



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESIÓN DE LOS GENES *crp*, *glnR*, *dasR* Y *tamR* EN
Streptomyces coelicolor M145 CRECIDO EN DIFERENTES
FUENTES DE CARBONO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ALEX JOSUÉ LÓPEZ ORDOÑEZ

ASESORES:

**DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO
DR. JORGE ALBERTO LUGO DE LA FUENTE**

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

Julio 2019

La presente tesis fue realizada en las instalaciones del laboratorio de la Dra. María Elena Flores Carrasco, bajo su dirección en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Esta tesis fue financiada a través del proyecto PAPIIT-UNAM No. 214116



Dedicatorias

A mi padre, por su devota confianza y a mi madre por el infinito apoyo y carisma. A ambos por las noches de desvelo que les hice pasar.

A mis hermanos que me han cuidado desde pequeño y han sabido apoyarme a su manera cada uno.

A mi pareja Ana Laura, que con el esfuerzo de ambos estamos dando comienzo a la vida que estamos planeando juntos.

Al padre de mi madre, mi abuelo Pedro quien hubiese deseado verme al comenzar esta carrera y a la madre de mi padre, mi abuela Irene con quien me hubiese gustado compartir este logro, llevo su recuerdo siempre conmigo.

Agradecimientos

Doy mi más profundo, sincero y gran agradecimiento a la Dra. María Elena Flores Carrasco por su guía, apoyo, dedicación, tiempo y sobre todo por su paciencia y comprensión durante mi estancia en su laboratorio, por haberme otorgado un espacio, brindarme su confianza, su guía durante toda la investigación de la tesis, es una persona realmente admirable.

A la Dra. Tóshiko Takahashi Íñiguez por el apoyo académico y la asesoría técnica dentro de las instalaciones del laboratorio durante la realización de este trabajo

A mi asesor interno de tesis, el Dr Jorge Alberto Lugo de la Fuente, quien además de su guía, y su tiempo, me apoyó y me motivó a emprender y a buscar el estudiar lo que más me gustara.

A mi padre y a mi madre, quienes me brindaron su apoyo y sin ellos no estaría aquí y que confiaron siempre en que podía sacar adelante mi licenciatura, les estaré de por vida agradecido.

A mis hermanos por el apoyo brindado y cariño que me tienen.

A mi pareja Ana Laura quien siempre me brindó su apoyo, su confianza y su guía desde el comienzo de la carrera y me ayudó a tomar la decisión de emprenderme en este proyecto.

A mis grandes amigas Yoloxochitl, Ary y Fabiola con quienes siempre tuve algo nuevo que aprender de ellas, y aunque ya no compartamos un aula juntos, atesoro mucho nuestra amistad.

Índice

Resumen.....	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	11
Generalidades de las actinobacterias.....	11
La importancia de <i>Streptomyces</i>	12
Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	13
Características genéticas de <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
Metabolismo primario y secundario.....	16
Regulación de la expresión génica.....	17
Transcripción.....	21
Características de las proteínas reguladoras.....	23
Sistemas de uno y dos componentes.....	27
Proteína receptora de AMPc (CRP).....	29
Proteína reguladora de deficiencia de esporas aéreas (DasR).....	30
Proteína reguladora global de nitrógeno (GlnR).....	30
Proteína reguladora de <i>trans</i> -aconitato metil transferasa (TamR).....	31
Justificación.....	32
Objetivos.....	33
General.....	33
Particulares.....	33
Hipótesis.....	33
Materiales y métodos.....	34
Modelo de estudio.....	34
Oligonucleotidos sentido y antisentido.....	34
Ensayos de reversotranscripción (RT).....	35
Ensayos de PCR.....	36
Electroforesis en gel de agarosa.....	37
Escaneo de los productos del RT-PCR semicuantitativo.....	37
Resultados.....	38

Estandarización de la temperatura de alineamiento.....	38
Obtención de los controles negativos de cada gen en diferentes condiciones.....	39
Expresión de los genes <i>crp</i> , <i>glnR</i> , <i>dasR</i> Y <i>tamR</i> en <i>Streptomyces coelicolor</i> crecido en las diferentes fuentes de carbono.....	40
Discusión.....	43
Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	56

Resumen

Existen gran variedad de microorganismos que son de mucha importancia en diversas áreas, por ejemplo, los degradadores de compuestos químicos contaminantes, recalcitrantes y polímeros complejos, que participan en procesos de biorremediación del suelo y agua. Otras bacterias interesantes forman compuestos originados a partir de reacciones metabólicas que se llevan a cabo durante su desarrollo, como son los metabolitos secundarios, siendo muchos de estos empleados como antibióticos comercialmente importantes. Estos microorganismos producen compuestos a través de precursores que provienen del metabolismo primario, el cual está sujeto a un proceso de regulación de la expresión de los genes, adecuándose al entorno.

El proceso de regulación del metabolismo en bacterias a través de proteínas específicas es un tema de estudio hoy en día. De manera específica, *Streptomyces coelicolor* ha sido estudiada no sólo por su gran capacidad de producción de metabolitos secundarios, sino también por el gran número de secuencias codificantes dentro de su genoma.

La regulación del metabolismo primario es un tema ampliamente explorado; por lo que este trabajo estudió la expresión semicuantitativa de los genes que codifican a 4 proteínas reguladoras: GlnR, DasR, CRP y TamR las cuales tienen diferentes papeles en el metabolismo del carbono. Se observó los niveles de RNAm de los genes *glnR*, *dasR*, *crp* y *tamR* a través de RT-PCR semicuantitativa utilizando RNA totales de *Streptomyces coelicolor* M-145 crecido en 3 fuentes de carbono distintas y a 6 tiempos de crecimiento; fueron calculados los niveles de expresión de estos genes por medio de la cuantificación del número de píxeles de cada una de las bandas mostradas durante la electroforesis en gel de agarosa. Los resultados mostraron que estos cuatro genes se transcribieron de manera diferente dependiendo de la fuente de carbono utilizada.

Introducción

Las actinobacterias son un grupo de bacterias filamentosas que se encuentran en la rizosfera; son cosmopolitas, se distribuyen en sistemas naturales por todo el mundo; son resistentes a la desecación y sobreviven a condiciones de sequía e incluso en suelos de desiertos. Viven a un pH ligeramente alcalino o neutro y son sensibles a pH ácido (Atlas & Bartha, 2001). Este grupo de microorganismos participan de manera importante en el reciclaje de la materia orgánica, así como en la degradación de compuestos recalcitrantes y de productos químicos usados en la agricultura a través de enzimas extracelulares, que le son útiles para la degradación de polímeros complejos (Atlas & Bartha, 2001; Quiñones *et al.*, 2016); asimismo, son capaces de asimilar el nitrógeno disponible y promueven el crecimiento vegetal. Son buenos modelos para procesos de biorremediación, además de que han recibido una considerable atención en las áreas de la industria farmacéutica por la producción de antibióticos activos (por ejemplo; estreptomicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, entre otros) contra microorganismos de interés médico y veterinario, así como, en la industria alimentaria y últimamente en la agricultura para producir alimentos sin el empleo excesivo de productos químicos potencialmente contaminantes como los pesticidas (Salazar *et al.*, 2014; Quiñones *et al.*, 2016).

Inicialmente las actinobacterias fueron consideradas como microorganismos que sólo habitaban en el suelo, pero hoy se sabe que también son capaces de adaptarse a ambientes marinos, lagos y ríos, encontrándose en sedimentos ricos en materia orgánica (Quiñones *et al.*, 2016). En el suelo, la cantidad de actinobacterias encontradas dependen de diferentes factores que van desde la humedad, pH, contenido de materia orgánica, textura, entre otros. Se sabe por medio de aislamientos de bacterias a partir de muestras de suelo, que el género predominante de actinobacterias es *Streptomyces*, el cual varía en porcentajes de 70 a 90% de las colonias totales (Quiñones *et al.*, 2016).

Al género *Streptomyces* pertenecen bacterias aerobias facultativas, presentan diferenciación celular formando un crecimiento vegetativo que va desde el micelio

sustrato, micelio aéreo y una larga cadena de esporas reproductivas la cual coincide con el inicio de la producción de metabolitos secundarios (Bentley *et al.*, 2002).

El uso prioritario de este género de actinobacterias se inclina hacia el área médica, ya que dos terceras partes de los antibióticos producidos por los estreptomicetos son de uso común, además de producir otro tipo de fármacos como antitumorales, inmunosupresores e inhibidores enzimáticos (Bentley *et al.*, 2002). Un antibiótico es un metabolito secundario con estructura química compleja, son producidos por lo general en altas concentraciones de sustrato disponible que favorecen el crecimiento microbiano y generalmente los antibióticos producidos en el suelo están unidos a minerales de arcillas o de otras partículas dejándolos inactivos. Si los antibióticos disponibles en el suelo no hubiesen sido útiles para la naturaleza probablemente no habrían sido seleccionados en los procesos de evolución y no estarían tan extendidos (Atlas & Bartha, 2001).

Otro aspecto importante del género *Streptomyces* es la amplia variedad de procesos metabólicos y biotransformaciones que realizan, degradando muchos de los polímeros que se encuentran en el medio (como la celulosa y quitina que son los más abundantes en el mundo) y viviendo de forma saprófita, haciendo a este género como un participante central en el reciclaje de carbono (Atlas & Bartha, 2001).

Dentro de este género, la especie *Streptomyces coelicolor* es quizá la mejor caracterizada genéticamente. Esta bacteria tiene un cromosoma lineal con un origen de replicación casi en el centro (su posicionamiento pudo deberse a una presión selectiva) y con regiones terminales invertidas repetidas (Bentley *et al.*, 2002). El tamaño del cromosoma de *S. coelicolor* es de cerca de 8.66 Mb, tiene un 72.1% de contenido G+C haciéndolo un genoma muy estable con 7825 genes codificantes. La gran mayoría de todos los genes son esenciales para el crecimiento y desarrollo celular, replicación del DNA, transcripción, traducción, la biosíntesis de aminoácidos y la mayoría de éstos se encuentran en la región central del cromosoma y los genes no esenciales que codifican, por ejemplo para la síntesis de metabolitos secundarios, proteínas de vesículas de gas, exoenzimas hidrolíticas, entre otros, se encuentran en los brazos del cromosoma (Bentley *et al.*, 2002).

S. coelicolor tiene una amplia gama de genes codificantes que, comparada con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* con 4289 secuencias codificantes, dan idea de un reflejo de la multiciplidad de familias de proteínas, así como la expansión de otras familias conocidas. Varias de las familias de proteínas que se encuentran en *S. coelicolor* comparadas a otras bacterias, corresponden a familias de proteínas de transporte, de degradación de nutrientes y reguladores. Este último grupo de proteínas presenta gran número de secuencias codificante con un total de 965 proteínas reguladoras, representando 12.33% de todos los genes (Bentley *et al.*, 2002). Entre estas proteínas se encuentran las que actúan como activadores o represores de la transcripción.

Se ha descrito que el metabolismo de carbono y nitrógeno en *S. coelicolor* puede estar regulado por las proteínas DasR, GlnR, Crp o TamR (Romero *et al.*, 2015). Se ha estudiado la expresión de genes relacionados principalmente con el metabolismo de carbono, pero a la fecha se desconoce si estas o algunas otras moléculas regulan la transcripción de las rutas de degradación de fuentes de carbono o nitrógeno en *Streptomyces coelicolor*.

El presente trabajo tuvo la finalidad de analizar la expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes *dasR*, *glnR*, *crp* y *tamR*, que codifican a las 4 proteínas reguladores mencionadas anteriormente en *Streptomyces coelicolor* M-145 crecido en diferentes fuentes de carbono y a distinto tiempo de crecimiento.

Antecedentes

Generalidades de las actinobacterias

El filo de las actinobacterias es uno de los grupos taxonómicos más grandes reconocidos dentro del dominio de las bacterias incluyendo 5 subclases, 6 órdenes y 14 subórdenes, exhibiendo una enorme diversidad en términos de su morfología, fisiología y capacidades metabólicas, evolucionando la taxonomía de este grupo de bacterias establecido desde 1917. Las principales características utilizadas para delinear la taxonomía de Actinobacteria a nivel de género y especie son la morfología microscópica y la químiotaxonomía. La última de estas características se relaciona principalmente con la composición de la pared celular y la distribución de azúcar de células enteras, la composición de fosfolípidos y el tipo de menaquinona (Barka *et al.*, 2015).

Las actinobacterias son organismos de vida libre que están ampliamente distribuidos en ecosistemas acuáticos y terrestres encontrándose tanto en la superficie del suelo, como a profundidades de más de 2 m bajo tierra y pasan la mayoría de sus ciclos de vida como esporas semidormantes, especialmente en condiciones limitadas de nutrientes. Forman un grupo de bacterias gram positivas de filamentos ramificados denominado micelio (Madigan *et al.*, 2012; Quiñones *et al.*, 2016). La densidad de población de las actinobacterias depende de su hábitat y de las condiciones climáticas reinantes. Típicamente están presentes en densidades del orden de 10^6 a 10^9 células por gramo de suelo; las poblaciones de suelo están dominadas por el género *Streptomyces*, que representa más del 95% de las cepas de actinobacterias aisladas del suelo (Barka *et al.*, 2015; Quiñones *et al.*, 2016).

Los genomas de actinobacterias secuenciados a la fecha, pertenecen a organismos relevantes para la medicina humana y veterinaria, la biotecnología y la ecología, y su heterogeneidad genómica observada es un reflejo de su biodiversidad. Las actinobacterias son bacterias filamentosas Gram positivas con un alto contenido de

guanina y citosina (G+C) en sus genomas que van desde un 50% en *Corynebacteria*, hasta más del 70% en *Streptomyces* y *Frankia*. Crecen por una combinación de extensión de punta y ramificación de la hifa, lo que les dio su nombre, que se deriva de las palabras griegas para *aktis* o *aktin* = rayo (denotando a filamento) y *mukēs* = hongos (anteriormente fueron conocidos como actinomicetos). Las actinobacterias eran conocidas como un grupo de transición entre bacterias y hongos debido a que su crecimiento es de tipo micelial y se reproducen por esporas. Sin embargo, las células de las actinobacterias, como en las bacterias en general son delgadas con un cromosoma en su nucleoide, presenta una pared celular de peptidoglicano y son susceptibles a agentes antibacterianos. La mayoría de las actinobacterias son aeróbicas, quimioheterótrofas y pueden habitar el suelo o ambientes marinos como algunas especies de *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Salinispora*. También son simbioses y patógenos de plantas y animales o comensales gastrointestinales y juegan un papel crucial en el reciclaje de materia orgánica en descomposición y formación de humus (Ventura *et al.*, 2007; Barka *et al.*, 2015).

Las actinobacterias también exhiben diversas propiedades fisiológicas y metabólicas, como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios. Cabe destacar que muchos de estos metabolitos secundarios son potentes antibióticos de diferentes estructuras químicas como aminoglucósidos, glicopéptidos, β -lactámicos, nucleósidos, policétidos, péptidos de síntesis no ribosomal, entre otros. Este rasgo ha convertido a especies de *Streptomyces* en los principales organismos productores de antibióticos para la industria farmacéutica (Ventura *et al.*, 2007; Parada *et al.*, 2017).

