



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión del regulador transcripcional SCO3986 de
Streptomyces coelicolor en *Escherichia coli***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JESÚS EMILIANO CAMPOY ROMÁN



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2024**



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.

DATOS DEL JURADO

- **Dra. Ángela Victoria Forero Forero**
- **Dra. Beatriz Ruiz Villafán**
- **Dra. Claudia Segal Kischinevzky**
- **Dra. Rosario Pérez Molina**
- **Dr. Sergio Sánchez Esquive**

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial (C-106) del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM a cargo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Tutor del tema:

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Sustentante:

Jesús Emiliano Campoy Román

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez por permitirme realizar mi servicio social y proyecto de tesis de licenciatura en su laboratorio y por darme su apoyo profesional durante mi estancia.

A la Dra. Nathaly Vásquez por donar una muestra de la proteína de fusión α -cristalinaDFA-6xHis de *Mycobacterium tuberculosis*.

Al Dr. Daniel Guillén por donar una muestra del plásmido pQE31.

A la Dra. Romina Rodríguez por haberme permitido hacer uso del equipo de su laboratorio.

A mis sinodales, Dra. Ángela Forero, Dra. Beatriz Ruiz, Dra. Claudia Segal, Dra. Rosario Pérez, y Dr. Sergio Sánchez, por disponer su tiempo en leer y corregir mi tesis de licenciatura.

Al CONAHCYT, por el financiamiento otorgado al proyecto de investigación bajo el registro AI-S9143.

DEDICATORIA

A mi madre, Martha Judith Román, por su amor incondicional y su inmenso apoyo. Su inagotable cariño ha dejado en mi la enseñanza de la esperanza y ver el lado positivo de las cosas.

A mi padre, José Rafael Campoy, porque, aunque no se encuentre hoy, su recuerdo perdura conmigo en las metas y proyectos del hoy y el mañana.

A mis tutores del laboratorio Dr. Sergio Sánchez y Dra. Beatriz Ruiz, porque su apoyo y aliento me ha permitido entender lo que representa el trabajo en la ciencia: un trabajo humanitario y de suma dedicación.

A mis amigos más cercanos, Lizeth, Hilda, Janneth y Giovanni, porque en ustedes veo el reflejo de mis virtudes y mis vicios.

A mis compañeros de laboratorio, por el tiempo que hemos pasado juntos conversando, discutiendo y riendo. A todos ustedes: Dr. Fernando, Alma, Berenice, Carlos, Rodrigo, Alessandra, Gladys, Thalía, Valerie, Ximena, Andrea y Rosalía

ÍNDICE

1 RESUMEN	2
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades de los estreptomicetos.....	3
2.2 La represión catabólica por carbono y la glucosa cinasa	4
2.3 Ruta independiente y dependiente de GlkA	6
2.4 Análisis transcriptómico diferencial	8
3 ANTECEDENTES	10
3.1 Los reguladores transcripcionales en <i>Streptomyces</i>	10
3.2 Caracterización del regulador transcripcional SCO3264.....	11
3.3 Caracterización del regulador transcripcional SCO3986.....	11
4 JUSTIFICACIÓN	13
5 HIPÓTESIS	14
6 OBJETIVO GENERAL	14
7 MÉTODO	15
7.1 Cepas microbianas y plásmidos	15
7.2 Clonación del gen <i>sco3986</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
7.3 Amplificación de <i>sco3986</i> por PCR.....	17
7.4 Inserción de <i>sco3986</i> en el plásmido pQE31	17
7.5 Secuenciación de la construcción pQE3986.....	18
7.6 Transformación de pQE3986 en <i>E.coli</i> M15	18
7.7 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986	19
7.8 Expresión de 6xHis-SCO3986 a tres tiempos de inducción.....	19
7.9 Expresión de 6xHis-SCO3986 a tres concentraciones de inducción	20
7.10 Separación de 6xHis-SCO3986 en fase soluble e insoluble.....	20
7.11 Preparación geles para electroforesis unidireccional SDS-PAGE.....	21
7.12 Preparación de western blot.....	22
8 RESULTADOS	23
8.1 Extracción de gDNA de <i>Streptomyces coelicolor</i> M145	23
8.2. Amplificación por PCR de <i>sco3986</i>	23
8.3 Clonación de <i>sco3986</i> en pQE31.....	26
8.4 Secuenciación de pQE3986.....	29
8.5. Expresión de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986	29
9 DISCUSIÓN	32
10 CONCLUSIÓN	35
11 PROSPECTIVAS	36
12 BIBLIOGRAFÍA	37
13 ANEXOS	42

1. RESUMEN

En las bacterias existen mecanismos regulatorios que controlan el transporte, así como la utilización secuencial y ordenada de diferentes fuentes de carbono, fenómeno catalogado como represión catabólica por carbono (RCC). La RCC se define como el mecanismo que inhibe transportadores y reprime la síntesis de las enzimas encargadas del uso de fuentes de carbono secundarias, en presencia de una fuente de carbono preferencial, como la glucosa.

Desde hace muchos años se le ha dado un papel regulatorio a la glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) dentro de la RCC en el género *Streptomyces*. Por estudios comparativos de secuencia, se ha observado que la ATP-Glk pertenece a la familia ROK de proteínas regulatorias, pero es incapaz de regular por unión directa al DNA. Por lo anterior, se ha sugerido que esta enzima podría ejercer su papel regulatorio mediante su interacción con otras proteínas.

En un análisis transcriptómico entre la cepa silvestre del modelo *Streptomyces coelicolor* M145 y una cepa mutante carente de ATP-Glk, y complementada con el gen *glk* de *Zymomonas mobilis* se observaron nueve reguladores transcripcionales con expresión modificada. De entre ellos, el probable regulador codificado por *sco3986*, pertenece a la familia GntR de proteínas involucradas en la regulación del metabolismo primario y secundario.

El análisis *in silico* de *sco3986* ha mostrado que podría regular positivamente la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor* M145. Sin embargo, resta comprobar experimentalmente que SCO3986 es capaz de unirse a los promotores de los genes blanco-predichos, como son los reguladores positivos ACTII-ORF4 (para actinorrodina) o REDZ (para undecilprodigiosina). Para realizar los estudios de unión es necesario expresar la proteína reguladora, por ello, en este trabajo se clonó y expresó el regulador transcripcional SCO3986 de *S. coelicolor* M145 en *Escherichia coli*. En futuros proyectos se llevará a cabo la purificación de la proteína de fusión y los ensayos de interacción proteína-DNA.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de los estreptomicetos

El phylum Actinomycetota contiene a una diversidad de microorganismos saprófitos residentes del suelo, que poseen una adaptabilidad a un amplio rango de ambientes terrestres y acuáticos y presentan una forma de vida en micelio con reproducción por esporulación. Estas bacterias son Gram positivas, y tienen un alto contenido de G-C en su genoma (Barka *et al.*, 2016; Schoch *et al.*, 2020). El género *Streptomyces* recibe una gran atención porque son organismos abundantes e importantes del suelo para el reciclaje de material orgánico. Este género es el taxón con mayor número de especies, llegando a tener alrededor de 700; y son los organismos que producen metabolitos secundarios con la mayor diversidad química (Nett *et al.*, 2009).

Los estreptomicetos producen aproximadamente dos tercios de los antibióticos conocidos (Barka *et al.*, 2016). La exploración genética en *Streptomyces* ha revelado que estos organismos poseen cromosomas lineales de aproximadamente 8-10 Mbp, los cuales contienen hasta 20 clústeres codificantes de genes involucrados en metabolismo secundario (e.g., biosíntesis de policétidos, péptidos no ribosomales, terpenoides, etc.) (Nett *et al.*, 2009).

En general el metabolismo secundario es influenciado por la disposición de nutrientes en el medio, como puede ser nitrógeno, fosfato y carbono. A raíz de esto, se ha visto que, si en el medio existe una fuente de carbono preferencial como es el caso de la N-acetilglucosamina y la glucosa, hay un efecto negativo sobre la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces coelicolor* (van Wezel & McDowall, 2011).

La cepa de *S. coelicolor* M145 se ha utilizado ampliamente como modelo de estudio, debido a que carece de plásmidos (en comparación con su cepa parental A 3(2), que posee dos plásmidos “SCP1” y “SCP2”), y se conoce la secuencia de su genoma por completo (Bentley *et al.*, 2002). Adicionalmente, *S. coelicolor* produce antibióticos que son fácilmente detectables y cuantificables ya que son pigmentados, gracias a eso se le confiere a la especie su epíteto específico “coelicolor” que significa “del color del cielo” en latín (Schlimpert & Elliot, 2023). En *S. coelicolor* se ha encontrado un amplio catálogo de metabolitos secundarios, de los cuales el antibiótico pigmentado azul actinorrodina (ACT) y el antibiótico pigmentado rojo undecilprodigiosina (RED) son utilizados como marcadores de los cambios en la regulación del metabolismo secundario. Otros antibióticos de *S. coelicolor* son la coelomicina (CPK, conocida previamente como policétido

críptico), el antibiótico dependiente de calcio (CDA) y la metilenomicina codificada en plásmido (MM) (Ruiz-Villafán et al., 2022).

2.2 La represión catabólica por carbono y la glucosa cinasa

En la naturaleza, las bacterias optan por el uso preferente de algunas fuentes de carbono sobre otras, debido principalmente a su disponibilidad y facilidad para metabolizarlas. De estas fuentes de carbono, la glucosa ha sido la más estudiada, sobre todo dentro del mecanismo de represión catabólica por carbono (RCC). Dicho fenómeno se define como la inhibición de la expresión de enzimas encargadas del uso de fuentes de carbono secundarias, en presencia de una fuente de carbono preferencial (Görke & Stülke, 2008).

La RCC ha sido estudiada en modelos para bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y en Gram positivas con bajo contenido de G-C como *Bacillus subtilis* (figura 1). En ambos modelos, juega un papel central el sistema de transferencia de grupos fosfato dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). El PTS permite el transporte y la fosforilación de diversas fuentes de carbono, incluida la glucosa. En el PTS, el grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) es transferido a la enzima EI, la cual lo traslada a su vez a la enzima HPr, para finalmente transferirlo a las enzimas EII específicas para cada carbohidrato. La enzima EIIB fosforilada ($P\sim EIIB^{Glc}$) se une al transportador que se encuentra en la membrana, EIIC, para formar el complejo proteico (EIIBC). Cuando se percibe glucosa en el medio, $P\sim EIIB^{Glc}$ se disocia de $EIIC^{Glc}$, permitiendo la fosforilación de la glucosa, dejando a $EIIB^{Glc}$ en su forma no-fosforilada. Este sistema permite el transporte y la fosforilación concomitante del carbohidrato. En el caso de *E. coli*, la enzima reguladora de la RCC por glucosa es EII^{Glc} y en el caso de *B. subtilis* es HPr (Deutscher, 2008).

