



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

PERFIL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES ACETILADAS EN *Streptomyces
coelicolor* CRECIDO EN GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOTECNÓLOGO

P R E S E N T A

NANCY GONZÁLEZ CORREA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Leticia Buendía González



Índice

1. Resumen	5
2. Abstract	6
3. Introducción	7
4. Antecedentes.....	9
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6. Métodos.....	14
6.1 Microorganismo.....	14
6.2 Medios de cultivo.....	14
6.3 Cultivo inicial	15
6.4 Cultivo en medio LB	15
6.5 Obtención de cultivo semilla.....	15
6.6 Cultivo en medio mínimo	15
6.7 Obtención del extracto libre de células (ELC).....	16
6.8 Identificación de proteínas por electroforesis vertical SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	16
6.8.1 Preparación de la muestra	16
6.8.2 Western Blot	17
6.8.3 Determinación de peso molecular en SDS-PAGE y Western Blot.....	18
6.9 Purificación de proteínas con agarosa-AntiAcK (IMMUNECHEM)	18
6.10 Evaluación de crecimiento por ensayo Lowry	18
6.11 Cuantificación de amonio residual	19
6.12 Cuantificación de glucosa residual	19
7. Resultados y discusión	20
7.1 Perfil de proteínas acetiladas detectadas por Western Blot y tinción de Coomassie	20
7.1.2 Comparación de bandas de proteínas acetiladas por peso molecular.....	24
7.1.3 Perfil de proteína acetilada en diferentes fases de crecimiento.....	28
8. Conclusiones	32
9. Perspectivas	32
10. Referencias.....	33

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.

1. Resumen

Streptomyces coelicolor es la bacteria modelo del filo Actinobacteria, importante en industria biotecnológica por sus habilidades en la biosíntesis de productos naturales. Para comprender la regulación celular en los Actinomicetos se han desarrollado diversos proyectos que serán la base para una mejor explotación de sus metabolitos. En este sentido, las modificaciones postraduccionales han demostrado ser un punto de regulación celular ya que afectan la función, localización e interacción de las proteínas permitiendo a los microorganismos adaptarse a su medio ambiente. La acetilación es una de las modificaciones más abundantes, es reversible, evolutivamente conservada en todos los dominios de vida, e integra y coordina procesos celulares en respuesta a cambios ambientales. Aunque existe una creciente evidencia que indica que la acetilación de lisina está involucrada en diversos procesos celulares, se conoce muy poco sobre el rol regulador de la acetilación en *Streptomyces coelicolor*. En el presente estudio se obtuvo el primer perfil de proteínas intracelulares acetiladas de *S. coelicolor* crecido en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y cloruro de amonio o nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida desnaturizante. Se evaluó también el crecimiento en términos de la concentración de proteína por el método de Lowry, glucosa residual por determinación de azúcares reductores por DNS (ácido dinitrosalicílico) y amonio residual de acuerdo con la técnica reportada por Weatherburn. El crecimiento se vio mayormente reducido en condiciones carbono-limitantes y en cultivos con nitrato como fuente de nitrógeno. En cultivos conteniendo glucosa 1 o 2.5 % y 100 mM de amonio como fuente de nitrógeno se encontraron el 56 y el 69 % de proteínas acetiladas, respectivamente, principalmente en la fase de crecimiento pre-estacionaria. De igual manera, los cultivos suplementados con nitrato y glucosa como fuente de carbono mostraron un perfil de acetilación particular para cada caso. También, se encontraron 24 bandas de proteína acetilada en un rango de 15 a 112 KDa que son comunes en las diferentes condiciones de crecimiento de *S. coelicolor*.

2. Abstract

Streptomyces coelicolor is the model bacterium of the phylum Actinobacteria, important in the biotechnological industry for its abilities in the biosynthesis of natural products. In order to understand cell regulation in Actinomycetes, several projects have been developed, these will be the basis for a better exploitation of their metabolites. On the other hand, post-translational modifications are a point of cellular regulation that affect the function, localization, and interaction of proteins. Acetylation is a reversible modification, evolutionarily conserved in prokaryotes, that integrates and coordinates cellular processes in response to environmental changes. Although there is growing evidence that lysine acetylation is involved in diverse cellular processes, little is known about the regulatory role of acetylation in *Streptomyces coelicolor*. In the present study, the first profile of acetylated intracellular proteins of *S. coelicolor* grown on minimal medium with glucose and ammonium chloride or sodium nitrate as nitrogen sources was obtained by vertical denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Growth was also evaluated in terms of protein concentration by Lowry's method, residual glucose by determination of reducing sugars by DNS (dinitrosalicylic acid) and residual ammonium according to the technique reported by Weatherburn. Growth was mostly reduced under carbon-limiting conditions and in cultures with nitrate as nitrogen source. In cultures containing 1 or 2.5 % glucose and 100 mM ammonium as nitrogen source, 56 and 69 % of acetylated proteins were found, respectively, mainly in the pre-stationary growth phase. Similarly, cultures supplemented with nitrate and glucose as carbon source showed a particular acetylation profile for each case. Also, 24 acetylated protein bands in a range from 112 to 15 KDa were found to be common in the different growth conditions of *S. coelicolor*.

3. Introducción

Streptomyces coelicolor es la bacteria modelo del filo Actinobacteria, un grupo de interés debido a su complicado desarrollo celular y sus potentes habilidades en la biosíntesis de productos naturales (Zhang *et al.*, 2019). Pertenece al subgrupo representativo de bacterias miceliares y saprofitas del suelo, los estreptomicetos. Estos microorganismos son bacterias Gram positivas de gran importancia para la biotecnología dada su capacidad para producir una gran variedad de compuestos bioactivos, incluidos antibióticos, agentes anticancerígenos, inmunosupresores y enzimas, todos ellos de interés industrial (Hopwood, 2007). En la actualidad, para comprender la regulación celular en Actinomicetos se han desarrollado diversos proyectos que serán la base para una mayor producción de sus productos naturales.

Los procesos celulares se regulan en varios niveles y la mayoría de los estudios actuales se centran en la regulación transcripcional (Romero-Rodríguez *et al.*, 2015). Sin embargo, las modificaciones postraduccionales (MPT) son un campo de estudio emergente y se ha demostrado que desempeñan un papel clave en una gran cantidad de procesos celulares permitiendo que los microorganismos se ajusten a los estímulos externos o internos rápidamente (Cain *et al.*, 2014). Las modificaciones postraduccionales amplían en gran medida la composición química y la información normalmente codificada en la secuencia de aminoácidos de las proteínas (Hesketh *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2020). Este fenómeno es importante para la regulación funcional y estructural de las proteínas (VanDrisse & Escalante, 2019). En Actinomicetos, hay cada vez más evidencias de que las MPT desempeñan un papel significativo en varios procesos celulares como formación de esporas, latencia, virulencia, síntesis de proteínas, interviniendo también en la carga, tamaño, hidrofobicidad, conformación, actividad proteica, estabilidad, localización celular y/o su afinidad con otras proteínas vinculantes, permitiendo a los organismos responder rápidamente y adaptarse a cambios en su ambiente (VanDrisse & Escalante, 2019; Sun *et al.*, 2020). Actualmente se conocen más de 300 MPT (Pieroni *et al.*, 2020),

algunas de las cuales pueden ser reversibles, lo que le confiere gran utilidad a la célula (VanDrisse & Escalante, 2019).

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

La acetilación en la Nε-lisina fue descubierta por primera vez en las histonas. Esta modificación aumenta el tamaño de la cadena lateral, neutraliza la carga positiva del grupo amino y cambia las propiedades de las proteínas a una mayor hidrofobicidad; puede alterar la unión del ADN, la actividad enzimática, las interacciones proteína-proteína y la estabilidad o la localización de las proteínas (Glozak *et al.*, 2005). En algunas enzimas del metabolismo primario estas alteraciones cambian el potencial de unión e inhiben la actividad catalítica (Nakayasu *et al.*, 2017). También, se ha demostrado que la acetilación de la Nε-lisina puede producirse de forma enzimática por actividad de acetiltransferasas (KAT) o no enzimática por acetil fosfato (AcP), y que, además, es reversible mediante la acción de una lisina desacetilasa (KDAC) (Christensen *et al.*, 2019).