La importancia de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* ha recibido particular atención porque son extremadamente abundantes e importantes en el suelo, donde son los principales agentes en el ciclo del carbono atrapado en los restos orgánicos insolubles, especialmente de las plantas, hongos y algunos artrópodos, logrando esto a través de la producción de

diversas exoenzimas hidrolíticas (como quitinasa, amidasas, aldosas, proteasas entre otras); una cepa única de *Streptomyces* es capaz de utilizar hasta 50 fuentes de carbono distintas (Ventura *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009). Sin la descomposición y reciclaje de organismos muertos, se acumularían rápidamente volviéndose inaccesibles para las redes tróficas terrestres y el ciclo del carbono (Ventura *et al.*, 2007; Book *et al.*, 2015). Este género exhibe una amplia dispersión filogenética y este género cuenta con un gran número de especies sobrepasando las 500 (Madigan *et al.*, 2009); asimismo son la fuente natural más abundante de antibióticos y otros metabolitos secundarios bioactivos; alrededor del 50% de los estreptomicetos aislados producen antibiótico y se conocen más de 500 antibióticos diferentes producidos por este grupo de actinobacterias dentro de lo que se pueden mencionar la estreptomicina, kanamicina, puromicina, y anfotericina (Parada *et al.*, 2017); alrededor de 60 antibióticos son de uso médico humano, veterinario, agricultor e industrial. La cepa *Streptomyces coelicolor* A3 (2) reveló por medio de la secuenciación de su genoma más de 20 agrupaciones de genes crípticos para metabolitos secundarios, además de las ya conocidas actinorrodina y undecilprodigiosina (Wentzel *et al.*, 2012). *Streptomyces coelicolor* A3 (2), es un organismo modelo importante, particularmente por la complejidad en su desarrollo (Ventura *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

Ciclo de vida de *Streptomyces*

Los estreptomicetos son bacterias no móviles y debido a este carácter, es necesario que empleen diferentes estrategias para que puedan colonizar nuevos lugares y consumir la mayor cantidad de nutrientes posibles en el suelo. Muchos estreptomicetos son versátiles nutricionalmente y no suelen depender de factores de crecimiento, pueden utilizar diferentes fuentes de carbono como azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y algunos compuestos aromáticos (Madigan *et al.*, 2009). El ciclo de vida puede distinguirse por 3 etapas diferentes; 1) la formación de un micelio vegetativo, 2) la formación de un micelio aéreo y 3) la producción de esporas germinativas (Fig. 1).

El ciclo comienza con la germinación de una espora que detecta una fuente adecuada de nutrientes y crece para formar uno o dos tubos germinales que se alargan por extensión de la punta apical formando a las hifas vegetativas, ramificándose y dando como resultado micelio vegetativo intrincadamente ramificado. Los mecanismos de crecimiento apical y los procesos inherentes de transporte hacia los polos se han estudiado ampliamente en hongos, pero se tienen pocas observaciones sobre los mecanismos correspondientes en un procarionta micelial.

Las formas de crecimiento y división celular se modifican drásticamente durante el desarrollo de las colonias de *Streptomyces*, obteniendo una capa esponjosa de micelio aéreo. Esto implica una regulación pronunciada de los procesos morfogenéticos y relacionados con el ciclo celular (van Wezel *et al.*, 2007; Barka *et al.*, 2015). Las esporas de *Streptomyces* son distintas a las esporas de otras actinobacterias como *Bacillus* y *Clostridium*; las esporas de los estreptomicetos se producen por la formación de septos en esporóforos multinucleados, seguido de la separación de esporas individuales (Madigan *et al.*, 2009).

Además de la percepción de la situación nutricional y señales de estrés ambiental también están involucradas y controladas por la cascada jerárquica de los genes reguladores *bld* y *whi* que juegan un papel en el desarrollo (Chater, 1993; Flardh *et al.*, 2012).

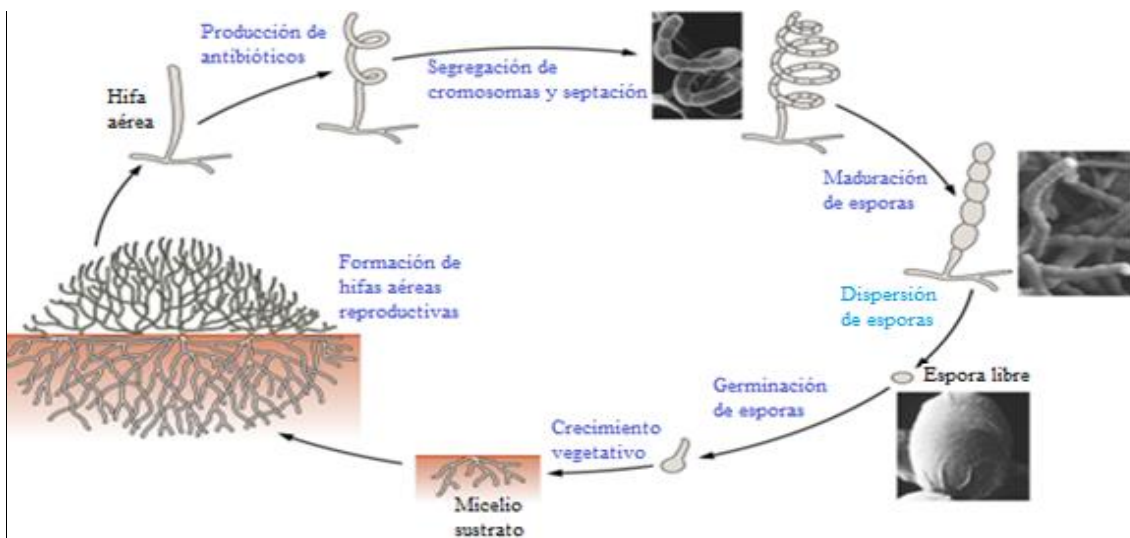


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Modificado de Barka *et al.*, 2015.

Características genéticas de *Streptomyces coelicolor*

La especie de *Streptomyces coelicolor*, es el modelo de estudio por excelencia de las actinobacterias. Su cromosoma comprende un total de 8 667 507 pares de bases (pb) y presenta un sitio de origen de replicación (OriC) orientada al centro del cromosoma. La parte central del cromosoma se extiende alrededor de los 1.5 Mb a 6.4 Mb, dando longitudes desiguales de los brazos de aproximadamente 1.5 Mb (brazo izquierdo) y 2.3 Mb (brazo derecho). La mayoría de los genes esenciales como los implicados en la división celular, la replicación, la transcripción, la traducción y la biosíntesis de aminoácidos, se encuentran en la región del núcleo del cromosoma. En contraparte, los genes codificantes de funciones no esenciales como metabolitos secundarios, exoenzimas hidrolíticas, proteínas de vesículas de gas, se encuentran en los brazos del cromosoma (Fig. 2; Bentley *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2015).

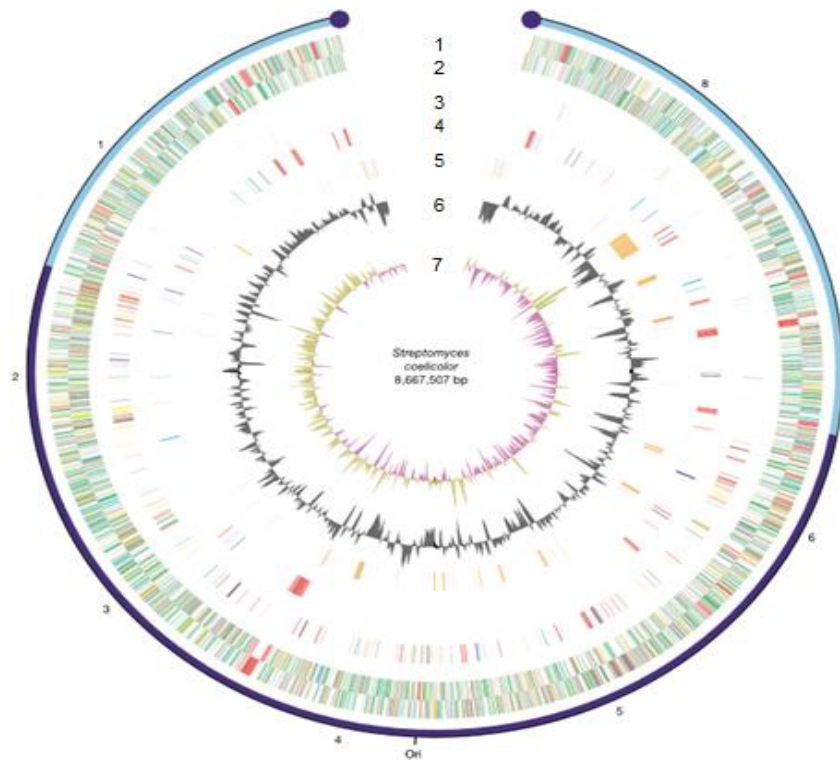


Figura 2. Representación del cromosoma *S. coelicolor*. (1,2) todos los genes, (3) genes esenciales, (4) genes no esenciales, (5) elementos móviles, (6,7) contenido de G+C. Modificado de Bentley *et al.* (2002).

S. coelicolor tiene 7 825 genes haciendo alusión a un enorme potencial codificador comparado con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, que tiene 4 289 genes o con otra bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* con 4 099 secuencias codificantes (Bentley *et al.*, 2002). La gran cantidad de genes codificantes en *S. coelicolor* refleja la multiciplidad de nuevas familias de proteínas, así como la expansión de familias de proteínas conocidas en otras bacterias que están involucradas en el transporte, la degradación de nutrientes extracelulares y la regulación. La secuencia genómica revela el énfasis que se tiene hacia los genes reguladores, con 965 secuencias codificantes que representan 12.3% del total de las secuencias (Bentley *et al.*, 2002).

Metabolismo primario y secundario.

Es conocido el término metabolismo como la suma de todas las reacciones químicas que ocurren en el interior de la célula de forma coordinada mediante diferentes rutas, transformando diferentes compuestos orgánicos, a través de un conjunto de reacciones catalizadas por enzimas y que en conjunto forman diferentes vías metabólicas (Nelson & Cox 2005; Horton *et al.*, 2008).

El metabolismo se presenta en 2 tipos, el anabolismo y el catabolismo. Las reacciones anabólicas (también conocidas como biosíntesis) corresponden a la síntesis de compuestos complejos a partir de precursores pequeños requiriendo un aporte de energía, generalmente en forma de potencial de transferencia de un grupo fosforilo de ATP y de poder reductor de NADH, NADPH y FADH₂. Por el contrario, el catabolismo es la degradación de compuestos grandes y complejos a moléculas pequeñas liberando energía en forma de ATP y de transportadores electrónicos reducidos. Los intermediarios químicos en las reacciones del metabolismo catalizadas por enzimas de las diferentes vías se les conocen como metabolitos (Nelson & Cox 2005; Horton *et al.*, 2008;). Existen 2 tipos de metabolitos microbianos de interés para la microbiología, los primarios que se forman durante la fase exponencial de crecimiento y los metabolitos secundarios que se forman cuando se acerca el final de la fase exponencial de crecimiento o muy cerca o

durante la fase estacionaria de crecimiento y estos no son esenciales para el crecimiento o la reproducción; además de que suelen producirse en enormes cantidades contrariamente de los primarios que están asociados a la energía, crecimiento y no pueden producirse en altas cantidades. Los metabolitos secundarios son producidos comúnmente por microorganismos formadores de esporas durante el proceso de esporulación (Madigan *et al.*, 2009).

La mayoría de los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas que requieren de una síntesis específica llevada a cabo por un gran número de reacciones enzimáticas; sin embargo, estos metabolitos secundarios provienen a partir de precursores generados durante el metabolismo primario (Madigan *et al.*, 2009).

Regulación de la expresión génica

Cada organismo tiene la necesidad de expresar genes codificadores de productos que son de uso constante para el crecimiento y desarrollo, como el caso de las enzimas partícipes en las vías metabólicas centrales. La expresión de genes para estas proteínas es casi a un nivel constante por lo que son designados como genes constitutivos y por lo tanto, la expresión que lleva este tipo de gen se le denomina como expresión génica constitutiva (Nelson & Cox 2005). Por otro lado, también existen proteínas que sólo se necesitan en ciertos momentos y en ciertos ambientes. Los genes que codifican a enzimas que se expresan únicamente cuando se necesitan tienen una expresión regulada y son llamados genes inducibles (Willey *et al.*, 2011).

La expresión génica aumenta o disminuye, de acuerdo a diferentes señales moleculares que son estimuladas principalmente por los cambios ambientales en el entorno de un organismo, conllevando así a una regulación de la expresión génica. Cuantitativamente existen 2 tipos de regulación de la expresión de un gen. Se dice que la regulación es positiva cuando existe en los productos génicos un aumento de su concentración en determinadas circunstancias siendo genes que son

inducibles en su expresión, o en contraparte de esto, la represión de un gen es un tipo de regulación negativa donde se disminuye la concentración de un producto génico. Sin embargo, existen proteínas que actúan como un “doble negativo” ya que tienen el efecto de actuar como un positivo, inhibiendo la función de un regulador negativo y desencadenando una regulación positiva, donde algunos sistemas regulados que parecen ser inducidos, realmente se están desreprimiendo (Nelson & Cox 2005).

La expresión de la información genética debe regularse durante la diferenciación del organismo y sus componentes celulares y para que el organismo se adapte a su ambiente y conserve energía y nutrientes, por lo tanto la expresión de la información genética debe ser influida por señales extrínsecas, y mostrar una respuesta cuando es necesario (Nelson & Cox 2005; Murray *et al.*, 2009). Se ha descrito el incremento de la expresión de un gen en tres tipos de respuestas temporales a señales inductoras (Fig. 3; Murray *et al.*, 2009):

1. La respuesta de tipo A es caracterizada por el aumento de la expresión de un gen que depende de que esté presente una señal inductora, y a su vez cuando la señal desaparece, la expresión del gen disminuye. Este tipo de respuesta es muy visto en bacterias en respuesta a cambios repentinos en la concentración de algún nutriente.
2. La respuesta de tipo B muestra el aumento de la expresión de un gen que es transitorio incluso cuando la señal inductora siga presente. Cuando la señal desaparece, es posible que pueda observarse una segunda respuesta transitoria a una señal subsiguiente. Este fenómeno es observado en acción a diferentes agentes farmacológicos y también es característico de algunos procesos naturales y ocurre cuando un organismo requiera la aparición del producto de un gen específico.
3. La respuesta de tipo C muestra el aumento de la expresión de un gen en respuesta a una señal reguladora que persiste por tiempo indefinido incluso

después de que la señal termine, actuando como un desencadenante; la expresión génica en este tipo de respuesta no puede terminarse incluso en las células hijas, siendo una condición irreversible y hereditaria aunque esta respuesta es vista en el desarrollo de la función diferenciada de un tejido u órgano de organismos superiores.

Las células bacterianas son capaces de responder a diferentes estímulos ambientales modificando su expresión génica o llevando a cabo modificaciones postranscripcionales en las proteínas para controlar su actividad o inhibiéndola. Estos cambios surgen inicialmente en la síntesis de RNA, habiendo reguladores que interactúan con secuencias de DNA específicas para inducir o reprimir la transcripción. La regulación al inicio de la transcripción es un ejemplo común de la adaptación metabólica en las bacterias, siendo las proteínas de unión al DNA las que toman el papel principal en la regulación y estas moléculas son conocidas como factores de transcripción (Rodríguez *et al.*, 2015).

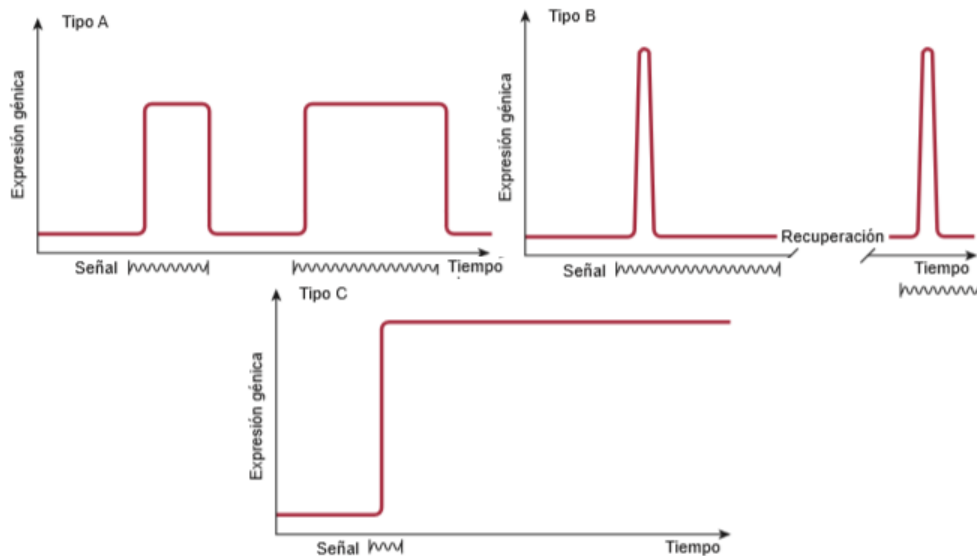


Figura 3. Representaciones esquemáticas de las respuestas de la extensión de la expresión de un gen a señales reguladoras específicas. Modificado de Murray *et al.* (2009).