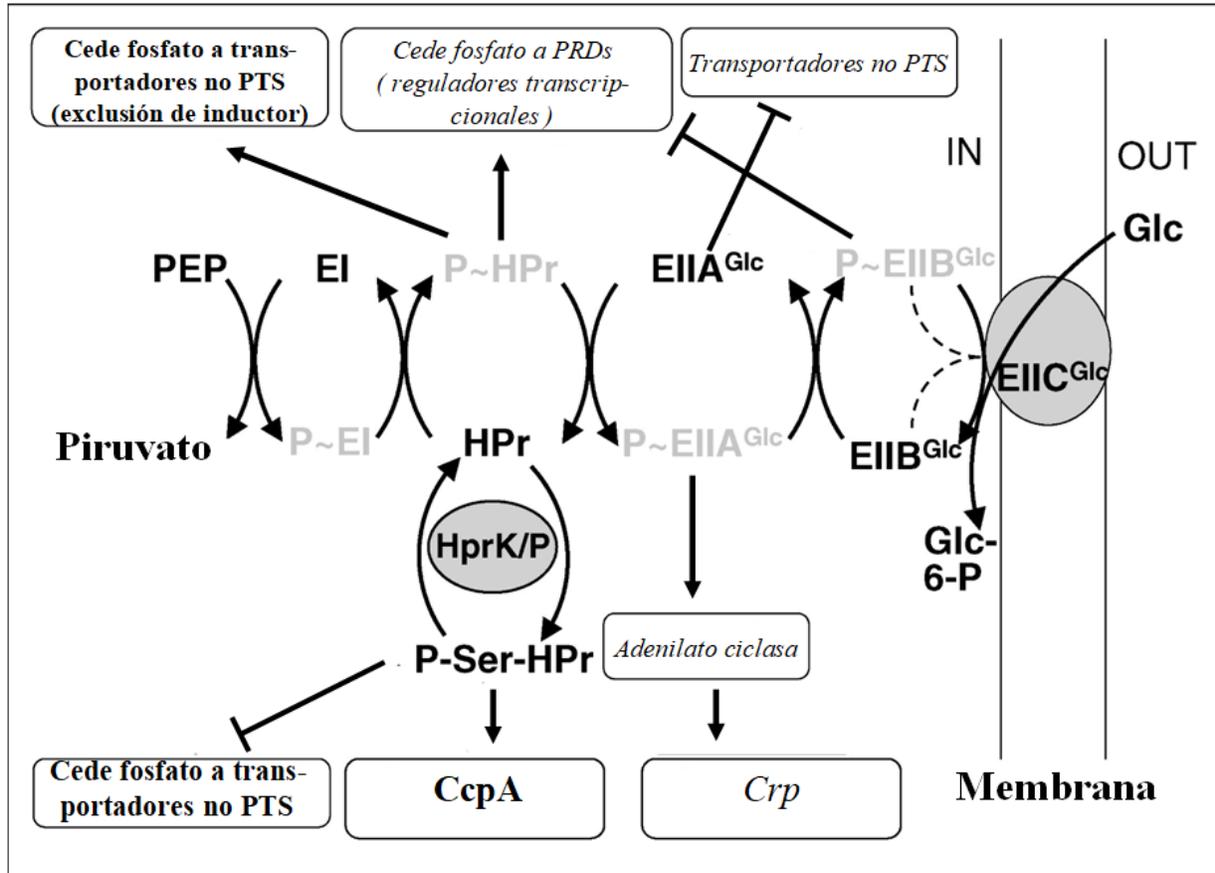


Figura 1. El sistema PTS y sus proteínas regulatorias en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. El fosfoenolpiruvato (PEP) dona el grupo fosfato a las proteínas EI, HPr, EIIA y EIIB y proporciona la energía necesaria para el paso transporte de glucosa catalizado por EIIC. Estas proteínas aparecen desfosforiladas (letras negras) o fosforiladas (letras grises), y tienen un papel estimulador o inhibitorio, según sea el caso. El proceso regulatorio exclusivo en *E. coli* está escrito en *italicas*, y para *B. subtilis*, en *letras negras*. En *B. subtilis*, HPr es fosforilable en Ser-46 o His-15 en una reacción dependiente de ATP por la proteína HprK/P. Este evento regulatorio repercute sobre los dominios regulatorios de PTS (PRDs). Los PRDs son antiterminadores de unión a RNA fosforilables por P~His~Hpr para su activación y P~EIIB^{Glc} regula la fosforilación de los PRDs al inhibir su actividad. Por otro lado, existen reguladores globales de la RCC como la proteína A de control catabólico (CcpA) para *B. subtilis*, que se une a P~Ser~Hpr para formar un complejo de unión a los sitios de sensibles a elementos catabólicos (cre), y la proteína receptora de adenosín monofosfato cíclico (Crp) para *E. coli*. Imagen modificada de Deutscher, 2008.

En *Streptomyces* existe PTS, sin embargo, a diferencia de *E. coli* y *B. subtilis*, el PTS regula la RCC por N-acetilglucosamina (NAG) y fructosa, por medio del complejo proteico de EII que reconoce a NAG y fructosa (Romero-Rodríguez *et al.*, 2017). Se ha reportado que, a diferencia de la mayoría de las bacterias, alterar los genes responsables del sistema PTS no afecta a la represión por glucosa, ya que su flujo es mediado por la proteína GlcP de simporte de glucosa acoplado a

protones. Esto significa que el control del sistema regulatorio de la glucosa no depende de PTS (Urem *et al.*, 2016).

Desde inicios del estudio de la RCC en *Streptomyces* se ha considerado a la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) como la proteína regulatoria de la represión por glucosa. En general, la ATP-Glk es la enzima que fosforila a la glucosa, en presencia de iones Mg^{2+} y un donador de grupo fosforilo (ATP, PP o ADP). Hodgson en 1982 aisló mutantes de *S. coelicolor* resistentes a un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (DogR), que ya no presentaban represión por glucosa. Se observó que este fenotipo se debía a la presencia de mutaciones en el gen de la enzima ATP-Glk. Posteriormente, al complementar mutantes DogR con un gen ortólogo de glucosa cinasa (*ZmGlkA*) de la bacteria Gram negativa *Zymomonas mobilis* se recuperaba la actividad de glucosa cinasa, crecimiento en glucosa, sensibilidad a 2-desoxiglucosa, pero no la RCC. Por lo que se sugirió una función dual regulatoria/catalítica de la enzima ATP-Glk de *S. coelicolor*. Por otro lado, las mutantes sin ATP-Glk podían recuperar la utilización de glucosa (Glc^+) al cabo de varias generaciones, pero no la represión, por lo que se sugiere la presencia de otra glucosa cinasa aparte de ATP-Glk (Angell *et al.*, 1994). Sorprendentemente las mutantes en el gen *ATP-glk*, además de ser incapaces de reprimirse por glucosa, tampoco se reprimen por otras fuentes de carbono que no se metabolizan por la vía glucolítica (arabinosa o glicerol, por ejemplo), por lo que se concluyó que la ATP-Glk tenía un papel global en la RCC (Kwakman & Postma, 1994).

En un análisis de la secuencia de la ATP-Glk de *S. coelicolor* se encontraron los sitio consenso de la familia ROK (“Repressor-Orf-Kinase”), que es una familia de proteínas con actividad cinasa y de unión a DNA (Titgemeyer *et al.*, 1994). Sin embargo, la ATP-Glk de *S. coelicolor* no tiene motivos de unión al DNA característicos de esta familia, por lo que se ha sugerido que probablemente su efecto regulatorio se lleve a cabo a través de su interacción con otras proteínas regulatorias, por ejemplo, la proteína GlcP (van Wezel *et al.*, 2007).

2.3 Ruta independiente y dependiente de GlkA

Aunque la ATP-Glk ha tenido un papel central en la RCC en el género *Streptomyces*, ya existían resultados que mostraban que esta enzima no era la única involucrada en la regulación por carbono. En el análisis de la secuencia de un fragmento de DNA que era capaz de revertir de manera parcial

la mutación en *ATP-glk*, Angell *et al.* (1992) encontraron que para que se recuperara por completo el fenotipo silvestre, era necesario un gen río arriba de *ATP-glk* denominado actualmente como *sco2127*. Esto llamó la atención pues aún hoy en día no hay ninguna función asociada a ese gen. Por otro lado, en la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (productora del antitumoral doxorubicina) se ha visto que el mecanismo de regulación por glucosa no depende solamente de la ATP-Glk. Ramos y col. en 2004 observaron que la tasa de transporte de glucosa/actividad de Glk es importante para establecer la regulación por carbono en esta cepa.

Por otra parte, cepas de *S. coelicolor* carentes de *sco6008* (*rok7B7*) se ven afectadas en la RCC, el crecimiento y el metabolismo secundario. El perfil proteómico de la cepa mutante muestra una alta expresión de *ATP-glk*, *glcP* y del operón transportador de xilosa *xylFGH* (Świątek *et al.*, 2013).

Como se dijo anteriormente, se ha postulado que la ATP-Glk podría ejercer su acción regulatoria por una interacción con otras proteínas. Un ejemplo de ello es la probable interacción de ATP-Glk con el transportador de glucosa (GlcP). Van Wezel *et al.* (2007) encontraron que cuando se cultivaba a *S. coelicolor* en presencia de glucosa, observaban a ambas proteínas (ATP-Glk y GlcP) en la misma fracción asociada a membrana, lo que no se veía cuando la bacteria era cultivada sin glucosa.

Interesados por entender la compleja estructura regulatoria alrededor de la ATP-Glk, Gubbens y col. (2012) realizaron un análisis proteómico donde reportaron que posiblemente existen dos vías para la regulación por carbono, una dependiente y otra independiente de ATP-Glk, que influyen en la producción de metabolitos secundarios. El análisis proteómico involucró la comparación entre una cepa de *S. coelicolor* carente de ATP-Glk con la cepa silvestre M145, ambas crecidas en diferentes fuentes de carbono. En esta comparación se encontraron diferencias significativas en la expresión de enzimas que participan en vías del metabolismo primario y secundario que no requieren a la ATP-Glk para su represión. Ejemplos de lo anterior son la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) que se mantienen activos mientras exista flujo de glucosa, ya que GlcP puede ser la proteína que controla estas rutas.

De hecho, para la regulación del metabolismo secundario no siempre hay una predominancia de la regulación por glucosa. Este es el caso de la regulación por el carbohidrato N-acetil glucosamina (NAG). NAG se transporta por el sistema PTS y ejerce una represión catabólica hacia la producción de metabolitos secundarios por medio del efector alostérico DasR. Por lo tanto, el

operón PTS-NAG en *S. coelicolor* es inducible por NAG y está constituido por las enzimas pstI (fosfotransferasa EI), crr (IIACrr transportador específico), pstH (proteína acarreadora HPr), y NagE2 (sub-unidad del transportador tipo ABC para NAG) (Ruiz-Villafán *et al.*, 2022).

NAG~6P funciona como un efector alostérico negativo de DasR, regulador de la familia GntR, familia de reguladores que actúan sobre el metabolismo primario, secundario y la formación de micelio aéreo en *Streptomyces*. También, indirectamente AtrA (factor transcripcional de la familia TetR) controla la actividad de DasR al unirse al promotor de *nagE2*, que activa su expresión y permite el transporte de NAG, lo que ocasiona la inhibición de DasR al tener NAG-6P (Urem *et al.*, 2016). La inhibición de DasR afecta directamente el metabolismo secundario, ya que al no tener una cantidad suficiente de NAG-6P, se evita la unión de DasR hacia *actII-ORF4* y *redZ* (activadores de la transcripción para la producción de metabolitos secundarios), y por consecuencia se activa la producción de ACT y RED (Ruiz-Villafán *et al.*, 2022).

2.4 Análisis transcriptómico diferencial

Con el objetivo de estudiar la regulación dependiente e independiente de ATP-Glk, Romero-Rodríguez *et al.* (2016) realizaron un análisis transcriptómico diferencial en *S. coelicolor* M145. En este trabajo, se analizaron dos condiciones diferenciales, en la primera se comparó la cepa mutante de *ATP-glk* complementada con el gen ortólogo *ZmGlkA* de *Zymomonas mobilis* y la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145 cultivadas en glucosa y agar. En la segunda condición, se comparó la cepa silvestre M145 bajo condiciones represivas y no represivas, es decir en medio con glucosa y agar, y solamente con agar, respectivamente.

En esta segunda condición (Glc/Agar) se encontraron 261 genes sobre expresados y 390 genes subexpresados. Mientras que en la primera condición (GlkScoM145/GlkZm) hubo 85 genes sobre expresados y 96 subexpresados

Lo más destacable de este trabajo fue que el 15% de los genes expresados diferencialmente en Glc/Agar y GlkScoM145/GlkZm comprenden reguladores globales de procesos metabólicos y de respuesta a estímulos. En la comparación de GlkScoM145/GlkZm, se encontraron nueve genes codificantes de proteínas regulatorias pertenecientes a las familias GntR (*sco3264*, *sco3986*), LuxR (*sco4261*), SARP (*sco6288*), ArgR (*sco1576*); y probables MerR (*sco3413*, *sco5025*, *sco7530*,

sco7698). Interesantemente, el regulador *sco3986* tiene el mayor valor estadístico comparado con los demás reguladores.

