in vitro and in vivo, *J. Bacteriol.* 196. 3441–3451.
6. Crellin P.K., Kovacevic S., Martin K.L., Brammananth R., Morita Y.S, Billman-Jacobe H., McConville M.J., Coppel R.L., 2008. Mutations in *pimE* restore lipoarabinomannan synthesis and growth in a *Mycobacterium smegmatis* *lpqW* mutant, *J. Bacteriol.* 190 3690–3699.
7. Eagen WJ, Baumel LR, Osman SH1, Rahlwes KC, Morita YS. 2018. Deletion of *PimE* mannosyltransferase results in increased copper sensitivity in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1;365(6). doi: 10.1093/femsle/fny025.
8. Espitia C, Mancilla R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 77:378–83.
9. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, Hamasaki M, Nishiuchi Y. 2013., Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *mBio*, 00472-12.
10. Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645
11. Guerin, D. Kaur, B.S. Somashekar, S. Gibbs, P. Gest, D. Chatterjee, P.J. Brennan, M. Jackson. 2009. New insights into the early steps of phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in mycobacteria: *PimB'* is an essential enzyme of *Mycobacterium smegmatis*, *J. Biol. Chem.* 284, 25687–25696.
12. Gilleron, C. Ronet, M. Mempel, B. Monsarrat, G. Gachelin, G. Puzo. 2001. Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells, *J. Biol. Chem.* 276 34896–34904.
13. Gilleron, M. Lepore, E. Layre, D. Cala-De Paepe, N. Mebarek, J.A. Shayman, S. Canaan, L. Mori, F. Carrière, G. Puzo, G. De Libero. 2016. Lysosomal lipases PLRP2 and LPLA2 process mycobacterial multi-acylated lipids and generate T cell stimulatory antigens, *Cell Chem. Biol.* 23,1147–1156

14. Gust B, Kieser T, Chater K.F. 2002. PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, United Kingdom
15. Howlett R, Read N, Varghese A, Kershaw C, Hancock Y, Smith MCM. 2018(a). *Streptomyces coelicolor* strains lacking polyprenol phosphate mannose synthase and protein O-mannosyl transferase are hyper-susceptible to multiple antibiotics. *Microbiology* 164:369–382. doi:10.1099/mic.0.000605.
16. Howlett R, Anttonen K, Read N, Smith MCM. 2018(b). Disruption of the GDP-mannose synthesis pathway in *Streptomyces coelicolor* results in antibiotic hyper-susceptible phenotypes. *Microbiology*. 164:614–624. doi:10.1099/mic.0.000636
17. Hsu F-F, Turk J, Owens RM, Rhoades ER, Russell DG. 2007. Structural characterization of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from mycobacterium bovis Bacillus calmette guérin by multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. I. PIMs and Lyso-PIMs. *J Am Soc Mass Spectrom*. 18(3):466–78.
18. Jackson M. 2014. The mycobacterial cell envelope-lipids, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* a021105
19. Keenan T, Dowle A, Bates R, Smith MCM. 2019. Characterization of the *Streptomyces coelicolor* Glycoproteome Reveals Glycoproteins Important for Cell Wall Biogenesis. *MBio*. 25;10(3). pii: e01092-19. doi: 10.1128/mBio.01092-19.
20. Kieser T, Bibb M, et al. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John INNES Foundation, Norwich U. K
21. Korduláková, Gilleron M., Mikusová K., G. Puzo, P.J. Brennan, B. Gicquel, M. Jackson. 2001. Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 277, 31335–31344.
22. Korduláková, Gilleron M., Puzo G., P.J. Brennan, B. Gicquel, Mikusová K., Jackson M. 2003. Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of mycobacterium species, *J. Biol. Chem.* 278 36285–36295.
23. Kovacevic S., Anderson D., Morita Y.S., Patterson J., Haites R., McMillan B.N., Coppel R., McConville M.J., Billman-Jacobe H. 2006. Identification of a novel protein with a role in lipoarabinomannan biosynthesis in mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 281, 9011–9017.
24. Kremer L., Gurucha S.S., Bifani P., Hitchen P.G., Baulard A., Morris H.R., Dell A., Brennan P.J., Besra G.S. 2002. Characterization of a putative α -mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochem. J.* 363 437–447.
25. Jackson, D.C. Crick, P.J. Brennan. 2000. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 275 30092–30099.
26. MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H. and MacNeil, T. 1992. *Gene*, 111, 61-68
27. Mishra, N.N. Driessen, B.J. Appelmelk, G.S. Besra., 2011., Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction, *FEMS Microbiol. Rev.* 35 1126–1157.

28. Morita, Fukuda T., Sena C.B., Yamaryo-Botte Y., McConville M.J. and Kinoshita T. 2011. Inositol lipid metabolism in mycobacteria: biosynthesis and regulatory mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 630–641.
29. Morita Y.S., Sena C.B., Waller R.F., Kurokawa K., Sernee M.F., Nakatani F., Haites R.E., Billman-Jacobe, M.J. McConville, Y. Maeda, T. Kinoshita. 2006. PimE is a polyprenolphosphate- mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25143–25155.
30. Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D.A. 1996. *Mol. Microbiol.*, 21, 77-96
31. Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, NY.
32. Sancho-Vaello E., et al. 2012. Structural basis of phosphatidyl-myo-inositol mannosides biosynthesis in mycobacteria, *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.116/j.bbaliip.2016.11.002>
33. Sandoval-Calderon M., Nguyen D.D., Kapon, Herron, P., Dorrestein P.C., Sohlenkamp C. 2015. Plasticity of *Streptomyces coelicolor* membrane composition under different growth conditions and during development, *Front. Microbiol.*
34. Sandoval-Calderon M. 2016. Síntesis de lípidos polares y remodelación de la membrana en *Streptomyces coelicolor* y otros actinomicetos. Tesis de doctorado. UNAM
35. Sandoval-Calderon, M., et al. 2017. Knowns and unknowns of membrane lipid synthesis in streptomycetes, *Biochimie* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.008>
36. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. 2013., *EMBO J*, 32(10):1478-88
37. Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ. 1995. Constructions of thioestrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene.*;166:133–137. doi: 10.1016/0378-1119(95)00545-2.
38. Tera M, Raich L, Albasa-Jové D, Trastoy B, Prandi J, Gilleron M, Rovira C, Guerin ME. 2018. The molecular mechanism of substrate recognition and catalysis of the membrane acyltransferase PatA from mycobacteria. *ACS Chem Biol* 13:131–140. doi:10.1021/acscchembio.7b00578
39. Weidenmaier C, Peschel A. 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol.*;6:276–287. doi:10.1038/nrmicro1861
40. Zhang, G., Tian, Y., Hu, K., Zhu, Y., Chater, K. F., Feng, C. 2012. Importance and regulation of inositol biosynthesis during growth and differentiation of *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* 83, 1178–1194.