La acetilación Nε-NH₂ de residuos de lisina, es una modificación postraducciona conservada evolutivamente, y se ha reportado que participa en diversos procesos como la expresión de genes, interacción de proteínas, localización proteica, ciclo celular, splicing y transporte nuclear (Pieroni *et al.*, 2020).

En total se conocen 57 acetilomas en procariontas (Christensen *et al.*, 2019), de los cuales 29 corresponden a bacterias gram positivas que entre sí han mostrado mayor similitud entre sus acetilomas (Liao *et al.*, 2014).

En *Streptomyces coelicolor* se sabe que la proteína GlnR, regulador global de nitrógeno, se encuentra regulada por acetilación en residuos de lisina, incrementando su afinidad de unión al ADN diana en condiciones limitadas de

nitrógeno con 5 mM de cloruro de amonio o nitrato de sodio, mientras que disminuye en condiciones ricas de N con 100 mM de cloruro de amonio o nitrato de sodio por fosforilación de residuos serina/treonina (Amin *et al.*, 2016). Además de regular el metabolismo de nitrógeno y carbono, GlnR está relacionado con la transcripción de desacetilasas, pues se ha observado que una mutante $\Delta glnR$ de *S. coelicolor* disminuye la transcripción de los tres genes que codifican a las desacetilasas SCO3330 (acetoin utilization protein AcuC), SCO0452 (CobB 1), SCO6464, en condiciones nitrógeno limitantes creciendo al microorganismo en medio Evans modificado con L-glutamina 1 mM como única fuente de nitrógeno y glucosa 2.5 %, sugiriendo un papel regulador en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno (Xu *et al.*, 2017). Aunque existe una creciente evidencia del rol regulador de la acetilación en el metabolismo primario y secundario en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en procariontes, en *S. coelicolor*, bacteria modelo del género *Streptomyces*, no se ha presentado un perfil de proteínas global en función de la disponibilidad de nutrientes. Por lo que en el presente estudio se pretende obtener el perfil de proteínas intracelulares acetiladas de *S. coelicolor* crecido en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono en dos concentraciones (1% y 2.5 %), y cloruro de amonio o nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno a una concentración de 100 mM.

4. Antecedentes

El concepto de que las MPT pueden regular el metabolismo primario y secundario se propuso por primera vez en 2002 con el desarrollo de la electroforesis en gel bidimensional y la espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Hesketh *et al.*, 2002). El primer análisis de un fosfoproteoma modificado global en Actinobacterias se reportó para *Streptomyces coelicolor* en 2011, mostrando que se produce una fosforilación de proteínas extensa durante la diferenciación celular (Manteca *et al.*, 2011). Estudios recientes de proteómica, en diversas especies bacterianas, han identificado cientos de proteínas acetiladas en lisina que controlan diferentes

procesos celulares (Hentchel & Escalante-Semerena, 2015; Kosono *et al.*, 2015; Schilling *et al.*, 2015).

En *Escherichia coli* crecido en medio TB 7 suplementado con glucosa 0.4 % como fuente de carbono se han detectado 2730 residuos de lisina acetilados en 806 proteínas (Kuhn *et al.*, 2014) y se ha propuesto que la acetilación dependiente de acetil fosfato es una respuesta a la disminución en la velocidad de crecimiento y a la acumulación de este compuesto en medios suplementados con glucosa 0.4 % (Schilling *et al.*, 2015). Entre las proteínas acetiladas en *E. coli* se ha encontrado a la piruvato deshidrogenasa, el componente IIA del sistema de fosfotransferasa (PTS), 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). También, en *Bacillus subtilis* crecido en medio mínimo suplementado con sulfato de amonio a una concentración de 0,2 g/L y con citrato o glucosa como fuente de carbono a concentración 30 mM se han identificado 629 proteínas acetiladas con 1355 sitios únicos de acetilación observándose cambios en las proteínas que participan en el metabolismo central de carbono y en componentes de la transcripción y traducción (Kosono *et al.*, 2015). Mientras que en *Corynebacterium glutamicum*, un microorganismo Gram positivo utilizado en la sobreproducción de ácido glutámico, al crecer en un medio de producción de glutamato que contenía 60 g de glucosa y 30 g de sulfato de amonio, también 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 al crecer en medio F10A suplementado con glucosa 0.2 %. Sorprendentemente, se incluyen proteínas involucradas en el metabolismo secundario, indicando que las MPT son un mecanismo de regulación importante tanto en metabolismo primario como secundario (Liao *et al.*, 2014). Las 667 proteínas acetiladas encontradas fueron comparadas con acetil proteomas reportados de otras bacterias y se

encontraron ortólogos de 137 proteínas acetiladas en otras bacterias. El mayor número (45%) fue detectado con *B. subtilis*, indicando una mayor similitud con bacterias Gram⁺ (Liao *et al.*, 2014).

También, Nakayasu y colaboradores (2017) en un análisis proteómico extenso de 48 bacterias filogenéticamente diversas de seis filos: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Cyanobacteria y Fibrobacteres demostraron que la acetilación de lisina en fase estacionaria temprana ocurre consistentemente en proteínas involucradas en la glucólisis, el metabolismo del piruvato, los ribosomas y el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), lo que sugiere una función reguladora común en bacterias evolutivamente diversas. En la glucólisis, siete de las nueve enzimas involucradas contienen residuos de lisina catalíticamente importantes en el sitio activo. En cuatro de estas enzimas, estas lisinas se unen al sustrato (Pgi: fosfoglucosa isomerasa, Tpi: triosa fosfato isomerasa, GpmA: fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato y Eno: enolasa). En las tres enzimas restantes (Fba: fructosa-bisfosfato aldolasa, Pgk: fosfoglicerato quinasa y Pyk: piruvato quinasa), se demostró por alineaciones de la secuencia de proteínas que todas estas lisinas se encuentran conservadas en las 48 bacterias del estudio filoproteómico.

La transición de la glucólisis (piruvato) al ciclo del TCA (acetil-CoA) implica un conjunto de cuatro enzimas que controlan la formación y, por lo tanto, el destino del acetil-CoA disponible. Tres de las cuatro enzimas contienen residuos de lisina que participan en la catálisis a través de la unión de sustrato/cofactor. Tanto en acetil-CoA sintetasa (Acs) como en la fosfotransacetilasa (Pta), la lisina se une al sustrato y en la dihidrolipoamida deshidrogenasa, una subunidad del complejo de piruvato deshidrogenasa, la lisina se une al cofactor de flavina adenina dinucleótido (FAD). De las ocho reacciones enzimáticas en el ciclo del TCA, cuatro contienen una lisina catalítica: isocitrato deshidrogenasa, el complejo alfa-oxoglutarato deshidrogenasa, succinato-CoA ligasa y fumarato hidratasa. Con una sola excepción (fumarato hidratasa), estas lisinas se encuentran acetiladas en múltiples organismos a través de los datos filoproteómicos (Nakayasu *et al.*, 2017). Además,

otros acetilomas reportados apuntan a que la acetilación puede tener un papel importante en el control de la biosíntesis de aminoácidos, degradación de RNA y metabolismo de nucleótidos entre otros (Kim *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012; Okanishi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

La acetilación de residuos de lisina se ha sugerido como un mecanismo regulador de retroalimentación negativa para limitar el metabolismo del exceso de carbono. Debido a que muchas de las lisinas acetiladas están ubicadas profundamente dentro de los sitios activos, se ha demostrado que el donante de acetilo para estas lisinas es una molécula pequeña, como el acetilfosfato, y que la reacción no requiere una acetiltransferasa (Nakayasu *et al.*, 2017).

