



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO

**METABOLISMO DE ALANTOÍNA EN *Streptomyces coelicolor*:  
RELACIÓN ENTRE METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO**

Presentada por

Lic. Laura Navone

Rosario, Argentina

2014

# METABOLISMO DE ALANTOÍNA EN *Streptomyces coelicolor*: RELACIÓN ENTRE METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO

Lic. Laura Navone

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la cátedra de Microbiología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Área Microbiología Básica, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2009 y el 12/02/2014, bajo la dirección de Dr. Eduardo Rodríguez y la co-dirección del Dr. Hugo Gramajo.



**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE ROSARIO**

---

*a mi familia*

## Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de un extenso proceso de trabajo que debe mucho a la colaboración y el apoyo que me brindaron varias personas.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director el Dr. Eduardo Rodríguez y a mi codirector el Dr. Hugo Gramajo, por haberme posibilitado llevar a cabo este trabajo de Tesis, por el constante aporte de ideas y por todo lo que me permitieron aprender.

También, agradezco al grupo de investigación del Dr. Esteban Marcellin Saldana, Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology de la Universidad de Queensland, Brisbane, Australia, que colaboró en la realización de los experimentos finales de esta tesis. Asimismo, a la Dra. Paula Casati y Mónica Hourcade que me ayudaron en ciertas etapas de este trabajo.

A todo el IBR, especialmente a mis compañeros de laboratorio Simón, Soni, Marian, Santi, Ber, Meli, Julita, el Cabru, Valen, Gastis y Ale por todo el apoyo a lo largo de estos años y por hacer tan divertidas las horas de trabajo.

Al Lautá, Anita y Gabi por todos los consejos y conocimientos transmitidos.

A mis amigos paceños por tantos momentos compartidos, y seguir a mi lado durante todos estos años.

A mis amigas de la facultad por todo lo que vivimos juntas, su ayuda y apoyo constante.

A mi familia, por el apoyo incondicional y el cariño. Principalmente a mis viejos y a mi hermano Gui porque sin ellos este logro no hubiera sido posible.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido presentados en las siguientes publicaciones y reuniones científicas.

Publicaciones:

**Navone L**, Casati P, Licon-Cassani C, Marcellin E, Nielsen LK, Rodriguez E, Gramajo H. *Allantoin catabolism influences the production of antibiotics in Streptomyces coelicolor*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014. **98**(1) p:351-60.

Reuniones científicas:

**Laura Navone**, Paula Casati, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. *Interaction between purine metabolism and poliketide production in Streptomyces coelicolor*. XLIVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2009. San Miguel de Tucumán, Tucumán. Argentina.

**Laura Navone**, Paula Casati, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. *Relationship between Purine metabolism and Antibiotic production in Streptomyces coelicolor*. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2010. Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

**Laura Navone**, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. *Purine Metabolism and Polyketide Production in Streptomyces coelicolor*. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Octubre 2011. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

**Laura Navone**, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. *Effect of primary metabolic pathways over triacylglycerol accumulation and antibiotic production in Streptomyces coelicolor*. XVI International Symposium on the Biology of Actinomycetes Diciembre 2011. Puerto Vallarta, México.

**Laura Navone**, Paula Casati, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. *Allantoin metabolism in Streptomyces coelicolor: crosstalk with antibiotic production*. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Octubre 2012. Mendoza, Argentina.

**Laura Navone**, Hugo Gramajo y Eduardo Rodríguez. **Allantoin metabolism regulation by AIR and its effect on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor***. IX Annual Meeting, Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Agosto 2013, Rosario, Argentina.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
El género <i>Streptomyces</i>	5
Metabolitos secundarios: compuestos policétidos	6
<i>Streptomyces coelicolor</i> como modelo de estudio	8
Regulación genética de la producción de metabolitos secundarios en <i>Streptomyces</i>	9
Influencia de la disponibilidad de nutrientes en la producción de metabolitos secundarios	11
(p)ppGpp	11
Fosfato	12
Nitrógeno	13
Carbono	14
Moléculas difusibles: $\gamma$ -butirolactonas	15
Influencia del metabolismo primario sobre la producción de antibióticos	16
Metabolismo de purinas	17
Metabolismo de xantina e hipoxantina	18
Metabolismo de alantoína en bacterias	20
Regulación del metabolismo de alantoína	22
Metabolismo de purinas en <i>S. coelicolor</i>	25
<b>OBJETIVOS</b>	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
Cepas bacterianas y plásmidos	31
Medios de cultivo	36
Medios de cultivo sólidos	36
Soja – Manitol (SM)	36
Medio mínimo suplementado sólido	37

Medios de cultivo líquidos	37
2xYT	37
TSB (Caldo Triptona Soja)	37
Medio mínimo suplementado líquido (MM)	38
Luria Bertani (LB)	38
Condiciones de crecimiento	39
Preparación de esporas de <i>Streptomyces</i>	39
Cultivos de <i>Streptomyces</i> en medio líquido	39
Cultivos de <i>E. coli</i> en medio líquido	39
Transformación de <i>E. coli</i>	40
Expresión heteróloga de proteínas en <i>E. coli</i>	40
Conjugación <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i>	41
Construcción de mutantes insercionales de <i>S. coelicolor</i>	42
Construcción de mutante $\Delta$ P-AllB	43
Detección de la producción de metabolitos secundarios	43
Determinación de actinorrodina	44
Determinación de undecilprodigiosina	44
Análisis <i>in vitro</i> de proteínas	44
Preparación de extractos proteicos de <i>E. coli</i>	44
Purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad	45
Tratamiento con Trombina	45
Dosaje de proteínas	46
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	47
Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)	47
Análisis transcripcional de fusiones reporteras	47
Ensayo de actividad catecol 2,3-dioxigenasa	47
Determinaciones enzimáticas	48
Determinación de actividad alantoinasa y alantoica	48
Determinación de actividad hidroxipiruvato isomerasa y tartronato semialdehído reductasa	50
Marcación isobárica para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ)	50
Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS)	51

Manipulaciones de ADN	52
Extracción de ADN genómico de <i>S. coelicolor</i>	52
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	52
Tratamiento con enzimas de restricción, ligasa y fosfatasa alcalina	52
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
Secuenciación de nucleótidos	53
Construcción de plásmidos	54
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	55
Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	55
Determinación de concentración de ADN en solución acuosa	55
Generación de sondas de ADN radiactivas	56
Ensayo de retardo en gel (EMSA)	56
Ensayos de protección por DNAasa I	58
Transferencia de ADN a membranas de nylon e hibridización con sondas radioactivas (Southern blot)	59
Métodos bioinformáticos	59
Manipulación de ARN	60
Extracción de ARN	60
Síntesis de ADNc	60
PCR semicuantitativa	61
Amplificación por PCR en tiempo real (RT-PCR)	61
Determinaciones de amonio y urea	61
Análisis de metabolitos intracelulares	62
Análisis de lípidos	63
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>METABOLISMO DE ALANTOÍNA EN <i>S. coelicolor</i></b>	<b>65</b>
Estudios proteómicos para la identificación de proteínas de la vía de la alantoína	66
Proteínas del metabolismo de nitrógeno, carbono y aminoácidos	69
Vía propuesta para el metabolismo de alantoína en <i>S. coelicolor</i>	73

Estudio transcripcional de los genes <i>aceB1</i> , <i>allB</i> y <i>alc</i> en presencia de alantoína	76
Estudio genético de la vía de alantoína	77
Análisis bioinformático de AllB y Alc	80
Caracterización bioquímica de las proteínas AllB y Alc	81
Análisis bioinformático de Hyi y GlxR	84
Caracterización bioquímica de las proteínas Hyi y GlxR	87
Efecto del crecimiento en alantoína sobre la producción de antibióticos	88
Análisis de la expresión del regulador ActIIORF4	90
Estudio metabolómico de <i>S. coelicolor</i> crecida en presencia de alantoína	90
Cambios producidos en el medio de cultivo por el metabolismo de alantoína	93
Efecto de la acumulación de amonio sobre la producción de antibióticos	94
Caracterización de la cepa mutante UreB <sup>-</sup>	97
Efecto sobre la producción de antibióticos frente a distintas concentraciones de alantoína	98
Otras fuentes de nitrógeno y sus efectos sobre la producción de antibióticos	99
Conclusiones y discusión	101
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE ALANTOÍNA EN <i>S. coelicolor</i></b>	106
Identificación y caracterización del regulador del metabolismo de alantoína en <i>S. coelicolor</i>	107
Estudios transcripcionales de los posibles blancos de AllR	113
Unión del regulador AllR al ADN	115
Identificación del sitio de unión de AllR	118
Estudio de efectores del regulador AllR	121
Efecto de la mutación <i>allR</i> sobre la producción de ATBs	123
Hipótesis sobre la disponibilidad del acetil-CoA	125
Hipótesis sobre la expresión de los genes de biosíntesis de antibióticos	127
Reversión del fenotipo de la mutante AllR <sup>-</sup>	132
Conclusiones y discusión	134
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	138

**RESUMEN**

141

**REFERENCIAS**

144

# ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Am	apramicina
Ap	ampicilina
ATP	adenosina trifosfato
ARN	ácido ribonucleico
Cm	cloranfenicol
CoA	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
csp	cantidad suficiente para
C-terminal	carboxilo terminal
dH <sub>2</sub> O	agua destilada
DMSO	dimetilsulfóxido
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ε	coeficiente de absortividad molar
G + C	guanina + citosina
GC-MS	cromatografía gaseosa acoplada a espectro de masas
GTP	guanosina trifosfato
h	hora (s)
Hyg	higromicina
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosido
iTRAQ	marcación isobárica para la cuantificación relativa y absoluta de proteínas
Km	kanamicina
LDH	lactato deshidrogenasa
LB	Luria Bertani

LC-MS	cromatografía líquida acoplada a espectro de masas
Mb	mega bases
min	minuto(s)
NRPS	sintetasa de péptido no ribosomal
N-terminal	amino terminal
<i>oriT</i>	origen de transferencia
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PKS	policétido sintasa
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
(p)ppGpp	guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato
P/V	peso en volumen
R	resistente
S	sensible
s	segundo(s)
SARP	proteína regulatoria de antibiótico de <i>Streptomyces</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAG	triacilglicéridos
TBE	Tris-Borato-EDTA
V/V	volumen en volumen
RT-PCR	PCR en tiempo real

# INTRODUCCIÓN

**El género *Streptomyces***

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecen al orden Actinomycetales, que comprende géneros como *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Micromonospora* y *Saccharopolyspora*. Son microorganismos Gram positivos de alto contenido de G+C en su genoma, aerobios estrictos y de morfología filamentosa [1].

El hábitat natural de estos microorganismos es principalmente el suelo y los sedimentos acuáticos. Debido a que estos ambientes son bióticamente diversos y sus componentes nutricionales fluctúan de manera considerable, *Streptomyces* presenta un arsenal de proteínas extracelulares como quitinasas, lipasas, amilasas, proteasas y celulasas que le permiten degradar gran variedad de restos orgánicos. A su vez, estos nichos ambientales resultan altamente competitivos por la presencia de una gran cantidad de organismos como hongos, nematodos, insectos y otras bacterias que se alimentan de los mismos nutrientes. Por lo que, las bacterias del género *Streptomyces* se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios en su mayoría antibióticos que le permiten competir frente a la escasez de nutrientes, aunque estas moléculas también pueden presentar funciones de señalización y comunicación celular [1, 2].

*Streptomyces* crece en forma de micelio, generando ramificaciones que constituyen las hifas vegetativas. Estas hifas se encuentran ocasionalmente divididas por lo que los streptomycetes representan uno de los pocos ejemplos de procariotas multicelulares. Ante la escasez de nutrientes, se inicia un proceso complejo de diferenciación morfológica que lleva a la formación de exoesporas en los extremos de las hifas aéreas que crecieron a partir del micelio vegetativo. Parte de este micelio se sacrifica mediante un proceso de muerte celular programada para liberar nutrientes que van a ser utilizados por las células sobrevivientes [3]. En la mayoría de los casos este proceso de diferenciación morfológica va acompañado de la producción de metabolitos secundarios en muchos casos con actividad antibacteriana. De aquí se desprende que la regulación de la producción de antibióticos comparte varios elementos con la regulación del proceso de esporulación [4] [5] [6].

Este género bacteriano ha despertado un gran interés industrial y medicinal debido a la gran variedad de metabolitos secundarios que produce. Alrededor de dos tercios de los antibióticos utilizados en medicina y veterinaria son sintetizados por

miembros de esta especie. Además de actividad antibiótica otros compuestos muestran actividades antifúngicas, antiparasitarias y anticancerígenas [7]. Otra faceta industrial muy importante de estos microorganismos es la producción y acumulación de triacilglicéridos en gran cantidad, característica poco frecuente en procariotas ([8] [9]).

### **Metabolitos secundarios: compuestos policétidos**

Los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por plantas, hongos y bacterias del suelo. Estos compuestos poseen un amplio rango de estructuras químicas y actividades biológicas, y juegan un importante rol en la supervivencia y en la diferenciación de los microorganismos. Algunas de las funciones biológicas que pueden cumplir son: agentes de defensa competitiva contra otras bacterias, hongos, insectos y animales superiores, agentes de transporte de metales, mediadores de simbiosis entre microbios, plantas, insectos o animales superiores, hormonas sexuales y efectores de diferenciación, entre otras [10].

Aquellos que muestran actividad antimicrobiana le brindan una ventaja adaptativa al microorganismo para colonizar sus nichos ecológicos, pero no son esenciales para su crecimiento [11].

Un conjunto particular de metabolitos secundarios está constituido por el grupo de los compuestos policétidos. Estos compuestos son estructuralmente muy diversos pero comparten el mismo patrón de biosíntesis. Son sintetizados tanto en procariotas como en eucariotas y cumplen diversas funciones tales como: micotoxinas, flavonoides, fitotoxinas y moléculas de señalización celular [12]. Estos productos naturales también proporcionan un asombroso número de drogas clínicamente activas, incluyendo antibióticos (eritromicina A, monensina A, rifamicina S), inmunosupresores (rapamicina), antifúngicos (amfotericina B), antiparasitarios (avermectina) y anticancerígenos (doxorubicina) [13].

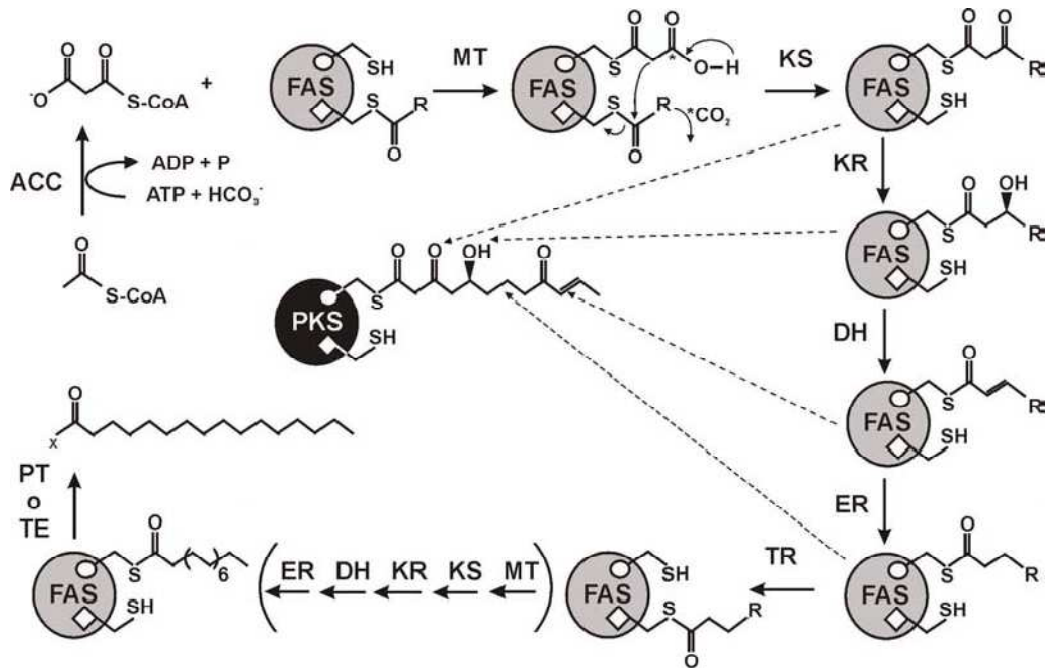
El proceso de biosíntesis de compuestos policétidos es similar a la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Figura 1). La enzima que cataliza el proceso de condensación se denomina policétido sintasa (PKS, del inglés “polyketide synthase”) y presenta homología estructural con la ácido graso sintasa (FAS, del inglés “fatty acid synthase”) [11] [12]. Estos compuestos, al igual que los ácidos grasos, se generan por

condensaciones sucesivas de pequeños ácidos carboxílicos activados como ésteres de CoA (generalmente acetil-, propionil-, butiril-, malonil-, metilmalonil-, o etilmalonil-CoA). De esta manera se genera una cadena lineal de carbonos, donde el carbono  $\beta$  lleva un grupo ceto y cada ácido carboxílico contribuye con dos átomos de carbono a la cadena creciente lineal. Cuando el ácido carboxílico tiene más de dos carbonos, los carbonos “extra” quedan como sustituyentes de la cadena lineal. Luego de la condensación, los grupos ceto pueden ser reducidos totalmente (como ocurre en la síntesis de ácidos grasos de cadena lineal), parcialmente (a hidroxilos o dobles enlaces) o quedar como tales. La permanencia de estos grupos ceto da el nombre de policétidos (o policetónicos) a esta familia de compuestos [11].

Una característica importante de la síntesis de policétidos es que el proceso de terminación de la misma suele estar acompañado de otros procesos como ciclación, lactonización, formación de anillos aromáticos y reacciones post-PKS como metilaciones, oxidaciones y agregado de azúcares [12]. Además existen otro grupo de compuestos conocidos como péptidos de síntesis no ribosomal sintetizados por el complejo catalítico NRPS (del inglés “non-ribosomal peptides synthetase”) y otros que son híbridos entre policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal [14].

Las NRPSs constituyen un complejo de módulos enzimáticos que catalizan condensaciones sucesivas de aminoácidos. A diferencia de la síntesis de péptidos ribosomales, existe una gran variedad de aminoácidos que sirven de sustratos para las NRPSs, como  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -amino ácidos.

En el caso de los compuestos híbridos entre policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal, como es el caso de bleomicina, rifamicina, pristamicina IIB y undecilprodigiosina, existen complejos de módulos capaces de catalizar condensaciones sucesivas entre aminoácidos y ésteres de CoA. La disposición de estos módulos enzimáticos determina el orden de incorporación de estas moléculas en la estructura final del compuesto [15].



**Figura 1. Representación esquemática de la biosíntesis de ácidos grasos y de compuestos policétidos.**

Los pasos enzimáticos involucrados en el proceso son: ACC, acetil-CoA carboxilasa; MT, malonil-CoA-ACP transferasa; KS, 3-cetoacil-ACP sintasa; KR, 3-cetoacil-ACP reductasa; DH, 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa; ER, enoil-ACP reductasa; TR: acil-ACP transferasa; TE: tioesterasa; PT: fosfotransferasa. Las flechas discontinuas representan las distintas vías que puede seguir la síntesis de policétidos luego de cada paso de condensación (6). ACP: proteína transportadora de grupos acilo.

### ***Streptomyces coelicolor* como modelo de estudio**

En las últimas décadas, se ha producido un gran avance científico con respecto a los mecanismos de biosíntesis y regulación de la producción de antibióticos, así como también del fenómeno de diferenciación morfológica en el género *Streptomyces*. La mayoría de estos estudios se han centrado en la especie *Streptomyces coelicolor* que constituye el organismo modelo dentro de este género bacteriano. Esta especie ha sido ampliamente estudiada gracias al desarrollo de herramientas genéticas y bioquímicas de gran utilidad [16].

El genoma de *S. coelicolor* se encuentra completamente secuenciado, presentando un contenido de G + C del 72 % y un tamaño de 8.6 Mb [17] [18]. Otra característica importante es la linealidad de su cromosoma, en cuyos extremos se encuentran repeticiones invertidas unidas covalentemente a proteínas, cuya función probable es servir de cebadores para la replicación de los extremos.

Esta especie produce al menos cuatro compuestos con actividad antimicrobiana en medio líquido durante fase estacionaria de crecimiento. Dos de estos compuestos poseen colores característicos, actinorhodina que es un compuesto de tipo policétido aromático de color azul a pH alcalino y undecilprodigiosina que es un compuesto híbrido entre policétido y péptido de síntesis no ribosomal de color rojo a pH neutro [19, 20]. Los colores de estos antibióticos fueron de gran ayuda para la obtención y el estudio genético de mutantes deficientes en la síntesis de los mismos. Cada monómero de actinorhodina es sintetizado a partir de una molécula de acetil-CoA y siete moléculas de malonil-CoA, mientras que undecilprodigiosina se sintetiza a partir de una molécula de glicina, una de prolina, una de serina y varias de acetato, que condensan previamente para formar 4-metoxi-2,2-bipirrol-5-carboxaldehído [21, 22]. Los otros dos compuestos conocidos son el antibiótico calcio dependiente [23] y la ciclopentanona metilenomicina codificada en el plásmido SCP1 [24]. Recientemente se ha descubierto un nuevo alcaloide de tipo policétido con actividad antimicrobiana producido por esta especie bacteriana, conocido con el nombre coelimicina P1 producto del cluster de genes *cpk* (del inglés “criptic polyketide”) [25, 26]. Aunque todos estos antibióticos poseen actividad antibacteriana, ninguno de ellos presenta aplicaciones comerciales.

### **Regulación genética de la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces***

Los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentran generalmente agrupados en una misma región del genoma e incluyen tanto los genes de síntesis, como así también genes de síntesis de precursores, de transporte, resistencia y regulación. En el género *Streptomyces*, generalmente la producción de metabolitos secundarios coincide con el proceso de diferenciación morfológica en medio sólido, y con la entrada en fase estacionaria de crecimiento resultado de la limitación de nutrientes en medio líquido.

Dentro de los genes regulatorios de la síntesis de metabolitos secundarios se encuentran los activadores transcripcionales específicos conocidos como URAPs de las siglas en inglés “ultimate regulator of antibiotic production”. La transcripción del conjunto de genes de biosíntesis de un metabolito secundario depende de la previa expresión de estos reguladores. En la mayoría de los casos existe un único URAP para

cada metabolito secundario que se encarga de traducir las distintas señales ambientales que afectan la producción del mismo. A su vez, todos los estudios realizados hasta el momento sostienen que el nivel de expresión de estos activadores transcripcionales es el factor principal que determina el nivel de expresión de los genes de síntesis y consecuentemente la cantidad de metabolito secundario producido [27, 28].

Muchos de los reguladores URAPs caracterizados pertenecen a la familia SARP (del inglés “*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins”) que se caracterizan por la unión a repeticiones directas de secuencias heptaméricas conservadas. Miembros de esta familia son ActIIORF4 y RedD, los activadores específicos de la síntesis de actinorhodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor*, así como también TylS, el activador de la síntesis de tilosina en *S. fradiae*, ThnU, el activador de la síntesis de thienamicina en *S. catleya* y FdmR1, el activador de la síntesis de fredericamicina A en *S. griseus*, entre otros [29-33].

Otra familia de reguladores URAPs es la familia LAL (“large ATP-binding members of LuxR family”) que incluye el regulador PikD de la síntesis de pikromicina de *S. venezuelae* y RapH de la síntesis de rapamicina de *S. hygroscopicus*, entre otros [34, 35].

Las señales externas, como la limitación de nutrientes que lleva a la disminución o cese del crecimiento, o los niveles de densidad celular, actúan sobre reguladores pleiotrópicos globales que en la mayoría de los casos son sistemas de dos componentes regulador/respuesta, y se encargan de transformar estas señales en variación en los niveles de expresión de los URAPs [14].

En el caso de *S. coelicolor*, la expresión del gen *actIIORF4* es sumamente compleja y han sido caracterizados varios reguladores capaces de unirse a la región promotora del mismo. Algunos de los reguladores que actúan sobre la expresión de *actIIORF4* son AbsA2, DasR y AtrA [36-38]. AbsA2 es el regulador respuesta de un sistema de dos componentes que cuando es fosforilado por AbsA1 es capaz de unirse a las regiones específicas en el ADN. Este regulador también regula la expresión de RedD y CdaR, el regulador de la síntesis del antibiótico calcio dependiente, y el conjunto de genes de síntesis de metillenomicina. La señal a la que responde este sistema de dos componentes aún no se conoce.

Otro regulador importante de la síntesis de actinorhodina es DasR, el mismo es el represor de los genes del metabolismo de N-acetilglucosamina (GlcNAc), el monómero de quitina, uno de los polisacáridos más importantes en la naturaleza ya que es el componente principal del exoesqueleto de artrópodos y la pared celular de hongos. La molécula efectora de DasR es la glucosamina-6-fostato, un intermediario del metabolismo de GlcNAc. La unión de esta molécula disminuye la afinidad de unión de este regulador al ADN, permitiendo la expresión de *actIIORF4* y los genes del metabolismo de GlcNAc. DasR también regula la expresión de RedD y CdaR [37, 39].

Por otro lado, el regulador AtrA es un activador de la transcripción de *actIIORF4*. La disrupción del gen *atrA* provoca una marcada disminución de la producción de actinorhodina en ciertas condiciones de crecimiento; mientras que la sobreexpresión de este regulador genera un aumento en los niveles de producción de actinorhodina. La molécula señal traducida por AtrA aún no se conoce, sin embargo, se piensa estaría involucrado en la regulación del metabolismo de acetil-CoA, precursor de la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor* [28].

### **Influencia de la disponibilidad de nutrientes en la producción de metabolitos secundarios**

#### **(p)ppGpp**

La limitación de nutrientes es un factor principal que desencadena la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*. Una molécula clave asociada íntimamente con este fenómeno es (p)ppGpp (guanosina tetra- y penta- fosfato). La acumulación de (p)ppGpp se reconoce ampliamente como la señal que desencadena la respuesta astringente (del inglés “stringent response”) en bacterias, permitiendo la supervivencia en condiciones de falta de nutrientes. La respuesta astringente es una respuesta fisiológica pleiotrópica durante la cual ocurren complejos cambios en el patrón de expresión génica como por ejemplo represión de la síntesis de rARN y tARN, y el aumento de la expresión de genes asociados de fase estacionaria y de síntesis de aminoácidos [40]. En el género *Streptomyces*, la acumulación de (p)ppGpp no sólo desencadena la producción de metabolitos secundarios sino que también tiene efectos sobre el desarrollo morfológico [41].

Los niveles de (p)ppGpp dependen del balance de dos actividades enzimáticas, una pirofosfoquinasa o sintetasa y una pirofosfohidrolasa. En *E. coli*, existen dos enzimas homólogas capaces de sintetizar (p)ppGpp a partir de GTP y ATP, llamadas SpoT y RelA [40]. La proteína RelA se encuentra asociada con el ribosoma y se activa cuando un tRNA no cargado con el aminoácido correspondiente se une al sitio A de esta organela, por lo que responde a condiciones de escasez de nitrógeno. En estas condiciones la enzima RelA cataliza la formación de (p)ppGpp a partir de la transferencia de un grupo pirofosfato de un ATP a un GTP. Mientras que la proteína SpoT produce (p)ppGpp en respuesta a varias condiciones de estrés nutricionales, como de escasez de carbono, fosfato, hierro o ácidos grasos [40]. A su vez, la proteína SpoT también presenta actividad pirofosfohidrolasa, que es capaz de degradar (p)ppGpp.

*S. coelicolor* presenta dos homólogos RelA/SpoT, el primero en ser descubierto se denominó RelA mientras que el segundo RshA. Ambas proteínas, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, presentan actividad tanto sintetasa como hidrolasa. RelA se encuentra interaccionando con el ribosoma y es requerida para la síntesis de (p)ppGpp en condiciones limitantes de nitrógeno o glucosa. Una mutante  $\Delta relA$  es incapaz de producir ACT y RED en estas condiciones [42]. La imposibilidad de sintetizar estos antibióticos se asocia a una importante disminución de los niveles de transcripto *actIIORF4* y *redD*, indicando un rol de (p)ppGpp en la activación de la transcripción de estos SARPs aunque el mecanismo exacto aún no se conoce. A su vez, la estimulación de la síntesis de (p)ppGpp aumenta los niveles de expresión de *actIIORF4* y *redD* y consecuentemente de la producción de ambos antibióticos [41, 43, 44]. Por otro lado, la proteína RshA es necesaria para la síntesis de (p)ppGpp en condiciones limitantes de fosfato [44].

### **Fosfato**

Los niveles de fosfato en el medio de crecimiento tienen un efecto importante sobre la producción de metabolitos secundarios en varias especies de *Streptomyces*. Se conoce un número considerable de antibióticos que son regulados negativamente por altas concentraciones de fosfato, estos incluyen streptomina, oxitetraciclina, ácido

clavuránico, tilosina, cefalosporina, así como también actinorhodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor*, entre otros [45, 46].

El sistema encargado de traducir los niveles de fosfato intracelular en respuestas fisiológicas es el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. Cuando la cantidad de fosfato no es suficiente para el crecimiento, la proteína histidinkinasa PhoR fosforila el regulador respuesta PhoP. De esta manera, PhoP-fosforilado es capaz de unirse a las secuencias específicas en el ADN, regulando la transcripción de los genes blanco, por ejemplo activando la transcripción de genes que codifican para fosfatasas, fosfolipasas y transportadores de fosfato. A su vez, el sistema PhoR-PhoP también es capaz de regular genes del metabolismo de carbono y de nitrógeno, generando una red compleja de regulación del metabolismo primario [47].

Este sistema PhoR-PhoP también se encuentra involucrado en la regulación de la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor*. Una delección del gen *phoP* o de los genes *phoR-phoP* provoca un aumento de los niveles de producción de actinorhodina y undecilprodigiosina. Sin embargo, no existe una interacción directa de PhoP con las regiones promotoras de los genes *actIIORF4* y *redD* ni de los genes de biosíntesis. Es por esto que existiría una cascada de señalizaciones con otros genes regulatorios que mediaría esta interacción [45].

### **Nitrógeno**

En la mayoría de las bacterias existen dos formas de asimilación de nitrógeno. Una para altas concentraciones (> 1 mM) mediada por una enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que sintetiza glutamato a partir de oxoglutarato y amonio sin consumo de ATP y otra para bajas concentraciones mediada por dos enzimas, una glutamina sintetasa (GS) y una glutamato sintetasa (GOGAT). GS cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio mediante consumo de una molécula de ATP, y luego GOGAT cataliza la síntesis de dos moléculas de glutamato a partir de glutamina y oxoglutarato. Glutamato y glutamina representan de esta manera dos moléculas clave en el metabolismo primario ya que son dadoras de nitrógeno para todas las reacciones de biosíntesis [48].

Debido a que el hábitat natural de *Streptomyces* es el suelo y el nitrógeno es uno de los nutrientes limitantes de este nicho, la enzima GS es la más importante en la

asimilación de nitrógeno. *S. coelicolor* presenta cinco genes putativos que codifican para enzimas GS, sin embargo, únicamente el producto de dos de estos genes fueron caracterizados como proteínas con actividad GS. Estos son *glnA* que codifica para la glutamina sintetasa I (GSI) y *glnII* que codifica para la glutamina sintetasa II (GSII) [49-51].

La regulación del metabolismo de nitrógeno en *S. coelicolor* es mediada por la proteína GlnR. Este regulador controla la síntesis de genes relacionados con el transporte y la asimilación de nitrógeno entre ellos *glnA*, *glnII*, *gdhA*, el gen que codifica para la GDH, y *amtB*, el gen que codifica para la proteína transportadora de amonio [52, 53]. A su vez, existe un segundo regulador denominado GlnRII que también controla la expresión de alguno de los genes del metabolismo de nitrógeno, pero su función no se conoce con exactitud [53].

Por otro lado, al igual que en otros géneros bacterianos, en *S. coelicolor* existe una regulación post-transcripcional de la actividad GSI mediada por una enzima adenililtransferasa conocida como GlnE. Este mecanismo permite modificar rápidamente los niveles de actividad de la enzima GSI frente a cambios en la concentración de nitrógeno [54].

Varios estudios han demostrado que la fuente de nitrógeno disponible para el crecimiento tiene efectos sobre la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* [46, 55-58]. En la mayoría de los casos, la producción de antibióticos se observa disminuida en presencia de fuentes de nitrógeno favorables para el crecimiento. Una explicación fisiológica para esto sería que en presencia de estas fuentes de nitrógeno la bacteria utiliza el carbono disponible para el crecimiento y la generación de biomasa, y en consecuencia, se produce una disminución de esqueletos carbonados para la síntesis de metabolitos secundarios [28].

### **Carbono**

La disponibilidad y la fuente carbono también tiene un efecto importante sobre la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica en *Streptomyces*. A modo de ejemplo, la presencia de glucosa inhibe la producción de actinorhodina en *S. coelicolor*, de cloranfenicol en *S. venezuelae*, de cefamicina en *S. clavuligerus* y de estreptomicina en *S. griseus* [59-61]. Esto es así debido a que la glucosa es el producto

final de degradación de muchas enzimas como amilasas, celulasas, invertasas y maltasas, por lo que los niveles de glucosa denotan la cantidad de carbohidrato disponible para el crecimiento.

Otra fuente de carbono que afecta la producción de antibióticos es la GlcNac. Esta molécula es utilizada como fuente de carbono en *S. coelicolor*, sin embargo, el efecto de la misma sobre la producción de antibióticos depende de la composición del medio. En medio rico, la presencia de GlcNac inhibe completamente el desarrollo morfológico y la producción de antibióticos, mientras que en medio mínimo acelera estos procesos. Estas respuestas fisiológicas son mediadas por el regulador DasR [39, 62].

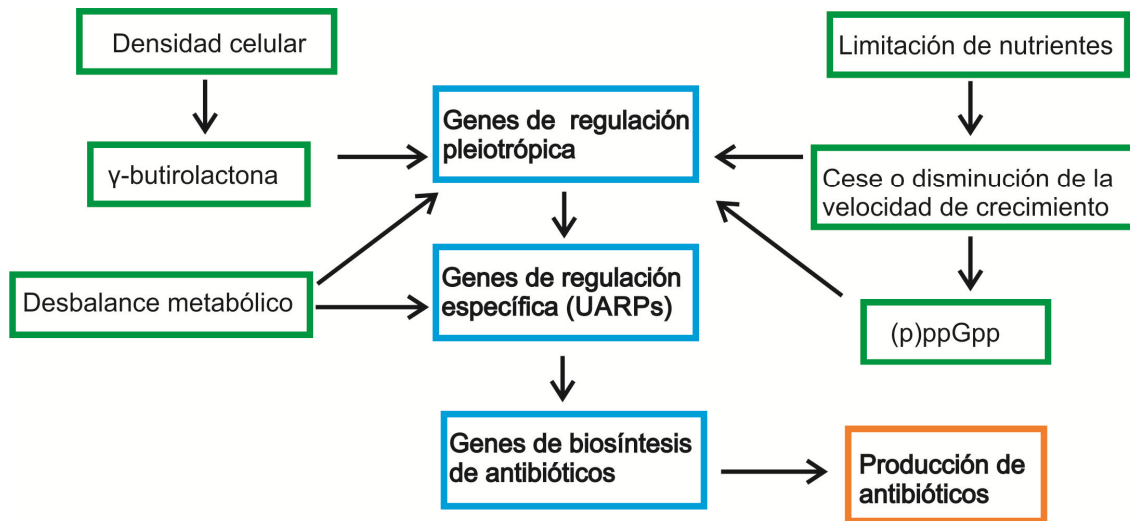
### **Moléculas difusibles: $\gamma$ -butirolactonas**

Existen moléculas extracelulares difusibles del tipo  $\gamma$ -butirolactonas que juegan un rol importante en la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos en *Streptomyces*. Estas moléculas se unen a receptores citoplasmáticos e inhiben la unión de los mismos a las secuencias específicas en el ADN. En la mayoría de los casos, estos receptores actúan como represores por lo que la presencia de las  $\gamma$ -butirolactonas permite la expresión de los genes blanco [63].

En *S. coelicolor*, el locus *scbAR* se encuentra involucrado en la producción de la hormona difusible, denominada SCB1, la cual afecta de manera notable la producción de actinorhodina, undecilprodigiosina y coelimidina P1 [63, 64]. ScbA es la proteína encargada de la síntesis de SCB1, mientras que ScbR es el receptor de SCB1. ScbR se une a su propio promotor y al del gen *scbA* por lo cual regula la producción de SCB1. A su vez, este regulador también se une al promotor del gen *cpkO* que codifica para el activador transcripcional específico de coelimidina P1, reprimiendo su expresión. En presencia de SCB1, ScbR se libera de esta región y se produce la síntesis de coelimidina P1 [64].

La mutante  $\Delta scbA$ , incapaz de sintetizar SCB1, produce actinorhodina y undecilprodigiosina tempranamente comparado con la cepa salvaje, y los niveles de producción ambos antibióticos son mayores [65]. Sin embargo, está propuesto que el efecto sobre la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina de la hormona SCB1 es indirecto debido a que ScbR no tiene sitio de unión en los promotores de los genes

*actIIORF4* ni *redD* ni en los genes biosintéticos de estos antibióticos. Probablemente, la reducción de producción de coelicina P1 aumenta la disponibilidad de precursores para la síntesis de actinorhodina y undecilprodigiosina, observándose un aumento en los niveles de estos antibióticos en la mutante  $\Delta scbA$  [63].



**Figura 2.** Factores que determinan la producción de antibióticos en *Streptomyces*.

### Influencia del metabolismo primario sobre la producción de antibióticos

El género *Streptomyces* ha sido y continúa siendo explotado para la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, por lo que existe un gran interés en el mejoramiento de la producción de estos compuestos naturales. La mayoría de los estudios realizados sobre la producción de antibióticos policétidos en el género *Streptomyces* se han enfocado en las rutas biosintéticas de los mismos o en su regulación. Sin embargo, menos atención ha recibido el metabolismo primario que es la fuente de precursores para la síntesis de los mismos. Algunos estudios realizados en los últimos años han demostrado que la manipulación de rutas metabólicas primarias es una herramienta muy importante para el mejoramiento de la producción de antibióticos. A modo de ejemplo, la inactivación del gen *gap1* que codifica para la enzima gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa mejora la producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus* debido al aumento de los niveles de precursor gliceraldeído-3-fosfato [66]. La sobreexpresión de la acetil-CoA carboxilasa (*acc*) en *S. coelicolor* mejora los niveles de producción de ACT, ya que el producto de esta enzima,

malonil-CoA, es un precursor importante de la síntesis de este antibiótico [67]. La inactivación de genes que codifican para enzimas del ciclo de Krebs, como la citrato sintasa (*citA*) y la aconitasa (*acoA*), o en el gen que codifica para la enzima fosfofructoquinasa (*pfkA2*) de glicólisis, también afectan los niveles de producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor* [68-70]. A su vez, en nuestro laboratorio también se estudió el efecto de la inactivación de las enzimas málicas en *S. coelicolor* observándose una marcada alteración de la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina que se debería a una acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs [71].

Para continuar con el análisis de cómo las vías metabólicas primarias afectan el metabolismo secundario en el género *Streptomyces*, en este trabajo nos centramos particularmente en el catabolismo de una fuente de carbono y nitrógeno abundante en el hábitat natural de *Streptomyces* y como esta contribuye o afecta la producción de compuestos de relevancia biotecnológica.

### **Metabolismo de purinas**

En el suelo, hábitat natural de *Streptomyces*, una de las fuentes principales de carbono y nitrógeno son las purinas y sus derivados de degradación. Las purinas se acumulan a partir de tejidos en descomposición, organismos muertos, o también son excretados como productos de desecho por organismos vivos como plantas y animales [72].

Las vías metabólicas de degradación de purinas son muy variadas, algunos organismos son capaces de degradar las purinas completamente a dióxido de carbono y amonio, mientras que otros presentan vías metabólicas incompletas y liberan al medio diferentes compuestos de degradación como ácido úrico o alantoína [73].

En humanos, aves, reptiles y la mayoría de los insectos, ácido úrico es el producto final de la vía de degradación de purinas y es excretado al medio. Los organismos uricolíticos, como la mayoría de los mamíferos, algunos insectos y gastrópodos liberan alantoína como producto final. Mientras que peces y anfibios degradan las purinas completamente a urea, amonio y CO<sub>2</sub> [74-77]. El producto final de excreción en animales estaría relacionado con un fenómeno de conservación de agua durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta. Si el producto de excreción

es amonio significa que existe suficiente cantidad de agua para una rápida eliminación de este compuesto tóxico. Si el producto de excreción es urea, existe menor disponibilidad de agua y la urea es un compuesto con menor toxicidad que puede ser retenido por más tiempo en el organismo [78].

En plantas el producto de degradación principal es amonio y  $\text{CO}_2$ , sin embargo, en algunos tejidos vegetales, la alantoína es un importante compuesto de almacenamiento y transporte de nitrógeno a otros tejidos [79]. Bacterias y hongos son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos para el crecimiento incluidas las purinas o sus derivados de degradación, estas pueden ser utilizadas en la mayoría de los casos como única fuente de nitrógeno y en otros casos como única fuente de carbono y nitrógeno [80].