3. ANTECEDENTES

3.1 Los reguladores transcripcionales en *Streptomyces*

En todos los microorganismos, la regulación transcripcional génica permite adaptarse a las diferentes condiciones de su entorno. Para llevar a cabo dicha regulación, se requiere el uso de reguladores transcripcionales (RTs), que son proteínas de unión a promotores para aumentar o disminuir la transcripción de genes específicos o de múltiples genes (reguladores pleiotrópicos) (Browning & Busby, 2004). Generalmente, los RTs están compuestos por dos dominios: uno funciona como sensor para señales internas y externas, y el otro interactúa con el DNA blanco utilizando motivos de unión como es hélice-bucle-hélice (Ishihama, 2012). Los RTs pueden actuar como represores mediante varios mecanismos: compitiendo con un activador por el sitio de unión; uniéndose al sitio promotor e impidiendo el acceso a la RNA polimerasa; o uniéndose a secuencias río abajo del promotor para impedir la transcripción (Romero Rodríguez *et al.*, 2015).

Los RTs son clasificados de acuerdo con sus dominios de unión al DNA, secuencia de aminoácidos, estructura y función. Santos *et al.* (2009) realizaron un análisis estadístico para clasificar los reguladores transcripcionales por medio de sus dominios de unión al DNA tipo HTH. Esta distribución fue utilizada para dividir a las familias en dos grupos regulatorios, el primer grupo contiene reguladores transcripcionales del metabolismo primario como son funciones básicas (crecimiento, reproducción, comunicación, etc.) y el segundo contiene reguladores de homeostasis a metales o de respuesta a estrés.

El género *Streptomyces* presenta proteínas regulatorias pertenecientes a diferentes familias de reguladores y también familias propias de las actinobacterias, como por ejemplo las familias SARP y WhiB (Romero Rodríguez *et al.*, 2015). En el análisis transcriptómico realizado por Romero-Rodríguez y col. (2016), observaron nueve proteínas regulatorias de distintas familias que tienen relación con la ATP-Glk en *S. coelicolor*, en las que sobresalen los reguladores SCO3264 y SCO3986 de la familia GntR.

La familia GntR está involucrada en la regulación de procesos metabólicos centrales, como es el mantenimiento de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y de carbono. Específicamente en *Streptomyces* las proteínas GntR se asocian con otras funciones como la formación de micelio y metabolismo secundario (Hoskisson & Rigali, 2009). Los reguladores GntR poseen un dominio de unión al DNA hélice-bucle-hélice en el extremo N terminal y un dominio de unión a molécula

inductora/efectora en el extremo C terminal (Romero-Rodríguez *et al.*, 2015). Un ejemplo de regulador GntR ampliamente estudiado es DasR, que fue mencionado previamente por su importancia en regulación del metabolismo secundario.

3.2 Caracterización del regulador transcripcional SCO3264

En su tesis de maestría de 2018, Manzo realizó una predicción de firmas de secuencias de DNA de los nueve reguladores transcripcionales dependientes de ATP-Glk, lo que dio paso a generar una lista de genes blanco-putativos. Pese a que SCO3264 y SCO3986 fueron los reguladores con mayor número de genes involucrados en el metabolismo del carbono, se seleccionó a SCO3264 para el estudio debido a que la mayoría de sus posibles genes blanco eran proteínas identificables, a diferencia de SCO3986 donde en su mayoría se trataba de proteínas hipotéticas.

Los resultados obtenidos del estudio de caracterización de la cepa mutante carente de *sco3264* revelaron que este regulador tiene actividad represora sobre *ATP-glk* y *dagA* (gen que codifica una agarasa y que es susceptible a RCC por glucosa), ya que se vio un aumento en la expresión de estos genes. También hay disminución en la expresión de *sco3986*, lo que sugiere que SCO3264 es un activador de *sco3986*.

3.3 Caracterización del regulador transcripcional SCO3986

El regulador transcripcional SCO3986, al igual que SCO3264, mantiene relación con la RCC y el metabolismo secundario. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se caracterizó una cepa mutante carente de *sco3986* para comparar la actividad de ATP-Glk, consumo de glucosa y producción de ACT y RED con respecto a la cepa silvestre. También se caracterizó el perfil de expresión de los posibles genes blanco, entre los que se encuentran: *ATP-glk*, *sco1939* (6-fosfogluconolactonasa; enzima que participa en la vía pentosa fosfato), *sco1701* (acil-CoA deshidrogenasa; enzima que participa en el metabolismo de lípidos), *actII*, *redD* y *redZ* (activadores de la transcripción para la producción de metabolitos secundarios) y *dagA* (agarasa).

Los resultados mostraron un aumento en el consumo de glucosa y en la actividad de ATP-Glk, pero disminución en la producción de ACT y RED en la cepa mutante, probablemente debido a la

disminución de la expresión de los reguladores específicos de la producción de ACT y RED, como lo son *actII*, *redY* y *redZ*, así como los genes *sco1701* y *sco1939*, que codifican para las enzimas involucradas en las vías metabólicas mencionadas anteriormente. Estas evidencias en conjunto sugieren que SCO3986 funciona como un posible activador de la producción de antibióticos.

Por lo tanto, la realización de ensayos que permitan determinar la unión de SCO3986 con sus posibles genes blanco-definidos únicamente por análisis *in silico* podría contribuir en su caracterización como activador transcripcional.

4. JUSTIFICACIÓN

Con el fin de comprender el mecanismo de la RCC en *Streptomyces coelicolor* se han analizado *in silico* los probables genes blanco del regulador SCO3986 de la familia GntR. Para comprobar la unión de SCO3986 a los promotores de sus genes blanco, es necesario expresarlo y purificarlo para realizar ensayos tipo EMSA. Por ello, en este trabajo se plantea realizar la clonación y expresión del gen *sco3986* en *Escherichia coli*, para su uso posterior en ensayos de unión a DNA.

5. HIPÓTESIS

Manipulando los parámetros de inducción (concentración de IPTG y tiempo), será posible producir la proteína reguladora SCO3986 de *Streptomyces coelicolor* en *Escherichia coli* para su futura purificación.

6. OBJETIVO GENERAL

Clonar y expresar el regulador transcripcional *sco3986* en un sistema heterólogo.

Objetivos particulares

- Clonar el gen *sco3986* por PCR en el plásmido pQE31
- Expresar la proteína 6xHis-SCO3986 en *Escherichia coli* M15.

7. MÉTODO

7.1 Cepas microbianas y plásmidos

La cepa de *Streptomyces coelicolor* M145 (John Innes Centre, Norwich, UK) fue cultivada para esporulación en medio MS (Ver anexo) a 28-29 °C por siete días. Para su conservación, las esporas se recolectaron y almacenaron en glicerol al 20% v/v a -20 °C (Shepherd *et al.*, 2010).

Las cepas de *Escherichia coli* y los plásmidos se enlistan en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB (Ver anexo) a 37 °C. Para su conservación, se prepararon suspensiones de las células en glicerol al 20% y se almacenaron a -70 °C (Tuttle *et al.*, 2021).

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepas	Genotipo
NEB5 α (NEB)	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ (lac- proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ Δ M15] hsdR17(rK-mK+)
M15 (Qiagen)	F-, Φ 80 Δ lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+ , KmR
Plásmidos	
pQE31 (Qiagen)	Promotor T5; dos operadores <i>lac</i> ; sitio de unión al ribosoma RBSII; etiqueta 6xHis; terminadores transcripcionales t ₀ y T1; resistencia a ampicilina; y origen de replicación ColE1.
pREP4 (Qiagen)	Represor <i>lac I</i> ; resistencia a kanamicina; replicón p15A; compatibilidad con ColE1.

7.2 Clonación del gen *sco3986* de *Streptomyces coelicolor* M145

El gen *sco3986* de *S. coelicolor* M145 se aisló por amplificación por PCR. Para ello, fue necesario extraer DNA genómico de la bacteria.

La extracción de DNA genómico (gDNA) se realizó según el protocolo reportado por Gómez Ortiz en 2020, con las siguientes modificaciones:

Se inocularon placas con medio TSA (ver anexo) con esporas de *S. coelicolor* M145 y se incubaron de cinco a siete días a 29 °C. Después de este tiempo, las esporas se cosecharon, se separaron del micelio, se lavaron y finalmente se resuspendieron en solución salina al 0.85% estéril. Posteriormente, se inoculó 1 mL de esa suspensión de esporas en un matraz bafleado de 250 mL con 33 mL de medio líquido YEME (ver anexo) suplementado con 0.5% glicina y 5mM MgCl₂. El matraz se incubó a 29 °C por 40-45 h (180 rpm).

Una vez transcurrida la incubación, el cultivo se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se recuperó el botón celular y se lavó dos veces con 15mL de solución de sacarosa al 10.3% estéril. El botón celular se suspendió en 4 mL de buffer L (ver anexo) con lisozima 1.5 mg/mL y se incubó 1 h a 30°C, con homogeneización cada 15 min. Este paso permite la generación de protoplastos, así que una vez obtenidos, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para eliminar el buffer con lisozima.

Los protoplastos se suspendieron en buffer P (ver anexo) hasta homogeneidad, posteriormente se adicionaron 200 µL de EDTA 0.5 M pH 8, 4 mL de SDS al 10% y 5 mL de NaCl 6 M, teniendo cuidado de agitar por inversión cada vez que se añade cada reactivo. La mezcla obtenida se dejó por 30 min a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm por 30 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó por 30 min a 4 °C.

Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm por 20 min, se recuperó el botón con gDNA y se lavó en un volumen de etanol 70%. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones, y se recuperó el botón para secarlo y suspenderlo en 1mL de buffer TE pH 8 (ver anexo).

Para remover el RNA de las muestras, se agregó RNAsa a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó 1h a 37 °C. Al final de la incubación se limpiaron las muestras con un volumen de fenol/cloroformo (50:50 v/v), se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se separó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio. Para remover el fenol se adicionó un volumen de cloroformo, se centrifugó y se separó la fase acuosa en un tubo limpio. Para precipitar el gDNA al sobrenadante recuperado se le agregó 0.1 volumen de NaCl al 0.85% y un volumen de isopropanol, se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se centrifugó y al botón se le agregó un volumen de etanol al 70%, para posteriormente centrifugar nuevamente, dejar secar y resuspender en agua ultra estéril.

7.3 Amplificación de *sco3986* por PCR

La clonación del gen *sco3986* se realizó en el plásmido de expresión pQE31 en fusión con una etiqueta de histidinas para facilitar su detección y posterior purificación. Por ello, para la clonación de *sco3986* se diseñaron cebadores específicos para su amplificación y posterior clonación utilizando la técnica de ensamble de Gibson (Gibson *et al.*, 2009). La secuencia del gen *sco3986*, se obtuvo de la base de datos StrepDB (<https://strepdb.streptomyces.org.uk>). Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta NEBuilder Assembly Tool (<https://nebuilder.neb.com>). Para la clonación de *sco3986* en pQE31 y que quedaran en marco de lectura con la etiqueta de histidinas, fue necesario agregar un nucleótido río arriba del codón de inicio de dicho gen.

Cebadores para la amplificación de *sco3986*:

Forward: 5' ACCATCACCATCACCATACGATGACGTCTCGCCGCCTC 3'.

Reverse: 5' GCTAATTAAGCTTGGCTGCATCATCTGTGCACCTGCCTTTC 3'.

La amplificación de *sco3986* por PCR se realizó utilizando las enzimas Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) y Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB).

