



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO DE UNA MUTANTE DELETADA DEL
GEN *cobB1* DE *Streptomyces coelicolor* M-145**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LEANN GWYNETH UNZUETA ARMENTA

ASESORES:

DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

DRA. CARLA GARCÍA MORALES

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

AGOSTO 2021

La presente investigación fue desarrollada en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN210019.

Agradecimientos

~~Agradezco a la DGAPA UNAM por la beca recibida.~~

~~A la Dra. María Elena Flores Carrasco por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por dirigir esta investigación. Gracias por su paciencia, su apoyo y generosidad.~~

~~A la Dra. Tásila Escobedo por el apoyo técnico y material en el laboratorio.~~

~~A Gabriela González, Guadalupe y Patricia de la Torre por el apoyo técnico.~~

~~A la Dra. Guadalupe González por su paciencia y por todo lo que me enseñó durante la licenciatura.~~

~~A la Dra. María Elena Estrada Zúñiga y al Dr. Ezequiel Ávila Santos por su tiempo y apoyo en la realización de esta tesis.~~

Dedicatoria

~~A mis padres y mi hermana. Gracias por mi soporte, su apoyo y cariño son fundamentales para cada proyecto que emprendo. Gracias.~~

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen | 10 |
| Introducción | 11 |
| Función e importancia de las modificaciones post-traduccionales en bacterias..... | 11 |
| Acetilación de proteínas en residuos de lisina | 11 |
| Acetilación enzimática | 12 |
| Acetilación no enzimática | 12 |
| Desacetilación..... | 13 |
| Estudio de la acetilación de proteínas en bacterias | 15 |
| Antecedentes..... | 17 |
| Métodos de transferencia de ADN para la manipulación genética de <i>Streptomyces</i> | 20 |
| Conjugación intergenérica entre <i>E. coli</i> y <i>Streptomyces</i> | 20 |
| Disrupción de genes en <i>Streptomyces coelicolor</i> | 21 |
| Acetilación en <i>S. coelicolor</i> | 22 |
| Justificación | 24 |
| Hipótesis..... | 25 |
| Objetivos..... | 25 |
| Objetivo general | 25 |
| Objetivos particulares..... | 25 |
| Materiales y métodos..... | 26 |
| Microorganismos..... | 26 |
| Medios de cultivo | 26 |
| Estrategia para la interrupción del gen <i>cobB1</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> | 27 |
| Diseño de oligonucleótidos para la clonación del fragmento extendido del gen SCO0452 | 28 |
| Amplificación del fragmento extendido del SCO0452 | 28 |
| Purificación del producto y secuenciación | 29 |
| Preparación del vector pBluescript SK+ | 30 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Digestión del plásmido pBluescript SK+ y del amplicón SCO0452 extendido..... | 32 |
| Ligación del plásmido y el inserto..... | 32 |
| Transformación de <i>E. coli</i> TOP10F' con el producto de la ligación..... | 33 |
| Ensayo de lisis de colonias en gel..... | 33 |
| Purificación y digestión de los plásmidos purificados | 34 |
| Digestión de los plásmidos..... | 35 |
| Secuenciación del plásmido pBSK+::SCO0452..... | 35 |
| Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el cassette extendido de resistencia a apramicina | 36 |
| Amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina..... | 37 |
| Secuenciación del cassette extendido de resistencia a apramicina..... | 38 |
| Preparación de la cepa <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790..... | 39 |
| Transformación de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 con el pBSK+::SCO0452..... | 40 |
| Electroporación del cassette de apramicina en <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790/pBSK+::SCO0452..... | 40 |
| Verificación de la sustitución por PCR..... | 41 |
| Transferencia del plásmido pBSK Δ SCO0452::aac(3)IV a <i>Streptomyces coelicolor</i> por conjugación con <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002..... | 43 |
| Resultados y discusión | 44 |
| Conclusiones | 57 |
| Perspectivas | 57 |
| Referencias | 58 |

Índice de figuras

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Modelo que representa la formación de acetato a partir de la glucólisis..... | 13 |
| Figura 2. Representación del mecanismo de acetilación enzimática reversible. | 14 |
| Figura 3. Colonias de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)..... | 17 |
| Figura 4. Representación del cromosoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> | 18 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5. Estrategia para la interrupción de genes en <i>E. coli</i> con productos generados por PCR..... | 21 |
| Figura 6. Representación de la estrategia general para interrumpir el SCO0452. Adaptado de Gust (2002)..... | 27 |
| Figura 7. Oligonucleótidos para la amplificación del fragmento extendido del SCO0452. | 28 |
| Figura 8. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina. Modificado de Gust <i>et al.</i> (2002). | 37 |
| Figura 9. Electroforesis de los productos de la amplificación del fragmento del SCO0452 con un gradiente de temperatura de alineamiento (Ta°C)..... | 44 |
| Figura 10. Secuenciación y alineamiento del amplicón SCO0452..... | 45 |
| Figura 11. Información de la secuencia del amplicón SO0452..... | 45 |
| Figura 12. Mapa del plásmido pBSK+::SCO0452. | 46 |
| Figura 13. Colonias obtenidas después de la transformación con la mezcla de la ligación. | 47 |
| Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de colonias lisadas. | 47 |
| Figura 15. Electroforesis de los productos de la digestión de los plásmidos purificados. . | 48 |
| Figura 16. Secuenciación y alineamiento del plásmido pBSK+::SCO0452. | 49 |
| Figura 17. Información de la secuencia del pBSK+::SCO0452. | 49 |
| Figura 18. Electroforesis de los productos de la amplificación del cassette extendido. | 50 |
| Figura 19. Secuenciación y alineamiento del cassette extendido de resistencia a apramicina..... | 50 |
| Figura 20. Información de la secuencia del cassette de resistencia a apramicina..... | 50 |
| Figura 21. Colonias de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 obtenidas después de la transformación con el pBSK+::SCO0452. | 51 |
| Figura 22. Colonias de <i>E. coli</i> BW25113/pBSKΔSCO0452::aac(3)/V..... | 52 |
| Figura 23. Mapa lineal de los plásmidos pBSK+::SCO0452 (A) y pBSKΔSCO0452::aac(3)/V (B)..... | 52 |
| Figura 24. Verificación de la sustitución del SCO0452..... | 53 |
| Figura 25. Ubicación de los oligonucleótidos internos para la amplificación de un fragmento del gen de resistencia a apramicina en el plásmido pBSKΔSCO0452::aac(3)/V..... | 53 |
| Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación por PCR de un fragmento del gen de resistencia a apramicina (rectángulo rojo) en una transformante de <i>E. coli</i> BW25113/pBSKΔSCO0452::aac(3)/V positiva. | 53 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 27. Colonias de <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 obtenidas después de la transformación con pBSK Δ SCO0452:: <i>aac(3)IV</i> | 54 |
| Figura 28. Exconjugantes Δ SCO0452 de <i>S. coelicolor</i> crecidas en medio MS con apramicina. | 54 |
| Figura 29. Cepas de <i>Streptomyces coelicolor</i> crecidas en medio MS sin (A) y con (B) apramicina. | 55 |

Índice de tablas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Características de los oligonucleótidos complementarios al fragmento del SCO0452. | 28 |
| Tabla 2. Programa para amplificar el fragmento del SCO0452. | 29 |
| Tabla 3. Programa de secuenciación por ciclado térmico. | 30 |
| Tabla 4. Mezcla de reacción de la doble digestión del pBluescript SK+. | 32 |
| Tabla 5. Mezcla de reacción de la doble digestión del inserto con el SCO0452. | 32 |
| Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación del pBSK+ y el SCO0452. | 33 |
| Tabla 7. Composición de la Solución 1 para la lisis de colonias en gel. | 34 |
| Tabla 8. Composición de la Solución 2 para la lisis de colonias en gel. | 34 |
| Tabla 9. Mezcla de reacción de la digestión sencilla de los plásmidos con insertos. | 35 |
| Tabla 10. Mezcla de reacción de la digestión doble de los plásmidos con inserto. | 35 |
| Tabla 11. Características de los oligonucleótidos para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina. | 36 |
| Tabla 12. Programa de ciclado para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina. | 38 |
| Tabla 13. Composición de la solución TFB-I con pH 5.8. | 39 |
| Tabla 14. Composición de la solución TFB-II con pH 7.0. | 39 |
| Tabla 15. Características de los oligonucleótidos para verificación de la sustitución del SCO0452. | 41 |
| Tabla 16. Programa de ciclado para la verificación de la sustitución del SCO0452. | 41 |
| Tabla 17. Programa de ciclado para la verificación de la presencia del gen de resistencia a apramicina. | 42 |

Índice de abreviaturas

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------|
| acetil-CoA | Acetil coenzima A |
| AcK | Acetil lisina |
| acP | Acetil fosfato |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfato |
| FRT | Objetivo de reconocimiento de la recombinasa FLP |
| GNAT | N-acetiltransferasa de la familia Gcn5 |
| HAT | Histona acetiltransferasa |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido |
| KAT | Lisina acetiltransferasa |
| Kb | Kilobase |
| KDAC | Lisina desacetilasa |
| NA | Nicotinamida |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| nt | nucleótido |
| oriT | Origen de transferencia |
| pb | Pares de bases |
| pBSK ⁺ | pBluescript SK ⁺ |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEPC | Fosfoenolpiruvato carboxilasa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |

Resumen

Las bacterias deben adaptarse a su entorno por medio de la regulación de sus procesos metabólicos a diferentes niveles, desde la regulación de la transcripción, hasta la modificación de una proteína después de que es sintetizada. Las modificaciones post-traduccionales son un mecanismo de regulación ampliamente distribuido en bacterias y son de importancia porque le dan diversidad al proteoma a la vez que funcionan como una forma de control rápido de diferentes funciones celulares. Las diversas modificaciones post-traduccionales que existen pueden alterar la estructura y función de las proteínas, la formación de complejos proteicos y la actividad enzimática.

La acetilación de lisinas es una modificación reversible muy recurrente en bacterias y se ha visto involucrada en procesos metabólicos, con énfasis en el metabolismo del carbono. Se han descrito mecanismos generales de acetilación enzimática y acetilación no enzimática, así como la reversión de esta modificación por enzimas con actividad desacetilasa, como lo son las sirtuinas dependientes de NAD⁺. En *Streptomyces coelicolor*, organismo modelo del género *Streptomyces*, se ha identificado que la sirtuina CobB1 tiene actividad desacetilasa y similitud con CobB de *E. coli*.

El metabolismo secundario de *S. coelicolor* ha sido estudiado debido a su capacidad de producir metabolitos especializados de interés biotecnológico, sin embargo, aún no se conoce a profundidad cómo se regula el metabolismo primario que genera precursores para la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos. Por ello ha surgido el interés por investigar qué impacto tiene la acetilación en la regulación del metabolismo de esta bacteria. Para contribuir al estudio del acetiloma de *S. coelicolor*, en este trabajo se aisló una cepa mutante deletada del gen *cobB1* con el fin de evitar la desacetilación de sus proteínas blanco, para en un futuro obtener el patrón de acetilación de las proteínas en este microorganismo. Esto se realizó clonando el gen en un plásmido junto con regiones adyacentes y se sustituyó por un cassette de resistencia a apramicina con extensiones homólogas a las regiones flanqueantes del gen mediante recombinación homóloga con el sistema λ Red. Posteriormente fue introducido a *S. coelicolor* por conjugación intergenérica con *E. coli*. Finalmente se aislaron colonias resistentes a apramicina que recombinaron con el plásmido sustituido con el cassette.

Introducción

Función e importancia de las modificaciones post-traduccionales en bacterias

Las bacterias son microorganismos que necesitan adaptarse a los cambios constantes en su ambiente, para esto cuentan con diferentes estrategias de regulación metabólica que van desde la regulación transcripcional de la expresión génica hasta la modificación de una proteína después de que es producida (Castaño-Cerezo *et al.*, 2014)

Las modificaciones post-traduccionales, como su nombre lo implica, son modificaciones que ocurren después de que el ADN ha sido transcrito a ARN y éste traducido a proteínas; estas modificaciones le dan complejidad y diversidad al proteoma a la vez que contribuyen a su regulación de muchas funciones celulares (Zhao y Jensen, 2009).

A partir de la aplicación de la espectrometría de masas para el desarrollo de estudios de proteómica se ha encontrado que los procariontes son capaces de modificar sus proteínas con diferentes modificaciones post-traduccionales, las cuales influyen considerablemente en la fisiología de las bacterias. Estas modificaciones pueden alterar la relación entre la estructura y la función de las proteínas, así como impactar en la formación de complejos proteicos o la actividad enzimática (Cain *et al.*, 2014).

Las modificaciones post-traduccionales reversibles son un mecanismo rápido para controlar la actividad de las proteínas y en particular, de aquellas que son clave en el metabolismo, controlando el uso de vías alternas (Heinemann y Sauer, 2010).

Entre las modificaciones post-traduccionales más comunes se encuentran la acetilación en el residuo Nε-lisina, así como la propionilación, butirilación, succinilación, malonilación, crotonilación, 2-hidroxiisobutirilación y glutarilación que también se llevan a cabo en residuos de lisina (Colak *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014; Hirschey y Zhao, 2015; Okanishi *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2011, 2014; Zhang *et al.*, 2009).

Acetilación de proteínas en residuos de lisina

La Nε-acetilación de proteínas es la adición de un grupo acetilo al Nε de la lisina. Esta modificación fue identificada por primera vez en histonas eucariotas (Carabetta y Cristea, 2017). Sin embargo, la acetilación es una modificación post-traduccionales recurrente en bacterias. Estudios recientes de proteómica, en diversas especies bacterianas, han identificado cientos de proteínas acetiladas en lisina que controlan diferentes procesos

celulares (Hentchel y Escalante-Semerena, 2015; Kosono *et al.*, 2015; Schilling *et al.*, 2015). La acetilación puede tener impacto en la función, estructura y estabilidad de las proteínas; debido a que la acetilación neutraliza la carga positiva en las lisinas, esta modificación puede alterar la actividad enzimática, las interacciones proteína-proteína o proteína-ácidos nucleicos, la conformación y la localización subcelular de las proteínas (Choudhary *et al.*, 2014).

Acetilación enzimática

En bacterias, la acetilación en los residuos de lisina se da por dos mecanismos, uno enzimático y uno no enzimático. La acetilación enzimática es catalizada por acetil transferasas (KATs o histona acetil transferasa HATs). Estas enzimas transfieren un grupo acetilo de una molécula donadora, como acetil-coenzima A (acetil-CoA), a una lisina. La mayoría de las KATs pertenecen a la familia GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase, por sus siglas en inglés), que contiene proteínas ortólogas en el dominio eucariota, procariota y arquea (Carabetta y Cristea, 2017).

En *Salmonella* se descubrió la acetiltransferasa, denominada Pat, responsable de acetilar a la acetil-coenzima A sintetasa (Acs). Pat fue identificada como una proteína perteneciente a la familia GNAT (Starai y Escalante-Semerena, 2004). Análogamente en *E. coli*, YfiQ funciona como KAT, perteneciente también a las GNATs (Kuhn *et al.*, 2014)

Acetilación no enzimática

La acetilación también puede llevarse a cabo por un mecanismo no enzimático, como fue demostrado en *E. coli*, donde se observó que la acetilación no enzimática está relacionada con los niveles de acetil-fosfato (acP). El acP dona directamente su grupo acetilo al grupo Nε de una lisina (Weinert *et al.*, 2013). En *Bacillus subtilis* también se ha observado el efecto del acP en la acetilación global de proteínas (Kosono *et al.*, 2015).

Se ha propuesto que la acetilación dependiente de acP en *E. coli* es resultado de un exceso metabólico que ocurre cuando el acetil-CoA se acumula. Para resolver esto, las células recurren a la fermentación ácida mixta, en la que los principales productos son ATP y acetato. El acP es un intermediario de la vía fosfotransacetilasa-acetato cinasa (Figura 1) y su acumulación favorece la acetilación (Wolfe, 2016).

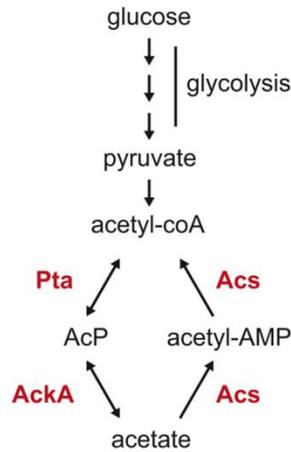


Figura 1. Modelo que representa la formación de acetato a partir de la glucólisis.

El acetato y el acetil-CoA pueden ser interconvertidos por dos mecanismos: la acetil-CoA sintetasa (Acs) convierte el acetato a acetil-CoA, con acetil-AMP como intermediario, mientras que la acetato cinasa (AckA) y la fosfotransacetilasa (Pta) convierten acetato en acetil-CoA de forma reversible con acetil-fosfato (AcP) como intermediario. Modificado de Weinert *et al.* (2013).