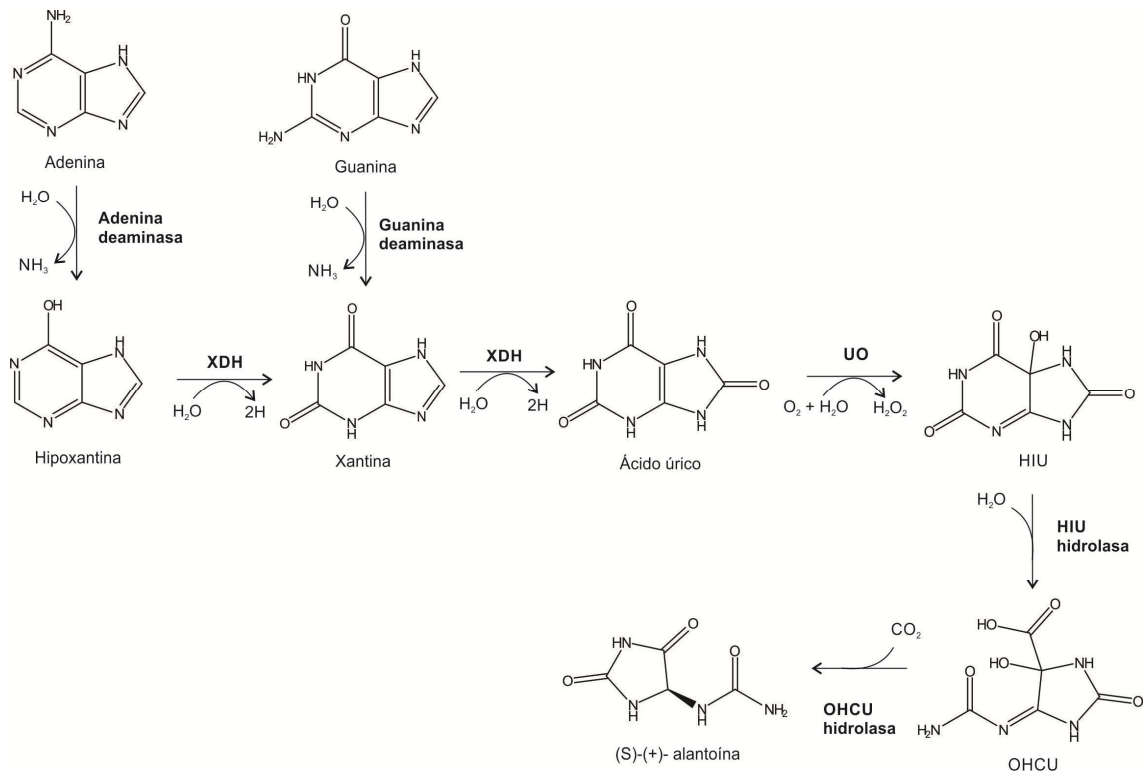
Una vez que las purinas son transportadas al interior celular por transportadores de membrana específicos [81], las mismas pueden entrar en vías de salvataje de purinas (del inglés "salvage pathways") que se encargan de reciclar estas purinas, incluidas xantina e hipoxantina, y convertirlas en nucleosidos, o bien ser catabolizadas para el crecimiento.

El primer paso en la asimilación de adenina y guanina es una reacción de deaminación que libera una molécula de amonio e hipoxantina o xantina, respectivamente. Posteriormente la asimilación de hipoxantina/xantina puede dividirse en dos partes, una primera parte de transformación a alantoína y una segunda parte de degradación de alantoína a amonio y  $\text{CO}_2$ . La primera etapa de esta vía es común en todas las especies bacterianas, mientras que el metabolismo de alantoína puede seguir diferentes rutas dependiendo de la especie microbiana.

### **Metabolismo de xantina e hipoxantina**

La enzima xantina deshidrogenasa (XDH) es la primera en actuar sobre las moléculas de hipoxantina o xantina, oxidándolas a ácido úrico. Estas proteínas son molibdoflavoenzimas altamente conservadas tanto en bacterias como animales y plantas, que catalizan una hidroxilación de los átomos de carbono utilizando oxígeno de la molécula de agua en lugar de  $\text{O}_2$ , y no requieren de una fuente externa de equivalentes de reducción. Posteriormente, la enzima uricasa o urato oxidasa (UO) se encarga de oxidar el ácido úrico a alantoína. Recientemente, se ha propuesto que la

conversión de ácido úrico a alantoína es mediada por tres pasos enzimáticos donde la enzima UO únicamente catalizaría la primera de estas reacciones. El ácido úrico sería oxidado a 5-hidroxiisourato (HIU) por UO, luego HIU es transformado en 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-ureidoimidazolina (OHCU) por la enzima HIU hidrolasa, y finalmente OHCU sufre una descarboxilación estereoselectiva por la acción de la enzima OHCU descarboxilasa para dar (S)-(+)-alantoína y  $\text{CO}_2$ . La molécula de HIU puede sufrir una conversión espontánea, pasando por el intermediario OHCU, a una mezcla racémica (+/-) alantoína, por eso inicialmente se pensó que UO catalizaba la reacción completa. Sin embargo, las enzimas subsecuentes de la vía de degradación de alantoína utilizan únicamente la forma dextro rotatoria de alantoína, lo que condujo a la búsqueda de otras proteínas implicadas en la reacción [82, 83] (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del metabolismo de adenina y guanina a alantoína en bacterias.

El crecimiento de *E. coli* a partir de purinas como única fuente de nitrógeno y carbono aún hoy se encuentra en discusión. La mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas de suelo son capaces de crecer en adenina, guanina, xantina y ácido úrico como única fuente de carbono y nitrógeno. La mayoría de las enzimas del metabolismo de purinas

han sido caracterizadas en esta especie bacteriana, como son adenina deaminasa, guanina deaminasa, adenosina deaminasa, xantina fosforibosil transferasa, XDH, UO, entre otras [80, 84, 85].

En *B. subtilis* todas las purinas pueden ser utilizadas como fuente de nitrógeno cuando otras fuentes de nitrógeno preferidas para el crecimiento no se encuentran disponibles. Las enzimas adenina deaminasa y guanina deaminasa han sido caracterizadas en esta especie [86, 87].

Varias especies del género *Pseudomonas* son capaces de crecer en purinas como única fuente de carbono y nitrógeno. *P. aeruginosa* y *P. acidovorans* pueden utilizar adenina, guanina, hipoxantina y xantina como única fuente de nitrógeno, mientras que *P. acidovorans* también es capaz de crecer en estos compuestos como única fuente de carbono [80, 88]. La mayoría de las enzimas del metabolismo de purinas en este género bacteriano han sido estudiadas en *P. aeruginosa*, *P. acidovorans* y *P. fluorescens*, como son las enzimas adenina deaminasa, guanina deaminasa, XDH y UO [89-91]. Estas tres especies bacterianas además son capaces de crecer ácido úrico o alantoína como única fuente de carbono y nitrógeno [80, 92].

### **Metabolismo de alantoína en bacterias**

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo de alantoína varía según la especie bacteriana. *E. coli* es capaz de crecer en alantoína como única fuente de nitrógeno pero únicamente en condiciones anaeróbicas. Como se muestra en la Figura 4, la alantoína es convertida en alantoato mediante la enzima alantoinasa (AIIb), luego la enzima alantoato amidohidrolasa (AIIc) transforma este alantoato en ureidoglicolato liberando en el proceso dos moléculas de  $\text{NH}_4^+$ . El ureidoglicolato representa un punto de ramificación de la vía ya que es sustrato de dos enzimas diferentes, la ureidoglicolato deshidrogenasa (AIIId) y la ureidoglicolato liasa (AIIa). La enzima ureidoglicolato deshidrogenasa transforma este sustrato en ácido oxalúrico que es luego metabolizado en oxamato,  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$  por la acción secuencial de las enzimas oxamato transcarbamoilasa (OXTc) y carbamato fosfotransferasa (CPT). La enzima ureidoglicolato liasa transforma el sustrato en glioxilato y urea [93]. Finalmente, el glioxilato es transformado en 3-fosfoglicerato por la acción secuencial de las enzimas tartronato semialdehído reductasa (GlXR) y glicerato quinasa (GlxK) [94, 95]. La enzima

hidroxipiruvato isomerasa (Hyi) también formaría parte de esta vía, generando hidroxipiruvato a partir de tartronato semialdehído, sin embargo, hasta el momento no se conoce con exactitud el destino metabólico de esta molécula, se propone es utilizada para la síntesis de serina [96] (Figura 4).

Los genes que codifican para la mayoría de las enzimas de esta vía se encuentran en la misma región del cromosoma y están organizados en tres unidades transcripcionales que constituyen el regulon de alantoína.

El metabolismo de alantoína en *B. subtilis* es igual al que ha sido propuesto *E. coli*, presentando las enzimas alantoinasa (PucH), alantoato amidohidrolasa (PucF) y ureidoglicolato liasa (PucG). Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran agrupados en una misma región del genoma junto con genes del metabolismo inicial de purinas (XDH y UO) y genes que codifican para transportadores de xantina, ácido úrico y alantoína [97](Figura 4).

El metabolismo de alantoína en *Pseudomonas* presenta varias diferencias con respecto a las vías mencionadas antes. En primer instancia la conversión de alantoína a alantoato es mediada por una proteína recientemente caracterizada en *P. fluorescens* conocida como PuuE que tiene alta homología con proteínas polisacárido deacetilasas. Si bien el producto final de reacción es alantoato, al igual que en el caso de la enzima alantoinasa de *E. coli*, el mecanismo de reacción es distinto [98]. Por otro lado, la transformación de alantoato en ureidoglicolato es mediada por una enzima alantoicasa (PuuF) que libera urea en lugar de  $\text{NH}_4^+$  como ocurre en el caso de la enzima alantoato amidohidrolasa de *E. coli* [99, 100]. El ureidoglicolato es luego metabolizado a glioxilato y urea por una enzima ureidoglicolato liasa (PuuG) al igual que en *E. coli* [101] (Figura 4).

Los genes que codifican las enzimas de los pasos iniciales de deaminación de adenina y guanina (adenina deaminasa y guanina deaminasa) se encuentran en una región cromosómica, mientras que los genes del metabolismo de hipoxantina y los pasos sucesivos de degradación de ácido úrico y alantoína se encuentran agrupados en otra región cromosómica en *P. aeruginosa* [102].



AllS. En ausencia de AllS los genes bajo el control del promotor *allD<sub>p</sub>* no se transcriben. Cuando las concentraciones de glioxilato intracelular aumentan, el represor AllR se libera de sus sitios operadores permitiendo la transcripción a partir de *allA<sub>p</sub>* y *gcl<sub>p</sub>*, esto ocurre en condiciones tanto de anaerobiosis como aerobiosis. Para que la expresión a partir de *allS<sub>p</sub>* sea completa se requiere de otros factores aún no identificados que actúan en *trans* y que responden a condiciones anaeróbicas y de limitación de nitrógeno. Cuando esto ocurre, altos niveles del activador AllS junto con altas concentraciones de alantoína activan la transcripción a partir de *allD<sub>p</sub>* [94, 95](Figura 5).

El regulador AllR pertenece a la familia IclR, cuyo miembro fundador es el regulador del ciclo del glioxilato en *E. coli*, IclR. Estos reguladores presentan un sitio HTH (del inglés helix turn helix) de unión a ADN en el extremo N-terminal y un sitio de interacción con moléculas efectoras en el extremo C-terminal. Además de glioxilato, que actúa como activador del metabolismo de alantoína, interaccionando con AllR y desestabilizando la unión a ADN, posteriormente se propuso que alantoína es un co-represor de AllR, aumentando la afinidad del mismo por sus sitios operadores [108]. Sin embargo, la función de la molécula de alantoína y su interacción con AllR aún no ha sido incluida en el modelo de regulación anteriormente descrito.

Los sitios específicos de unión del regulador AllR han sido caracterizados y los mismos son casi completamente palindrómicos. La proximidad de estos sitios de unión a los sitios de inicio de la transcripción de los genes que regula permiten inferir que este represor inhibe el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa debido a un impedimento estérico o por inhibición por contacto. AllR se une como tetrámero a los sitios operadores, este estado oligomérico se produce por interacción dímero-dímero de los extremos C-terminales. La formación de los dímeros por el contrario, se da mediante los extremos N-terminales de los monómeros [109].

Por otro lado, el regulador AllS no ha sido ampliamente caracterizado, el mismo pertenece a la familia LysR, estos reguladores requieren de la interacción con una molécula co-inductora que produce un cambio conformacional y aumenta la afinidad de unión a los sitios específicos en el ADN. Esta molécula sería alantoína según el modelo de regulación anteriormente descrito [95].

En *B. subtilis*, existe un único regulador transcripcional, PucR, que posee una función dual de activador y represor. Este regulador no solo controla la expresión de los genes de degradación de alantoína sino también la de otros genes involucrados en el metabolismo de purinas. En condiciones de limitación de nitrógeno y exceso de purinas o intermediarios de degradación de estas moléculas, se activa la expresión de PucR que, por un lado, reprime los genes que codifican para el complejo XDH y su propia expresión, mientras que por otro lado, activa los genes que codifican para las enzimas del metabolismo de ácido úrico y alantoína como UO, alantoinasa, alantoato amidohidrolasa, ureidoglicolato liasa y el gen que codifica para la adenina deaminasa. La expresión del gen *pucR* a su vez estaría regulada por el regulador global del metabolismo de nitrógeno en *B. subtilis*, TnrA [97, 107].

El mecanismo de regulación del catabolismo de purinas en *B. subtilis* es distinto al propuesto en *E. coli*, y PucR no presenta homología con los reguladores AllR o AllS de esta bacteria [107]. En *Pseudomonas* aún no se conoce el regulador transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de purinas o alantoína.

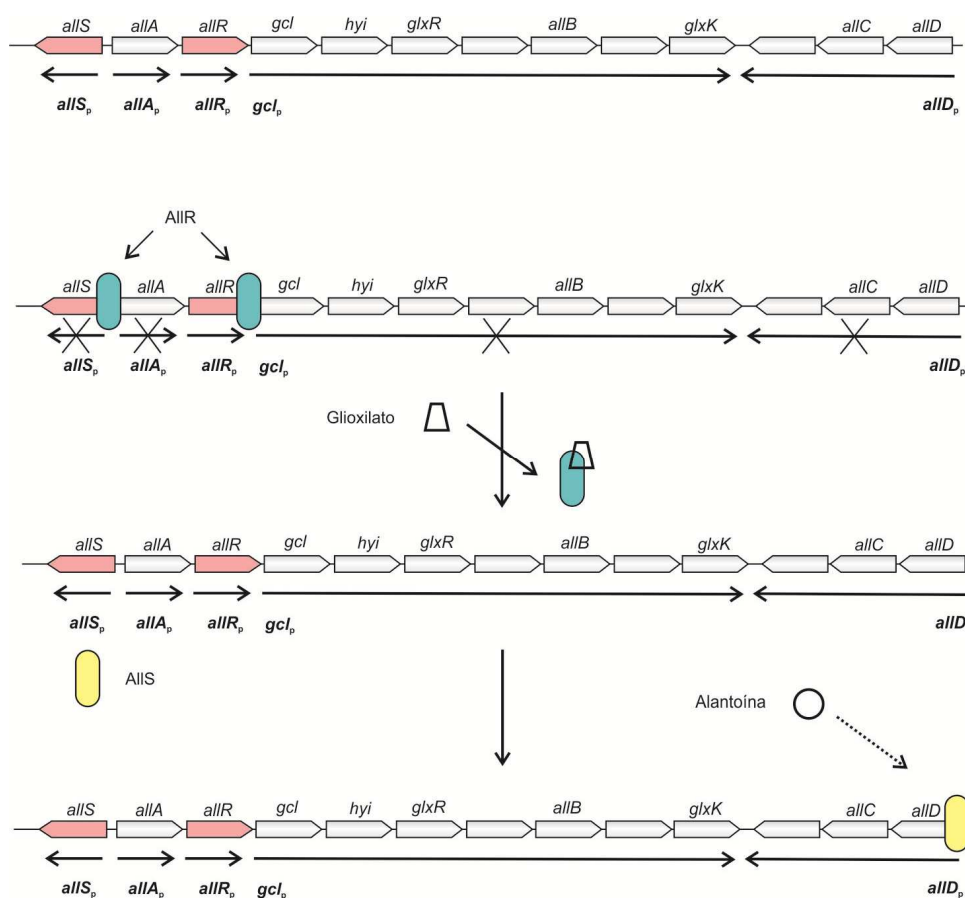
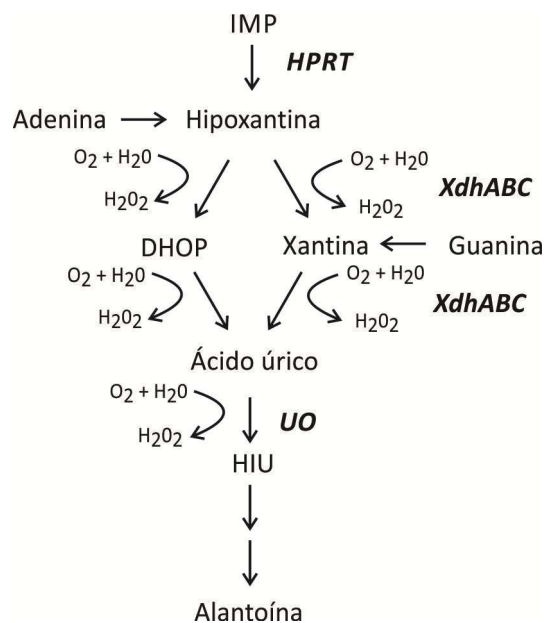


Figura 5. Regulon alantoína en *E. coli*.

### Metabolismo de purinas en *S. coelicolor*

En el género *Streptomyces* las vías de recuperación de purinas que permiten el mantenimiento de la homeostasis de estos compuestos o las vías catabólicas que permiten la utilización de purinas como fuente de nitrógeno o carbono han sido poco estudiadas [110]. Únicamente cuatro enzimas de esta vía han sido caracterizadas hasta el momento en *S. coelicolor* y *S. cyanogenus*. Las mismas son la hipoxantina fosforibosil-transferasa (HPRT), XDH, UO y adenosina deaminasa [111-113].

La enzima HPRT cataliza la conversión de inosine-5'-fosfato (IMP) en hipoxantina [111], luego la oxidación de hipoxantina a ácido úrico es catalizada por la enzima XDH en dos pasos pasando por el intermediario xantina o en menor medida por 6-8-dihidroxipurina (DHOP) [112, 114]. Finalmente, la oxidación de ácido úrico a alantoína ocurre mediante tres pasos enzimáticos donde únicamente se conoce el primer paso mediado por la enzima UO, que oxida el ácido úrico a HIU [113] (Figura 6). Las reacciones catalizadas por XDH y UO generan moléculas de  $H_2O_2$  por lo que también se encuentran asociadas a esta vía enzimas catalasas.



**Figura 6.** Metabolismo de purinas en *S. coelicolor*.

La proteína HPRT fue purificada a partir de *S. cyanogenus* por Ohe y Watanabe [115] y cataliza una reacción reversible, encontrándose involucrada tanto en el

anabolismo como en el catabolismo de nucleótidos. La dirección de la reacción depende de la expresión de la enzima XDH que desplaza la reacción a favor de la formación de ácido úrico y el catabolismo de IMP [116, 117]. Se supone que la expresión de HPRT es constitutiva durante todo el crecimiento del organismo por lo que, en presencia de hipoxantina agregada al medio de cultivo, la reacción se desplaza hacia la síntesis de IMP. Sin embargo, en fase exponencial tardía la proteína XDH comienza a expresarse y la reacción se desplaza a favor del catabolismo de este nucleótido. Este fenómeno se encuentra favorecido en condiciones de escasez de nitrógeno [117].

La enzima UO también fue purificada de *S. cyanogenus* por Ohe y Watanabe [118]. Al igual que en otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Bacillus* [91, 119], la enzima uricasa de *S. cyanogenus* no requiere de cationes  $\text{Cu}^{+2}$  o  $\text{Fe}^{+2}$  como las uricasas eucariotas [120].

La proteína UO es de gran interés biotecnológico ya que es utilizada en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de la gota y además para ensayos de diagnóstico de ácido úrico donde este se utiliza como reactivo principal. En la actualidad se utiliza la proteína UO de *Aspergillus flavus* obtenida de manera recombinante en *S. cerevisiae*. Sin embargo, los estudios en busca de proteínas más adecuadas continúan hoy en día luego del descubrimiento de otras enzimas implicadas en el catabolismo de ácido úrico [83]. Estudios bioinformáticos realizados recientemente determinaron que la enzima UO de una especie poco conocida de *Streptomyces*, *S. bingchenggensis BCW-1*, sería buena candidata para aplicaciones médicas debido a una mayor especificidad de sustrato para ácido úrico

[121].

Otra enzima caracterizada del metabolismo de purinas en el género *Streptomyces* es la enzima adenosina deaminasa que cataliza la deaminación irreversible de adenosina en inosina y amonio. Esta actividad fue descubierta en primera instancia en el sobrenadante de cultivos de especies de *Streptomyces* y luego purificada y caracterizada en *S. coelicolor* [122, 123].

La actividad XDH fue estudiada recientemente en *S. coelicolor* mediante la identificación de tres genes (*xdhABC*) que codificarían para subunidades de un complejo XDH. XdhA forma el centro de unión de hierro-azufre [ $2\text{Fe}-2\text{S}$ ], XdhB une el

dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y XdhC es la subunidad de unión a molibdopterina. Este complejo proteico no fue purificado pero se determinó su actividad mediante ensayos enzimáticos realizados en extractos proteicos totales provenientes de una mutante en los genes *xdhABC* y comparando con la cepa parental. En estos estudios también se caracterizó el regulador transcripcional negativo de estos genes, XdhR, cuyo gen codificante se encuentra corriente abajo de *xdhABC*. Este represor pertenece a la familia de reguladores TetR y la inactivación del mismo tiene efectos sobre la producción de antibióticos y el desarrollo morfológico de la cepa de *S. coelicolor*. Los autores sostienen que este efecto se debería a una expresión inapropiada del complejo XDH en la mutante  $XdhR^-$ , que provocaría un aumento en los niveles de xantina y GTP en las células y consecuentemente un aumento de molécula señalizadora (p)ppGpp [124].

El metabolismo a partir de alantoína y la incorporación de las moléculas de degradación de la misma al metabolismo central no han sido estudiadas en ninguna especie de *Streptomyces*. Las primeras evidencias de la presencia de actividad alantoinasa y alantoicasa en *Streptomyces* provienen de estudios de fines de la década del 70 por Ohe y Watanabe. Estos autores determinaron el crecimiento de *S. cyanogenus* usando hipoxantina como única fuente de nitrógeno y asumieron la existencia de estas enzimas [117]. De manera similar, Elzainy y El-Awamry sostuvieron lo mismo debido al crecimiento de *S. viridiviolaceus* en hipoxantina y xantina como única fuente de nitrógeno. Estos autores fueron más lejos y propusieron también la existencia de enzima ureidoglicolato liasa en esta especie bacteriana [125].

# OBJETIVOS

El objetivo general del laboratorio es estudiar la influencia del metabolismo primario sobre el secundario. En este trabajo de tesis profundizamos el estudio del metabolismo de alantoína como etapa final del metabolismo de purinas, su regulación y el efecto de este metabolismo sobre la producción de antibióticos en *S. coelicolor*.

Es por esto que nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Identificar y caracterizar las enzimas involucradas en el metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*.
- Estudiar la regulación transcripcional de la vía de degradación de alantoína *S. coelicolor*.
- Estudiar el efecto del metabolismo de alantoína y su regulación sobre la producción de antibióticos de *S. coelicolor*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas bacterianas y plásmidos**

Todas las cepas de *E. coli* y *S. coelicolor*, plásmidos y oligonucleótidos más relevantes de este trabajo de tesis se listan en las Tablas I, II y III.

**Tabla I.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo de tesis.

<b>Cepas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia o Fuente</b>
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5α	<i>E. coli</i> K-12 F <sup>-</sup> <i>lacU169 (φ80lacZΔM15) endA1 recA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1-l2 gyrA96 relA1</i>	[126]
ET 12567	<i>supE44 hsdS20 ara-14 proA2 lacY galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 dam dcm hdsM (Cm<sup>R</sup>)</i>	[127]
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	[128]
<b><i>S. coelicolor</i></b>		
M145	Cepa parental SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	[129]
AllR <sup>-</sup>	M145 SCO6246::Tn5066, Hyg <sup>R</sup>	Esta tesis
AllB <sup>-</sup>	M145 SCO6247::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
Alc <sup>-</sup>	M145 SCO6248::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
AceB1 <sup>-</sup>	M145 SCO6243::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
Gcl <sup>-</sup>	M145 SCO6201::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
Hyi <sup>-</sup>	M145 SCO6206::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
UreB <sup>-</sup>	M145 SCO1235::Tn5062, Am <sup>R</sup>	Esta tesis
AllR <sup>-</sup> AceB1 <sup>-</sup>	AllR <sup>-</sup> , SCO6243::Tn5062, Hyg <sup>R</sup> Am <sup>R</sup>	Esta tesis
AllR <sup>-</sup> Gcl <sup>-</sup>	AllR <sup>-</sup> , SCO6201::Tn5062, Hyg <sup>R</sup> Am <sup>R</sup>	Esta tesis
AllR <sup>-</sup> Hyi <sup>-</sup>	AllR <sup>-</sup> , SCO6206::Tn5062, Hyg <sup>R</sup> Am <sup>R</sup>	Esta tesis
ΔP-AllB	M145 ΔP <i>allR-allB</i>	Esta tesis
AllR <sup>-</sup> / <i>allR</i>	AllR <sup>-</sup> att <sub>φBT1</sub> ::pJM12, Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
AllR <sup>-</sup> Hyi <sup>-</sup> / <i>hyi</i>	AllR <sup>-</sup> Hyi <sup>-</sup> att <sub>φBT1</sub> ::pLN27, Hyg <sup>R</sup> Am <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
ΔP <sub>AllB</sub> / <i>allR</i>	ΔP <sub>AllB</sub> att <sub>φBT1</sub> ::pJM12, Km <sup>R</sup>	Esta tesis

$\Delta P\_AlIB/allB-alc$	$\Delta P\_AlIB att_{\phi BT1}::pLN09, Km^R$	Esta tesis
---------------------------	--	------------

**Tabla II.** Plásmidos utilizados en este trabajo de tesis

Plásmido	Descripción	Referencia o Fuente
2H4.2.D01(Hyg <sup>R</sup> )	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5066 ( <i>oriT, Hyg<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6246</i>	[130]
AH10.1.F09	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6247</i>	[130]
2H4.2.G01	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6248</i>	[130]
2H4.2.A01	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6243</i>	[130]
SC2G5.2.F07	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6201</i>	[130]
2STG1.1.A10	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco1235</i>	[130]
2G5.2.G11	Cósmido ( $rep^{pUC}, Km^R$ ) para conjugación entre <i>E.coli</i> – <i>Streptomyces</i> con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT, Am<sup>R</sup></i> ) en el gen <i>sco6206</i>	[130]
pET28a	Vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor del fago T7, $Km^R$	Novagen
pCR <sup>®</sup> -BluntII-TOPO <sup>®</sup>	Plásmido para el clonado de fragmentos de ADN romos, $Km^R$	Invitrogen
pUZ8002	Plásmido helper utilizado en conjugación <i>E. coli</i> - <i>S.</i>	[129]

	<i>coelicolor</i> , Km <sup>R</sup>	
pKOS111-47	Plásmido helper utilizado en conjugación <i>E. coli</i> - <i>S. coelicolor</i> , Ap <sup>R</sup>	B. Julien (comunicación personal)
pSET152	Vector conjugativo e integrativo en <i>Streptomyces</i> basado en el sistema de recombinación del fago $\phi$ C31, Am <sup>R</sup>	[131]
pRT802	Vector conjugativo e integrativo en <i>Streptomyces</i> basado en el sistema de recombinación del fago $\phi$ BT1, Km <sup>R</sup>	[132]
pLN04	<i>oriT</i> , conteniendo los genes <i>allR-alc</i> , Am <sup>R</sup>	Esta tesis
pJM12	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco6246</i> bajo el control de su propio promotor ( <i>PallR</i> ), Km <sup>R</sup>	Tesina Juan Pablo Macagno
pLN06	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco6247</i> bajo el control de su propio promotor ( <i>PallB</i> ), Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN07	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco6248</i> bajo el control del promotor <i>PallB</i> , Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN09	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco6247</i> y el gen <i>sco6248</i> bajo el control del promotor <i>PallB</i> , Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN27	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco6206</i> bajo el control de su propio promotor ( <i>Phyi</i> ), Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN32	Derivado pRT802 conteniendo el gen <i>sco1235</i> y el gen <i>1236</i> bajo el control de su propio promotor ( <i>Pure</i> ), Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN02	Derivado pET28a(+) conteniendo el gen SCO6246 bajo el control del promotor T7, Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN03	Derivado pET28a(+) conteniendo el gen SCO6247 bajo el control del promotor T7, Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN05	Derivado pET28a(+) conteniendo el gen SCO6248	Esta tesis

	bajo el control del promotor T7, Km <sup>R</sup>	
pLN16	Derivado pET28a(+) conteniendo el gen SCO6206 bajo el control del promotor T7, Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pLN24	Derivado pET28a(+) conteniendo el gen SCO6205 bajo el control del promotor T7, Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pTR285	Derivado pRT802 conteniendo el promotor constitutivo <i>Perme*</i> , Km <sup>R</sup>	[9]
pXE1	Derivado pTR285 que contiene los genes reporteros <i>xy/TE</i> bajo el control del promotor constitutivo <i>Perme*</i>	Tesina Juan Pablo Macagno
pXE2	Derivado pTR285 que contiene los genes reporteros <i>xy/TE</i> sin promotor	Tesina Juan Pablo Macagno
pJM27	Derivado pRT802 conteniendo los genes <i>xy/TE</i> bajo el control del promotor <i>PallR</i>	Tesina Juan Pablo Macagno
pJM28	Derivado pRT802 conteniendo los genes <i>xy/TE</i> bajo el control del promotor <i>PaceB1</i> .	Tesina Juan Pablo Macagno
pJM31	Derivado pRT802 conteniendo los genes <i>xy/TE</i> bajo el control del promotor <i>PallB</i>	Tesina Juan Pablo Macagno
pLN39	Derivado pRT802 conteniendo los genes <i>xy/TE</i> bajo el control del promotor <i>Phyi</i>	Esta tesis

**Tabla III.** Oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

Nombre	Secuencia (sentido 5'-3')	Sitio de restricción
P6247_40 bp (1)	CTGCTTGCTGGAATTCTAAT <u>TC</u> GCTTTGT <u>GGA</u> ACGTCC	-
P6247_40 bp (2)	GGACGTTTCCACAAAGC <u>GGA</u> ATTAGAATTCCAGCAAGCAG	-

Mut1	CTGCTTGCTGGAATTCTAA <u>ACTGG</u> CTTTGTGGAAACGTCC	-
Mut2	GGACGTTTCCACAAAGCT <u>GACT</u> TAGAATTCCAGCAAGCAG	-
Mut3	CTGCTTGCTGGAATTCTAA <u>ACTGG</u> CTTTGT <u>ATTG</u> ACGTCC	-
Mut4	GGACGTTTCCACAAAGCT <u>GACT</u> TAGAATA <u>AC</u> AGCAAGCAG	-
Mut5	CTGCTTGCTGGAATTCTAATCCGCTTTGT <u>ATTG</u> ACGTCC	-
Mut6	GGACGTTTCCACAAAGCGGAATTAGAATA <u>AC</u> AGCAAGCAG	-
RThrdBR	GTTGATGACCTCGACCATGT	-
RThrdBL	CAAGGGCTACAAGTTCTCCA	-
RTactIIORF4R	TACACGAGCACCTTCTCACC	-
RTactIIORF4L	TGGAATCGTATCGGAATCTC	-
RTaceB1R	CGGAAGTTCTTGACGATG	-
RTaceB1L	GGAACGAGGTCTTCGTCGTCTT	-
RTallBL	GCACTACCTCACGCTCACC	-
RTallBR	AAGTCGTCGGTCTTGAGGTC	-
RTalcL	ACGCCTCCAACCTCTTCTAC	-
RTalcR	ATCCAGTCGTTGCCCTTG	-
RTallRL	ACGGGGACGAGATCGTGT	-
RTallRR	GCGTGGTGATGGTCTTGTC	-
sco6246_Spe	TTT <b>ACTAG</b> TT <b>CAGG</b> CGCCGGGTTGCC	<i>SpeI</i>
sco6247_Nde	TTT <b>CATATG</b> TCCGAAGCTGAACTG	<i>NdeI</i>
sco6247_Spe	TTT <b>ACTAG</b> TT <b>CAGG</b> CCCGGTCGAG	<i>SpeI</i>
sco6248_Nde	TTT <b>CATATG</b> ACGGCCAGCAGAACAC	<i>NdeI</i>
sco6248_Spe	TTT <b>ACTAG</b> T <b>CAGG</b> CCCGGTTCTGG	<i>SpeI</i>
sco6206_Nde	TTT <b>CATATG</b> GGGATTCGAGACCAGCGCTTC	<i>NdeI</i>
sco6206_Spe	TTT <b>ACTAG</b> T <b>CAGG</b> CGCCGCGGGCCCC	<i>SpeI</i>
sco6205_Nde	TTT <b>CATATG</b> AGCACGCTCCAAGGTCG	<i>NdeI</i>
sco6205_Spe	TTT <b>ACTAG</b> TT <b>CAG</b> ACCTGGTCGCCGGAG	<i>SpeI</i>
sco1236_Nde	TTT <b>CATATG</b> CAACTGACCCCGCACGAGCAG	<i>NdeI</i>
sco1235_Spe	TTT <b>ACTAG</b> T <b>CAGG</b> CATCGAGGGCACCTCCG	<i>SpeI</i>
P6247_Not	TTT <b>GCGGCCG</b> CACGTTCTTT <b>CGGGG</b>	<i>NotI</i>
P6247_Nde	GGG <b>CATATG</b> CCGGATCCCCTTCTCTGC	<i>NdeI</i>

P6206_Not	TTT <b>GCGGCCG</b> CTCACCGCTCGCCCTCTCCC	<i>NotI</i>
P6206_Nde	TTT <b>CATATG</b> CCACGGCGGAGGGAAGGCG	<i>NdeI</i>
P1236_Not	TTT <b>GCGGCCG</b> CAGCACCGGGGCGGAC	<i>NotI</i>
P1236_Nde	TTT <b>CATATG</b> CCACCTCACAGGGCATC	<i>NdeI</i>
PaceB1_BamHI	TTT <b>GGATC</b> CTTGAGTGAGCGAGGTGGC	<i>BamHI</i>
PaceB1_Nde	TTT <b>CATATG</b> CTGCTCACTTCCTTCAGC	<i>NdeI</i>
sco6201_Nde	TTT <b>CATATG</b> GCTCGTATGACCGCTGC	<i>NdeI</i>
sco6201_Spe	TTT <b>ACTAGT</b> CAGACCTTCAGCGTCT	<i>SpeI</i>
sco6243_C	GCGGACGACTCCTGGAAG	-
sco6243_D	TGCCGAGGTCCAGCAGAC	-
Sco1235_Nde	TTT <b>CATATG</b> ATCCAGAGATCCTCTTC	<i>NdeI</i>
Sco1235_Spe	TTT <b>ACTAGT</b> CAGGGAGGGCACCTCCG	<i>SpeI</i>
EZR1	ATGCGCTCCATCAAGAAGAG	-
EZL2	TCCAGCTCGACCAGGATG	-

Los nucleótidos en negrita corresponden a los sitios de restricción especificados en la última columna de la tabla. Los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia original (cebadores P6247\_40 bp (1) y P6247\_40 bp (2)) y las secuencias mutadas (cebadores Mut1, Mut2, Mut3, Mut4, Mut5 y Mut6).

## Medios de cultivo

### Medios de cultivo sólidos [129]

#### Soja – Manitol (SM)

Este medio de cultivo se utilizó para la selección de exconjugantes en los experimentos de conjugación *E. coli* – *Streptomyces*, para el mantenimiento de cepas y la preparación de esporas.

Agar ..... 20 g  
 Manitol ..... 20 g  
 Harina de soja..... 20 g  
 H<sub>2</sub>O de la canilla ..... csp. 1 L

**Medio mínimo suplementado sólido**

Este medio de cultivo se empleó para el estudio de la producción de antibióticos de *S. coelicolor*. Se utilizó acetato 0,5% p/v como fuente de carbono y 0,2% casa aminoácidos como fuente de nitrógeno.

Difco Casa aminoácidos .....	2 g
Buffer TES .....	5,73 g
Agar .....	24 g
H <sub>2</sub> O .....	csp. 1 L

Luego de autoclavar se agrega por cada 200 mL de medio:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM cada uno) .....	2 mL
MgSO <sub>4</sub> (1M).....	1 mL
Elementos traza.....	0,2 mL

La solución de elementos traza contiene: 0,1 g/L de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O y NaCl.

**Medios de cultivo líquidos [129]****2xYT**

Usado para germinar esporas de *Streptomyces* en los experimentos de conjugación.

Difco Bacto triptona .....	16 g
Difco Bacto extracto de levadura.....	10 g
NaCl .....	5 g
H <sub>2</sub> O .....	csp. 1 L

**TSB (Caldo Triptona Soja)**

Este medio se utilizó en la preparación de micelios para la posterior extracción de ADN genómico.

Caldo de triptona de soja..... 30 g  
 H<sub>2</sub>O ..... csp. 1 L

### Medio mínimo suplementado líquido (MM)

Este medio fue utilizado para realizar los estudios de crecimiento, fusiones reporteras, producción de antibióticos y determinaciones de amonio y urea.

Como fuente de carbono se utilizó alternativamente glucosa 1% P/V o alantoína 20 mM. Como fuente de nitrógeno se utilizó casa aminoácidos 0,2%, alantoína 20 mM, urea 40 mM o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> 80 mM. Los medios se denominaron MM-GC, MM-GCA, MM-GA, MM-A, MM-GU y MM-GN.

PEG 6000 ..... 5 g  
 H<sub>2</sub>O .....csp. 100 mL

Luego de autoclavar se agrega por cada 100 mL de medio:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (50 mM cada uno) ..... 1 mL  
 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (24 g/L) ..... 2,5 mL  
 Buffer TES (0,25 M pH 7.2) ..... 10 mL  
 Antiespumante (1% P/V)..... 1 mL  
 Elementos traza..... 0,1 mL

La solución de elementos traza es igual a la de medio mínimo sólido.

### Luria Bertani (LB) [133]

Este medio, tanto líquido como sólido, se utilizó para mantener y crecer cepas de *E. coli*, y para el crecimiento de esporas de *S. coelicolor* para su titulación.

Peptona de caseína ..... 10 g  
 Extracto de levadura ..... 5 g  
 NaCl ..... 5 g

H<sub>2</sub>O .....csp. 1 l

Ajustar a pH 7 con NaOH

Para la obtención de medio sólido se suplementó el mismo agar hasta una concentración final de 1,5 % (P/V).

### **Condiciones de crecimiento**

#### **Preparación de esporas de *Streptomyces***

Una colonia aislada fue repicada y esparcida en direcciones perpendiculares con palillo sobre placas de medio sólido soja-manitol (SM). Éstas luego se incubaron por 6 días a 30°C o hasta obtener un pasto confluyente de esporas grises. Las esporas fueron colectadas en 20% V/V glicerol, tituladas en medio LB y guardadas a -80°C.

#### **Cultivos de *Streptomyces* en medio líquido**

Se utilizaron erlenmeyers con deflectores, para favorecer la aireación, y siliconizados, para evitar la adhesión del micelio a las paredes. El medio de cultivo se inoculó con esporas de *S. coelicolor* con una concentración final de 10<sup>7</sup> esporas/mL. Los cultivos crecieron a 30 °C, con una agitación de 200-250 rpm durante un período de tiempo dependiente del ensayo. El volumen de medio de cultivo nunca excedió la quinta parte del recipiente.

Las curvas de crecimiento se realizaron mediante extracciones proteicas totales de cada alícuota de cultivo (1 mL) tomada a diferentes tiempos, para esto cada alícuota fue centrifugada a máxima velocidad y la preparación proteica se realizó mediante sonicación a 25 % de amplitud, 5 veces x 10 segundos cada vez (VibraCell Ultrasonic Processor-Sonics & Materials Inc.). Posteriormente, se centrifugo a 14000 rpm y la concentración proteica en el sobrenadante se determinó por el método que se describe en la página 46. Cada determinación se realizó por duplicado.

#### **Cultivos de *E. coli* en medio líquido**

Las cepas bacterianas se inocularon desde medio sólido a una absorbancia inicial (DO<sub>600nm</sub>) de 0,01 y el volumen del medio de cultivo (LB) en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. Los cultivos crecidos durante toda la noche (ON) fueron diluidos 1:100 en medio LB fresco o fueron recolectados por centrifugación. Cuando

fue necesario, el medio fue suplementado con  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  ampicilina (Ap),  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  cloramfenicol (Cm),  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicina (Km),  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  apramicina (Am) o  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  higromicina (Hyg) para el mantenimiento de los plásmidos. Para el crecimiento se utilizaron baños termostatzados a  $37^{\circ}\text{C}$  con vigorosa agitación.

### **Transformación de *E. coli***

La cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [126] fue utilizada para los subclonados de rutina. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron transformadas por golpe térmico en presencia de  $\text{CaCl}_2$  siguiendo los métodos convencionales [133]. Brevemente, a partir de 10 ml de cultivo de fase logarítmica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de aproximadamente 0,5) crecido a  $37^{\circ}\text{C}$ , se colectaron por centrifugación (10 min,  $4000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) las células correspondientes a 1 ml de cultivo, se lavaron con 1 ml de Solución 1 de transformación estéril (10 mM Solución MOPS y 10 mM KCl, pH 7) y luego se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de Solución 2 (0,1 M MOPS, 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, pH 6,5) y se incubaron 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$  en baño de hielo. Para la transformación, las células se centrifugaron y resuspendieron en 0,1 ml de la Solución 2, se agregó 1 - 200 ng de ADN en un volumen menor a  $10 \mu\text{l}$ , y finalmente la mezcla se incubó 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en baño de hielo. Luego se transfirió a un baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1 min y posteriormente se incubaron 2 min más en hielo. Las células se incubaron en 1 ml de medio LB durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y una alícuota de  $100 \mu\text{l}$  de esta preparación fue sembrada en una placa con medio LB agar con los antibióticos apropiados para la selección de las transformantes.