7.4 Clonación de *sco3986* en el plásmido pQE31

Una vez amplificado el gen *sco3986* por PCR, se ligó al vector de expresión pQE31 de *E. coli*.

El plásmido pQE31 se extrajo de la cepa NEB5 α por medio del método de extracción de plásmidos por lisis alcalina (miniprep) (Bimboim & Doly, 1979) (ver anexo). Se corroboró la identidad del plásmido al digerir con la enzima de restricción SacI (NEB), que también se utilizó para linealizarlo. Se decidió utilizar el kit comercial NEBuilder HiFi Assembly Master Mix (NEB) para ligar el gen *sco3986* y pQE31, siguiendo las instrucciones del proveedor. La construcción resultante fue denominada pQE3986.

Posteriormente, se prepararon células competentes de *E. coli* JM109 para electroporación (ver anexo). Las células competentes fueron transformadas con la mezcla obtenida del ensamble (ver anexo), y después se inocularon en medio sólido LB con ampicilina a una concentración final de 150 μ g/mL. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 h. Para la selección, se buscaron colonias resistentes a ampicilina. Las colonias seleccionadas fueron cultivadas en medio líquido LB con

ampicilina a 37 °C por 18 h para la extracción de plásmidos y para ser guardadas en glicerol al 20% a -70 °C.

7.5 Secuenciación de la construcción pQE3986

Con el fin de verificar si la secuencia de *sc03986* estaba libre de mutaciones, se secuenció la construcción pQE3986. Cabe mencionar que este paso es crítico en la clonación de secuencias ricas en GC, ya que es necesario verificar que no hayan ocurrido eliminaciones o adiciones de nucleótidos frecuentemente encontradas en este tipo de secuencias amplificadas por PCR. La secuenciación se realizó con los cebadores de pQE31 del protocolo de QIAexpressionist (Qiagen).

Cebadores de pQE31:

Forward (“Type III/IV”): 5’ CGGATAACAATTTACACACA 3’.

Reverse (“Reverse Sequencing”): 5’ GTTCTGAGGTCATTACTGG 3’.

7.6 Transformación de pQE3986 en *E. coli* M15

Una vez verificada la secuencia de la construcción pQE3986, se transformó en la cepa de expresión *E. coli* M15 (con el plásmido pREP4). El plásmido pREP4 QIAexpressionist (Qiagen) posee una alta tasa de iniciación de transcripción gracias al promotor T5 dependiente de la proteína represora lac (rápida inducción al usar isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)) y tiene compatibilidad con el origen de replicación ColE1. La presencia de este plásmido en la cepa M15 le permite un mejor control de la expresión de proteínas que potencialmente sean tóxicas para la bacteria.

Se prepararon células competentes para electroporación y se transformaron con pQE3986. Las células transformadas con pQE3986 se inocularon en placas de medio sólido LB con ampicilina y kanamicina (para conservar a pREP4) a una concentración final de 150 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 h, para posteriormente seleccionar colonias resistentes a ambos antibióticos. Las colonias resistentes fueron inoculadas en medio líquido LB con ambos antibióticos para ser verificadas posteriormente. Una porción del cultivo se guardó en glicerol al 20% a -70 °C.

7.7 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986

Para expresar la proteína de fusión 6xHis-SCO3986, se llevaron a cabo pruebas bajo diferentes condiciones de concentración de IPTG (inductor) y tiempo de inducción. También, con el fin de determinar en qué fracción celular se encontraba la proteína, las células se sonicaron para separar el contenido celular en una fase soluble y una insoluble. Para la purificación de la proteína expresada es preferible que SCO3986 se encuentre en la fase soluble, ya que la proteína soluble mantiene su estructura adecuada y puede ser recuperada en una columna de afinidad a metal (Ni^{2+}).

7.8 Expresión de 6xHis-SCO3986 a tres tiempos de inducción

Como se mencionó anteriormente, se determinaron las condiciones óptimas de expresión de la proteína 6xHis-SCO3986. Para ello se probaron tres tiempos distintos de inducción 1, 4, y 18 h. Los ensayos de expresión se realizaron según el protocolo de QIAexpressionist (Qiagen), con las siguientes modificaciones:

Se realizó un pre-inóculo de *E. coli* M15 (pQE3986 + pREP4) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido LB adicionado con ampicilina y kanamicina a una concentración final de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, y glucosa al 1% en matraces (para mantener reprimida la expresión de la proteína). Se incubó toda la noche a 37 °C y 180 rpm. Al final de la incubación, se tomaron 500 μL del pre-inóculo para inocular nuevamente 50 mL de medio líquido LB (con antibióticos y glucosa al 1%) y se creció a 37 °C a 180 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de ~ 0.6 (aproximadamente 4 h).

Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, el cultivo de células se centrifugó a 8500 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó dos veces con solución salina al 0.85% para quitar el medio con glucosa y antibióticos. Una vez limpias las células, se suspendieron en medio líquido LB con antibióticos, pero sin glucosa, y se tomó una muestra de 1 mL (tiempo 0). Posteriormente, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37 °C y 180 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL a las 1, 4 y 18 h posteriores a la inducción. Las muestras

se centrifugaron a 8500 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se guardaron los botones celulares a -20 °C.

7.9 Expresión de 6xHis-SCO3986 a tres concentraciones de inducción

El ensayo de incubación bajo diferentes concentraciones de IPTG se realizó de acuerdo con el protocolo previamente mencionado en el apartado 7.8, con las siguientes modificaciones:

Se tomaron tres muestras de 200 µL de un preinóculo de *E. coli* M15 (pREP4 +pQE3986) y se inocularon tres matraces de 125 mL con 20 mL de medio líquido LB con antibióticos y glucosa. Se dejaron crecer a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~0.6 para posteriormente lavar las células dos veces con solución salina al 0.85% y ser centrifugadas a 8500 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células recuperadas se suspendieron en tres matraces de 125 mL con 20 mL de medio líquido LB sin glucosa y con antibióticos bajo tres concentraciones distintas de IPTG (0.1, 0.5 y 1 mM). Los matraces se indujeron durante 1 h a 37 °C y 180 rpm. Después de la inducción, se tomaron muestras de 1 mL de los matraces y se centrifugaron a 8500 rpm por 10 min. Se descartaron los sobrenadantes y se guardaron las células a -20 °C.

7.10 Localización de 6xHis-SCO3986 en la fase insoluble

Para purificar la proteína es necesario que esté en la fase soluble, de lo contrario no se podría utilizar la columna de afinidad a metal (Ni²⁺). Con esto en mente, se sonicaron células de *E. coli* M15 (pQE3986 + pREP4) para extraer la proteína 6xHis-SCO3986.

Se preparó un cultivo inducido como se mencionó en la sección 7.8. Posteriormente, el sobrenadante se descartó y las células se suspendieron en 4 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7; DTT 2mM), para sonicarlas (50% de amplitud en un equipo procesador ultrasónico COLE-PARMER CPX750) por tres veces en hielo durante 10 s con descanso de 1 min entre cada pulso de sonicación. Después de la ruptura, las células se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le añadió 125 µL de Tritón X100 al 20% v/v, ajustando el volumen a 2.5 mL con buffer de lisis. El sobrenadante se dejó en agitación suave por 20 min y se centrifugó

a 17500 rpm por 15 min. El sobrenadante final se recuperó (fase soluble) y se le agregó un cóctel denominado cOmplete™ (Sigma) a una concentración final de 1%.

El botón celular restante nuevamente se volvió a suspender en 4 mL de buffer de lisis para repetir el procedimiento de sonicación. En esta ocasión, se sonicó (50% de amplitud) por tres veces durante 20 s y con 1 min de descanso en cada pulso. El botón final (fase insoluble) también se recuperó. Ambas muestras de fases soluble e insoluble se analizaron por geles de poliacrilamida y western blot con anticuerpos monoclonales

7.11 Preparación de geles para electroforesis desnaturizante SDS-PAGE

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% y su tinción con azul de Coomassie se llevaron a cabo según el protocolo reportado en Romero-Rodríguez, (2010). Se ensamblaron las placas de vidrio de 0.75 mm y se verificó que no hubiera fugas al colocar las placas en la base. Las soluciones de poliacrilamida de las fases concentradora y separadora (ver anexo), se vertieron dentro de las placas de vidrio.

Una vez polimerizado el gel se corrió en la cámara de electroforesis con buffer de corrida 1x (ver anexo). Las muestras se prepararon en buffer de carga 6x (ver anexo), se desnaturizaron hirviéndolas por 5 min, y se cargaron en el gel de poliacrilamida. El gel se corrió a 20 mA constantes por cada gel durante aproximadamente 2 h. Posteriormente, se recuperó el gel de la cámara y se tiñó con azul de Coomassie (ver anexo).

7.12 Preparación de western blot

Con el fin de verificar que se expresó la proteína de fusión 6xHis-SCO3986 se realizaron ensayos tipo western blot usando anticuerpos específicos contra la etiqueta de histidinas. Se realizó una transferencia en geles de poliacrilamida a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck Millipore). Una vez transferida la proteína, se incubó con el anticuerpo primario anti 6xHis (Genetex), después de lavarlo se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Genetex) (Gallagher *et al.*, 2011 y Romero-Rodríguez, 2010) (ver anexo).

8. RESULTADOS

8.1 Extracción de gDNA de *Streptomyces coelicolor* M145

La estrategia que se utilizó para clonar el gen *sco3986* implicó la amplificación del gen por PCR. Para ello, fue necesario aislar y purificar DNA genómico (gDNA) de la cepa silvestre *Streptomyces coelicolor* M145 utilizando el método reportado por Gómez, (2020). De esta forma se obtuvo el gDNA a una concentración de 1600 ng/ μ L (Figura 2).

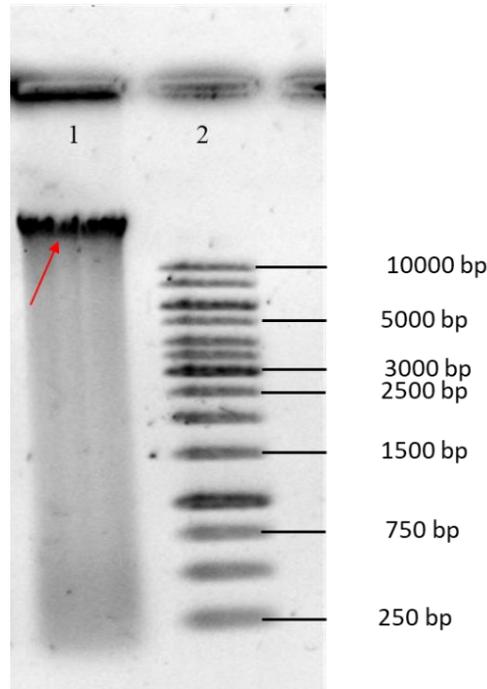


Figura 2. Aislamiento de gDNA de *S. coelicolor* M145 y su detección en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE teñido con bromuro de etidio. Carriles 1: muestra de gDNA extraídas de *S. coelicolor* M145 Carril 2: Marcador de peso molecular 1Kbp (Thermo Scientific)

8.2. Amplificación por PCR de *sco3986*

Se planteó clonar el gen *sco3986* en el plásmido de expresión pQE31 fusionado a una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal. De esta manera se diseñaron cebadores del gen *sco3986* con el fin de amplificar por PCR la secuencia de 732 pb para clonar por ensamble de Gibson.

Para determinar la mejor temperatura de alineamiento de los cebadores, se realizó un gradiente (de 60 a 70 °C) usando la enzima Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) (Tabla 2).

Tabla 2. Amplificación por PCR de *sco3986* con Taq Platinum®.