Los factores de transcripción tienen diferentes conformaciones estructurales, pero tienen una misma característica, su capacidad de unirse al DNA de doble cadena, llevándose a cabo a través de un dominio hélice–vuelta–hélice (HTH por sus siglas

en inglés) que es la forma más común, aunque existen otros dominios como los “dedos de zinc”, hélice–bucle–hélice, o la β plegada (Rodríguez *et al.*, 2015). Las proteínas reguladoras realizan su función a partir de un sistema de uno o dos componentes, relacionado a un estímulo ambiental. En *S. coelicolor* es más típico el sistema de 2 componentes que consiste en que a través de un estímulo ambiental, una proteína sensorial de membrana conocida como sensor cinasa, fosforilá a un regulador de respuesta, haciendo que se una a regiones promotoras específicas del gen ya sea para activar o inhibir la transcripción. En *S. coelicolor* se han reportado 85 sensores cinasas y 79 reguladores de respuesta, en los que se incluye 53 pares de sensores y reguladores que perciben los estímulos ambientales a las que se expone a la bacteria (Bentley *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2015).

En estudios anteriores sobre filogenia, se han encontrado que sensores de sistemas de un componente han sido los más predominantes en procariontes, posiblemente por la respuesta rápida a diversas circunstancias ambientales. Los sistemas de un componente en proteínas contienen dominios conocidos o predichos y carecen del sensor cinasa y regulador respuesta, aunque este sistema es capaz de detectar estímulos similares al de dos componentes y provocar respuestas celulares similares (Rodríguez *et al.*, 2015).

Se deben considerar 2 aspectos generales de la regulación. La primera es que la expresión del gen es raramente un fenómeno de todo o nada. La inhibición de la transcripción usualmente no significa que los genes están “apagados”, más bien significa, que el nivel de mRNA sintetizado decrece significativamente y en muchos casos esto ocurre en niveles muy bajos. Muchos promotores de genes reguladores y operones son considerados “defectuosos” por eso siempre hay algo de nivel basal de transcripción. El segundo aspecto de la regulación es la decisión de las células microbianas a considerar las funciones regulatorias, necesitando únicamente de la síntesis de enzimas de una vía catabólica específica si el sustrato de la ruta está presente en el ambiente y prefiere una fuente de carbono y energía. Las fuentes de carbono y energía preferidas usualmente son más fáciles de catabolizar o rinden más energía. Por lo tanto, las células tienen la ventaja de usar la fuente preferida

antes de otra fuente. La síntesis de las enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis es inhibida cuando el producto final de la ruta está presente (Willey *et al.*, 2011).

En bacterias varios genes codificados juntos son a menudo transcritos a través de un único promotor. Los genes estructurales que codifican para polipéptidos no reguladores y que simplemente están alineados juntos en el DNA y generando un único RNA policistrónico llevando todo el mensaje de la secuencia de bases que codifica para uno o más polipéptidos. Toda esta secuencia de promotor, operador y genes codificantes se denomina operón (Willey *et al.*, 2011).

Transcripción

La expresión de la información génica requiere principalmente de la síntesis de una cadena de RNA transcrita a partir de una cadena molde de DNA y por la acción de la enzima RNA polimerasa, que se encuentra formada por 2 regiones, la región funcional o sitio activo conformada por 4 subunidades, 2 de tipo α que regulan la frecuencia de iniciación, una de tipo β y una de tipo β' que son de tipo catalítico. La otra región se le conoce como factor σ , constituida por una sola subunidad σ , que es el factor proteico que se une al DNA en aproximadamente 50 a 80 nucleótidos localizados a la izquierda del sitio de inicio de la transcripción. Otro factor importante para la transcripción es el promotor, una secuencia de nucleótidos que generalmente se localiza a la izquierda del sitio de inicio de la transcripción, en la región de -10 a -35 y que está constituida por regiones altamente conservadas en la región -10, denominadas como cajas TATAAT y en la región -35 conocida como caja TTGACA en *Escherichia coli*. La RNA polimerasa se mueve a lo largo de la cadena molde de DNA y sintetiza un RNA hasta que encuentre una secuencia específica de terminación. Contrariamente al DNA, el RNA desempeña sus funciones a partir de una cadena sencilla, tomando una amplia variedad de funciones celulares, en las que destaca el almacenamiento y la transmisión de la información y en la catálisis (Jiménez & Merchant 2003; Nelson & Cox 2005).

Durante la transcripción, se ha reconocido que las proteínas han sido importantes porque forman complejos que funcionan como maquinarias moleculares muy elaboradas, empezando por los complejos enzimáticos, que convierte la información genética de un segmento de DNA de doble cadena, en cadenas sencillas de RNA, con secuencias de bases complementarias a las del DNA. Existen 3 tipos principales de RNA:

1. El RNA mensajero (mRNA) que varía en tamaño y composición de acuerdo al tamaño del gen transcrito y es el que codifica la secuencia de aminoácidos, de uno o más polipéptidos especificados por un gen o un conjunto de genes (policistrónico). Representa del 3 al 5% del RNA total, transcribiéndose y traducándose en el mismo compartimento en procariontes y teniendo una vida media de más o menos 5 minutos. Este tipo de RNA posee codones codificables que representan la secuencia de aminoácidos que será traducida. Antes del codón de inicio AUG, presenta un segmento de polipurinas exclusivo de procariontes llamada región Shine-Dalgarno que es el sitio de reconocimiento de los ribosomas; enseguida del codón de inicio AUG se encuentra la secuencia del gen extendiéndose hasta un codón de terminación (UAA, UAG y UGA). Cuando es un RNA policistrónico, existen también regiones intercistrónicas no codificantes, aunque hay algunos procariontes que no presentan dichas regiones (Jiménez & Merchant 2003).
2. EL RNA de transferencia (tRNA) que posee una longitud de entre 72 a 95 nucleótidos, siendo uno de los RNA más pequeños, lee la información de los codones del mRNA y transfiere los aminoácidos adecuados a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis de proteínas, realizando esta función en 2 regiones; el anticodón que va a interactuar con el codón del mRNA y la región aceptora terminal 3' (Jiménez & Merchant 2003; Nelson & Cox 2005).

3. El RNA ribosomal (rRNA) forma parte de los ribosomas que son grandes complejos que sintetizan a las proteínas y son un elemento fundamental en el mecanismo de la traducción y por lo tanto su síntesis es constitutiva y pueden adquirir una conformación particular. En procariontes se han descrito los rRNA 23S, 16S y 5S (Jiménez & Merchant 2003; Nelson & Cox 2005).

También existen otros tipos de RNA específicos que tienen funciones reguladoras o catalíticas, o son precursores de los RNAs antes mencionados.

La transcripción se caracteriza por ser un proceso más selectivo contrario a la replicación, ya que ciertos genes o grupos de genes, o algunas regiones de genoma no son transcritas, o se transcriben a diferentes tiempos durante el crecimiento y la maduración de la célula, restringiendo la expresión de la información génica a la formación de los productos génicos necesarios en cada momento, por lo que se dice que la expresión génica está regulada (Madigan *et al.*, 2009).

Características de las proteínas reguladoras.

Muchas proteínas reguladoras forman dímeros que contienen los dominios de unión al DNA y se unen en regiones de secuencias del DNA repetidas invertidas llamadas palíndromas. En las proteínas, los dominios más comunes presentan una conformación de motivos de hélice-vuelta-hélice o los dedos de zinc, aunque también se presentan otras menos comunes como la hélice-bucle-hélice, y la β plegada; todas éstas forman estructuras tridimensionales distintas (Willey *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015).

El dominio de unión al DNA, hélice-vuelta-hélice (Fig. 4a) se encuentra en proteínas reguladoras de bacterias, (como el represor *lac* y el represor de triptofano). Estos son generalmente secuencias de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud y esta doblada dentro de dos alfa hélices separadas por una porción de proteína en beta plegada. Una de las hélices sobresale de la superficie de la proteína y a menudo se posiciona en el surco mayor del DNA. Así cuando la proteína reguladora forma dímeros de 2 alfa hélices, una de cada subunidad de la proteína, interactúan con el surco mayor del DNA (Willey *et al.*, 2011).

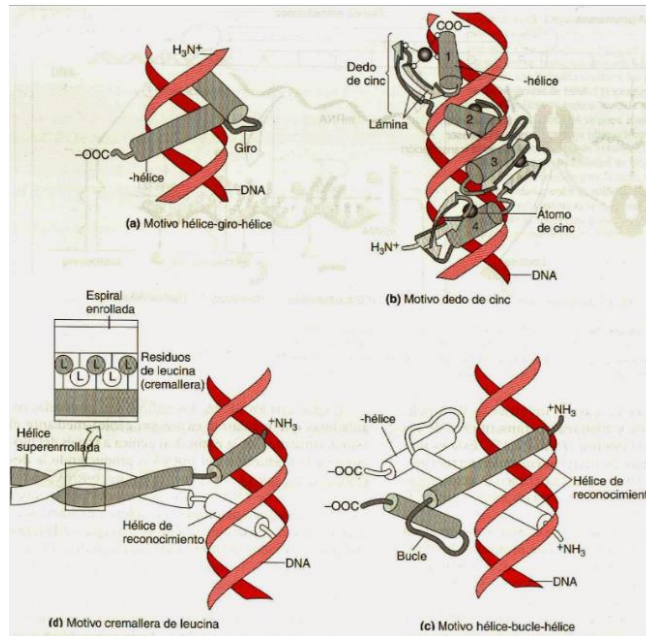


Figura 4. Unión al DNA por factores de transcripción (a) Hélice-vuelta-hélice. (b) Dedos de zinc (c) Cremallera de leucina (d) Hélice-bucle-hélice. Obtenido de Thieman & Palladino (2015)

Los dedos de zinc (Fig. 4b) son otro dominio de unión al DNA que han sido observados en algunas proteínas reguladoras de las bacterias pero son más comunes en proteínas reguladoras de eucariotas. Los dedos de zinc son largos bucles formados por alrededor de 30 aminoácidos; el bucle es estabilizado por una interacción de ciertos aminoácidos dentro del bucle con un ion de zinc (Zn^{2+}). Las proteínas reguladoras a menudo tienen más de un dedo de zinc, cada uno puede interactuar con el DNA; sin embargo, la función de cada dedo de zinc puede ser diferente pudiéndose unir a secuencias de DNA no específico, mientras otras son importantes para el reconocimiento de una secuencia particular de DNA (Willey *et al.*, 2011).

Las proteínas reguladoras pueden ejercer su acción sobre la transcripción, ya sea como control positivo o con un efecto negativo. El control transcripcional negativo ocurre cuando la proteína de unión al DNA inhibe la iniciación o bloquea la continuación de la transcripción; las proteínas reguladoras que actúan de esta forma se denominan como proteínas represoras. El control positivo de la transcripción ocurre cuando las proteínas de unión al DNA promueven el inicio de la transcripción,

estas proteínas son llamadas proteínas activadoras. Las proteínas activadoras y represoras generalmente actúan por uniones a sitios específicos del DNA. En bacterias, las proteínas represoras se unen a regiones específicas llamadas operadores que generalmente se superponen o están a la derecha del promotor. Las proteínas activadoras se unen a sitios de unión que frecuentemente se encuentran a la izquierda del promotor (Fig. 5). La presencia de un activador en el sitio regulador generalmente promueve la unión de la RNA polimerasa (Willey *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015).

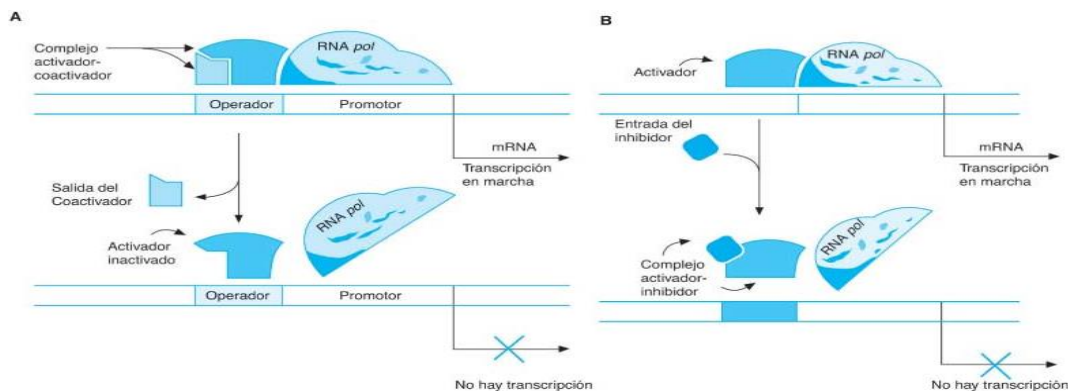


Figura 5. Proteínas activadoras y represoras. (A) La proteína activadora presenta un complejo activador y un coactivador, si el coactivador se separa, el activador se inactiva y la transcripción se interrumpe (B) Si a la proteína activadora se une un inhibidor, la transcripción se interrumpe. Tomado de Laguna *et al.* (2009).

Las proteínas represoras y activadoras deben existir en ambas formas, activas e inactivas para que el inicio de la transcripción pueda ser controlado apropiadamente. Por lo que se requiere su modificación por pequeñas moléculas efectoras, la mayoría de los cuales están unidas a la proteína reguladora no covalentemente mostrando cuatro formas básicas, en las cuales la interacción de un efector y una proteína reguladora pueden afectar la transcripción:

1. Para genes inducibles controlados negativamente, la proteína represora es activa y previene la transcripción cuando el sustrato de la vía no está disponible. Cuando el sustrato se adiciona, el efector o inductor se une a la proteína represora y entonces es inactivada por esta unión y se permite la

transcripción de los genes controlados (Fig. 6A). Un ejemplo es el modelo del operón *lac* en *Escherichia coli* (Willey *et al.*, 2011).

2. Para genes reprimibles controlados negativamente, (aquellos que codifican enzimas necesarias para la síntesis de un aminoácido) donde la proteína represora es inicialmente sintetizada en una forma inactiva llamada aporepresor y este es activado por la unión de un correpresor. Para enzimas reprimibles que funcionan en una ruta biosintética, el correpresor es a menudo el producto de la ruta, por ejemplo, un aminoácido como el triptofano. En ausencia de un correpresor, el represor es incapaz de unirse al DNA y ocurre la transcripción. Cuando el correpresor se une a la proteína llamada represor, ahora se puede unir al DNA y la transcripción es bloqueada (Fig. 6B). Un ejemplo es el modelo del operón de triptofano en *E. coli* (Willey *et al.*, 2011).
3. Cuando se tiene un gen inducible positivamente regulado para su transcripción se requiere de la presencia de una proteína activada por el inductor. Esta proteína reguladora unida al inductor es capaz de unirse al DNA y activar la transcripción (Fig. 6C). Un ejemplo es el modelo de operón de arabinosa en *E. coli* (Willey *et al.*, 2011).
4. La proteína activadora de un gen reprimible regulado positivamente puede ser inactivado por un inhibidor. El activador se une al DNA y promueve la transcripción a menos que el inhibidor esté presente y se une al activador sufriendo un cambio conformacional que impide su unión al DNA. Esto inhibe la transcripción (regulación alostérica) (Fig. 6D; Willey *et al.*, 2011).