### **Expresión heteróloga de proteínas en *E. coli***

Para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* se utilizó la cepa BL21 (DE3) transformada con los plásmido pLN02, pLN03, pLN05, pLN16 o pLN24. La cepa BL21 (DE3) es una cepa de *E. coli* B lisogénica con  $\lambda\text{DE3}$ , un profago derivado del fago  $\lambda$  que expresa la T7 ARN polimerasa a partir del promotor *lacUV5*, el cual es insensible a represión por catabolito (glucosa) e inducible por lactosa o su análogo isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Luego de crecer esta cepa hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 0,5-0,6$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , se adicionó IPTG 0,5 mM final para inducir la expresión de la proteína His<sub>6</sub>-Sco6246 (AllR), His<sub>6</sub>-Sco6247

(AllB), His<sub>6</sub>-Sco6248 (Alc), His<sub>6</sub>-Sco6206 (Hyi) o His<sub>6</sub>-Sco6205 (GlxR). Los cultivos fueron crecidos durante la noche a 20°C, para favorecer el correcto plegado de la proteína y evitar la formación de agregados proteicos.

Las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en solución A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM). Luego se agregó PMSF 0,1 mM final. Los extractos proteicos se prepararon y analizaron como se describe posteriormente en la página 44.

En el caso de la expresión de la proteína recombinante AllB, el medio de cultivo LB se utilizó como tal o fue inicialmente suplementado con 1mM CoCl<sub>2</sub> o 1 mM ZnCl<sub>2</sub> para la preparación de extractos proteicos totales, o con 1mM CoCl<sub>2</sub> para la purificación de la proteína [134].

### **Conjugación *E. coli* – *Streptomyces***

Para la transferencia de plásmidos movilizables entre *E. coli* y *S. coelicolor* se siguió una técnica modificada del método original [131]. La conjugación intergenérica se realizó utilizando como cepa dadora *E. coli* ET12567 (Cm<sup>R</sup>)/pKOS111-47 (Ap<sup>R</sup>) y como cepa receptora *S. coelicolor* M145 (parental). El plásmido pKOS111-47 proporciona las funciones de transferencia a plásmidos que contienen un origen de transferencia *oriT*, pero no puede autotransferirse por poseer una mutación en su propio *oriT* [135].

Por cada conjugación, 10<sup>8</sup> esporas de *Streptomyces* se agregaron a 500 µl de medio 2xYT y se germinaron por calentamiento a 50°C durante 10 min. Las células posteriormente se sembraron en placas de medio soja–manitol (SM) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Luego sobre las esporas se sembraron con ansa por medio de estrías las células dadoras ET12567/pKOS111-47 conteniendo el vector a transferir. Las placas se incubaron a 30°C durante la noche y luego se cubrió cada placa con 1 ml de dH<sub>2</sub>O conteniendo 0,5 mg ácido nalidíxico y 2,5 mg Km, 0,5 mg Am o 0,5 mg Hyg según el marcador utilizado en el vector. Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa a 30°C durante 3 a 4 días hasta la aparición de las transconjugantes.

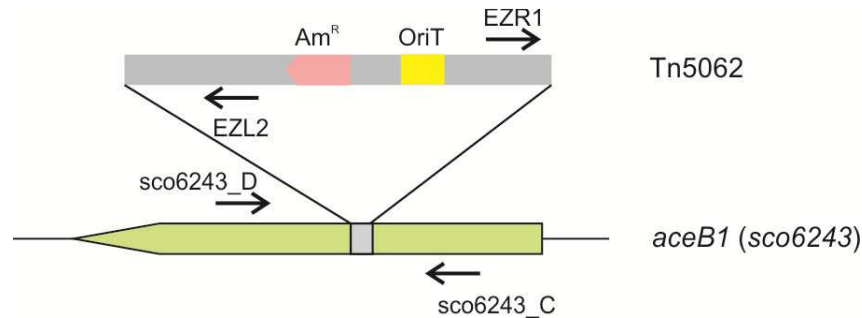
### Construcción de mutantes insercionales de *S. coelicolor*

Para la construcción de mutantes insercionales se utilizó una biblioteca de inserciones de transposones construida por el grupo del Dr. Dyson en la Universidad de Swansea, Gales [136]. Esta biblioteca se obtuvo *in vitro* utilizando el transposón Tn5062 y los cósmidos usados originalmente en el proyecto de secuenciación del genoma de *S. coelicolor* [130]. Cada uno de los cósmidos mutantes que constituyen esta biblioteca posee la inactivación por transposición de un único gen de *S. coelicolor*. Cada una de las inserciones del Tn5062 fue primero aislada en *E. coli* y luego mapeada mediante secuenciación del ADN. Además, la incorporación de un origen de transferencia, *oriT* (RK2), en el transposón permite que cada cósmido pueda ser movilizado dentro de *S. coelicolor* por un experimento de conjugación, dando exconjugantes con la disrupción génica deseada con alta eficiencia [131]. De esta manera, utilizando cósmidos con inserciones en cada uno de los genes de interés, y por medio de experimentos de conjugación entre *E. coli-Streptomyces*, se obtuvieron cepas mutantes en AllR<sup>-</sup> (*sco6246*), AllB<sup>-</sup> (*sco6247*), Alc<sup>-</sup> (*sco6248*), Gcl<sup>-</sup> (*sco6201*), AceB1<sup>-</sup> (*sco6243*) y Hyi<sup>-</sup> (*sco6206*). En el caso de la mutante AllR<sup>-</sup>, primeramente se realizó un cambio del gen de resistencia a apramicina del transposon Tn5062 por el gen de resistencia a higromicina (Hyg) utilizando el transposon Tn5066 del plásmido pQM5066. Para esto este plásmido fue digerido con PvuII y con mismo se transformó una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  que expresa el sistema de recombinación fago  $\lambda$  Red, obteniéndose de esta manera el cósmido 2H4.2.D01\* (Hyg<sup>R</sup>) (Tabla III) [137].

Para la construcción de las cepas dobles mutantes insercionales se partió de la cepa AllR<sup>-</sup>(Hyg<sup>R</sup>) y sobre esta se realizó el experimento de conjugación con *E. coli* previamente transformada con el cósmido de interés. De esta manera se obtuvieron las cepas mutantes AllR<sup>-</sup>Gcl<sup>-</sup>, AllR<sup>-</sup>AceB1<sup>-</sup> AllR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> y AllR<sup>-</sup> UreB<sup>-</sup> (*sco1235*).

Estas cepas se seleccionaron por su resistencia a apramicina (Am<sup>R</sup>) y/o higromicina (Hyg<sup>R</sup>) y sensibilidad a kanamicina (Km<sup>S</sup>). La confirmación del genotipo de las cepas mutantes se realizó mediante PCR. Para esto se extrajo ADN genómico de cada cepa mutante obtenida, el cual se utilizó como molde en las reacciones de PCR. Se utilizaron los pares de cebadores correspondientes a cada gen junto con oligonucleótidos EZR1 y EZL2 hibridan sobre el transposón Tn5062 en direcciones opuestas hacia afuera del mismo y sirven para determinar los sitios de inserción (Tabla

III)[136]. En este caso fueron utilizados para la confirmación de las cepas mutantes (Figura 7).



**Figura 7.** Representación esquemática de la inserción del transposón Tn5062 en el gen *aceB1* (*sco6243*). Se destaca la orientación del gen de resistencia a apramicina ( $Am^R$ ) y las posiciones de los cebadores usados en las reacciones de PCR se indican con flechas.

### Construcción de mutante $\Delta P$ -AIB

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido suicida movilizable pLN04 (página 55). El mismo se utilizó para transformar una cepa de *E. coli* ET12567 ( $Cm^R$ )/pKOS111-47 ( $Ap^R$ ) y posteriormente se transmitió por conjugación a la cepa *S. coelicolor* AllR<sup>-</sup> ( $Hyg^R$ ). Se seleccionaron cepas apramicina e higromicina sensibles, las candidatas a presentar un doble evento de recombinación. Las mismas se chequearon por la técnica de Southern Blot que se detalla en la página 58.

### Detección de la producción de metabolitos secundarios

Debido a que los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina son coloreados es posible observar la presencia de los mismos durante el crecimiento de *S. coelicolor* en medio líquido. Varios ensayos espectrofotométricos han sido reportados para el análisis de actinorrodina y undecilprodigiosina [20, 138]. Estos análisis se basan en el color diferente y el corrimiento de absorbancia máxima observados para estos dos compuestos en soluciones ácidas y alcalinas. Actinorrodina (y sus congéneres) es azul en soluciones alcalinas fuertes, mientras que undecilprodigiosina es rojo en soluciones ácidas.

### **Determinación de actinorrodina**

Se sonicaron (7 segundos, 25% amplitud en VibraCell Ultrasonic Processor-Sonics & Materials Inc.) 0,5 ml de cultivo y se agregaron 250  $\mu$ l de KOH 3 N para dar una concentración final de 1 N (pH  $\approx$  14,0). Se mezcló vigorosamente durante 15 min y luego se centrifugó a 4000 g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia del mismo a 640 nm ( $Ab_{S_{640nm}}$ ). La concentración de actinorrodina pudo ser calculada usando su coeficiente de extinción molar (en KOH 1 N) a 640 nm,  $\epsilon_{640nm} = 25.320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [19]. PM = 620 g mol<sup>-1</sup>.

### **Determinación de undecilprodigiosina**

Se cosecharon 0,5 ml de cultivo por centrifugación a 5.000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante (el compuesto está en la membrana) y se resuspendieron las células en 0,5 ml de metanol. Luego de acidificar con 10  $\mu$ l de HCl 1 N (pH  $\approx$  1,5), se mezcló vigorosamente durante 15 min y se centrifugó a 4000 g por 5 min. Por último, se colectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 530 nm ( $Ab_{S_{530nm}}$ ). La concentración de undecilprodigiosina pudo ser calculada usando el coeficiente de extinción molar (en HCl 1 N) a 530 nm,  $\epsilon_{530nm} = 100.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [20]. PM = 393 g mol<sup>-1</sup>.

### **Análisis *in vitro* de proteínas**

#### **Preparación de extractos proteicos de *E. coli***

Para grandes volúmenes de cultivo, la ruptura celular se llevó a cabo utilizando una celda de presión (French Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc.) donde cada muestra se sometió a 2 ciclos de presión-descompresión a 2000 psi.

Volúmenes pequeños fueron tratados por sonicación durante 5 series de 10 s a 25% amplitud usando un VibraCell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc.). Posteriormente, los restos celulares se clarificaron por centrifugación a 14000 g durante 30 min. La porción soluble fue tomada del sobrenadante y empleada como extracto proteico total libre de células tanto para la purificación de las proteínas recombinantes como para la realización del análisis de expresión por SDS-PAGE. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

### **Purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad**

Para la purificación de proteínas expresadas como proteínas de fusión a una secuencia de polihistidina se siguió el protocolo de purificación de proteínas solubles descrito por QIAGEN. Los extractos proteicos totales libres de células fueron sembrados tres veces a una columna de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Ácido Nitrilo-Tricloro-Acético)-Agarosa (1 ml de resina) equilibrada previamente con la solución A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM). La columna fue seguidamente lavada con 20 volúmenes de la solución de equilibrado y posteriormente las proteínas unidas a la columna fueron eluidas usando un gradiente discontinuo creciente de imidazol (40, 60, 80, 100, y 200 mM). Las fracciones del eluido fueron colectadas y la presencia de proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE (Figura 16, página 82).

Las fracciones que contenían las proteínas purificadas fueron dializadas a 4°C frente a 100 volúmenes de una solución amortiguadora Tris 50 mM pH 7,4, glicerol 20%. Se realizaron 2 cambios de dicha solución cada 12 horas. Todos los pasos se realizaron utilizando membranas de diálisis de corte 12 kDa pretratadas por ebullición durante una hora en agua destilada y EDTA para remover las trazas de metales pesados.

Posteriormente, las proteínas fueron separadas en alícuotas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

### **Tratamiento con Trombina**

El corte de la fusión N-terminal a His fue realizado con la proteína His<sub>6</sub>-Sco6246 unida a la resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA – Agarosa. Para ello fue llevado a cabo el protocolo de purificación a partir de 500 mL de cultivo de *E. coli* BL21(DE3)/pLN04. Habiéndose encontrado en purificaciones anteriores que His<sub>6</sub>-Sco6246 eluye de la columna a una concentración de 200-250 mM imidazol, se realizaron los lavados correspondientes hasta la fracción de 100 mM imidazol. La columna fue lavada con 5 mL de solución de digestión para Trombina (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1mM), y a continuación la resina fue resuspendida en 4 mL de la misma solución conteniendo trombina 5 µg/mL. Se realizaron dos digestiones de 3 y 16 horas con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante fue separado, la resina fue

lavada 2 veces con la solución A y tratada luego con solución A + 250 mM imidazol para extraer las proteínas cuya fusión a His N-terminal no hubiese sido removida y aún permanecieran unidas a la resina. Las distintas fracciones fueron recolectadas y analizadas por SDS-PAGE (Figura 29, página 116).

### **Dosaje de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método descrito por Bradford [139], usando como patrón una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida.

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Los extractos proteicos y las proteínas purificadas se analizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando la celda Mini-gel PROTEAN III (BioRad) y el sistema discontinuo de Laemmli [140]. La electroforesis se realizó únicamente con fines analíticos en condiciones desnaturizantes y reductoras. Las muestras se incubaron en solución de siembra (glicerol 5%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) durante 3 min a 100°C y posteriormente se sembró 1  $\mu$ g de proteína aproximadamente por calle (límite de detección de la tinción con azul brillante de Coomassie). Se usó un sistema discontinuo que consiste en un gel de concentración (poliacrilamida 4,5% en Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8, SDS 0,26% p/v) seguido por un gel de separación (poliacrilamida 12% en Tris-HCl 0,36 M, pH 8,8, SDS 0,26% p/v [133]. Para la corrida electroforética, realizada a temperatura ambiente, se utilizó una solución amortiguadora de Tris 0,3% p/v, glicina 1,44% p/v y SDS 0,1% p/v y se aplicó una corriente constante de 30 mA por gel. En todos los casos, la relación acrilamida:bisacrilamida utilizada fue 30:1.

Luego de la electroforesis, para detectar proteínas totales los geles se fijaron en ácido acético 10% V/V, se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante 15 min y se destiñeron por ebullición en dH<sub>2</sub>O durante 10 min. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: lisozima (14,4 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (66,2 kDa) y fosforilasa B (97,4 kDa).

### **Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)**

Luego de la corrida por SDS-PAGE, la electrotransferencia de proteínas se llevó a cabo utilizando la celda Mini-Trans-Blot transfer (Bio-Rad) y siguiendo la técnica descrita en [141] y [133]. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en solución de transferencia (15,6 mM Tris, 120 mM glicina, 20 % V/V metanol, pH 8.8) al menos por 2 hs a 250 mA a 4 °C.

Para detectar proteínas fusionadas a colas de histidina, se empleó la técnica recomendada por el fabricante de los anticuerpos anti-His (QIAGEN). Después de la transferencia, las membranas se lavaron durante 10 min 2 veces en solución de TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), y se incubaron durante 1 h con solución bloqueante (3% P/V BSA en TBS). Luego se lavó 10 min dos veces más con TBS-Tween/Triton (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% V/V Tween 20, 0.2% V/V Triton X-100), y 10 min más con TBS. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-His (1:3000) en solución bloqueante y se incubaron 1 h más en las mismas condiciones. A continuación, las membranas tratadas con anti-His fueron lavadas dos veces durante 10 min. con TBS-Tween/Triton y 10 min más con TBS. Luego fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (BioRad, dilución 1:3000), en solución bloqueante. Se lavaron 10 min 4 veces más con TBS-Tween/Triton y se revelaron utilizando como sustratos de la fosfatasa alcalina NBT y BCIP (Sigma).

### **Análisis transcripcional de fusiones reporteras**

#### **Ensayo de actividad catecol 2,3-dioxigenasa**

Se utilizaron los genes reporteros *xyITE*, que codifican para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (XylE), y para una proteína tipo ferredoxina que evita su inactivación por oxidación (XylT) [142].

La actividad de los promotores *PallR*, *PallB*, *PaceB1* y *Phyi* se ensayó utilizando los plásmidos pJM27, pJM28, pJM31 y pLN39, respectivamente. Como control positivo del sistema reportero *xyITE* se analizó el perfil de expresión de la fusión *Perme\*-xyITE* contenida en el vector pXE1. Como control negativo se utilizó el plásmido pXE2. Los plásmidos portadores de las distintas fusiones reporteras fueron introducidos en la

cepa *E. coli* ET12567/pKOS111-47 y luego conjugados en las cepas de *S. coelicolor* M145 y AllR.

Las distintas cepas así construidas (Tabla I) fueron crecidas en MM-GC y se tomaron muestras de 10 mL a 24 horas de crecimiento. La actividad catecol 2,3-dioxigenasa se midió como se describe en Kieser *et al.* [129]. Brevemente, cada una de las muestras obtenidas fue centrifugada 15 min a 4000 rpm, lavadas dos veces con una solución de Tris 100 mM pH 8 fría, centrifugadas nuevamente y resuspendidas en solución amortiguadora fosfato 100 mM pH 7,5, EDTA 20 mM pH 8,0, acetona 10% V/V. La disrupción de las células se realizó por sonicación, 4 series de 10 segundos a 20% de amplitud y con 30 s de intervalo. Seguidamente, se agregó Tritón X-100 en una concentración final de 0,1% V/V y se mantuvieron los tubos en hielo durante 15 min. Luego de centrifugar por 10 min a 14000 rpm a 4°C, se determinó la concentración de proteínas totales del sobrenadante como se describió anteriormente. A continuación, volúmenes definidos se agregaron a 500 µL de solución de ensayo (solución amortiguadora fosfato 10 mM pH 7,5, catecol 0,2 mM). El cambio en la absorbancia se siguió a 375 nm. Cada muestra se midió por duplicado, verificando que el cambio de absorbancia observado respondiera de manera proporcional al volumen de extracto agregado para comprobar que el sustrato no fuera limitante de la reacción. La actividad se calculó a partir de la pendiente de la región lineal de la gráfica Absorbancia<sub>375 nm</sub> vs. tiempo (min) y se refirió a la cantidad de proteína agregada:

$$mU_{esp} = 30,03 \times \frac{\Delta Abs_{375nm}}{\text{tiempo}(min)} \times \frac{1}{\mu g_{prot}}$$

## Determinaciones enzimáticas

### Determinación de actividad alantoinasa y alantoicasa

Para la determinación de la actividad alantoinasa se utilizó alantoína (2.5- 120 mM) como sustrato y se realizó un ensayo espectrofotométrico discontinuo acoplado a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La mezcla inicial de reacción contenía alantoína en *buffer* trietanolamina-HCl 50mM pH 8.2, en un volumen final de 0,36 mL y se incubó en un baño termostático a 30°C. La reacción se inició con el agregado de proteína AllB y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos luego del agregado de la

enzima. La reacción se detuvo por tratamiento ácido mediante el agregado de 0,5 mL de HCl 0,5 N y calentamiento a 100°C durante 2 min. Este tratamiento descompone el alantoato formado en glioxilato y urea. Posteriormente se neutralizó el pH por agregado de 0,5 mL de *buffer* fosfato de potasio 0,5 M pH 7.5 y se agregó NADH en una concentración final de 0,5 mM y 1U de LDH. Se determinó la disminución de la absorbancia a 340 nm por oxidación de NADH [143].

Para la determinación de la actividad alantoicasa se realizó un ensayo colorimétrico discontinuo determinándose la formación de urea en función del tiempo. La mezcla inicial de reacción contenía 90 mM alantoato en *buffer* trietanolamina-HCl 50mM pH 8.2 en un volumen final de 0,5 mL y se incubó en un baño termostaticado a 30°C. La reacción se inició con el agregado de proteína Alc y se tomaron alícuotas de 50 µL a diferentes tiempos luego del agregado de la enzima. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 2 min. La formación de urea se determinó con el kit Urea Color 2R Wiener Lab. Brevemente, se incubó 1 µL de cada alícuota con 100 µL de reactivo I (200 mM *buffer* fosfato, 750 mM ácido salicílico, 20 mM de sodio nitroprusiato y 10 mM EDTA) junto con una solución de enzima ureasa 75 U/mL, durante 5 min a 37°C. Luego se agregaron 100 µL de reactivo II (10 mM de hipoclorito de sodio en 0,1 M hidróxido de sodio) y se incubó durante 5 min a 37°C. El amonio formado se determinó por espectrofotometría a 570 nm.

Para descartar la actividad alantoato amidohidrolasa, se realizó un ensayo utilizando el kit Urea Color 2R Wiener Lab sin el agregado de ureasa. Este ensayo permite determinar si existe generación previa de amonio en la reacción. La determinación colorimétrica se realizó nuevamente a 570 nm.

El ensayo acoplado se realizó en *buffer* trietanolamina-HCl 50mM pH 8.2 utilizando alantoína como sustrato, en un volumen final de reacción de 0,36 mL. La mezcla de reacción se incubó en un baño termostaticado a 30°C. Se determinó la formación de urea en función del tiempo con el kit Urea Color 2R Wiener Lab como fue detallado anteriormente. Para la determinación de actividad alantoinasa se agregó un exceso de un exceso de proteína Alc (relación AIB : Alc 1 : 10 U). Para la determinación de actividad alantoicasa se agregó un exceso de proteína AIB (relación AIB : Alc 10 : 1 U). Como controles de este ensayo, se verificó la ausencia de reacción colorimétrica sin agregado de proteína AIB o sin agregado de proteína Alc a la mezcla de reacción.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto.

#### **Determinación de actividad hidroxipiruvato isomerasa y tartronato semialdehído reductasa**

Las actividades enzimáticas hidroxipiruvato isomerasa y tartronato semialdehído reductasa se determinaron mediante un ensayo acoplado espectrofotométrico continuo. La mezcla inicial de reacción contenía hidroxipiruvato (2.5 a 120 mM) y 0,4 mM de NADH en 100mM buffer fosfato de potasio pH 7. El volumen final de reacción fue de 0,5 mL y se incubó previamente a 30°C en un baño termostatzado. La reacción se inició con el agregado de enzima. Para la determinación de actividad hidroxipiruvato isomerasa se agregó un exceso de un exceso de proteína GlxR (relación Hyi : GlxR 1 : 10 U). Para la determinación de actividad tartronato semialdehído reductasa se agregó un exceso de proteína Hyi (relación Hyi : GlxR 10 : 1 U). La reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm por oxidación de NADH.

Como controles de este ensayo, se verificó la ausencia de cambio en la absorbancia a 340 nm sin agregado de proteína Hyi o sin agregado de proteína GlxR a la mezcla de reacción.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto.

#### **Marcación isobárica para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ)**

Células provenientes de cultivos de 50 mL en fase exponencial o estacionaria de crecimiento, se filtraron utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , se lavaron con una solución de PBS pH 7.5 (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por litro) y se resuspendieron en *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, inhibidor de proteasas (Thermo). Las células se sonicaron a 25 % de amplitud, 5 veces x 10 segundos cada vez usando un VibraCell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc.), y el debris celular se removió mediante centrifugación a 10,000 g por 10 min a 4°C.

Posteriormente, el lisado fue tratado con DNAasaI (0,1 mg/mL) (Fermentas) y RNAasa (0,1 mg/mL) (Fermentas) a durante 10 min a 37°C. El extracto proteico

obtenido fue dializado en agua Milli-Q y concentrado por liofilización. Las proteínas liofilizadas fueron luego digeridas con tripsina y marcadas con reactivos iTRAQ como describe el protocolo de fabricación. Brevemente, 50 µg de proteína de cada condición y dos duplicados biológicos fueron tratados con 50 mM tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante 1 hora a 60°C y los residuos de cisteína fueron alquilados con 200 mM metil metano-tiosulfonato (MMTS) a temperatura ambiente durante 15 min. La digestión enzimática fue realizada con tripsina (Promega, Gold trypsin; 1:20, w/w) durante 16 horas a 37°C. La marcación se realizó durante 2 horas con un marcador reactivo de grupo amino isobárico por cada muestra y las mismas se juntaron, evaporaron hasta secado completo en una centrifuga de vacío y resuspendieron en buffer SCX (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 % CAN, pH 2.7) y tratadas para eliminar el exceso de reactivo reductor, SDS, cloruro de calcio, e iTRAQ usando una resina de intercambio catiónico (AB Sciex).

#### **Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS)**

Las muestras se analizaron usando un nano-LC híbrido Triple-TOF 5600 (AB-Sciex) equipado con un sistema Shimadzu Prominence nano-LC. El LC se utilizó con una columna C18 (Vydac MS C18 300 Å 150×0,3 mm, GRACE Davison, Discovery Sciences, USA) operada a 30°C con un gradiente de 0 a 80 % acetonitrilo (en 0,1 % ácido fórmico) durante 220 min con una velocidad de flujo de 3 µl/min.

Los péptidos se pulverizaron con una fuente Nano-ESI III. Las especificaciones de gas y voltaje se ajustaron según fue necesario. Las proteínas se identificaron a partir de los datos del espectro de fragmentación adquiridos de 1-4 péptidos cargados con una ventana de selección de precursor de 100 a 1,800 m/z, usando fragmentos de 0,5 s seguidos de la adquisición de datos de 20 péptidos con intensidad sobre 100 cuentas entre m/z de 40-1.800 con energía de colisión rodante.

Los péptidos se identificaron utilizando el algoritmo paragon a partir de secuencias en formato FASTA provenientes de la base de datos de genoma de *S. coelicolor* obtenida de NCBI (Protein Pilot software 4.0, Applied Biosystems) [144]. Solamente proteínas con una confianza de mayor o igual a 95 % fueron aceptadas. Los valores relativos de iTRAQ y los valores p fueron obtenidos utilizando el método Paragon [144].

## Manipulaciones de ADN

### Extracción de ADN genómico de *S. coelicolor*

La extracción de ADN se realizó según el protocolo descrito por Kieser [129], a partir de 3 ml de cultivo en medio TSB inoculado con esporas de las distintas cepas. Brevemente, se tomaron aproximadamente 250-500  $\mu\text{L}$  de cultivo y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. Luego de un lavado con  $\text{dH}_2\text{O}$ , las células se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, 5 mg/mL lisozima, 0,1 mg/mL RNAasa) y se incubaron durante 30 min a 30°C. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10 % V/V, se vortereó 10 s, se agregó 85  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M y nuevamente se vortereó por 10 s. Luego se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de fenol, se mezcló por agitación durante 30 s y se centrifugó 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregó 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Nuevamente, se mezcló por agitación, se centrifugó y se tomó el sobrenadante. Para precipitar el ADN se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugo y eliminó la solución dejando el ADN en el fondo del tubo. Finalmente, se realizó un lavado con 1 mL de etanol 70 % V/V y luego de eliminarlo se dejó secar 30 min<sup>-1</sup> hora a temperatura ambiente. Para la resuspensión se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ .

### Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Los plásmidos utilizados fueron preparados mediante el kit comercial Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Tratamiento con enzimas de restricción, ligasa y fosfatasa alcalina

Las condiciones generales para los tratamientos de ADN con enzimas de restricción y fosfatasa alcalina, y las reacciones de ligación con T4 ADN ligasa, fueron realizadas mediante los métodos convencionales descritos por Kieser [129] y Sambrook [133] , y a partir de las recomendaciones de los proveedores de las enzimas.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La secuencias genómicas fueron obtenidas del sitio “StrepDB - The Streptomyces Annotation Server” ([streptomyces.org.uk](http://streptomyces.org.uk)). A partir de las mismas se realizó el diseño

de los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo las distintas reacciones de PCR. Sus secuencias se detallan en la Tabla III.

Se diseñaron los oligonucleótidos de manera que hibriden en los extremos de la región a amplificar e incluyan sitios de restricción para el subclonado posterior del fragmento amplificado (Tabla III).

La mezcla de reacción, en un volumen final de 25  $\mu$ l, consistió de *Buffer Taq* ADN polimerasa 1X,  $MgCl_2$  2 mM, DMSO 1%, 20 pmoles de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de ADN genómico obtenido por el método anteriormente descrito o 20 ng de ADN molde, 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa y 0,075 mM de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP). Se completó el volumen restante con agua Milli-Q. En algunos casos se utilizó *Pfu* ADN polimerasa (Promega) y el *buffer* correspondiente.

Las reacciones de amplificación respetaron el siguiente protocolo básico de amplificación, el cual se ajustó en cada caso particular según el tamaño del fragmento a amplificar y las secuencias de los cebadores. Después de una primera etapa de desnaturalización del ADN genómico a 94°C durante 5 min, se programaron 30 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C por 40 s, hibridación a 52-60°C por 40 s, y elongación a 72°C por 30-100 s. Para la extensión final de los fragmentos amplificados, la reacción fue continuada durante 5 min a 72°C, y fue terminada a 15°C. La temperatura de hibridación se definió en base al par de cebadores utilizado. Los tiempos de elongación de la segunda etapa se calcularon en base a la velocidad de síntesis promedio de las ADN Polimerasas utilizadas (*Taq* ADN Polimerasa, 1000 nt  $min^{-1}$ ; *Pfu* ADN Polimerasa, 500 nt  $min^{-1}$ ). Se utilizó un equipo MyCycler™ Thermal Cycler BIO-RAD o Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400.

### **Secuenciación de nucleótidos**

Todos los fragmentos amplificados se verificaron por secuenciación de ADN. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el servicio “DNA Sequencing Facility” de la Universidad de Maine, Estados Unidos, sobre una muestra de ADN plasmídico obtenida utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega). El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqMan II (DNASTAR Inc.).

### Construcción de plásmidos

Los genes *sco6246*, *sco6247*, *sco6248*, *sco6206* y *sco6205* fueron amplificados por PCR con los pares de oligos *sco6246\_Spe* y *sco6246\_Nde*, *sco6247\_Spe* y *sco6247\_Nde*, *sco6248\_Spe* y *sco6248\_Nde*, *sco6206\_Spe* y *sco6206\_Nde*, *sco6205\_Spe* y *sco6205\_Nde* (Tabla III), respectivamente, y posteriormente clonados en el vector pCR-BluntII-TOPO. Este vector fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *NotI*, y el fragmento que contenía a cada uno de los genes mencionados fue clonado en el plásmido de expresión pET28a (+), (el cual contiene seis codones de histidina corriente arriba del sitio *NdeI*) dando origen al plásmido pLN02, pLN03, pLN05, pLN16 y pLN24 respectivamente. Por otro lado, utilizando la misma metodología que para la construcción del vector pJM12 (tesina de licenciatura de Juan Pablo Macagno), por digestión con *NdeI-SpeI* de los vectores pLN03, pLN05 y pLN16 se obtuvieron los fragmentos de los genes *sco6247*, *sco6248* y *sco6206*. Mientras que por otro lado, con los pares de cebadores P6247\_Not y P6247\_Nde, y P6206\_Not y P6206\_Nde (Tabla III), se obtuvieron los productos de PCR *NotI-NdeI* que contienen los promotores putativos del correspondiente gen, que fueron clonados en el vector pCR-BluntII-TOPO y posteriormente digeridos con *NotI-NdeI*. Para el gen *sco6248* se utilizó el mismo promotor que para el gen *sco6247*. Cada par de fragmentos fueron clonados en el vector integrativo pRT802 digerido con *NotI* y *SpeI*, dando origen a los plásmidos pLN06, pLN07 y pLN27.

El plásmido pLN39 contiene el gen reportero *xyITE* bajo el control del promotor del gen *sco6206*. Para construir este vector, el fragmento *NotI-NdeI* de dicho promotor se clonó junto con un fragmento *NdeI-SpeI* conteniendo los genes *xyITE* en el vector pRT802.

Para la construcción del vector pLN32, el fragmento de ADN conteniendo los genes *sco1235* y *sco1236* se amplificó por PCR utilizando los oligos *sco1235-1236\_Nde* y *sco1235-1236\_Spe* (Tabla III) y posteriormente se clonó en el vector pCR-BluntII-TOPO. Este vector fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *SpeI*, obteniéndose un fragmento que contenía a estos genes. Por otro lado, con el par de cebadores P1236\_Not y P1236\_Nde (Tabla III) se obtuvo por PCR un fragmento de ADN *NotI-NdeI* que contenía el promotor putativo del gen *sco1235* que fue clonado en el

vector pCR-BluntII-TOPO, y posteriormente digerido con *NotI-NdeI*. Finalmente, ambos fragmentos se clonaron en el vector integrativo pRT802 digerido con *NotI* y *SpeI*.

El vector pLN04 fue utilizado para la generación de cepa mutante  $\Delta P$ -allB. Para la construcción del mismo se digirió previamente el vector pLN02 con *HindIII-NdeI* obteniéndose un fragmento que contenía al gen *sco6246*, por otro lado, se digirió el vector pLN07 con *NdeI-SpeI* obteniéndose un fragmento con el gen *sco6248*. Estos fragmentos fueron clonados en el vector pSET152 previamente digerido con *HindIII-XbaI*, esta digestión libera la región codificante de la integrasa en el mismo, volviéndolo un plásmido no integrativo. Este clonado fue posible debido a la compatibilidad de sitios entre *SpeI* y *XbaI*.

### **Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para la electroforesis de ADN los geles de agarosa se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook [133]. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,9 y 2 % P/V, según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon en solución TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) conteniendo bromuro de etidio  $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ . La corrida electroforética se realizó en solución TAE a un voltaje constante de 90 V. Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante un transiluminador de luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó el bacteriófago  $\lambda$  digerido con *BstEII*.

### **Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

Se emplearon los kits comerciales QIAquick (QIAGEN), y GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia), siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes.

### **Determinación de concentración de ADN en solución acuosa**

Sobre una dilución adecuada de la muestra de ADN, se obtuvo el valor de absorbancia a 260 nm. La concentración de ADN en solución se determinó empleando la relación  $1 \text{ UA}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ADN doble hebra [133].

### Generación de sondas de ADN radiactivas

Las sondas radiactivas *PallR-allB*, *PaceB1* y *Phyi* fueron obtenidas mediante PCR utilizando como molde los plásmidos pJM31, pJM28 y pLN39, respectivamente. Se emplearon los cebadores marcados en sus extremos 5' P6247\_Not, PaceB1\_Not y P6206\_Not junto con sus pares no marcados P6247\_Nde, PaceB1\_Nde y P6206\_Nde respectivamente. La marcación de cada oligonucleótido (10 pmoles) se realizó por 1 h a 37 °C en presencia de 3 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>, 10 mCi ml<sup>-1</sup>), la enzima T4 Polinucleótido Kinasa y el *buffer* suministrado por el fabricante (Promega) en un volumen final de 20 µl.

Luego de purificar cada cebador marcado en columnas de Sephadex G-25, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: en un volumen final de reacción de 50 µl se adicionó *Buffer Taq* ADN polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 0,3-10 pmoles del oligonucleótido marcado (dependiendo del rendimiento obtenido en cpm), 12 pmoles del oligonucleótido no marcado, 0,1 µg de ADN plasmídico correspondiente, DMSO 1X, 1 U de *Taq* ADN polimerasa y 0,25 mM de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP). Se completó el volumen restante con agua Milli-Q.

El tamaño de los amplicones fue de 270 pb (*PallR-allB*), 190 pb (*PaceB1*) y 450 bp (*Phyi*) y se utilizó el mismo protocolo de amplificación para los tres. Después de una primera etapa de desnaturalización del ADN plasmídico a 94 °C durante 75 s, se programaron 35 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94 °C por 40 s, hibridación a 51 °C por 40 s, y elongación a 72 °C por 30 s. Para la extensión final de los fragmentos amplificados, la reacción fue continuada durante 5 min a 72 °C, y fue terminada a 15 °C.

Los fragmentos resultantes fueron purificados a partir de geles de agarosa al 2% (P/V) y la actividad específica fue determinada utilizando el contador de centelleo Wallac 1209 Rackbeta.

### Ensayo de retardo en gel (EMSA)

Se utilizaron como sondas fragmentos de ADN conteniendo la región intergénica de los genes *sco6246* y *sco6247* (*PallR-allB*), y las regiones promotoras de los genes *sco6243* (*PaceB1*) y *sco6206* (*Phyi*). Las reacciones de unión (volumen final 20 µl) entre

la proteína AllR purificada y las sondas (3000 cpm por reacción) se llevaron a cabo en la solución de unión, Tris-HCl 25 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,01%, 1 µg poli-dIdC, glicerol 5 %, durante 20 min a 37 °C. Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida 6 % no desnaturizantes y la electroforesis se realizó a 4°C, y 150 V durante aproximadamente 2 h en buffer TBE 0,5X pH 8 (Tris base 44,5 mM; Ácido Bórico 44,5 mM; EDTA 1 mM). Los geles fueron preparados con una solución filtrada de acrilamida-bisacrilamida en relación 30:1, más glicerol 5 % P/V final. Se realizó una pre-corrída durante 2 h a 200 V antes de que las muestras fueran sembradas para homogenizar la temperatura del sistema.

Luego de la corrida electroforética los geles se secaron al vacío en Gel Dryer MODEL 583 (BIO-RAD) durante 50 min a 80 °C, revelados por autorradiografía mediante exposición a pantallas intensificadoras durante 24 h, y luego visualizados en un equipo Storm 840 (Amersham Biosciences).

El ADN no marcado usado en los ensayos de competición (en un exceso molar de 50 o 100 veces) fue incubado con la proteína AllR en la solución de unión durante 10 min a 37 °C, luego se agregó la sonda marcada y se incubó la mezcla por 20 min a 37 °C.

La sonda *PallR-allB* de 40 bp correspondiente a la región protegida en los ensayos de protección por DNAasa I y las tres sondas mutadas derivadas de la mismas, se obtuvieron por anillado de los pares de cebadores P6247\_40 bp (1) y P6247\_40 bp (2) para la sonda sin mutar, Mut1 y Mut2 para la mutación TTCC por ACTG, Mut5 y Mut6 para la mutación GGAA por ATTG y Mut3 y Mut4 para ambas mutaciones (TTCC por ACTG y GGAA por ATTG) (Tabla III), marcados radiactivamente en su extremo 5' tal como se describió previamente en ésta sección. Para el anillado se diluyeron 600 pmoles de cebadores en 30 µl finales de H<sub>2</sub>O, luego de calentar la mezcla a 95 °C se dejó enfriar lentamente. Las sondas obtenidas se utilizaron como tales.

Para analizar el efecto de las moléculas de alantoína, alantoato, glioxilato, xantina y urea en la afinidad de AllR por su sitio de unión en el ADN, se realizaron ensayos de retardo en gel en las condiciones ya descritas. Antes de la adición de la sonda radiactiva, se agregó a la mezcla de reacción la molécula en estudio. Las soluciones stock de los compuestos fueron preparadas a una concentración final de

200 o 100 mM dependiendo del caso y utilizando *buffer* de unión para su disolución y fueron preparadas frescas para cada ensayo.

### **Ensayos de protección por DNAasa I**

Para la realización de estos estudios se seleccionó previamente en función de los ensayos de retardo el gel, la relación de concentración adecuada de proteína AllR-sonda de ADN. Las concentraciones de AllR utilizadas fueron 0,2 y 0,35 mM o 0,2, 0,5 y 1,7  $\mu$ M dependiendo del caso.

Se incubaron sondas marcadas radioactivamente correspondientes a los promotores *PaceB1* y *PallR-allB* (50000 c.p.m.) con diferentes cantidades de proteína AllR purificada en un volumen final de 200  $\mu$ L de *buffer* de unión (ver ensayo de retardo en gel, página 56) durante 20 min a 30 °C.

Los fragmentos de ADN se digirieron parcialmente con DNAasa I (Promega) durante 4 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con el agregado 510  $\mu$ L de una solución de 20 mM EDTA pH 8,0, 200 mM NaCl, 100  $\mu$ g/mL ARN de levaduras (Ambion, 7120G) y 750  $\mu$ l fenol/cloroformo (1:1).

La precipitación del ADN se llevo a cabo con 1 mL de etanol 100%, el pellet se lavó con etanol 70 % V/V y se resuspendió en 5  $\mu$ l de una mezcla formamida-colorante de siembra. Luego se calentó hasta desnaturalización (2 min a 94 °C) e inmediatamente se puso en hielo. Los productos de digestión se resolvieron por electrophoresis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% P/V (poliacrilamida: bisacrilamida 38:2, 48 % (P/V) urea, TBE 1X).

Reacciones de secuenciación apropiadas se sembraron junto a las reacciones de digestión y se utilizaron como marcador para la identificación de las secuencias protegidas. Los resultados se visualizaron y digitalizaron utilizando un *scanner* Storm167 840 (Amersham).

### **Transferencia de ADN a membranas de nylon e hibridización con sondas radioactivas (Southern blot)**

Aproximadamente 10  $\mu$ g de ADN genómico de las cepas a analizar fueron digeridos toda la noche con un exceso de *NotI*, y los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0,7 % (P/V). La transferencia del ADN del gel a la

membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) se hizo por capilaridad. Para ello el gel de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN a transferir se trató dos veces con HCl 0,25 N durante 15 min., con el fin de provocar una hidrólisis parcial de los fragmentos de mayor tamaño, mejorando la eficiencia de la transferencia de éstos y su unión a la membrana. El ADN se desnaturalizó por tratamiento con 0,6 M NaCl, 0,2 M NaOH, durante 20 min, y luego de lavarlo dos veces con agua destilada se lo neutralizó por lavado en 0,2 M Tris-HCl pH 7,4, 0,6 M NaCl. El gel así tratado se colocó sobre un papel Whatman 3MM, dos de cuyos extremos estaban sumergidos en el buffer de transferencia, 10X SSC (NaCl 1,5 M, citrato de sodio 0,15 M, pH 7). Sobre el gel se colocó la membrana, y sobre ella una columna de papel absorbente. Luego de 16 h se retiró la membrana y el ADN se fijó a ella exponiéndolo a luz UV por 4 min.