La especificidad de la acetilación no enzimática es determinada por la accesibilidad, reactividad y el microambiente tridimensional de la lisina blanco. El microambiente propicio para que la acetilación no enzimática ocurra suele contener residuos que se unen al grupo fosforilo, estos residuos tienen carga positiva, como lisina y arginina, o tienden a formar puentes de hidrógeno como serina, treonina o tirosina (Kuhn *et al.*, 2014).

Desacetilación

La reversión de la acetilación es catalizada por desacetilasas que remueven grupos acetilo de residuos de lisina acetilados. Se han identificado dos familias de enzimas que realizan esta función: las desacetilasas dependientes de Zn^{2+} (KDACs) y las sirtuinas dependientes de NAD^+ . Las desacetilasas dependientes de Zn^{2+} son hidrolasas que liberan el grupo acetilo y generan acetato como producto, mientras que las sirtuinas utilizan NAD^+ como cofactor (Figura 2) y producen nicotinamida (NA) y 2'-O-acetil-ADP-ribosa (Carabetta y Cristea, 2017).

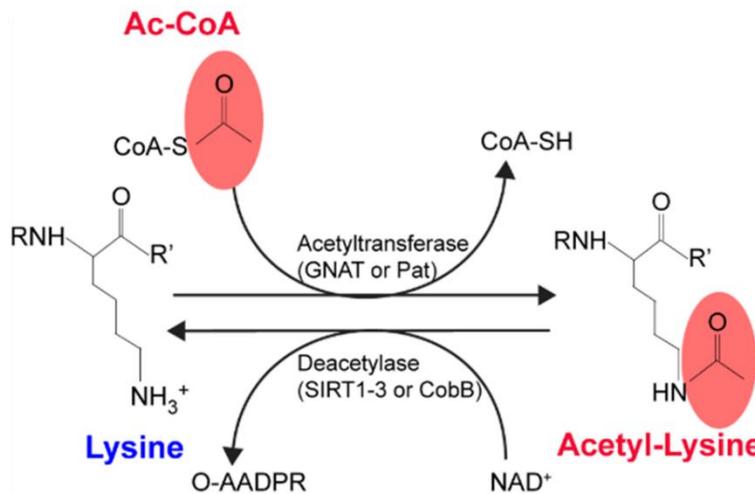


Figura 2. Representación del mecanismo de acetilación enzimática reversible.

El grupo acetilo puede ser añadido a la lisina por acetiltransferasas GNAT. Mediante un residuo conservado de glutamato, la enzima desprotona a la lisina y el acetil-CoA es usado como el donador del grupo acetilo. El acetilo puede ser removido por desacetilasas que usan NAD⁺ como cofactor y liberan nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR). Tomado de Li *et al.*, (2020).

Típicamente las sirtuinas consisten de un dominio catalítico conservado de ~250 aminoácidos y dos dominios opcionales y altamente variables en el amino- y carboxilo-terminal respectivamente (Schwer y Verdin, 2008). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en eucariotas y procariontes y ya se han identificado ortólogos en bacterias (North y Verdin, 2004).

La sirtuina bacteriana mejor caracterizada es la proteína CobB de *Salmonella enterica*, la cual desacetila y activa a la acetil-CoA sintetasa (Acs) acetilada por Pat (Starai *et al.*, 2002). También se han encontrado en *E. coli* (Zhao *et al.*, 2004), *B. subtilis* (Gardner y Escalante-Semerena, 2009), *Rhodopseudomonas palustris* (Crosby *et al.*, 2010) entre otros.

La sirtuina de *E. coli*, también llamada CobB, es capaz de desacetilar acetil-lisinas dependientes de su propia KAT, YifQ, así como lisinas acetiladas por acetil fosfato. El mecanismo por el cual CobB reconoce a su sustrato aún no se elucida, sin embargo, se sabe que en la especificidad enzimática interviene la accesibilidad del sustrato y el microambiente tridimensional en el que se encuentra la acetil-lisina (Abouelfetouh *et al.*, 2015).

Los genomas de las bacterias tienden a codificar una o dos homólogos de sirtuinas; algunos también codifican KDACs. Como ejemplo, *S. enterica* tiene una sola sirtuina (CobB) (Starai *et al.*, 2002); mientras que *B. subtilis* tiene una sirtuina (StrN) y una KDAC (AcuC) (Gardner y Escalante-Semerena, 2009). El estudio de VanDrise y Escalante-Semerena (2018) mostró que *Streptomyces lividans* tiene dos sirtuinas (CobB y SrtA) y una KDAC (AcuC). Se cree que cada una tiene diferentes sustratos, pero cómo se ha desarrollado su especificidad aún se está elucidando.

Estudio de la acetilación de proteínas en bacterias

Los avances en la proteómica basada en espectrometría de masas han permitido la identificación y caracterización de miles de sitios acetilados en muchas proteínas de bacterias de distintos géneros. A partir de estos estudios ha surgido el concepto del acetiloma, el cual se define como el perfil completo de proteínas acetiladas de un organismo en un determinado tiempo bajo condiciones específicas (Choudhary *et al.*, 2009).

En *E. coli* se han identificado 2730 lisinas acetiladas (AcK) en 806 proteínas (Kuhn *et al.*, 2014). Algunas de las proteínas acetiladas en *E. coli* incluyen a la piruvato deshidrogenasa, acetil-CoA sintetasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, entre otras, todas ellas relacionadas al metabolismo central del carbono (Yu *et al.*, 2008). En otro estudio con *E. coli* se determinó que el 47% de sus proteínas acetiladas están involucradas en la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el metabolismo del piruvato (Zhang *et al.*, 2013). Por otra parte, en la enterobacteria *S. enterica* G4266, Wang *et al.* (2010) identificaron 235 péptidos acetilados que correspondían a 195 proteínas.

En el principal modelo de las bacterias Gram⁺, *B. subtilis*, se han identificado 629 proteínas acetiladas con 1355 sitios únicos de acetilación afectando a la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y al metabolismo de purinas cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono y al ciclo del ácido cítrico cuando se cultiva a este microorganismo en citrato. También se observaron cambios en la acetilación de proteínas que participan en el metabolismo central de carbono y en componentes relacionados con la transcripción y traducción (Kosono *et al.*, 2015).

De igual forma se han reportado acetilomas de actinomicetos pertenecientes a diferentes géneros. En *Corynebacterium glutamicum*, un microorganismo Gram⁺ utilizado en la

sobreproducción de ácido glutámico, se han observado 604 proteínas acetiladas con 651 sitios únicos de acetilación, incluyendo al complejo proteico de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Mizuno *et al.*, 2016). Por otro lado, en *Streptomyces roseosporus*, microorganismo productor del antibiótico daptomicina, se encontraron 667 proteínas acetiladas con 1143 sitios únicos. Sorprendentemente, se incluyen proteínas involucradas en el metabolismo secundario, indicando que las modificaciones post-traduccionales son un mecanismo de regulación importante tanto en metabolismo primario como secundario. Las 667 proteínas acetiladas encontradas fueron comparadas con otros acetilomas reportados y se encontraron ortólogos de 137 proteínas acetiladas en otras bacterias. El mayor número (45%) fue encontrado en *B. subtilis*, indicando una mayor similitud con bacterias Gram⁺ (Liao *et al.*, 2014). Asimismo, dentro del género *Streptomyces*, se analizó el acetiloma de *Streptomyces griseus*, en el cual se identificaron 162 sitios de acetilación en 134 proteínas principalmente relacionadas al metabolismo primario y a la traducción; sin embargo, también se encontraron algunas proteínas acetiladas del metabolismo secundario, entre ellas la proteína StrM, involucrada en la biosíntesis de la estreptomicina. (Ishigaki *et al.*, 2017).

La regulación por acetilación más caracterizada es la que modula a la acetil-CoA sintetasa, no obstante, la acetilación de lisinas puede también ocurrir en proteínas involucradas en procesos no metabólicos (Ouidir *et al.*, 2016). La proteína CheY, regulador de la quimiotaxis de *E. coli*, es susceptible a acetilación en respuesta al estado metabólico de la célula y puede ser desacetilado por CobB. Al ser modificada, su punto isoeléctrico cambia, lo cual impide su interacción con otras proteínas y afecta el movimiento flagelar (Li *et al.*, 2010).

La transcripción también puede ser regulada por acetilación. En *E. coli* la RNA polimerasa puede ser acetilada en varios residuos de diferentes subunidades (α , β y β') y los patrones de acetilación dependen de las condiciones de crecimiento. Particularmente, la acetilación en el dominio α -carboxi-terminal regula el reconocimiento del promotor ya que ese dominio interactúa con una región de ADN río arriba del sitio de iniciación de la transcripción o también con ciertos factores de transcripción. Se sabe que este dominio es acetilado en respuesta a glucosa y otras fuentes de carbono (Lima *et al.*, 2011).

Antecedentes

Las bacterias del orden de los actinomicetos son los mayores productores de compuestos bioactivos de importancia médica como antibióticos, antifúngicos, inhibidores virales, antiparasitarios, inmunosupresores, entre otros (Musiol-Kroll *et al.*, 2019; Van Keulen y Dyson, 2014). Dentro de los actinomicetos, el género *Streptomyces* produce cerca de la mitad de los antibióticos de origen microbiano (Chater, 2016; Gomez-Escribano y Bibb, 2011; Liu *et al.*, 2013). *Streptomyces coelicolor* A3(2) fue elegido en un inicio como el organismo modelo del género debido a que la producción de antibióticos con pigmentación azul y roja permitía la discriminación rápida de mutaciones que afectaban el metabolismo secundario (Hopwood, 2007). Posteriormente, con la secuenciación de su genoma se desarrollaron métodos de manipulación e ingeniería genética que han ayudado a estudiar la genética y la biología de los estreptomicetos.

Los estreptomicetos son bacterias Gram-positivas que se encuentran principalmente en el suelo, tienen una morfología filamentosa, diferente a las más conocidas formas de bacilos, cocos y espiroquetas. Su ciclo de vida es complejo y consiste en varios tipos de diferenciación celular y esporulación; crecen en forma de hifas filamentosas que forman un micelio, a partir de este micelio vegetativo emergen hifas aéreas en las que se desarrollan esporas que pueden ser dispersadas por agentes físicos (Figura 3). Típicamente tienen un solo cromosoma lineal, la cual es una topología poco usual en bacterias (Van Keulen y Dyson, 2014).



Figura 3. Colonias de *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Los estreptomicetos crecen en forma de hifas filamentosas que dan lugar a un micelio basal del cual emergen hifas aéreas. En el micelio aéreo se forman las esporas, que dan el aspecto pulverulento a las colonias. Tomado de Chater (2016).

El cromosoma lineal de *S. coelicolor* es de 8.7 Mb (Figura 4) con un contenido de G+C de 72%. Las 7825 secuencias codificantes se organizan en una región central de 4.4 Mb, lo que es casi la mitad del tamaño total del cromosoma, y en dos brazos flanqueantes de 1.5 y 2.3 Mb. La región central contiene al origen de replicación (*oriC*) así como a la mayoría de los genes que son esenciales para el crecimiento, mientras que en los brazos se encuentran codificados muchos genes para biosíntesis de metabolitos especializados. En los extremos del cromosoma hay repeticiones invertidas que funcionan como telómeros y se mantienen unidos por proteínas (Bentley *et al.*, 2002).

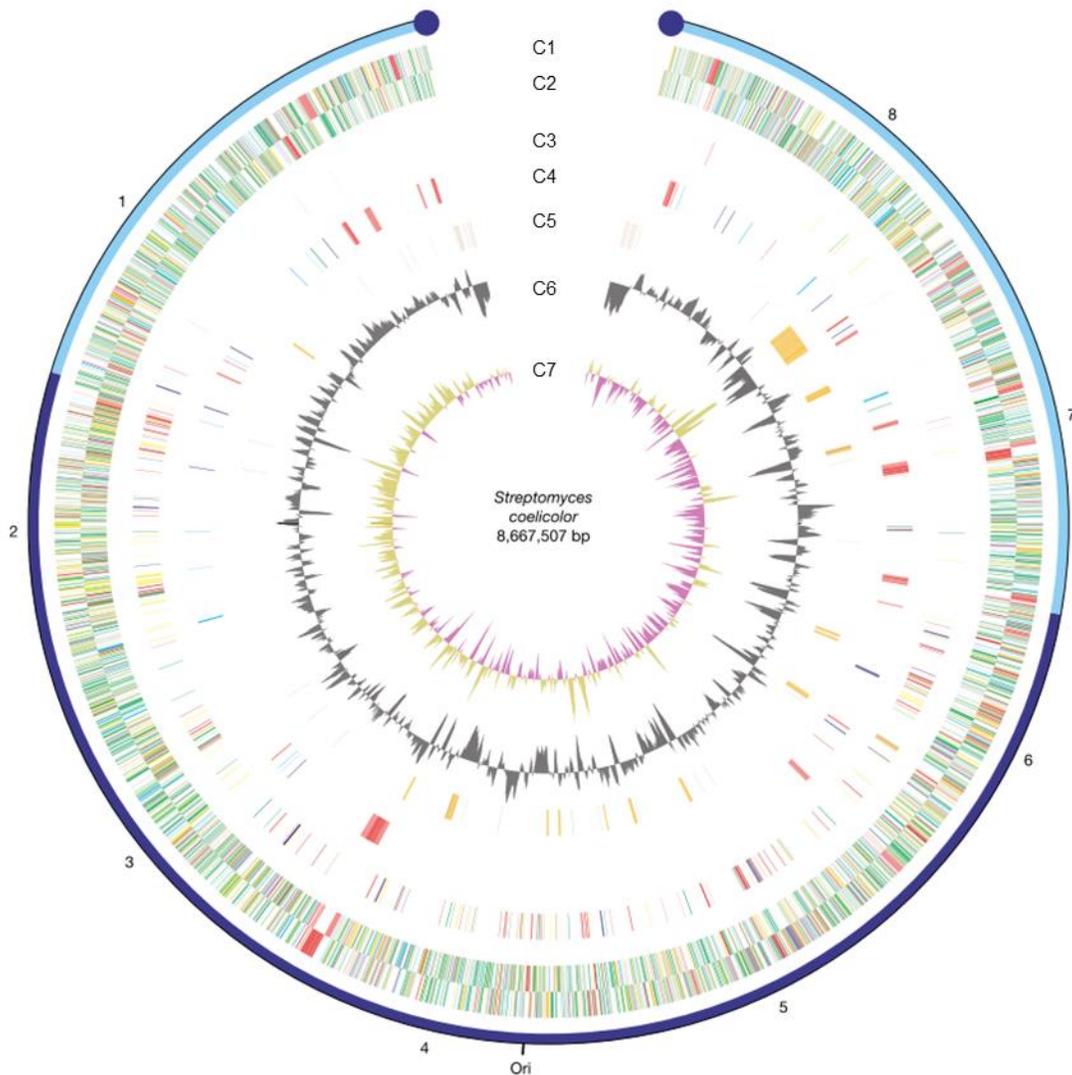


Figura 4. Representación del cromosoma de *Streptomyces coelicolor*.

El círculo externo enumera las megabases e indica la región central (azul oscuro), el origen de replicación (Ori) y los brazos (azul claro) del cromosoma; (C1 y C2) todos los genes en la cadena sentido y antisentido, respectivamente; (C3) genes esenciales involucrados en división celular, replicación de ADN, transcripción, traducción y biosíntesis de aminoácidos; (C4) genes no esenciales; (C5) elementos móviles; (C6) contenido de G+C; (C7) Sesgo de GC. Modificado de Bentley *et al.* (2002).

Existe una sintenia considerable entre la región central del cromosoma de *S. coelicolor* y los genomas circulares de otras actinobacterias incluyendo a *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*, es decir, las posiciones relativas de los genes entre estas especies están altamente conservadas, lo cual sugiere la ancestría común de las funciones celulares primarias en las actinobacterias (Chandra y Chater, 2014). Por otro lado, se ha visto que entre diferentes especies de *Streptomyces* los brazos presentan mayor divergencia genómica en comparación con la región central. Los estreptomicetos también presentan diversidad de plásmidos que difieren en tamaño, número de copias y topología. Los hay circulares covalentemente cerrados y lineales también, estos últimos tienen, al igual que el cromosoma, un origen de replicación localizado al centro y secuencias terminales repetitivas (Van Keulen y Dyson, 2014). La cepa de *Streptomyces coelicolor* M145 carece de los plásmidos SCP1 y SCP2 que están presentes en la cepa silvestre.