Se ha reportado que la acumulación de acetilfosfato (AcP) favorece la acetilación en *E. coli* cuando se crece en medio mínimo M9 suplementado con 0.2 % de glucosa (Weinert *et al.*, 2013) y *B. subtilis* (Kosono *et al.*, 2015). En estas especies, el AcP se genera como un intermediario de la ruta de la fosfotransacetilasa (Pta)-acetato quinasa (AckA). La ruta Pta-AckA es una vía reversible y responsable de la fermentación del acetato, cuando hay exceso de carbono, y se encuentra evidentemente relacionada con la acetilación. La Pta es una enzima capaz de utilizar fosfato inorgánico para convertir acetil-coenzima A (AcCoA) en acetilfosfato (AcP), liberando CoA. AckA puede convertir el AcP en acetato mientras genera un ATP. En relación con esta ruta metabólica, es importante destacar que la acetilación bloquea la actividad enzimática de la acetil-coenzima A sintetasa en *Salmonella enterica* (Starai *et al.*, 2002), *B. subtilis* (Gardner *et al.*, 2006), *Rhodopseudomonas palustris* (Crosby *et al.*, 2010), *Mycobacterium smegmatis* (Xu *et al.*, 2011) y *S. coelicolor* (Mikulik *et al.*, 2012) mostrando un mecanismo regulador conservado.

La estructura secundaria de la proteína tiene relevancia para que haya acetilación de las lisinas. Aproximadamente 32% de los sitios de acetilación se han encontrado en estructuras secundarias como alfa hélices o beta plegadas. El resto fueron localizadas en regiones no estructuradas de la proteína, indicando que la

acetilación se prefiere en este tipo de regiones (Okanishi *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2014).

Las enzimas del nodo anaplerótico del fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato (PEP-Pyr-Oxa) no son la excepción para ser acetiladas y de esta manera controlar este proceso metabólico. Nagano-Shoji y colaboradores (2017) reportaron recientemente que la fosfoenolpiruvato carboxilasa de *Corynebacterium glutamicum* se encuentra acetilada en el residuo K⁶⁵³, lo que causa la pérdida de la actividad.

Aunque existe una creciente evidencia que indica que la acetilación de lisina está involucrada en diversos procesos celulares, especialmente en la regulación de las vías metabólicas centrales, se conoce muy poco sobre el rol regulador de la acetilación en *S. coelicolor*.

S. coelicolor es el microorganismo modelo del género y su genoma está secuenciado (Bentley *et al.*, 2002). En un estudio previo, se determinaron los niveles de expresión de las enzimas que participan en la vía anaplerótica del PEP-Pyr-Oxa y se encontró que el fosfoenolpiruvato carboxilasa codificada por el SCO3127, es una enzima clave en la regeneración del oxalacetato, en este microorganismo cuando crece en presencia de glucosa (Llamas-Ramírez *et al.*, 2020). Al mismo tiempo se cuantificó la actividad de ésta y otras enzimas del nodo y se observó que no había una correlación con la cantidad de ARNm y la actividad enzimática en función del tiempo, lo que sugirió que las proteínas podrían estar acetiladas y sin actividad.

4. Hipótesis

Más de una de las proteínas intracelulares de *Streptomyces coelicolor* se acetilan cuando este microorganismo, crecido en glucosa como fuente de carbono, entra en la fase estacionaria.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Obtener el perfil de proteínas intracelulares acetiladas en *S. coelicolor* crecido en glucosa como fuente de carbono y amonio o nitrato como fuente de nitrógeno.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los patrones de las proteínas acetiladas a través de electroforesis en poliacrilamida desnaturizante y Western blot de *S. coelicolor* crecido en medio mínimo con glucosa al 1 o 2.5 % y 100 mM de NH₄Cl.
- Obtener los patrones de las proteínas acetiladas a través de electroforesis en poliacrilamida desnaturizante y Western blot de *S. coelicolor* crecido en medio mínimo con glucosa al 1 o 2.5 % y 100 mM de NaNO₃.

6. Métodos

6.1 Microorganismo

Streptomyces coelicolor M-145 (Hopwood *et al.*, 1985) fue el microorganismo usado en este trabajo. La cepa fue donada por el Dr. Luis Servín, Investigador del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

6.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento de *S. coelicolor* M-145 se utilizó el medio mínimo (MM) que contiene buffer MOPS 20 g/L, polietilenglicol-8000 50 g/L, NaCl 5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, ZnSO₄ 0.05 g/L, FeSO₄ 0.02 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, MnCl₂ 0.001 g/L, CoCl₂ 0.001 g/L, glucosa 10 o 25 g/L y NH₄Cl o NaNO₃ 100 mM. El medio se ajustó a pH 7.0 con NaOH 10 M y se utilizaron matraces Fernbach con 500 mL de medio con espiral de acero inoxidable. Se esterilizó a 120 °C y 15 lb por 30 min.

Para la obtención de esporas se utilizó el medio MS (Harina de soya-manitol) que contiene 20 g de harina de soya, 20 g de manitol, 1 g de extracto de levadura y 20 g de agar por litro de medio. Se esterilizó a 120° C y 15 lb por 25 min.

Para la preparación del inóculo de *S. coelicolor* se utilizó medio LB (Luria-Bertani) que contenía en g por litro, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 0.1 M y se esterilizó a 120° C y 15 lb por 25 min.

6.3 Cultivo inicial

Bajo condiciones asépticas se inoculó una asada de esporas de *S. coelicolor* en placas de medio MS por agotamiento en estrías, se incubó a 30 °C durante 7 días. Pasado este periodo las placas se almacenaron a 4 °C.

6.4 Cultivo en medio LB

Bajo condiciones asépticas se inocularon varias asadas de las esporas en 200 mL de medio LB contenidos en un matraz de 1 L con espiral de acero inoxidable. Se incubó a 30 °C y 200 rpm durante 24 horas.

6.5 Obtención de cultivo semilla

En condiciones asépticas se recolectaron 50 mL del medio del cultivo LB donde creció *S. coelicolor* con una probeta estéril de 25 mL, y repartido en tubos de centrifuga de fondo redondo de 50 mL, se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga Hettich. Se descartó el sobrenadante evitando se resuspendiera el pellet generado. Cada pellet se lavó 2 veces con 5 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril a cada pellet y se agitó ligeramente de manera orbital para desprender el pellet del fondo del tubo y vaciarlo a los matraces con medio mínimo.

6.6 Cultivo en medio mínimo

Bajo condiciones asépticas se transfirió el micelio a matraces Fernbach con espiral de acero inoxidable y 500 mL de medio mínimo (MM), suplementado con glucosa como fuente de carbono (1 y 2.5%) en combinación con amonio o nitrato

(100 mM) como fuentes de nitrógeno, se incubaron a 30 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras de 50 mL a las 24 h y de 30 mL a las 48, 72 y 96 h para obtener el extracto libre de células (ELC). También, se tomaron dos muestras de 3 mL a las 24, 48, 72 y 96 h para determinación del crecimiento, glucosa y amonio residual, de acuerdo con las subsecciones 6.10-6.12.

6.7 Obtención del extracto libre de células (ELC)

En tubos de centrifuga de fondo redondo se cosecharon 50 mL de muestra a las 24 horas y 30 mL de los tiempos de incubación de 48, 72 y 96 horas. Los tubos se centrifugaron por 5 minutos a 4 °C y 5000 rpm. El micelio se lavó dos veces con buffer Tris-HCl 0.1M con los inhibidores de desacetilasas (butirato de sodio 50 mM con nicotinamida 20 mM y Tricostatin 3 µM) y se resuspendió el micelio con 1.5 - 2 mL del mismo buffer y se transfirió a un tubo para la sonicación. Todas las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. La sonicación se llevó a cabo en un sonicador Soniprep durante 60 segundos con intervalos de 10 segundos en frío.

Las muestras se centrifugaron a 4°C y 5000 rpm por 15 minutos en una centrífuga Hettich. Se transfirió el sobrenadante por decantamiento a un tubo Eppendorf frío previamente etiquetado. Todos los ELC se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como estándar (Bradford, 1976).

6.8 Identificación de proteínas por electroforesis vertical SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

6.8.1 Preparación de la muestra

El volumen correspondiente a 40 y 500 µg de proteína de cada una de las muestras se precipitó con dos volúmenes de acetona en tubos Eppendorf de 2 mL. Se agitaron los tubos y la proteína precipitada se recuperó por centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente se resuspendió en un volumen máximo

de 30 μ L de buffer de muestra. Las muestras se calentaron a 90 °C por 3 minutos. Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 %.