El fragmento de ADN escogido como sonda fue amplificado a partir de ADN cromosomal de la cepa *S. coelicolor* M145 usando los oligonucleótidos RTallRL y sco6246\_Spe detallados en la Tabla III. La sonda, de 470 bp, se marcó radiactivamente por la técnica de “iniciación al azar” utilizando el sistema “Prime-a-gene” (Promega). Esta técnica utiliza una mezcla de todos los hexanucleótidos posibles (algunos de ellos serán complementarios al ADN molde) como iniciadores y una mezcla de los tres dNTP y 185 MBq de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP. La prehibridación se realizó durante 2 horas y la hibridación durante toda la noche a 65 °C usando SSC 5X, Denhardt’s 5X (Albúmina 0,1 % (P/V), ficoll 0,1 % (P/V), polivinilpirrolidona 0,1% (P/V)) y SDS 0,5% (P/V). Luego se hicieron dos lavados de 15 min a 65 °C con SSC 2X – SDS 0,1 % (P/V). La lectura fue desarrollada y digitalizada con un scanner Storm 840 (Amersham).

### **Métodos bioinformáticos**

Las secuencias de nucleótidos y proteínas fueron analizadas usando el programa BLAST [145] y los alineamientos de secuencias proteicas fueron creados usando el método ClustalW [146]. Se utilizó la herramienta MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) para la búsqueda de motivos en secuencias de ADN y la herramienta MAST (Motif Alignment & Search Tool) para la búsqueda de estos motivos en el genoma de *S. coelicolor* [147].

El servidor Softberry BPROM se utilizó para realizar predicciones de promotores bacterianos ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)).

El servidor Primer3Plus se utilizó para el diseño de oligonucleótidos para RT-PCR [148].

## **Manipulación de ARN**

### **Extracción de ARN**

Un volumen de 3 ml de un cultivo en fase exponencial o estacionaria de crecimiento se centrifugó a 4000 x *g* durante 10 min para bajar las células. Luego de descartar el sobrenadante, las mismas se resuspendieron en 100 µL de *buffer* de dilución del kit SV total RNA isolation system (Promega). A partir de este momento se trabajó en hielo.

Las células resuspendidas se lisaron mediante 5 pulsos de sonicación de 10 s a 25 % de potencia con intervalos de enfriamiento de 30 s. El lisado se centrifugó a 12000 x *g* durante 20 min y el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf limpio.

A partir de este punto se sigue el protocolo de extracción proporcionado por el fabricante.

La cuantificación de las muestras de ARN se llevó a cabo a midiendo la  $DO_{260}$ , teniendo en cuenta que un valor de 1 corresponde a una concentración de ARN de 40 µg/ml. La pureza de las muestras fue analizada determinando por la relación  $DO_{260}/DO_{280}$ .

La integridad y concentración del ARN fue examinada mediante electroforesis en geles de agarosa 2 % (P/V). La corrida se llevó a cabo a 50 V durante 2-3 h en *buffer* TAE 1X. Las bandas correspondientes a los ARN ribosomales se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta.

### **Síntesis de ADNc**

La síntesis del ADNc se realizó incubando 2 µg de ARN total con la enzima transcriptasa reversa Superscript III (Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 0,5 µg de hexanucleótidos al azar como cebadores de la reacción.

### PCR semicuantitativa

Esta PCR se realizó de la misma manera que la reacción de PCR convencional descrita en la sección reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (página 52), solo que en este caso, se utilizó 1  $\mu$ L de ADNc como molde. Los cebadores utilizados fueron RTallRR y RTallRL, RTallBR y RTallBL, y RTalcR y RTalcL (Tabla III) para el análisis de la expresión de los genes *allR*, *allB* y *alc*, respectivamente.

### Amplificación por PCR en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR fue realizada en el equipo Mastercycler® ep *realplex* de Eppendorf. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, el cual contenía buffer de reacción comercial (*Invitrogen Life Technologies*) 1 X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, mezcla equimolar de dNTPs 200  $\mu$ M, SYBR Green 0,5 X, ambos cebadores 0,5  $\mu$ M, 0,8 U de enzima Platinum® *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen Life Technologies*) y 1  $\mu$ l de ADNc molde. Las mezclas de reacción fueron sometidas, luego de una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, a 40 ciclos de desnaturalización (durante 15 s a 95 °C), anillado (15 s a 58 °C) y polimerización (20 s a 68 °C). Después del último ciclo se realizó una etapa de polimerización de 2 min a 72 °C. Los valores de corte (Ct) fueron determinados en función del umbral determinado por defecto por el equipo, éste se define como el punto al cual la fluorescencia sobrepasa considerablemente la fluorescencia de base. Para la cuantificación relativa se utilizó el método de Pfaffl, calculándose las eficiencias como allí se indica [149]. Para ello se utilizó como molde ADN genómico de *S. coelicolor* M145 en el rango 0,5- 30 ng/ $\mu$ l para todos los pares de cebadores.

La expresión de cada gen analizado se normalizó con la expresión del gen de referencia *hrdB*. Los pares de cebadores utilizados en este ensayo fueron RThrdBR y RThrdBL para el gen *hrdB*, RTactIIORF4R y RTactIIORF4L para el gen *actIIORF4*, RTaceB1R y RTaceB1L para el gen *aceB1*, RTallBL y RTallBR para el gen *allB*, y RTalcL y RTalcR para el gen *alc*, los mismos se detallan en la Tabla III.

### Determinaciones de amonio y urea

Los valores de urea y amonio se cuantificaron mediante la utilización del Kit Urea Color 2R Wiener Lab. Se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L del sobrenadante del medio de cultivo a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento de las cepas de *S.*

*coelicolor*. En el caso de las determinaciones de amonio, no se agregó la enzima ureasa a la mezcla de reacción.

### **Análisis de metabolitos intracelulares**

Se cosecharon 10 mL de cultivo en fase exponencial o estacionaria de crecimiento, las células se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min a 4 °C y posteriormente se agregaron 700 µL de metanol 100 % previamente enfriado a -20 °C. Luego se agregaron 25 µL de ribitol (0,3 mg/mL) que se utilizó como estándar interno para la cuantificación. Se agitó durante 15 min a 70 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se agregaron 350 µL de cloroformo y se agitó durante 5 min a 37°C. Finalmente, se adicionaron 750 µL de dH<sub>2</sub>O y se centrifugo a 2,200 x g por 15 min. El volumen final se separo en alícuotas de 250 µL y se secó en una centrífuga al vacío *Speed Vac* sin calentamiento.

La metodología de extracción anteriormente descrita, partición líquida y derivatización se realizaron según descrito por Lisec et al. [150]. Se utilizaron cuatro replicados biológicos por tratamiento con un segundo grupo de replicados técnicos para la determinación. El análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) se realizó utilizando el sistema cromatográfico Autosystem XL acoplado a un espectro de masa Turbo (Perkin Elmer) en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR.

Las inyecciones de 1 µL fueron realizadas a 280 °C. La columna capilar utilizada fue VF-5ms (Varian, Darmstadt, Germany) con las siguientes dimensiones: 30 m por 0,25 mm diámetro interior y partícula de 0,25 µm usando helio como gas de corrida con un flujo constante de 1 mL/min.

El programa de temperatura utilizado fue 5 min a 70 °C, una rampa de 5 min a 310 °C, and un calentamiento final de 2 min at 310 °C.

Los espectros se monitorearon en un rango de masa de m/z de 70 a 600. Los cromatogramas se adquirieron utilizando el software TurboMass 4.1 (Perkin Elmer). El programa "NIST98mass spectral search program" se utilizó como plataforma del software (<http://www.nist.gov/srd/mslist.htm>; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD).

Los espectros de masa (MS) y el tiempo de retención se compararon con la colección de datos de la base de datos "Golm Metabolome Database" (Kopka J, et al. 2005. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21:1635–1638). La coincidencia de espectros de masa se supervisó manualmente y se aceptaron los aciertos con un umbral  $\geq 650$  y retenciones del índice de derivatización menores al 1.0 %.

La altura de los picos se normalizó con la cantidad de peso fresco de la muestra y ribitol como estándar interno. Las cantidades relativas de metabolitos y los estudios estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Sigma Stat 3.1.

### **Análisis de lípidos**

La extracción de lípidos totales se realizó a partir de células liofilizadas (1,5 a 3 mg) tratadas con cloroformo- metanol (2:1 V/V). Los extractos se evaporaron y analizaron por cromatografía de capa delgada (TLC) en placas de sílica gel 60 F254 (0,2 mm Merck) como fue descrito previamente por Arabolaza et al. [9], utilizando una mezcla hexano- dietil éter- ácido acético (80:20:1 V/V) como solvente para la resolución de triacilglicéridos (TAGs). Las fracciones lipídicas fueron visualizadas por tinción con Cu-fosfórico.

# RESULTADOS

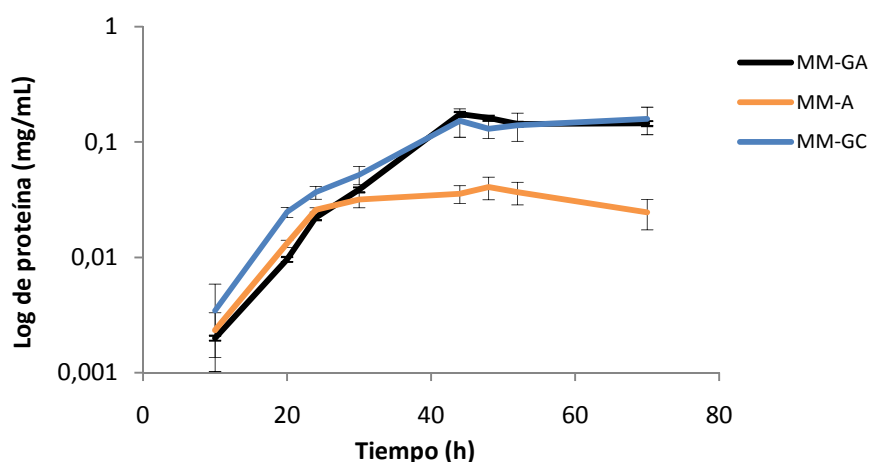
# CAPÍTULO I

## METABOLISMO DE ALANTOÍNA EN *S. coelicolor*

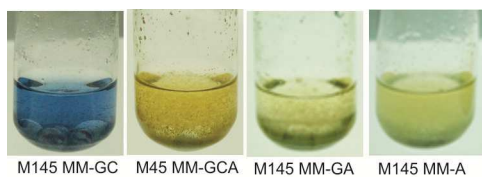
### Estudios proteómicos para la identificación de proteínas de la vía de la alantoína

Estudios previos en bacterias del género *Streptomyces* demostraron que las mismas eran capaces de crecer con purinas o sus derivados, como hipoxantina, xantina o ácido úrico, como única fuente de carbono y nitrógeno [110, 125]. Estos trabajos permitieron describir parte de las enzimas involucradas en la degradación de purinas a alantoína. Sin embargo hasta el momento no se han descrito enzimas de degradación de alantoína en este género bacteriano [115, 122, 123]. Como punto de partida de este trabajo se verificó que *S. coelicolor* fuera capaz de utilizar adenina, guanina o xantina como única fuente de nitrógeno y carbono. Una vez corroborado esto, para comenzar con los estudios del metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*, se determinó la capacidad de la cepa parental M145 de crecer en alantoína como única fuente de carbono y/o nitrógeno. Para esto se comparó el crecimiento de *S. coelicolor* M145 en medio mínimo líquido suplementado con alantoína como única fuente de carbono y nitrógeno (MM-A) y suplementado con glucosa como fuente de carbono y alantoína como fuente de nitrógeno (MM-GA), con el crecimiento en medio mínimo líquido suplementado con glucosa y casa aminoácidos (MM-GC) (Figura 8 A). Durante estos estudios se evidenció una alteración en la producción de antibióticos de *S. coelicolor* (Figura 8 B) en presencia de alantoína, tanto en MM-A como en MM-GA que se tratará sobre el final de este capítulo. Primeramente, nos centramos en la caracterización de las enzimas de esta vía metabólica.

A)



B)



**Figura 8.** A) Curva de crecimiento de la cepa parental *S. coelicolor* M145 en medio mínimo líquido suplementado con alantoína como única fuente de carbono y nitrógeno (MM-A), con glucosa como fuente de carbono y alantoína como fuente de nitrógeno (MM-GA) y con glucosa como fuente de carbono y casa aminoácidos como fuente de nitrógeno (MM-GC). B) Producción de antibióticos de la cepa parental *S. coelicolor* M145 en MM-GC, MM-GCA y MM-GA.

Con la idea de identificar las proteínas involucradas en el catabolismo de alantoína se realizaron experimentos proteómicos comparando el proteoma de la cepa *S. coelicolor* M145 crecida en medio mínimo suplementado con glucosa y alantoína (MM-GA) contra el proteoma de esta cepa crecida en medio glucosa y casa aminoácidos (MM-GC). Estos ensayos se plantearon con el objeto de encontrar un aumento de la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de alantoína cuando la cepa es crecida en presencia de alantoína en MM-GA con respecto a MM-GC. Para esto, se tomaron muestras de ambos cultivos a dos tiempos de crecimiento (uno en fase exponencial y otro en fase estacionaria) y se realizaron extracciones proteicas totales de cada una de ellas. Estos extractos proteicos totales fueron marcados utilizando la técnica de iTRAQ y se analizaron por LC-MS. De esta manera, se lograron identificar más de 450 proteínas totales (con al menos dos péptidos con 99% de confianza), de las cuales aproximadamente 70 presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos medios a cada uno de los tiempos analizados (Tabla IV, V y VI). Dentro de estas 70 proteínas se seleccionaron aquellas que presentaron un incremento en sus niveles de expresión en medio suplementado con alantoína y se compararon con proteínas previamente identificadas en el metabolismo de alantoína en otros organismos utilizando la herramienta bioinformática BLAST [145], de manera de poder asignar un rol a las mismas en el metabolismo de este compuesto en *S. coelicolor*.

De esta manera se logró identificar 5 proteínas en fase exponencial de crecimiento con incrementos de más de 4 veces en sus niveles de expresión en medio

suplementado con alantoína. Estas proteínas fueron alantoicasa (Alc), tartronato semialdehído reductasa (GlxR), glioxilato carboligasa (Gcl), hidroxipiruvato isomerasa (Hyi) y malato sintasa (AceB1), las cuales mostraron incrementos de 6,2, 10,4, 9,3, 8,8 y 3,9 respectivamente (Tabla IV) [18, 151]. A su vez, la proteína putativa ureidoglicolato liasa también mostró un aumento en su nivel de expresión en presencia de alantoína aunque el incremento fue de 2,2 veces. Por otro lado, la proteína Sco6204, que presenta un alto porcentaje de similitud con enzimas catalasas, también mostró un marcado aumento de la expresión en medio con alantoína (incremento de 6,3) [18]. La mayoría de estas proteínas también presentaron un aumento de la expresión en MM-GA durante fase estacionaria de crecimiento, sin embargo, algunas de ellas no pudieron ser detectadas (Tabla IV).

**Tabla IV.** Proteínas putativas del metabolismo de alantoína de *S. coelicolor* identificadas por proteómica.

Proteína	Proteína homóloga <sup>a</sup>	% Sim <sup>b</sup>	Función	r <sup>c</sup> 24 h	r <sup>c</sup> 46 h	Referencia
<b>GlxR, SCO6205</b>	GlxR ( <i>E. coli</i> )	43 %	tartronato semialdehído reductasa	10,44	35,91	[152]
<b>Hyi, SCO6206</b>	Hyi ( <i>E. coli</i> )	34 %	hidroxipiruvato isomerasa	9,35	3,49	[153]
<b>Gcl, SCO6201</b>	Gcl ( <i>E. coli</i> )	73 %	glioxilato carboligasa	8,88	ND	[154]
<b>SCO6204</b>	KatE ( <i>E. coli</i> )	48 %	catalasa	6,32	3,15*	[155]
<b>Alc, SCO6248</b>	PuuF ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	39 %	alantoicasa	6,23	ND	[156]
<b>AceB1, SCO6243</b>	AceB ( <i>E. coli</i> )	49 %	malato sintasa	3,99*	1,56	[157]
<b>Ugl, SCO2850</b>	Ugl ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	54 %	Ureidoglicolato liasa	2,19	ND	[158]

<sup>a</sup>: Proteínas caracterizadas involucradas en el metabolismo de alantoína.

<sup>b</sup>: Sim, similitud. Determinado utilizando BLAST.

<sup>c</sup>: Relación proteica detectada en MM-GA/MM-GC. Test de Student; P < 0.1.

\*: P > 0.1. Verificado por RT-PCR.

ND: no detectada

### **Proteínas del metabolismo de nitrógeno, carbono y aminoácidos**

A su vez, los estudios proteómicos permitieron detectar proteínas pertenecientes al metabolismo de nitrógeno, metabolismo de carbono y metabolismo de aminoácidos cuyos niveles de expresión se encontraban afectados cuando la bacteria se creció en medio con alantoína (Tabla V).

Por ejemplo, se detectaron proteínas involucradas en la incorporación de nitrógeno cuyos niveles disminuyeron en fase exponencial de crecimiento en medio con alantoína: la proteína que une ATP (GluA), la proteína periplasmática de unión a glutamato (GluB) y la proteína glutamina sintasa II (GSII). GluA y GluB, si bien no han sido caracterizadas en *S. coelicolor*, presentan una alta homología de secuencia con el complejo de captación de glutamato en *Corynebacterium glutamicum* [159]. Por otro lado, GSII es una de las principales proteínas de asimilación de nitrógeno en *S. coelicolor*, catalizando la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio [48].

También se lograron detectar en estos experimentos otras proteínas importantes del metabolismo de nitrógeno como son la glutamato sintasa I (GSI), la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la proteína reguladora de nitrógeno PII (GlnB) pero los valores de las mismas no se encontraron afectados en medio con alantoína en fase exponencial de crecimiento.

La enzima malato deshidrogenasa (Mdh) fue la única proteína identificada del ciclo de Krebs en presentar un aumento en su expresión tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento en medio con alantoína. Esto podría deberse a los altos niveles de malato generados durante el catabolismo de alantoína. Otras proteínas del ciclo de Krebs cuyos niveles de expresión se encontraron afectados en MM-GA fueron 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Sco5281), succinil-CoA sintetasa (SucD y SucC), citrato sintasa (CitA), y isocitrato deshidrogenasa (Idh), pero en este caso las mismas presentaron una disminución en su expresión a 24 horas de crecimiento en MM-GA con respecto a MM-GC.

La mayor cantidad de proteínas del metabolismo de aminoácidos fue identificada durante la fase estacionaria de crecimiento. Dos proteínas cuyos valores de expresión se encontraron afectados a 46 horas en medio con alantoína pueden vincularse con los resultados obtenidos en los experimentos de metabolómica (Capítulo I, página 92). Una de estas proteínas es la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA), involucrada en la

biosíntesis de serina y glicina que mostró un marcado aumento en MM-GA y podría explicar la acumulación de glicina observada a 46 horas de crecimiento (Figura 21). La otra es la metilmalonato semialdehído deshidrogenasa (MsdA), una proteína de la vía de degradación de valina que también mostró un marcado aumento de su expresión en MM-GA correspondiéndose con la disminución de los niveles de valina mostrado por los estudios metabólicos (Figura 21).

**Tabla V.** Proteínas del metabolismo de nitrógeno, aminoácidos y carbono identificadas por proteómica.

Metabolismo de nitrógeno	Función proteica	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
<b>GSI, SCO2198</b>	glutamina sintetasa I	1,57	0,22
<b>GluB, SCO5776</b>	proteína periplasmática de unión a glutamato	0,25	0,30
<b>GSII, SCO2210</b>	glutamina sintetasa II	0,28	0,82 *
<b>GDH, SCO4683</b>	glutamato deshidrogenasa	1,20 *	0,98
<b>GlnB, SCO5584</b>	proteína regulatoria de nitrógeno pII	0,72 *	0,42 *
<b>GluA, SCO5777</b>	proteína de captación de glutamato de unión a ATP	0,22 *	0,59 *

Metabolismo de aminoácidos	Función proteica	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
<b>IlvC, SCO5514</b>	acetolactato sintasa subunidad pequeña	3,58	1,76
<b>SerA, SCO5515</b>	3-D-fosfoglicerato deshidrogenasa	1,16 *	2,58
<b>SCO4366</b>	Aminotransferasa	2,56	ND
<b>GlyA1, SCO4837</b>	serina hidroximetiltransferasa	1,28 *	ND
<b>MsdA, SCO2726</b>	ácido metilmalonico semialdehído deshidrogenasa	ND	2,69
<b>CysA, SCO4164</b>	thiosulfato sulfurotransferasa	ND	6,25

Metabolismo de carbono	Función proteica	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
<b>Fba, SCO3649</b>	fructosa 1,6-difosfato aldolasa	2,19	ND
<b>Mdh, SCO4827</b>	malato deshidrogenasa	1,64	2,68
<b>SCO5281</b>	2-oxoglutarato deshidrogenasa	0,49	1,81
<b>Ppc, SCO3127</b>	fosfoenolpiruvato carboxilasa	0,48	ND
<b>Gap, SCO1947</b>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	0,44	ND
<b>SucD, SCO4809</b>	succinil-CoA sintetasa subunidad alfa	0,43	ND
<b>CitA, SCO2736</b>	citrato sintasa	0,40	0,52
<b>SCO3877</b>	6-fosfogluconato deshidrogenasa	0,37	ND
<b>Idh, SCO7000</b>	isocitrato deshidrogenasa	0,27	ND

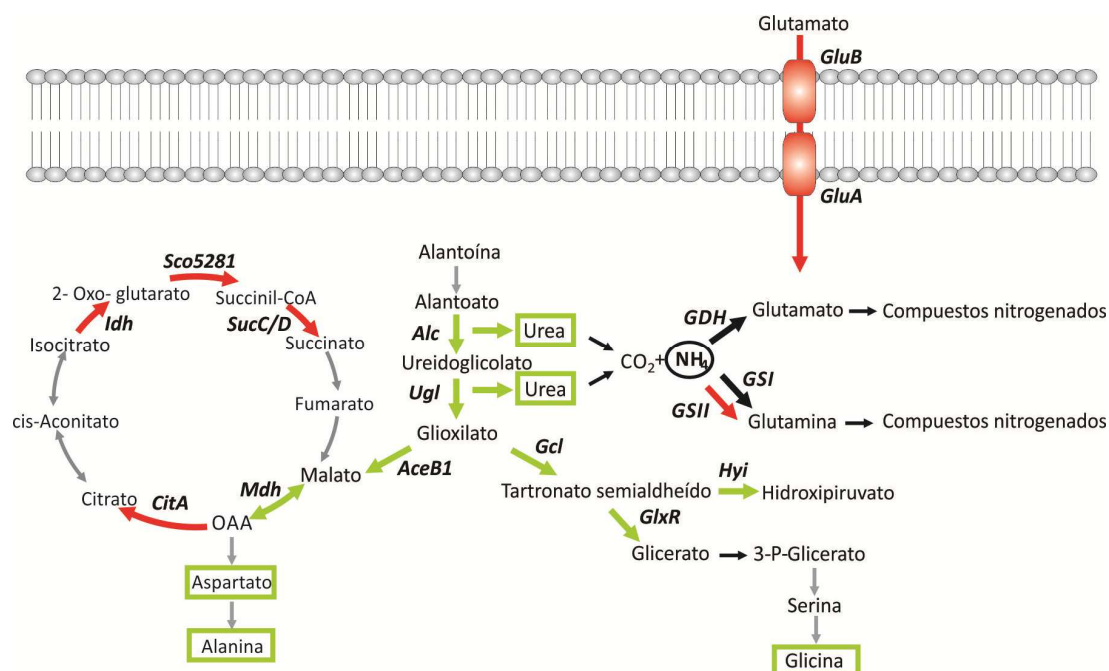
<b>SucC, SCO4808</b>	succinil-CoA sintetasa subunidad beta	0,23	ND
<b>SCO2180</b>	dihidrolipoamida deshidrogenasa	0,40	0,38
<b>Eno, SCO3096</b>	Enolasa	1,38	ND
<b>Glk, SCO2126</b>	Glucokinasa	ND	0,14

<sup>a</sup>: Relación proteica detectada en MM-GA/MM-GC. Test de Student;  $P < 0.1$ .

\*:  $P > 0.1$

ND: no detectada

En base a los resultados de los estudios proteómicos elaboramos un esquema (Figura 9) a modo de resumen donde se muestran las proteínas del metabolismo de alantoína, nitrógeno y carbono cuyos niveles de expresión se encontraron alterados en MM-GA con respecto a MM-GC en *S. coelicolor*. En este esquema se incluyeron metabolitos (recuadrados en verde) que se encontraron acumulados en MM-GA con respecto a MM-GC mediante estudios metabolómicos como se detalla sobre el final de este capítulo.



**Figura 9.** Representación de las proteínas cuyos niveles se encontraron alterados en MM-GA con respecto a MM-GC en fase exponencial de crecimiento en *S. coelicolor*. Las flechas verdes representan las proteínas que mostraron un aumento de su nivel mientras que las flechas rojas proteínas que mostraron una disminución en MM-GA con respecto a MM-GC. Las flechas negras representan proteínas que si bien fueron identificadas no presentaban cambios en su nivel y las flechas grises corresponden a las proteínas que no fueron detectadas en los estudios de proteómica pero se suponen existirían en *S. coelicolor*.

El resto de las proteínas involucradas en otros procesos metabólicos y estructurales o cuyo rol se desconoce que se encontraron alteradas en MM-GA con respecto a MM-GC se detallan en la Tabla VI.

**Tabla VI.** Otras proteínas putativas identificadas por proteómica.

Otras proteínas	Función proteica	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO2396	proteína hipotética	13,10	4,06
SCO6431	proteína hipotética	1,47	ND
SCO6279	diaminobutirato-piruvato aminotransferasa	4,00	ND
SCO1080	proteína hipotética	4,08	ND
SCO2008	proteína periplasmática de unión a aminoácidos	6,14	0,34
SCO6009	proteína periplasmática de unión a soluto	5,81	ND
SCO1074	Peptidasa	0,20	ND
SCO1480	proteína hipotética	0,19	ND
InhA, SCO1814	enoil-ACP-reductasa	0,14	ND
cypH, SCO7510	peptidil-proil cis-trans isomerasa	0,34	ND
sodN, SCO5254	superoxide dismutasa	0,32	ND
SCO681	ferredoxina/ferredoxina-NADP reductasa	0,39	ND
DnaK, SCO3671	proteína de shock térmico	0,46	ND
SCO6431	proteína hipotética	1,47	ND
GroEL1, SCO4762	Chaperona	1,48	ND
SCO1355	serina proteasa de secreción	1,52	ND
SCO5178	Sulfurilasa	1,61	2,07
SCO2492	proteína de membrana	2,45	ND
SCO5477	proteína de unión a oligopéptido	2,47	ND
SCO1630	proteína de membrana	2,53	ND
AtpD, SCO5373	ATP sintasa cadena beta	4,33	ND
GroES, SCO4761	Chaperona	0,09	6,79
SCO2011	proteína de transporte de aminoácidos de unión a ATP	ND	0,18
SCO3542	proteína de membrana con actividad quinasa	ND	6,32
SCO5389	proteína hipotética	ND	5,94
SCO4277	proteína hipotética	ND	5,53
GlgX2, SCO5456	glicosil hidrolasa	ND	3,97
SCO2780	proteína de secreción	ND	3,41
SCO4880	Transferasa	ND	2,14
Arc, SCO1648	ATPasa	ND	2,12
SCO1089	proteína hipotética	ND	0,73
SCO4228	proteína de transporte de fosfato	ND	0,65
CobN, SCO1849	proteína de biosíntesis de cobalamina	ND	0,59

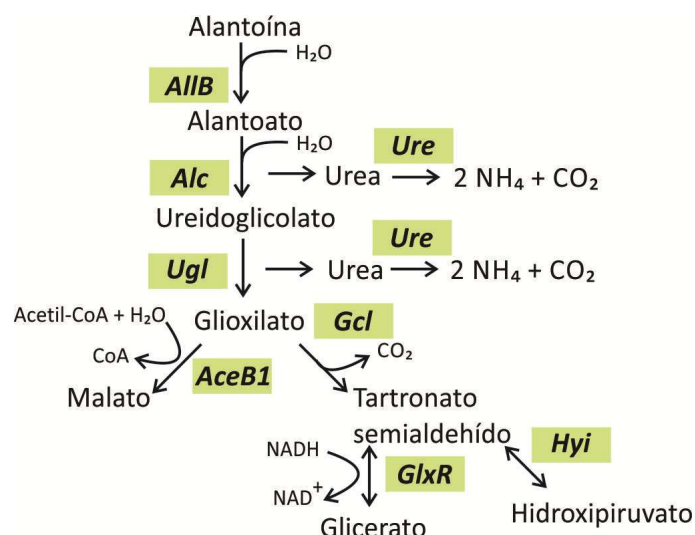
<b>SCO1925</b>	proteína hipotética	ND	0,48
<b>SCO3767</b>	proteína hipotética	ND	0,45
<b>PstS, SCO4142</b>	proteína de unión a fosfato	ND	0,36
<b>SCO5477</b>	proteína de unión a oligopéptido	ND	0,32
<b>BldKB, SCO5113</b>	transportador ABC lipoproteína	ND	0,25
<b>SCO1647</b>	proteína hipotética	ND	0,23
<b>SCO1565</b>	glicerofosforil diester fosfodiesterasa	ND	0,19
<b>SodF2, SCO0999</b>	superóxido dismutasa	ND	0,16
<b>SCO5520</b>	delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	ND	0,14
<b>SCO1230</b>	proteína de secreción	ND	0,05
<b>SCO6431</b>	proteína hipotética	ND	0,12

<sup>a</sup>: Relación proteica detectada en MM-GA/MM-GC. Test de Student;  $P < 0.1$ .

ND: no detectada

### Vía propuesta para el metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*

En base a los resultados obtenidos en los experimentos de proteómica y siguiendo la información bibliográfica disponible, proponemos la siguiente vía metabólica para la degradación de alantoína en *S. coelicolor* (Figura 10). Esta vía involucra seis proteínas de las identificadas mediante proteómica (Alc, Ugl, AceB1, Gcl, GlxR y Hyl) y otras dos proteínas (AlIB y Ure) no detectadas mediante estos experimentos proteómicos pero su inclusión se demuestra más adelante en este capítulo. AlIB presenta un alto porcentaje de similitud con alantoinasas de otros organismos y su marco abierto de lectura se encuentra corriente arriba del gen *alc* [18, 160-164]. Ure correspondería al complejo ureasa constituido por tres subunidades proteicas (UreABC) y tres proteínas accesorias (UreD, UreF y UreG) [165].



**Figura 10.** En verde se resalta las proteínas propuestas para la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*.

La primera proteína de la vía, AlIB, se propone como enzima alantoinasa capaz de catalizar la ruptura hidrolítica del enlace amida entre N3 y C4 del anillo de alantoína generando como producto de reacción una molécula de alantoato. Esta proteína presenta un 36 % de similitud con la alantoinasa de *E. coli* [161, 166]. El alantoato formado sería el sustrato de Alc que se propone como alantoicasa, catalizando la formación de ureidoglicolato y urea a partir del mismo. Alc presenta un 39 % de similitud con la alantoicasa PuuF de *P. aeruginosa* [156].

Para demostrar esto, ambas proteínas (AlIB y Alc) fueron caracterizadas mediante la utilización de herramientas bioinformáticas y ensayos bioquímicos (página 80).

El ureidoglicolato sería sustrato de Ugl que presenta un 54 % de similitud con la proteína ureidoglicolato liasa de *B. cepacia*, también presente en *E. coli*, *S. cerevisiae* y en algunas especies de *Pseudomonas* [93, 167-169]. Esta proteína cataliza la conversión de ureidoglicolato en glioxilato con liberación de una molécula de urea.

Luego el glioxilato sería sustrato de varias enzimas. Por un lado, de la malato sintasa AceB1 que cataliza la condensación irreversible de acetil-CoA con glioxilato para dar una molécula de malato. El malato formado podría luego ser metabolizado por el ciclo de Krebs. AceB1 de *S. coelicolor* ha sido previamente caracterizada y se demostró que la misma requiere de  $Mg^{+2}$  como co-factor para su máxima actividad catalítica [150 [170]. A su vez, existe otra proteína con alta similitud a AceB1 en *S.*

*coelicolor* (codificada por el gen *sco0983*) que, por cercanía genética a la secuencia codificante de la proteína isocitrato liasa (*sco0982*), la misma se propone como enzima del ciclo del glioxilato en este organismo (Tesina de Licenciatura de Juan Pablo Macagno).

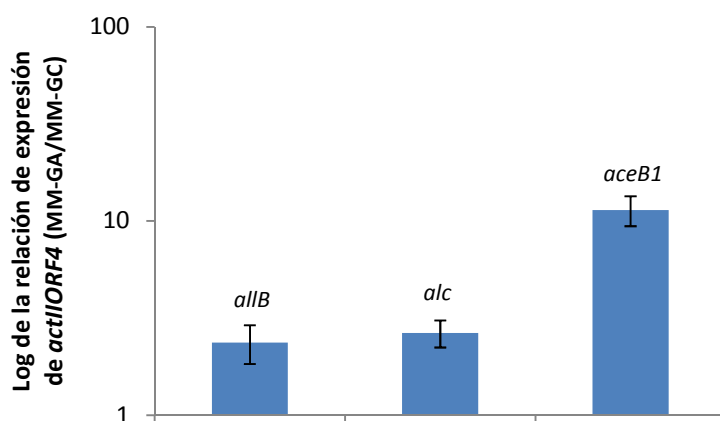
Por otro lado, el glioxilato sería sustrato de la proteína Gcl que presenta un 73 % de similitud con la proteína glioxilato carboligasa de *E. coli* y cataliza la condensación de dos moléculas de glioxilato en tartronato semialdehído [171]. De esta manera el glioxilato presenta un punto de ramificación en la vía para la asimilación de la parte carbonada de la molécula de alantoína.

Por último, el tartronato semialdehído también sería sustrato de más de una enzima. Por un lado, de GlxR, que presenta un 43 % de similitud con la proteína tartronato semialdehído reductasa de *E. coli* y cataliza la reducción NADH dependiente de tartronato semialdehído para dar glicerato [94]. Y por otro lado, de Hyi, que se propone como enzima hidroxipiruvato isomerasa ya que presenta un 34 % de similitud con la proteína de esta actividad en *E. coli*. Esta enzima cataliza la isomerización reversible de tartronato semialdehído en hidroxipiruvato [172]. Para corroborar esta última parte de la vía, las proteínas GlxR y Hyi fueron estudiadas mediante herramientas bioinformáticas y las actividades enzimáticas comprobadas con experimentos bioquímicos (página 84).

Con respecto a la urea, el derivado nitrogenado de la alantoína, proponemos que el complejo ureasa Ure sería el encargado de catalizar su hidrólisis, generando ácido carbónico y dos moléculas de  $\text{NH}_3$ . El ácido carbónico luego se disocia y las moléculas de  $\text{NH}_3$  se protonan generando  $\text{NH}_4^+$ . El complejo Ure estaría constituido por 3 subunidades (UreABC) y tres proteínas accesorias (UreD, UreF y UreG) requeridas para ensamblar el centro metálico de níquel característico de este complejo [165]. Cada una de las subunidades Ure de *S. coelicolor* presentan un alto grado de similitud con las subunidades del complejo ureasa caracterizado de *B. subtilis* [173]. Por otro lado, el genoma de *S. coelicolor* presenta otro conjunto de genes (*sco5525-sco5526*) que podrían codificar para otro complejo ureasa; sin embargo, como se detalla en la página 97 de este capítulo, descartamos la participación del mismo en la vía de degradación de alantoína.

### Estudio transcripcional de los genes *aceB1*, *allB* y *alc* en presencia de alantoína

Con el fin de verificar los resultados obtenidos en los experimentos de proteómica y determinar el nivel de expresión del gen *allB* cuya proteína no fue detectada en dichos estudios, se analizaron los niveles de transcripción de los genes *aceB1*, *allB* y *alc* en MM-GA con respecto a MM-GC a 24 horas de crecimiento mediante ensayos de PCR en tiempo real. A partir de cultivos de la cepa parental M145 crecida en ambos medios se prepararon extracciones de ARN total de utilizando un kit de extracción de Promega (ver materiales y métodos). El RNA total se retrotranscribió con una enzima transcriptasa reversa de Invitrogen y finalmente, el producto se amplificó utilizando oligos correspondientes a cada gen (Tabla III). Los resultados de estos experimentos muestran un aumento de los niveles de transcripción de los tres genes analizados en medio con alantoína (Figura 11).



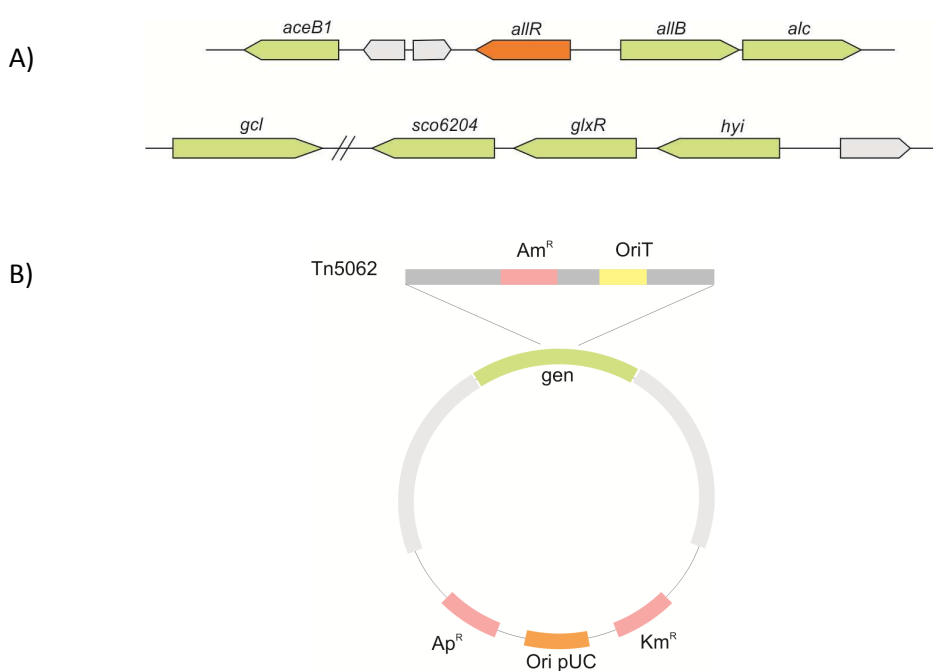
**Figura 11.** Niveles de expresión de los transcritos de los genes *allB*, *alc*, *aceB1* a 24 horas de crecimiento en MM-GA con respecto a MM-GC por RT-PCR.

Estos estudios permitieron, por un lado, corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de proteómica, observándose un aumento de la expresión de los genes *alc* y *aceB1* en MM-GA; y por otro lado, determinar que el gen *allB* también se expresa y presenta un aumento de expresión en MM-GA.

### Estudio genético de la vía propuesta

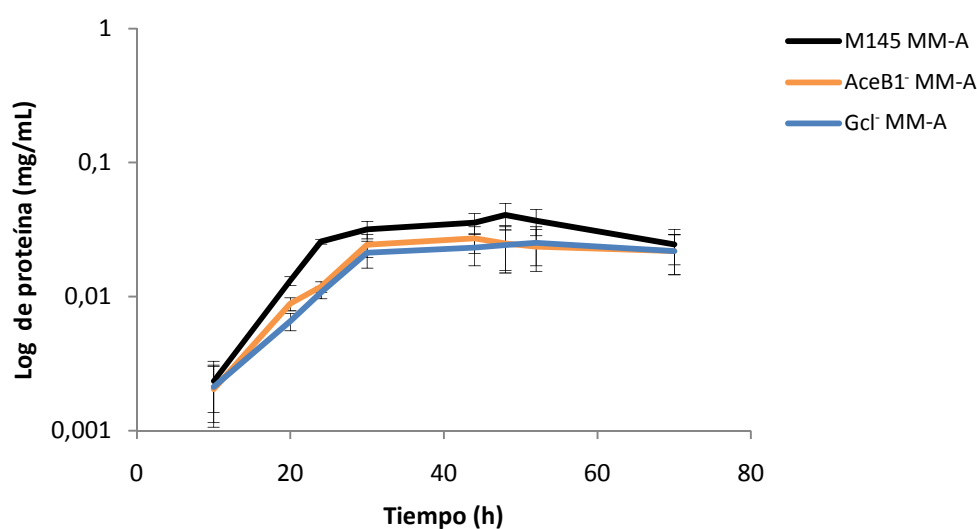
Los genes que codifican para las proteínas propuestas de la vía de catabolismo de alantoína se encuentran agrupados en dos regiones del genoma de *S. coelicolor*. Una región comprende los genes *aceB1*, *allR* (este gen codifica para un regulador transcripcional que será descrito en el Capítulo II de este trabajo), *allB* y *alc*. La otra región comprende a los genes *sco6204*, *glxR* y *hyi* mientras que el gen *ugt* (*sco2850*) y *ure* (*sco1231-sco1236*) se encuentran más alejado de estas regiones (Figura 12 A) [17].