Las proteínas reguladoras de bacterias tienen 2 dominios, uno para la unión de una pequeña molécula efectora y uno para la unión al DNA. La unión de la molécula efectora puede cambiar la habilidad de las proteínas reguladoras de unirse al DNA (Willey *et al.*, 2011).

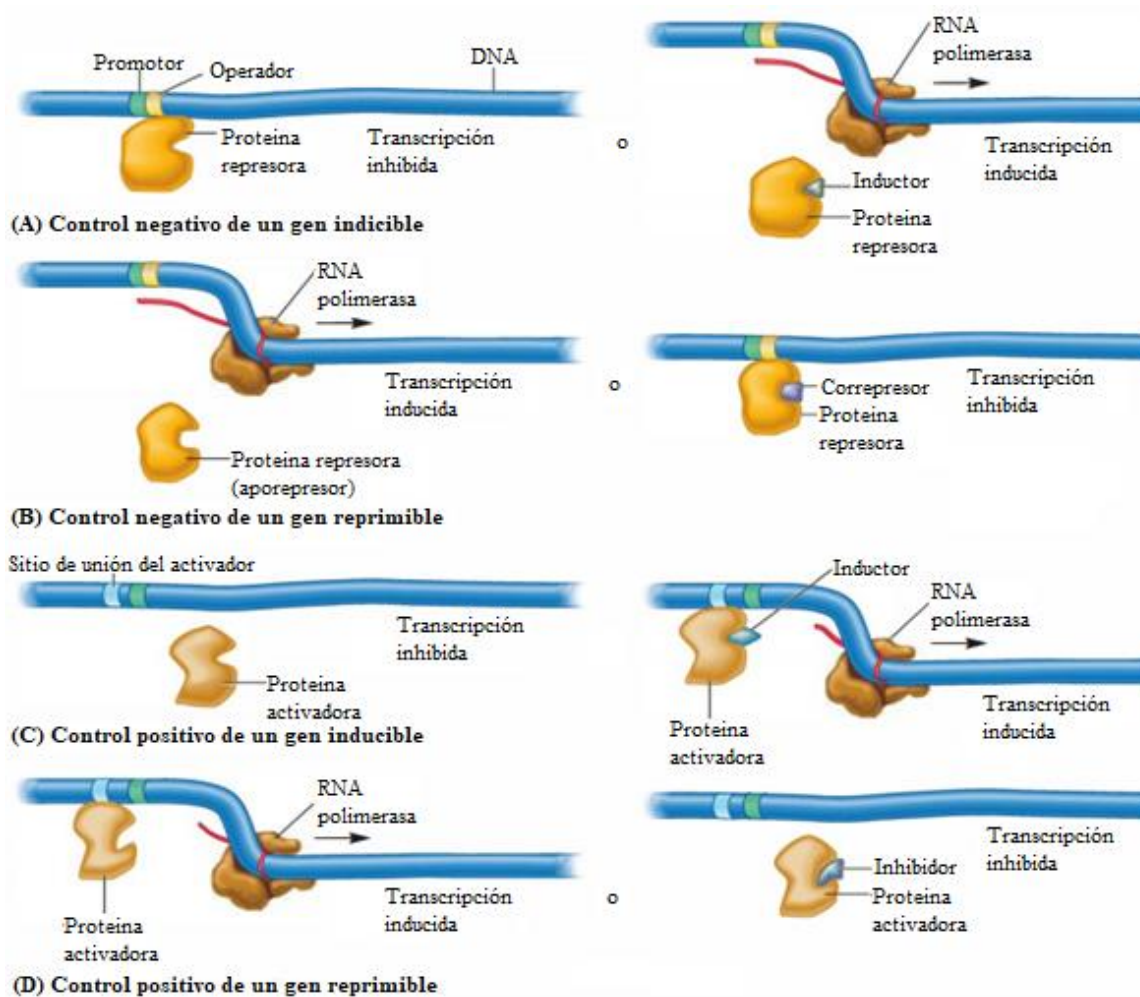


Figura 6. Mecanismo de acción de las Proteínas Regulatorias Bacterianas. Las proteínas reguladoras bacterianas tienen dos sitios de unión, uno para una pequeña molécula efectora y otro para el DNA. La unión de la molécula efectora cambia la capacidad de la proteína reguladora para unirse al DNA. Modificado de Willey *et al.* (2011).

Sistemas de uno y dos componentes

Los sistemas de un componente (OCS, One Component System) y dos componentes (TCS, Two Component System) se vinculan a estímulos ambientales específicos y se presentan en organismos de todos los dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya. Controlan la expresión de determinados genes en respuesta a factores del medio, participando en quimiotaxis, captación de nutrientes, fijación del nitrógeno, esporulación, quorum sensing y virulencia (Rodríguez *et al.*, 2015).

El sistema de dos componentes consiste en un sensor cinasa (SK, Sensor Kinase), con dominios extracelulares que responden a diferentes estímulos ambientales, provocando una autofosforilación de un residuo de histidina en una posición conservada que transfiere el grupo fosforilo a una proteína de unión al DNA, conocida como regulador de respuesta (RR, Response Regulator) que la convierte en un factor transcripcional. Los genes que codifican al regulador de respuesta están, generalmente, codificados por genes vecinos. (Fig. 7; Rodríguez *et al.*, 2015).

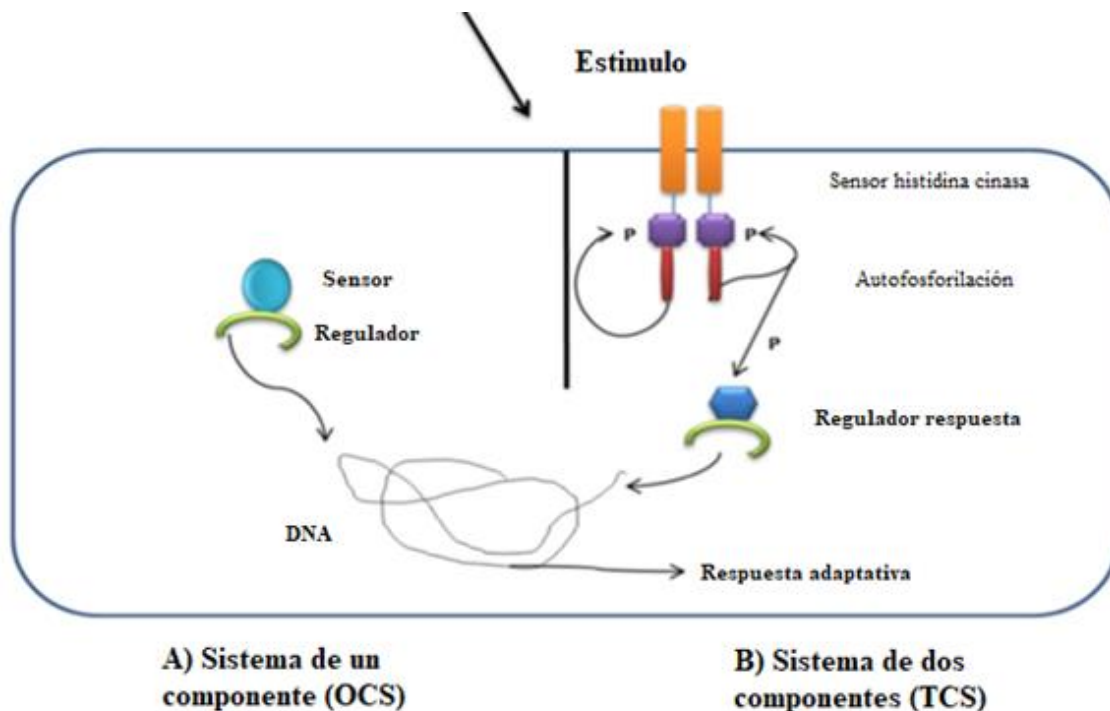


Figura 7. Sistemas de señal de uno (OCS) y dos componentes (TCS). A) consiste en una proteína con un dominio sensor y un dominio regulador. B) un sensor de histidina cinasa y un regulador respuesta. Modificado de Rodríguez *et al.* (2015).

Se ha evidenciado por medio de análisis genómicos bacterianos que el número de sensores cinasa y reguladores de respuesta, son más altos en relación al tamaño del genoma y se correlaciona con la cantidad de estímulos ambientales a los que está expuesta la bacteria. Estudios filogenéticos sugieren que los sensores de un componente son el mecanismo dominante de detección de nutrientes en procariontes y posiblemente se deba a la necesidad de una respuesta rápida a cambios ambientales. La proteína tiene un dominio sensor de entrada y un dominio de respuesta de salida (Rodríguez *et al.*, 2015).

En *S. coelicolor* se conocen 53 parejas sensor-regulador, 85 sensores cinasa y 79 reguladores de respuesta (Botas 2013; Rodríguez *et al.*, 2015). De todos estos reguladores codificados en el genoma de este microorganismo, se considera más importantes para la regulación del metabolismo de carbono, a los que se describen a continuación.

Proteína receptora de AMPc (CRP)

En estudios filogénicos, se ha encontrado que el gen *crp* codifica a una proteína de aproximadamente 220 aminoácidos, que pertenece a la superfamilia de proteínas CRP/FNR. Esta proteína presenta, en la región N-terminal, un dominio de unión al adenosín-monofosfato cíclico (AMPc), mientras que en la región C-terminal se encuentra el dominio de unión al DNA (Derouaux *et al.*, 2004).

La proteína receptora de AMPc (CRP) se encuentra en bacterias gram negativas y positivas, aunque está ausente en algunas otras como en *Bacillus*. Se ha estudiado mejor su función en *E. coli*, donde es intermediaria en la represión catabólica de carbono junto a su molécula efectora AMPc, y puede unirse a 70 regiones génicas diferentes, pudiendo activar o reprimir la expresión de diversos genes que están implicados en diferentes funciones celulares como el metabolismo y la depleción de carbono, resistencia a estrés, motilidad y patogénesis (Derouaux *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2012).

En *S. coelicolor*, se ha encontrado que el AMPc es sintetizado durante todas las etapas de desarrollo y se ha confirmado su capacidad de interactuar con CRP. Se ha demostrado que esta proteína reguladora tiene un papel en el desarrollo morfológico de este microorganismo, es decir durante la germinación y la esporulación. También se ha visto que CRP es capaz de modular el metabolismo primario y secundario, demostrando que es capaz de controlar la transcripción de genes que codifican a enzimas que participan en la acumulación de acetil-CoA y en la producción de antibióticos (Gao *et al.*, 2012).

Proteína reguladora de deficiencia de esporas aéreas (DasR)

El gen *dasR* codifica a la proteína reguladora DasR de 254 aminoácidos, perteneciente a la familia GntR, que están asociados en la formación de micelio aéreo y la producción de metabolitos secundarios. La actividad de DasR está controlada por estímulos extracelulares, específicamente por la presencia de la N-acetilglucosamina (GlcNAc), controlando al regulón que la asimila. Esta molécula se presenta en el peptidoglucano bacteriano y es un monómero de la quitina, que es uno de los polímeros naturales más abundantes en el planeta (Rigali *et al.*, 2006).

La GlcNAc modula la actividad de este regulador. Las bajas concentraciones de GlcNAc activan a DasR reprimiendo el sistema de fosfotransferasas de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), encargado del transporte de azúcares diferentes hacia el interior de las células bacterianas. Por otro lado, las altas concentraciones de GlcNAc en el medio ambiente, inactivan a DasR permitiendo la transcripción del sistema PTS, siendo la GlcNAc transportada y fosforilada por el fosfoenolpiruvato en el interior de la bacteria, donde por medio de otras enzimas, es formada la fructosa 6 fosfato para entrar a la vía de la glucólisis (Rigali *et al.*, 2006; Rigali *et al.*, 2008).

En otros estudios, se ha obtenido una mutante deletada del gen *dasR* donde se ha mostrado una mayor producción de los antibióticos pigmentados, sugiriendo que la presencia de DasR inicia una cascada de señalización que va desde la detección de nutrientes hasta la producción de antibióticos (Rigali *et al.*, 2006).

Proteína reguladora global de nitrógeno (GlnR)

La asimilación de nitrógeno está regulada transcripcionalmente por un regulador global de nitrógeno, GlnR. Esta proteína reguladora de 267 aminoácidos es un regulador de respuesta huérfano sin sensor quinasa acoplado y que, además, regula muchas de las proteínas implicadas en el metabolismo del carbono, especialmente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la glucólisis y la ruta de la pentosa fosfato, mostrando que la regulación mediada por GlnR presenta un papel importante en el metabolismo del carbono y además, una conexión entre el

metabolismo de carbono y nitrógeno. Se ha reportado en *S. coelicolor* que el regulador GlnR, controla la expresión de transportadores ABC de carbohidratos, está involucrado en la morfogénesis y el desarrollo de *S. coelicolor* M145 detectando el estado nutricional del medio ambiente y, por lo tanto, conexión del metabolismo del carbono y el nitrógeno (Fink *et al.*, 2002; Tiffert *et al.*, 2011).

La proteína GlnR controla importantes genes implicados en la absorción y regulación de nitrógeno como el operon *mtB-glnK-glnD* que actúan en la asimilación de fuentes de nitrógeno y transporte de amonio, *glnA* y *glnII* que son codificantes para las enzimas glutamina sintetasa (GS), así como de glutamato deshidrogenasa (GDHA). Lo que señala a esta proteína reguladora como importante en la regulación de la biosíntesis de aminoácidos (Tiffert *et al.*, 2008).

Proteína reguladora de *trans*-aconitato metil transferasa (TamR)

El regulador *trans*-aconitato metiltransferasa (TamR) es una proteína de 165 aminoácidos perteneciente a la familia MarR, codificada por el gen *tamR*. Es importante para el flujo metabólico a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos durante el estrés oxidativo ya que *S. coelicolor* vive en diferentes ambientes ecológicos y es una de las bacterias del suelo más ampliamente distribuida. TamR reprime diversos genes incluida la transcripción del gen aconitasa; la enzima que contiene grupos hierro-azufre (Fe-4S). La aconitasa cataliza la isomerización de citrato a isocitrato a través de *cis*-aconitato. Los niveles de citrato y *trans*-aconitato pueden aumentar cuando el núcleo de hierro-azufre requerido para la actividad enzimática es alterado, causando la acumulación del sustrato citrato y liberación del intermediario *cis*-aconitato, que luego se convierte en el isómero *trans* más estable. Estos metabolitos a su vez, se unen a TamR para atenuar la unión al DNA y aliviar la represión de genes. Por lo tanto, este regulador funciona como un interruptor de atenuación para afinar el flujo metabólico a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, particularmente durante la recuperación del estrés oxidativo (Huang & Grove 2013).

Justificación

Streptomyces coelicolor es la especie modelo de este género de actinobacteria más empleada e investigada. Se ha mencionado la importancia de este microorganismo en el área médica, veterinaria, farmacológica y agrícola por la amplia producción de metabolitos que son de uso recurrente, generando así también un interés económico. A pesar de haber ya alcanzado un gran número de hallazgos, en relación al estudio del metabolismo secundario de este organismo, aún se desconoce cómo se expresan y regulan los genes que participan en el metabolismo primario, los cuales generan precursores que son intermediarios en la biosíntesis de antibióticos. Enfocado a este último punto, el conocer cómo se lleva a cabo la regulación, ya sea activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes, puede abrirse un amplio panorama en la cascada de señalización de diversas rutas metabólicas y comprobar cómo dicha expresión puede ser llevada a cabo en diferentes fuentes de carbono. El estudiar la expresión de genes reguladores a diferentes horas de crecimiento puede ayudar a entender si estas moléculas pueden participar en la regulación del metabolismo del carbono en *S. coelicolor*.