Concentraciones de reactivos para PCR		
Reactivo	Conc. final	Volumen
gDNA [200-250 ng/μL]	4 ng	2.5 μL
Cebador FW [10 pmol/μL]	0.4 μM	2.0 μL
Cebador RV [10 pmol/μL]	0.4 μM	2.0 μL
MgCl ₂ [50 mM]	1.5 mM	1.5 μL
dNTPs [10 mM]	0.2 mM	1.0 μL
DMSO 100%	5%	2.5 μL
Buffer 10x	1x	5 μL
Taq Platinum DNA polimerasa	50 U	0.2 μL
H ₂ O destilada	-----	33.3 μL
	Volumen final	50.0 μL
Condiciones para amplificación a 30 ciclos		
desnaturalización inicial	94 °C 4 min	
desnaturalización	94 °C 30 s	
alineamiento	60-70 °C 30 s	
extensión	72 °C 1 min	
extensión final	72 °C 5 min	

Como se observa en la figura 3, en todas las temperaturas de alineamiento se observó la banda de amplificación con el tamaño esperado de 732 pb.

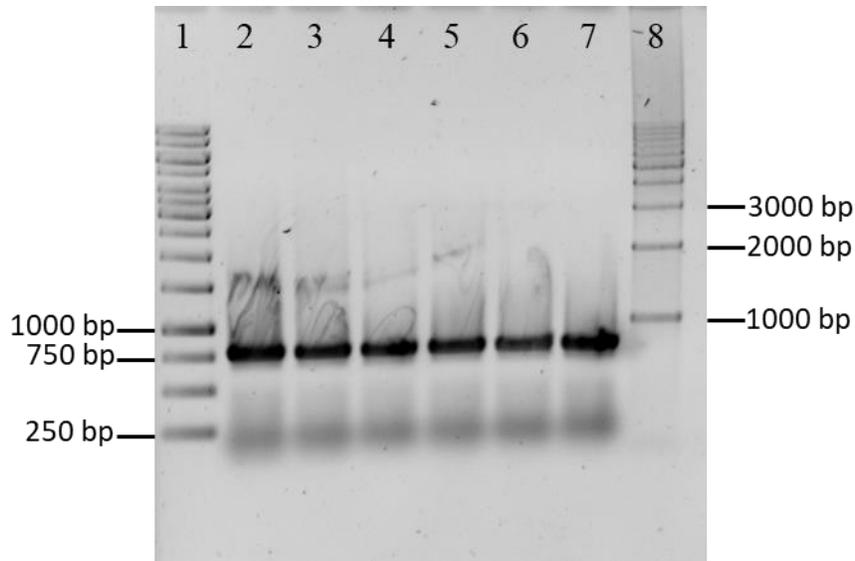


Figura 3. Gradiente de temperaturas de alineamiento para la amplificación del gen *sco3986*. Gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kbp (Thermo Scientific). Carriles 2-7: temperaturas de alineamiento 60,62,64,66,68 y 70 °C respectivamente. Carril 8: Marcador de peso molecular 1Kbp (Jena Bioscience))

Con el experimento anterior, se eligió 68 °C como la temperatura de alineamiento para *sco3986*. En esta condición ya no se ven bandas por encima de 700 pb. Debido a que el genoma de *S. coelicolor* tiene un alto porcentaje de GC, no es recomendable utilizar DNA polimerasas poco fieles como la que se utilizó para hacer el gradiente. De esta forma, con el fin de minimizar la aparición de mutaciones en el gen *sco3986*, se utilizó la enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) (Tabla 3). Se obtuvo un amplicón similar con la enzima Q5 al visualizarse en gel de agarosa al 0.8% (figura 4)

Tabla 3. Amplificación por PCR de *sco3986* con Q5° DNA Polymerase.

Concentraciones de reactivos para PCR	
Reactivo	Volumen Final
gDNA [100 ng/mL]	5.0 µL
Cebador FW [10 pmol/µL]	2.5 µL
Cebador RV [10 pmol/µL]	2.5 µL

Q5 2x Master Mix	25.0 μ L
H ₂ O destilada	15.0 μ L
Volumen final	50.0 μ L
Condiciones para amplificación por 20 ciclos	
desnaturalización inicial	98 °C 30 s
desnaturalización	98 °C 10 s
alineamiento	68 °C 30 s
extensión	72 °C 30 s
extensión final	72 °C 2 min

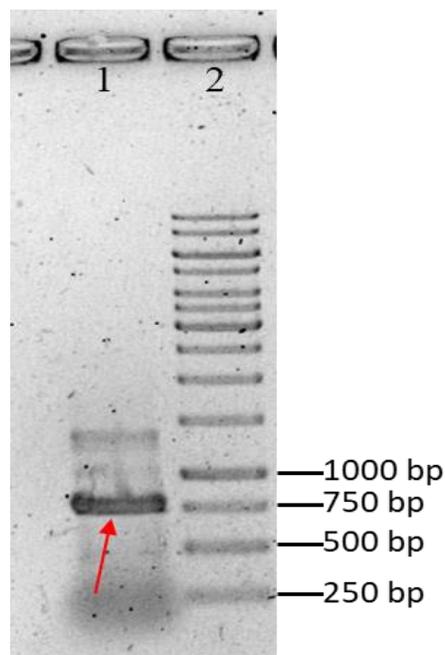


Figura 4. Amplificación del gen *sco3986* con enzima Q5 (NEB). Gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Amplicón de *sco3986* de 732 bp a 66 °C como temperatura de alineamiento. Carril 2: Marcador de peso molecular 1Kbp (Thermo Scientific)

8.3 Clonación de *sco3986* en pQE31

Para la clonación del gen *sco3986* en el plásmido de expresión pQE31 (figura 5), primero se aisló de la cepa *E.coli* DH5 α por el método de lisis alcalina, y se digirió con *SacI* (enzima que corta dentro del sitio de clonación múltiple (MCS) de pQE31) (figura 6).

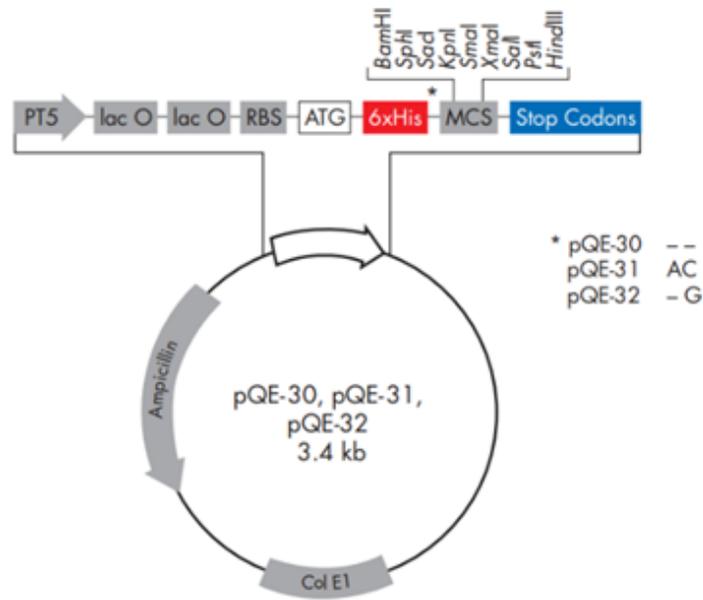


Figura 5. Mapa del plásmido de expresión pQE31. Tomado de QIAexpressionist, 2003

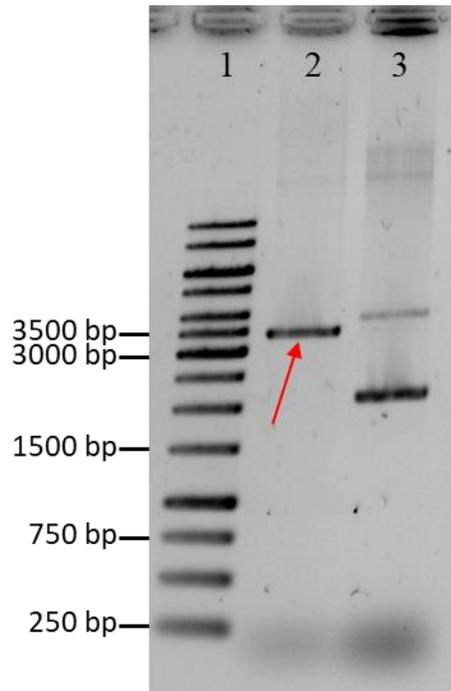


Figura 6. Comprobación de la digestión del plásmido pQE31 con la enzima *SacI*. Gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kbp (Thermo Scientific). Carril 2: pQE31 digerido con *SacI*. Carril 3: pQE31 sin digerir

Una vez confirmada la identidad de pQE31, se llevó a cabo la ligación con *sco3986* para hacer la construcción pQE3986 con el kit comercial NEBuilder HiFi Assembly Master Mix (NEB) (figura 7).

Posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 con la mezcla de reacción del ensamble. De la transformación, se seleccionaron al azar tres colonias resistentes a ampicilina. Se extrajeron los plásmidos de las colonias resistentes a ampicilina por lisis alcalina (figura 8A), obteniendo muestras del plásmido a una concentración de ~1100 ng/μL. Para corroborar la presencia de *sco3986* en pQE3986, se realizó una digestión a un volumen final de 30 μL con 3 μL de muestra y 3 μL de la enzima *EcoRI*, que corta dentro de la secuencia de *sco3986* y río arriba de la etiqueta de histidinas (figura 8B).

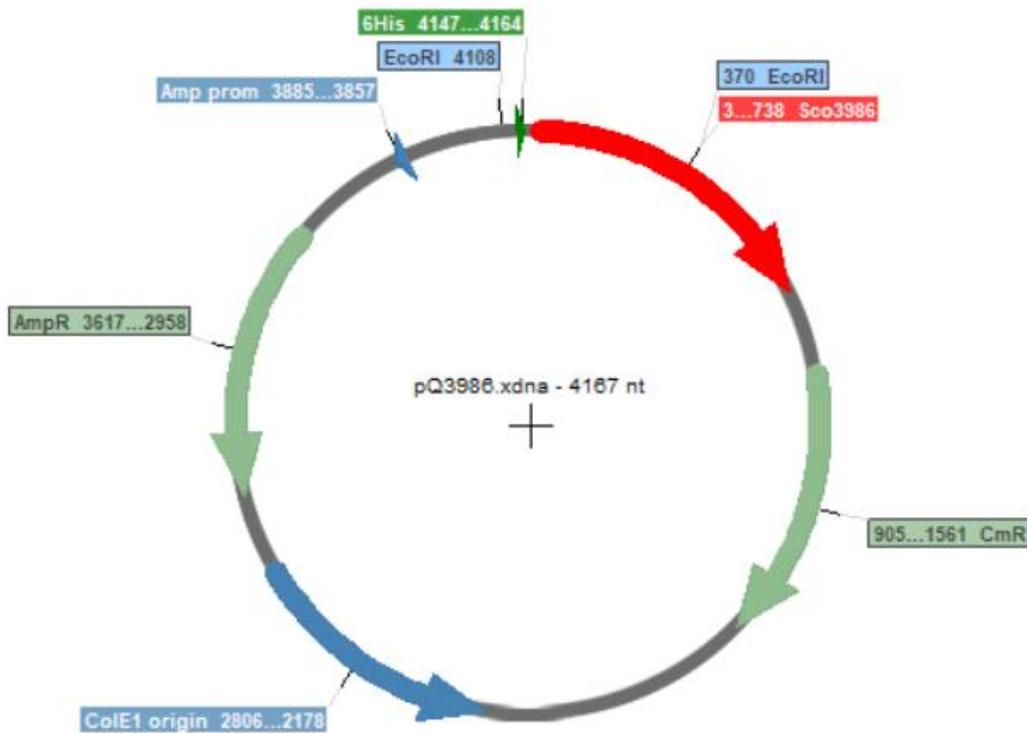


Figura 7. Mapa de la construcción pQE3986 diseñado en Serial Cloner.