Para continuar con la caracterización de esta vía metabólica se construyeron mutantes insercionales en los genes *alc*, *allB*, *aceB1* y *gcl*. Para esto se usaron cósmidos que presentaban el gen de interés interrumpido por una inserción transposónica conteniendo un cassette de resistencia a apramicina y un *oriT* que permite su movilización por conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces* (Figura 12 B) [174]. Utilizando esta estrategia, mediante un doble evento de recombinación homóloga se obtienen las mutantes en los genes en estudio por intercambio con el alelo mutado, seleccionando cepas resistentes al antibiótico apramicina y sensibles a kanamicina. Las cepas mutantes seleccionadas se corroboraron mediante experimentos de PCR como se describe en el capítulo materiales y métodos.



**Figura 12.** A) Regiones genómicas que contienen los genes propuestos para el metabolismo de alantoína. B) Estructura de los cósmidos utilizados para la conjugación intergenérica.

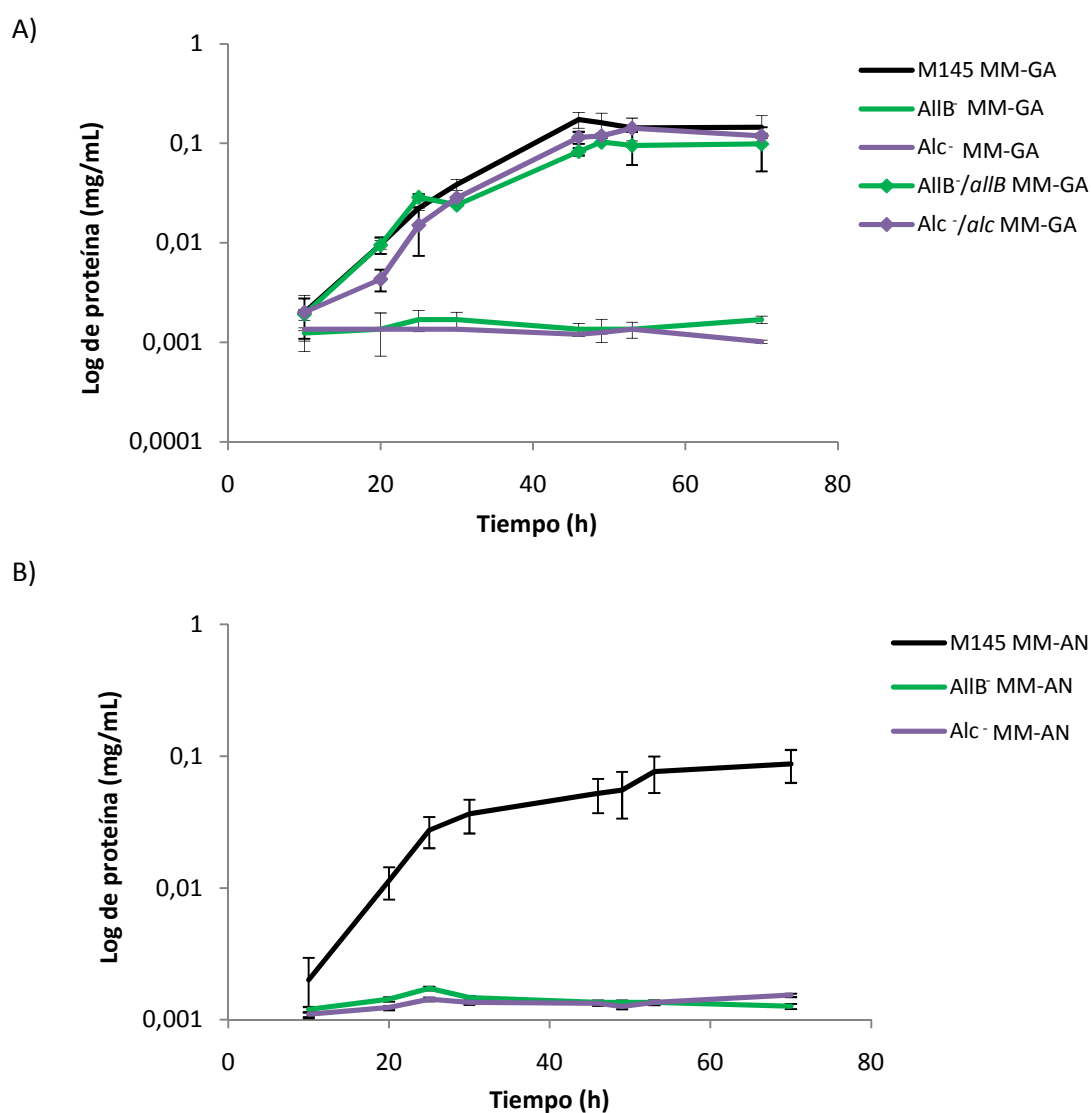
Cada una de estas cepas mutantes fue crecida en MM-A para evaluar el rol de cada gen sobre el crecimiento con alantoína como fuente de nitrógeno y carbono. Las mutantes *AceB1<sup>-</sup>* y *Gcl<sup>-</sup>* no presentaron diferencias significativas de crecimiento en este medio comparado con la cepa parental M145 (Figura 13). Este resultado concuerda con la vía metabólica propuesta, donde las enzimas malato sintasa y glioxilato carboligasa representan una ramificación pudiendo utilizar ambas glioxilato como sustrato y permitiendo el crecimiento a partir de alantoína mediante la rama alternativa de la vía.



**Figura 13.** Crecimiento de las cepas *AceB1<sup>-</sup>*, *Gcl<sup>-</sup>* y M145 en MM-A y MM-GA.

Por otro lado, las mutantes *AllB<sup>-</sup>* y *Alc<sup>-</sup>* no fueron capaces de crecer en medio con alantoína como única fuente de nitrógeno (MM-GA) (Figura 14). Para verificar estos resultados, cada una de estas cepas fue complementada con una copia funcional del gen correspondiente mediante la utilización de un vector integrativo (pLN06 y pLN07 Tabla II). En la Figura 14 A se puede observar que la expresión de una copia funcional del gen *allB* o *alc* en la cepa mutante correspondiente restablece el crecimiento en medio con alantoína. Este resultado indica que las proteínas AllB y Alc son esenciales para el crecimiento con alantoína como única fuente de nitrógeno. A su vez, estos experimentos de complementación indican que la mutación en el gen *allB* no tiene un efecto polar sobre la expresión del gen *alc*, debido a que la expresión sólo de *allB* en la mutante *AllB<sup>-</sup>* permite el crecimiento en alantoína.

Por otro lado, para el caso de estas mutantes también se realizó un control de crecimiento en medio mínimo suplementado con alantoína y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (MM-AN), para determinar si las mismas eran capaces de crecer a partir de alantoína como única fuente de carbono (Figura 14 B). Estos experimentos demostraron que las mutantes  $\text{AlIB}^-$  y  $\text{Alc}^-$  no fueron capaces de crecer en este medio y de esta manera, se verifica la esencialidad de los genes *allB* y *alc* también para el crecimiento en alantoína como única fuente de carbono.



**Figura 14.** Curvas de crecimiento de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y de las cepas mutantes  $\text{AlIB}^-$ ,  $\text{Alc}^-$  en MM-GA (A) y MM-AN (B). Las cepas  $\text{AlIB}^-/\text{allB}$  y  $\text{Alc}^-/\text{alc}$  corresponden a las cepas mutantes complementadas con una copia funcional del gen en estudio.

Estos estudios verifican la vía propuesta y demuestran que las proteínas AIB y Alc constituyen la única vía funcional para el catabolismo de alantoína en *S. coelicolor*.

### **Análisis bioinformático de AIB y Alc**

Para continuar con el estudio de las proteínas AIB y Alc de *S. coelicolor* se analizaron las secuencias aminoacídicas de las mismas buscando la presencia de regiones conservadas características de las familias de enzimas a las cuales pertenecen mediante alineamientos con secuencias aminoacídicas de proteínas ortólogas en otros organismos.

La enzima alantoinasa pertenece a la familia de amidohidrolasas metal-dependientes, los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un sitio mononuclear o dinuclear de unión a metal [161, 175, 176]. Pertenecen a este grupo también las enzimas hidantoinasa, dihidropirimidinas y dihidroorotasa que forman parte del metabolismo de purinas y pirimidinas, catalizando la hidrólisis reversible del enlace amida cíclico del sustrato correspondiente [177-179]. Estas enzimas, junto con las enzimas alantoinasas, presentan un sitio dinuclear de unión a metal con residuos de histidina y aspartato conservados que son esenciales para la unión de metal y la actividad catalítica. A su vez, también se encuentra conservado en estas proteínas un residuo de lisina, cuya cadena lateral es carbamilada post-traduccionalmente permitiendo la interacción de los dos iones metálicos [160, 161].

Como se observa en la Figura 15 A, la enzima AIB de *S. coelicolor* presenta los cuatro residuos de histidina conservados junto con el residuo de aspartato y de lisina característicos de estas proteínas [160, 178, 179].

Por otro lado, las enzimas alantoicasas se caracterizan por la presencia de dos repeticiones conocidas como AR1 y AR2 conectadas mediante una región flexible. La única estructura cristalográfica disponible hasta el momento es la de la alantoicasa de *S. cerevisiae*, que indica que la región AR1 tiene una configuración espacial muy similar a la región AR2, ambas constituyendo un motivo de “jelly-roll” compuesto por cuatro y cinco hebras antiparalelas de hojas plegadas beta. A su vez, las enzimas alantoicasas se caracterizan por la presencia de motivos específicos altamente conservados en su secuencia aminoacídica, DGWET(S)RR, PDGG y DGWET(A)R [180]. Estos motivos fueron

fácilmente encontrados en la secuencia de aminoácidos de la proteína Alc de *S. coelicolor* (Figura 15 B).

A)

```

E. coli AllB PGMVDAH59TH61I62SEPGR VGVVGF146K147CFVATCG GQPVLVH186CENAL RLHVCH242VSSPE IDCLVSD315HSPC
B. sub AllB PGVIDCH60VH62FNEPGR AGAIGF147AFLSKSG GKILALH183AESDA PVHFVH239ISTAK IDMVSD312HSPC
S. cer AllB PGLVDSH70VH72LNEPGR AGVVRGF157GFLLD158SG DTMMMF193AELPK FVHIVH250LASMK IGSVSD322HSPC
S. coe AllB PGLVDTH63VH65VNDPGR AGVVRGF150AFLSPSG DGLLIVH186AEDPH RVHVLH238LSSSD IDCVVD312HSPS

```

B)

```

N. cra Alc MTDIDYKLEAVPATRIAADD-----IDKTFRSSTIDLISGALGGKVS146GFSD147EWFAE148ANLLTPTAP149IRQPGK150MVYT 71
P. aer Alc MN---AEHSPFRHY-----LDLADARLGSQVAVSDEWFAPASRMLQAGEPVWKEGVFDD151S 53
S. cer Alc MKFFSLADEAEFKSIIIS-----KNKAVDVI152GSKLGGQVVSFSD153EWFAE154ENLIQPTAP155IRDPTRFVHS 64
S. coe Alc VTAQQNTSLASFTGDAQPYGGDPYADYRTADLPFTQYANLADRQLGAGVVAANDEFFAQRENLLVPEPAEFDPEHFGHK 80

N. cra Alc GAWYD146GWETR147RHN-----PAEFDVWVIRLGVASGTVEGVEIDTAF148FNGNHAPAI149SVEGCF150SQNDDEVL151SWKGE152L 141
P. aer Alc GKWM146D147GWETR148RKR-----FEGHDQAVIRLGV149P-GVLKGV150IDTRFF151TGNHPPAASLDGCFC152AE153GDP--DD154ST-- 118
S. cer Alc GAWYD146GWETR147RHN-----EMEYD148VVI149IKMGVAA150AHI151IGGEIDTAF152FNGNHAPF153VSIEALYDE154GEEGNIV155EDDSR- 133
S. coe Alc GKVM146D147GWETR148RRRGVSAEQPWPTEEDHDWALIRL149GAP-GVIRGIV150VDTAHFRGNY151PQAVSVEGASVAGSP152SPEELLAD153DV 159

N. cra Alc GWETILGVQECG146PSQ147RFCKLEN-P148TKKQY149THVRLN150MY151PD152GGIAR153FRLFGH154AVPVFP155PDN-TDAIFDLAA156QNGGVA157ISCS 219
P. aer Alc -WSEVLA146AVGLQGD147SHHYHPID148---ERP149WTHLRL150NIY151PD152GGIAR153LRLYGV154PYRD155WSNQP156PGTALDLAA157VNGGRAL158ACS 194
S. cer Alc -WVEIVEK146FE147CGPSQR148HLFVR149GNGLTK150ERF151THIKL152KMY153PD154GGIAR155FRLYGR156VVPE157ELKT-KDHI158IDLAV159CNGA160VALK161YS 211
S. coe Alc KWTTLVPR146TPV147GGHAANGFAVSA---EQR148FTHLRL149KQH150PD151GGIAR152LRLVY153GEV154VADPAWLAALGT155FVVALE156NGGQ157VEDAS 236

N. cra Alc DQHF146GTKDNLILPGRGKDMG147D148GWETAR149SR150TKG151HVDWTI152IRL153G-APGYIQ154NFMV155DTAHFRGNY156PQV157KLQRI158EWK--SEGR 296
P. aer Alc DQHFGRMG146NLLNPGRAINMG147D148GWETGR149RRTPGH-DW150VIVALG-HPGSIEAAV151DTLHF152KGNY153PESCSIQAA154FVEGGNEAR 272
S. cer Alc DQHF146GSVDNLLLPGRGHDMS147D148GWETKR149SRQP150GH151TDWAVI152QLGRES153FI154EKI155IVDTAHFRG156NFPQ157FITVEG158CLKE--SESS 289
S. coe Alc NLFYSPATNTIQ146GRSRKMD147D148GWETR149RRRD150KGN-DWI151QYRLV-DRSQIRAI152EIDTAYL153KGNSAG154WASVSVK155DGE----- 308

N. cra Alc PGADSEG146WTEVVEPIKCPDQ147EHPVESLVKDK-PF148THVKLI149IV150PD151GGV152KRLRV153FAKRAV 354
P. aer Alc IEAQSLFWRELLPAQKLEMHQEHR146FERHLN147ALGPITHVRLN148IF149PD150GGV151SR152LRL153FGR154PQLP 332
S. cer Alc ENTGEGTWV146ELV147GKSKT148GPDK149EH-VYEIRKSI-RVSHV150KLTI151IV152PD153GGV154KRIR155VWGY 343
S. coe Alc ---AGEWREVLPRTRMQ146PD147TNHRFVLPEAAV148G--THARVDI149IV150PD151GGI152SR153LRL154FGSL155TEDGAARLAARHQELGG 376

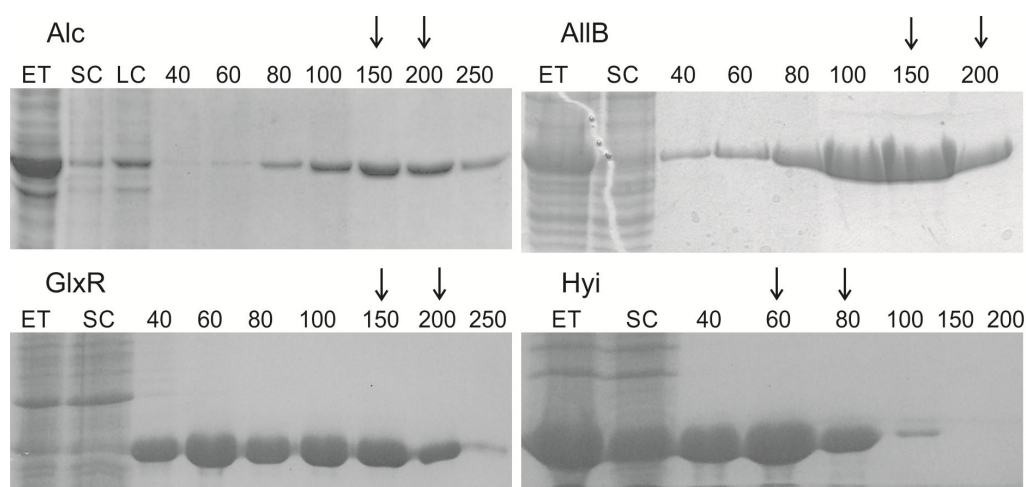
```

**Figura 15.** A) Alineamiento de las secuencias aminoácidas de proteínas alantoinasas de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* y *S. coelicolor* utilizando el software ClustalW [146]. Los residuos marcados en rojo se encuentran altamente conservados en esta familia de amidohidrolasas metal-dependientes. B) Alineamiento de secuencias aminoácidas de las proteínas alantoicasas de *N. crassa* (*N. cra*), *P. aeruginosa* (*P. aer*), *S. cerevisiae* (*S. cer*) y *S. coelicolor* (*S. coe*). Los motivos marcadas en rojo se encuentran altamente conservados en la familia de alantoicasas.

### Caracterización bioquímica de las proteínas AllB y Alc

Con el objetivo de verificar las actividades enzimáticas propuestas para las proteínas AllB y Alc, las mismas se obtuvieron como proteínas recombinantes en *E. coli*. Para esto, los genes *allB* y *alc* se amplificaron por PCR, se clonaron en el vector pET28a (pLN03 y pLN05 Tabla II) y se expresaron en la cepa *E. coli* BL21 como proteínas

de fusión a seis residuos de histidina. Finalmente las proteínas fueron purificadas en columnas de afinidad de  $\text{Ni}^{+2}$ -agarosa (Figura 16).



**Figura 16.** SDS-PAGEs realizados durante la purificación de proteínas Alc, AllB, GlxR y Hyi. ET corresponde a extracto proteico total, SC siembra inicial de la columna, LC primer lavado de la columna, 40, 60, 80, 100, 150, 200 y 250 corresponden a las eluciones realizadas con imidazol en mM. Las flechas indican las fracciones de elución que fueron posteriormente dializadas y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La actividad alantoinasa de la proteína AllB, que cataliza la formación de alantoato a partir de alantoína, se determinó mediante la descomposición del alantoato formado a glioxilato y posterior transformación a glicolato acoplado la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 17 A). Previamente a la purificación de la proteína AllB, se realizaron ensayos enzimáticos de actividad alantoinasa con extractos proteicos totales provenientes de cultivos crecidos en medios suplementados con  $1\text{mM CoCl}_2$ ,  $1\text{mM ZnCl}_2$  o sin agregado de catión divalente. De estos experimentos se determinó que actividad alantoinasa más alta fue obtenida cuando se expresó la proteína en presencia de  $\text{CoCl}_2$ , por lo tanto se seleccionó este medio para la expresión y posterior purificación de la enzima AllB. La presencia del catión divalente en el medio aumenta marcadamente la actividad alantoinasa, como fue previamente demostrado para la enzima alantoinasa de *E. coli* [134].

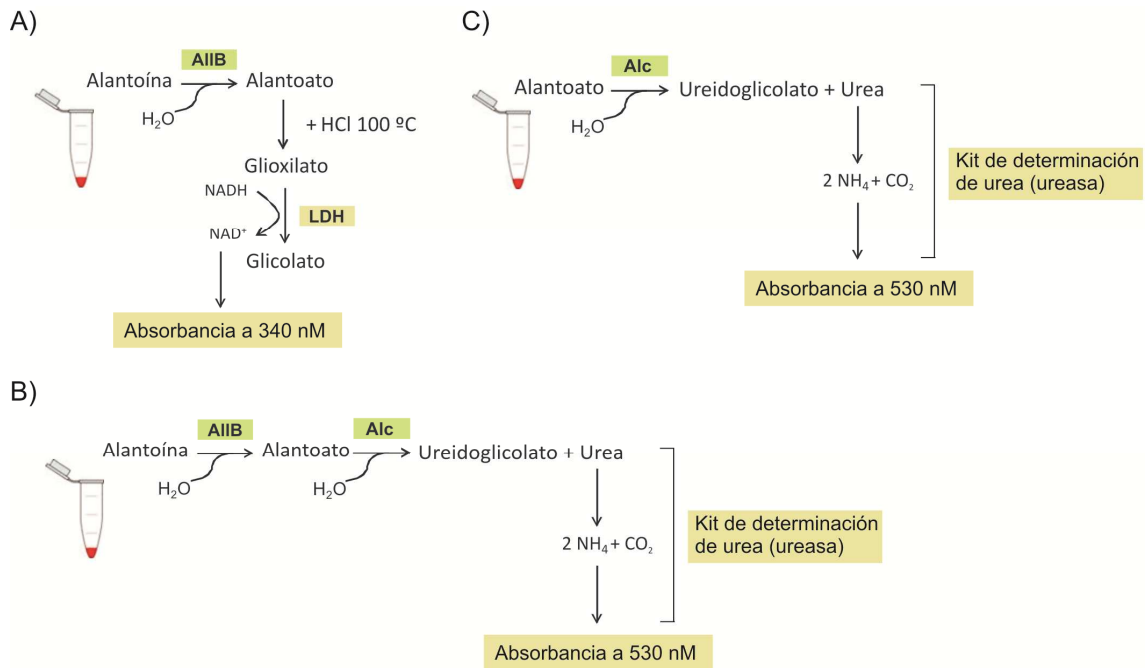
Para determinar la actividad alantoinasa de la proteína Alc, que cataliza la formación de ureidoglicolato y urea a partir de alantoato, se realizó un ensayo

colorimétrico discontinuo determinándose la formación de urea en función del tiempo (Figura 17 C).

Algunas especies bacterianas como *E. coli* [181] o *B. fastidiosus* [182] presentan una enzima alantoato amidohidrolasa capaz de catalizar la reacción de hidrólisis de alantoato a ureidoglicolato. Sin embargo, el mecanismo molecular de la enzima alantoato amidohidrolasa es distinto, pasando por el intermediario ureidoglicina y liberando dos moléculas de amonio y una de CO<sub>2</sub> en lugar de una molécula de urea.

Para corroborar que la proteína Alc presenta actividad alantoicasa y no alantoato amidohidrolasa, se realizó un ensayo control utilizando el kit Urea Color 2R (Wiener Lab), pero sin el agregado final de ureasa que descompone la urea formada en amonio y CO<sub>2</sub> para la determinación colorimétrica. Este experimento permitió corroborar que la enzima Alc cataliza la formación de ureidoglicolato y urea a partir de alantoato, en lugar de ureidoglicolato y amonio, ya que no se observó aparición de color por presencia de amonio sin el agregado de ureasa a la mezcla de reacción.

Por otra parte, también se realizó un ensayo enzimático acoplando las enzimas AIB y Alc utilizando alantoína como sustrato y determinando la formación de urea en función del tiempo. El alantoato generado por AIB es utilizado como sustrato por la proteína Alc que lo transforma en ureidoglicolato y urea. Utilizando alantoína como sustrato de AIB y agregando un exceso de proteína Alc (relación AIB:Alc 1:10 U) se verificó la actividad alantoinasa de AIB. Este ensayo permitió determinar los parámetros cinéticos de la misma. De la misma manera, utilizando alantoína como sustrato y agregando un exceso de proteína AIB (relación AIB:Alc 10:1 U) se verificó la actividad alantoicasa de Alc y se determinó la actividad específica de esta proteína (Figura 17 B). Como controles de este ensayo, se verificó la ausencia de reacción colorimétrica sin agregado de proteína AIB o sin agregado de proteína Alc a la mezcla de reacción.



**Figura 17.** A) Determinación enzimática de la actividad alantoinasa de AIBB mediante una reacción acoplada a LDH. Se determinó la disminución de absorbancia a 340 nm por oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. B) Determinación enzimática de la actividad alantoinasa de AIBB mediante una reacción acoplada a la enzima Alc (relación AIBB:Alc 1:10 U). Se utilizó el kit Urea 2R Color Wiener Lab para la determinación de NH<sub>4</sub> mediante absorbancia a 530 nm. C) Determinación enzimática de la actividad alantoicasa de Alc mediante la utilización del kit Urea 2R Color Wiener Lab.

Estos ensayos enzimáticos confirmaron que la proteína AIBB presenta actividad alantoinasa catalizando la conversión de alantoína a alantoato con  $V_{\max}$  de  $619 \pm 25 \text{ U mg}^{-1}$  y  $K_m$  para alantoína de  $41 \pm 4 \text{ mM}$ . Además, se verificó que la proteína Alc presenta actividad alantoicasa y cataliza la conversión de alantoato a ureidoglicolato y urea con una  $V_{\max}$  de  $218 \pm 20 \text{ U mg}^{-1}$ . Los parámetros cinéticos estimados para cada enzima son comparables con los valores reportados para otros ortólogos bacterianos [97, 134, 183].

### Análisis bioinformático de Hyi y GlxR

Para profundizar el estudio de las proteínas Hyi y GlxR de *S. coelicolor* se analizaron las secuencias proteicas de las mismas utilizando bases de datos y fuentes bibliográficas.

La enzima GlxR pertenece a la familia de  $\beta$ -hidroxiácido deshidrogenasas que presentan varios dominios y residuos característicos conservados. Estas proteínas presentan un dominio N-terminal de unión a co-factor dinucleótido con la secuencia

consenso GXXGXGXMGXAXNXXXG, un dominio LDAPVSSGGXXXAXX(A/G) de unión a sustrato donde los residuos de serina y glicina son altamente conservados, un dominio catalítico que presenta varios residuos de lisina y glicinas indispensables para la actividad catalítica cuya secuencia consenso es GXXGXGXXXXXXX(N/Q). Por otro lado, poseen un dominio C-terminal de unión a co-factor donde existen dos residuos altamente conservados (lisina y glicina) [152]. Los miembros de la familia de  $\beta$ -hidroxiácido deshidrogenasas pueden utilizar NAD(H) o NADP(H) como co-factor. En el caso de las enzimas tartronato semialdehído reductasas bacterianas caracterizadas hasta el momento, las mismas utilizan NAD(H) [152, 184]. Los cuatro dominios conservados de esta familia de enzimas se encontraron en la secuencia de la proteína GlxR de *S. coelicolor* (Figura 18 A).

La enzima Hyi ha sido poco estudiada en bacterias, la misma fue purificada y caracterizada en *E. coli* y *B. fastidiosus* [153, 185]. Según los estudios realizados en *E. coli*, existirían varios residuos conservados característicos de estas proteínas no solo procariontes sino también en homólogos eucariotas [153] como se muestra en el alineamiento de la Figura 18 B. Estos alineamientos fueron realizados con las secuencias proteicas de hidroxipiruvato isomerasas putativas de varias especies bacterianas. La secuencia proteica de la proteína Hyi de *B. fastidiosus* no se encuentra disponible en la base de datos ya que el genoma de esta especie bacteriana aún se encuentra en etapas de secuenciación ([http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/project\\_wgs-e.html](http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/project_wgs-e.html)). Los aminoácidos conservados característicos de las enzimas hidroxipiruvato isomerasas se encuentran presentes en la secuencia proteica de Hyi de *S. coelicolor* (Figura 18 B).

A)

GlxR <i>S. coe</i>	MSTLPKVAVI <b>GLGIMG</b> SPMSE <b>NLIKAGY</b> QVTGFTLEQEKLDRLLAAAGGGVAGSIAEAVRDADVVVMTVPASPQVEAIIAYG	80
GlxR <i>B. cep</i>	---MATI <b>GFIGLIGIMGAHMARNLLKGD</b> HQLVVMGAFPIIP--DDLRA <b>SAKVVANST</b> EVANQADIIISMVDPDTPDVRNVLPAF	75
GlxR <i>B. sub</i>	--MDRNV <b>GFIGLIGIMG</b> KPMAL <b>NLIKAGY</b> SLTIFDLNQDAVQRVVVSAGAAAAGSPREVAEKSEVIITMLPASQHVKSIVILG	78
GlxR <i>E. coli</i>	----MKL <b>GFIGLIGIMG</b> TPMA <b>INLARAGHQLHVT</b> TIGPVAD-ELLSL <b>GAVSVETARQVTEASD</b> IIFIMVDPDTPQVEEVLFG	75
GlxR <i>P. aer</i>	---MAKI <b>GFIGTIGIMG</b> KPMA <b>QNLQAGH</b> SLFLSTHDDAAPADLLEAGAIALANPKVAQEAFFIIVMVPDTPQVEDVLF	77
GarR <i>S. typ</i>	--MTMKV <b>GFIGLIGIMG</b> KPM <b>SKNLLKAGY</b> SLVSDRNPEAIADVIAAGAE <b>TASTAKAIAEQ</b> CDVITITMLPNSPHVKEVALG	78
GlxR <i>S. coe</i>	PDGILENAKSGALLVDMSSITPQTSVDLAKAAKDKGIRV <b>LDAPVSGGEAGAE</b> AVLSIMVGGEQADFDEAKPLLEALGKT	160
GlxR <i>B. cep</i>	DDGVAKGLTAGKLVDMSSISPLDTQEF <b>AKQINALGCDYLDAPVSGGEGARE</b> ATLIMVGGPEQAFERAKPLFEKMGKN	155
GlxR <i>B. sub</i>	ENGLVKGVKKNVAVIIDMSSITPDVSREIAVKA <b>AKGGAAML</b> LDAPVSGGEPK <b>AIDG</b> TLAIMVGGREDVFESVSSIFHAVGKD	158
GlxR <i>E. coli</i>	ENGCTKASLKGKTI <b>VD</b> MSSISPIETKR <b>FARQV</b> NELGGDY <b>LDAPVSGGEIGARE</b> GTLSIMVGGDEAVFERVKPLFELLGKN	155
GlxR <i>P. aer</i>	KDGAIEGVGPNKVVDMSSISPSATK <b>GF</b> AEKIKATGAQ <b>YLDAPVSGGEGAKA</b> ATLSIMVGGCPNSFERALPLFQAMGKN	157
GarR <i>S. typ</i>	ENGIIEGAKPGTVLIDMSSIA <b>PLASREIS</b> DAL <b>KAKGVEMLDAPVSGGEPK</b> AIDGTL <b>SMVGGDKAIFDKY</b> YDLMKAMAGS	158
GlxR <i>S. coe</i>	IVLCGPH <b>SGQ</b> TV <b>KAANQL</b> I <b>VAVNIQACAE</b> AVV <b>FL</b> EKSGVDLKAALDVLNGGLAGSTVLTRKKNDFLGRDFKPGFRIDLH	240
GlxR <i>B. cep</i>	ITLVGD <b>NGAG</b> Q <b>TCKVANQ</b> I <b>I</b> VALNIEAVGEALL <b>F</b> AARSGADPERVRQALMGGFAASRILEVHGARM <b>T</b> KRTFD <b>DP</b> GFRIELH	235
GlxR <i>B. sub</i>	ITLVGD <b>NGCG</b> V <b>TAKLANQ</b> I <b>I</b> VALNIAAMSEALVLA <b>AKAGID</b> IEKMYQAIR <b>S</b> GLAGSAVLD <b>AK</b> VP <b>M</b> ILDRNFTAGGSIAIN	238
GlxR <i>E. coli</i>	ITLVGG <b>NGDG</b> Q <b>TCKVANQ</b> I <b>I</b> VALNIEAVSEALL <b>F</b> ASKAGAD <b>P</b> VRVRQALMGGFASSRILEVHG <b>R</b> MIK <b>R</b> T <b>F</b> NP <b>G</b> FKIALH	235
GlxR <i>P. aer</i>	ITRVGG <b>NGDG</b> Q <b>TAKVANQ</b> I <b>I</b> VALN <b>IQ</b> AVAEALL <b>F</b> AARNGAD <b>PA</b> KVREALMGGFASSRILEVHG <b>R</b> MIK <b>R</b> T <b>F</b> NP <b>G</b> FRISLH	237
GarR <i>S. typ</i>	VVHTGDI <b>GAG</b> NV <b>T</b> KL <b>ANQ</b> V <b>I</b> VALNIAAMSEAL <b>T</b> LAT <b>KAG</b> VNPDLVYQ <b>A</b> IRGGLAGSTVLD <b>AK</b> AP <b>M</b> MDR <b>N</b> FK <b>P</b> GF <b>R</b> IDLH	238
GlxR <i>S. coe</i>	HKDMGIVTDAARNVGAALPVGAVVAQLVASLRA <b>Q</b> GDGGLDHSAL <b>L</b> LRAVERLSGDQV	296
GlxR <i>B. cep</i>	QKDLNLALDGARKLGLALPHTASA <b>Q</b> QLF <b>S</b> VCASH <b>GG</b> KAWDHSAL <b>V</b> RALEIMSN <b>F</b> IG <b>Q</b> TPAA	297
GlxR <i>B. sub</i>	MKDITNVMDTAHEIGVPLPLSS <b>Q</b> LLE <b>I</b> FHALKVD <b>G</b> KINDDHGS <b>I</b> VR <b>Y</b> EKL <b>A</b> NI <b>E</b> V <b>K</b> KA	297
GlxR <i>E. coli</i>	QKDLNLALQSAKALALNLPNTATC <b>Q</b> ELFNTCAAN <b>GG</b> SQLDHSAL <b>V</b> QALELMAN <b>H</b> KL <b>A</b>	292
GlxR <i>P. aer</i>	QKDLNLALAGARELNLNLPNTANA <b>Q</b> QVF <b>S</b> TCA <b>A</b> I <b>G</b> GSNWDHSAL <b>I</b> KGLEHMAN <b>F</b> S <b>I</b> R <b>D</b> E	296
GarR <i>S. typ</i>	IKDLANALD <b>T</b> SHGVGAQL <b>P</b> L <b>T</b> AAV <b>M</b> EMMQAL <b>R</b> AD <b>GH</b> GNDDHSAL <b>A</b> CY <b>Y</b> EKL <b>A</b> K <b>V</b> EV <b>T</b> R	296

B)

Hyi <i>S. coe</i>	MGFADQRFN <b>N</b> LSILFTE <b>L</b> PL <b>L</b> ER <b>P</b> AAA <b>A</b> AG <b>F</b> T <b>A</b> VEL <b>W</b> W <b>P</b> WID <b>S</b> PT <b>P</b> EQ <b>S</b> EL <b>D</b> AL <b>K</b> SA <b>I</b> ED <b>A</b> GV <b>L</b> T <b>G</b> L <b>N</b> F <b>Y</b> AG <b>Q</b> LP <b>G</b> P	80
Hyi <i>B. cep</i>	----MPK <b>F</b> AAN <b>L</b> T <b>M</b> L <b>F</b> NE <b>V</b> P <b>F</b> LD <b>R</b> F <b>K</b> AA <b>A</b> D <b>A</b> G <b>F</b> DA <b>V</b> E <b>F</b> LF <b>P</b> Y <b>P</b> -----Y <b>A</b> KE <b>L</b> EA <b>R</b> LE <b>T</b> H <b>R</b> L <b>R</b> L <b>V</b> L <b>H</b> N <b>L</b> P <b>A</b> GN <b>W</b> D <b>Q</b> G	69
Hyi <i>E. coli</i>	----MLR <b>F</b> SA <b>N</b> LS <b>M</b> LF <b>Q</b> E <b>Y</b> D <b>F</b> LE <b>R</b> F <b>D</b> KA <b>A</b> Q <b>C</b> G <b>F</b> RA <b>V</b> E <b>F</b> MF <b>P</b> Y <b>D</b> -----Y <b>D</b> I <b>E</b> V <b>L</b> Q <b>H</b> KL <b>S</b> SN <b>N</b> LE <b>H</b> T <b>L</b> H <b>N</b> L <b>P</b> AG <b>D</b> WA <b>A</b> G	69
Hyi <i>P. aer</i>	----MLR <b>F</b> SA <b>N</b> LS <b>M</b> LF <b>Q</b> E <b>Y</b> D <b>F</b> LE <b>R</b> F <b>D</b> KA <b>A</b> Q <b>C</b> G <b>F</b> RA <b>V</b> E <b>F</b> MF <b>P</b> Y <b>D</b> -----Y <b>D</b> I <b>E</b> V <b>L</b> Q <b>H</b> KL <b>S</b> SN <b>N</b> LE <b>H</b> T <b>L</b> H <b>N</b> L <b>P</b> AG <b>D</b> WA <b>A</b> G	69
Hyi <i>S. coe</i>	DRGALSIPGEESERFRANID <b>V</b> A <b>A</b> D <b>F</b> AR <b>S</b> LGCTALN <b>A</b> LYGN <b>R</b> VEG <b>V</b> DP <b>A</b> E <b>Q</b> DR <b>L</b> A <b>L</b> EN <b>L</b> V <b>L</b> A <b>A</b> RA <b>A</b> DR <b>I</b> GA <b>V</b> LL <b>V</b> E <b>A</b> LN <b>K</b> P	160
Hyi <i>B. cep</i>	ERGIACLPDRVGE-FQEGV <b>G</b> RA <b>I</b> E <b>Y</b> AK <b>A</b> L <b>K</b> V <b>P</b> Q <b>L</b> N <b>C</b> L <b>V</b> G <b>I</b> PS <b>A</b> ST <b>A</b> R <b>D</b> K <b>T</b> F <b>V</b> T <b>I</b> V <b>D</b> N <b>L</b> R <b>F</b> A <b>A</b> D <b>A</b> L <b>K</b> R <b>E</b> G <b>I</b> R <b>L</b> L <b>V</b> E <b>P</b> C <b>N</b> S <b>F</b>	148
Hyi <i>E. coli</i>	ERGIACIPG <b>R</b> EE <b>E</b> -FRD <b>G</b> V <b>A</b> VA <b>I</b> R <b>Y</b> AR <b>A</b> L <b>G</b> N <b>K</b> K <b>I</b> N <b>C</b> L <b>V</b> G <b>K</b> T <b>P</b> V <b>G</b> S <b>A</b> E <b>Q</b> V <b>H</b> T <b>T</b> L <b>V</b> E <b>N</b> L <b>R</b> Y <b>A</b> A <b>N</b> M <b>L</b> A <b>K</b> E <b>G</b> I <b>L</b> L <b>L</b> I <b>E</b> P <b>L</b> N <b>H</b> F	148
Hyi <i>P. aer</i>	ERGIACIPG <b>R</b> EE <b>E</b> -FRD <b>G</b> V <b>A</b> VA <b>I</b> R <b>Y</b> AR <b>A</b> L <b>G</b> N <b>K</b> K <b>I</b> N <b>C</b> L <b>V</b> G <b>K</b> T <b>P</b> V <b>G</b> S <b>A</b> E <b>Q</b> V <b>H</b> T <b>T</b> L <b>V</b> E <b>N</b> L <b>R</b> Y <b>A</b> A <b>N</b> M <b>L</b> A <b>K</b> E <b>G</b> I <b>L</b> L <b>L</b> I <b>E</b> P <b>L</b> N <b>H</b> F	148
Hyi <i>S. coe</i>	ES <b>P</b> RY <b>P</b> LV <b>S</b> AP <b>A</b> IA <b>V</b> DR <b>V</b> NE <b>A</b> T <b>G</b> L <b>N</b> A <b>K</b> F <b>L</b> M <b>D</b> L <b>Y</b> H <b>L</b> S <b>M</b> N <b>G</b> E <b>D</b> L <b>P</b> Q <b>V</b> I <b>D</b> A <b>Y</b> A <b>A</b> K <b>T</b> G <b>H</b> V <b>Q</b> I <b>A</b> D <b>N</b> P <b>R</b> G <b>R</b> G <b>A</b> P <b>T</b> G <b>S</b> L <b>P</b> L <b>E</b> D <b>L</b>	240
Hyi <i>B. cep</i>	D <b>I</b> P <b>G</b> F <b>A</b> L <b>N</b> R <b>S</b> SE <b>G</b> L <b>D</b> V <b>I</b> R----AV <b>G</b> S <b>D</b> N <b>L</b> F <b>L</b> Q <b>Y</b> D <b>I</b> Y <b>H</b> M <b>Q</b> R <b>M</b> E <b>G</b> E <b>L</b> A <b>A</b> T <b>I</b> E <b>R</b> N <b>L</b> A <b>S</b> I <b>G</b> H <b>V</b> Q <b>L</b> A <b>D</b> N <b>P</b> R <b>G</b> R <b>N</b> E <b>P</b> G <b>T</b> G <b>E</b> I <b>N</b> Y <b>A</b> F <b>L</b>	224
Hyi <i>E. coli</i>	D <b>M</b> P <b>G</b> F <b>H</b> L <b>T</b> G <b>T</b> Q <b>Q</b> A <b>L</b> A <b>L</b> I <b>A</b> ----D <b>I</b> G <b>S</b> N <b>N</b> I <b>K</b> I <b>Q</b> Y <b>D</b> I <b>Y</b> H <b>M</b> Q <b>R</b> M <b>E</b> G <b>E</b> L <b>A</b> Q <b>T</b> M <b>T</b> W <b>A</b> N <b>K</b> I <b>G</b> H <b>L</b> Q <b>I</b> A <b>D</b> N <b>P</b> R <b>R</b> G <b>E</b> P <b>G</b> T <b>G</b> E <b>I</b> N <b>D</b> F <b>L</b>	224
Hyi <i>P. aer</i>	D <b>M</b> P <b>G</b> F <b>H</b> L <b>T</b> G <b>T</b> Q <b>Q</b> A <b>L</b> A <b>L</b> I <b>A</b> ----D <b>I</b> G <b>S</b> N <b>N</b> I <b>K</b> I <b>Q</b> Y <b>D</b> I <b>Y</b> H <b>M</b> Q <b>R</b> M <b>E</b> G <b>E</b> L <b>A</b> Q <b>T</b> M <b>T</b> W <b>A</b> N <b>K</b> I <b>G</b> H <b>L</b> Q <b>I</b> A <b>D</b> N <b>P</b> R <b>R</b> G <b>E</b> P <b>G</b> T <b>G</b> E <b>I</b> N <b>D</b> F <b>L</b>	224
Hyi <i>S. coe</i>	LDRLAKAGYDGWV <b>G</b> LE <b>Y</b> K <b>P</b> GD <b>D</b> PS <b>A</b> Q <b>S</b> F <b>S</b> W <b>L</b> P <b>A</b> G <b>A</b> R <b>A</b> R	279
Hyi <i>B. cep</i>	FALLDRLGYAGYV <b>G</b> C <b>E</b> Y <b>K</b> P-R <b>T</b> T <b>T</b> T <b>E</b> G <b>L</b> W <b>L</b> Q <b>S</b> V <b>A</b> G <b>C</b> A <b>P</b> S <b>A</b> R <b>R</b> A <b>A</b>	269
Hyi <i>E. coli</i>	FDLIEKSDYDGWV <b>G</b> C <b>E</b> Y <b>K</b> P-L <b>T</b> T <b>T</b> E <b>A</b> G <b>L</b> S <b>W</b> I <b>N</b> P <b>Y</b> R	258
Hyi <i>P. aer</i>	FDLIEKSDYDGWV <b>G</b> C <b>E</b> Y <b>K</b> P-L <b>T</b> T <b>T</b> E <b>A</b> G <b>L</b> S <b>W</b> I <b>N</b> P <b>Y</b> R	258

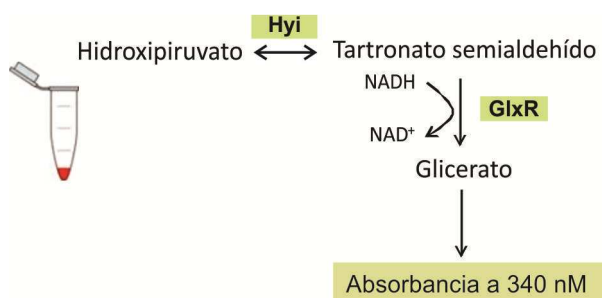
**Figura 18.** A) Alineamiento de secuencias proteicas de enzimas tartronato semialdehído reductasas de *S. coelicolor* (*S. coe*), *B. cepacia* (*B. cea*), *E. coli* (*E. coli*), *B. subtilis* (*B. sub*), *P. aeruginosa* (*P. aer*) y *Salmonella typhimurium* (*S. typ*) utilizando el software ClustalW [146]. Los residuos en rojo corresponden a los residuos conservados de cada dominio característico de estas enzimas B) Alineamiento de secuencias proteicas de enzimas tartronato semialdehído reductasas de *S. coelicolor*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa* y la secuencia proteica de la proteína Hyi caracterizada de *E. coli*.