S. coelicolor es conocida por la producción de los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina, sin embargo, se ha reportado que en su genoma existen al menos 27 grupos o clusters de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios especializados (Nodwell, 2019). Un compuesto se considera como metabolito especializado si no aparenta tener una función directamente involucrada en los procesos de crecimiento y desarrollo, pero le confiere ventajas ecológicas y/o mayor competitividad biológica al organismo productor en su nicho ecológico (Van Keulen y Dyson, 2014). La versatilidad metabólica de *S. coelicolor* se ve reflejada en la amplia variedad de clases de compuestos que es capaz de producir, entre los cuales se encuentran policétidos, pironas, péptidos, sideróforos, γ -butirolactonas, butenólidos, furanos, terpenoides, ácidos grasos, oligopirroles y desoxiazúcares. Como ejemplos de algunas de estas clases de compuestos están los policétidos actinorrhodina y coelomicina A; la undecilprodigiosina, compuesta por pirroles, y el antibiótico dependiente de calcio, que es un lipopéptido (Liu *et al.*, 2013). No obstante, la estructura de cerca del 30% de los metabolitos especializados de este organismo aún está por elucidarse (Čihák *et al.*, 2017; Van Keulen y Dyson, 2014) esto es debido a la presencia de clusters o grupos de genes crípticos o silenciosos que no se activan en condiciones de laboratorio (Challis, 2014; Tanaka *et al.*, 2013).

Métodos de transferencia de ADN para la manipulación genética de *Streptomyces*

El primer método que permitió la manipulación genética en *Streptomyces* fue la transformación de protoplastos por medio de polietilenglicol (Bibb, Ward, y Hopwood, 1978). Este procedimiento requería una optimización extensiva y cuidadosa de la formación de protoplastos mediante la remoción de la pared celular utilizando enzimas, por lo que pocas cepas eran transformables con este método (Musiol-Kroll *et al.*, 2019). El uso de la electroporación para transferir plásmidos a *Streptomyces* aumentó el número de cepas disponibles para modificar genéticamente, no obstante, cada una requería condiciones optimizadas (Pigac y Schrempf, 1995). La conjugación intergénica estableció una alternativa para transferir plásmidos integrativos y replicativos de *E. coli* a *Streptomyces* (Bierman *et al.*, 1992).

Conjugación intergénica entre *E. coli* y *Streptomyces*

La conjugación es un proceso de transferencia genética horizontal de una célula donadora que contiene uno o más plásmidos conjugativos a una célula receptora. Los plásmidos conjugativos de la mayoría de las bacterias pueden ser transferidos a microorganismos lejanamente relacionados o incluso no relacionados. La conjugación requiere contacto físico muy cercano entre las células y usualmente es mediado por proteínas codificadas en plásmidos que poseen funciones de transferencia (Llosa *et al.*, 2002).

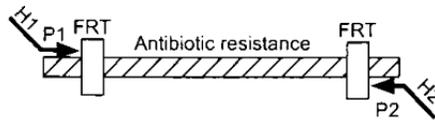
La conjugación es la manera más eficiente de transferir grandes fragmentos de ADN a *Streptomyces* y este método ha sido aplicado exitosamente para desarrollar cepas de relevancia industrial (Netzker *et al.*, 2016; Wang y Jin, 2014). Los vectores diseñados para la conjugación intergénica contienen la secuencia *oriT* del plásmido RK2 y requieren proteínas con la función de transferencia suplementadas en trans por la cepa donadora de *E. coli*. Hay parámetros críticos para una conjugación eficiente que han sido estandarizados para diferentes cepas de *Streptomyces*, como la concentración, crecimiento y tratamiento de las células donadoras y receptoras, el medio de conjugación y las condiciones de selección para la cepa receptora (Musiol-Kroll *et al.*, 2019).

La conjugación fue subsecuentemente desarrollada como parte de una metodología que permite la integración del plásmido al cromosoma de *Streptomyces* por recombinación homóloga (Kieser *et al.*, 2000).

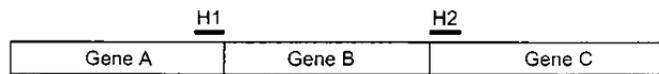
Disrupción de genes en *Streptomyces coelicolor*

Datsenko y Wanner (2000) desarrollaron un método para inactivar genes en *E. coli* utilizando el sistema de recombinación del fago λ Red (Figura 5). Mediante PCR generaron fragmentos que contenían genes de resistencia a antibióticos con extensiones de 36 a 50 nucleótidos, homólogas a las regiones adyacentes al gen a inactivar. Con la expresión controlada de las proteínas del sistema λ Red fue posible reemplazar genes en *E. coli* por recombinación homóloga entre los productos de PCR y las respectivas secuencias en el cromosoma.

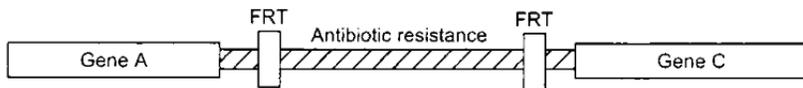
Step 1. PCR amplify FRT-flanked resistance gene



Step 2. Transform strain expressing λ Red recombinase



Step 3. Select antibiotic-resistant transformants



Step 4. Eliminate resistance cassette using a FLP expression plasmid

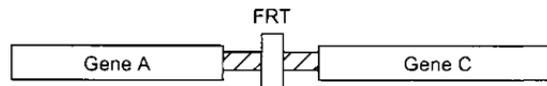


Figura 5. Estrategia para la disrupción de genes en *E. coli* con productos generados por PCR.

La estrategia se basa en amplificar un gen de resistencia antibiótica por PCR usando oligonucleótidos con extensiones homólogas (H1 y H2) de 36 nt (paso 1) para reemplazar una secuencia cromosomal (e.g. gene B) por recombinación homóloga mediada por el sistema λ Red (paso 2). Después de la selección (paso 3) el gen de resistencia puede ser eliminado con la ayuda de un plásmido a partir del cual se exprese la recombinasa FLP que actúa en los sitios FRT (paso 4). Tomado de Datsenko y Wanner (2000).

Gust *et al.* (2003) adaptaron este método para sustituir genes en *S. coelicolor* con cassettes conformados por genes de resistencia a antibióticos, un *oriT* para transferir el ADN a *S. coelicolor* por conjugación intergenérica y sitios FRT (FLP Recognition Target, por sus siglas en inglés) para la posterior escisión del cassette por la recombinasa FLP.

Estos cassettes son amplificados utilizando oligonucleótidos con extensiones correspondientes al codón de inicio del gen más 36 nt río arriba, y al codón de paro más 36 nt río abajo, dando un total de 39 nt para cada extensión homóloga.

El producto generado se electropora en *E. coli*, que cuenta con el sistema de recombinación λ Red y el gen de interés de *S. coelicolor* clonado en un cósmido. La recombinación se lleva a cabo entre el cassette y el cósmido; el cósmido sustituido es introducido en una cepa deficiente de metilación (ET12567) que funge como donador en la conjugación para eludir el sistema de restricción de ADN metilado que posee *S. coelicolor*. La identidad de las secuencias entre el cósmido y el cromosoma promueven la integración del cassette por recombinación homóloga.

Además del uso de cósmidos, se ha optimizado también el uso de plásmidos para interrumpir los genes de *Streptomyces*. Netzker *et al.* (2016) inactivaron genes de la bacteria productora de rapamicina, *Streptomyces iranensis* HM 35, clonados en plásmidos junto con regiones flanqueantes de 2 Kb. Los genes se sustituyeron con cassettes de resistencia a apramicina y subsecuentemente se transfirieron los plásmidos sustituidos a *S. iranensis* por conjugación con *E. coli*.

Desde que se estableció este método, al cual llamaron REDIRECT, se ha utilizado para interrumpir más de 100 genes en *S. coelicolor* y también ha sido aplicado a otras especies de *Streptomyces* (Gust *et al.*, 2003; Hoff *et al.*, 2017; Ishigaki *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2011).

Acetilación en *S. coelicolor*

El genoma de *S. coelicolor* codifica 77 probables acetiltransferasas GNAT (Tucker y Escalante-Semerena, 2013). Con respecto a las desacetilasas se han identificado dos sirtuinas dependientes de NAD⁺, CobB1 y CobB2, codificadas por el gen SCO0452 y SCO6464, respectivamente (Mikulik *et al.*, 2012). Adicionalmente, el genoma de *S. coelicolor* codifica una desacetilasa dependiente de Zn²⁺ en el SCO3330 (Xu *et al.*, 2017).

Mikulik *et al.* (2012) demostraron que CobB1 tiene actividad desacetilasa dependiente de NAD⁺ y es capaz de desacetilar a la acetil-CoA sintetasa (AcsA) *in vitro*, restableciendo su actividad. Posteriormente, Zhang *et al.* (2019) caracterizaron a CobB2 como una sirtuina con actividad desuccinilasa dependiente de NAD⁺. CobB1 y CobB2 tienen una similitud del 36 y 32%, respectivamente, con CobB de *E. coli* (Li *et al.*, 2020).

Hasta la fecha no se ha publicado un estudio completo del acetiloma de *S. coelicolor*, sin embargo, se han detectado diversas proteínas acetiladas que están involucradas en diferentes procesos celulares, como es el caso de AcsA, que es una proteína del metabolismo central (Mikulik *et al.*, 2012). La acetilación también se ha visto involucrada en el metabolismo del nitrógeno de *S. coelicolor*. Amin *et al.* (2016) reportaron que el regulador de nitrógeno GlnR puede acetilarse en residuos de lisina en las posiciones 142, 153, 159 y 200; además encontraron que estas modificaciones podrían alterar la afinidad de GlnR por las secuencias promotoras de algunos de sus genes blanco. Posteriormente, Xu *et al.* (2017) evidenciaron que GlnR es capaz de interactuar con la región promotora de genes que codifican deacetilasas y de activar su transcripción. Asimismo, en este estudio evaluaron el estado de acetilación de proteínas en las células en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno, encontrando una mayor acetilación en condiciones de nitrógeno en exceso, en comparación con nitrógeno limitado, debido a que hay una menor expresión de los genes SCO3330, SCO0452 y SCO6464.

Recientemente, se halló que la acetilación está involucrada en la segregación del cromosoma de *S. coelicolor*; ParB, una proteína importante para la segregación del cromosoma, puede acetilarse en la lisina 183 (Li *et al.*, 2020). La acetilación de ParB disminuye la afinidad por sus secuencias blanco de ADN, *parS*. Además, se observó que CobB1 puede desacetilar a ParB, lo cual aumenta su afinidad por el ADN.

En un proyecto anterior se determinaron los niveles de expresión de las enzimas que participan en la vía anaplerótica del fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato y se encontró que la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), codificada por el SCO3127, es una enzima clave en la regeneración del oxaloacetato en este microorganismo cuando crece en presencia de glucosa. Se observó que los niveles de ARNm correspondientes a este gen no correlacionan con la baja actividad enzimática de la PEPC, lo que puede sugerir que la proteína esté modificada post-traduccionalmente (Llamas-Ramírez *et al.*, 2020).

Estos datos, en conjunto con los que se han obtenido en estudios de otras especies de *Streptomyces*, evidencian que la acetilación es una modificación post-traducciona importante para la regulación de distintos procesos celulares como el metabolismo primario, incluyendo las vías de glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y gluconeogénesis, así como vías de biosíntesis de metabolitos secundarios como antibióticos (Ishigaki *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2014).

Justificación

El género *Streptomyces* produce cerca de la mitad de los antibióticos de origen microbiano, además de otros metabolitos de interés médico y biotecnológico (Chater, 2016). Es por ello que estos organismos están siendo estudiados con la expectativa de que puedan contribuir al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, así como proveer otros compuestos bioactivos con aplicaciones médicas o industriales.

Streptomyces coelicolor es el organismo modelo del género debido a que se cuentan con herramientas como su genoma secuenciado y métodos de manipulación genética que están disponibles para estudiar su fisiología. El estudio de su metabolismo secundario ha revelado la presencia de numerosos grupos de genes para la producción de metabolitos especializados. Sin embargo, aún no se conoce a profundidad cómo se regula el metabolismo primario que genera precursores para la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos.

Con los recientes hallazgos de modificaciones post-traduccionales y en particular de la acetilación como forma de regulación del metabolismo en bacterias, ha surgido el interés en el grupo de la Dra. Flores por investigar qué impacto tiene esta modificación en el metabolismo de la glucosa de *S. coelicolor*, para comprobar que en este microorganismo también se regulan por acetilación, enzimas que participan en la glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Como parte de ese estudio se requiere una cepa mutante que tenga la desacetilasa CobB1 deletada con el fin de evitar la desacetilación de sus proteínas blanco dentro de la célula para poder estudiar el acetiloma completo de *S. coelicolor*.

Hipótesis

El aislamiento de una cepa deletada de *Streptomyces coelicolor* M-145 que carezca del gen que codifica a la desacetilasa CobB1 es posible por doble recombinación y la sustitución por un cassette de resistencia a un antibiótico.

Objetivos

Objetivo general

Obtener una mutante deletada del gen *cobB1* (SCO0452) de *S. coelicolor*.

Objetivos particulares

- Clonar el gen *cobB1* (SCO0452) más 1000 pb en ambos lados en el plásmido pBluescript SK+.
- Sustituir el gen SCO0452 en el plásmido pBluescript SK+ por un cassette de resistencia a apramicina usando el sistema de recombinación λ RED en *E. coli* BW25113/pIJ790.
- Conjugar a *E. coli* ET12567/pUZ8002/pBSK Δ SCO0452::*aac(3)IV* con *S. coelicolor* M-145 para transferir el plásmido sustituido y obtener exconjugantes deletadas del SCO0452 cromosomal.

Materiales y métodos

Microorganismos

Las cepas de *Streptomyces coelicolor* M145, carente de los plásmidos SCP1 y SCP2, *E. coli* TOP10F', *E. coli* BW25113/pIJ790 y *E. coli* ET12567/pUZ8002 fueron obtenidas de la colección del laboratorio de la Dra. Flores.

Medios de cultivo

Medio MS (Mannitol Soya Flour Medium):

| | |
|----------------|---------|
| Agar | 20 g |
| Mannitol | 20 g |
| Harina de soya | 20 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Medio LB:

| | |
|----------------------|---------|
| Extracto de levadura | 5 g |
| Triptona | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Antibióticos utilizados:

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Ampicilina (Sigma-Aldrich) | 100 µg/ml |
| Tetraciclina (Sigma-Aldrich) | 10 µg/ml |
| Apramicina (Sigma-Aldrich) | 50 µg/ml |
| Cloranfenicol (Sigma-Aldrich) | 25 µg/ml |
| Kanamicina (Sigma-Aldrich) | 50 µg/ml |

Estrategia para la interrupción del gen *cobB1* de *Streptomyces coelicolor*

La estrategia general para sustituir el SCO0452 por un cassette de resistencia a apramicina, esquematizada en la Figura 6 se adaptó del método descrito por Gust *et al.* (2002).

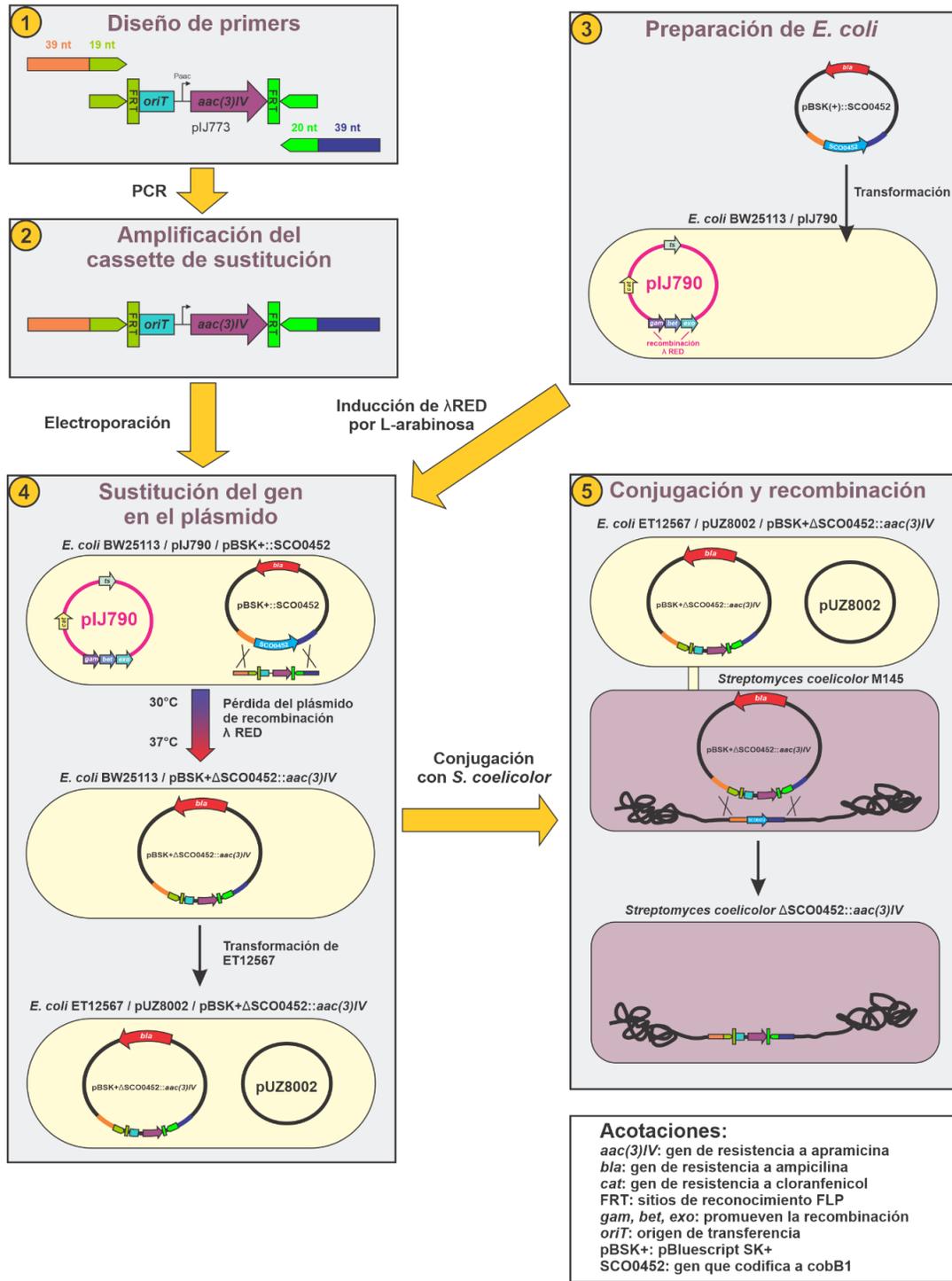


Figura 6. Representación de la estrategia general para interrumpir el SCO0452. Adaptado de Gust (2002).