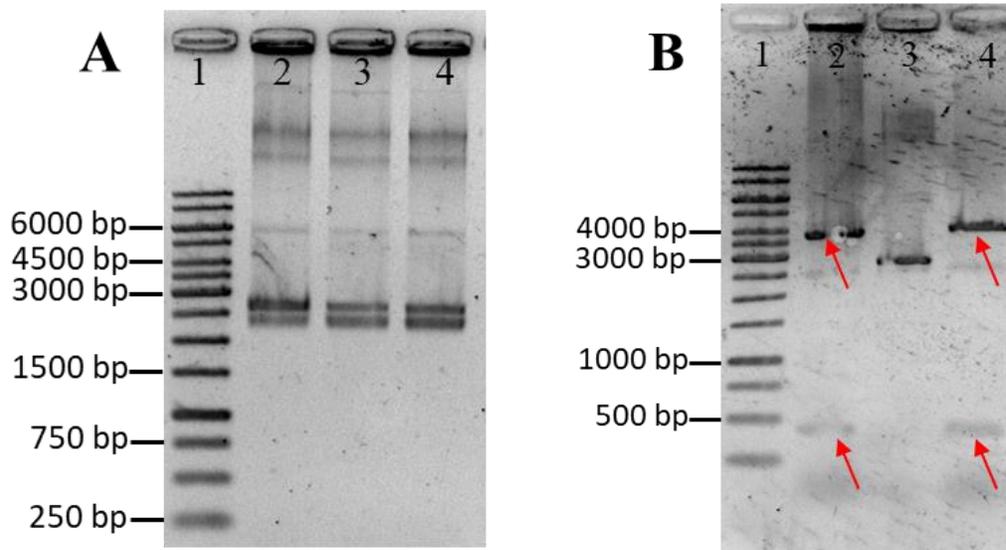


Figura 8. A) gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio con muestras de plásmido de colonias resistentes a ampicilina. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kbp (Thermo Scientific). Carriles 2-4: muestras las colonias resistentes. B) Gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio de las digestiones con *EcoRI*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kbp (Thermo Scientific). Carriles 2 y 4: muestras digeridas con *EcoRI*. Carril 3: muestra sin digerir.

8.4 Secuenciación de pQE3986

La construcción pQE3986 fue secuenciada para confirmar que no existieran mutaciones en el gen *sco3986*. La secuencia recuperada no presentaba mutaciones y mostró la etiqueta de histidinas en marco de lectura con el gen *sco3986*.

8.5 Expresión de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986

El interés en expresar la proteína SCO3986 se debe a que se quiere comprobar los sitios de unión a la secuencia de los posibles genes blanco para este regulador mediante ensayos tipo EMSA. De esta manera, con la construcción pQE3986, se realizaron ensayos de inducción por IPTG en la cepa *E. coli* M15 con pREP4. El primer ensayo se hizo manteniendo constante la concentración del inductor a 1 mM de IPTG y tomando muestras a distintos tiempos. Como control positivo se utilizó la proteína de fusión α -cristalina-DFA-6xHis de *Mycobacterium tuberculosis* con un peso molecular de ~66 kDa. De acuerdo con Moreno Mendieta (2014), esta proteína corre de manera anómala en geles de acrilamida, por lo que su peso molecular llega a ser mayor al peso estimado.

En la figura 9A se observa que aparece una banda de proteína desde 1 h de inducción, con un peso aproximado de 27 kDa. La banda corresponde a la proteína de fusión 6xHis-SCO3986. Además, se observa que a 18 h de inducción se mantiene una concentración relativamente igual de 6xHis-SCO3986, por lo que es conveniente solamente inducir por 1 h. Lo mismo se observa en el correspondiente western blot del gel (figura 9B). En la membrana de PVDF se puede ver que ya no hay incremento en la concentración de la proteína aún a 18 h de inducción con IPTG.

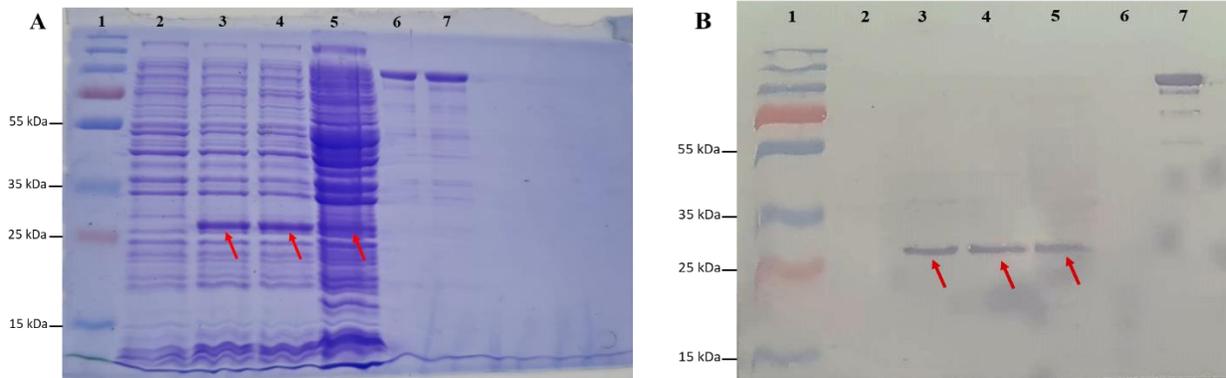


Figura 9. Ensayo de expresión a 1 mM de IPTG y variando tiempos de inducción A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Carriles 2-4: tiempos de incubación 0, 1, 4 y 18 h. Carriles 5 y 6: control positivo con la proteína α -cristalina. B) Western blot en membrana de PVDF. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Carriles 2-5: tiempos de inducción 0, 1, 4 y 18 h. Carril 7: control positivo con la proteína α -cristalina.

De acuerdo con los resultados anteriores, el segundo ensayo se hizo manteniendo constante el tiempo de inducción a 1 h pero variando las concentraciones de IPTG a 0.1, 0.5 y 1 mM (figura 10). Como se observa en la figura 10A, la proteína 6xHis-SCO3986 aparece desde la concentración 0.1 mM de IPTG. Cabe resaltar que en el western blot de la figura 10B se observa ligeramente mayor señal a 0.1 mM de IPTG.

Para realizar ensayos tipo EMSA es necesario contar con la proteína purificada en cuestión. Por ello, en este trabajo se hizo una fusión con una etiqueta de histidinas para purificar en columna de afinidad a níquel (Ni^{2+}). Un paso importante es obtener la proteína en forma soluble, por lo que se hizo un ensayo de ruptura de las células después de la inducción para determinar en qué fase de la célula se encuentra la proteína expresada.

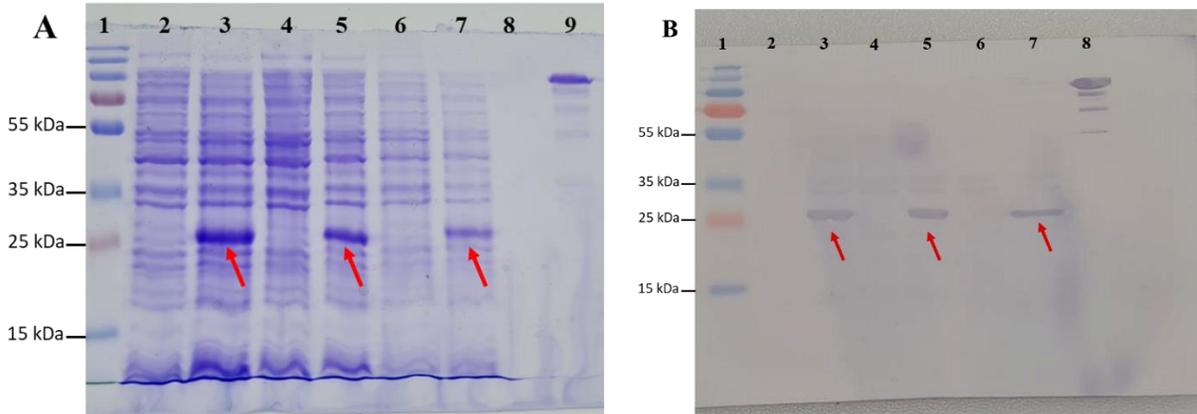


Figura 10. A) Ensayo de expresión a 1 h de inducción y variando la concentración de IPTG. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Carril 2,4,6: tiempo 0 h de inducción para 0.1, 0.5, y 1 mM de IPTG. Carril 3,5,7: tiempo 1 h de inducción para 0.1, 0.5, y 1 mM de IPTG. Carril 9: Control positivo. B) Western blot en membrana de PVDF de inducción a diferentes concentraciones. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)- Carriles 2,4,6: tiempo de inducción 0. Carriles 3,5,7: inducción con 0.1, 0.5, 1 mM de IPTG a 1 h. Carril 8: control positivo.

Las células se sonicaron después de ser inducidas con 0.1 mM de IPTG por 1 h. En la figura 11A se observa que la banda de proteína correspondiente a 6xHis-SCO3986 se presenta en el carril con células completas (carril 3) y en el carril con el botón después de sonicar (carril 7) y no se observa ninguna señal en el carril con muestra soluble. Lo mismo se observa en el western blot de la figura 11B, en donde hay mayor presencia de la proteína 6xHis-SCO3986 en el carril de la muestra insoluble.

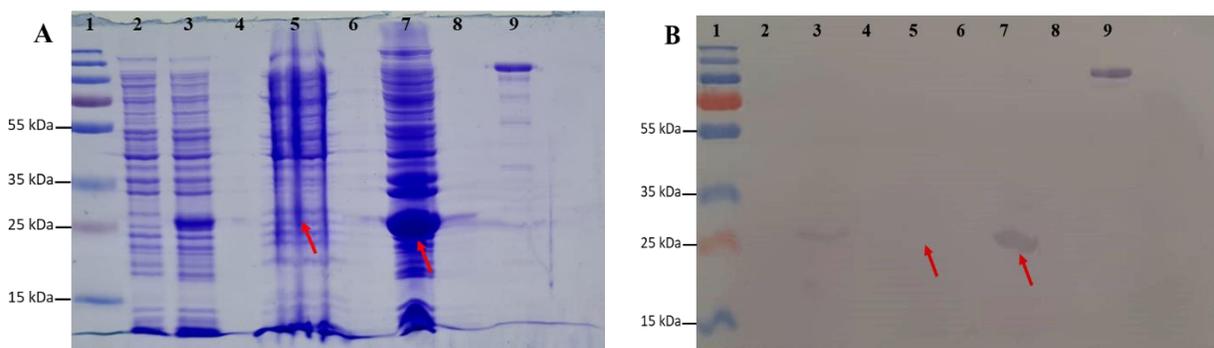


Figura 11. A) Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo scientific). Carril 2: inducción con 0.1 mM IPTG a 0 h. Carril 3: inducción con 0.1 mM IPTG a 1 h. Carril 5: fase soluble. Carril 7: fase insoluble. Carril 9: control positivo (α cristalina) B) Western blot en membrana de PVDF. Carril 1: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Carril 2: inducción con 0.1 mM IPTG a 0 h. Carril 3: inducción con 0.1 mM IPTG a 1 h. Carril 5: fase soluble. Carril 7: fase insoluble. Carril 9: control positivo (α cristalina).

9. DISCUSIÓN

Hasta ahora se sabe que la ATP-Glk juega un papel central en la RCC en *Streptomyces*, aunque se desconoce a través de que mecanismos ejerce su función regulatoria. Debido a que la secuencia de la ATP-glxA carece de motivos de unión a DNA, se propone que su mecanismo de acción implique la interacción con otras proteínas regulatorias. En un análisis transcriptómico de la cepa *S. coelicolor* M145, se observó que en presencia de ATP-Glk se modificaba la expresión de diversos genes que codifican para posibles reguladores transcripcionales (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016).