Objetivo

General

- Determinar la expresión de los genes reguladores *crp*, *glnR*, *dasR* y *tamR* en muestras de RNA total obtenidas a diferentes tiempos de crecimiento de *Streptomyces coelicolor* M145 en medio mínimo con glucosa, fructosa y casaminoácidos como fuentes de carbono para obtener de forma semicuantitativa los diferentes niveles en que se expresan estos genes en cada condición.

Particulares

- Obtener las muestras de DNA complementarios por medio de ensayos de transcripción reversa a partir de muestras de RNA previamente extraídas y tratadas con DNAsa, de *Streptomyces coelicolor* M145 crecido en las condiciones ya establecidas.
- Obtener por PCR los amplicones del tamaño esperado realizados a partir de los cDNA obtenidos y de las temperaturas de alineamientos predeterminadas con los oligonucleótidos usados.
- Determinar la intensidad de las bandas obtenidas por la electroforesis de cada uno de los amplicones.

Hipótesis

- Los genes correspondientes a los reguladores transcripcionales *crp*, *dasR*, *glnR* y *tamR* se transcriben de manera diferencial de acuerdo con las fuentes de carbono usadas para el crecimiento de *S. coelicolor*.

Materiales y métodos

Modelo de estudio

Se utilizó al microorganismo *Streptomyces coelicolor* M145.

Oligonucleótidos sentido y antisentido

Se utilizaron pares de oligonucleótidos sentido y antisentido para cada uno de los genes basándose en la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor* M145. Fueron identificadas las secuencias codificantes en la base de datos de la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEEG) y con el apoyo de los programas DNAMAN y Primer3 se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido con las siguientes secuencias:

- Oligonucleótido sentido *crp*: 5'-GTCACGGAAGGCAAGGTC-3'.
- Oligonucleótido antisentido *crp*: 5'-GAGCAGCTTGACCTCGGT-3'.
- Oligonucleótido sentido *dasR*: 5'-GACATCGGCTACATCACCG-3'.
- Oligonucleótido antisentido *dasR*: 5'-CGTGTACTTCACCAGGGAGC-3'.
- Oligonucleótido sentido *glnR*: 5'-CTGCTGCACAACGTACGC-3'.
- Oligonucleótido antisentido *glnR*: 5'-GATGAGGACCAGCGGACA-3'.
- Oligonucleótido sentido *tamR*: 5'-ATCTCGAGCCGTGGGAGT-3'.
- Oligonucleótido antisentido *tamR*: 5'-CTCCACCAGGCCCTTCTT-3'.

Los oligonucleótidos se diseñaron en secuencias de 18 a 20 pb (pares de bases), con un contenido de G+C entre 55% y 60%; también se diseñaron con las características de que no hubiera algún apareamiento en las secuencias de los oligonucleótidos sentido y antisentido, que se obtuviera un fragmento de amplificación de 150 a 200 pb y que las temperaturas de alineamiento fueran de entre 59°C y 64 °C y entre cada par fueran lo más cercana posible.

Ensayos de reversotranscripción (RT)

El trabajo experimental se comenzó a partir de muestras de RNA total que fueron antes extraídas de cultivos de *Streptomyces coelicolor* WT M145 crecido por 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas en medio mínimo con glucosa 1%, fructosa 1% y casaminoácidos 1% como parte del trabajo realizado por Llamas en 2018. Se obtuvo el cDNA (DNA complementario) utilizando la enzima reverso transcriptasa M-MLV (Promega). Se realizaron diferentes mezclas de reacción usando 25 ng de RNA total preservadas a -72°C , se desnaturalizó y se trabajó en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias, 0.5 μl de primer antisentido (50 μM) y ajustando a 15 μl con agua grado biología molecular (gbm). La mezcla se dejó reposar 5 minutos a 72°C para que el oligonucleótido se alineara con el RNA. Posteriormente, trabajando las muestras en hielo, se añadió a cada muestra 5 μl Buffer RT 5X, 1.25 μl DNTP's (10 mM), 1 μl M-MLV RT (200 U; Promega) y se ajustó cada muestra a 25 μl con agua gbm. Cada muestra se incubó 60 minutos a 42°C para que se llevara a cabo la reacción de reversotranscripción y después se incubó por 10 minutos a 92°C para inactivar la enzima reversotranscriptasa. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso posterior (Fig. 8).

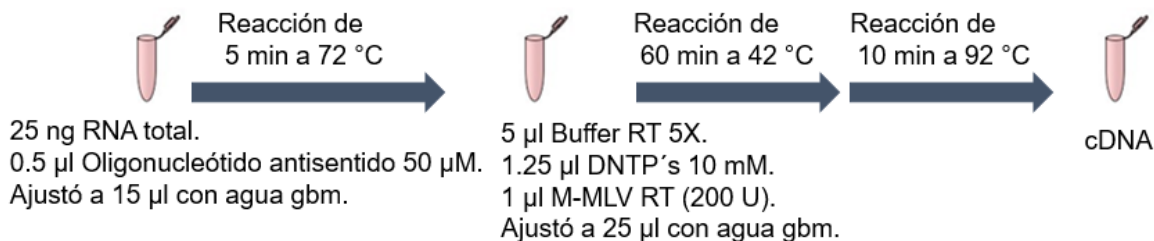


Figura 8. Pasos realizados para la reacción de la reverso transcriptasa.

Ensayos de reacción de la cadena de polimerasa (PCR) punto final

La PCR punto final fue realizada siguiendo el protocolo del fabricante de la enzima “DreamTaq™Green PCR” (Thermo Sci.) con algunas modificaciones. Se realizaron las mezclas de reacción utilizando 2 µl de cDNA de cada una de las muestras y a cada una se les agregó 12.5 µl del master mix de la enzima polimerasa DreamTaq™Green PCR (2X), 0.5 µl del oligonucleótido sentido (50 µM), 0.5 µl de oligonucleótido antisentido (50 µM), 1 µl de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) y se ajustó a un volumen final de 25 µl con agua gbm.

Posteriormente se colocaron cada una de las muestras en un termociclador BioRad modelo T100, programándose con las diferentes temperaturas por cada paso como se muestra en la tabla 1.

Tabla1. Programa de temperaturas, tiempos y ciclos en el termociclador BioRad modelo T100 para cada muestra.

	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
Temperatura (°C)	95	95	<i>crp</i> : 60 <i>dasR</i> : 59 <i>glnR</i> : 60.5 <i>tamR</i> : 59	72	72
Tiempo	3 min	30 s	1 min	1 min	5 min
# de Ciclos	1	30	30	30	1

Electroforesis en gel de agarosa

Realizadas las amplificaciones de los genes, se observaron los resultados por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% w/v. Ya que la concentración de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de DNA a separar, al igual que del buffer de corrida empleado, se preparó una solución 1.5% de agarosa añadiendo 1.5 g de agarosa en 100 ml de buffer tris-boratos 1X (TBE, previamente preparado), la mezcla se calentó hasta homogeneizarse y se añadieron 10 µl de bromuro de etidio 10 000X (Sigma Chem). Se preparó la charola de la cámara con un peine de 8 pozos y se adicionaron 30 ml de la agarosa; se reposó a temperatura ambiente hasta que solidificó. Se retiró cuidadosamente el peine y se colocó el gel dentro de la charola en la cámara de electroforesis y se añadió buffer TBE hasta cubrir la superficie del gel.

Cada muestra de 25 µl con el producto de PCR (amplicón) fue previamente mezclada con 5 µl de buffer de carga Orange DNA 6X (Fermentas) y se colocaron 18 µl de la muestra en cada pozo. En cada gel de agarosa se cargó en un pozo 6 µl de marcador de peso molecular (Escalera de 100 pb, Fermentas). Las muestras se corrieron a 110 volts por 1 hora.

Escaneo de los productos del RT-PCR semicuantitativo

Todos los geles de agarosa fueron observados individualmente en un transiluminador de luz UV a un tiempo de exposición de 0.7 segundos y por medio del programa Kodak Molecular Imaging se analizó la intensidad de cada una de las bandas vistas en los geles por medio de la obtención de los números de píxeles.

Resultados

Estandarización de la temperatura de alineamiento

Previo al comienzo de los ensayos de RT-PCR, fue necesario comprobar el correcto alineamiento de los oligonucleótidos sentido y antisentido para amplificar la región de DNA que se desea y probar las temperaturas de alineamiento descritas por el fabricante, esto través de un PCR punto final usando el mismo protocolo mencionado en materiales y métodos, empleando DNA genómico purificado de *Streptomyces coelicolor* M145. Además, para saber si los productos de amplificación eran del tamaño esperado, de acuerdo a las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos de cada gen, se obtuvieron amplicones para el gen *crp* de 159 pb, para *dasR* de 180 pb, para *glnR* de 165 pb y para *tamR* de 155 p (Fig. 9).

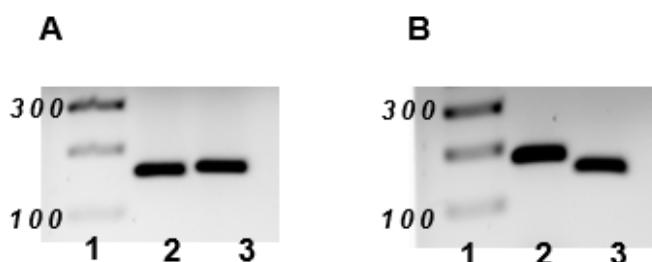


Figura 9. Amplificación de productos por PCR punto final usando DNA genómico de *S. coelicolor*, marcador de pesos moleculares (carril A1; Fermentas), amplicón del gen *crp* (carril A2), amplicón del gen *dasR* (carril A3), marcador de pesos moleculares (carril B1; Fermentas), amplicón de gen *glnR* (carril B2), amplicón de gen *tamR* (carril B3).

En la figura 9 se observan los amplicones que de cada PCR sólo se obtuvo una banda y que el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR con los oligonucleótidos correspondientes, son del tamaño esperado comprobando así, la correcta funcionalidad de los oligonucleótidos y la temperatura de alineamiento para cada gen.

Obtención de los controles negativos de cada gen en diferentes condiciones

Durante la realización de los ensayos de RT-PCR, fue necesario realizar un control negativo para reverso transcripción con la finalidad de saber si las muestras de RNA están contaminadas con DNA. Se siguió el mismo procedimiento de PCR punto final descrito en materiales y métodos, sólo que se usaron 2 µl de RNA total en lugar del cDNA. Para las muestras de RNA de 12 h se usaron los oligonucleótidos correspondientes al *crp*, para las muestras de 24 h se usaron los oligonucleótidos de *dasR*, para las muestras de 36 h se usaron los oligonucleótidos para la amplificación del gen de *glnR*, para las muestras de 48 h se usaron los oligonucleótidos de *tamR*, para las muestras de 60 h se usaron los oligonucleótidos de *crp* y para las muestras de 72 h se usaron los oligonucleótidos de *dasR*. Este procedimiento se empleó para todos los RNA de cada una de las fuentes de carbono obteniendo los resultados que se muestran en la figura 10. En cada uno de los controles se obtuvo el resultado deseado, ya que no hubo amplificación en las muestras de RNA, por lo que puede asegurarse que los resultados que se obtengan serán por la presencia de RNAm de cada gen en las muestras obtenidas (Fig. 10).

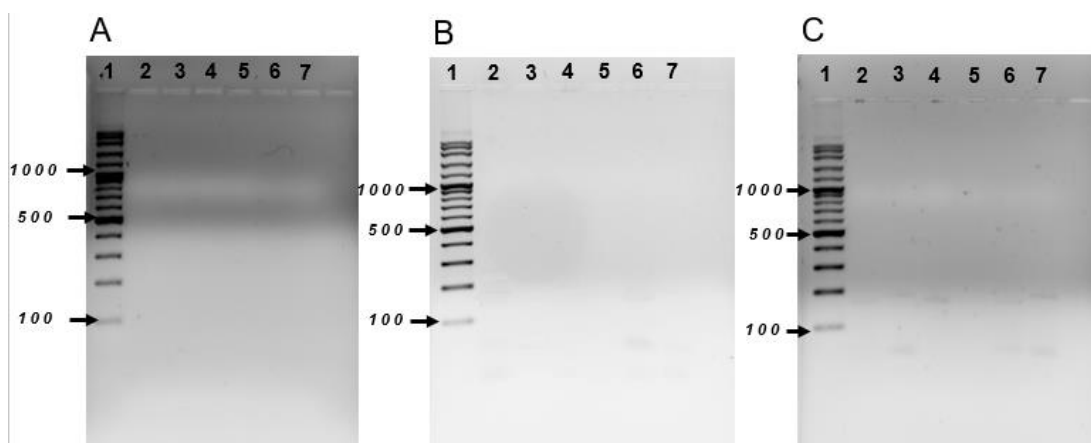


Figura 10. Ensayo de PCR punto final con los RNAs para el control de RT negativo. (A) Muestras de RNA extraídas de *S. coelicolor* crecido en casaminoácidos, (B) muestras de RNA extraídas de *S. coelicolor* crecido en fructosa, muestras de RNA extraídas de *S. coelicolor* crecido en glucosa, (carril 1) marcador de pesos moleculares (Fermentas), (carril 2) muestra de RNA de 12 h, (carril 3) muestra de RNA de 24 h, (carril 4) muestra de RNA de 36 h, (carril 5) muestra de RNA de 48 h, (carril 6) muestra de RNA de 60 h (carril 7) muestra de RNA de 72 h.

Expresión de los genes *crp*, *glnR*, *dasR* Y *tamR* en *Streptomyces coelicolor* crecido en las diferentes fuentes de carbono

Con el interés de conocer en qué fuentes de carbono y en qué tiempos se transcribían los diferentes genes en *S. coelicolor*, se realizaron los ensayos de RT-PCR en cada uno de los genes en las diferentes fuentes de carbono. Se llevó a cabo el RT-PCR semicuantitativo incorporando un control positivo usando DNA genómico de *S. coelicolor* para que la banda correspondiente al amplicón funcionara como guía del tamaño correcto correspondiente para cada producto esperado. En la figura 11 se muestra la presencia de RNA mensajero correspondiente a la expresión del gen *crp*, en la que se observa su presencia en todas las horas de crecimiento en las distintas fuentes de carbono probadas, a excepción del crecimiento a las 72 horas en glucosa como fuente de carbono, donde se nota una disminución en la intensidad de esta banda (Fig. 11-C carril 8).

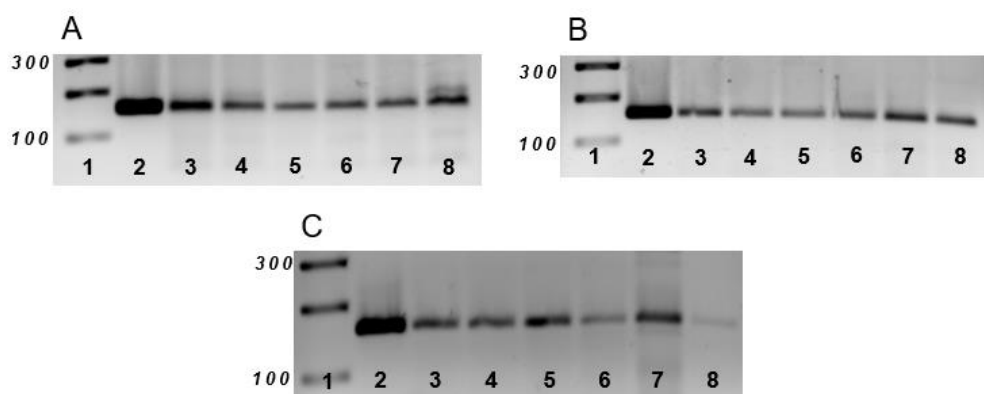


Figura 11. Expresión del gen *crp* de *S. coelicolor* crecido en distintas fuentes de carbono. (A) Casaminoácidos, (B) Fructosa, (C) Glucosa, (carril 1) marcador de pesos moleculares de 100 pb (Fermentas), (carril 2) control positivo con DNA genómico de *S. coelicolor*, (carril 3) muestra de RNA de 12 h, (carril 4) muestra de RNA de 24 h, (carril 5) muestra de RNA de 36 h, (carril 6) muestra de RNA de 48 h, (carril 7) muestra de RNA de 60 h y (carril 8) muestra de RNA de 72 h.