Diseño de oligonucleótidos para la clonación del fragmento extendido del gen SCO0452

Se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar y clonar un fragmento del ADN de *S. coelicolor* conteniendo al gen SCO0452, de 900 pb, más 834 pb río arriba y 876 pb río abajo, correspondientes al SCO0451 y al SCO0453, dando un total de 2610 pb. Los oligonucleótidos de 20 nt complementarios a la secuencia se obtuvieron con la herramienta Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a los cuales les fueron añadidos los sitios de restricción para *Bam*HI y *Eco*RI en los oligonucleótidos sentido (Sen) y antisentido (Anti), respectivamente. Además, se añadieron 6 bases en cada uno para favorecer la digestión del fragmento, como se observa en la Figura 7.

Sen: 5'-TGTTTAGGATCCGTGACCAGGACGAACACTCC-3'
 Anti: 5'-TATTGAGAATTCGAAGTACTCGATGCCCAGG-3'

Figura 7. Oligonucleótidos para la amplificación del fragmento extendido del SCO0452.

Bases complementarias al templado (rosa), sitio *Bam*HI (amarillo), sitio *Eco*RI (azul), bases adicionales (verde).

La temperatura de alineamiento fue calculada con la aplicación Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific considerando únicamente las bases complementarias al templado. Adicionalmente, se verificó que los oligonucleótidos completos no formaran dímeros entre ellos o estructuras secundarias por medio de la calculadora OligoCal. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor., México); sus características se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos complementarios al fragmento del SCO0452.

| Oligonucleótidos | SCO0452-2610 Sentido | SCO0452-2610 Antisentido |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| Longitud | 20 nt | 20 nt |
| Secuencia | 5'GTGACCAGGACGAACACTCC3' | 5'CGAAGTACTCGATGCCCAGG3' |
| % GC | 60 % | 60 % |
| Tm | 61°C | 60.9°C |
| Ta | 64.4°C | |

Ta, temperatura de alineamiento; Tm, temperatura de fusión.

Amplificación del fragmento extendido del SCO0452

El fragmento extendido del SCO0452 fue amplificado por PCR con un gradiente de temperaturas de alineamiento. Se utilizó la enzima Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Thermo

Fisher Scientific), la cual tiene actividad exonucleasa 3'→5' correctora y es apta para amplificar ADN con alto contenido de GC. Se preparó una mezcla de reacción en la cual se agregaron 10 µl de buffer de amplificación Pfx 10X, 3 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 2 µl de MgSO₄ (25 mM), 10 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 100 ng de ADN de *Streptomyces coelicolor*, 4 µl de DMSO, 1 µl de polimerasa Platinum Pfx y se llevó el volumen a 100 µl con agua grado biología molecular. Esta mezcla se repartió en 8 tubos de reacción, se colocaron en el termociclador (T100, BioRad) y se corrió el programa indicado en la Tabla 2 con un gradiente de temperatura de alineamiento de 56 a 62°C.

Tabla 2. Programa para amplificar el fragmento del SCO0452.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 03:00 | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 00:15 | 30 |
| Alineamiento | 56-62°C | 00:30 | |
| Extensión | 68°C | 03:00 | |
| Extensión final | 68°C | 05:00 | 1 |

El producto de PCR fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X con bromuro de etidio (10 µg/ml) a 100 V por 60 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó el GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

Purificación del producto y secuenciación

Los productos de la PCR se purificaron utilizando un dispositivo conformado por una punta de micropipeta de 200 µl con filtro, colocada dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Una vez recortada la banda del gel, se colocó dentro de la punta con filtro del dispositivo y se congeló a -20°C durante 5 minutos. Inmediatamente se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos, a temperatura ambiente. El proceso de congelación y centrifugación (Patharkar, 2019) se repitió dos veces. El amplicón de ADN recuperado se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2, posteriormente se incubó a -20°C por 24 horas. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C y se lavó con etanol al 70% frío dos veces. El precipitado se secó a temperatura ambiente, se resuspendió con agua grado biología molecular y se determinó

la concentración de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Con el producto purificado se preparó una reacción de secuenciación por ciclado térmico con el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems). La reacción se preparó mezclando 4 μ l de BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 4 μ l del oligo SCO0452-Fw (1 μ M), 1 μ l (80 ng) del amplicón purificado y 1 μ l de agua grado biología molecular en un tubo de PCR. El tubo se colocó en el termociclador y se corrió el programa de secuenciación mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de secuenciación por ciclado térmico.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 96°C | 01:00 | 1 |
| Desnaturalización | 96°C | 00:10 | 25 |
| Alineamiento | 50°C | 00:05 | |
| Extensión | 68°C | 04:00 | |

Cuando terminó el programa del termociclador, los productos fueron purificados pasándolos por una columna de Sephadex G50, colocada en un tubo colector, la cual fue centrifugada a 2700 rpm por 2 minutos.

Una vez purificada, la muestra fue llevada al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología de la UNAM (Ciudad Universitaria, CDMX) en donde se obtuvo la secuencia.

Después de obtener la secuencia del producto de PCR, se realizó un alineamiento con el genoma de *S. coelicolor* utilizando la herramienta BLAST del servidor NCBI para determinar los genes que se amplificaron.

Preparación del vector pBluescript SK+

El plásmido pBluescript SK+ (pBSK+) con el gen de resistencia a ampicilina y con un sitio de clonación múltiple que incluía los sitios de para *Bam*HI y *Eco*RI se eligió como vector de clonación. Para propagarlo se transformaron células de *E. coli* TOP10F' por shock térmico.

Un stock de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 F' fue descongelado en hielo durante 10 minutos. En el tubo se colocaron 60 ng de plásmido y se mezcló suavemente. Se incubó en hielo por 45 minutos, luego a 37°C por 15 minutos y nuevamente en hielo por 3 minutos. Se añadió 1 ml de medio LB estéril y se incubó en agitación a 37°C durante una hora. Después de este tiempo se centrifugaron las células a 13000 rpm por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en la gota de medio restante para sembrarlas en una caja de LB con ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), IPTG (140 µM) y X-Gal (240 µg/ml). Tras 24 horas se seleccionaron cuatro colonias azules para ser resembradas en una caja nueva de LB con los mismos antibióticos, IPTG y X-Gal. Un día después se prepararon cultivos de dos colonias en 10 ml de LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) y se incubaron en agitación a 200 rpm y 37°C por toda la noche. Posteriormente, se tomaron 3.5 ml de cada cultivo para purificar plásmido con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Siguiendo el protocolo de purificación recomendado por el fabricante, se centrifugaron las células de cada muestra para retirar el medio de cultivo y suspenderlas en 250 µl de buffer de resuspensión mediante agitación en vórtex. Posteriormente se transfirió la solución a tubos de 1.5 ml y se agregaron 250 µl de buffer de lisis, se mezcló por inversiones suavemente y se incubó por 5 minutos hasta que la solución clarificase. Se añadieron 10 µl de proteasa alcalina, se mezcló y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregaron 350 µl de buffer de neutralización, se mezcló por inversiones y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó por 10 minutos más para después ser transferido a una columna colocada dentro de un tubo colector. Las columnas fueron centrifugadas por 1 minuto a 13000 rpm; se descartó el eluato y se lavó la columna con 750 µl de buffer de lavado, centrifugando nuevamente por 1 minuto. El eluato fue descartado y se repitió el lavado con 250 µl de buffer de lavado. Las columnas se transfirieron a tubos de 1.5 ml limpios para centrifugarlas por 3 minutos y remover el etanol residual; después se transfirieron nuevamente a tubos de 1.5 ml estériles y se eluyó el plásmido con 100 µl de agua libre de nucleasas, centrifugando por 1 minuto. La concentración de cada muestra de plásmido se cuantificó empleando el NanoDrop y posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

Digestión del plásmido pBluescript SK+ y del amplicón SCO0452 extendido

El plásmido y el inserto fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI Fast Digest (Thermo Fisher Scientific), que permiten realizar reacciones de digestión con múltiples enzimas simultáneamente. Los reactivos se combinaron en tubos de 0.6 ml, en el orden indicado en las tablas Tabla 4 y Tabla 5, se mezclaron por agitación y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se inactivaron las enzimas incubando a 80°C por 5 minutos.

Tabla 4. Mezcla de reacción de la doble digestión del pBluescript SK+.

| Reactivo | Volumen (μl) |
|--------------------------|--------------|
| Agua GBM | 12 |
| 10X FastDigest Buffer | 7 |
| pBSK+ (60 ng/μl) | 45 |
| FastDigest <i>Eco</i> RI | 3 |
| FastDigest <i>Bam</i> HI | 3 |
| Volumen total | 70 |

Tabla 5. Mezcla de reacción de la doble digestión del inserto con el SCO0452.

| Reactivo | Volumen (μl) |
|--------------------------|--------------|
| Agua GBM | 4.5 |
| 10X FastDigest Buffer | 2.5 |
| ADN SCO0452 (80 ng/μl) | 15 |
| FastDigest <i>Eco</i> RI | 1.5 |
| FastDigest <i>Bam</i> HI | 1.5 |
| Volumen total | 25 |

El plásmido y el inserto, digeridos en cada reacción, fueron precipitados con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, en incubación a -20°C; el plásmido se incubó durante 24 horas y el inserto durante 2 horas. Ambos fueron centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C y lavados con etanol al 70% dos veces. Los precipitados se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en agua grado biología molecular. Se determinó su concentración utilizando el NanoDrop.

Ligación del plásmido y el inserto

Para ligar los productos de la digestión se empleó la enzima T4 DNA Ligase (Promega). Se calculó una proporción molar 3:1 entre el inserto y el plásmido de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ng de plásmido} \times \text{kb del inserto}}{\text{kb del plásmido}} \times \frac{3}{1} = \text{ng de inserto}$$

$$\frac{225 \text{ ng} \times 2.6 \text{ kb}}{2.9 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 605 \text{ ng de inserto}$$

Estos fueron mezclados con la ligasa en un coctel de reacción, indicado en la Tabla 6, el cual fue incubado a 10°C por 16 horas.

Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación del pBSK+ y el SCO0452.

| Reactivo | Volumen (μl) |
|-------------------|--------------|
| pBSK+ digerido | 2.5 |
| SCO0452 digerido | 5.5 |
| Ligase Buffer 10X | 1.2 |
| T4 DNA Ligase | 1 |
| Agua GBM | 1.8 |
| Volumen total | 12 |

Transformación de *E. coli* TOP10F' con el producto de la ligación

Todo el producto de ligación fue transformado en *E. coli* TOP10F' por shock térmico siguiendo la metodología ya descrita en la preparación del vector. Se sembraron 50 μl de suspensión celular en LB con ampicilina (100 μg/ml), tetraciclina (10 μg/ml), IPTG (140 μM) y X-Gal (240 μg/ml). Como control, se realizó también la transformación del pBSK+ vacío (60 ng) y se sembraron 100 μl de suspensión celular en una caja de LB idéntica a la descrita previamente. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se resembraron algunas colonias blancas conteniendo el plásmido pBluescript SK+::SCO0452 en el mismo medio.

Ensayo de lisis de colonias en gel

De las colonias resembradas se seleccionaron 11 para observar si tenían el inserto por medio de lisis en gel. Esto se realizó preparando un gel desnaturizante de agarosa 0.8% con SDS 0.5% y bromuro de etidio (10 μg/ml) en buffer TAE 1X. Se prepararon dos soluciones, etiquetadas como Solución 1 y Solución 2 (Tabla 7 y Tabla 8). Asimismo, se preparó una solución de lisis disolviendo 1 mg de lisozima en 10 ml de Solución 1. Se etiquetaron microtubos de fondo plano con los números de las colonias, adicionalmente, se etiquetó un tubo como Control. En todos los tubos se colocaron 20 μl de Solución 1 y se inoculó una asada de la colonia correspondiente; como control se inoculó una colonia de *E. coli* TOP10F'/pBSK+. Los inóculos fueron homogeneizados completamente agitando el asa

en el líquido. Posteriormente, se agregaron 20 μ l de solución de lisis a cada muestra y se mezcló por golpeteo para después cargar 15 μ l de mezcla en cada pozo del gel, seguido de 10 μ l de solución 2. El gel se corrió a 50 V por 30 minutos para promover el ingreso preferencial de los plásmidos al gel y luego a 100 V por 1 hora 15 minutos. El control fungió como referencia para comparar la migración del plásmido sin inserto y con inserto. Al finalizar el corrimiento se fotografió en un fotodocumentador (Gel Logic 2200 Imaging System, Kodak).

Tabla 7. Composición de la Solución 1 para la lisis de colonias en gel.

| Solución 1 | |
|------------------|---------------------|
| Componente | Concentración final |
| Sacarosa | 250 g/L |
| Tris-HCl 1M pH 8 | 25 mM |
| EDTA 0.5M | 25 mM |

Tabla 8. Composición de la Solución 2 para la lisis de colonias en gel.

| Solución 2 | |
|--------------------|---------------------|
| Componente | Concentración final |
| Sacarosa | 250 g/L |
| SDS | 100 g/L |
| Tris-HCl 1M pH 8 | 25 mM |
| Azul de bromofenol | 700 mg/L |

Purificación y digestión de los plásmidos purificados

De las 11 colonias analizadas por lisis en gel se seleccionaron cuatro para purificar el plásmido pBluescript SK+::SCO0452. Para esto, se prepararon cultivos líquidos de cada colonia en 5 ml de LB con ampicilina (100 μ g/ml) y tetraciclina (10 μ g/ml), y se incubaron en agitación a 200 rpm y 37°C toda la noche. Se tomaron 3 ml de cada cultivo y se purificó plásmido siguiendo la metodología ya descrita en la preparación del vector. La concentración de los plásmidos se cuantificó en el NanoDrop.

Digestión de los plásmidos

Para observar el tamaño de los plásmidos, así como verificar el tamaño del inserto se realizaron digestiones sencillas y dobles con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI FastDigest (Thermo Fisher Scientific), además se empleó el 10X FastDigest Green Buffer, el cual contiene un buffer de carga para correr las muestras en un gel directamente después de que la reacción se lleva a cabo. Las reacciones de digestión sencilla (Tabla 9) se efectuaron con la enzima *Bam*HI. En las reacciones dobles (Tabla 10) se emplearon tanto *Bam*HI como *Eco*RI. Los dos tipos de reacciones se incubaron por 5 minutos a 37°C. Después de este tiempo se inactivaron las enzimas incubando a 80°C por 5 minutos.

Tabla 9. Mezcla de reacción de la digestión sencilla de los plásmidos con insertos.

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------------|------------|
| 10X FastDigest Green Buffer | 1 μ l |
| Plásmido | 240 ng |
| FastDigest <i>Bam</i> HI | 1 μ l |
| Volumen total | 10 μ l |

Tabla 10. Mezcla de reacción de la digestión doble de los plásmidos con inserto.

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------------|------------|
| Agua GBM | 8 μ l |
| 10X FastDigest Green Buffer | 2 μ l |
| Plásmido | 240 ng |
| FastDigest <i>Bam</i> HI | 1 μ l |
| FastDigest <i>Eco</i> RI | 1 μ l |
| Volumen total | 20 μ l |

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X para realizar la electroforesis de los plásmidos, así como de los plásmidos digeridos. El marcador de peso molecular utilizado fue el GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

Secuenciación del plásmido pBSK+::SCO0452

El plásmido con inserto pBSK+::SCO0452, fue secuenciado por ciclado térmico con el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se preparó mezclando 4 μ l de BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 1 μ l del oligonucleótido del promotor T7 (4 pmol/ μ l) y 5 μ l de pBSK+::SCO0452.