De los reguladores transcripcionales GntR (SCO3264, SCO3986), LuxR (SCO4261), SARP (SCO6288), ArgR (SCO1576), TipA (SCO3413), y probables MerR (SCO5025, SCO7530, SCO7698), llaman la atención los reguladores *sco3986* y *sco3264* pertenecientes a la familia GntR. Esta familia está involucrada en el catabolismo del carbono (Hoskisson & Rigali 2009), y en *Streptomyces* en el metabolismo secundario y en la formación de micelio aéreo (Romero-Rodríguez *et al.*, 2015). Se sugiere que SCO3986 tiene un efecto activador sobre la producción de metabolitos secundarios, ya que las cepas mutantes de *S. coelicolor* carentes del gen tuvieron menor expresión de los reguladores específicos de ACT y RED (Hernández, 2022). Por otro lado, se sugiere que SCO3264 tiene un efecto represor sobre *sco3986* y la producción de antibióticos, ya que las cepas mutantes de *S. coelicolor* carentes de *sco3264* tuvieron menor valor de expresión de *sco3986* y una mayor producción de ACT y RED (Manzo, 2018).

Ensayos previos sugieren la relevancia de regulador transcripcional SCO3986 en la producción de metabolitos secundarios y su posible interacción con la ATP-Glk. Por ello se consideró importante verificar la unión de SCO3986 con sus posibles sitios blanco de unión. De esta manera, en este trabajo se reporta la clonación y expresión de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986 para que esta proteína pueda ser utilizada en posteriores ensayos de interacción proteína-DNA.

La secuencia del gen *sco3986* se compone de 732 pb, que coincide en cercanía a la banda de 750 pb del marcador de peso molecular 1Kbp (Thermo scientific) en geles de agarosa al 0.8% (Figura 2), por lo que se amplificó exitosamente el gen *sco3986*. Se eligió el plásmido de expresión pQE31 para clonar *sco3986* ya que posee etiqueta de histidinas (6xHis), y al promotor T5 junto a dos operadores *lac* que incrementan la represión y control sobre la expresión del promotor (QIAexpressionist, 2003). Es importante tener un control sobre la expresión, ya que permitir la expresión constitutiva de la proteína puede ser contraproducente para el crecimiento de la bacteria

hospedera y, en consecuencia, llegar a ser un componente tóxico para la bacteria (Kaur *et al.*, 2018). Como la clonación de fragmentos ricos en GC en cepas de *E. coli* puede ser compleja, se utilizan técnicas como el ensamble de Gibson para aumentar la eficiencia en la obtención de clones con el gen de interés.

En el presente trabajo, se logró integrar adecuadamente el gen *sco3986* en el plásmido pQE31 y se confirmó la construcción pQE3986 por secuenciación. Otro punto crítico para la clonación de genes ricos en GC es la elección de la cepa para transformación. La cepa utilizada en este trabajo fue *E. coli* JM109 que en su genotipo presenta una mutación en la proteína RecA del sistema de recombinación (*recA1*), una mutación en una endonucleasa (*endA1*), y una mutación en la DNA girasa (*gyrA96*) (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). La mutación en *recA1* permite la capacidad de retener los plásmidos como monómeros.

Además, la cepa JM109 de *E. coli* tiene la capacidad de replicar fragmentos grandes de manera estable y sin mutaciones durante varias generaciones. Yanisch-Perron *et al.*, (1985) reportaron que al transformar células JM109 con el fragmento del elemento activador del maíz (AC), rico en G+C con tamaño de 4.5 Kbp, no se presentó alguna alteración en la secuencia de los fragmentos recuperados de las células recombinantes en comparación con otras cepas hermanas como JM107. Por lo tanto, la cepa JM109 se utilizó para replicar y recuperar la construcción pQE3986 libre de mutaciones.

El peso de la proteína de fusión 6xHis-SCO3986 fue de ~26 kDa utilizando una estimación con el marcador de peso molecular en un gel SDS-PAGE que fue muy similar al peso teórico por secuencia de aminoácidos de 27 kDa. Por el tamaño en los geles desnaturizantes de poliacrilamida y la señal que se observa en el western blot, se puede concluir que se obtuvo la proteína de fusión.

Sin embargo, es de notar que 6xHis-SCO3986 se encuentra en la parte insoluble (Figura 9A), lo que puede complicar la purificación de la proteína. Usualmente, durante la alta expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se pueden producir agregados de proteína, referidos como cuerpos de inclusión (IBs), los cuales se ven contaminados con partes de la pared celular y la membrana externa de la bacteria (Palmer & Wingfield, 2012).

A raíz de estos resultados, se supuso que la proteína se podría encontrar presente dentro de cuerpos de inclusión. La literatura que aborda esta problemática menciona el mismo protocolo de lisis, sonicación y ruptura de la membrana con el detergente que utilizamos en este trabajo, que deja un botón de cuerpos de inclusión limpio con pureza de hasta 90% (Burgess, 2009).

Los IBs se forman como consecuencia de un mal plegamiento al exponer regiones hidrofóbicas que interactúan con proteínas similares (Burgess, 2009). Este fenómeno no se asocia con la secuencia del polipéptido, pero sí obstaculiza la solubilidad y se puede incrementar ya sea por altas temperaturas de crecimiento, acidificación del medio o por el uso de cepas deficientes en proteasas (Carrio & Villaverde, 2002).

Se encuentran disponibles en la literatura estrategias experimentales para aumentar la solubilidad de proteínas recombinantes como son la co-expresión de sistemas de proteínas chaperonas en la cepa, optimización de codones para *E. coli*, modulación del ambiente reductor celular, reducción de la temperatura de expresión, y uso de otras proteínas de fusión (e.g. tiorredoxinas) (Basu *et al.*, 2011). Aun así, cada proteína es distinta y no hay una solución universal para evitar la formación de IBs. Para proteínas de fusión con etiqueta de poli histidinas se recomienda la extracción de los IBs con hidrocloreuro de guanidina (4 a 6 M) después de extraer y lavar los IBs de acuerdo con el protocolo básico de Palmer & Wingfield (2012), tomando en cuenta el uso de β -mercaptoetanol (2-ME) si se requiere un agente reductor y no usando DTT ya que este se precipita con el níquel si se va a purificar la proteína por cromatografía o columna de afinidad a níquel (Ni^{2+}).

10. CONCLUSIÓN

En este trabajo, se clonó y expresó el regulador transcripcional SCO3986 de *S. coelicolor* M145 de manera heteróloga en el plásmido de expresión pQE31 de *E. coli*. No obstante, la proteína de fusión 6xHis-SCO3986 se mantiene en la fase insoluble del contenido celular (probablemente agregada en cuerpos de inclusión), por lo que para lograr su purificación se necesitaría realizar más ensayos de expresión bajo diferentes condiciones de cultivo.

11. PROSPECTIVAS

Para ampliar los resultados del presente trabajo, se sugiere realizar la extracción de 6xHis-SCO3986 utilizando los protocolos de extracción de IBs para proteínas de fusión con etiqueta de poli histidinas para solubilizar a la proteína. Posteriormente, purificar la proteína por cromatografía de afinidad a níquel con el fin de recuperar la proteína nativa y emplearla en los ensayos de interacción proteína-DNA tipo EMSA con el fin de verificar la unión a las secuencias río arriba de los posibles genes blanco de SCO3986.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Angell, S., Lewis, C. G., Buttner, M. J., & Bibb, M. J. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Molecular and General Genetics MGG*, 244, 135-143.
- Angell, S., Schwarz, E., & Bibb, M. J. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular microbiology*, 6(19), 2833-2844.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1-43.
- Basu, A., Li, X., & Leong, S. S. J. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied microbiology and biotechnology*, 92, 241-251.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *nature*, 417(6885), 141-147.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57-65.
- Burgess, R. R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in enzymology*. 463, 259–282.
- Carrio, M. M., & Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of biotechnology*, 96(1), 3-12
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 87-93.
- E. coli* genotypes. (2023, February 15). OpenWetWare, Retrieved 16:53, June 15, 2023 from https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=1108686.

Gallagher, S. R. (2006). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current protocols in immunology*, 75(1), 8-4.

Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., & Hurrell, J. G. (2011). Immunoblotting and immunodetection. *Current protocols in cell biology*, 52(1), 6-2.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Gómez Ortiz B. (2020). *Diseño y construcción de un hospedero para la expresión heteróloga de clústeres de metabolitos secundarios*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., & van Wezel, G. P. (2012). Identification of glucose kinase-dependent and-independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Molecular Microbiology*, 86(6), 1490-1507.

Guzman, S., Carmona, A., Escalante, L., Imriskova, I., Lopez, R., Rodríguez-Sanoja, R., ... & 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*. *Microbiology*, 151(5), 1717-1723.

Hernández Cordero, B. (2022). *Evaluación de la participación del regulador transcripcional sco3986 sobre el proceso de represión catabólica*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hodgson, D. A. (1982). Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *Microbiology*, 128(10), 2417-2430.

Hoskisson, P. A., & Rigali, S. (2009). Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in applied microbiology*, 69, 1-22.

Ishihama, A. (2012). Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 88(9), 485-508.

- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. Norwich, United Kingdom. John Innes Foundation.
- Kwakman, J. H., & Postma, P. W. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 176(9), 2694-2698.
- Lee, J. S., Bat-Ochir, M., Demirev, A. V., & Nam, D. H. (2009). Molecular cloning of the phospholipase D gene from *Streptomyces* sp. YU100 and its expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology*, 47, 116-122.
- Manzo Ruiz M.B. (2018). *Caracterización de un regulador transcripcional dependiente del gen glk en Streptomyces coelicolor*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
- Moreno Mendieta S.A. (2014). *Micropartículas de almidón como vehículo para la administración de antígenos vía mucosa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current protocols in protein science*, 70(1), 6-3.
- QIAexpressionist, A. (2003). *A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins*. Qiagen. p1-125.
- Ramos, I., Guzmán, S., Escalante, L., Imriskova, I., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S., & Langley, E. (2004). Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Research in microbiology*, 155(4), 267-274.
- Romero Rodríguez A. I. (2010). *Clonación y análisis del promotor del gen sp7066 de Streptomyces peucetius subsp.caesius*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1017-1039.
- Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D., & Sánchez, S. (2016). Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. *BMC microbiology*, 16(1), 1-16.
- Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Manzo-Ruiz, M., Passari, A. K., Villarreal-Gómez, K., Rodríguez-Sanoja, R., & Sanchez, S. (2022). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microbial Biotechnology*, 15(4), 1058-1072.
- Santos, C. L., Tavares, F., Thioulouse, J., & Normand, P. (2009). A phylogenomic analysis of bacterial helix–turn–helix transcription factors. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 411-429.
- Schlimpert, S., & Elliot, M. A. (2023). The Best of Both Worlds—*Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae* as Model Species for Studying Antibiotic Production and Bacterial Multicellular Development. *Journal of Bacteriology*, e00153-23.
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., ... & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources, and tools. *Database*, 2020.
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., & Roh, J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Current protocols in microbiology*, 18(1), 10E-1.
- Świątek, M. A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y. H., Laing, E., ... & van Wezel, G. P. (2013). The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 195(6), 1236-1248.
- Titgemeyer, F., Reizer, J., Reizer, A., & Saier Jr, M. H. (1994). Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140(9), 2349-2354.
- Tuttle, A. R., Trahan, N. D., & Son, M. S. (2021). Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Current Protocols*, 1(1), e20.

Urem, M., Świątek-Połatyńska, M. A., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2016). Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 102(2), 183-195.

van Wezel, G. P., & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural product reports*, 28(7), 1311-1333.

Van Wezel, G. P., König, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M., & Titgemeyer, F. (2007). A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbial Physiology*, 12(1-2), 67-74.

Wang, Y., Zhang, H., He, Y., Luo, H., & Yao, B. (2007). Characterization, gene cloning, and expression of a novel xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. *Aquaculture*, 267(1-4), 328-334.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119.

13. ANEXOS

Medios de cultivo

Medio MS (Kieser *et al.*, 2000)

Contenido	Cantidad
Agar	20 g
Manitol	20 g
Harina de soya	20 g
Agua destilada	1 L

Nota: este medio requiere doble esterilización por autoclave.