En la figura 12 se muestra la expresión del gen *dasR* en *S. coelicolor* crecido en las fuentes de carbono mencionadas a diferentes horas de crecimiento. Contrario al gen *crp*, no fue observada expresión alguna del gen *dasR* en casaminoácidos como fuente de carbono (Fig. 12A) observándose únicamente la banda correspondiente al control positivo, mientras que en fructosa, cualitativamente se muestra una mayor expresión a las 36 y 48 horas (Fig. 12B). Por otro lado, la expresión de este gen en glucosa (Fig. 12C) se ve claramente disminuida a las 36 horas de crecimiento, mientras que se mantiene casi constante en las demás horas de crecimiento.

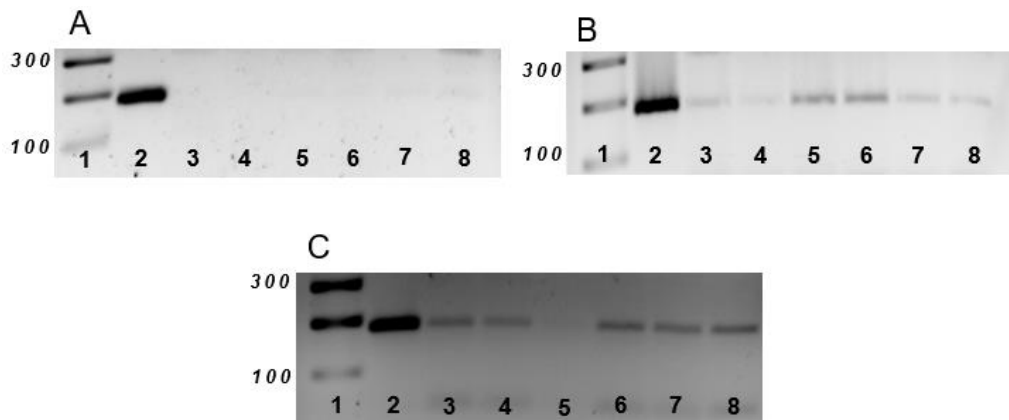


Figura 12. Expresión del gen *dasR* de *S. coelicolor* crecido en distintas fuentes de carbono. (A) Casaminoácidos, (B) Fructosa, (C) Glucosa, (carril 1) marcador de pesos moleculares de 100 pb (Fermentas), (carril 2) control positivo con DNA genómico de *S. coelicolor*, (carril 3) muestra de RNA de 12 h, (carril 4) muestra de RNA de 24 h, (carril 5) muestra de RNA de 36 h, (carril 6) muestra de RNA de 48 h, (carril 7) muestra de RNA de 60 h y (carril 8) muestra de RNA de 72 h.

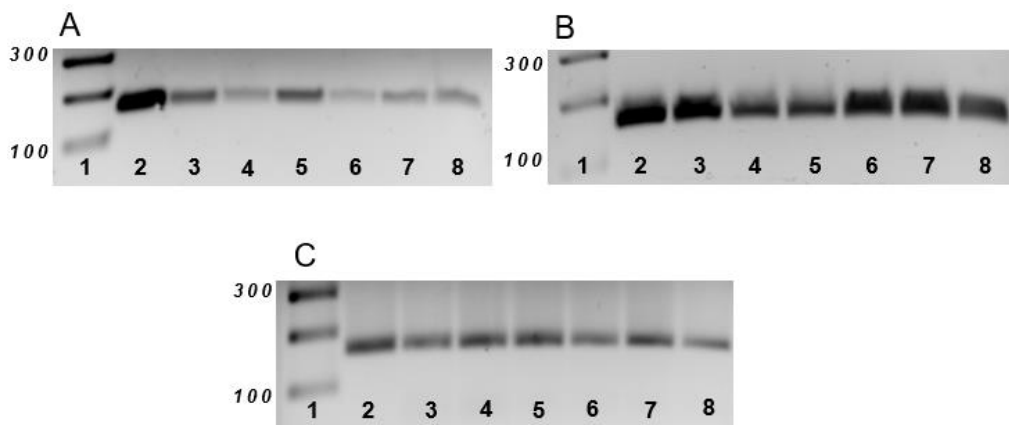


Figura 13. Expresión del gen *glnR* de *S. coelicolor* crecido en distintas fuentes de carbono. (A) Casaminoácidos, (B) Fructosa, (C) Glucosa, (carril 1) marcador de pesos moleculares de 100 pb (Fermentas), (carril 2) control positivo con DNA genómico de *S. coelicolor*, (carril 3) muestra de RNA de 12 h, (carril 4) muestra de RNA de 24 h, (carril 5) muestra de RNA de 36 h, (carril 6) muestra de RNA de 48 h, (carril 7) muestra de RNA de 60 h y (carril 8) muestra de RNA de 72 h.

En la figura 13 se muestra la expresión del gen *glnR* se observa la presencia de RNA en todas las fuentes de carbono probadas. La expresión de este gen en casaminoácidos (Fig. 13A) presentó 2 bandas más intensas a las 12 y 36 horas y tiene una disminución considerable a las 48 horas, mientras que la expresión de este gen en fructosa (Fig. 13B) es mayor, en relación a la intensidad de las bandas, a las demás fuentes de carbono probadas, teniendo cualitativamente una intensidad mayor a las 12, 48 y 60 horas, casi similar al control positivo. Por otro lado, la expresión de *glnR* en *S. coelicolor* crecido en glucosa (Fig. 13C) tiene intensidades de bandas similares a todas las horas y al control positivo.

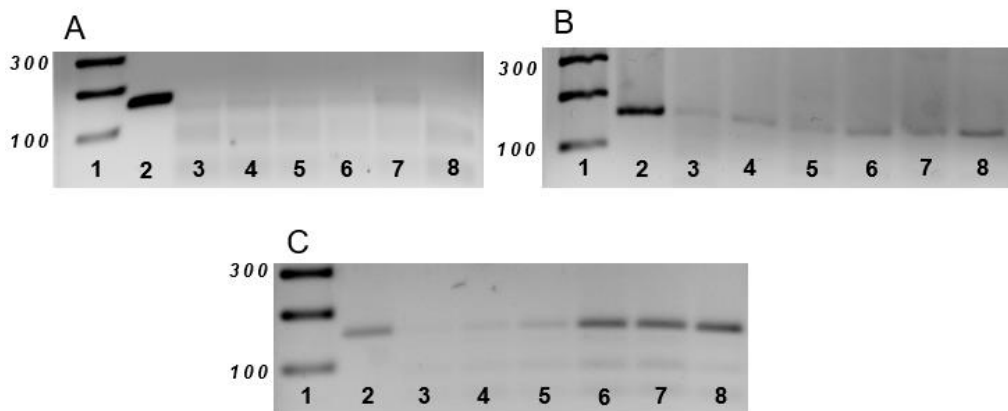


Figura 14 Expresión del gen *tamR* de *S. coelicolor* crecido en distintas fuentes de carbono. (A) Casaminoácidos, (B) Fructosa, (C) Glucosa, (carril 1) marcador de pesos moleculares de 100 pb (Fermentas), (carril 2) control positivo con DNA genómico de *S. coelicolor*, (carril 3) muestra de RNA de 12 h, (carril 4) muestra de RNA de 24 h, (carril 5) muestra de RNA de 36 h, (carril 6) muestra de RNA de 48 h, (carril 7) muestra de RNA de 60 h y (carril 8) muestra de RNA de 72 h.

Como se observa en la figura 14, se obtuvieron ligeras bandas correspondientes al RNAm del gen *tamR* en casaminoácidos indicando una baja expresión en esta fuente de carbono (Fig. 14A), por lo que se realizó una repetición de PCR en esta condición, pero aumentando el tiempo de exposición al observarse en el transiluminador con los mismos resultados (Fig. 15). En fructosa como fuente de carbono (Fig. 14B) se nota como la expresión es muy baja, e incrementa durante las últimas horas de crecimiento, teniendo en todos los casos, una intensidad de bandas menor en comparación al control positivo. Por lo que respecta a la expresión

de este gen en glucosa (Fig. 14C) se tiene el mismo comportamiento de que en fructosa, pero con una mayor intensidad de las bandas a las 48, 60 y 72 horas.

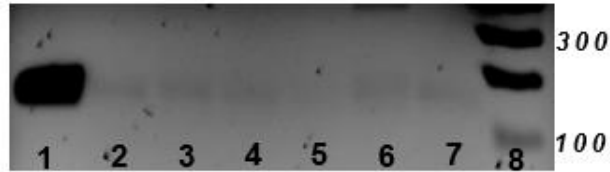


Figura 15 Expresión del gen *tamR* de *S. coelicolor* crecido en casaminoácidos como fuente de carbono, a 3.6 segundos de tiempo de exposición en luz UV. (carril 1) control positivo con DNA genómico de *S. coelicolor*, (carril 2) muestra de RNA de 12 h, (carril 3) muestra de RNA de 24 h, (carril 4) muestra de RNA de 36 h, (carril 5) muestra de RNA de 48 h, (carril 6) muestra de RNA de 60 h, (carril 7) muestra de RNA de 72 h y (carril 8) marcador de pesos moleculares de 100 pb (Fermentas).

Discusión

Una gran variedad de procesos metabólicos como la utilización de fuentes de carbono, diferenciación y la producción de metabolitos secundarios son fundamentales en la biología de los estreptomicetos. En general, las células procariontes se pueden adaptar y responder al medio ambiente modificando la expresión de sus genes, siendo entonces la regulación de la síntesis de RNA, la forma más directa de controlar la formación de determinadas proteínas. Los reguladores transcripcionales son proteínas capaces de unirse al DNA para reprimir o activar la transcripción de ciertos genes controlando de esta manera la expresión (Romero *et al.*, 2015). Estos factores o reguladores transcripcionales pueden actuar como represores: a) compitiendo con otra proteína llamada activador por una región de DNA; b) uniéndose a la región promotora y evitando la unión de la RNA polimerasa e inhibiendo la iniciación de la transcripción y c) uniéndose a una región río abajo de un promotor previniendo la elongación transcripcional. Por otro lado, los activadores funcionan o estabilizando el complejo promotor-RNA polimerasa inicial o acelerando la transición a un complejo abierto (Lee *et al.*, 2012).

En el genoma de *Streptomyces coelicolor* se han identificado 499 reguladores transcripcionales lo que da idea de la importancia de este tipo de proteínas (Bentley *et al.*, 2002). Existen diferentes tipos con diferentes estructuras 3D, con una única característica común que es la capacidad de unirse al DNA. El dominio hélice-vuelta-hélice (HTH, por sus siglas en inglés) es la estructura de unión al DNA más común encontrada en los factores transcripcionales de bacterias y de arqueas (Minezaki *et al.*, 2005). Por otro lado, el metabolismo de las bacterias es uno de los procesos que están controlados por este tipo de reguladores, como las proteínas GlnR, CRP, DasR y TamR, de los cuales, en este trabajo se estudió el nivel de RNAm de los genes correspondientes en *S. coelicolor* crecido en diferentes fuentes de carbono ya que no se conoce, hasta la fecha, bajo qué condiciones se transcriben los genes *glnR*, *crp*, *dasR* y *tamR*.

GlnR, es un regulador que representa un papel importante en el metabolismo del nitrógeno y carbono. Su secuencia de aminoácidos está bien conservada en actinobacterias, como *Amycolatopsis mediterranei*, *Streptomyces venezuelae*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Mycobacterium smegmatis* y *Streptomyces coelicolor* (Romero *et al.*, 2018). Se ha aislado una mutante de *S. coelicolor* que carece del gen *glnR* que codifica a esta proteína y se ha observado que genes se derreprimen, es decir aumenta su expresión. Entre los genes que se encontraron derreprimidos están los que codifican a la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la transaldolasa, entre otros (Tiffert *et al.*, 2011). Además, en este microorganismo la regulación del metabolismo de nitrógeno también está mediada por GlnR, controlando la expresión de los genes *glnA* y *glnII* (ambos codificantes de la glutamina sintetasa), aumentando la transcripción en condiciones limitantes de nitrógeno, pero a su vez reprimiendo en estas condiciones al gen *ureA* y *gdhA* que codifican a la ureasa y a la glutamato deshidrogenasa, respectivamente. También se observó en experimentos de Tiffert y colaboradores que la delección del gen *glnR* afecta la transcripción de los genes *nirB* (nitrito reductasa) reprimiéndola y haciendo incapaz a *Streptomyces* de reducir el nitrito en amonio, también provocando niveles de expresión mínima en el gen *amtB* (transportador de amonio) (Tiffert *et al.*, 2008).

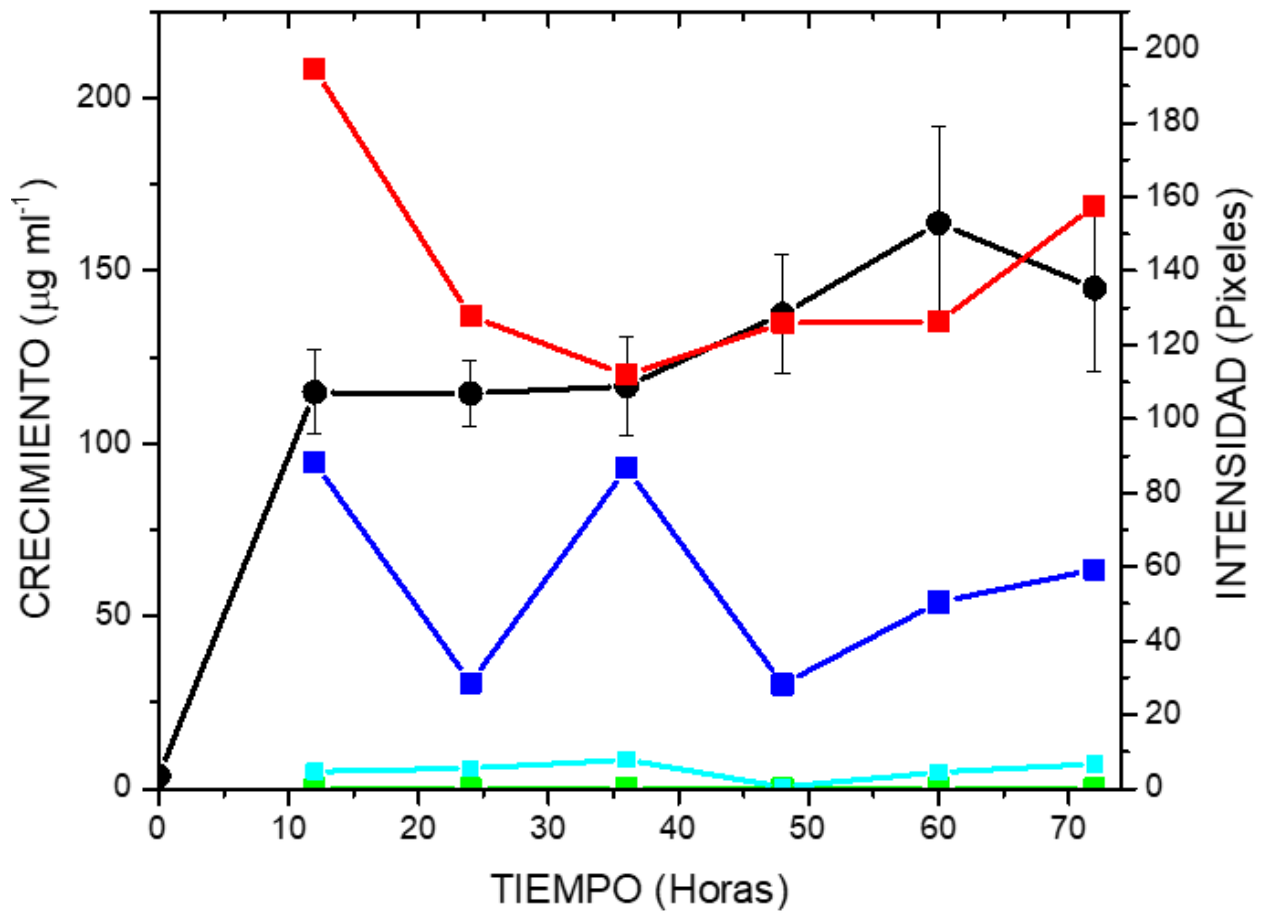
Se ha comprobado de igual manera, que la actividad de GlnR no sólo se limita al metabolismo del nitrógeno, sino que también cumple su papel en el metabolismo del carbono, regulando también los sistemas de transporte ABC (ATP binding cassette) que son importantes para la incorporación de azúcares en *S. coelicolor*. Se han encontrado secuencias de unión de GlnR en 11 de 37 regiones promotoras de genes del sistema ABC en *S. coelicolor*, así como en *Amycolatopsis mediterranei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces venezuelae* y *Streptomyces avermitilis* sugiriendo que la regulación del transporte de carbono mediada por GlnR es altamente conservada en este filo de bacterias. Estudios realizados por Liao y colaboradores en el 2015, usando a la actinobacteria *Saccharopolyspora erythraea* demuestran que la delección del gen *glnR* disminuye el crecimiento de esta bacteria, y la complementación del gen en dicha mutante restaura los niveles de crecimiento a la normalidad en fuentes de carbono como sorbitol, manitol, celobiosa, trehalosa y manosa. A su vez se comprobó que GlnR mejoró la utilización de carbono en condiciones de crecimiento con fuentes de carbono mixtas, en glucosa con xilosa y celobiosa con xilosa, proponiendo que si la regulación del metabolismo de carbohidratos está mediada por GlnR, es posible que dicho metabolismo pueda verse afectado también por la disponibilidad de nitrógeno, esto puede ser una razón por la cual *S. coelicolor* mostró una buena expresión de este gen en las 3 fuentes de carbono probadas en todas las horas de crecimiento en este trabajo. El estudio de Liao y colaboradores también reveló que GlnR no sólo controla los genes de sistema ABC, también se encontró una regulación directa hacia los genes codificadores de α y β glucosidasas, enzimas hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos de azúcares mayores como disacáridos y polisacáridos para generar azúcares menores en el metabolismo de los carbohidratos (Liao *et al.*, 2015).