Por cada corrida electroforética se incluyeron dos geles, uno para tinción Coomassie y el otro para hacer la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Se colocaron 40 μ g de proteína de las muestras en cada carril del gel destinado a tinción Coomassie y 500 μ g en el gel destinado para hacer la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. Se utilizó un voltaje de 100 mA durante 90 min.

6.8.2 Western Blot (WB)

El gel cargado con 500 μ g de muestra se transfirió a la membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo para transferencia de proteínas a membrana de BioRad, con un amperaje de 350 mA durante 60 min.

Al finalizar la transferencia se detuvo el proceso y se realizaron 3 lavados a las membranas transferidas en 20 mL de buffer TBS (1.21 g Tris Base, 2.065 g NaCl) a 4°C en un recipiente con tapa con agitación por 5 minutos.

Se descartó el buffer TBS y se agregaron 10 mL de solución de bloqueo (leche en polvo Sveltis al 5 %) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se descartó la solución de bloqueo y se realizaron 3 lavados a la membrana en 15 mL de TBST (200 mL TBS y 200 μ L de Tween 20), durante 5 min con agitación lineal. El anticuerpo antiacetil-lisina generado en conejo (Acetylated-Lysine Antibody, Cell Signaling) a una dilución de 1:3000 se agregó a las membranas y se dejó incubando en frío con agitación durante toda la noche. Se recuperó el anticuerpo y se lavó dos veces la membrana con TBST. Se agregó el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa (GenTex) obtenido en rata a una dilución de 1:1000 y se incubó con agitación lineal durante dos horas a 4 °C.

Las membranas se revelaron agregando la solución de cloronaftol (5 mg/mL) en buffer Tris-HCl pH 7.5 50 mM y con 100 μ L de peróxido de hidrógeno, incubando durante 5-15 minutos en agitación y protegiendo de la luz hasta aparición de las bandas color café obscuro.

6.8.3 Determinación de peso molecular en SDS-PAGE y Western Blot

Se determinó el peso molecular de las bandas de proteínas identificadas como acetiladas en SDS-PAGE y Western Blot de la elución con agarosa por extrapolación del valor Rf empleando el marcador de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) como curva estándar (Shapiro & Maizel, 1969).

6.9 Purificación de proteínas con agarosa-AntiAcK (IMMUNECHEM)

Se realizaron dos lavados con 1 mL de TBS a 25 μ L de perlas de agarosa, se agitó suavemente y centrifugó a 3000 rpm por 2 min a 4 °C. Se aspiró el sobrenadante y se agregó el volumen correspondiente a 1 mg de proteína del ELC y se incubó una noche a 4 °C con agitación rotatoria. Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 2 min y se aspiró el sobrenadante, se almacenó a 4 °C para separar las proteínas por SDS-PAGE y posteriormente realizar el WB y la tinción con Azul de Coomassie.

Se lavaron tres veces las perlas de agarosa con 500 μ L de TBST, centrifugando a 3000 rpm por 2 min a 4 °C y aspirando el sobrenadante. Se eluyeron las proteínas acetiladas con 100 μ L de buffer de carga SDS 1 X y se llevó a ebullición por 30 seg. Se utilizaron 50 μ L para un gel SDS-PAGE al 10 % y se transfirió a membrana y se utilizaron 50 μ L para colocar en un gel SDS-PAGE al 10 % para teñir por azul de Coomassie.

6.10 Evaluación de crecimiento por ensayo Lowry

Se determinó el crecimiento de *S. coelicolor* por concentración de proteína intracelular por el método de Lowry (Flores y Sánchez 1985). Se emplearon muestras de micelio de 3 mL tomadas por duplicado de los tiempos de incubación 24, 48, 72 y 96 h, y se centrifugaron a 3500 rpm. El sobrenadante se almacenó para determinación de glucosa y amonio residual, mientras que el pellet resultante se lavó con 1 mL de agua destilada, se colocó en 2 ml de ácido tricloroacético 0,3 M. Tras la centrifugación, el pellet se resuspendió en 1 ml de NaOH 0,4 M, se mezcló

a fondo y su concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. Se preparó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un rango de 0-100 μg . Se emplearon 50 μL de muestra en 450 μL de agua destilada. Las muestras se trataron con un reactivo de hidróxido de sodio 1 M-Carbonato de sodio 2 %-Sulfato de cobre 1 %-citrato de sodio 2 % antes de adicionar el reactivo Folin & Ciocalteau y agua destilada en proporción 1:1. La reacción se incubó por 20 minutos y se realizaron lecturas de densidad óptica en espectrofotómetro a 750 nm.

6.11 Cuantificación de amonio residual

El contenido de amonio residual en el medio mínimo después de crecer a *S. coelicolor* se llevó a cabo por el método de Weatherburn (1967). Se empleó el sobrenadante resultante de la centrifugación de las muestras de 3 mL tomadas por duplicado en la sección 6.10. Se preparó una curva estándar de cloruro de amonio en un rango de 0 a 10 μg . Se agregaron 2 mL de muestra en 998 μL de agua destilada. A cada tubo de estándar y muestra se le agregaron 2.5 mL de fenol 1 % y nitroprusiato de sodio 0.005 % y 2.5 mL de hipoclorito de sodio 8.4 %. Se incubó la reacción por 30 minutos y se realizaron lecturas de densidad óptica a 625 nm en espectrofotómetro.

6.12 Cuantificación de glucosa residual

El contenido de glucosa residual en el medio mínimo después de crecer a *S. coelicolor* se llevó a cabo por el método del dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se empleó el sobrenadante resultante de la centrifugación de las muestras de 3 mL tomadas por duplicado en la sección 6.10. Se preparó una curva estándar de glucosa en un rango de 0 a 180 μg . Se emplearon 4 μL de muestra en 396 μL de agua destilada. A cada tubo de estándar y de muestra se agregó 1 mL del reactivo DNS, se sometió a baño maría 5 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se realizaron lecturas de densidad óptica a 550 nm en espectrofotómetro.

7. Resultados y discusión

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas que están involucradas en diferentes procesos del metabolismo de las bacterias son un mecanismo regulatorio muy importante ya que implican cambios inmediatos en la función de las mismas. En el caso particular de *Streptomyces coelicolor* es de nuestro interés conocer si se lleva a cabo la acetilación de las proteínas en respuesta a la disponibilidad de glucosa y/o de amonio o nitrato en el medio de cultivo.

7.1 Perfil de proteínas acetiladas detectadas por Western Blot y tinción de Coomassie

A partir de muestras de extractos libres de células se trató de obtener el perfil de proteínas acetiladas intracelulares a través de la técnica de Western blot (WT) utilizando un anticuerpo antiacetil-lisina generado en conejo y un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa obtenido en rata. En principio se realizó la separación de las proteínas por electroforesis desnaturizante con 40 μg de proteína de los extractos libres de células obtenidos y posteriormente la transferencia a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western blot. Los resultados no mostraron bandas de proteínas acetiladas, probablemente por la baja concentración de lisinas acetiladas que no pudieron ser detectadas con el WT.

Por lo tanto, se concentraron las proteínas por precipitación con acetona y se colocaron 500 μg de proteína para determinar si con esta concentración se lograba obtener el perfil de las proteínas acetiladas. Los resultados mostraron que se lograba detectar a las proteínas acetiladas, pero no eran más de 6-7 bandas (Fig. 1).

Ante esta situación se decidió purificar a las proteínas acetiladas utilizando una agarosa con el anticuerpo antiacetil-lisinas acoplado para unir a las proteínas por la acetil-lisina y posteriormente eluirlas y detectarlas por tinción con azul de

Coomassie después de la electroforesis (Fig. 2 y 3 panel B). De esta manera se obtuvo un perfil de proteínas de un número menor que las proteínas totales observadas por tinción con Coomassie en ELC.