### Caracterización bioquímica de las proteínas Hyi y GlxR

Para verificar que el gen *hyi* codifica una proteína con actividad hidroxipiruvato isomerasa como fue propuesto, se realizó un ensayo enzimático acoplado a la enzima tartronato semialdehído reductasa, GlxR. Esta metodología se utilizó para determinar la actividad hidroxipiruvato isomerasa de Hyi en *E. coli*.

Para este fin, los genes *hyi* y *glxR* fueron amplificados por PCR y clonados en el vector pET28 (pLN16 y pLN24 Tabla II) para su expresión como proteínas recombinantes en una cepa de *E. coli* BL21. Ambas proteínas se expresaron como proteínas de fusión a seis residuos de histidina y se purificaron en columna de afinidad de Ni-agarosa (Figura 16). Debido a que la reacción catalizada por la enzima Hyi es reversible, en este ensayo se utilizó hidroxipiruvato como sustrato y el producto tartronato semialdehído fue convertido en glicerato por la enzima GlxR que utiliza NADH como co-cofactor. La reacción se determinó espectrofotométricamente a 340 nm por oxidación de NADH (Figura 19).

Este ensayo enzimático permitió confirmar que Hyi cataliza la conversión de hidroxipiruvato en tartronato semialdehído con  $V_{\max}$  de  $26,8 \pm 1,8 \text{ U mg}^{-1}$  y  $K_m$  para hidroxipiruvato de  $55 \pm 7,5 \text{ mM}$ , y que GlxR cataliza la conversión de tartronato semialdehído en glicerato con  $V_{\max}$  de  $4,2 \pm 0,5 \text{ U mg}^{-1}$ . Los parámetros cinéticos obtenidos son comparables con los valores propuestos para otros ortólogos bacterianos [152, 153].



**Figura 19.** Determinación enzimática de la actividad hidroxipiruvato isomerasa de Hyi y tartronato semialdehído reductasa de GlxR mediante la determinación de desaparición de NADH en un ensayo espectrofotométrico.

### **Efecto del crecimiento en alantoína sobre la producción de antibióticos**

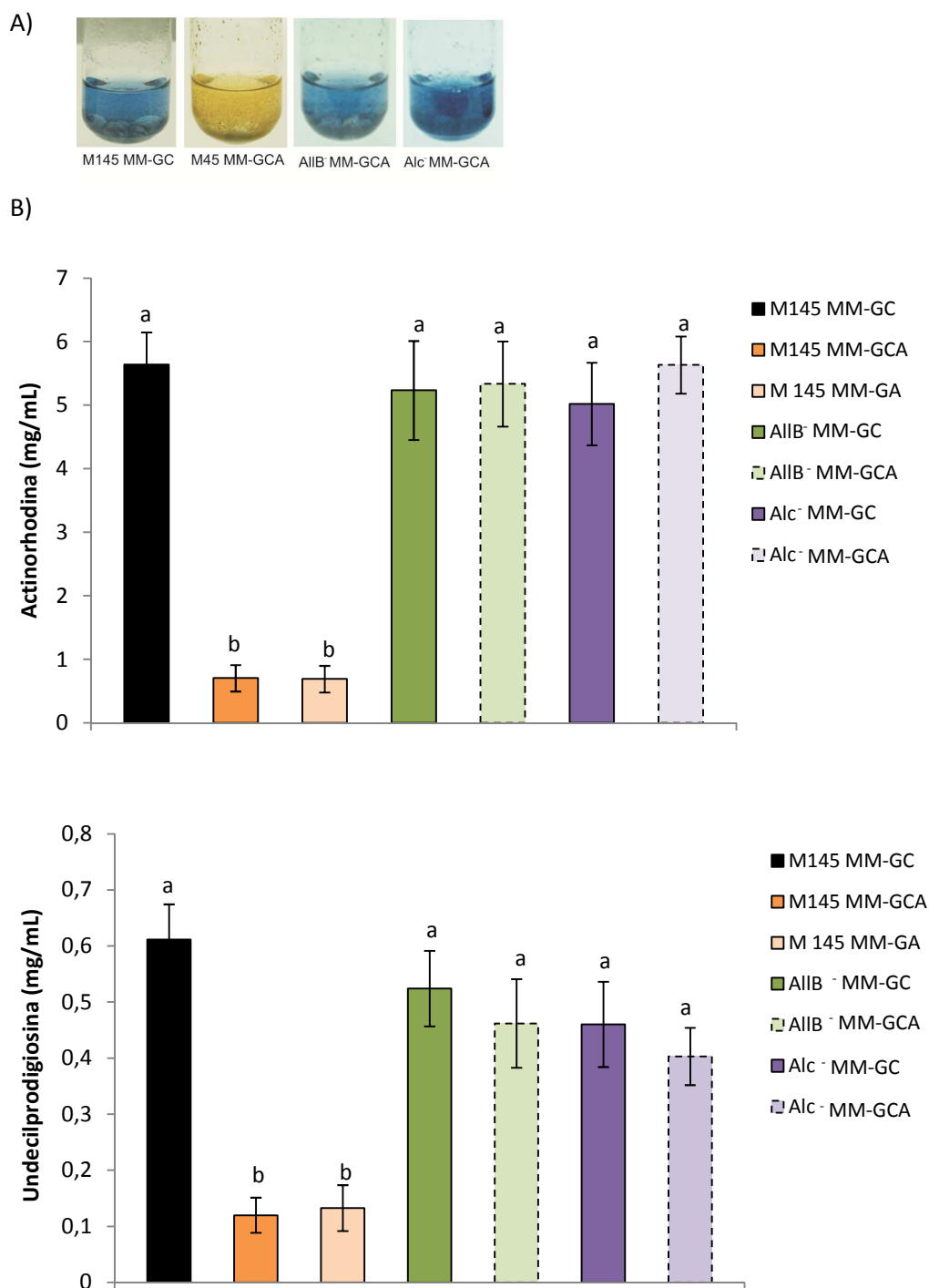
Como se mencionó anteriormente, el agregado de alantoína al medio de cultivo provoca una marcada disminución de la producción de los antibióticos en *S. coelicolor* (Figura 8 B). La utilización de esta cepa permite visualizar este defecto en la producción de antibióticos de color a simple vista.

En esta etapa del trabajo, nos propusimos cuantificar los niveles de producción de undecilprodigiosina y actinorhodina, y determinar la causa por la cual se observa una disminución de los mismos en presencia de alantoína.

Para esto determinamos los niveles de producción de antibióticos en MM-GA y MM-GCA durante la fase estacionaria de crecimiento. Como se puede observar en la Figura 20 B, la producción de estos metabolitos secundarios disminuyó un 88 % en ambos medios con respecto a la producción en medio control MM-GC.

Para determinar si la alantoína *per se* o algún subproducto del metabolismo de la misma es el causante de la disminución de la producción de antibióticos, se planteó analizar la producción de antibióticos de la mutante  $\text{AlIB}^-$  que es incapaz de degradar este compuesto y de la mutante  $\text{Alc}^-$  que es incapaz de degradar alantoato. Para esto se utilizó el medio MM-GCA ya que permite el crecimiento de dichas mutantes debido a la presencia de casaminoácidos como fuente de nitrógeno.

De manera opuesta a lo que ocurre con la cepa parental M145, las mutantes  $\text{AlIB}^-$  y  $\text{Alc}^-$  producen ambos antibióticos de manera similar a la producción de la cepa M145 en MM-GC sin agregado de alantoína (Figura 20 A y B). Como control de estos experimentos, se corroboró que las cepas mutantes  $\text{AlIB}^-$  y  $\text{Alc}^-$  no presentan una alteración de la producción de antibióticos en el medio control MM-GC. Estos resultados indican que la disminución en la producción de antibióticos en medio con alantoína se debe a un desbalance metabólico o subproducto que genera el metabolismo de la misma (Figura 20 B).



**Figura 20.** A) Producción de antibióticos de la cepa parental M145 en MM-GC y MM-GCA, y de las cepas AIBB<sup>-</sup>, y Alc<sup>-</sup> en MM-GCA. B) Cuantificación de undecilprodigiosina y actinorhodina en MM-GC, MM-GCA y MM-GA a 60 y 72 horas de crecimiento respectivamente. Las letras a y b denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ).

### **Análisis de la expresión del regulador ActIIORF4**

La disminución en la producción de antibióticos observada anteriormente podría deberse por un lado, a la falta de precursores para la síntesis de los mismos (acetil-CoA, malonil-CoA, aminoácidos, etc), o bien, a un defecto en la expresión de los genes que codifican para los activadores transcripcionales (*actIIORF4* o *redD*) que regulan la expresión de los genes de biosíntesis de actinorhodina y undecilprodigiosina.

Para corroborar esta última hipótesis, se analizaron el nivel de expresión del gen que codifica para el activador transcripcional de los genes de biosíntesis de actinorhodina, *actIIORF4*. Para esto se creció la cepa M145 en medio MM-GA y MM-GC y se extrajo ARN total de muestras de ambos cultivos a 46 horas. A partir de estas muestras, se retrotranscribió el ARN obteniéndose cADN de calidad para la realización de una RT-PCR (ver materiales y métodos). Los resultados de este ensayo arrojaron una disminución de 98 veces de la expresión de *actIIORF4* en medio con alantoína con respecto al medio sin la misma (la relación de expresión en MM-GA/MM-GC fue  $0,014 \pm 0,007$ ). Este resultado confirmó que la disminución de la producción de actinorhodina en MM-GA se debe a una disminución significativa de la expresión del activador transcripcional ActIIORF4 causada por algún producto del catabolismo de alantoína, lo que conlleva a una falta de expresión de los genes biosintéticos de este antibiótico.

Por cuestiones de simplicidad solo se determinó la expresión de *actIIORF4* siendo necesario a futuro analizar la expresión del gen que codifica para el activador transcripcional de undecilprodigiosina, *redD*. Debido a los resultados mostrados sobre el final de este capítulo podemos aventurarnos a decir que el efecto sobre este regulador podría ser similar a *actIIORF4*.

### **Estudio metabolómico de *S. coelicolor* crecida en presencia de alantoína**

Para poder establecer una conexión entre los cambios que provoca el metabolismo de alantoína y la producción de antibióticos, nos planteamos realizar un estudio metabólico comparando el metaboloma de la cepa *S. coelicolor* M145 crecida en MM-GA con respecto a la cepa crecida en MM-GC. Este estudio permitiría determinar de qué manera se alteran los niveles de los metabolitos por la degradación de alantoína.

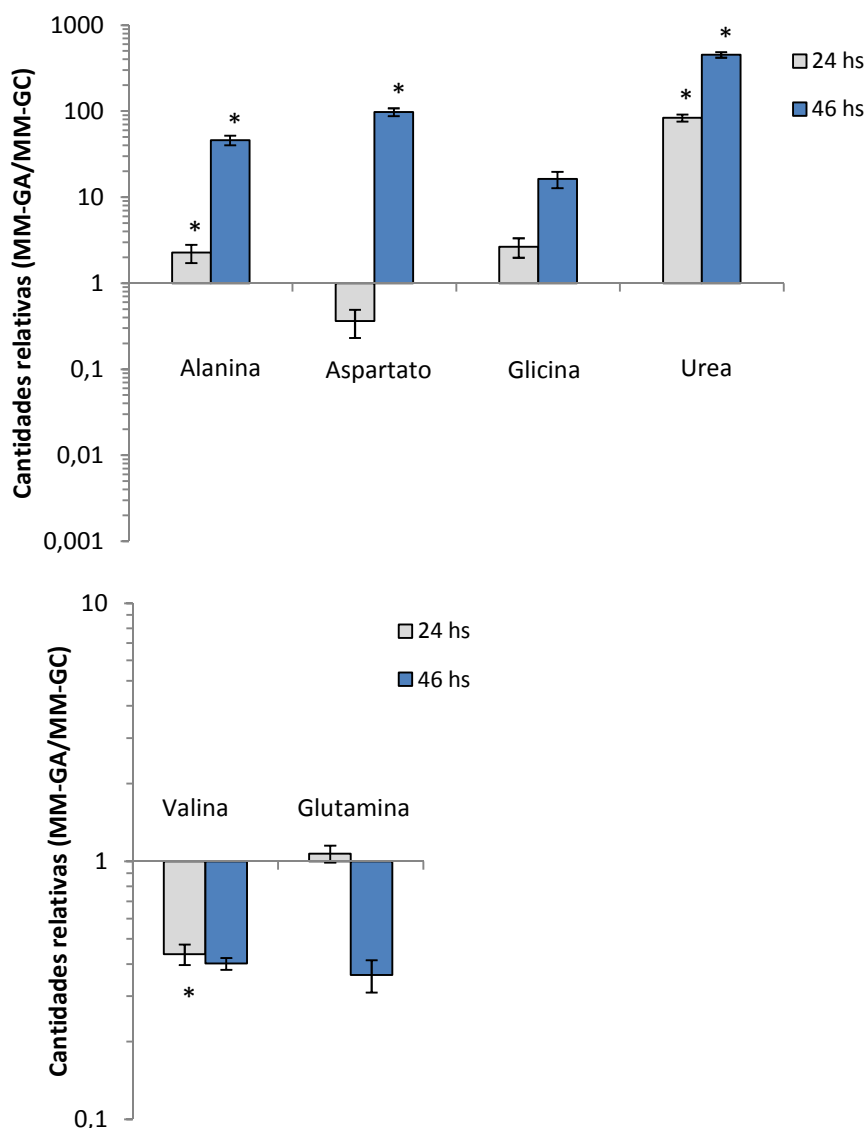
Para esto se creció la cepa de *S. coelicolor* M145 en ambos medios y se realizaron extracciones con solventes a dos tiempos: fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento [71]. Estos extractos fueron derivatizados y analizados mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masa (GC-MS). De esta manera se pudieron identificar 40 metabolitos intracelulares, de los cuales 20 presentaron diferencias estadísticamente significativas dependiendo de la fuente de nitrógeno utilizada (Tabla VII). Aspartato, alanina, glicina y urea se encontraron aumentados cuando la cepa fue crecida en medio con alantoína, siendo urea el compuesto que mayor aumento evidenció a ambos tiempos ensayados (83 veces en fase exponencial y 453 veces en fase estacionaria, Figura 10 y 21). Por el contrario, glutamina y valina se encontraron disminuidos bajo las mismas condiciones (Figura 21).

**Tabla VII.** Metabolitos alterados identificados por metabolómica.

Metabolito	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
Alanina	2,27	46,10
Glicina	2,66	16,25
Valina	0,44	0,40
Urea	83,55	453
Fosfato	1,20	0,25
Prolina	0,84	0,74 *
Ácido succínico	3,04	0,84 *
Ácido fumárico	0,17	47,52
Serina	0,39	0,97 *
Dímero láctico	0,15	0,63 *
Aspartato	0,36	97,91
Ácido citramálico	1,29	6,70
Ácido pentaneodico metoximino	0,43	0,42 *
Glutamina	1,07	0,36
Ácido fosfórico	1,80 *	0,14
Ácido cítrico	0,77	0,02 *
Glucosa oxima	1,29	1,11
Glucopiranososa	0,45	7,58
Ácido hexadecanoico	137,86 *	3,78
Turanosa	0,04	0,36

<sup>a</sup>: Relación detectada en MM-GA/MM-GC. Test de Student; P < 0.1.

\*: P > 0.1.



**Figura 21.** Metabolitos intracelulares que se encontraron alterados cuando la cepa M145 fue crecida en MM-GCA con respecto a MM-GC en fase exponencial (24 horas) y fase estacionaria de crecimiento (46 horas). Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. Un asterisco representa diferencia estadísticamente significativa aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ) y dos asteriscos ( $P < 0,05$ ).

Estos resultados estarían sugiriendo un desbalance o exceso de nitrógeno intracelular en presencia de alantoína, no solo porque existen altos niveles de urea en el interior celular sino también porque los niveles de varios aminoácidos se encuentran alterados. Con respecto a esto último, es interesante observar que el aminoácido glutamina se encuentra disminuido en medio con alantoína. Los niveles intracelulares

de glutamina y glutamato son de gran importancia porque son los aminoácidos dadores de nitrógeno para la mayoría de las reacciones biosintéticas.

### **Cambios producidos en el medio de cultivo por el metabolismo de alantoína**

La vía metabólica propuesta para la degradación de alantoína explicaría la acumulación de urea cuando la cepa de *S. coelicolor* es crecida en medio con alantoína. Según esta vía se generarían dos moléculas de urea a partir de una molécula de alantoína, la primera de ellas en el paso catalizado por la enzima Alc y la segunda en el paso catalizado por la enzima Ugl. Muchos organismos excretan urea como producto final de esta vía, sin embargo otros la convierten a CO<sub>2</sub> y amonio, el cual puede excretarse o ser asimilado por las enzimas GDH o GS. Debido a que *S. coelicolor* puede utilizar alantoína como fuente de nitrógeno, nosotros proponemos que esto último estaría ocurriendo en este microorganismo, es decir, la urea sería degradada a amonio por la enzima ureasa y el mismo se incorporaría al metabolismo celular en forma de glutamina o glutamato (Figura 10).

Para corroborar esta hipótesis, se cuantificaron los valores de urea y amonio presentes en el sobrenadante del medio a diferentes tiempos cuando la cepa *S. coelicolor* M145 se creció en MM-GCA y en MM-GC. Como se muestra en la Figura 22 A, los valores de urea y amonio extracelular se encuentran marcadamente aumentados cuando la cepa crece en MM-GCA con respecto al crecimiento en MM-GC. Estos resultados confirman que la urea se está degradando a amonio y que el exceso de urea y amonio intracelular se estaría liberando al medio. Por otro lado, estos resultados también estarían sugiriendo una falta de inhibición por exceso de producto de la vía, ya que se no observa un fenómeno de represión catabólica por acumulación de los productos de la vía, amonio y urea, durante la degradación de alantoína.

A partir de este resultado y de la información bibliográfica disponible que sostiene que los niveles de nitrógeno intracelular/extracelular juegan un rol central en el metabolismo secundario, se propone que el exceso de amonio en el interior de la célula podría ser el causante de la disminución de la producción de antibióticos cuando *S. coelicolor* crece en exceso de alantoína.

### **Efecto de la acumulación de amonio sobre la producción de antibióticos**

De acuerdo con la vía propuesta (Figura 10), el complejo ureasa Ure degradaría la urea en dos moléculas de amonio y CO<sub>2</sub> durante el catabolismo de alantoína. Por lo tanto, para analizar si el exceso de amonio podría ser la causa de la disminución de la producción de antibióticos, se inactivó uno de los genes que codificaría para una de las subunidades del complejo ureasa. Para esto se utilizó la misma estrategia de inactivación por inserción transposónica previamente utilizada para la construcción de las cepas AllB<sup>-</sup> y Alc<sup>-</sup> [18]. Utilizando un cósmido que contenía un alelo mutante del gen *ureB* (*sco1235*), se aisló la mutante UreB<sup>-</sup> mediante dos pasos de recombinación homóloga.

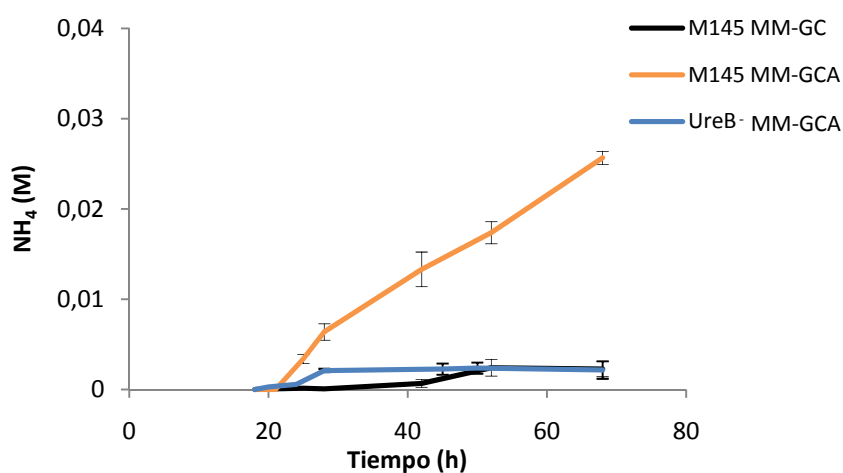
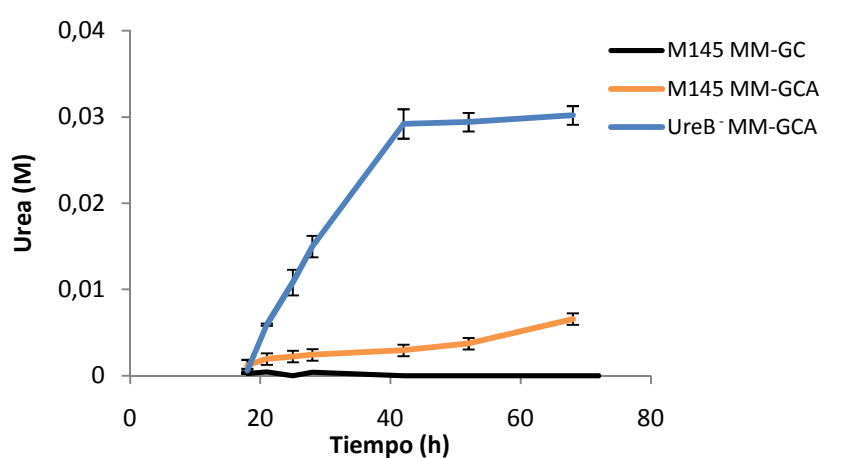
De esta manera, se determinaron los niveles de amonio acumulado en el medio extracelular cuando la cepa UreB<sup>-</sup> fue crecida en MM-GCA (Figura 22 A). Los resultados mostraron que la acumulación de amonio extracelular se encuentra disminuida con respecto a lo observado en estas condiciones para la cepa parental, siendo similares a los observados en MM-GC para esta cepa (Figura 22 A). Por otro lado, al cuantificar la producción de antibióticos en la cepa mutante UreB<sup>-</sup> se observó que no se producía una disminución en los mismos, sino que los valores eran similares a los obtenidos para la cepa *S. coelicolor* M145 crecida en MM-GC (Figura 22 B). Estos resultados estarían verificando las hipótesis propuestas. Primero, este complejo ureasa es el encargado de degradar la urea generada por el metabolismo de alantoína; y segundo, la acumulación intracelular/extracelular de amonio por este complejo es la causa de la disminución en la producción de antibióticos. Para verificar estos experimentos, se complementó la cepa UreB<sup>-</sup> con una copia funcional del gen *ureB* utilizando plasmidos integrativos. A partir de esta cepa se determinó la acumulación de amonio extracelular y la producción de antibióticos, observándose nuevamente el fenotipo parental (Figura 22 A).

Finalmente para verificar el rol de este complejo en los distintos medios, se realizó una determinación de actividad ureasa en extractos proteicos totales de esta mutante en comparación con la cepa parental M145. La actividad ureasa se encontró marcadamente disminuida en la cepa mutante UreB<sup>-</sup> con respecto a la cepa parental tanto en MM-GCA como en MM-GC. El aumento de actividad ureasa en la cepa parental M145 en presencia de alantoína denota una inducción de esta actividad en

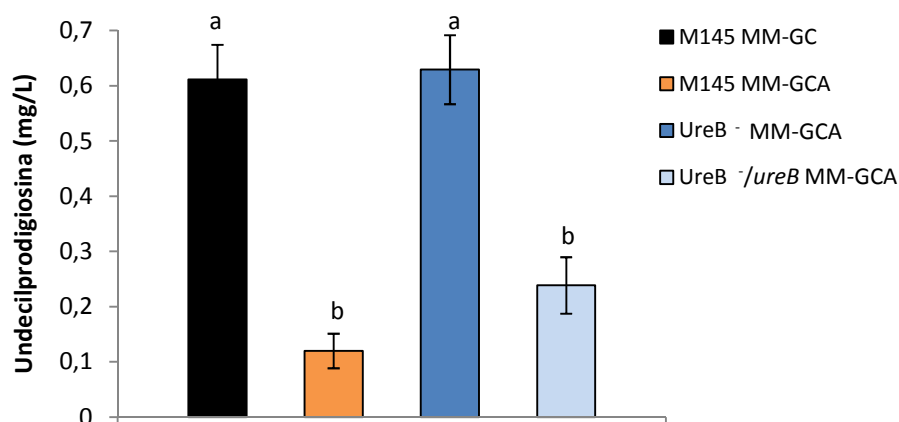
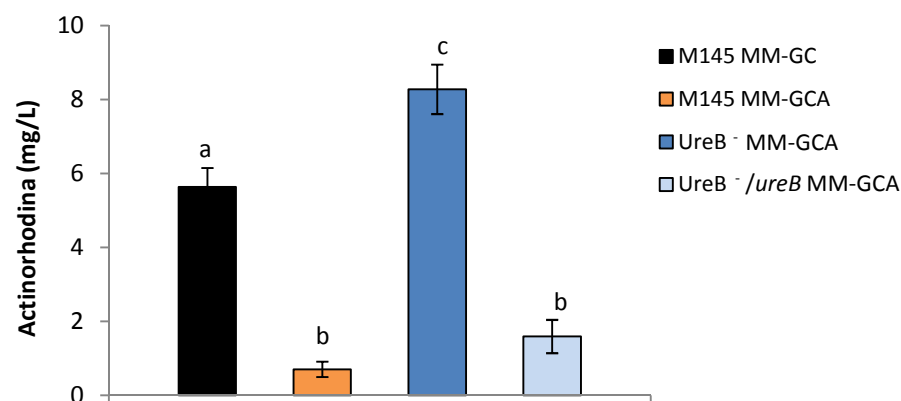
MM-GCA con respecto a MM-GC (Figura 22 C). Debido a que los experimentos de proteómica no permitieron identificar un aumento en los niveles de expresión del complejo ureasa, esta inducción podría ser de tipo alostérica.

Los resultados obtenidos de estos experimentos sugieren que la acumulación intracelular/extracelular de amonio producto del metabolismo de alantoína provocaría una disminución de la expresión del activador transcripcional *actIIORF4* y esto generaría entonces la disminución en la producción de actinorhodina.

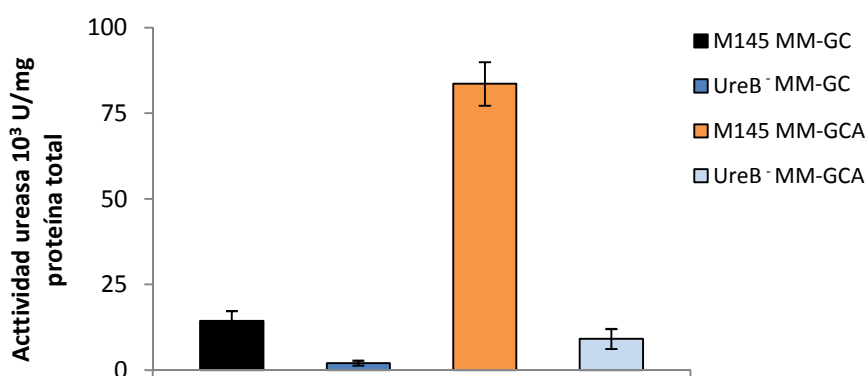
A)



B)



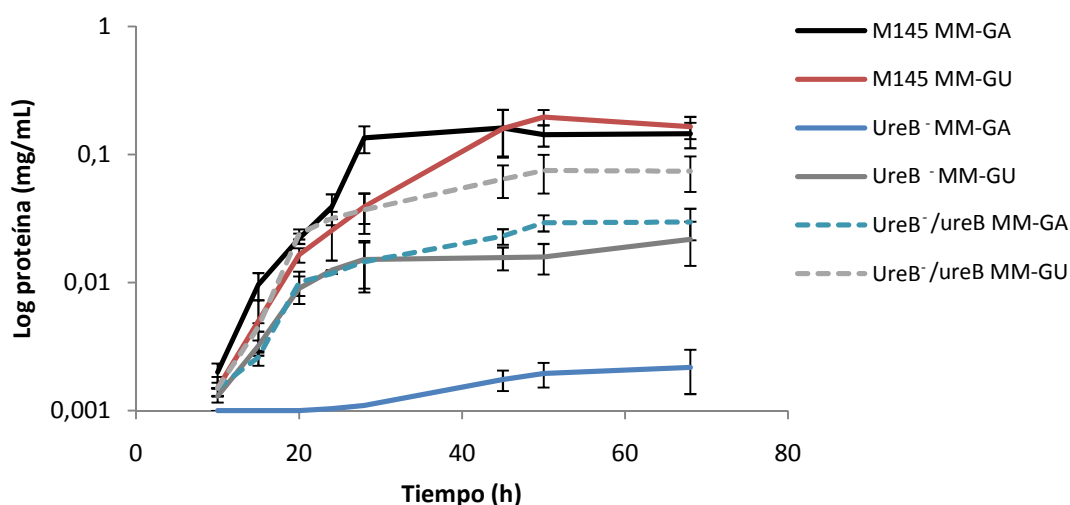
C)



**Figura 22.** A) Liberación de amonio (líneas continuas) y urea (líneas discontinuas) por la cepa parental M145 y la cepa mutante UreB<sup>-</sup> crecida en MM-GCA o en MM-GC. B) Cuantificación de la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina de las cepas M145 y UreB<sup>-</sup> a 72 y 60 horas de crecimiento respectivamente, en MM-GCA y MM-GC. Las letras a, b y c denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ). B) Actividad ureasa en extractos proteicos totales de la cepa M145 y UreB<sup>-</sup> crecidas en MM-GCA o MM-GC.

### Caracterización de la cepa mutante *UreB*<sup>-</sup>

Debido a que se determinó algo de actividad ureasa en la cepa *UreB*<sup>-</sup> (Figura 22 C) y que en el genoma de *S. coelicolor* existe otro grupo de genes que codifican para un complejo ureasa, se estudió el rol de *UreB* bajo distintas condiciones de crecimiento. Para esto se estudió el crecimiento de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y la mutante *UreB*<sup>-</sup> en MM-GA y en medio mínimo líquido suplementado con urea como única fuente de nitrógeno (MM-GU).



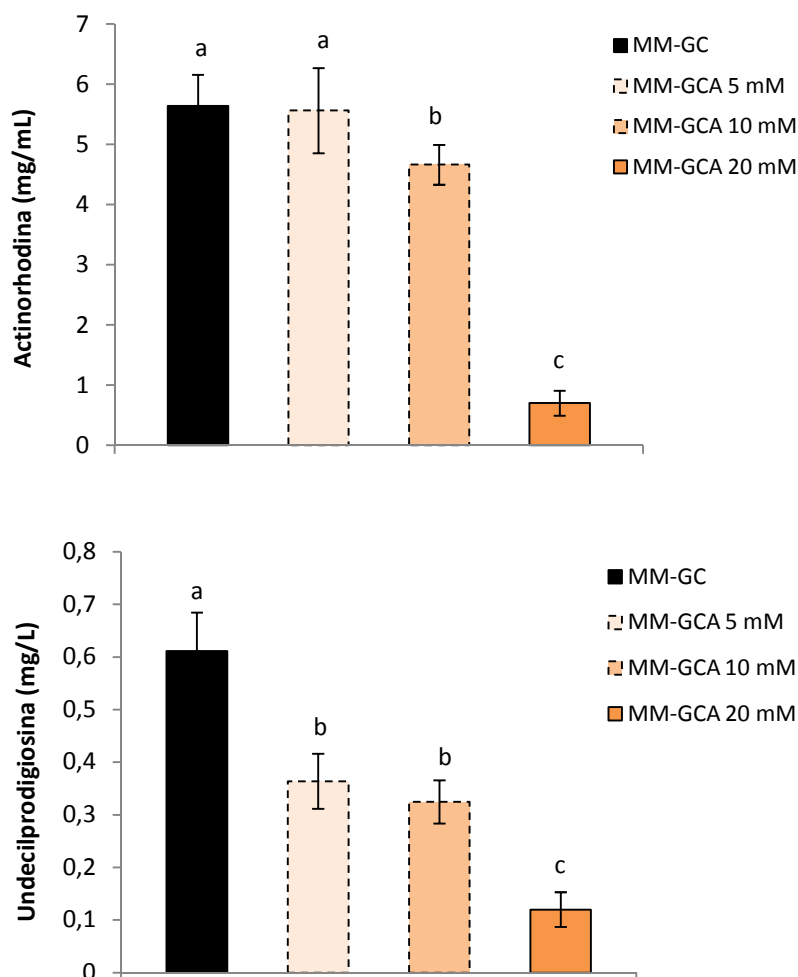
**Figura 23.** Curva de crecimiento de las cepas M145, *UreB*<sup>-</sup> y *UreB*<sup>-</sup> complementada con una copia funcional del gen *ureB* (*UreB*<sup>-</sup>/*ureB*) en MM-GA y MM-GU.

En la Figura 23 se puede observar que la mutación en *ureB*<sup>-</sup> afecta principalmente el crecimiento de esta cepa en medio MM-GA mientras que no se ve efecto cuando se usa urea como fuente de nitrógeno (MM-GU). Este resultado sugiere que el crecimiento de esta cepa en MM-GU podría deberse a la presencia del segundo complejo ureasa (*sco5525-sco5526*) bajo estas condiciones. Sin embargo, este complejo no se expresaría o estaría activo en presencia de alantoína sustentado por la falta de crecimiento de la cepa *UreB*<sup>-</sup> en MM-GA. Como control de estos ensayos se determinó el crecimiento de la cepa parental M145 en MM-GU para evaluar si el efecto de la inactivación en el gen *ureB* sobre el crecimiento es específico del mismo y no se debe a un efecto tóxico de la presencia de urea en el medio.

Para corroborar estos resultados, se complementó la cepa UreB<sup>-</sup> con una copia funcional del gen *ureB* bajo el control de su propio promotor utilizando un vector integrativo. Nuevamente se determinó el crecimiento de esta cepa en MM-GU y MM-GA. Como puede observarse en la Figura 23, la complementación fue casi completa aunque no se llegó a los valores de crecimiento de la cepa parental. Esto puede deberse al hecho de que al mutar el gen *ureB* la expresión de las subunidades corriente abajo del gen *ureB* puedan estar afectadas en el caso de que se expresen a partir del mismo promotor. No se pudo realizar la complementación completa con todos los genes del complejo UreABCDEFG para evaluar esta hipótesis debido a que no se contaba con todos los genes del operon.

#### **Efecto sobre la producción de antibióticos frente a distintas concentraciones de alantoína**

Si la acumulación de nitrógeno intracelular, consecuencia de la degradación de alantoína, es la causa de la disminución en la producción de antibióticos en este medio, se planteó analizar la concentración umbral de alantoína capaz de provocar este efecto. Para esto se disminuyó la concentración de alantoína a 5 y 10 mM y se cuantificó la producción de antibióticos comparando con la concentración utilizada anteriormente de 20 mM de alantoína (Figura 24). Estos resultados indican que altas concentraciones de alantoína estarían afectando la producción de antibióticos mientras que al disminuir la concentración al medio, el efecto ya no sería observable para actinorhodina, aunque si afectaría en parte la producción de undecilprodigiosina.



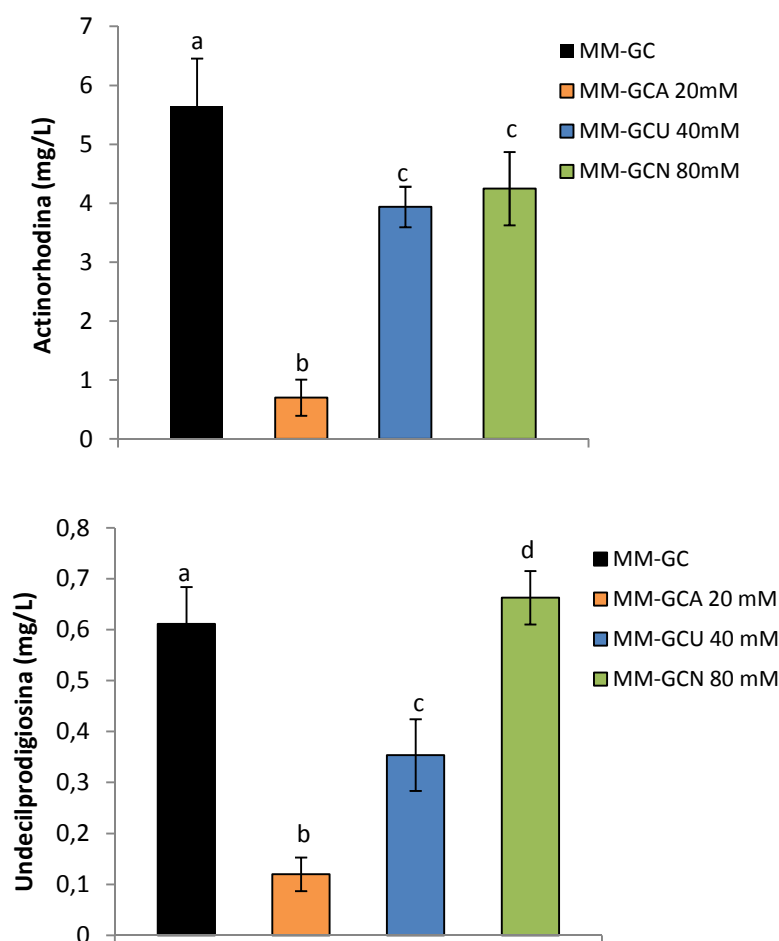
**Figura 24.** Cuantificación de actinorhodina y undecilprodigiosina en MM-GC o MM-GCA 5, 10 o 20 mM a 72 y 60 horas de crecimiento respectivamente. Las letras a, b y c denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ).

### Otras fuentes de nitrógeno y su efecto sobre la producción de antibióticos

Si el efecto sobre la producción de antibióticos provocado por el metabolismo de alantoína se debe al exceso de amonio intracelular generado, se planteó analizar si este efecto podría reproducirse mediante el agregado de otras fuentes de nitrógeno al medio. Para esto, se utilizaron concentraciones de urea y de amonio manteniendo los equivalentes de nitrógeno presentes en los medios suplementados con 20 mM alantoína.

Como se puede observar en la Figura 25, la utilización de urea o amonio en concentraciones equivalentes de nitrógeno no tuvo el mismo efecto que la presencia de alantoína sobre la producción de antibióticos, es decir, la producción de

actinorhodina y undecilprodigiosina en medio con urea 40 mM (MM-GCU) o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  80 mM (MM-GCN) fue similar a la producción en MM-GC.



**Figura 25.** Cuantificación de actinorhodina y undecilprodigiosina en MM-GC, MM-GCA 20 mM, MM-GCU 40 mM y MM-GCN 80 mM a 72 y 60 horas de crecimiento respectivamente.

Estos resultados sugieren que para el caso de urea o amonio se activa un sistema de represión catabólica por nitrógeno, inhibiendo la entrada de estos compuestos cuando hay cantidad suficiente de metabolitos nitrogenados en el interior celular para el crecimiento. En el caso de alantoína esto pareciera no ocurrir, ya que la misma se incorpora sin retroalimentación negativa al interior de la célula aunque esto provoque una acumulación excesiva de nitrógeno.

## Conclusiones y discusión

En esta etapa del trabajo se utilizó una estrategia proteómica para encontrar proteínas involucradas en el metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*. De esta manera se lograron identificar 6 proteínas con niveles aumentados en presencia de alantoína que están involucradas en dicha vía metabólica. Para esto nos basamos en la similitud de la secuencia aminoacídica con enzimas caracterizadas del metabolismo de alantoína en otros géneros bacterianos, además de corroborar la actividad de alguna ellas mediante experimentos bioquímicos. Las proteínas identificadas fueron: alantoicasa (Alc), malato sintasa (AceB1), glioxilato carboligasa (Gcl), tartronato semialdehído reductasa (GlxR), hidroxipiruvato isomerasa (Hyi) y ureidoglicolato liasa (Ugl).