El ciclado de secuenciación fue el mismo que el indicado en la Tabla 3. De igual forma, se purificó el producto pasándolo por una columna de Sephadex G50 colocada en un tubo colector y centrifugando a 2700 rpm por 2 minutos. La muestra fue llevada al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología de

la UNAM en donde se llevó a cabo la electroforesis capilar y la obtención de la secuencia. Esta fue alineada con el genoma de *S. coelicolor* por medio de la herramienta BLAST para comprobar la región que se clonó en el plásmido.

Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el cassette extendido de resistencia a apramicina

Siguiendo la metodología de Gust *et al.* (2002), se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un cassette extendido de resistencia a apramicina que se encuentra en el plásmido pIJ773, que sustituirá al gen SCO0452 en *S. coelicolor*. Los oligonucleótidos de 58 y 59 nt, incluyeron 39 nt en el extremo 5' complementarios a secuencias adyacentes al SCO0452, como se indica en la Figura 8. Los 39 nt del oligonucleótido sentido se contaron río arriba del gen a partir del codón de inicio ATG, mientras que los del oligonucleótido antisentido se contaron río abajo a partir del codón de paro TGA. En el extremo 3' de los oligonucleótidos se añadió una secuencia de 19 o 20 nt correspondientes a la secuencia del cassette de resistencia a apramicina del plásmido pIJ773, indicados en rojo en la Tabla 11.

Tabla 11. Características de los oligonucleótidos para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina.

| Oligonucleótidos | REDIRECT Sentido | REDIRECT Antisentido |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Longitud | 58 nt | 59 nt |
| Secuencia | 5'CGCCGGGGACCGCGCGCGTTCC GTACCCTTGCCGCATG ATCCGGG GATCCGTCGACC ^{3'} | 5'AGATTTCCGGTCCCCTGCGCGACG CGGGCTGCCTGGTCA TGTAGGCTG GAGCTGCTTC ^{3'} |
| % GC | 72.88 % | 65.52 % |
| Tm* | 60°C | 65°C |
| Ta* | 55°C | |

Ta, temperatura de alineamiento; Tm, temperatura de fusión. *Valores calculados a partir de las secuencias complementarias al pIJ773 resaltadas en rojo.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por ADN Sintético SAPI DE CV (México). El tamaño del amplicón se determinó sumando los 1369 pb del cassette de apramicina con los 78 nt correspondientes a la región flanqueante del SCO0452, dando un total de 1447 pb (Figura 8).

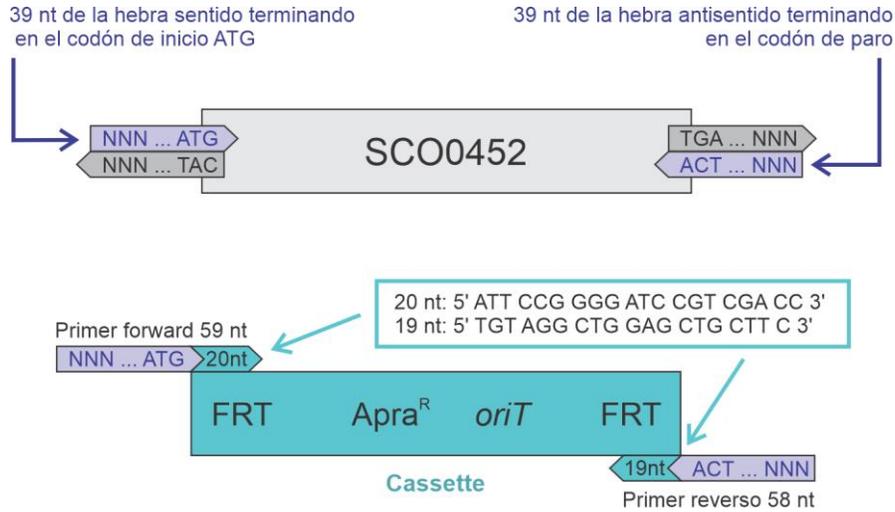


Figura 8. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina. Modificado de Gust *et al.* (2002).

Amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina

La reacción de PCR se preparó por duplicado mezclando 5 μ l de buffer de amplificación Pfx 10X, 1 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 μ l de $MgSO_4$ (50 mM), 1 μ l de DMSO, 1.5 μ l de cada oligonucleótido (10 μ M), 400 ng de plásmido pIJ773, 0.4 μ l de polimerasa Platinum Pfx, se llevó el volumen a 50 μ l con agua grado biología molecular y se corrió con un programa de ciclado térmico basado en el protocolo de Gust *et al.* (2002), indicado en la Tabla 12. El producto se corrió en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X a 100 V por 1 hora. El gel se fotografió en un fotodocumentador y se recortó la banda del peso correspondiente al cassette para purificar el amplicón por el método de congelación y centrifugación descrito anteriormente. Este proceso se repitió 3 veces para extraer la mayor cantidad de ADN de la agarosa.

Tabla 12. Programa de ciclado para la amplificación del cassette extendido de resistencia a apramicina.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 03:00 | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 00:45 | 15 |
| Alineamiento | 50°C | 00:45 | |
| Extensión | 68°C | 01:30 | |
| Desnaturalización | 94°C | 00:45 | 20 |
| Alineamiento | 55°C | 00:45 | |
| Extensión | 68°C | 01:30 | |
| Extensión final | 68°C | 05:00 | 1 |

El ADN del amplicón se precipitó agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto, incubando a -20°C durante 24 horas. Se recuperó el ADN centrifugando a 14000 rpm a 4°C y se realizaron dos lavados con etanol al 70%. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua grado biología molecular. Posteriormente se determinó la concentración usando el NanoDrop.

Secuenciación del cassette extendido de resistencia a apramicina

Se preparó la reacción para secuenciación del cassette por ciclado térmico usando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems). Se mezclaron 4 µl de BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 4 µl del oligonucleótido Cassette-Fw (1 µM), 1 µl de templado y 1 µl de agua grado biología molecular.

La reacción se sometió al programa de secuenciación indicado en la Tabla 3. Posteriormente, se purificó el producto de reacción pasándolo por una columna de Sephadex G50 colocada en un tubo colector y centrifugando a 2700 rpm por 2 minutos. La secuencia fue obtenida por el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología de la UNAM. Posteriormente se realizó un alineamiento con la herramienta BLAST para verificar que el cassette contara con las regiones del SCO0452 y el gen de resistencia a apramicina.

Preparación de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790

Para transformar a *E. coli* BW25113/pIJ790 con el pBSK+::SCO0452, se prepararon células químicamente competentes de esta cepa. En primera instancia, se estrieron las células en LB con cloranfenicol (25 µg/ml) y se incubaron a 30°C toda la noche. Posteriormente se inoculó una colonia aislada en 10 ml de LB con cloranfenicol y se incubó a 30°C en agitación a 200 rpm toda la noche. En seguida, se diluyó el cultivo 1:100 en 100 ml de LB con cloranfenicol (25 µg/ml) y se incubó a 30°C y en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez alcanzada esta densidad, las células se incubaron en hielo durante 10 minutos para luego centrifugarlas a 4000 rpm por 7 minutos a 4°C. Después de decantar el medio, las células se resuspendieron suavemente en 30 ml de solución TFB-1 (Tabla 13) fría y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 ml de solución TFB-II estéril fría (Tabla 14). Esta suspensión se congeló en alícuotas de 100 µl dando un shock térmico por frío con hielo seco en etanol. Las alícuotas de células competentes se almacenaron a -70°C.

Tabla 13. Composición de la solución TFB-I con pH 5.8.

| Componente | g/L |
|-----------------------------|-------|
| Acetato de potasio 30 mM | 2.94 |
| MnCl ₂ 50 mM | 9.88 |
| RbCl 10 mM | 12.08 |
| CaCl ₂ 10 mM | 1.48 |
| Glicerol al 15% | 150 |

Tabla 14. Composición de la solución TFB-II con pH 7.0.

| Componente | g/L |
|-------------------------|------|
| MOPS 10 mM | 2.08 |
| CaCl ₂ 75 mM | 11 |
| RbCl 10 mM | 1.2 |
| Glicerol al 15% | 150 |

Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el pBSK+::SCO0452

Siguiendo el protocolo de transformación por shock térmico ya descrito, se utilizaron 120 ng del pBSK+::SCO0452 para transformar a *E. coli* BW25113/pIJ790 y se sembraron 200 μ l de suspensión celular en una caja de LB con cloranfenicol (25 μ g/ml) y ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 30°C por 24 horas. Las colonias crecidas fueron resembradas e incubadas a 30°C.

Electroporación del cassette de apramicina en *E. coli* BW25113/pIJ790/pBSK+::SCO0452

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* BW25113/pIJ790/pBSK+::SCO0452 en 5 ml de LB con cloranfenicol (25 μ g/ml) y ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó el cultivo a 30°C en agitación a 200 rpm toda la noche. Posteriormente se inocularon 100 μ l del cultivo en 10 ml de medio SOB con cloranfenicol (25 μ g/ml), ampicilina (100 μ g/ml) y L-arabinosa (10 mM) para inducir el sistema λ Red. Se incubó a 30°C en agitación a 200 rpm hasta que alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4. Las células se recuperaron centrifugando a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C, el medio se decantó y se resuspendieron en 10 ml de glicerol al 10% frío. Se repitió la centrifugación y se resuspendió el pellet en 5 ml de glicerol al 10%. Las centrifugaron una tercera vez, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en el glicerol residual (~100 μ l). Se colocaron 50 μ l de esta suspensión celular en un tubo de 1.5 ml, se añadieron 160 ng de cassette y se mezcló suavemente. La mezcla fue transferida a una celda de electroporación previamente enfriada, se introdujo en el electroporador (BioRad, modelo Gene Pulser II) y se activó la descarga eléctrica. Inmediatamente después se añadió 1 ml de LB frío a la suspensión celular y se transfirió a un tubo de 1.5 ml para incubar a 37°C en agitación a 200 rpm durante 1 hora. Después de este tiempo de recuperación, se sembraron 100 μ l en una caja (1) de LB con ampicilina (100 μ g/ml) y apramicina (50 μ g/ml). El resto de la suspensión celular se centrifugó a 13000 rpm por un minuto, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el medio residual para sembrarlo en otra caja (2) de LB con ampicilina y apramicina a las mismas concentraciones. Las cajas se incubaron a 37°C por 16 horas. Las colonias crecidas en la caja 2 fueron resembradas en LB con los mismos antibióticos.

Verificación de la sustitución por PCR

Para confirmar la sustitución del SCO0452 por el cassette de resistencia a apramicina en las colonias transformantes de *E. coli* BW25113 se sintetizó un par de oligonucleótidos que se alinean fuera de la zona afectada por la recombinación, cuya secuencia y características se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Características de los oligonucleótidos para verificación de la sustitución del SCO0452.

| Oligonucleótidos | Sust-SCO0452 Forward | Sust-SCO0452 Reverse |
|------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Longitud | 20 nt | 20 nt |
| Secuencia | ^{5'} GCAGCTCTTCACCGTCAGG T ^{3'} | ^{5'} TCGTGAGGTGCGAGGACTGT 3' |
| % GC | 60 % | 60 % |
| Tm | 63.3°C | 64.3°C |
| Ta | 66°C | |

Ta, temperatura de alineamiento; Tm, temperatura de fusión.

Estos oligonucleótidos se diseñaron para amplificar un producto de 1240 pb usando como templado el plásmido no sustituido, pBSK+::SCO0452, y uno de 1717 pb usando el plásmido sustituido con el cassette de resistencia a apramicina, nombrado pBSKΔSCO0452::aac(3)/V. Se probaron en una reacción de PCR usando el pBSK+::SCO0452 como templado. En esta reacción se agregaron 5 μl de buffer de amplificación *Pfx*, 1 μl de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 μl de MgSO₄ (50 mM), 1 μl de DMSO, 1.5 μl de cada oligonucleótido, 90 ng de templado, 0.4 μl de polimerasa Platinum *Pfx* y se llevó a 50 μl con agua grado biología molecular. Se amplificó el producto usando las condiciones indicadas en la Tabla 16.

Tabla 16. Programa de ciclado para la verificación de la sustitución del SCO0452.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 03:00 | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 00:45 | 30 |
| Alineamiento | 66°C | 00:30 | |
| Extensión | 68°C | 01:30 | |
| Extensión final | 68°C | 05:00 | 1 |

El producto se corrió en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X a 100 V por 1 hora junto con un marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Fisher Scientific). El gel se fotografió en un fotodocumentador,

Se seleccionaron 4 colonias transformantes y se prepararon cultivos de cada una en 5 ml de LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml); se incubaron a 37°C toda la noche. De cada cultivo se tomaron 3 ml para purificar plásmido siguiendo el protocolo del kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System ya descrito. Los plásmidos purificados se cuantificaron y se usaron como templado para las reacciones de PCR, en las cuales se utilizaron las mismas condiciones, pero usando 200 ng de cada plásmido. Como control se preparó una reacción usando el pBSK+::SCO0452 como templado.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X a 100 V por 1 hora, junto con el marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

Adicionalmente, se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia interna del gen de resistencia a apramicina, *aac(3)/IV*, con los cuales se preparó una reacción de PCR usando 5 µl de buffer de amplificación *Pfx*, 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 1 µl de DMSO, 1.5 µl de cada oligonucleótido, 100 ng de pBSKΔSCO0452::*aac(3)/IV*, 0.4 µl de polimerasa Platinum *Pfx* y se llevó a 50 µl con agua grado biología molecular. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Programa de ciclado para la verificación de la presencia del gen de resistencia a apramicina.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 03:00 | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 00:45 | 30 |
| Alineamiento | 56°C | 00:30 | |
| Extensión | 68°C | 00:30 | |
| Extensión final | 68°C | 05:00 | 1 |

El producto se corrió en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Vivantis, VC 100 bp Plus DNA Ladder). El gel se corrió a 100 V por 1 hora.

Transferencia del plásmido pBSKΔSCO0452::aac(3)/V a *Streptomyces coelicolor* por conjugación con *E. coli* ET12567/pUZ8002

Las células competentes de la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 se prepararon siguiendo la misma metodología usada para la cepa BW25113/pIJ790.

Por medio de shock térmico se transformaron 200 ng del plásmido sustituido pBSKΔSCO0452::aac(3)/V en *E. coli* ET12567/pUZ8002. Las células transformantes fueron seleccionadas sembrando 200 µl en cajas conteniendo agar LB con ampicilina (100 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml), incubando a 37°C por 24 horas. Cuatro colonias transformantes fueron seleccionadas y resembradas en LB con apramicina (50 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C.

Posteriormente se preparó un cultivo líquido de *E. coli* ET12567/pUZ8002/pBSKΔSCO0452::aac(3)/V en 10 ml de LB con apramicina, cloranfenicol y kanamicina en las concentraciones indicadas previamente. El cultivo se incubó toda la noche a 37°C. Se inocularon 100 µl de este cultivo en 10 ml de LB con los mismos antibióticos y se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.4. Las células se centrifugaron a 4000 rpm por 7 minutos y se lavaron con 10 ml de LB para remover los antibióticos; este proceso se realizó dos veces. Después se resuspendieron en 1 ml de LB.

A partir de un cultivo de *Streptomyces coelicolor* en agar MS se obtuvieron 10⁸ esporas que fueron resuspendidas en 1.5 ml de medio 2xYT, se tomaron 100 µl y se diluyeron en 500 µl de medio 2xYT. A esta suspensión de esporas se le dio un shock térmico a 50°C por 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Después del shock térmico se mezclaron 500 µl de suspensión de *E. coli* y 500 µl de esporas, la mezcla se centrifugó brevemente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en el medio residual del tubo. A partir de esta mezcla se prepararon diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ con agua estéril, en un volumen total de 100 µl. Cada dilución fue sembrada en agar MS con MgCl₂ 10 mM y se incubó a 30°C. Después de 16 horas se añadió 0.5 mg de ácido nalidíxico y 1.25 mg de apramicina en cada caja y se continuó la incubación. Las colonias exconjugantes que crecieron y esporularon fueron resembradas en agar MS con apramicina (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (25 µg/ml), se incubaron a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a 4°C.

Resultados y discusión

La técnica del REDIRECT desarrollada por Gust *et al.* (2002) para la sustitución y delección de genes en *Streptomyces coelicolor* utiliza los cósmidos generados para la secuenciación del genoma, sin embargo, el cósmido que contenía al gen SCO0452 no se logró conseguir por lo que se decidió clonar un fragmento de ADN que contenía a este gen flanqueado por casi mil pares de bases de cada lado que permitieran la doble recombinación. Por lo tanto, se diseñó un par de oligonucleótidos (Material y Métodos) con los sitios de restricción para *Bam*HI y *Eco*RI para su posterior clonación en el plásmido pBlueScript SK+.

Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar un fragmento de ADN a partir del ADN cromosomal de *S. coelicolor* y en la curva de temperatura realizada para amplificar el fragmento del SCO0452 con regiones flanqueantes se observó una banda en el peso esperado de 2634 pb en todos los carriles correspondientes a cada temperatura del gradiente (Figura 9). Debido a que se amplificó una gran cantidad de producto, se procedió a recortar la banda de cada carril para purificar el producto y secuenciarlo.