La expresión de *glnR* de *S. coelicolor* crecido en casaminoácidos como fuente de carbono mostraron intensidades de banda de 88.17 pixeles para las 12 h, para las 24 h de 28.56, para las 36 h se mostró una intensidad de 86.67, a las 48 h se obtuvo

una intensidad de banda de 28.18, a las 60 h se mostró una intensidad de 50.43 y a las 72 h se obtuvo una banda con 59.24 de intensidad mostrando igualmente una discontinuidad en las primeras 48 h horas de crecimiento y manteniendo valores similares a partir de las 60 h de crecimiento, coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria y la acumulación de NH_4^+ (datos no mostrados; Gráfica 1).

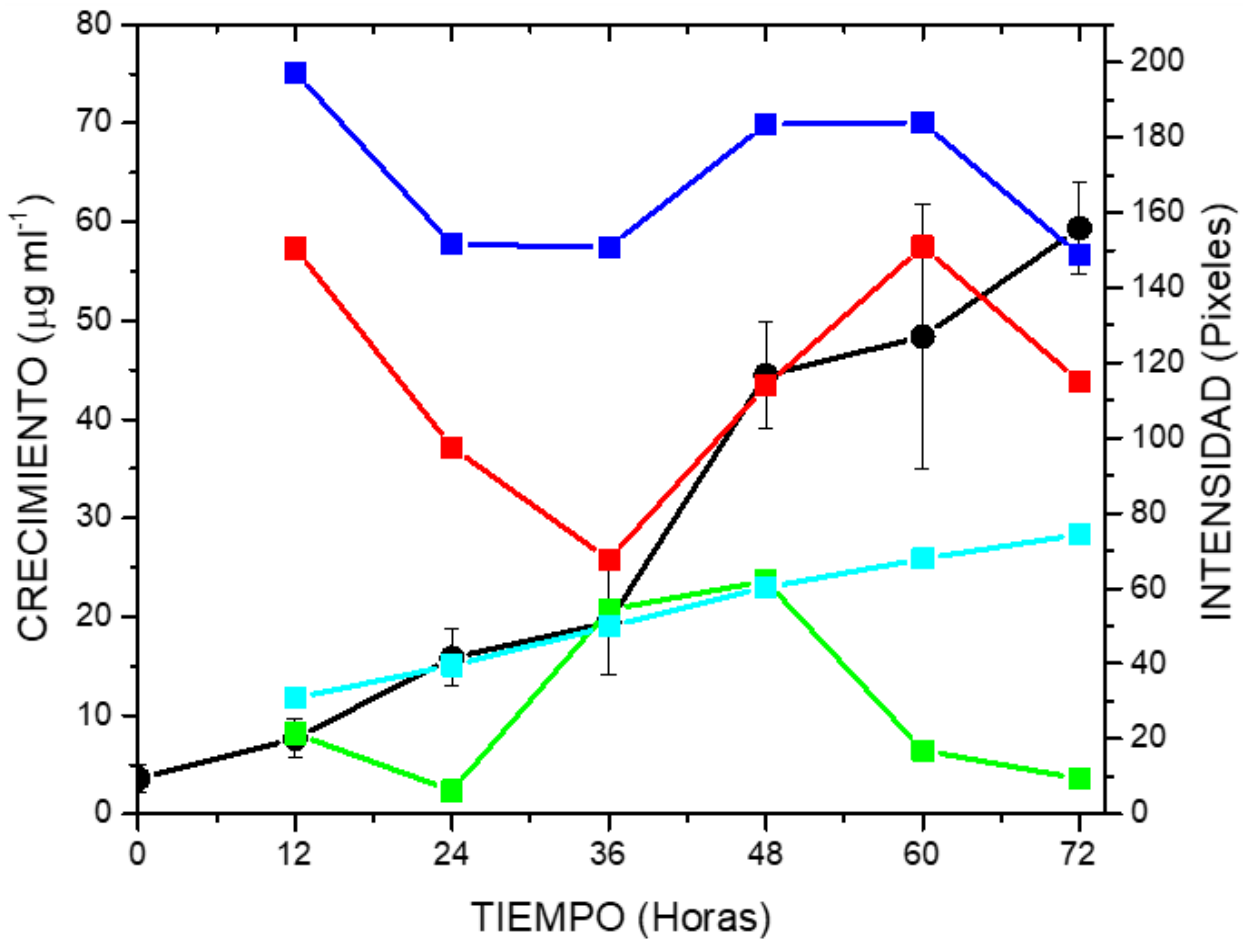
En fructosa como fuente de carbono, la expresión del gen *glnR* también fue constante a lo largo de la fermentación con niveles superiores a los obtenidos en glucosa. Se obtuvieron 197.22 pixeles para las 12 h, para las 24 h de 151.51, para las 36 h se mostró una intensidad de 150.83, a las 48 h se obtuvo una intensidad de banda de 183.44, a las 60 h se mostró una intensidad de 183.87, a las 72 h se obtuvo una banda con 148.59 de intensidad. Por lo tanto, en fructosa hubo una mayor expresión que en glucosa y que en casaminoácidos (Gráfica 2).

La expresión de *glnR* en *S. coelicolor* con glucosa como fuente de carbono fue constante con intensidades de banda que fueron de 76.1 pixeles a las 12 horas de crecimiento, de 108 a las 24, manteniéndose en este nivel hasta las 60 horas y declinó a 78.23 de intensidad a las 72 horas (Gráfica 3). Hay que mencionar que este trabajo es parte de una línea de investigación más amplia, por lo que el crecimiento de *S. coelicolor* y el RNA utilizado fueron obtenidos en otra tesis del laboratorio (Lamas 2018).



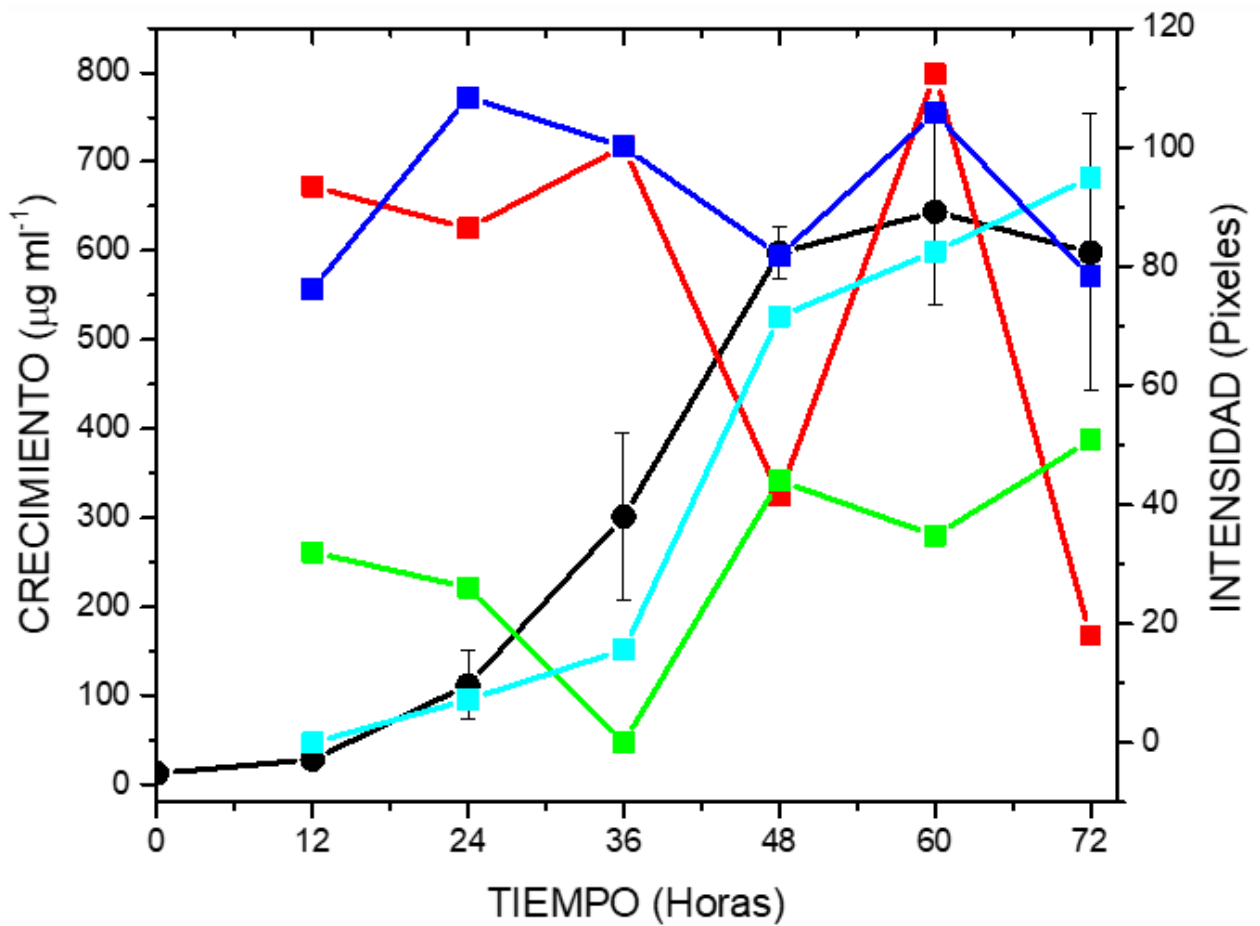
Gráfica 1. Crecimiento de *Streptomyces coelicolor* en casaminoácidos como fuente de carbono e intensidades de banda obtenidas en la electroforesis. Crecimiento (●), *crp* (■), *dasR* (■), *glnR* (■) y *tamR* (■).

“Curva de crecimiento obtenida del estudio realizado por Llamas en 2018”



Gráfica 2. Crecimiento de *Streptomyces coelicolor* en fructosa como fuente de carbono e intensidades de banda obtenidas en la electroforesis. Crecimiento (●), *crp* (■), *dasR* (■), *glnR* (■) y *tamR* (■).

“Curva de crecimiento obtenida del estudio realizado por Llamas en 2018”



Gráfica 3. Crecimiento de *Streptomyces coelicolor* en glucosa como fuente de carbono e intensidades de banda obtenidas en la electroforesis. Crecimiento (●), *crp* (■), *dasR* (■), *glnR* (■) y *tamR* (■).

“Curva de crecimiento obtenida del estudio realizado por Llamas en 2018”

La expresión de *glnR* de *S. coelicolor* crecido en fructosa como fuente de carbono mostró intensidades de banda de 197.22 pixeles para las 12 h, para las 24 h de 151.51, para las 36 h se mostró una intensidad de 150.83, a las 48 h se obtuvo una intensidad de banda de 183.44, a las 60 h se mostró una intensidad de 183.87 y a las 72 h se obtuvo una banda con 148.59 de intensidad. En esta fuente de carbono se encontraron los mayores niveles de RNAm correspondiente al gen *glnR*, observándose que en esta condición se puede expresar más este gene, mientras que en casaminoácidos es en la que hubo menores niveles. En este caso, la expresión no se debió al sulfato de amonio que contiene el medio, ya que en glucosa y en fructosa la concentración fue la misma y se observaron diferencias en los niveles de RNAm en estos dos azúcares, mientras que en casaminoácidos los niveles de amonio se incrementaron al inicio de la fase estacionaria (Gráfica 2).

DasR es un regulador que forma parte del sistema de detección de nutrientes, actúa como un regulador multifuncional pleiotrópico en actinobacterias y controla no sólo el regulón de N-acetil-glucosamina (GlcNAc, monómero de la quitina) y las vías relacionadas, sino también varios transportadores de azúcar. DasR controla el transporte de GlcNAc a través de un sistema PTS, así como del dímero N,N'-diacetilquitobiosa a través de un transportador ABC. Por lo tanto, se ha descrito una cascada de señalización desde la detección de nutrientes hasta la producción de antibióticos, incluyendo también la diferenciación. Un dato interesante de esta cascada de señalización es que *S. coelicolor* puede distinguir, a través de DasR, cuando crece en la GlcNAc derivada de la quitina (abundancia de señalización) y la GlcNAc derivada de la lisis de la pared celular, sugiriendo una coordinación entre la producción de antibióticos y la lisis de la pared celular (Rigali *et al.*, 2006; Rigali *et al.*, 2008) como se puede observar en la Fig. 16.

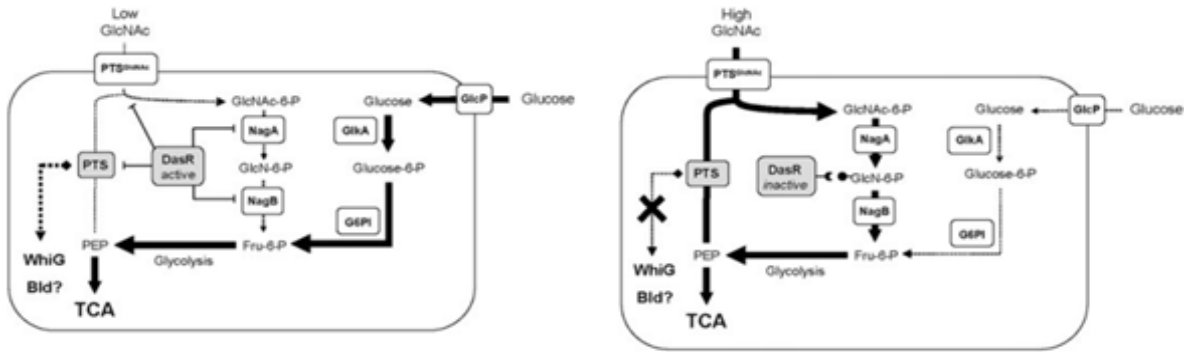


Figura 16. Modelo propuesto por Rigali y colaboradores en 2006, donde señala bajo que condición se expresa el regulador DasR (izquierda) y la inactivación de este, al haber en el medio una fuente de carbono preferente (derecha). Modificado de Rigali *et al.* (2006).