A partir de estos resultados y experimentos genéticos posteriores, se propuso una vía de degradación de alantoína en esta especie bacteriana. La misma involucra un primer paso de conversión de alantoína en alantoato mediado por la enzima AllB, que si bien no pudo ser detectada en el análisis proteómico, la expresión de la misma se estudió por RT-PCR; un segundo paso de formación de ureidoglicolato y urea a partir de alantoato por la enzima Alc y un tercer paso catalizado por la enzima Ugl de conversión de ureidoglicolato en glioxilato con liberación de una segunda molécula de urea. En este punto la vía se ramifica debido a que glioxilato es sustrato tanto de la enzima AceB1 y como de Gcl. AceB1 condensa acetil-CoA con glioxilato para formar malato que puede incorporarse en el metabolismo central, y Gcl forma tartronato semialdehído a partir de glioxilato. Este tartronato semialdehído puede ser utilizado posteriormente por las enzimas GlxR o Hyi para dar glicerato o hidroxipiruvato, respectivamente. Las moléculas de urea generadas durante la degradación de alantoína son transformadas en amonio y CO<sub>2</sub> por el complejo Ure.

Para verificar los dos pasos principales de la vía, las proteínas AllB y Alc se estudiaron bioquímicamente, confirmando las actividades alantoinasa y alantoicasa respectivamente. Los parámetros cinéticos de las mismas mostraron valores similares a las encontradas en otras bacterias. AllB presentó un requerimiento de catión divalente como ha sido propuesto para otras enzimas alantoinasas [134]. Finalmente estudios genéticos permitieron demostrar que las enzimas AllB y Alc constituyen la única vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*. Por otro lado, también se

caracterizaron bioquímicamente las proteínas Hyi y GlxR, confirmando la actividad catalítica propuesta y determinándose los parámetros cinéticos de las mismas.

Si bien la vía de degradación de alantoína ha sido caracterizada en otras especies bacterianas, el conjunto específico de enzimas involucradas en la misma varía considerablemente de un microorganismo a otro. Por ejemplo, las enzimas alantoinasa, ureidoglicolato liasa, malato sintasa, glioxilato carboligasa, tartronato semialdehído reductasa e hidroxipiruvato isomerasa están presentes en *E. coli* mientras que la enzima alantoicasa está presente en *P. aeruginosa* y *B. cepacia* [156, 158]. Esta última enzima cataliza la degradación del ácido alantóico a ureidoglicolato y urea. Mientras que *E. coli* contiene una alantoato amidohidrolasa capaz de catalizar la conversión de alantoato a ureidoglicolato y amonio con liberación de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, *P. aeruginosa* posee una enzima paróloga a AllB de *E. coli*, conocida con el nombre de PuuE [186].

La enzima ureidoglicolato hidrolasa también presenta una proteína paróloga, la ureidoglicolato hidrolasa. La misma es característica de plantas y es capaz de catalizar la hidrólisis de ureidoglicolato en glioxilato pero con liberación de dos moléculas de amonio y CO<sub>2</sub> en lugar de una molécula de urea [187]. Esta enzima ha sido ampliamente caracterizada en *Arabidopsis thaliana* [188].

Al igual que en *S. coelicolor*, *E. coli* presenta dos proteínas con actividad malato sintasa, las mismas se encuentran asociadas a dos metabolismos distintos. La enzima malato sintasa A es la proteína del ciclo del glioxilato mientras que la enzima malato sintasa G se asocia con el metabolismo de glicolato [189, 190]. Lo destacado en el caso de *S. coelicolor*, es que las dos enzimas malato sintasa presentan alta homología con la enzima malato sintasa A de *E. coli* a pesar de encontrarse asociadas a dos vías metabólicas diferentes. En este estudio se pudieron determinar parte de las enzimas específicas de la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*, siendo la caracterización de esta vía la primera en realizarse en este importante género bacteriano.

Con respecto al transporte de alantoína, el mismo ha sido caracterizado únicamente en *S. cerevisiae*. La proteína transportadora de esta molécula es codificada por el gen *dal4* [191]. En *S. coelicolor*, existe una proteína homóloga que presenta un 40 % de similitud con este transportador, la misma es codificada por el gen *sco7500* y

podría ser la responsable de la incorporación de alantoína al interior celular en este género bacteriano.

La alantoína ha sido utilizada históricamente como cicatrizante natural, fue descubierta a principios del siglo XX y sigue siendo uno de los ingredientes más utilizados por la industria cosmética. Macalister la descubrió en 1912 como principal ingrediente activo de la raíz de consueta y posteriormente en 1935 fue aislada de animales y rápidamente incorporada en muchas formulaciones tanto farmacéuticas como cosméticas. Los beneficios del tratamiento por terapia larval de heridas durante la segunda guerra mundial se atribuyeron años más tarde a la excreción de alantoína por parte de estas larvas. La acción de la alantoína no se conoce con exactitud pero estaría asociada a la estimulación de la proliferación celular [192, 193].

Por otra parte, algunos estudios realizados en suelo sostienen que la presencia de alantoína en el mismo mejora la producción de algunos cultivos, como es el caso de los cultivares de arroz [72]. La alantoína producida y liberada por determinadas especies vegetales tiene un efecto estimulante de la germinación y el crecimiento de otras plantas [194, 195]. A su vez, esta molécula provoca cambios en la microflora del suelo e incrementa la diversidad microbiana del mismo [72]. Si esto es así, entonces el metabolismo de alantoína juega un rol interesante en el metabolismo celular, por lo que no llama la atención que exista una relación entre la degradación de alantoína y la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*.

En referencia a esto, un resultado importante de esta etapa de trabajo fue que la cepa *S. coelicolor* M145 presentó una marcada disminución de la producción de antibióticos cuando se utilizó alantoína como fuente de nitrógeno para el crecimiento. Como se mencionó antes, la degradación de alantoína genera un compuesto carbonado (glicoxilato) y otro nitrogenado (urea). Combinando experimentos metabólicos y genéticos se pudo establecer que la liberación de amonio intracelular generado por el catabolismo de la urea provoca la disminución de la producción de antibióticos. Este resultado fue corroborado mediante la construcción de la cepa mutante *UreB<sup>-</sup>* que no muestra liberación de amonio al medio extracelular y permite una producción normal de antibióticos durante el crecimiento en MM-GA.

Varios estudios sostienen que los niveles de nitrógeno intracelular controlan diferentes vías metabólicas relacionadas con el metabolismo secundario [55]. En la

mayoría de los casos, el exceso de amonio provoca una disminución en la producción de antibióticos debido a la disminución de la expresión de las enzimas biosintéticas de los mismos [56, 196]. Por otro lado, también se propone que altas concentraciones de nitrógeno afectan a las enzimas que sintetizan los precursores para la síntesis de metabolitos secundarios. Si bien los mecanismos moleculares de esta regulación por nitrógeno no se conocen con exactitud hasta el momento, lo que si se ha demostrado es que se requiere de una limitación de nitrógeno para que se expresen de manera completa los genes de biosíntesis o se activen las enzimas necesarias para la producción de actinorhodina en *S. coelicolor* [197].

La disponibilidad de nutrientes juega un rol central en la producción de metabolitos secundarios, no solo porque la restricción de algún nutriente limita el crecimiento sino también porque la falta del mismo tiene efectos metabólicos y regulatorios específicos. En este estudio se propone que el exceso de nitrógeno indica condiciones favorables de crecimiento, estimulándose el mismo en lugar de la producción de antibióticos. Como se traduce el exceso de nitrógeno en señales regulatorias que afectan la expresión del activador transcripcional de actinorhodina y que proteínas se encuentran involucradas en esta señalización será tema de estudios futuros.

Por otro lado, el exceso de urea y amonio generado durante la degradación de alantoína sugiere una falta de represión catabólica de esta vía metabólica. Los cambios en la expresión de proteínas involucradas en la captación y asimilación de nitrógeno durante el crecimiento en alantoína observados en los experimentos de proteómica, junto con la alteración de los niveles de diferentes aminoácidos intracelulares bajo esas condiciones, se condicen con esta hipótesis. La regulación del metabolismo de nitrógeno no se conoce con exactitud en el género *Streptomyces*; se ha descrito recientemente la existencia de dos reguladores específicos del mismo conocidos como GlnR y GRII, sin embargo, el mecanismo de molecular de acción sería distinto al caracterizado sistema de control Ntr de la familia *Enterobacteriaceae* [58]. Estos sistemas actúan en condiciones limitantes de nitrógeno mientras que lo que ocurría bajo exceso de nitrógeno no se conoce hasta el momento.

Por otra parte, las proteínas del metabolismo de alantoína se han encontrado aumentados durante el fenómeno de muerte celular programada (MCP) en

*Streptomyces* [3]. MCP es un mecanismo de supervivencia frente a condiciones de limitación de nutrientes, como la falta de nitrógeno, donde una parte de la población se sacrifica en pos de la supervivencia del resto. El fenómeno se caracteriza por la activación de nucleasas no específicas que degradan el ADN cromosomal completamente a nucleótidos libres que son liberados al medio y pueden ser utilizados por la población viva remanente como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento. La activación de los genes del catabolismo de alantoína durante MCP podría estar indicando que estos nucleótidos son también degradados a diferentes compuestos de carbono y nitrógeno, como urea y amonio, y liberados al medio como tales para ser captados por la población superviviente. Esto podría explicar entonces la ausencia de represión catabólica de la vía de degradación de alantoína por metabolitos nitrogenados, ya la activación de la misma representaría un fenómeno en respuesta a la limitación de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en esta etapa de trabajo no solamente contribuyen al conocimiento de una vía metabólica primaria como es la degradación de alantoína en *S. coelicolor*, sino que también denotan la importancia que tiene el metabolismo primario sobre la regulación del metabolismo secundario en este importante género bacteriano.

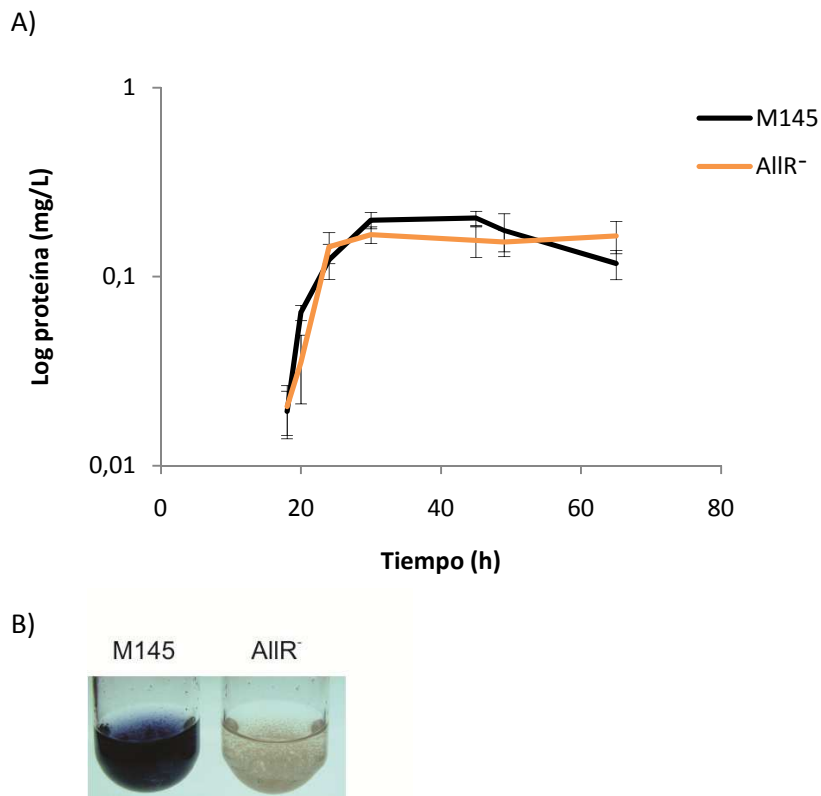
**CAPÍTULO II**  
**REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE**  
**ALANTOÍNA EN *S. coelicolor***

### **Identificación y caracterización del regulador del metabolismo de alantoína en *S. coelicolor***

Corriente arriba de los genes *allB-alc* y cerca de *aceB1*, se encuentra el gen *sco6246* cuyo producto proteico presenta un 40 % de similitud con la secuencia aminoacídica del regulador transcripcional negativo IclR de ciclo del glioxilato en *E. coli*. Por esta razón, esta proteína ha sido previamente propuesta como el regulador de la vía del glioxilato en *S. coelicolor* [198]. Sin embargo, el gen *sco6246* también presenta un alto grado de similitud con la secuencia de aminoácidos del represor AllR de la vía de degradación de alantoína en *E. coli* (33 % de similitud). Debido a la cercanía a los genes *allB*, *alc* y *aceB1* caracterizados en el Capítulo I que codifican para enzimas del catabolismo de alantoína, se planteó determinar si este gen (que de ahora en adelante llamaremos *allR*) codifica para la proteína regulatoria de la vía de la alantoína en *S. coelicolor*.

Para comenzar con estos estudios, se aisló una mutante en el gen *allR* utilizando un cósmido que contenía una inserción transposónica en este gen. En este caso, la cepa mutante se seleccionó por resistencia a higromicina y sensibilidad a kanamicina, y la correcta interrupción del gen fue confirmada por PCR (ver materiales y métodos).

A partir de esta cepa se analizó si la mutación presentaba efectos sobre el crecimiento y para esto se creció la cepa AllR<sup>-</sup> en medio mínimo suplementado con glucosa y casa aminoácidos (MM-GC). Como puede observarse en la Figura 26 A, la inactivación del gen *allR* no provoca efectos sobre el crecimiento en comparación con el crecimiento de la cepa parental *S. coelicolor* M145 en este mismo medio. Sin embargo, durante estos estudios se evidenció una marcada alteración en la producción de antibióticos de la cepa AllR<sup>-</sup> (Figura 26 B) que se tratará sobre el final de este capítulo.



**Figura 26.** A) Crecimiento de la cepa mutante AIIIR<sup>-</sup> y la cepa parental M145 en MM-GC. B) Producción de antibióticos de la cepa parental M145 y la cepa mutante AIIIR<sup>-</sup> en MM-GC.

Posteriormente, se realizaron experimentos de proteómica para determinar si los niveles de expresión de proteínas del metabolismo de alantoína se encontraban alterados en la mutante AIIIR<sup>-</sup>. Con este propósito, se comparó el proteoma de la cepa *S. coelicolor* M145 y la mutante AIIIR<sup>-</sup> crecidas en medio MM-GC. Para esto se tomaron muestras de cultivos de estas cepas a dos tiempos de crecimiento (fase exponencial y estacionaria) y se prepararon extractos proteicos totales. Las proteínas fueron marcadas y analizadas mediante LC-MS como fue mencionado en el capítulo anterior. Este análisis proteómico permitió detectar e identificar más de 450 proteínas de las cuales 86 presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa M145 y la mutante AIIIR<sup>-</sup> (Tabla VIII).

Como se puede evidenciar en la Tabla VIII, la mayoría de las proteínas previamente caracterizadas como enzimas involucradas en el catabolismo de alantoína en *S. coelicolor* presentaron un aumento en su expresión de más de 10 veces. Estos resultados junto con el alto porcentaje de similitud con el regulador transcripcional

negativo de la vía de la alantoína en *E. coli*, sugieren que gen *allR* codifica para regulador del metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*.

**Tabla VIII.** Proteínas del metabolismo de alantoína identificadas por proteómica cuya expresión se encontró alterada en la cepa *AllR<sup>-</sup>* con respecto a la cepa parental M145.

Metabolismo de alantoína	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
<b>GlxR, SCO6205</b>	tartronato semialdeído reductasa	28,93	35,38
<b>Hyi, SCO6206</b>	hidroxipiruvato isomerasa	25,78	24,70
<b>Gcl, SCO6201</b>	glioxilato carboligasa	18,96	13,55
<b>AceB1, SCO6243</b>	malato sintasa	16,66	5,21
<b>SCO6204</b>	catalasa	13,64	ND
<b>Alc, SCO6248</b>	alantoicasa	2,91	1,54*
<b>Ugl, SCO2850</b>	ureidoglicolato liasa	2,96	ND

<sup>a</sup>: Relación de los niveles de expresión proteica *AllR<sup>-</sup>*/M145.

\*: P > 0.1.

ND: no detectado.

Al igual que en los estudios proteómicos previos, la proteína *AllB* no pudo ser detectada en este ensayo, sin embargo, la expresión transcripcional del gen *allB* en la mutante *AllR<sup>-</sup>* se estudió por PCR en tiempo real, estos resultados se muestran en la siguiente sección de este capítulo.

El resto de las proteínas cuyos niveles de expresión se encontraron alterados en la mutante *AllR<sup>-</sup>* se muestran en la Tabla IX, estas proteínas fueron clasificadas como pertenecientes al metabolismo de carbono, nitrógeno, aminoácidos, purinas, ADN y transcripción, síntesis proteica, aminoazúcares y nucleótido azúcares, y lípidos.

**Tabla IX.** Proteínas del metabolismo de carbono, nitrógeno, aminoácidos, purinas, ADN y transcripción, síntesis proteica, aminoazúcares y nucleótido azúcares, lípidos, y otras proteínas putativas identificadas por proteómica cuya expresión se encontró alterada en la cepa AllR<sup>-</sup> con respecto a la cepa parental M145.

Metabolismo de purinas	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO5805	ribonucleotido reductasa	0,19	ND
CysD, SCO6098	sulfato adenililtransferasa	ND	0,62

Metabolismo de nitrógeno	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
GlnA, SCO2198	glutamina sintetasa I	0,30	ND
GlnII, SCO2210	glutamina sintetasa II	0,16	3,97
GluB, SCO5776	proteína periplasmática de unión a glutamato	ND	0,16

Metabolismo de aminoácidos	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SerA, SCO5515	3-D-fosfoglicerato deshidrogenasa	0,61	3,11
IlvC, SCO5514	acetolactato sintasa subunidad pequeña	ND	0,36
SahH, SCO3023	adenosilhomocisteinasa	ND	0,16
AroB, SCO1494	3-dehidroquinato sintasa	ND	2,15
SCO5520	delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	ND	0,64

Metabolismo de carbono	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO2951	malato oxidoreductasa	3,86	1,46
SCO5281	2-oxoglutarato deshidrogenasa	0,49	ND
Ppc, SCO3127	fosfoenolpiruvato carboxilasa	0,49	ND
Gap, SCO1947	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	2,65	4,25
SCO2180	dihidrolipoamida deshidrogenasa	0,43	
Idh, SCO7000	isocitrato deshidrogenasa	ND	5,73
PurA, SCO3629	adenilsuccinato sintasa	ND	2,41
SucC, SCO4808	succinil-CoA sintasa cadena beta	ND	1,82
CitA, SCO2736	citrato sintasa	ND	1,81
Glk, SCO2126	glucokinasa	ND	0,30
Gap2, SCO7511	gliceraldehído-3-fosfato	ND	4,69

	deshidrogenasa		
--	----------------	--	--

Metabolismo de amino azúcares y nucleótido azúcares	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO3122	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa	ND	0,32
SCO0379	catalasa	0,08	0,06
SCO4881	proteína de biosíntesis de polisacárido	ND	0,11

Metabolismo de DNA y transcripción	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
Tuf1, SCO4662	factor de elongación TU-1	1,94	1,78
Tsf, SCO5625	factor de elongación Ts	ND	3,27
Hup, SCO2950	proteína de unión a DNA Hu	ND	5,11

Síntesis de proteínas	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO4734	proteína ribosomal 50S	2,23	ND
RpsA, SCO1998	proteína ribosomal 30S	2,92	2,40
RplL, SCO4653	proteína ribosomal 50S	2,69	ND
RspG, SCO4660	proteína ribosomal 30S	ND	8,22
RplT, SCO1598	proteína ribosomal 50S	ND	7,07
RpsH, SCO4716	proteína ribosomal 30S	ND	4,67
RplP, SCO4709	proteína ribosomal 50S	ND	4,05
RplI, SCO3909	proteína ribosomal 30S	ND	3,86
RpoA, SCO4729	RNA polimerasa cadena alfa	ND	0,61
RspL, SCO4659	proteína ribosomal 30S	ND	0,54

Metabolismo de lípidos	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
AccA2, SCO4921	acil-CoA carboxilasa	ND	2,31

Otras proteínas	Función	r <sup>a</sup> 24 h	r <sup>a</sup> 46 h
SCO5074	proteína hipotética	0,12	ND
SCO4761	chaperona 10kD	0,28	ND
SCO3767	proteína hipotética	0,25	ND
SCO0494	lipoproteína de unión a sideroforo de hierro	0,28	ND
terD, SCO0641	proteína de resistencia a telurium	0,43	0,21
groEL2, SCO4296	chaperona	2,51	ND
SCO6009	proteína periplasmática de unión	3,43	ND
SCO1080	proteína hipotética	6,20	4,06
SCO2396	proteína hipotética	19,59	7,27

<b>SCO2780</b>	proteína de secreción	ND	4,56
<b>SCO3899</b>	proteína hipotética	ND	4,11
<b>SCO1480</b>	proteína hipotética	ND	3,89
<b>GroES, SCO4761</b>	chaperona	ND	15,68
<b>SCO6282</b>	oxidoreductasa	ND	3,06
<b>BldKB, SCO5113</b>	lipoproteína transportador ABC	ND	1,76
<b>GroEL1, SCO4762</b>	chaperona	ND	1,55
<b>SCO1296</b>	proteína hipotética	ND	0,67
<b>SCO3717</b>	transporte de cationes	ND	0,59
<b>SCO2127</b>	proteína hipotética	ND	0,56
<b>SCO3793</b>	proteína hipotética	ND	0,56
<b>SCO4228</b>	proteína reguladora de transporte de fosfato	ND	0,54
<b>SCO5646</b>	lipoproteína de unión	ND	0,51
<b>SCO2999</b>	proteína hipotética	ND	0,42
<b>SCO1355</b>	serin proteasa de secreción	ND	0,41
<b>SCO1630</b>	proteína de membrana	ND	0,26
<b>SCO0472</b>	proteína de secreción	ND	0,23
<b>SCO3542</b>	proteína de membrana con actividad quinasa	ND	0,20
<b>SCO5590</b>	proteína hipotética	ND	0,18
<b>SCO4812</b>	proteína de membrana	ND	0,17
<b>SodF2, SCO0999</b>	superóxido dismutasa	ND	0,15
<b>PstS, SCO4142</b>	proteína de unión a fosfato	ND	0,15
<b>SCO1089</b>	proteína hipotética	ND	0,14
<b>SCO5074</b>	proteína hipotética	ND	0,14
<b>SCO6431</b>	proteína hipotética	ND	0,11
<b>SCO1647</b>	proteína hipotética	ND	0,11
<b>SCO6159</b>	regulador transcripcional de la familia GntR	ND	0,20
<b>GlgX2, SCO5456</b>	glicosil hidrolasa	ND	0,14
<b>SCO7682</b>	sintasa de péptido no ribosomal	ND	0,12
<b>CypH, SCO7510</b>	peptidil-prolil cis-trans isomerasa	ND	16,89
<b>ActVA3, SCO5078</b>	proteína hipotética	0,80	ND
<b>SCO6282</b>	oxidoreductasa	6,74	ND

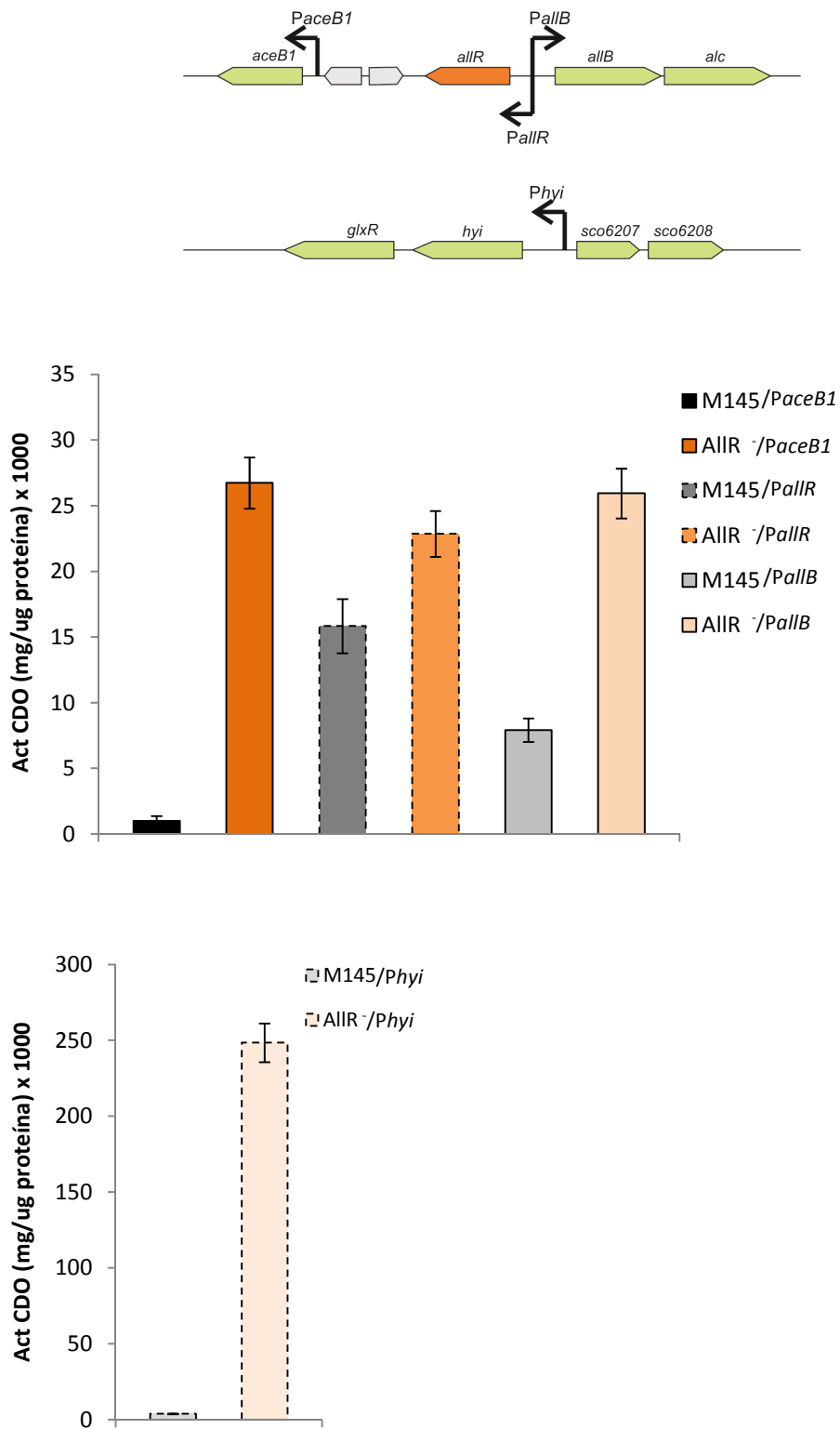
<sup>a</sup>: Relación de los niveles de expresión proteica AllR<sup>-</sup>/M145 (P < 0,1).

ND: no detectado.

**Estudios transcripcionales de los posibles blancos de AllR**

Para corroborar los resultados anteriores y determinar si los niveles de expresión de los genes de la vía de alantoína estaban alterados en la cepa mutante AllR<sup>-</sup>, se realizaron estudios mediante fusiones transcripcionales con genes reporteros a los promotores de estos genes. Para esto se construyeron una serie de cepas de *S. coelicolor* M145 y AllR<sup>-</sup> que contienen una integración ectópica del gen reportero que codifica para la catecol dioxigenasa (*xyITE*) bajo el control del promotor de los genes: *aceB1*, *allR*, *allB* y *hyi*. Previo a esto se realizó un estudio *in silico* de la secuencia corriente arriba de cada gen para poder identificar una posible ubicación de su promotor usando el programa Softberry ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)).

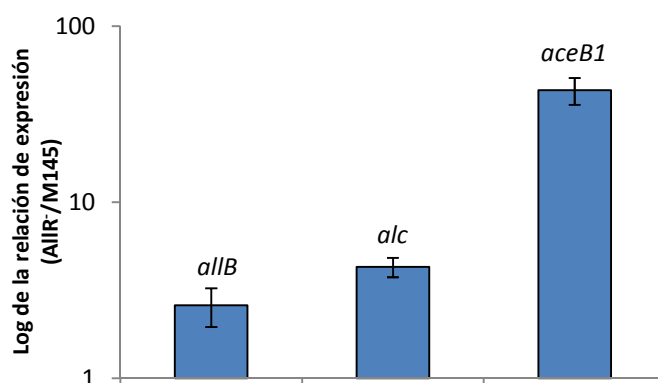
La expresión del gen reportero en cada cepa se determinó midiendo la actividad catecol dioxigenasa a partir de extractos proteicos totales preparados de cultivos crecidos 24 horas en MM-GC. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la expresión de todos los promotores estudiados en ausencia del gen funcional *allR* (Figura 27). Como control de este experimento se construyeron dos cepas derivadas de *S. coelicolor* M145 y AllR<sup>-</sup> que contienen una integración ectópica del gen reportero XylTE sin promotor. En ambos casos no se detectó actividad catecol dioxigenasa (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que AllR estaría reprimiendo su propia expresión y la de los genes *aceB1*, *allB* y *hyi* en medio MM-GC.



**Figura 27.** Análisis de expresión mediante fusiones transcripcionales con el gen reportero de catecol dioxigenasa.

Debido a que la proteína AllB no pudo ser detectada en los estudios de proteómica y para corroborar de manera alternativa que AllR es una proteína represora de los genes *aceB1*, *allB* y *alc*, realizamos un estudio transcripcional de los mismos mediante RT-PCR. Para esto se creció la cepa *S. coelicolor* M145 y la mutante AllR<sup>-</sup> en MM-GC, se tomaron muestras de cultivos a 24 horas de crecimiento y se realizó una extracción de ARN total en cada caso. El mismo fue retrotranscrito y analizado por PCR en tiempo real utilizando los oligos correspondientes (Tabla III). Los resultados de estos experimentos mostraron que el gen *aceB1* presenta un aumento de expresión de  $43,32 \pm 7,50$ , el gen *allB* un aumento de  $2,60 \pm 0,64$  veces y el gen *alc* un aumento de  $4,20 \pm 0,94$  en la mutante AllR<sup>-</sup> comparado con la cepa parental M145 (Figura 28).

Esto permitió corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de proteómica y los ensayos de fusiones transcripcionales con el gen reportero catecol dioxigenasa.



**Figura 28.** Análisis transcripcional por PCR en tiempo real de la expresión de los genes *aceB1*, *allB* y *alc* en la cepa AllR<sup>-</sup> comparado con la cepa M145 a 24 horas de crecimiento en MM-GC.

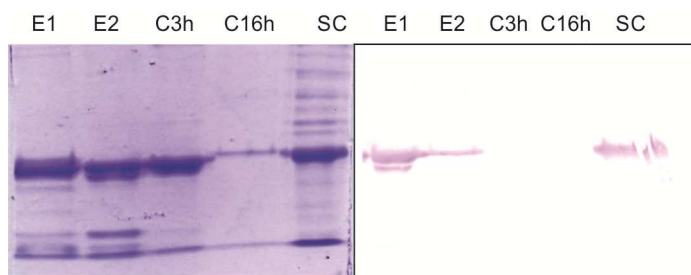
### Unión del regulador AllR al ADN

Los resultados anteriores sugieren que la proteína AllR reprime su propia expresión y la de los genes *aceB1*, *allB* y *hyi*. Para determinar si AllR se une directamente a los promotores de estos genes, se realizaron ensayos *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética utilizando la proteína AllR pura y fragmentos de

ADN correspondientes a las posibles regiones promotoras, según los estudios *in silico* antes mencionados, de dichos genes.

Con este fin, el gen *allR* fue amplificado por PCR, clonado en el vector pET28a (pLN02 Tabla II) y expresado como proteína de fusión a seis residuos de histidina en la cepa *E. coli* BL21.

El regulador AllR de *S. coelicolor* pertenecería a la familia de reguladores IclR, esta familia se caracteriza por la presencia de un dominio HTH de unión a ADN en el extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica. Por esta razón se eligió eliminar los residuos de histidina que podrían afectar la unión del regulador a los fragmentos de ADN. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de Ni<sup>+2</sup>-Agarosa, y la elución final se realizó mediante un corte con enzima trombina, este tratamiento permitió eluir la proteína recombinante sin la fusión a los residuos histidina. La pérdida de los residuos de histidina se corroboró mediante un Western Blot con anticuerpos anti-His (Figura 29).

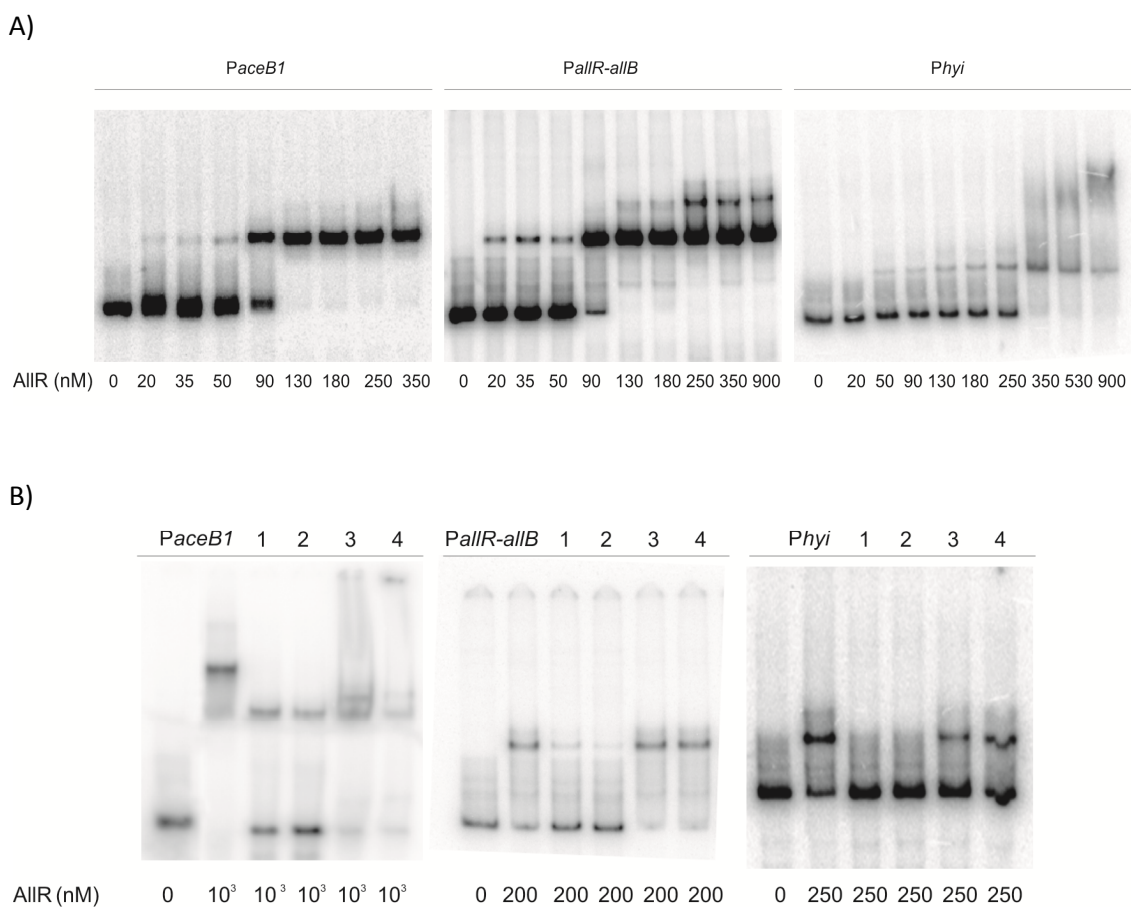


**Figura 29.** SDS-PAGE y Western Blot realizados durante la purificación de AllR. E1 y E2 corresponden a la elución con 80 y 100 mM de imidazol, respectivamente, C3h y C16h corresponden a los cortes de 3 y 16 horas con enzima trombina, respectivamente, y SC corresponde al eluido inicial luego de la primera siembra de la columna (ver materiales y métodos).

Los fragmentos de ADN utilizados en estos ensayos fueron obtenidos por PCR y corresponden a las posiciones: -255 a -1 relativo al sitio de inicio de la traducción del gen *allB* (*PallR-allB*, los promotores putativos de estos genes se encuentran en la misma región intergénica pero en direcciones opuestas); -184 a -1 relativo al sitio de inicio de la traducción del gen *aceB1* (*PaceB1*); -156 a -1 relativo al sitio de inicio de la traducción del gen *hyi* (*Phyi*). Estos fragmentos de ADN se incubaron con concentraciones crecientes de AllR en un *buffer* de unión adecuado y se sembraron

posteriormente en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes para la separación electroforética (materiales y métodos).

Los resultados que se observan en la Figura 30 A demuestran que AllR es capaz de unirse y alterar la movilidad electroforética de los tres fragmentos de ADN analizados. Para estudiar la especificidad de estos corrimientos, se realizaron ensayos de competencia para cada sonda utilizando un exceso de 50 y 100 veces de ADN específico e inespecífico. La Figura 30 B muestra la especificidad de unión de AllR a los fragmentos de ADN estudiados.



**Figura 30.** A) Ensayos de retardo en gel utilizando concentraciones crecientes de AllR y fragmentos de ADN correspondientes a los promotores *PaceB1*, *PallR-allB* y *Phyi*. B) Ensayo de competencia utilizando cada una de las sondas: ADN específico 50 X (1), ADN específico 100 X (2), ADN inespecífico 50 X (3) y ADN inespecífico 100 X (4).

En el caso del fragmento de ADN correspondiente a *PallR-allB* se observa la formación de un primer complejo AllR-ADN y luego a mayor concentración de AllR, la formación de un segundo complejo. La aparición de este segundo complejo podría deberse a la unión de más de una molécula de regulador a la sonda *PallR-allB*, tal vez de manera cooperativa. Este efecto no se observó con el resto de los fragmentos ensayados.

### Identificación del sitio de unión de AllR

Como continuación de los estudios anteriores, se planteó identificar el sitio específico de unión del regulador AllR al ADN. Para esto se llevaron a cabo experimentos de protección a la digestión con la nucleasa DNAasaI en presencia y ausencia de AllR utilizando como sitio blanco las regiones promotoras putativas de los genes *allB* y *aceB1*. La cantidad de proteína utilizada en estos ensayos se eligió en base a los resultados de los ensayos de retardo en gel anteriores.

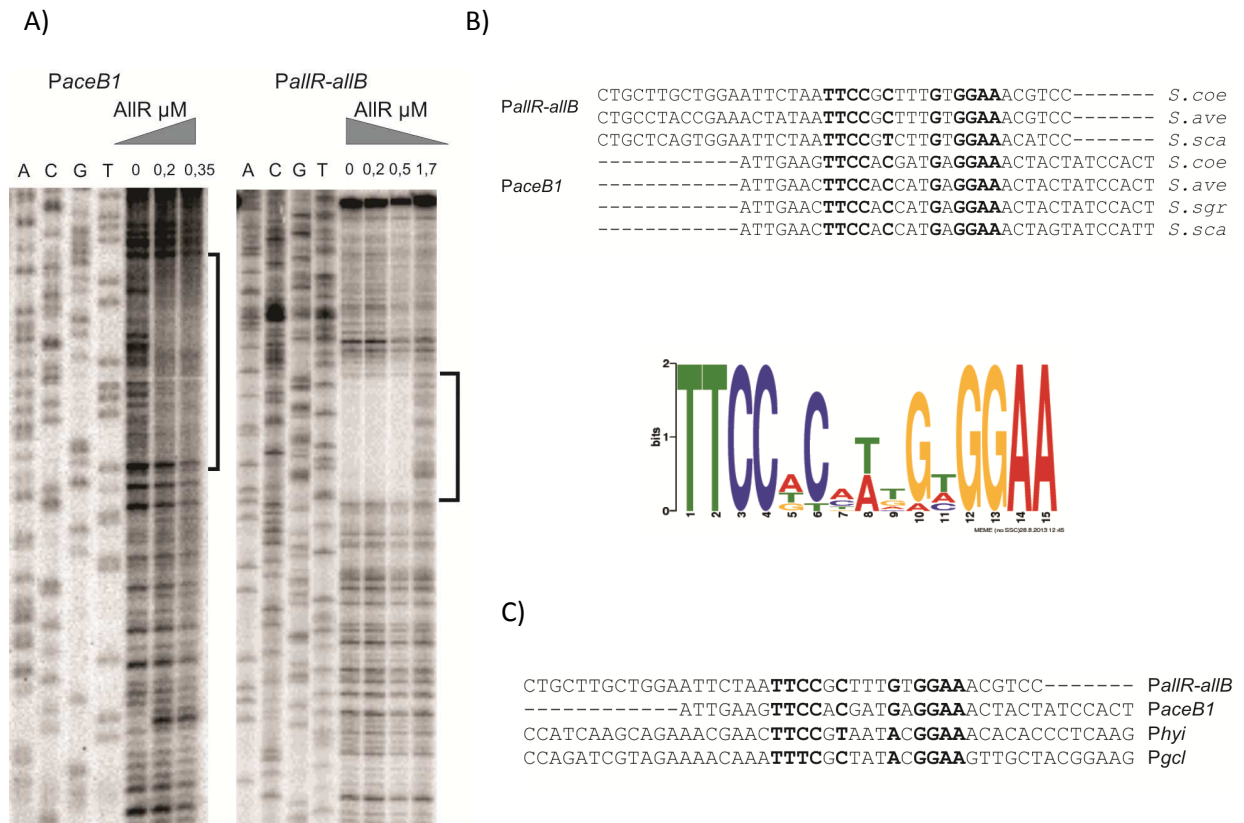
Los fragmentos de ADN *PallR-allB* y *PaceB1* marcados radioactivamente se incubaron con concentraciones crecientes de AllR en *buffer* de unión, luego los mismos se digirieron con DNAasa I y finalmente se sembraron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para la separación electroforética (ver materiales y métodos).