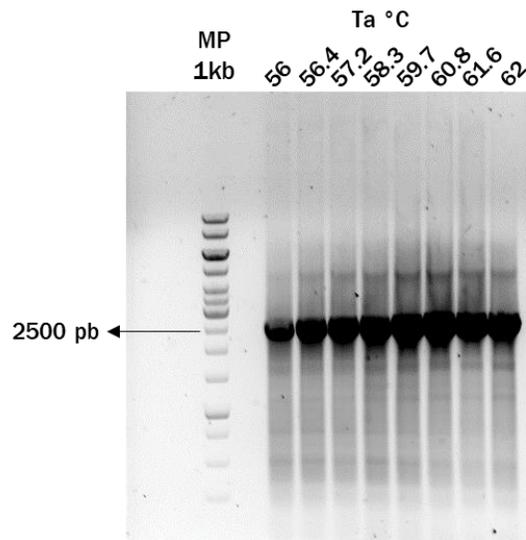
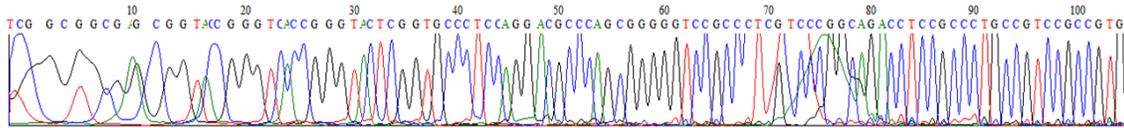


Figura 9. Electroforesis de los productos de la amplificación del fragmento del SCO0452 con un gradiente de temperatura de alineamiento (Ta°C).

La lectura de los nucleótidos arrojados por la secuencia en el electroferograma (Figura 10A) y la búsqueda de dichas secuencias con el programa BLAST (NCBI; Figura 10B) confirmó que el fragmento contenía al SCO0451 y al SCO0452 (Figura 11). Dado que sólo se secuenció por un extremo del amplicón usando el oligonucleótido sentido, no fue posible

secuenciar al SCO0453, sin embargo, considerando el peso molecular del producto se puede asumir que está también contenido en el mismo.

A



B

| Sequences producing significant alignments | | Download | Manage Columns | Show | 100 | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|--------------------------|------------|----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> select all 1 sequences selected | | GenBank | Graphics | Distance tree of results | | |
| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor A3(2) strain CFB_NBC_0001 chromosome, complete genome | 1914 | 1914 | 99% | 0.0 | 97.13% | CP042324.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome, segment 2/29 | 1914 | 1914 | 99% | 0.0 | 97.13% | AL939105.1 |

Figura 10. Secuenciación y alineamiento del amplicón SCO0452.
 (A) Electroferograma parcial del amplicón. (B) Resultados del alineamiento por BLAST.

| FEATURES | Location/Qualifiers |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| source | 1..1127 /organism="Streptomyces coelicolor A3(2)" /mol_type="genomic DNA" /serovar="A3(2)" /db_xref="taxon:300226" |
| gene | complement(<1..607) /gene="SCO0451" |
| CDS | /gene_synonym="SCF51A.29c" complement(<1..607) /gene="SCO0451" /gene_synonym="SCF51A.29c" /note="SCF51A.29c, unknown, len: 284 aa. Similar to the C-terminus of many hypothetical proteins e.g. Mycobacterium tuberculosis SW:Y075_MYCTU (EMBL; 275555) hypothetical 69.5 KD protein CY02BI0.28C (653 aa), fasta scores opt: 390 z-score: 451.1 E(): 9.1e-18 33.5% identity in 263 aa overlap. In addition to Bacillus subtilis SW:RSBU_BACSU (EMBL; L35574) sigma factor SibG regulation protein RsbU (335 aa), fasta scores opt: 206 z-score: 243.6 E(): 3.3e-06 24.3% identity in 185 aa overlap." /codon_start=1 /transl_table=11 /product="conserved hypothetical protein SCF51A.29c" /protein_id="CA856681.1" /db_xref="GDA:Q9RL36" /db_xref="InterPro:IPR001932" /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q9RL36" /translation="MFRKRPAPDGEELLARLASLTTRAKELAE LRRSQVELAIALQRDMLPADLPVPGIHLAACYSPAYAGLVGGDWDYAFALPDGRIGLSVGDVQGHAIIDAAA FMGQVRVGLRALASVTSEPGDLLACTNELLNLDKLFATCFMRYDPATGLLESARA GHIPCVRATADGRAEVCRDGGPPLVGLVLEGT EYPVTRYRLATGGVFLVLDGVEGSP LSVDEGLDRVRLASLAAAVGMEADLAAAVLKNAELIGHEDDAAVLVVGHDRGATRGLARGVTP" |
| regulatory | complement(614..617) /regulatory_class="ribosome_binding_site" |
| gene | 813..>1127 /gene="SCO0452" |
| CDS | /gene_synonym="SCF51A.30" 813..>1127 /gene="SCO0452" /gene_synonym="SCF51A.30" /note="SCF51A.30, possible SIR2-like regulatory protein," |

Figura 11. Información de la secuencia del amplicón SCO0452.
 En los elementos de la secuencia se encuentran el SCO0451 y el SCO0452 pertenecientes a *Streptomyces coelicolor*.

El fragmento obtenido de la PCR fue digerido con *EcoRI* y *BamHI* para insertarlo en los sitios del plásmido pBluescript SK+, generando así el plásmido pBSK+::SCO0452 de 5556 pb (Figura 12).

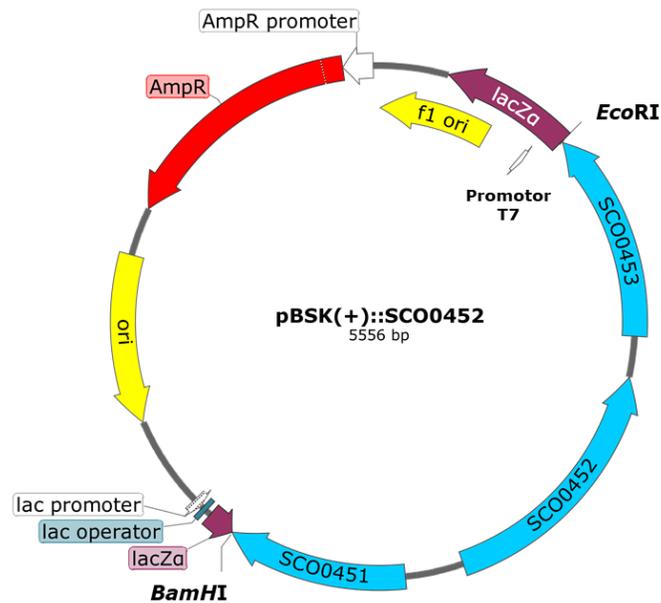


Figura 12. Mapa del plásmido pBSK+::SCO0452.

La mezcla de ligación del plásmido con el inserto se transformó en *E. coli* TOP10F' y se seleccionaron las clonas positivas usando la técnica de cribado de colonias azules y blancas. Esta técnica se basa en la utilización de una cepa que codifica una β -galactosidasa inducible que carece de una secuencia llamada péptido α , por lo cual no es funcional. Al proveer esta secuencia en trans, como es el caso con un plásmido, se complementa la β -galactosidasa lo cual permite la metabolización de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) que da como producto galactosa y el pigmento azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Cuando se inserta una secuencia en el sitio de clonación múltiple del plásmido, el péptido α es interrumpido y no puede complementar a la β -galactosidasa, por lo tanto, las colonias no metabolizan el X-Gal y permanecen blancas, esta diferencia de color permite distinguir las clonas positivas (Green y Sambrook, 2012). Al sembrar la cepa de *E. coli* transformada con el producto de ligación crecieron pocas clonas positivas en comparación con las negativas (Figura 13), esto pudo deberse a una digestión incompleta del plásmido por alguna de las dos enzimas y su consecuente religación sin el inserto.

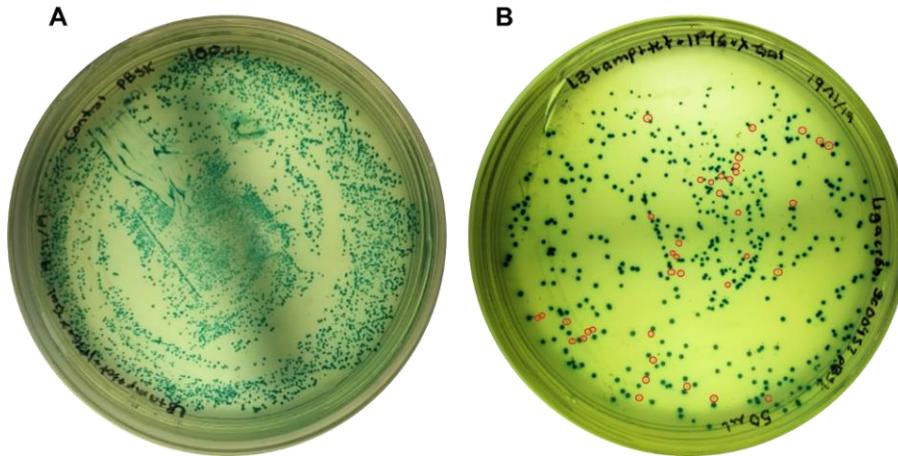


Figura 13. Colonias obtenidas después de la transformación con la mezcla de la ligación.

A) Control: *E. coli* TOP10F' transformada con pBluescript SK+, B) *E. coli* TOP10F' transformada con el producto de la ligación. Las clonas positivas blancas están señaladas por los círculos rojos.

Con algunas colonias blancas seleccionadas se realizó un ensayo de lisis de colonias en gel. Este consiste en lisar las células directamente en un gel de agarosa desnaturalizante y observar la migración de los plásmidos para determinar cuáles tienen inserto en comparación con un control sin inserto (pBluescript SK+). De las 12 colonias analizadas se seleccionaron las 4 que presentaban una banda visible en un peso mayor al del control debido a que el inserto de 2.6 kb se ligó en el plásmido de 2.9 kb (Figura 14).

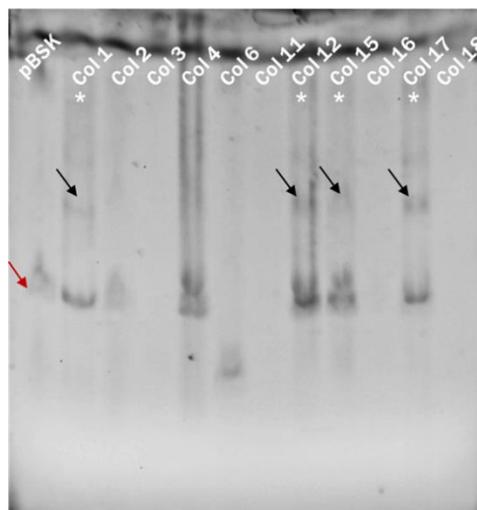


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de colonias lisadas.

El primer carril corresponde a la colonia con el pBSK+ (flecha roja, 2.9 Kb); los carriles marcados con asterisco corresponden a las colonias que presentaron plásmidos con inserto (flechas negras, 5.5 Kb).

Con el fin de confirmar el tamaño de los insertos a partir de estas 4 colonias se purificaron los plásmidos para realizar digestiones dobles con *Bam*HI y *Eco*RI, y sencillas con *Bam*HI. Al analizar los productos de la digestión se observó el plásmido linealizado, resultado de la digestión sencilla, con un peso de casi 6000 pb, mientras que en los productos de la digestión doble fue posible diferenciar las dos bandas de cerca de 3000 pb, correspondientes al esqueleto del plásmido (2940 pb) y al inserto (2616 pb) respectivamente (Figura 15).

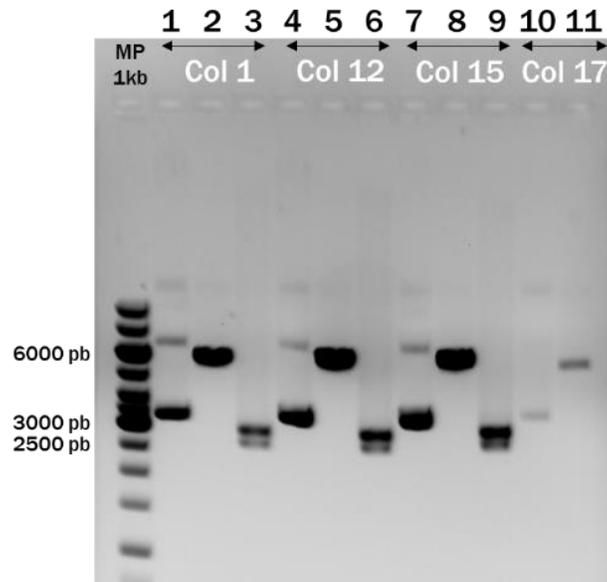


Figura 15. Electroforesis de los productos de la digestión de los plásmidos purificados.

Carriles 1, 4, 7, 10: plásmidos sin digerir. Carriles 2, 5, 8, 11: plásmidos digeridos con *Bam*HI. Carriles 3, 6, 9: plásmidos digeridos con *Bam*HI y *Eco*RI.

En los carriles de las colonias 1, 12, 15 y 17 se presentaron las dos bandas correspondientes al plásmido linealizado y al inserto, por lo que se escogió la colonia 12 para purificar el plásmido y secuenciarlo para corroborar que realmente el inserto correspondía al SCO0452 extendido.

La secuenciación del plásmido pBSK+::SCO0452 (Figura 16A) permitió detectar parte del SCO0453 (Figura 17) ya que se utilizó el oligonucleótido del promotor T7, ubicado en el extremo donde se encuentra el sitio de restricción para *Eco*RI (Figura 12), con lo cual se confirmó la clonación del fragmento amplificado por PCR.

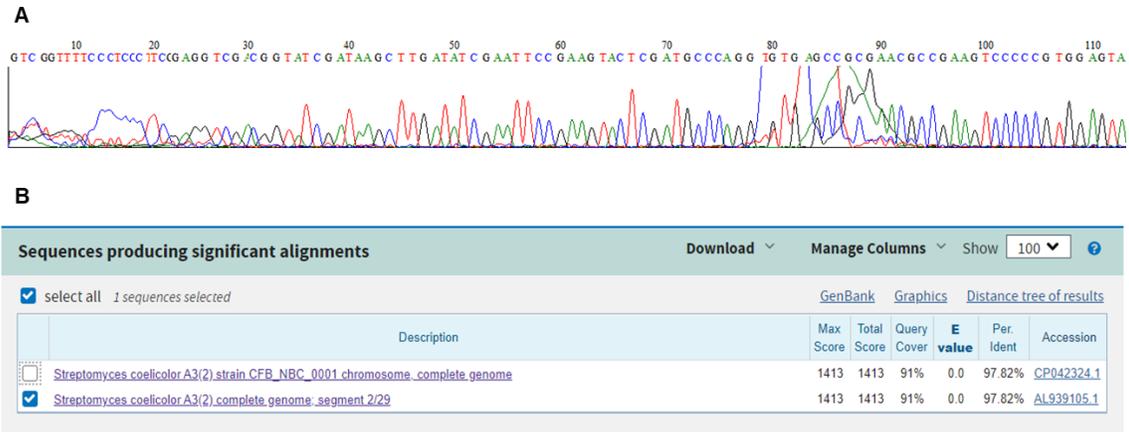


Figura 16. Secuenciación y alineamiento del plásmido pBSK+::SCO0452.
 (A) Electroferograma parcial de la secuencia del plásmido. (B) Resultados del alineamiento por BLAST.

```

source      1..815
            /organism="Streptomyces coelicolor A3(2)"
            /mol_type="genomic DNA"
            /serovar="A3(2)"
            /db_xref="taxon:100226"
regulatory  70..73
            /regulatory_class="ribosome_binding_site"
gene        83..>815
            /gene="SCO0453"
            /gene_synonym="SCF51A.31"
CDS         83..>815
            /gene="SCO0453"
            /gene_synonym="SCF51A.31"
            /note="SCF51A.31, probable secreted solute-binding
lipoprotein, len: 429 aa. Weakly similar to many putative
solute-binding proteins e.g. Bacillus subtilis
SW:YURO_BACSU (EMBL; Z99120) hypothetical ABC transporter
extracellular binding protein YurO (422 aa), fasta scores
opt: 235 z-score: 270.1 E(): 1.1e-07 19.9% identity in 422
aa overlap. Contains a Pfam match to entry PF01547
SBP_bacterial_1, an appropriately positioned Prosite hit
to PS00013, a prokaryotic membrane lipoprotein lipid
attachment site and also contains a possible N-terminal
signal sequence."
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="probable secreted solute-binding lipoprotein."
  