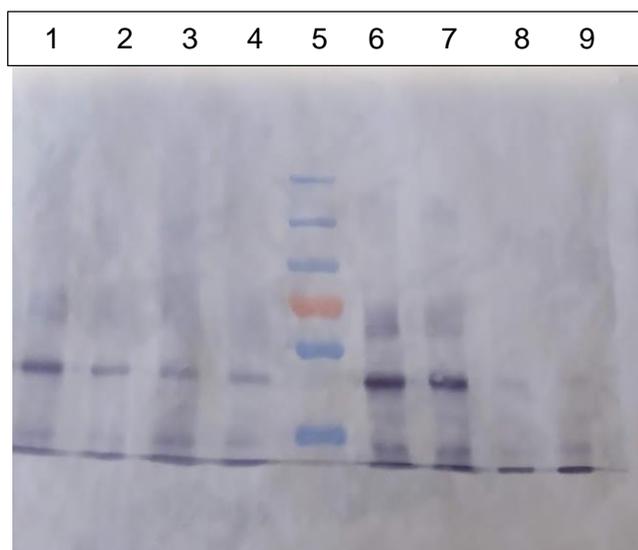


Fig. 1. Perfil de proteínas acetiladas después del WB y detección con H_2O_2 y α -cloronaftol. **carril 1**, 500 μ g ELC 24 h 5 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 2**, 500 μ g ELC 48 h 5 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 3**, 500 μ g ELC 72 h 5 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 4**, 500 μ g ELC 96 h 5 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 5**, Marcadores de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific); **carril 6**, 500 μ g ELC 24 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 7**, 500 μ g ELC 48 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 8**, 500 μ g ELC 72 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1%; **carril 9**, 500 μ g ELC 96 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1%.

7.1.1 Cuantificación de proteína acetilada e identificación por peso molecular

A partir de la determinación del peso molecular por extrapolación del valor R_f de las bandas de proteína obtenidas en la electroforesis SDS-PAGE de los extractos libres de células (ELC) obtenidos a los diferentes tiempos, concentraciones de glucosa y de fuente de nitrógeno (Shapiro & Maizel, 1969) se generaron los perfiles de bandas de proteínas acetiladas.

En la tinción de los geles por Azul de Coomassie dónde se corrieron las muestras de proteínas de los ELC, se identificaron también los pesos moleculares

de bandas de proteína, para identificar las bandas que no se acetilan, con la finalidad de calcular un porcentaje de proteína acetilada.

En los geles teñidos con Azul de Coomassie dónde se corrieron los ELC de cultivos de *S. coelicolor* crecido con cloruro de amonio 100 mM y glucosa 1 % se cuantificaron 39, 41 y 36 bandas de proteína a las 24, 48 y 72 h respectivamente (Fig. 2. Panel A, carriles 2, 3 y 4), de las cuales 11, 23 y 17 se encontraban acetiladas (Fig. 2. Panel B, carril 3, 4, 5).

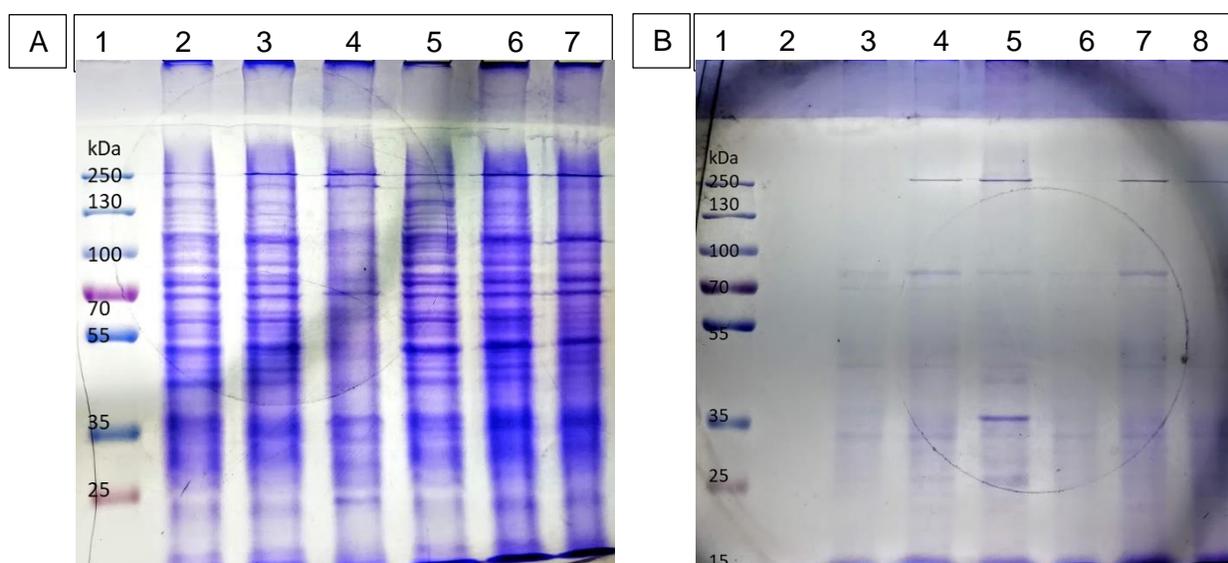


Fig. 2. Perfil de proteínas del extracto libre de células de *S. coelicolor* crecido en MM con 100 mM de NH_4Cl y 1 % o 2.5 % glucosa, teñidas con azul de Coomassie (**Panel A, carril 1**, marcadores de peso molecular, **carril 2**, 40 μg proteína en ELC 24 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %; **carril 3**, 40 μg proteína en ELC 48 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %; **carril 4**, 40 μg proteína en ELC 72 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %, **Carril 5**, 40 μg proteína en ELC 24 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %; **Carril 6**, 40 μg proteína en ELC 48 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %; **carril 7**, 40 μg proteína en ELC 72 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %) y electroforesis de las proteínas acetiladas purificadas (**Panel B, carril 1**, Marcadores de peso molecular; **carril 2**, perlas empleadas en purificación, **carril 3**, 25 μL elución de purificación 24 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %; **carril 4**, 25 μL elución de purificación 48 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %; **carril 5**, 25 μL elución de purificación 72 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 1 %, **carril 6**, 25 μL elución de purificación 24 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %; **carril 7**, 25 μL elución de purificación 48 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %; **carril 8**, 25 μL elución de purificación 72 h 100 mM NH_4Cl /Glucosa 2.5 %).

De igual manera, en los ELCs obtenidos de los cultivos suplementados con cloruro de amonio 100 mM y glucosa 2.5 % se cuantificaron 41, 36 y 36 bandas de proteína a las 24, 48 y 72 h respectivamente (Fig. 2. Panel A, carriles 5, 6 y 7), de

las cuales 14, 25 y 13 se encontraban acetiladas en tinción Coomassie de elución de proteína acetilada (Fig. 2. Panel B, carriles 6, 7 y 8).

Por otro lado, en los ELCs de cultivos suplementados con nitrato de sodio y glucosa al 1 % se cuantificaron 30, 35 y 36 bandas de proteína a las 48, 72 y 96 h respectivamente (Fig. 3. Panel A, carriles 2, 3 y 4), de las cuales 14, 21 y 14 se encontraban acetiladas (Fig. 3. Panel B, carriles 2, 3 y 4).