La expresión del gen *dasR* en *S. coelicolor* crecido en un medio mínimo con fructosa se observó con intensidades de 21.45 pixeles a las 12 h de crecimiento, bajando a las 24 h con una intensidad de 6.23 y volviendo a subir a las 36 h con una intensidad de 54.31 y a las 48 h con una intensidad de 62.06, a las 60 h bajó la intensidad a 16.90, a las 72 h disminuyó todavía más la intensidad hasta 9.43 (Gráfica 2). A la fecha no tenemos una explicación por la cual la expresión del gen *dasR* y de los otros genes tiene este comportamiento.

En glucosa como fuente de carbono se observaron intensidades de 32.02 pixeles a las 12 h de crecimiento, bajando a las 24 h con una intensidad de 26.10 y a las 36 h sin banda aparente, a las 48 h se muestra una banda con una intensidad de 44.03, y bajando a las 60 h a 34.82 y a las 72 h subió la intensidad hasta 50.79. Los bajos valores mostrados en la intensidad de banda, no solo en esta fuente de carbono, sino también en fructosa, demuestran que *dasR* es un gen que se expresa en bajos niveles en estos dos azúcares y durante las diferentes horas de crecimiento, por lo que sería interesante cuantificar los niveles de RNAm en N-acetilglucosamina para compararlos con los obtenidos en glucosa y fructosa. Es importante notar que en casaminoácidos no se encontró RNAm del gen *dasR*, por lo que en aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno no hay expresión lo que lo sugiere que solo en azúcares se transcribe (Gráfica 3).

La proteína receptora de AMP cíclico (CRP) es un regulador transcripcional que controla diversos procesos celulares en muchas bacterias. Participa en el fenómeno regulatorio de la represión catabólica, en la resistencia a estrés, la movilidad celular y la patogénesis en enterobacterias. En *S. coelicolor* juega un papel importante formando un complejo con el AMPc y la adenil ciclasa en la germinación de esporas y el desarrollo de las colonias (Derouaux *et al.*, 2004). Esta proteína es capaz de asociarse a 393 secuencias de las que resaltan algunos genes del metabolismo primario; el gen *nuoA* (SCO4562) codificante de una subunidad de la deshidrogenasa de NADH, el gen *accA2* (SCO4921) codificante de la subunidad A del complejo acyl-CoA carboxilasa que participa en el metabolismo del propanoil-CoA para la formación de succinil-CoA e ingresar en el ciclo de Krebs, el gen *pckA* (SCO4979) codificador de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, que cataliza la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato y la enzima málica dependiente de NADP (SCO5261) que cataliza la reacción de malato a oxalacetato. Se ha evidenciado que el regulador CRP en *S. coelicolor* está implicado hasta en un 12.5% de los genes del metabolismo primario y un 5.1% en metabolismo secundario (Gao *et al.*, 2012).

La expresión del gen *crp* en *S. coelicolor* crecido con casaminoácidos como fuente de carbono, mostró que a las 12 h de crecimiento con una intensidad de 194.53 píxeles, a las 24 h bajo la intensidad a 127.78, a las 36 h descendió a 111.87, a las 48 h aumenta a 125.94, a las 60 h se mantuvo en 126.30 y a las 72 h aumento hasta 157.65. Estos resultados revelan un nivel casi constante de transcripción de este gen en esta fuente de carbono donde predomina la gluconeogénesis (Gráfica 1).

La expresión del gen *crp* de *S. coelicolor* crecido en fructosa como fuente de carbono se reportó con diferentes bandas a partir de las 12 h de crecimiento con 150.5 de píxeles de intensidad, descendiendo a las 24 h a 97.54, a las 36 h bajo hasta 67.66, a las 48 h creció a 113.97, a las 60 h aumento hasta 150.9 y a las 72 h descendió a 115.09. En esta fuente de carbono, los niveles de RNAm de este gen se encuentran altos en las primeras horas de crecimiento y disminuyen hasta las

36 h para volver a incrementarse hasta el final de la fermentación (Gráfica 2). Este comportamiento podría indicar que la expresión depende de la etapa de crecimiento del *S. coelicolor*.

Para la expresión de *crp* en *S. coelicolor* crecido en glucosa como fuente de carbono se encontró que a las 12 h de crecimiento una banda con una intensidad de 93.42 píxeles, a las 24 h se obtuvo una intensidad de 86.36, a las 36 h se obtuvo una intensidad de 100.17, a las 48 h se obtuvo una intensidad de 41.51, a las 60 h se obtuvo una intensidad de 112.28 y a las 72 h se obtuvo una intensidad de 18. Estos valores se mantuvieron constantes hasta las 48 h donde disminuyeron para volver a aumentar. Hay que enfatizar en que los niveles en glucosa fueron menores que en fructosa y que en casaminoácidos. A su vez en casaminoácidos fueron mayores que en fructosa. La expresión de este gen *crp* es más constante en las 3 condiciones de crecimiento y da los valores más altos de píxeles que cualquiera de los otros dos genes, *glnR* y *dasR* (Gráfica 3). Este perfil de expresión es muy similar al obtenido en fructosa, dependiendo de la etapa de crecimiento del microorganismo. No existe evidencia bibliográfica que ayude a explicar este fenómeno.

El regulador de *trans*-aconitato metiltransferasa (TamR) controla la transcripción de su propio gen *tamR* y del gen *tam* que codifica para la *trans*-aconitato metiltransferasa y de *sacA* que codifica a la aconitasa, enzima involucrada en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Durante el paso de isomerización del citrato, el intermediario *cis*-aconitato puede ser liberado del complejo enzima-sustrato; si esto ocurre debe ser espontáneamente convertido al isómero *trans*-aconitato más estable. A diferencia del *cis*-aconitato, el isómero *trans*- es un eficiente inhibidor de la aconitasa, bloqueando la conversión de citrato a isocitrato. La *trans*-aconitato metiltransferasa puede usar el *trans*-aconitato como un sustrato y transferir un grupo metilo de la *S*-adenosilmetionina para formar el *trans*-aconitatometilester, el cual es un inhibidor menos eficiente. La inducción de la transcripción del gene que codifica a la *trans*-aconitato metiltransferasa previene la acumulación de *trans*-aconitato y asegura el flujo metabólico a través del ciclo del ácido cítrico (Cai & Clarke 1999;

Cai *et al.*, 2001). Se ha demostrado también que TamR regula a los genes que codifican a la malato sintasa (ciclo del glioxalato), malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (Huang *et al.*, 2015). Por lo tanto es muy importante el papel de TamR para mantener el flujo de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, sin embargo, no se ha descrito como es la expresión del gene que codifica a esta proteína, *tamR*.

La expresión de *tamR* de *S. coelicolor* crecido en casaminoácidos como fuente de carbono mostró intensidades de banda de 4.59 pixeles para las 12 h, para las 24 h de 5.92, para las 36 h se mostró una intensidad de 8.31, a las 48 h se obtuvo una intensidad de banda de 0.52, a las 60 h se mostró una intensidad de 4.74 y a las 72 h se obtuvo una banda con 7.1 de intensidad, mostrando así que la expresión de este gen en esta fuente de carbono fue casi nula en comparación con la expresión de los genes de los otros reguladores analizados en este trabajo (Gráfica 1). Los casaminoácidos es una fuente de carbono gluconeogénica por lo que la aconitasa del ciclo de los ácidos tricarbónicos está disminuída y por lo tanto no requiere de la expresión de este gen.

La expresión de *tamR* de *S. coelicolor* crecido en fructosa como fuente de carbono mostraron intensidades de banda de 30.87 pixeles para las 12 h, para las 24 h de 39.54, para las 36 h se mostró una intensidad de 49.94, a las 48 h se obtuvo una intensidad de banda de 60.27, a las 60 h se mostró una intensidad de 67.93 y a las 72 h se obtuvo una banda con 74.35 de intensidad, habiendo incrementos lineales durante el avance de las horas de crecimiento, alcanzando un máximo a las 72 h. Estos resultados son los esperados ya que en la fase de crecimiento estacionaria podría acumularse el cis-aconitato al no haber un buen flujo de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbónicos e inducirse la síntesis del gen *tam* (Gráfica 2).

La expresión de *tamR* de *S. coelicolor* crecido en glucosa como fuente de carbono estuvo ausente en las primeras 12 h de crecimiento, pero se mostraron bandas de a partir de las 24 h de 7.23 pixeles, para las 36 h se mostró una intensidad de 15.60,

a las 48 h se obtuvo una intensidad de banda de 71.63, a las 60 h se mostró una intensidad de 82.52 y a las 72 h se obtuvo una banda con 94.92 de intensidad, mostrando un perfil de expresión similar al obtenido en las dos condiciones anteriores, aunque fue mayor el nivel de RNAm del gen *tamR* en esta última fuente de carbono (Gráfica 3). El incremento en la expresión de este gene en las diferentes fuentes de carbono utilizadas podría indicar que se requiere la proteína TamR cuando el crecimiento se ha detenido y el microorganismo entra en estrés, como ya se mencionó previamente.

Conclusiones

- La expresión de *glnR* fue independiente de la fuente de carbono utilizada, esta fue mayor en fructosa, luego glucosa y menor en casaminoácidos.
- El gen *dasR* no se expresó en casaminoácidos, la mayor expresión se obtuvo en glucosa y en fructosa tuvo máximos a las 36 y 48 horas.
- La expresión del gen *crp* fue constitutiva en las 3 fuentes de carbono utilizadas.
- No hubo expresión de *tamR* en casaminoácidos y en los dos azúcares los niveles de RNAm fueron mayores en la fase estacionaria de crecimiento, esta fue mayor en glucosa que en fructosa.
- Los genes *dasR* y *tamR* sólo fueron expresados en los azúcares lo que podría sugerir un papel en el metabolismo del carbono importante.
- El gen *glnR* se transcribió sin importar la concentración de amonio en el medio de cultivo.

Bibliografía

Atlas RM, Bartha R. (2001). *Microbial ecology. Fundamentals and applications*. 4ª edición Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Barcelona. España. Pp 83, 369, 398.

Barka EA, Vatsa P, Sánchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. (2015). *Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (80): 1–43.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen§ CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang§ S, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O’Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. (2002). *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Nature* (417): 141–147.

Book AJ, Lewin GR, McDonald BR, Takasuka TE, Wendt-Pienkowski E, Doering D T, Suh S, Raffa KF, Fox BG, Currie CR. (2015). *Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic Streptomyces through selection of expanded gene content and coordinated gene expression*. *Journal PLOS Biology* 14(6): e1002475.

Botas, M. A. (2013). *Regulación del metabolismo en Streptomyces: Control por ArgR* (Tesis doctoral). Instituto de Biotecnología de la Universidad de León, España.

Cai H, Clarke S. (1999). *A novel methyltransferase catalyzes the methyl esterification of trans-aconitate in Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 274(19): 13470-13479.

Cai H, Dumlao D, Katz JE, Clarke S. (2001). *Identification of the gene and characterization of the activity of the trans-aconitate methyltransferase from Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 40(45): 13699-13709.

Derouaux A, Halici S, Nothaft H, Neutelings T, Moutzourelis G, Dusart J, Titgemeyer F, Rigali S. (2004). *Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology 186(6): 1893–1897.

Fink D, Weibschuh N, Reuther J, Wohlleben W, Engels A. (2002). *Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Molecular Microbiology 46(2):331-347.

Gao C, Hindra, Mulder D, Yin C, Eliot M A, (2012). *Crp is a global regulator of antibiotic production in Streptomyces*. Mbio 3(6): pii: e00407-12.

Huang H, Grove A. (2013). *The transcriptional regulator TamR from Streptomyces coelicolor controls a key step in central metabolism during oxidative stress*. Molecular Microbiology 87(6): 1151–1166.

Huang H, Sivapragasam S, Grove A. (2015). *The regulatory role of Streptomyces coelicolor TamR in central metabolism*. Biochemical Journal 466(2): 347-358.

Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD. (2008). *Principles of Biochemistry*. 8ª Edición. Editorial Person. Carolina, USA. P.p. 296.

Jiménez GLF, Merchant LH. (2003). *Biología celular y molecular*. Editorial Pearson Educación. México. P.p. 25, 27-30.

Lee DJ, Minchin SD, Busby SJW. (2012). *Activating Transcription in Bacteria*. The Annual Review of Microbiology (66): 125-152.

Liao CH, Yao L, Xua Y, Liu WB, Zhou Y, Ye BC. (2015). *Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112 (51): 15630–15635.

Llamas R. 2018. Expresión de las enzimas del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor* M145. (Tesis de Maestría). Fac. de Ciencias, UNAM.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. (2012). *Brock. Biología de los microorganismos*. 12° Edición. Editorial Person. Madrid, España. P.p. 507-510, 813, 814.

Minezaki Y, Homma K, Nishikawa K. (2005). *Genome-Wide Survey of Transcription Factors in Prokaryotes Reveals Many Bacteria-Specific Families Not Found in Archaea*. DNA Research 12(5): 269-280.

Murray RK, Bemder DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. (2009). *Harper's illustrated Biochemistry*. 28° edición. Editorial McGraw-Hill. University of Toronto. Canada. P.p. 369, 370.

Nelson DL, Cox MM. (2005). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4° Edición. Editorial Freeman and Company. Nueva York. USA. P.p. 482, 1081.

Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F. (2003). *The phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is biased for N-acetylglucosamine metabolism*. Journal of Bacteriology 185(23): 7019–7023.

Quiñones AE, Evangelista MZ, Rincón EG. (2016). *Los actinomicetos y su aplicación a la biotecnología*. Revista Elementos 101. México. P.p. 59–64.

Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris. B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel. GP. (2006). *The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development*. Molecular Microbiology 61(5): 1237–1251.

Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel.GP. (2008). *Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces*. EMBO Reports 9 (7): 670-675.

Romero RA, Maldonado CN, Ruiz VB, Koirala N, Rocha D, Sanchez S. (2018). *Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 111(5): 761–781.

Romero RA, Robledo CI, Sanchez S. (2015). *An overview on transcriptional regulators in Streptomyces*. Biochimica et Biophysica Acta 1849(8): 1017-1039.

Salazar LAM, Ordoñez GCA, Hernández SD, Castaño PLM, Peña PK, Rodriguez. NJR, Bueno LL. (2014). *Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Scientia et Technica Año XIX, Vol. 19, No. 2.

Thieman WJ, Palladino MA. (2015) *Introducción to Biotechnology*. 2° Edición. Editorial Person Educación. Madrid. España. P.p. 49.

Tiffert Y, Franz-Wachtel M, Fladerer C, Nordheim A, Reuther J, Wohlleben W, Mast Y. (2011). *Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in Streptomyces coelicolor M145*. Applied Microbiology Biotechnology 89(4): 1149-1159.

Tiffert Y, Supra P, Wurm R, Wohlleben W, Wagner R, Reuther J. (2008). *The Streptomyces coelicolor GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes*. Molecular Microbiology 67(4): 861–880.

van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F. (2007). *A new piece of an old jigsaw: Glucose kinase Is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 12(1-2): 67-74.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. (2007). *Genomics of actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71(3): 495-548.

Wentzel A, Sletta H, Consortium S, Ellingsen TE, Bruheim P. (2012). *Intracellular metabolite pool changes in response to nutrient depletion induced metabolic switching in Streptomyces coelicolor*. Metabolites 2(1): 178-194.

Willey JM, Sherwood LM, Wolvertson CJ. (2011). *Prescott's Microbiology*. 8° edition. Mc Graw Hill. New York. USA. P.p. 332-337.