```

Figura 17. Información de la secuencia del pBSK+::SCO0452.
 En los elementos de la secuencia se encuentra el SCO453 de *S. coelicolor*

El método REDIRECT (Gust *et al.* 2002) también requiere del diseño de un par de oligonucleótidos para amplificar un cassette de interrupción con un gen de resistencia a un antibiótico y extensiones homólogas a la secuencia adyacente al gen que se va a deletar. Para este trabajo se seleccionó el cassette de resistencia a apramicina contenido en el plásmido pIJ773. El cassette se amplificó usando oligonucleótidos con extensiones homólogas al SCO0452 de 39 nucleótidos en el extremo 5', mientras que en el extremo 3' ubicaron los nucleótidos complementarios al cassette en el pIJ773. El diseño de estos oligonucleótidos se aprecia en la Figura 8. La incorporación de las extensiones homólogas en los oligonucleótidos dio como resultado la amplificación de un cassette extendido de 1447 pb (Figura 18). Este producto se purificó y se secuenció para corroborar la presencia

del gen de resistencia a apramicina por medio de un alineamiento BLAST (Figura 19; Figura 20).

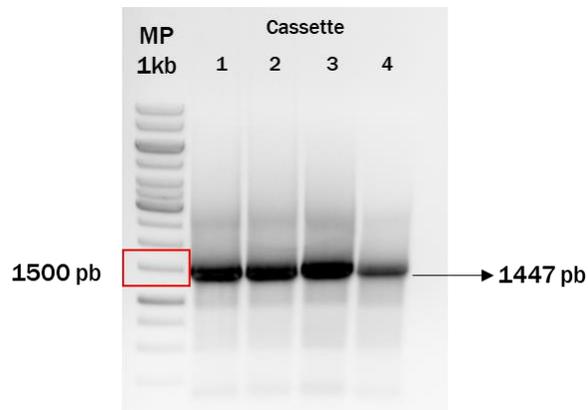
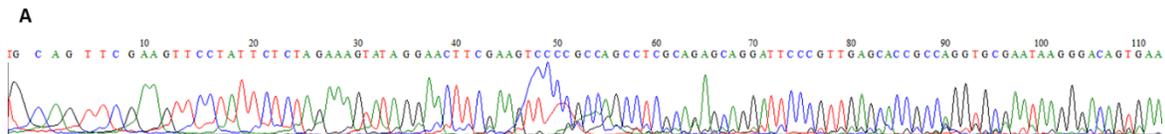


Figura 18. Electroforesis de los productos de la amplificación del cassette extendido. Los carriles 1-4 corresponden a los productos de las cuatro reacciones en las preparadas para amplificar el cassette.



B

Sequences producing significant alignments

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Cloning vector pJF361 levansucrase (sacB) and apramycin resistance (aac(3)iv) genes complete cds | 1912 | 1985 | 99% | 0.0 | 96.73% | DQ095874.1 |
| <input type="checkbox"/> Streptomyces olivaceus strain SCSIO T05 lobophorin biosynthetic gene cluster complete sequence | 1901 | 1974 | 99% | 0.0 | 96.56% | MN396889.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Cloning vector pAB707 complete sequence | 1901 | 1974 | 99% | 0.0 | 96.56% | JN005928.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Cloning vector pJ12742 complete sequence | 1825 | 1825 | 95% | 0.0 | 96.51% | KU523903.1 |

Figura 19. Secuenciación y alineamiento del cassette extendido de resistencia a apramicina. A) Electroferograma parcial del cassette. B) Resultados del alineamiento de la secuencia del cassette por BLAST.

```

ACCESSION DQ095874 REGION: 2544..3680
VERSION DQ095874.1
KEYWORDS .
SOURCE Cloning vector pJF361
ORGANISM Cloning_vector_pJF361
          other sequences; artificial sequences; vectors.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1137)
AUTHORS Liu,J., He,Q. and Chen,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JUN-2005) Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural
          University, Shizishan Street, Wuhan, Hubei 430070, China
FEATURES             location/Qualifiers
   source             1..1137
                     /organism="Cloning vector pJF361"
                     /mol_type="other DNA"
                     /db_xref="taxon:335384"
                     /lab_host="Actinobacillus pleuropneumoniae"
   gene               complement(<1..637)
                     /gene="aac(3)iv"
   CDS                complement(<1..637)
                     /gene="aac(3)iv"
                     /note="used to screen for mutant of Actinobacillus
                     pleuropneumoniae"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="apramycin resistance"
                     /protein_id="AAZ04376.1"

```

Figura 20. Información de la secuencia del cassette de resistencia a apramicina. En los elementos de la secuencia se encuentra el gen *aac(3)IV* que confiere la resistencia a apramicina.

Posteriormente hay que eliminar el gen de elección, en este caso el SCO0452 en el cósmido o plásmido donde está clonado. Por lo tanto, el pBSK+::SCO0452 se transformó en *E. coli* BW25113/pIJ790 (Figura 21) primero para llevar a cabo la recombinación por medio del sistema λ -RED con el cassette de sustitución que después fue electroporado en esta misma cepa (Figura 22).

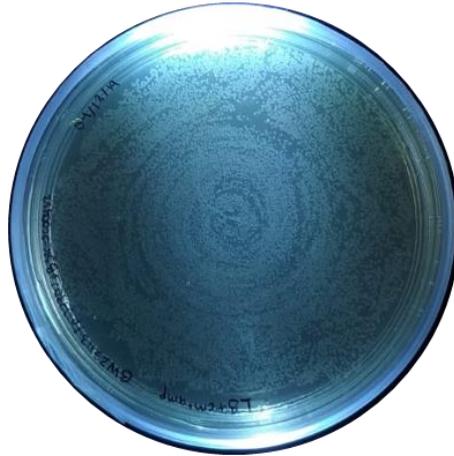


Figura 21. Colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790 obtenidas después de la transformación con el pBSK+::SCO0452.

El plásmido pIJ790 contiene los genes que codifican las proteínas Gam, Beta y Exo del sistema de recombinación derivado del bacteriófago λ . Gam previene que las nucleasas endógenas digieran el ADN lineal introducido a *E. coli*. Exo es una exonucleasa 5'→3' dependiente de ADN de doble cadena que degrada el ADN lineal para producir una molécula de doble cadena con extremos 3' de cadena sencilla. Por su parte, Beta protege el ADN de cadena sencilla producido por Exo y promueve su alineamiento con la cadena complementaria objetivo en la célula (Thomason *et al.* 2014). La expresión de los genes λ Red a partir del plásmido pIJ790 se lleva a cabo con el promotor lac, que es inducible con IPTG. Así es como el sistema λ Red permite la recombinación entre el cassette de resistencia a apramicina con extremos complementarios al SCO0452 y el gen clonado en el pBSK+::SCO0452.

Como puede observarse en la Figura 22, la cantidad de colonias obtenidas después de la electroporación del cassette disminuye en comparación con las transformantes obtenidas en el paso anterior dado que no en todas las clonas se lleva a cabo la sustitución. Además, las colonias resultantes tienen tamaños heterogéneos, ya que tanto el plásmido sustituido como el no sustituido pueden coexistir en una clona; una copia del plásmido con el cassette

es suficiente para conferir resistencia a apramicina, no obstante, mientras mayor sea la proporción de plásmidos sustituidos con el cassette, mayor será el tamaño de la colonia (Gust *et al.*, 2004). Bajo este criterio, se seleccionaron las colonias de mayor tamaño para purificar el plásmido.

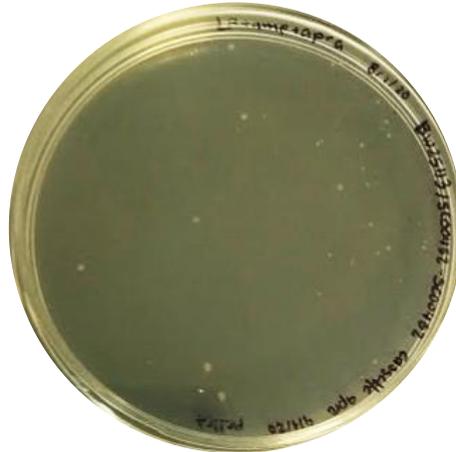


Figura 22. Colonias de *E. coli* BW25113/pBSKΔSCO0452::*aac(3)/V*.

La sustitución del SCO0452 se confirmó por PCR utilizando oligonucleótidos que se alinean fuera de la región de recombinación. Se determinó que el producto esperado, usando el pBSK+::SCO0452 como templado, era de 1240 pb (Figura 23A). Usando el pBSKΔSCO0452::*aac(3)/V* como templado el producto esperado era de 1715 pb (Figura 23B), debido a que el cassette de sustitución con el gen de resistencia a apramicina y el *oriT* tiene un tamaño de 1447 pb, mayor que el SCO0452.

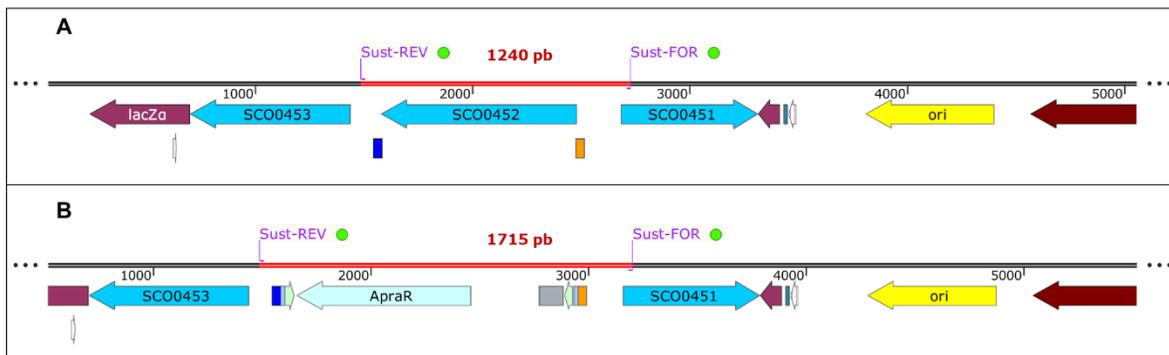


Figura 23. Mapa lineal de los plásmidos pBSK+::SCO0452 (A) y pBSKΔSCO0452::*aac(3)/V* (B).

Los oligonucleótidos para la verificación de la sustitución (Sust-FOR y Sust-REV) se alinean fuera de la zona de recombinación (señalada con un rectángulo azul y uno naranja).

Al realizar la electroforesis en agarosa de los productos de PCR con los plásmidos purificados de diferentes colonias transformantes se observó la banda correspondiente al amplicón de 1715 pb y también al de 1240 pb (Figura 24), lo cual ocurre debido a que, como se mencionó anteriormente, en una transformante pueden permanecer copias del plásmido sin sustitución, que en este caso es el pBSK+::SCO0452.

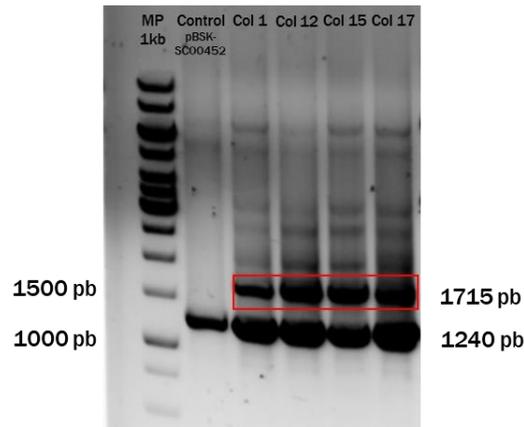


Figura 24. Verificación de la sustitución del SCO0452.
El fragmento generado después de la sustitución con el cassette de resistencia a apramicina está indicado en el rectángulo rojo.

Adicionalmente se utilizaron oligonucleótidos internos a la región de recombinación (Figura 25) para amplificar un fragmento del gen de resistencia a apramicina, *aac(3)/IV*, de 381 pb (Figura 26).

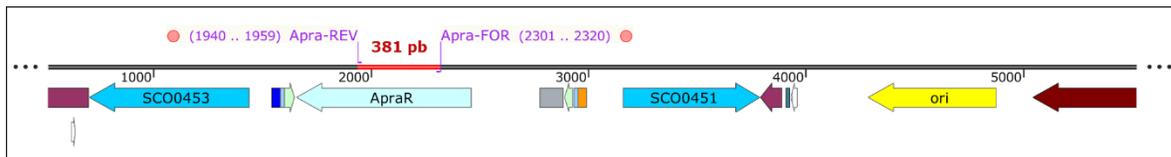


Figura 25. Ubicación de los oligonucleótidos internos para la amplificación de un fragmento del gen de resistencia a apramicina en el plásmido pBSKΔSCO0452::*aac(3)/IV*.
Los oligonucleótidos Apra-FOR y Apra-REV se alinean en una región interna del gen de resistencia a apramicina para amplificar un producto de 381 pb (línea roja).

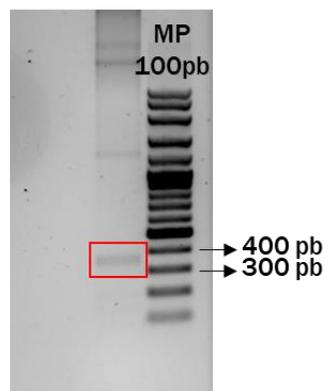


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación por PCR de un fragmento del gen de resistencia a apramicina (rectángulo rojo) en una transformante de *E. coli* BW25113/pBSKΔSCO0452::*aac(3)/IV* positiva.

Debido a que *S. coelicolor* M145 presenta un sistema de modificación/restricción, todo aquel ADN heterólogo metilado que entre a su citoplasma sería digerido, por lo tanto, el plásmido que se conjuga no debe estar metilado, para lo cual tiene que ser transformado en una cepa que no lleve a cabo este cambio como la *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta cepa tiene un fondo genético deficiente de metilación y contiene el plásmido no transmisible pUZ8002 que permite la movilización en trans del pBSK Δ SCO0452::*aac(3)IV*, que contiene el cassette de sustitución y el *oriT*. Por ello, el plásmido pBSK Δ SCO0452::*aac(3)IV* purificado se transformó en *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Figura 27) para realizar la conjugación con *S. coelicolor*.



Figura 27. Colonias de *E. coli* ET12567/pUZ8002 obtenidas después de la transformación con pBSK Δ SCO0452::*aac(3)IV*.

Las transformantes se seleccionaron en LB con ampicilina (100 mg/ml) y apramicina (50 mg/ml).

Los exconjugantes de *S. coelicolor* se seleccionaron en cajas con medio MS con MgCl₂ y apramicina y a las 16 horas se les agregó ácido nalidixico para eliminar a la *E. coli* (Figura 28).



Figura 28. Exconjugantes Δ SCO0452 de *S. coelicolor* crecidas en medio MS con apramicina.

Tras la transferencia del plásmido a *S. coelicolor* en algunas exconjugantes se lleva a cabo la doble recombinación entre las extensiones homólogas del cassette y las regiones flanqueantes del SCO0452 en el cromosoma, así el gen es reemplazado por el cassette; estas mutantes son resistentes a apramicina y sensibles a ampicilina ya que el plásmido se pierde. Es posible también que en algunas otras exconjugantes ocurra un evento de recombinación sencilla en el que el plásmido pBSK Δ SCO0452::aac(3)/V completo es integrado en el cromosoma, confiriendo resistencia a apramicina y a ampicilina.

La frecuencia con que se obtienen exconjugantes con doble recombinación depende del tamaño de las regiones flanqueantes del gen en el plásmido, se recomienda que sean mayores a 1 Kb pero es posible obtener dobles recombinantes con regiones de menor tamaño. Si el gen no es esencial bajo las condiciones de crecimiento establecidas, la frecuencia puede variar entre 5-70% (Gust *et al.*, 2004).

La cepa silvestre de *S. coelicolor* y una de las exconjugantes Δ SCO0452 se sembraron en medio MS sin y con apramicina (Figura 29) para comprobar que la cepa mutante puede crecer en presencia del antibiótico, lo cual implica que se llevó a cabo al menos un evento de recombinación homóloga. Además, el crecimiento y el fenotipo de la mutante indicarían que el gen SCO0452 no es esencial para *S. coelicolor*.

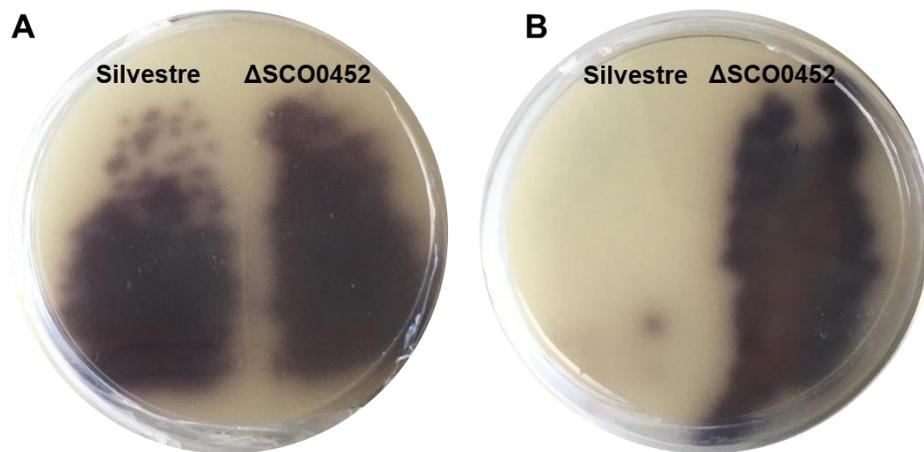


Figura 29. Cepas de *Streptomyces coelicolor* crecidas en medio MS sin (A) y con (B) apramicina.