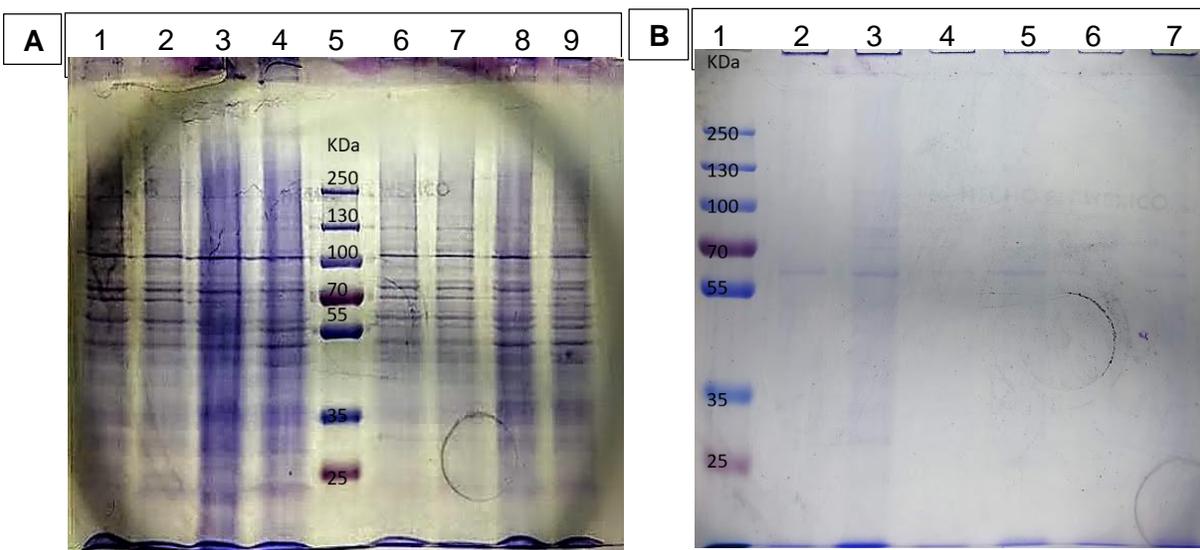


Fig. 3. Perfil de proteínas del extracto libre de células de *S. coelicolor* crecido en MM con 100 mM de NaNO_3 y 1 % o 2.5 % glucosa, teñidas con azul de Coomassie (**Panel A, carril 1**, 40 μg proteína en ELC 24 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 2**, 40 μg proteína en ELC 48 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 3**, 40 μg proteína en ELC 72 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 4**, 40 μg proteína en ELC 96 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 5**, Marcadores de peso molecular; **carril 6**, 40 μg proteína en ELC 24 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %; **carril 7**, 40 μg proteína en ELC 48 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %; **carril 8**, 40 μg proteína en ELC 72 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %; **carril 9**, 40 μg proteína en ELC 96 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %) y electroforesis de proteínas acetiladas purificadas (**Panel B. carril 1**, Marcadores de peso molecular; **carril 2**, 25 μL de elución de purificación 48 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 3**, 25 μL de elución de purificación 72 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 4**, 25 μL de elución de purificación 96 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 1 %; **carril 5**, 25 μL de elución de purificación 48 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %; **carril 6**, 25 μL de elución de purificación 72 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %; **carril 7**, 25 μL de elución de purificación 96 h 100 mM NaNO_3 /Glucosa 2.5 %).

En los ELCs de cultivos suplementados con nitrato de sodio y glucosa 2.5 % (Fig. 3. Panel A, carriles 7, 8 y 9) se cuantificaron 35, 34 y 31 bandas de proteína a

las 48, 72 y 96 h respectivamente, de las cuales 23, 15 y 14 se encontraban acetiladas (Fig. 3. Panel B, carriles 5, 6 y 7).

Mientras que en cultivos con nitrato de sodio y glucosa 1 % el mayor número de bandas de proteína en los ELCs se observa a las 72 h, en cultivos con glucosa 2.5 % el mayor número de bandas de proteína acetilada se observa a las 48 h.

7.1.2 Comparación de bandas de proteínas acetiladas por peso molecular

Posteriormente, los pesos moleculares identificados en tinción Commassie de proteína purificada acetilada se compararon entre las diferentes condiciones de cultivo.

Se identificaron 25 bandas de proteínas acetiladas únicas de cultivos suplementados con cloruro de amonio. De las cuales 14 fueron comunes independientemente de la concentración de glucosa, 8 bandas fueron únicas de cultivos con cloruro de amonio y glucosa 1 % y 3 bandas fueron únicas de cultivos con cloruro de amonio y glucosa 2.5 % (Tabla 1).

Se identificaron 14 bandas de proteínas acetiladas únicas de cultivos suplementados con nitrato de sodio. De las cuales 11 bandas fueron comunes independientemente de la concentración de glucosa, 2 bandas fueron únicas de cultivos con nitrato de sodio y glucosa 1 % y una banda fue única de cultivos con glucosa 2.5 % (Tabla 2). Se identificó una única banda de proteína acetilada (45 KDa) común en cultivos con glucosa 2.5 % independientemente de la fuente de nitrógeno y 24 bandas de proteína acetilada fueron comunes en todas las condiciones de cultivo (Tabla 3).

Tabla 1. Bandas de proteína acetilada en ELC de *S. coelicolor* crecido en MM con NH₄Cl.

Horas	NH ₄ Cl Glucosa 1%			NH ₄ Cl Glucosa 2.5%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Peso molecular (KDa) de bandas de proteína acetilada	178	178	178	178	178	
			173			
					106	
					100	
	97					
			95	95	95	95
	92	92				92
	87					
			80		80	
		73			73	
		69			69	
			61			
	58	58		58		
			49	49	49	
		46.51078			46	
	43		43			
					41	
		40				
		35		35	35	
		33	33	33	33	
	31					31
			28			
		26				
	25	25	25			25
			21		21	

En color rosa se observan los pesos moleculares de bandas en glucosa 2.5 %. En color azul, los pesos moleculares de bandas de proteína en glucosa 1 %. Los mismos colores atenuados indican las bandas con pesos moleculares comunes en ambas concentraciones de glucosa.

Tabla 2. Bandas de proteína acetilada en ELC de *S. coelicolor* en MM con NaNO₃

Horas	NaNO ₃ Glucosa 1%			NaNO ₃ Glucosa 2.5%		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
Peso molecular (KDa) de bandas de proteína acetilada		176	176		176	176
	166	166	166		166	166
			148		148	148
				140		
		132	132	132		132
		118	118	118	118	118
		115	115			
			108			
		105	105	105		
	94	94	94	94	94	94
			79	79	79	
	75		75	75		
		55				
		34		34		34

En color verde se observan los pesos moleculares de las bandas en glucosa 2.5 %. En color amarillo, los pesos moleculares de las bandas de proteínas en glucosa 1 %. Los mismos colores atenuados indican las bandas con pesos moleculares comunes en ambas concentraciones de glucosa.

El gran número de proteínas acetiladas comunes entre las diferentes condiciones de cultivos puede estar relacionado con el metabolismo central de carbono, el cual suele ser una de las vías enzimáticas más acetiladas. Como se ha mencionado en la sección de antecedentes, mediante un estudio filo proteómico de acetilación se identificaron las enzimas del metabolismo central en glucólisis, el TCA y el metabolismo del piruvato con residuos de lisina altamente conservados y acetilados en 48 bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Cyanobacteria y Fibrobacteres (Nakayasu et al., 2017).

Tabla 3. Bandas de proteínas acetiladas comunes en todos los tratamientos en ELC de *S. coelicolor* crecido en Medio Mínimo.

Horas	NH ₄ Cl Glucosa 1%			NH ₄ Cl Glucosa 2.5%			NaNO ₃ Glucosa 1%			NaNO ₃ Glucosa 2.5%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
Peso molecular (KDa) de bandas de proteína acetilada					112			112		112		
				89	89		89	89	89	89	89	89
	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
			71	71			71		71	71	71	71
				67				67				
	63									63		
				60			60	60	60	60	60	
	53		53	53			53	53		53		53
	50	50					50	50		50		
		47				47		47	47	47	47	47
		42		42	42	42		42	42	42	42	42
	38						38	38	38	38	38	38
		32	32		32	32	32				32	
		30	30	30	30		30			30		
						29		29				29
	27		27	27	27		27	27		27	27	27
		24		24	24	24	24	24		24		
	22	22	22	22	22	22				22	22	
	20		20		20	20				20		20
		19	19	19		19		19				
		18		18	18	18	18			18	18	18
		17	17		17	17					17	
			16				16		16	16		
		15			15			15				

En color verde se observan los pesos moleculares de las bandas en glucosa 2.5 %. Rosa, NH₄Cl y glucosa 2.5 %. Verde, NaNO₃ y glucosa 2.5 %. Azul, NH₄Cl y glucosa 1 %. Amarillo, NaNO₃ y glucosa 1 %.