Medio LB (Tuttle *et al.*, 2021)

Componente	Cantidad
Agar	15 g
Triptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L

Nota: ajustar a pH 7.

Medio TSB (Kieser *et al.*, 2000)

Componente	Cantidad
Agar	15 g
Caldo de soya triptico	30 g
Agua destilada	1 L

Nota: ajustar a pH 7.2, si se requiere para cajas, se añade 1.5 g/L de agar (TSA)

Medio YEME (Kieser *et al.*, 2000)

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Sacarosa	340 g (34% final)
Agua destilada	1 L

Amortiguadores

Buffer P (Kieser *et al.*, 2000)

Componente	Cantidad
Sacarosa	20 g
K ₂ SO ₄	20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	20 g
Soluciones de elementos traza	2 mL
Agua destilada	800 mL

Buffer L (Kieser *et al.*, 2000)

Componente	Cantidad
Sacarosa (10.3%)	100 mL
Buffer TES (5.73%, ajustado a pH 7.2)	10 mL
K ₂ SO ₄ (2.5%)	1 mL
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O (2.5M)	0.1 mL
Soluciones de elementos traza	0.2 mL
CaCl ₂ (0.25M)	1 mL

Nota: Añadir 1 mg/mL de lisozima y esterilizar por filtración

Solución de elementos traza (Kieser *et al.*, 2000)

Compuesto	Cantidad
ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg
Agua destilada	1 L

Buffer TE (Kieser *et al.*, 2000)

Compuesto	concentración	Solución stock	Volumen stock para un litro
Tris-HCl	10 mM	2 M (pH8)	5 mL
EDTA	1 mM	0.25 M (pH8)	4 mL

Soluciones para extracción de plásmidos por lisis alcalina (Miniprep) (Bimboim & Doly, 1979)

solución SET (I)	solución II	solución III	solución TE
Sacarosa 8%	SDS 2%	Acetato de sodio	Tris-HCl 10 mM pH 8
Tris-HCl 0.05 M pH 8	NaOH 0.4 N	3M pH 4.8	EDTA 1mM pH 8
EDTA 0.05 M pH 8			

Técnica de extracción de plásmidos por lisis alcalina (Miniprep) según Bimboim & Doly, 1979 con modificaciones.

1. Se siembra un inóculo de la cepa de *Escherichia coli* elegida en 6 mL de medio líquido LB con los antibióticos que se requieran y se deja crecer toda la noche a 37 °C. Después de la incubación, el cultivo se vacía en tubos de 1.5 mL y se centrifuga a 15000 rpm por 1 min, a temperatura ambiente.

2. Se descarta el sobrenadante y se recupera el botón celular, que se suspende en 1 mL de agua destilada y se centrifuga nuevamente. Posteriormente, se agregan 150 μ L de solución SET y se suspende completamente.
3. Se agregan 350 μ L de solución II preparada al momento, se mezcla seis veces por inversión y se reposa en hielo por 10 min. Después, se agregan 250 μ L de solución III, se mezcla por inversión y se reposa en hielo por 15 min. Se centrifuga a 15000 rpm por 5 min.
4. Se recupera el sobrenadante (que contiene a los ácidos nucleicos) y se le agregan 650 μ L de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico. Se agita por inversión el tubo de 1.5 mL, se centrifuga a 13200 rpm por 10 min y se recupera el botón.
5. Se agrega al botón 1 mL de etanol al 70%, se homogeniza y se centrifuga a 15000 rpm por 10 min. Posteriormente, se recupera el botón de plásmidos y se deja secar. Una vez secado, se suspende en 50 μ L de solución TE y se incuba con RNAsa (concentración final de 20 μ g/mL) por 1 h a 37 °C.

Lavado de muestras con fenol/cloroformo (50:50) según Romero-Rodríguez, 2010 con modificaciones

Nota: Si se utiliza la muestra de plásmido para clonación o secuenciación, se debe lavar con fenol/cloroformo 50:50 para eliminar las proteínas residuales y la RNAsa.

1. En un tubo de 1.5 mL, se colocan 0.5 mL de solución con DNA y se adiciona un volumen de fenol/cloroformo 50:50 y se agita por inversión hasta formar una emulsión. Posteriormente, se centrifuga a 13200 rpm por 5 min y se recupera la fase acuosa en un tubo limpio
2. Se agrega un volumen de cloroformo-isoamílico 24:1 y se agita. Posteriormente se centrifuga a 13200 rpm por 5 min para recuperar la fase acuosa en un tubo limpio.
3. A la fase acuosa recuperada se le agrega 0.1 volumen de NaCl 1 M y un volumen de isopropanol. Se deja precipitar por 1 h y se centrifuga a 13200 rpm por 15 min para descartar el sobrenadante.
4. Se agrega un volumen de etanol al 70% y se centrifuga a 13000 rpm por 10 min. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el botón de DNA hasta que pierda el olor a etanol.
5. El botón de DNA se suspende en 50-100 μ L de agua destilada.

Preparación de células competentes y procedimiento de electroporación (Romero-Rodríguez, 2010)

1. Se inoculan 400 mL de medio líquido LB con 4 mL de precultivo de la cepa de uso de *E. coli*. El cultivo se incuba a 37°C con agitación continua hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.5-0.7
2. Se cosechan las células del cultivo centrifugando a 10000 rpm por 15 min a 4 °C. Nota: Es importante mantener todo el tiempo el botón celular en hielo durante el procedimiento.
3. El botón celular recuperado se suspende en un volumen original en agua ultra estéril fría (MilliQ), después se centrifuga como en el paso 2.
4. Se descarta el sobrenadante y se suspende en ½ de volumen original en agua ultra estéril y fría y se centrifuga como en el paso 2.
5. Se descarta el sobrenadante y el botón celular se suspende en 8 mL de glicerol frío al 10% para ser centrifugado como en el paso 2.
6. Por último, se recupera el botón celular para suspenderlo en un volumen final de 1.2 mL de glicerol frío al 10%. Posteriormente, se preparan alícuotas de 50 µL cada una y se almacenan a -70 °C.

Electro-transformación (Romero-Rodríguez, 2010)

1. Se toma una alícuota de células *E. coli* competentes de 50 µL, se les adiciona 1-2 µL de plásmido y se deja reposar 2 min en hielo.
2. En cubetas de electroporación previamente enfriadas de 0.1 cm (Biorad) se coloca la mezcla de células y DNA.
3. Se coloca la cubeta en el electroporador ajustando a un pulso de 4-5 ms y 1.25 V. Inmediatamente después de electroporar, se adicionan 950 µL de solución de recuperación (900 µL medio líquido LB y 100 µL de 1 M glucosa), y rápidamente se suspenden las células con micropipeta.
4. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y se dejan incubar para recuperación a 37 °C en agitación continua por 1 h. Después, se plaquea la muestra en medio LB sólido con los respectivos antibióticos.

Soluciones para la preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%

Según Romero Rodríguez (2010), para las soluciones stock concentradora y separadora, se utilizan las siguientes proporciones:

Reactivos	Gel de concentración al 4%	Gel de separación al 12%
Bisacrilamida 40%	500 µL	2.7 mL
4X Tris-HCl 0.5M/ 0.4% SDS, pH 6.8	1.25 mL	-
4X Tris-HCl 1.5 M/ 0.4% SDS, pH 8.8	-	3 mL
TEMED (Tetrametiletilendiamina)	2.5 µL	5 µL
Agua destilada	3.25 mL	3.3 mL
Persulfato de amonio al 10%	25 µL	50 µL
Total	~5 mL	~9 mL

Buffer de electroforesis 5x (Romero-Rodríguez, 2010)

Componentes	Cantidad
Tris base 125 M	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

Buffer de carga 4X (Romero-Rodríguez, 2010)

Componentes	Cantidad
Agua destilada	8.5 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5 mL

Glicerol	2 mL
SDS 10%	4 mL
β mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	500 μ L

Soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie (Romero-Rodríguez, 2010)

Soluciones	Cantidad	Tiempo
Solución Stock I	0.2% p/v azul de Coomassie 90% v/v Etanol	
Solución Stock II	20% v/v Ácido acético	-
Procedimiento de tinción		
1. Fijación	Etanol al 40% v/v Ácido acético glacial 10% v/v Agua destilada 100%	30 min
2. Tinción	Stock I 50% v/v Stock II 50% v/v	20 min
3. Destinción I	Solución de fijación	30 s
4. Destinción II	Etanol al 20% v/v Ácido acético glacial 10% v/v Agua destilada cbp 100%	Inspección visual

Procedimiento para electro transferencia de geles de acrilamida y western blot (Romero-Rodríguez, 2010)

Amortiguadores

Buffer de transferencia 20X (Gallagher *et al.*, 2011)

Componente	Concentración
Tris-base	200 mM
Glicina	2 M

Nota: para 1 L de buffer 1X, agregar 50 mL de solución stock 20X y 100 mL de metanol. El buffer de transferencia 1x se debe hacer el mismo día y mantener en refrigeración.

Buffer fosfato salino (PBS) 10X (Gallagher *et al.*, 2011)

Componente	Cantidad
Agua destilada	1 L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Nota: se debe ajustar el pH a 7 utilizando HCl

Buffer de bloqueo de membrana (BBM)

Componente	Cantidad
Buffer PBS pH 7	4 mL
Tween-20	20 µL
Leche descremada (3% w/v)	1.2 g

Nota: llevar a volumen de 40 mL en tubos cónicos de 50 mL

Procedimiento

1. Para la electro transferencia, se prepara el buffer de transferencia 1X con 10% de metanol. Para activar la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se sumerge completamente en metanol puro, mientras que los componentes del sándwich se deben humedecer en buffer de transferencia
2. El orden de los componentes del sándwich es el siguiente:

Ánodo (+)

Fibra

Papel filtro

Membrana PVDF

Gel SDS-PAGE

Papel Filtro

Fibra

Cátodo (-) Negro

Nota: se debe procurar no tener burbujas entre la membrana de PVDF y el gel de poliacrilamida.

3. El sándwich se coloca en el soporte para la cámara de electro transferencia de western blot (Biorad) y se cubre con el buffer de transferencia 1X.
4. Se corre la transferencia a 20 V durante toda la noche. Para evitar que aumente la temperatura, la transferencia se debe hacer en un cuarto frío y/o con el equipo en hielo.
5. Completada la transferencia, la membrana se retira y se deja secar sobre papel bond a temperatura ambiente.
6. Una vez seca, se añaden 20 mL de buffer de bloqueo por cada membrana de 80 x 50 mm aproximadamente y se deja en agitación suave a 4 °C durante 2 h. Al término de la agitación, se descarta el buffer de bloqueo.
7. Se añaden nuevamente 20 mL de buffer de bloqueo más el anticuerpo primario a una dilución 1:5000 (Mouse Anti-6xHis). La membrana se deja con los anticuerpos toda la noche a 4 °C en agitación constante.
8. Al día siguiente, la membrana se lava dos veces con 20 mL de buffer PBS-Tween 20 (4mL de buffer PBS, 20 µL de Tween-20 en 40 mL de agua destilada). Una vez lavada la membrana. se agregan 20 mL de buffer de bloqueo más el anticuerpo secundario (Rabbit Anti-Mouse + fosfatasa alcalina) a una dilución de 1:10000 y se reposa por 2 h a 4 °C con agitación constante.
9. Después del tiempo se lava la membrana dos veces con 20 mL de buffer PBS-Tween 20. Al final de los lavados se le agrega de 1-2 mL de BCIP/NBT como sustrato para la fosfatasa alcalina. Se incuba hasta que sea visible el control. Una vez revelada la membrana, se le agrega agua destilada para inhibir la reacción.

10. Finalmente, se descarta el agua destilada y se seca la membrana sobre una hoja de papel bond blanco.