Para aislar las mutantes con doble recombinación será necesario sembrar colonias aisladas en medio con y sin ampicilina e identificar las que son sensibles a este antibiótico. Se podrá verificar la sustitución del SCO0452 cromosómico por el cassette de resistencia a

apramicina mediante PCR con los oligonucleótidos que se alinean por fuera del gen como se llevó a cabo en el plásmido pBSK Δ SCO0452::aac(3)IV.

La manipulación genética de *S. coelicolor* ha sido facilitada por el desarrollo del método REDIRECT, el cual se ha usado extensivamente para generar mutantes basándose en la delección de genes en cósmidos que subsecuentemente recombinan con el cromosoma (Ditkowski *et al.*, 2013; Duong *et al.*, 2012; Gust *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2020; Pérez-Redondo *et al.*, 2012; Takahashi-Íñiguez *et al.*, 2018), sin embargo, el uso de estos puede conllevar dificultades ya que no solo contienen los genes de interés, sino insertos mucho más grandes. Munnoch *et al.*, (2016) identificaron que el uso de cósmidos para generar delecciones en *S. coelicolor* puede ocasionar inestabilidad cromosómica debido a que la expresión transitoria de los genes duplicados en el cósmido puede causar mutaciones secundarias no deseadas, asimismo, constataron que este problema puede evitarse utilizando un vector que no afecte o duplique otros genes. El uso de un plásmido que solo contiene el gen de interés ofrece la ventaja de tener un menor tamaño, lo que facilita su manejabilidad, aunado a esto, se evita la posibilidad de que la presencia de otros genes ocasione efectos no deseados en el genoma. En este trabajo fue posible deletar un gen de *S. coelicolor* clonado en un plásmido junto con regiones flanqueantes de casi 1 Kb mediante la recombinación homóloga con un cassette de resistencia a apramicina mediada por el sistema λ Red.

Conclusiones

- El gen SCO0452 junto con una región de 834 pb río arriba y 876 pb río abajo fue clonado en el plásmido pBluescript SK+.
- La técnica basada en el sistema λ Red permitió la recombinación homóloga entre el SCO0452 en el plásmido y el cassette de resistencia a apramicina en *E. coli* BW25113/pIJ790.
- El plásmido pBSK Δ SCO0452::*aac(3)IV* fue transferido a *S. coelicolor* por medio de conjugación con *E. coli* ET12567/pUZ8002 deficiente de metilación.
- Fue posible aislar colonias de *S. coelicolor* con resistencia a apramicina.

Perspectivas

Para comprobar la recombinación doble entre el plásmido sustituido y el cromosoma de *S. coelicolor* se deben seleccionar las colonias resistentes a apramicina y sensibles a ampicilina. Posteriormente es necesario purificar el ADN de una de estas exconjugantes para realizar una PCR con los oligonucleótidos diseñados para amplificar desde el exterior del SCO0452, con el fin demostrar que el producto de amplificación da el tamaño correspondiente al gen de resistencia a apramicina, debido a la sustitución en el cromosoma de *S. coelicolor*.

También, en caso de comprobarse la delección del SCO0452, será pertinente obtener el perfil de proteínas acetiladas en la mutante Δ SCO0452 crecida en glucosa y amonio, para compararlo con el de la cepa silvestre obtenido anteriormente; esto permitiría establecer si la delección de CobB1 provoca que no haya desacetilación de las proteínas ya acetiladas.

Referencias

- Abouelfetouh, A., Kuhn, M. L., Hu, L. I., Scholle, M. D., Sorensen, D. J., Sahu, A. K., ... Wolfe, A. J. (2015). The E. coli sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 66–83. <https://doi.org/10.1002/mbo3.223>
- Amin, R., Franz-Wachtel, M., Tiffert, Y., Heberer, M., Meko, M., Ahmed, Y., ... Bera, A. (2016). Post-translational serine/threonine phosphorylation and lysine acetylation: A novel regulatory aspect of the global nitrogen response regulator GlnR in *S. coelicolor* M145. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00038>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Bibb, M. J., Ward, J. M., & Hopwood, D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, 274(5669), 398–400. <https://doi.org/10.1038/274398a0>
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Nagaraja Rao, R., & Schonher, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90627-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90627-2)
- Cain, J. A., Solis, N., & Cordwell, S. J. (2014, January 31). Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.012>
- Carabetta, V. J., & Cristea, I. M. (2017). Regulation, function, and detection of protein acetylation in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 199(16), e00107-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00107-17>
- Castaño-Cerezo, S., Bernal, V., Post, H., Fuhrer, T., Cappadona, S., Sánchez-Díaz, N. C., ... Cánovas, M. (2014). Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 10(11), 762.

<https://doi.org/10.15252/msb.20145227>

- Challis, G. L. (2014). Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 219–232. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1383-2>
- Chandra, G., & Chater, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12047>
- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9534.1>
- Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E., & Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 536–550. <https://doi.org/10.1038/nrm3841>
- Čihák, M., Kameník, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofroňová, O., ... Bobek, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 2495. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02495>
- Colak, G., Xie, Z., Zhu, A. Y., Dai, L., Lu, Z., Zhang, Y., ... Tan, M. (2013). Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), 3509–3520. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031567>
- Crosby, H. A., Heiniger, E. K., Harwood, C. S., & Escalante-Semerena, J. C. (2010). Reversible N ϵ -lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodospseudomonas palustris*. *Molecular Microbiology*, 76(4), 874–888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07127.x>
- Dai, L., Peng, C., Montellier, E., Lu, Z., Chen, Y., Ishii, H., ... Zhao, Y. (2014). Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nature Chemical Biology*, 10(5), 365–370. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1497>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6620–6625. <https://doi.org/10.1073/pnas.120000097>

Sciences, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/PNAS.120163297>

Ditkowski, B., Holmes, N., Rydzak, J., Donczew, M., Bezulska, M., Ginda, K., ... Jakimowicz, D. (2013). Dynamic interplay of ParA with the polarity protein, Scy, coordinates the growth with chromosome segregation in *Streptomyces coelicolor*. *Open Biology*, 3(3), 130006. <https://doi.org/10.1098/rsob.130006>

Duong, A., Capstick, D. S., Di Berardo, C., Findlay, K. C., Hesketh, A., Hong, H.-J., & Elliot, M. A. (2012). Aerial development in *Streptomyces coelicolor* requires sortase activity. *Molecular Microbiology*, 83(5), 992–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07983.x>

Gardner, J. G., & Escalante-Semerena, J. C. (2009). In *Bacillus subtilis*, the sirtuin protein deacetylase, encoded by the srtN gene (formerly yhdZ), and functions encoded by the acuABC genes control the activity of acetyl coenzyme a synthetase. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1749–1755. <https://doi.org/10.1128/JB.01674-08>

Gomez-Escribano, J. P., & Bibb, M. J. (2011). Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: a laboratory manual (4th Edition)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1541–1546.

Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C. J., & Chater, K. F. (2004). λ Red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 107–128. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54004-2)

Gust, B., Kieser, T., & Chater, K. (2002). *REDIRECT technology: PCR targeting in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Norwich: John Innes Centre.

Heinemann, M., & Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.005>

Hentchel, K. L., & Escalante-Semerena, J. C. (2015). Acylation of Biomolecules in

- Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 79(3), 321–346. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-15>
- Hirschey, M. D., & Zhao, Y. (2015). Metabolic regulation by lysine malonylation, succinylation, and glutarylation. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(9), 2308–2315. <https://doi.org/10.1074/mcp.R114.046664>
- Hoff, G., Bertrand, C., Piotrowski, E., Thibessard, A., & Leblond, P. (2017). Implication of RuvABC and RecG in homologous recombination in *Streptomyces ambofaciens*. *Research in Microbiology*, 168(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.003>
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Ishigaki, Y., Akanuma, G., Yoshida, M., Horinouchi, S., Kosono, S., & Ohnishi, Y. (2017). Protein acetylation involved in streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Journal of Proteomics*, 155, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2016.12.006>
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., & Chater, K. F. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Kosono, S., Tamura, M., Suzuki, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Nishiyama, M., & Yoshida, M. (2015). Changes in the Acetylome and Succinylome of *Bacillus subtilis* in Response to Carbon Source. *PLOS ONE*, 10(6), e0131169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131169>
- Kuhn, M. L., Zemaitaitis, B., Hu, L. I., Sahu, A., Sorensen, D., Minasov, G., ... Wolfe, A. J. (2014). Structural, Kinetic and Proteomic Characterization of Acetyl Phosphate-Dependent Bacterial Protein Acetylation. *PLoS ONE*, 9(4), e94816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094816>
- Li, P., Zhang, H., Zhao, G.-P., & Zhao, W. (2020). Deacetylation enhances ParB-DNA interactions affecting chromosome segregation in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research*, 48(9), 4902–4914. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa245>
- Li, R., Gu, J., Chen, Y. Y., Xiao, C. Le, Wang, L. W., Zhang, Z. P., ... Zhang, X. E. (2010). CobB regulates *Escherichia coli* chemotaxis by deacetylating the response regulator CheY. *Molecular Microbiology*, 76(5), 1162–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Liao, G., Xie, L., Li, X., Cheng, Z., & Xie, J. (2014). Unexpected extensive lysine acetylation in the trump-card antibiotic producer *Streptomyces roseosporus* revealed by proteome-wide profiling. *Journal of Proteomics*, 106, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.017>
- Lima, B. P., Antelmann, H., Gronau, K., Chi, B. K., Becher, D., Brinsmade, S. R., & Wolfe, A. J. (2011). Involvement of protein acetylation in glucose-induced transcription of a stress-responsive promoter. *Molecular Microbiology*, 81(5), 1190–1204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07742.x>
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112–143. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00054-12>
- Llamas-Ramírez, R., Takahashi-Iñiguez, T., & Flores, M. E. (2020). The phosphoenolpyruvate-pyruvate-oxaloacetate node genes and enzymes in *Streptomyces coelicolor* M-145. *International Microbiology*, 23(3), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00116-x>
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., & De la Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x>
- Mikulik, K., Felsberg, J., Kudrnáčová, E., Bezoušková, S., Šetinová, D., Stodůlková, E., ... Zídek, V. (2012). CobB1 deacetylase activity in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(2), 179–187. <https://doi.org/10.1139/o11-086>
- Mizuno, Y., Nagano-Shoji, M., Kubo, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Kawasaki, H., ... Kosono, S. (2016). Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction. *MicrobiologyOpen*, 5(1), 152–173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.320>
- Munnoch, J. T., Widdick, D. A., Chandra, G., Sutcliffe, I. C., Palmer, T., & Hutchings, M. I. (2016). Cosmid based mutagenesis causes genetic instability in *Streptomyces coelicolor*, as shown by targeting of the lipoprotein signal peptidase gene. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29495>

- Musiol-Kroll, E. M., Tocchetti, A., Sosio, M., & Stegmann, E. (2019). Challenges and advances in genetic manipulation of filamentous actinomycetes-the remarkable producers of specialized metabolites. *Natural Product Reports*, 36(9), 1351–1369. <https://doi.org/10.1039/c9np00029a>
- Netzker, T., Schroeckh, V., Gregory, M. A., Flak, M., Krespach, M. K. C., Leadlay, P. F., & Brakhage, A. A. (2016). An efficient method to generate gene deletion mutants of the rapamycin-producing bacterium *Streptomyces iranensis* HM 35. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3481–3492. <https://doi.org/10.1128/AEM.00371-16>
- Nodwell, J. R. (2019). Microbe Profile: *Streptomyces coelicolor*: a burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiology*, 165, 953–955. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000821>
- North, B. J., & Verdin, E. (2004). Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biology*, 5(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-5-224>
- Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., & Kuramitsu, S. (2014). Lysine propionylation is a prevalent post-translational modification in *thermus thermophilus*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(9), 2382–2398. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035659>
- Patharkar, R. (2019). Gel purification - Freeze & Squeeze method. Retrieved October 30, 2019, from <https://patharkar.com/2019/02/gel-purification-freeze-squeeze>
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Botas, A., Santamarta, I., Martín, J. F., & Liras, P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* Is a Versatile Regulator. *PLoS ONE*, 7(3), e32697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032697>
- Pigac, J., & Schrempf, H. (1995). A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 352–356. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.352-356.1995>
- Qiu, J., Zhuo, Y., Zhu, D., Zhou, X., Zhang, L., Bai, L., & Deng, Z. (2011). Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 337–345. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3439-4>
- Schilling, B., Christensen, D., Davis, R., Sahu, A. K., Hu, L. I., Walker-Peddakotla, A., ...

- Wolfe, A. J. (2015). Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 98(5), 847–863. <https://doi.org/10.1111/mmi.13161>
- Schwer, B., & Verdin, E. (2008). Conserved Metabolic Regulatory Functions of Sirtuins. *Cell Metabolism*, 7(2), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.006>
- Starai, V. J., Celic, I., Cole, R. N., Boeke, J. D., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science*, 298(5602), 2390–2392. <https://doi.org/10.1126/science.1077650>
- Starai, Vincent J., & Escalante-Semerena, J. C. (2004). Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *Journal of Molecular Biology*, 340(5), 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.010>
- Takahashi-Íñiguez, T., Barrios-Hernández, J., Rodríguez-Maldonado, M., & Flores, M. E. (2018). Tricarboxylic acid cycle without malate dehydrogenase in *Streptomyces coelicolor* M-145. *Archives of Microbiology*, 200(9), 1279–1286. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1541-z>
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., ... Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
- Tan, M., Peng, C., Anderson, K. A., Chhoy, P., Xie, Z., Dai, L., ... Zhao, Y. (2014). Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metabolism*, 19(4), 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.014>
- Tanaka, Y., Kasahara, K., Hirose, Y., Murakami, K., Kugimiya, R., & Ochi, K. (2013). Activation and Products of the Cryptic Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters by Rifampin Resistance (*rpoB*) Mutations in Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2959. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-13>
- Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106, 1.16.1-39. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0116s106>

- Tucker, A. C., & Escalante-Semerena, J. C. (2013). Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans*. *Molecular Microbiology*, 87(1), 152–167. <https://doi.org/10.1111/mmi.12088>
- Van Keulen, G., & Dyson, P. J. (2014). Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 89, pp. 217–266). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00006-8>
- VanDrise, C. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2018). In *Streptomyces lividans*, acetyl-CoA synthetase activity is controlled by O-serine and N ϵ -lysine acetylation. *Molecular Microbiology*, 107(4), 577–594. <https://doi.org/10.1111/mmi.13901>
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., ... Zhao, G. P. (2010). Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 327(5968), 1004–1007. <https://doi.org/10.1126/science.1179687>
- Wang, X.-K., & Jin, J.-L. (2014). Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains. *FEMS Microbiology Letters*, 357(1), 99–103. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12507>
- Weinert, B. T., Iesmantavicius, V., Wagner, S. A., Schölz, C., Gummesson, B., Beli, P., ... Choudhary, C. (2013). Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in *E. coli*. *Molecular Cell*, 51(2), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.003>
- Wolfe, A. J. (2016). Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions. *Current Genetics*, 62(2), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0552-4>
- Xu, Y., You, D., & Ye, B. C. (2017). Nitrogen regulator GlnR directly controls transcription of genes encoding lysine deacetylases in actinobacteria. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(11), 1702–1710. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000553>
- Yu, B. J., Kim, J. A., Moon, J. H., Ryu, S. E., & Pan, J.-G. (2008). The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(9), 1529–1536.
- Zhang, H., Li, P., Ren, S., Cheng, Z., Zhao, G., & Zhao, W. (2019). ScCobB2-mediated lysine desuccinylation regulates protein biosynthesis and carbon metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(10), 2003–2017.

<https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001298>

- Zhang, K., Chen, Y., Zhang, Z., & Zhao, Y. (2009). Identification and verification of lysine propionylation and butyrylation in yeast core histories using PTMap software. *Journal of Proteome Research*, 8(2), 900–906. <https://doi.org/10.1021/pr8005155>
- Zhang, K., Zheng, S., Yang, J. S., Chen, Y., & Cheng, Z. (2013). Comprehensive profiling of protein lysine acetylation in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research*, 12(2), 844–851. <https://doi.org/10.1021/pr300912q>
- Zhao, K., Chai, X., & Marmorstein, R. (2004). Structure and Substrate Binding Properties of cobB, a Sir2 Homolog Protein Deacetylase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.060>
- Zhao, Y., & Jensen, O. N. (2009). Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*, 9(20), 4632–4641. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900398>