7.1.3 Perfil de proteína acetilada en diferentes fases de crecimiento

Con la finalidad de conocer las diferentes etapas del crecimiento de *S. coelicolor*, éste se cuantificó como proteína intracelular a través del método de Lowry, se midió también la glucosa y el amonio residuales para conocer su concentración en el medio en función del tiempo. Adicionalmente, las bandas de proteína totales detectadas en los geles teñidos por Coomassie (Figura 2 y 3 panel A) se consideraron el 100 % de proteínas en ELC, para posteriormente determinar qué porcentaje del total identificado se encontraba acetilado por tinción de Coomassie de las proteínas acetiladas purificadas. Posteriormente, el porcentaje de bandas de proteínas acetiladas se graficó con los datos del crecimiento, glucosa y amonio residuales.

El microorganismo crecido en MM suplementado con glucosa 1 % y cloruro de amonio 100 mM mostró un crecimiento lineal de las 24 h a las 72 h, alcanzando la fase estacionaria con 600 y 610 $\mu\text{g/mL}$ de proteína a las 72 h y 96 h respectivamente (Fig. 4, panel A). A las 48 h se ha consumido el 60 % de la glucosa y el 30 % del amonio presentes en el medio.

De igual manera, cuando el medio contiene cloruro de amonio con glucosa 2.5 % se observa un crecimiento lineal a partir de las 24 h y a las 96 h se alcanzan 1308 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4 panel B). Esto es más del doble comparado con el cultivo con 1 % de glucosa. Sin embargo, en estas condiciones no se alcanza a ver una fase estacionaria (Fig. 7.4 Paneles A y B) debido al exceso de carbono y de nitrógeno.

El porcentaje de proteína acetilada en los cultivos conteniendo cloruro de amonio y glucosa 1 % incrementa casi al doble (del 28 al 56 %) de las 24 a las 48 h. En este mismo tiempo se detiene el consumo de amonio y de la glucosa. El porcentaje de proteína acetilada se mantiene alrededor de 47 % (Figura 4. Panel A).

De igual manera, en cultivos conteniendo cloruro de amonio y glucosa 2.5 % los niveles de acetilación aumentaron el doble de las 24-48 h (incrementó de 34 %

a 69 %), momento justo, en que el consumo de amonio se detuvo y quedó un exceso de fuente de carbono. Posteriormente los niveles de acetilación descienden a la mitad (al 36 % a las 72 h) (Fig. 7.4. Panel B).

Comparando los parámetros evaluados en los cultivos conteniendo cloruro de amonio ya sea en condiciones limitadas o en exceso de glucosa, se puede sugerir que la acetilación incrementó desde la fase logarítmica en algunos casos y en otros en la fase preestacionaria, para disminuir posteriormente (Fig. 4. panel A y B).

En el crecimiento cuando el medio se suplementa con nitrato de sodio y glucosa 1 % se observó un incremento lineal hasta las 72 h, donde posteriormente se puede observar una fase estacionaria alcanzando 493 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 y 96 h. El consumo de glucosa fue casi lineal de las cero hasta las 96 horas. El amonio generado no pudo ser detectado ya que se consumía conforme se formaba (Fig. 4, Panel C).

En la condición de cultivo conteniendo nitrato de sodio y 2.5 % de glucosa, el crecimiento fue lineal de las 24 a las 96 h, alcanzando 455 $\mu\text{g/mL}$ a las 96 h (Fig. 4, Panel D).

Los niveles de acetilación en condiciones con nitrato de sodio y glucosa 1 % no se observaron en puntos previos a las 48 h, sin embargo, éstos se muestran crecientes, de las 48-72 h (47 al 60 %) y se observa un descenso a las 96 h al 39 %. En este caso como en cultivos con cloruro de amonio el nivel de acetilación aumenta en periodos de crecimiento lineal en fase preestacionaria, y disminuye al entrar a fase estacionaria en cultivos con glucosa 1 % (Fig. 4. Panel C).

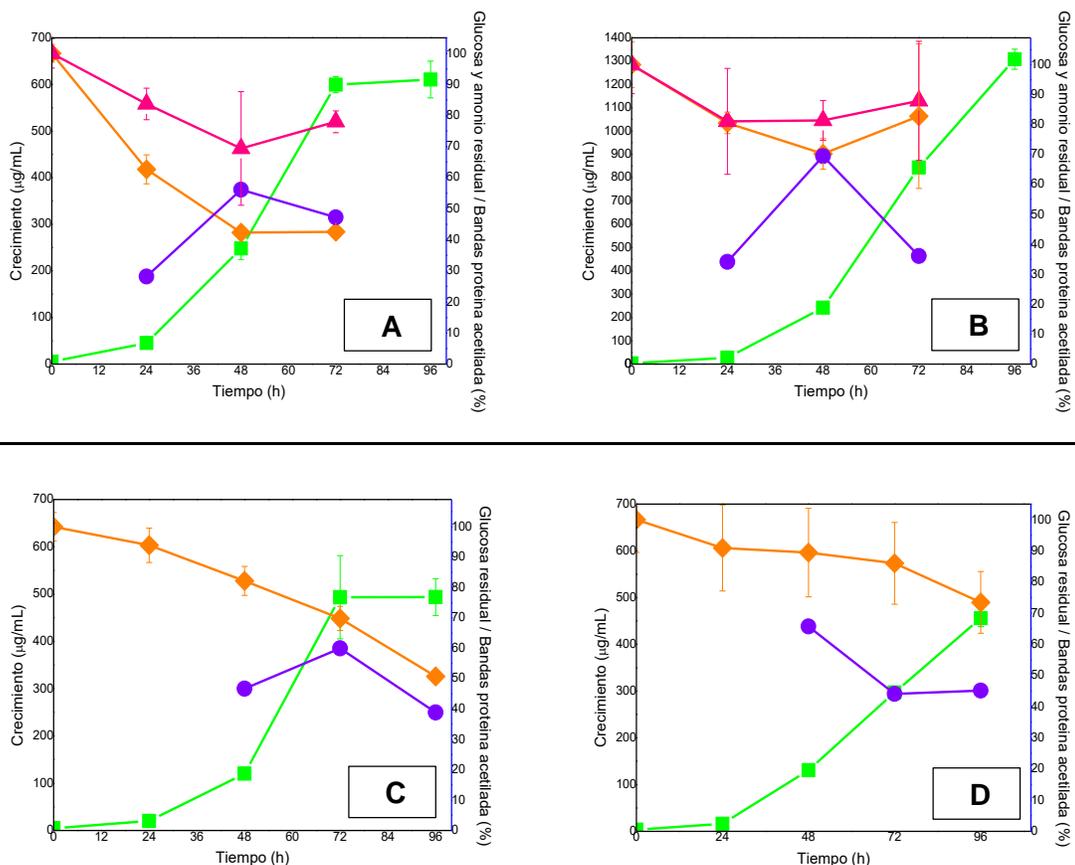


Fig. 7.4. Curvas de crecimiento (■-■-), porcentaje del consumo de amonio (-▲-), porcentaje del consumo de glucosa (-◆-) y porcentaje de bandas de proteínas acetiladas (-●-) en los extractos libres de células de *S. coelicolor* crecido en MM suplementado con: Panel A, cloruro de amonio 100 mM y glucosa 1 %; Panel B, cloruro de amonio 100 mM y glucosa 2.5 %; Panel C, Nitrato de sodio 100 mM y glucosa 1 %; Panel D, Nitrato de sodio 100 mM y glucosa 2.5 %.

Al suplementar el medio con nitrato de sodio y glucosa al 2.5 % los niveles de acetilación más altos se observan a las 48 h (66 %), posteriormente los niveles de acetilación descienden de las 48-72 h y se mantienen al 44-45 % de las 72-96 h respectivamente (Fig. 4. Panel D).

En cultivos suplementados con nitrato se observó mayor crecimiento cuando se suplementa el medio con glucosa 1 %. Los niveles de acetilación en cada tiempo fueron particulares para cada condición. Sin embargo, tal como en los cultivos suplementados con cloruro de amonio, en los cultivos suplementados con nitrato de

sodio y glucosa 2.5 % los niveles de acetilación incrementan a las 48 h cuando el crecimiento es lineal.

El crecimiento en cultivos suplementados con amonio fue mayor que en cultivos suplementados con nitrato como fuente de nitrógeno, posiblemente porque el amonio es la fuente preferencial de nitrógeno (Moir & Wood, 2001).

Estos resultados, en el aumento de los niveles de acetilación durante la fase preestacionaria, coinciden con el acetiloma de *Clostridium acetobutylicum* (Xu *et al.*, 2018), en que los más altos niveles de acetilación se reportan entre fase log y preestacionaria.

Los altos niveles de acetilación en el tiempo en que se detiene el consumo de amonio contribuyen a la creciente evidencia de que la acetilación es un mecanismo de regulación metabólica que responde a la disponibilidad de nutrientes, en este caso el nitrógeno y a que la glucosa al estar en mayor concentración puede estar generando una gran cantidad de acetilfosfato que acetila de manera no enzimática a las proteínas. Al detenerse el crecimiento por cualquier razón es indispensable para la célula no seguir acumulando compuestos de alta energía ni poder reductor que generalmente son las señales para regular todo el metabolismo de las células (Schilling *et al.*, 2015).

Las observaciones anteriores sugieren que los perfiles de acetilación descritos podrían ser una respuesta de las condiciones de cultivo en que se hace variar la concentración de glucosa en altas concentraciones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno.

8. Conclusiones

- Este trabajo contribuye a la creciente evidencia que sugiere que la acetilación de lisina reversible (RLA) ajusta rápidamente las actividades y funciones de las proteínas que permiten que la plasticidad del crecimiento de los microorganismos responda y se adapte a los entornos fluctuantes.
- Se logró obtener un perfil de acetilación particular para cada condición de crecimiento de *Streptomyces coelicolor* crecido en un medio mínimo con glucosa en dos concentraciones, 1 % y 2.5 %, en combinación con amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno en concentraciones altas (100 mM).
- Los niveles de acetilación fueron particularmente altos en fase de crecimiento lineal.
- La acetilación mostró reversibilidad. Los niveles de acetilación fueron menores en etapas posteriores al punto más alto.
- La identificación de bandas de proteína acetilada por peso molecular permitió generar un perfil particular de cada condición de crecimiento.

9. Perspectivas

Con los resultados obtenidos en este trabajo, en un futuro se podrán identificar las proteínas acetiladas y el número de sitios de acetilación por diferentes técnicas para obtener el acetiloma completo de *Streptomyces coelicolor*.

10. Referencias

- Amin, R., Franz-Wachtel, M., Tiffert, Y., Heberer, M., Meky, 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, 38.
- 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.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Cain, J. A., Solis, N., & Cordwell, S. J. (2014). Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of proteomics*, 97, 265-286.
- Christensen, D. G., Baumgartner, J. T., Xie, X., Jew, K. M., Basisty, N., Schilling, B., & Wolfe, A. J. (2019). Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes. *MBio*, 10(2), e02708-18.
- 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 & Cellular Proteomics*, 12(12), 3509-3520.
- 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 *Rhodopseudomonas palustris*. *Molecular Microbiology*, 76(4), 874-888.

- 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.
- Flores ME, Sanchez S. (1985). Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiology Letters.*;26(2):191-194.
- Gardner, J. G., Grundy, F. J., Henkin, T. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2006). Control of acetyl-coenzyme A synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD⁺ involvement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5460-5468.
- Glozak M., Sengupta N., Zhang X. y Seto E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363: 15-23
- Hesketh, A. R., Chandra, G., Shaw, A. D., Rowland, J. J., Kell, D. B., Bibb, M. J., & Chater, K. F. (2002). Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 46(4), 917-932.
- 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*, 79(3), 321-346.
- Hirschey, M. D., & Zhao, Y. (2015). Metabolic regulation by lysine malonylation, succinylation, and glutarylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(9), 2308-2315.
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. Oxford University Press, New York, USA.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H. 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kim, D., Yu, B. J., Kim, J. A., Lee, Y. J., Choi, S. G., Kang, S., & Pan, J. G. (2013). The acetylproteome of Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 13(10-11), 1726-1736.

- 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.
- 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.
- Lee, H. J., Lang, P. T., Fortune, S. M., Sasseti, C. M., & Alber, T. (2012). Cyclic AMP regulation of protein lysine acetylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(8), 811-818.
- 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.
- 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.
- Manteca, A., Ye, J., Sánchez, J., & Jensen, O. N. (2011). Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *Journal of Proteome Research*, *10*(12), 5481-5492.
- 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. *Microbiology Open*, *5*(1), 152-173.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* *31*:426–428
- Mikulik, K., Felsberg, J., Kudrnáčová, E., Bezoušková, S., Šetinová, D., Stodůlková, E., & Zidek, V. (2012). CobB1 deacetylase activity in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry and Cell Biology*, *90*(2), 179-187.
- Moir, J. W. B., & Wood, N. J. (2001). Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular & Molecular Life Sciences*, *58*(2).

- Nagano-Shoji, M., Hamamoto, Y., Mizuno, Y., Yamada, A., Kikuchi, M., Shirouzu, M., Umehara, T., Yoshida, M., Nishiyama, M., & Kosono, S. (2017). Characterization of lysine acetylation of a phosphoenolpyruvate carboxylase involved in glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 104(4), 677–689. <https://doi.org/10.1111/mmi.13658>
- Nakayasu, E. S., Burnet, M. C., Walukiewicz, H. E., Wilkins, C. S., Shukla, A. K., Brooks, S., & Payne, S. H. (2017). Ancient regulatory role of lysine acetylation in central metabolism. *MBio*, 8(6), e01894-17.
- Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., & Kuramitsu, S. (2013). Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in *Thermus thermophilus*. *Journal of Proteome Research*, 12(9), 3952-3968.
- Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., & Kuramitsu, S. (2014). Lysine propionylation is a prevalent post-translational modification in *Thermus thermophilus*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(9), 2382-2398.
- Pieron, L., Iavarone, F., Orianas, A., Greco, V., Desiderio, C., Martelli, C., ... & Cabras, T. (2020). Enrichments of post-translational modifications in proteomic studies. *Journal of Separation Science*, 43(1), 313-336.
- Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., & Sánchez, S. (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1017-1039.
- 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.
- 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.
- Sun, C. F., Li, Y. Q., & Mao, X. M. (2020). Regulation of protein post-translational modifications on metabolism of actinomycetes. *Biomolecules*, 10(8), 1122.
- 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.

- 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.
- VanDrisse, C. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2019). Protein acetylation in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 73, 111-132.
- 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.
- Weatherburn, M. W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39:971–974
- Wu, X., Vellaichamy, A., Wang, D., Zamdborg, L., Kelleher, N. L., Huber, S. C., & Zhao, Y. (2013). Differential lysine acetylation profiles of *Erwinia amylovora* strains revealed by proteomics. *Journal of Proteomics*, 79, 60-71.
- Xu, H., Hegde, S. S., & Blanchard, J. S. (2011). Reversible acetylation and inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* acetyl-CoA synthetase is dependent on cAMP. *Biochemistry*, 50(26), 5883-5892.
- Xu, J. Y., Xu, Z., Liu, X., Tan, M., & Ye, B. C. (2018). Protein acetylation and butyrylation regulate the phenotype and metabolic shifts of the endospore-forming *Clostridium acetobutylicum*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(6), 1156-1169.
- Xu, Y., You, D., & Ye, B. C. (2017). Nitrogen regulator GlnR directly controls transcription of genes encoding lysine deacetylases in Actinobacteria. *Microbiology*, 163(11), 1702-1710.
- Yu, B. J., Kim, J., 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 & Cellular Proteomics*, 18(10), 2003-2017.

- Zhang, J., Sprung, R., Pei, J., Tan, X., Kim, S., Zhu, H., & Zhao, Y. (2009). Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *8*(2), 215-225.
- 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.