Como se observa en la Figura 31 A, existe una única región de protección a la nucleasa para cada promotor ensayado en presencia de AllR y no se observaron regiones de hipersensibilidad. Para determinar la secuencia nucleotídica de la región protegida se corrió junto con las reacciones de protección una reacción de secuencia utilizando como molde los promotores de *PallR-allB* o *PaceB1* según corresponda.

El análisis de cada una de estas regiones protegidas muestra la presencia de una repetición invertida que está altamente conservada en las regiones promotoras de genes ortólogos en otras especies de *Streptomyces* (Figura 31 B). A su vez, estas secuencias fueron analizadas utilizando la herramienta bioinformática MEME, detectándose una secuencia pseudo-palindrómica de 15 pb [147] (Figura 31 C).

La repetición invertida encontrada en estos experimentos también está presente en la región promotora del gen *hyi*, lo cual confirma el resultado obtenido en el ensayo de retardo en gel.

A su vez, una secuencia muy similar a la repetición invertida identificada se encuentra en la región promotora del gen *gcl*, aunque se necesitarían ensayos de retardo en gel para corroborar la unión específica del regulador AllR a este promotor (Figura 31 C). El resto de los genes de la vía de degradación de alantoína caracterizados en el capítulo I, *ureB*, *ugl* y *glxR*, no presentan la secuencia invertida de unión de AllR identificada en estos estudios en sus regiones promotoras putativas.



**Figura 31.** A) Ensayos de protección con DNAasa I utilizando *PaceB1* y *PallR-allB* como sondas. B) Alineamiento de las secuencias protegidas y logo obtenido a partir de la herramienta online MEME (Nucleic Acids Res. 2006 MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs Timothy L. Bailey, Nadya Williams, Chris Mischel, and Wilfred W. Li). C) Alineamiento con las regiones promotoras putativas de los genes *hyi* y *gcl*.

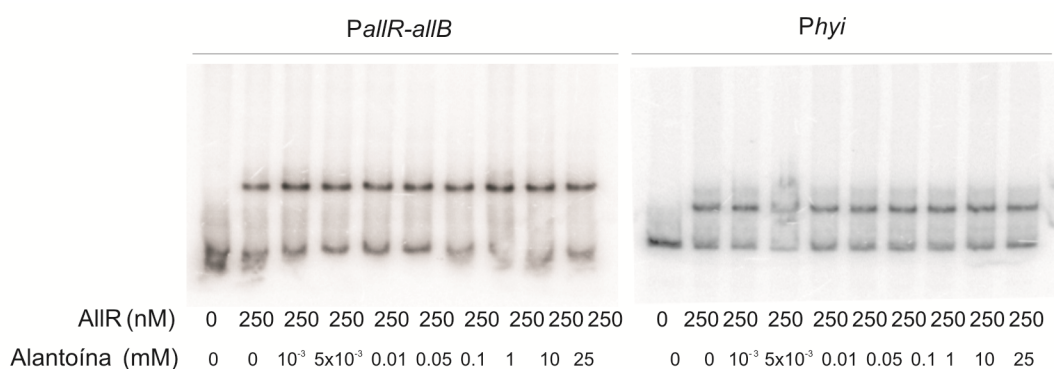
Estos análisis muestran que la región protegida en cada uno de los promotores ensayados presenta mayor longitud (35 pb para *PaceB1* y 40 bp para *PallR-allB*) que la secuencia pseudo-palindrómica encontrada de 15 pb. Esto podría deberse a que la unión del regulador a estas regiones específicas provoca un impedimento espacial para

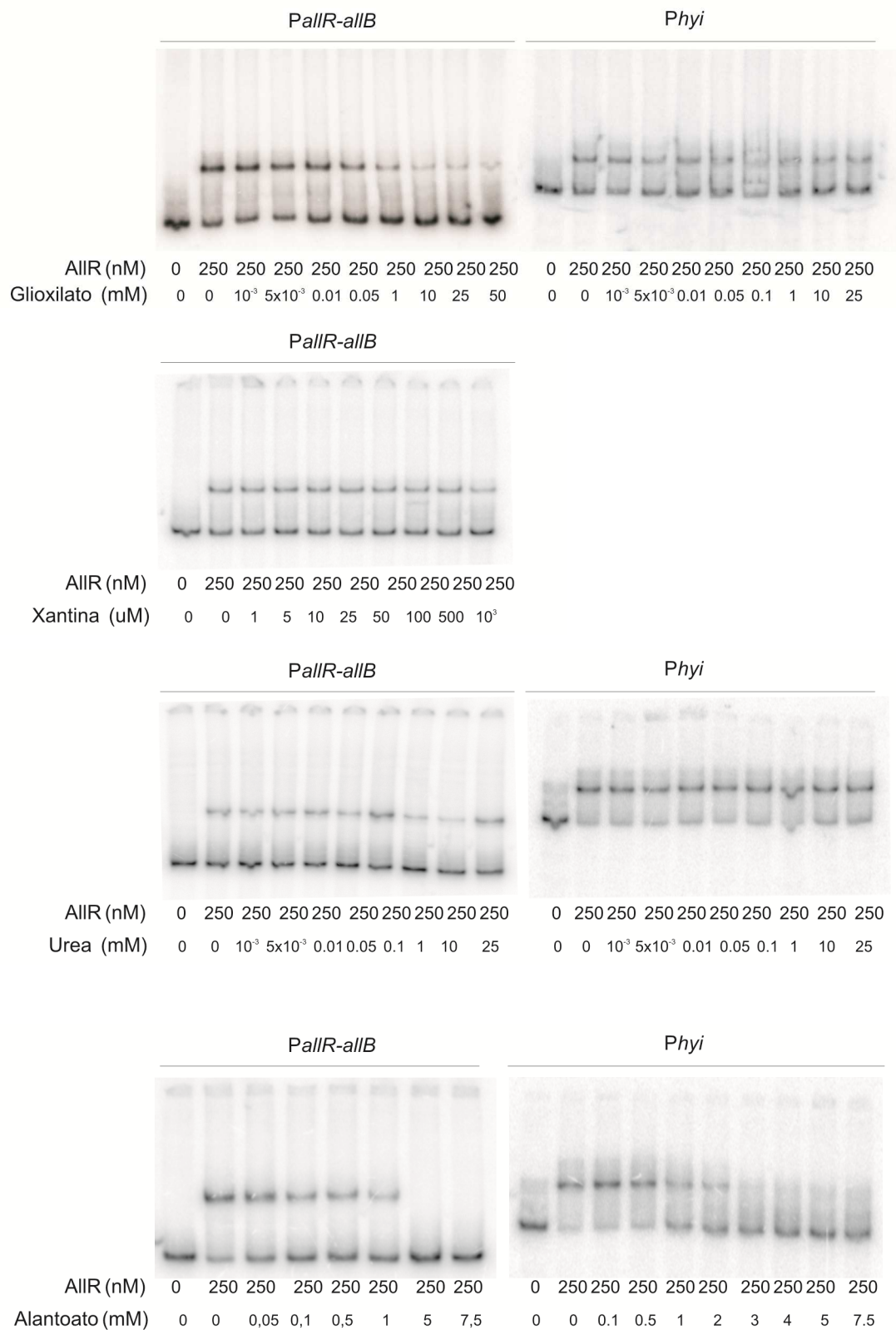


### Estudio de efectores del regulador AllR

Para determinar cuál/es metabolitos podrían estar modificando la unión del regulador AllR de *S. coelicolor* al ADN se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel agregando a las mezclas de reacción concentraciones crecientes de los agentes que se disponían en el laboratorio como ser: alantoína, alantoato, glioxilato, piruvato, urea, xantina. Los mismos se eligieron por ser sustratos o productos de la vía de degradación de alantoína. Una concentración fija de AllR, correspondiente a la formación de un 50 % de complejo AllR-ADN, se incubó previamente con las moléculas en estudio en *buffer* de unión y luego se agregaron los fragmentos de ADN *PallR-allB* y *Phyi* marcados radioactivamente. La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida no desnaturizantes.

Como se puede observar en la Figura 33, el agregado de alantoína no tiene efecto sobre la unión de AllR a los fragmentos de ADN probados para ninguna de las concentraciones ensayadas. Por otro lado, la presencia de glioxilato si presentó un efecto sobre la unión proteína-ADN a altas concentraciones pero únicamente cuando se utilizó *PallR-allB* como sonda. En el caso de *Phyi* tal vez se necesiten mayores concentraciones de glioxilato para observar un efecto sobre la unión de AllR. El agregado de alantoato también presentó un efecto sobre la unión del regulador AllR al ADN, en este caso, para ambas sondas ensayadas. La presencia de este compuesto provocó una marcada disrupción del complejo AllR-ADN. Estos resultados estarían sugiriendo que alantoato sería un modulador positivo de la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*.



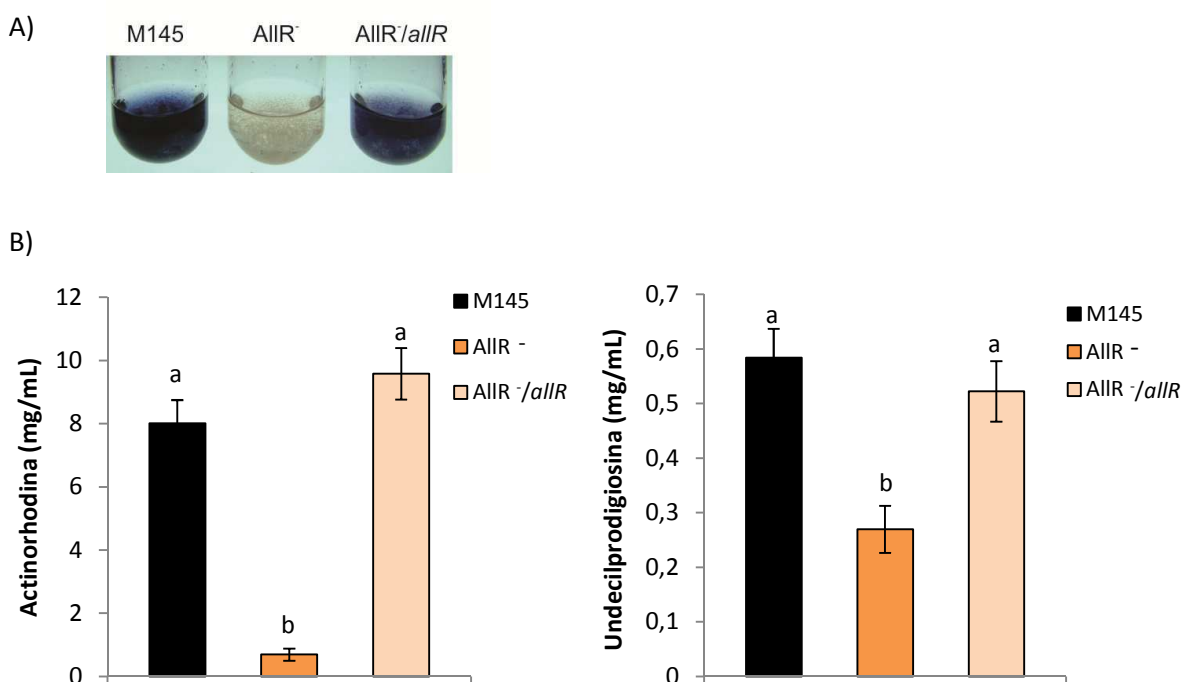


**Figura 33.** Ensayos de retardo en gel utilizando sondas correspondientes a los promotores PallR-allB y Phyi a una concentración fija de AIIR y con el agregado de concentraciones crecientes de alantoína, glioxilato, xantina, urea y alantoato.

### Efecto de la mutación *allR* sobre la producción de ATBs

Durante el crecimiento de la cepa  $AllR^-$  en MM-GC se pudo evidenciar una alteración en la producción de antibióticos de esta cepa mutante. A simple vista se observaba la falta de color azul característico de la liberación de actinorhodina al medio en fase estacionaria de crecimiento (Figura 26 B y 34 A). Para corroborar esta observación se cuantificó la producción de undecilprodigiosina y actinorhodina en comparación con los valores obtenidos para la cepa parental *S. coelicolor* M145 (Figura 34). Si bien los niveles de ambos antibióticos se encontraron disminuidos, la producción de actinorhodina se observó más afectada en la mutante  $AllR^-$ .

Para verificar que este efecto se debía a la inactivación del gen *allR*, la cepa  $AllR^-$  se complementó con una copia funcional del gen *allR* bajo el control de su propio promotor integrada en el sitio  $\phi BT1$  [132]. La Figura 34 A muestra que efectivamente el fenotipo de la mutante se revierte con esta complementación.

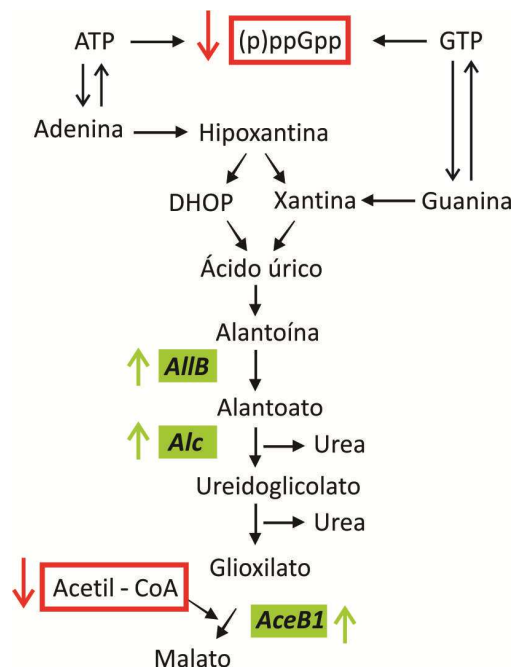


**Figura 34.** A) Producción de antibióticos en las cepas M145,  $AllR^-$  y  $AllR^-/allR$  en MM-GC. La cepa  $AllR^-/allR$  corresponde a la cepa  $AllR^-$  complementada con una copia funcional del gen *allR*. B) Cuantificación de la producción de undecilprodigiosina y actinorhodina de las cepas M145,  $AllR^-$  y  $AllR^-/allR$  a 60 y 72 horas de crecimiento en MM-GC, respectivamente. Las letras a y b denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ).

Esta disminución en la producción de antibióticos en la mutante  $\Delta\text{AllR}^-$  podría deberse a la falta de los precursores (acetil-CoA) necesarios para la biosíntesis de los mismos, o bien a una disminución de los precursores (ATP y GTP) para generar la molécula señal de fase estacionaria (p)ppGpp que afecta la expresión de los genes de biosíntesis de antibióticos.

Estas hipótesis se basan en los datos proteómicos de la cepa mutante, ya que la inactivación del represor AllR provoca un aumento de la expresión de las proteínas de degradación de alantoína incluida la enzima AceB1 que utiliza acetil-CoA para la síntesis de malato. De esta manera el aumento de los niveles de esta enzima en la mutante  $\Delta\text{AllR}^-$  podría afectar los niveles de acetil-CoA intracelular para la síntesis de actinorhodina (Figura 35).

Por otro parte, la vía de degradación de alantoína es la etapa final de degradación de purinas por lo tanto, el aumento en los niveles de las proteínas de esta vía metabólica podrían estar afectando los niveles de ATP y GTP intracelular. Estas moléculas además de ser la fuente energética más importante de la célula, son precursores para la síntesis de (p)ppGpp. El (p)ppGpp es una molécula señalizadora esencial para la respuesta astringente y para la activación de los reguladores específicos de la biosíntesis de antibióticos (Figura 35). Si esto fuera cierto, el crecimiento de esta cepa también debería encontrarse afectado, sin embargo, este fenómeno no se observó durante los estudios realizados previamente (Figura 26).



**Figura 35.** La disminución de los niveles de acetil-CoA o de molécula señalizadora (p)ppGpp podrían estar afectando la producción de antibióticos en la mutante AllR<sup>-</sup>.

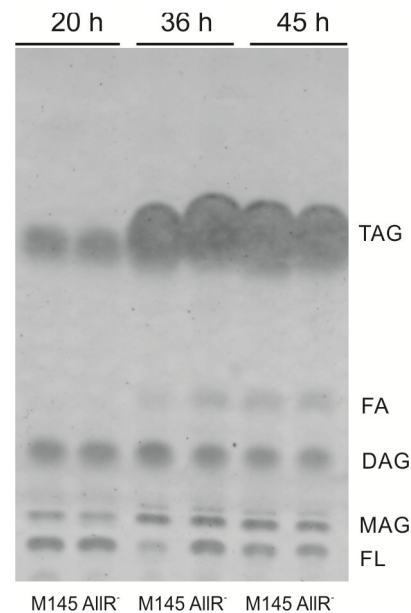
### Hipótesis sobre la disponibilidad del acetil-CoA

Para verificar las hipótesis planteadas realizamos los siguientes experimentos fisiológicos y genéticos. Si el efecto se debe a la falta de precursores como el acetil-CoA, esto también podría afectar otros procesos celulares que utilizan este mismo precursor como ser la síntesis de ácidos grasos y por lo tanto la síntesis de TAGs.

Es por esto que nos propusimos determinar los niveles de TAGs acumulados por esta cepa. Para esto se crecieron las cepas AllR<sup>-</sup> y M145 en MM-GC y se tomaron muestras de los cultivos a 20, 36 y 45 horas de crecimiento. Las células se centrifugaron, liofilizaron y los ácidos grasos totales fueron extraídos con solventes orgánicos y posteriormente separados por TLC. Los TAGs fueron revelados por tinción con cobre fosfórico y calor [9].

Como se puede observar en la Figura 36, la acumulación de TAGs no se encuentra afectada en la mutante AllR<sup>-</sup> a ninguno de los tiempos analizados. Estos experimentos estarían indicando que existe cantidad suficiente de acetil-CoA para la síntesis de TAGs, lo cual sugiere que la disponibilidad de este precursor no sería la causa de la disminución de la producción de antibióticos en la mutante AllR<sup>-</sup>. Sin embargo, también podría ocurrir que los niveles de acetil-CoA se encuentren

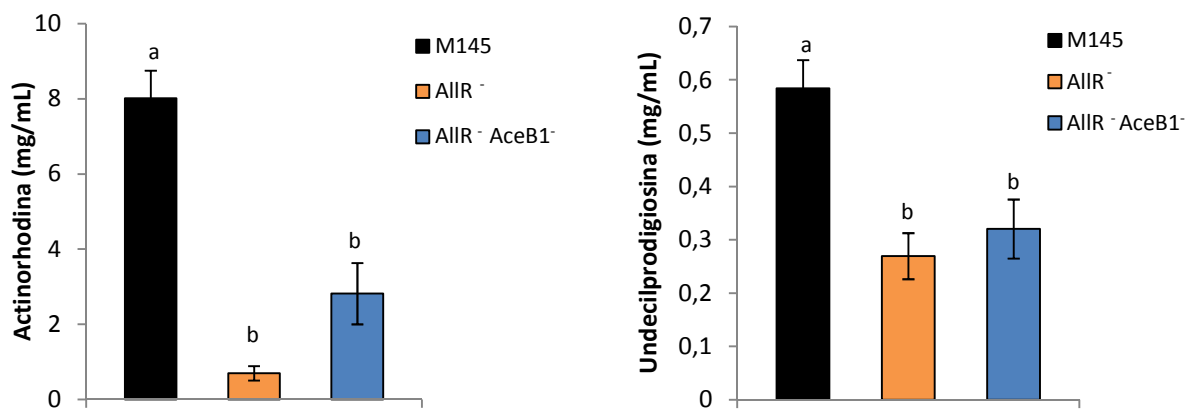
verdaderamente afectados pero los mismos sean direccionados para la síntesis de TAGs o de fosfolípidos de membrana celular priorizando el crecimiento celular, y afectándose solamente la síntesis de antibióticos.



**Figura 36.** Cromatografía de capa delgada de ácidos grasos totales de las cepas M145 y AllR<sup>-</sup> a 20, 36 y 45 horas de crecimiento en MM-GC. Triacilglicéridos (TAG), ácidos grasos libres (FA), diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MAG) y fosfolípidos (FL).

Finalmente para poder descartar que el aumento en los niveles de AceB1 pudiera estar condicionando los niveles de acetil-CoA o alguna alteración metabólica en la cepa AllR<sup>-</sup>, se planteó construir una mutante en el gen *aceB1* a partir de la mutante AllR<sup>-</sup>. Para la construcción de esta cepa se utilizó la cepa AllR<sup>-</sup> y el cósmido correspondiente para la disrupción por inserción transposónica del gen *aceB1* utilizado anteriormente (Capítulo I).

Una vez obtenida la cepa AllR<sup>-</sup> AceB1<sup>-</sup> se determinó la producción de antibióticos en medio MM-GC. La cuantificación de los niveles de undecilprodigiosina y actinorhodina se realizó a 60 y 72 horas de crecimiento. Al comparar los niveles de producción de la cepa AllR<sup>-</sup> AceB1<sup>-</sup> con los de las cepas M145 y AllR<sup>-</sup>, se evidenciaron valores muy similares a los de la cepa AllR<sup>-</sup> (Figura 37). Este resultado permite descartar la hipótesis que el aumento en los niveles de AceB1 provoca la disminución de la producción de los antibióticos.



**Figura 37.** Cuantificación de undecilprodigiosina y actinorhodina de las cepas M145, AllR<sup>-</sup> y AllR<sup>-</sup> AceB1<sup>-</sup> a 60 y 72 horas de crecimiento en MM-GC, respectivamente. Las letras a y b denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ).

### Hipótesis sobre la expresión de los genes de biosíntesis de antibióticos

La segunda hipótesis plantea que la disminución de la producción de los mismos podría deberse a la disminución de la expresión de los genes de biosíntesis de antibióticos mediado por los activadores transcripcionales, provocada por una alteración de los niveles de la molécula señalizadora (p)ppGpp.

Para evaluar esto, se estudió la expresión del activador específico para actinorhodina, ActIIORF4. De esta manera se preparó ARN total a partir de cultivos de la cepa mutante AllR<sup>-</sup> y de la cepa parental M145 crecidas 46 horas en MM-GC. Estos ARNs se retrotranscribieron y analizaron por PCR en tiempo real utilizando los oligos correspondientes (Tabla III). La expresión del gen *actIIORF4* se encontró 97 veces disminuida en AllR<sup>-</sup> con respecto a la cepa parental M145 (la relación de expresión AllR<sup>-</sup>/M145 fue  $0,033 \pm 0,008$ ). Este resultado indica la inactivación de *allR* provoca una alteración metabólica que afecta la expresión del regulador ActIIORF4 y consecuentemente la biosíntesis de actinorhodina.

Si bien no se determinó la expresión del gen *redD*, esperaríamos observar el mismo efecto en este activador como causa de la disminución de la producción de undecilprodigiosina.

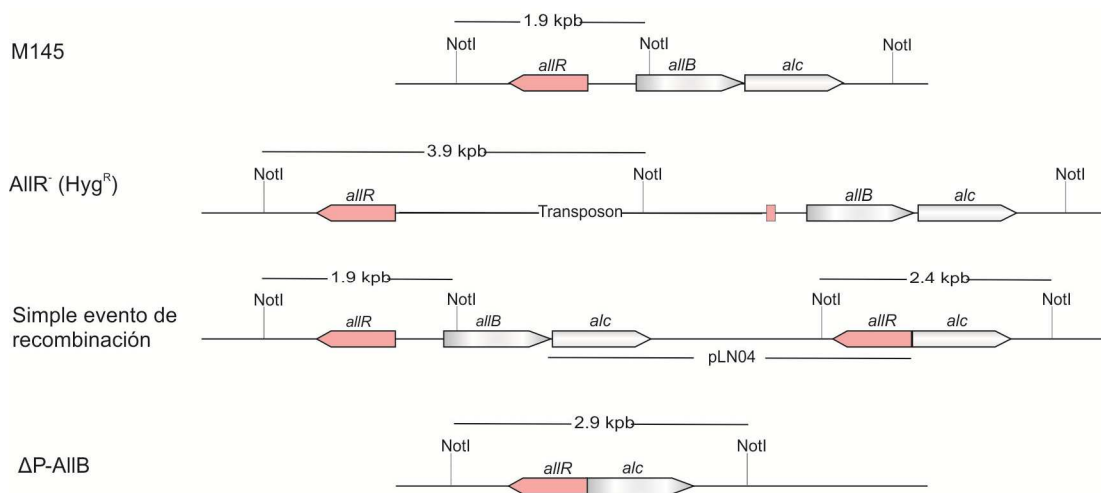
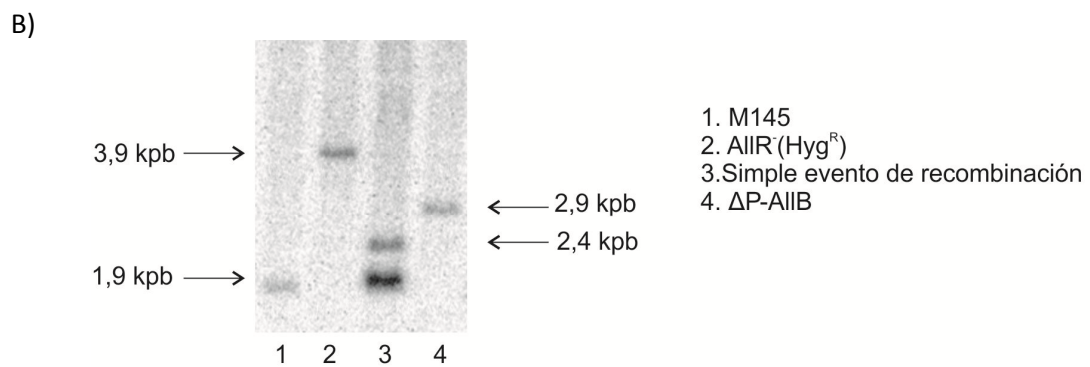
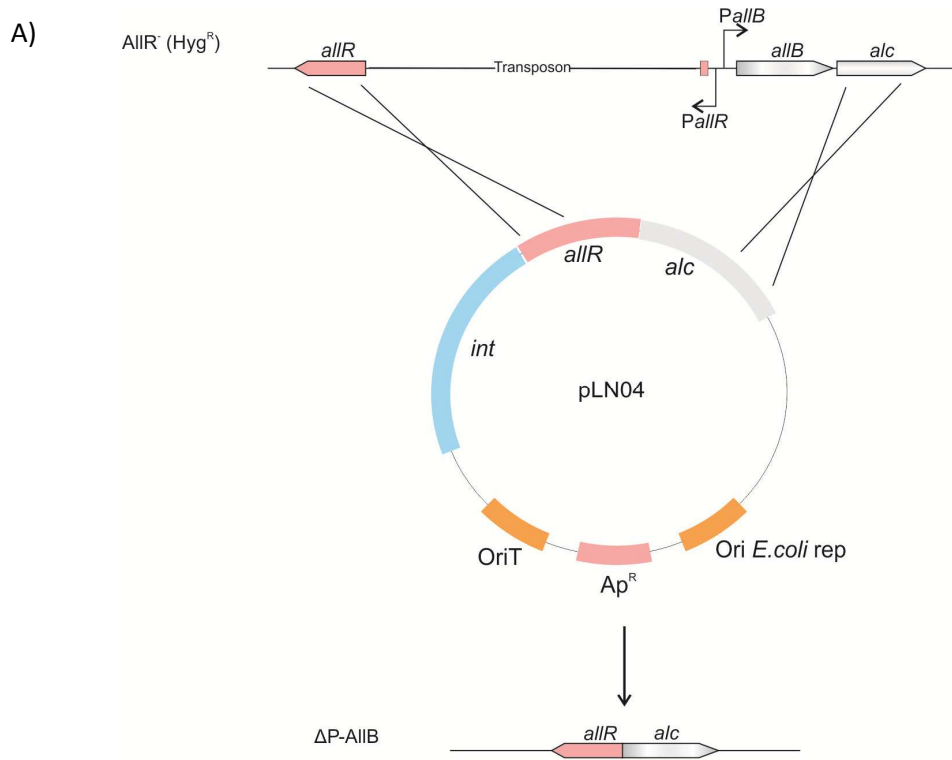
Finalmente para verificar si el aumento en los niveles de proteínas de la vía de alantoína de la cepa AllR<sup>-</sup> genera una modificación en los niveles de purinas que

puedan afectar la síntesis de (p)ppGpp, se aislaron nuevas mutantes en los genes *allB* y *alc* de la vía de degradación de alantoína a partir de la cepa  $AllR^-$ . Esta idea plantea que si uno bloquea la vía de degradación de alantoína se debería frenar la degradación de purinas. Para la construcción de estas cepas mutantes, no se pudieron utilizar los cósmidos conteniendo las inserciones transposónicas anteriormente mencionados, posiblemente debido a la baja eficiencia de la recombinación homóloga para fragmentos pequeños (entre los genes *allR-allB*).

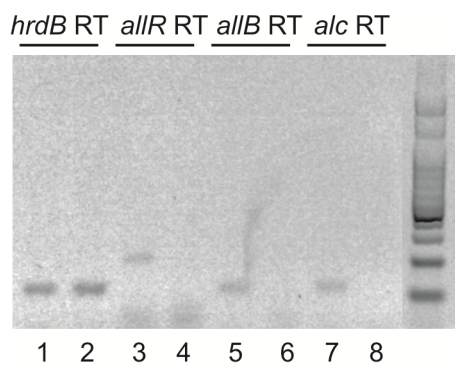
Es por esto que para esta construcción se utilizó una estrategia diferente. Primero se construyó un plásmido suicida movilizable que contenía los genes *allR* y *alc*. Esta construcción contiene una delección del promotor bidireccional *P<sub>allR-allB</sub>* y una delección del gen *allB*. Este plásmido se transfirió por conjugación a la cepa  $AllR^-$  ( $Hyg^R$ ) y mediante un doble evento de recombinación se aisló una cepa sensible a los antibióticos apramicina e higromicina que llamamos  $\Delta P-AllB$  (Figura 38 A).

La construcción de la cepa  $\Delta P-AllB$  fue analizada por la técnica de Southern Blot. Para esto, se obtuvieron cantidades suficientes de DNA genómico de las cepas M145,  $AllR^-$  y  $\Delta P-AllB$  que se cortaron con la enzima de restricción *NotI*, observándose el correcto patrón de digestión (Figura 38 B).

Debido a que esta cepa lleva la delección en el promotor bidireccional *P<sub>allR-allB</sub>* y el gen *allB*, la expresión de los genes *allR* y *alc* debería encontrarse afectada (Figura 12 A). Esto fue verificado mediante determinación de RNAm por RT-PCR semicuantitativa. Para esto se aisló RNA total de la cepa  $\Delta P-AllB$  y M145, se obtuvo ADNc y se realizó una PCR con los oligos correspondientes (Tabla III) (Figura 38 C).



C)



**Figura 38.** A) Estrategia utilizada para la obtención por doble evento de recombinación de la cepa  $\Delta P$ -AIIB. B) Autoradiografía de Southern Blot y esquema de restricción con enzima Not I para las cepas M145,  $AllR^-$ , resultante del simple evento de recombinación y  $\Delta P$ -AIIB. C) PCR semicuantitativa donde las calles 1, 3, 5 y 7 corresponden a M145 ADNc, y las calles 2, 4, 6, y 8 corresponden a  $\Delta P$ -AIIB ADNc. Los oligos utilizados fueron RT*allRL* y RT*allRR*, RT*allBL* y RT*allBR*, RT*alcL* y RT*alcR* para los genes *allR*, *allB* y *alc* respectivamente.

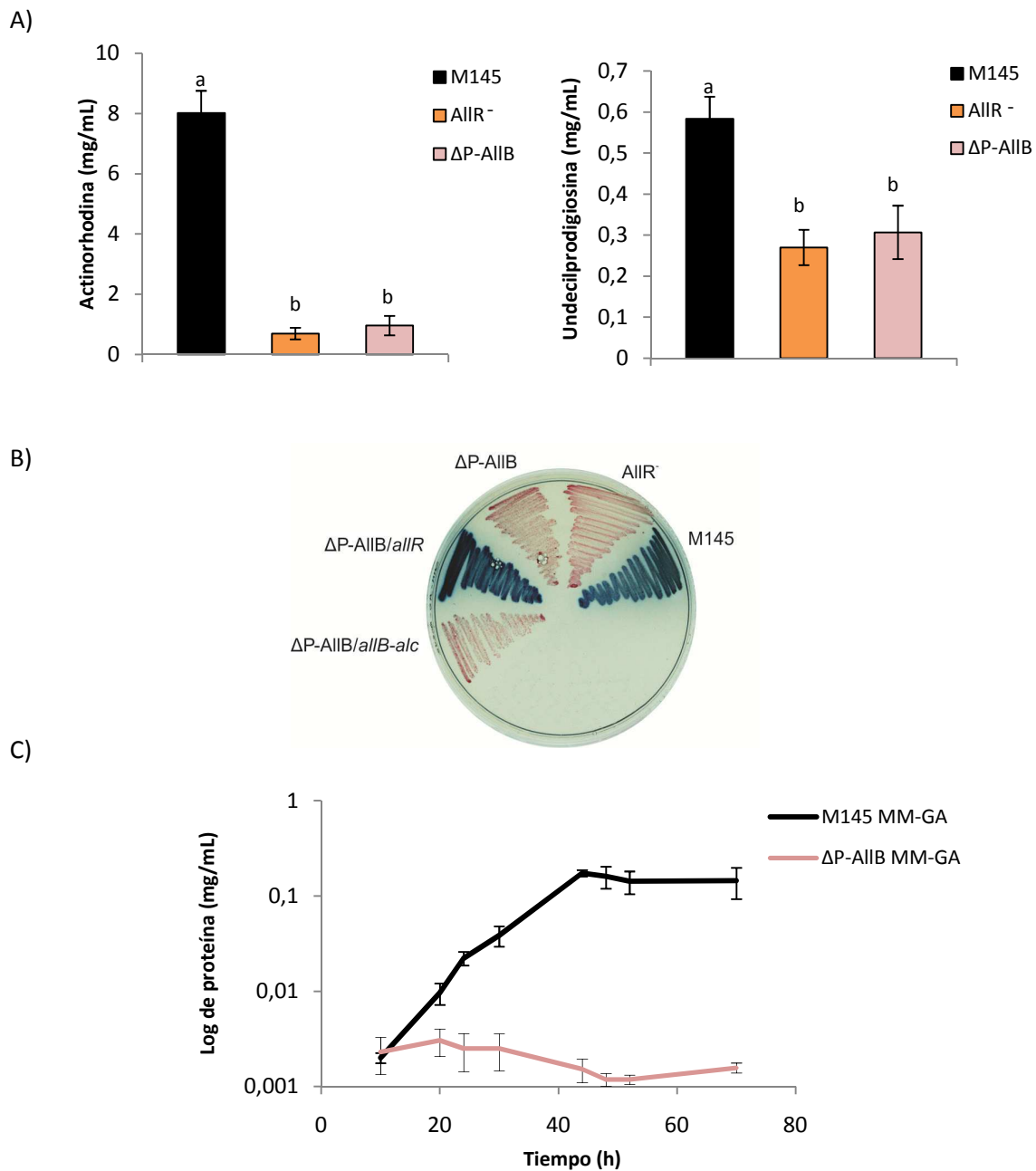
Para analizar la producción de antibióticos de la cepa  $\Delta P$ -AIIB, la misma se creció en MM-GC y se tomaron muestras a 60 y 72 horas de crecimiento. Al cuantificar los niveles de producción de undecilprodigiosina y actinorhodina, los mismos se encontraron muy similares a los de la cepa  $AllR^-$  (Figura 13 A).

Estos resultados permiten descartar la hipótesis de que un aumento en los niveles de expresión de AIIB-Alc podría provocar un efecto en los niveles de purinas y así una disminución de (p)ppGpp como causa de la disminución de la producción de antibióticos en la cepa  $AllR^-$ .

Para corroborar estos estudios, se realizó la complementación de la cepa  $\Delta P$ -AIIB con una copia funcional de los genes *allB* y *alc* bajo el control de su propio promotor y por otro lado, con una copia funcional del gen *allR* bajo el control de su promotor (pLN09 y pJM12, Tabla II). El fenotipo de producción de antibióticos se revirtió únicamente con la introducción de una copia funcional del gen *allR* en la mutante  $\Delta P$ -AIIB, verificando el resultado obtenido (Figura 39 B).

Como parte de los estudios fenotípicos de esta cepa mutante, también se estudió el crecimiento de la misma en medio con alantoína como única fuente de

nitrógeno (MM-GA) para verificar que la misma no sea capaz de crecer en el mismo debido a la ausencia de las enzimas AII<sub>B</sub> y Alc (Figura 39 C).



**Figura 39.** A) Cuantificación de la producción de undecilprodigiosina y actinorhodina a 60 y 72 horas de crecimiento en MM-GC respectivamente. Las letras a y b denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ). B) Producción de antibióticos en medio mínimo suplementado con acetato y casa aminoácidos de las cepas M145, AII<sub>R</sub><sup>-</sup>, ΔP-AII<sub>B</sub>, y las cepas complementadas ΔP-AII<sub>B</sub>/aII<sub>R</sub> y ΔP-AII<sub>B</sub>/aII<sub>B</sub>-alc. Se eligió este medio sólido debido a que la producción de antibióticos se observa más claramente que en MM-GC sólido. C) Crecimiento de la cepa ΔP-AII<sub>B</sub> en MM-GA comparado con el crecimiento de la cepa parental M145.

Por otro lado, si bien no fue planteado como hipótesis inicialmente, estos resultados también permiten descartar que la disminución de la producción de antibióticos se deba un aumento en los niveles de amonio intracelular que afecte la expresión de los activadores transcripcionales específicos de la biosíntesis, como se determinó en el Capítulo I de este trabajo.

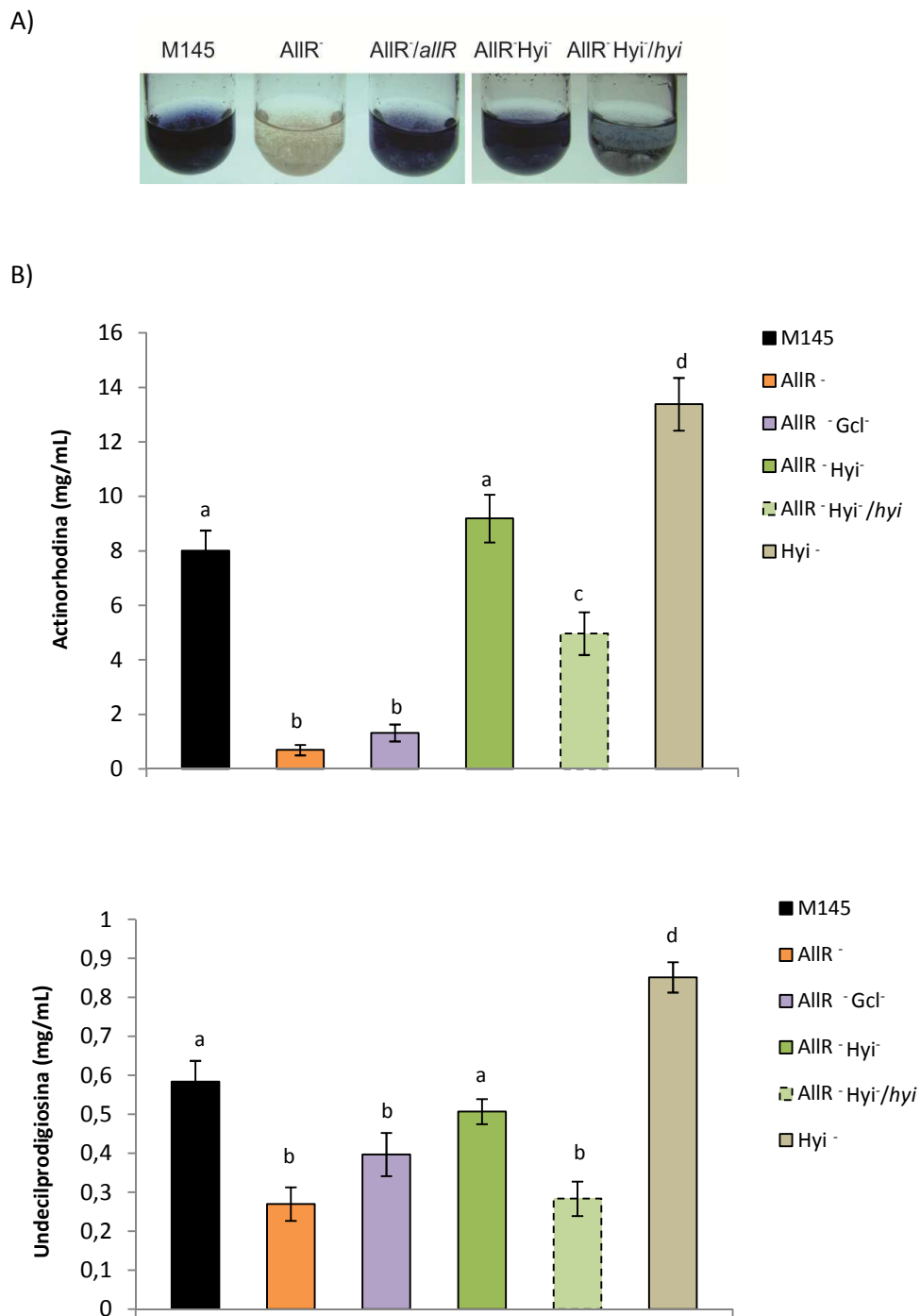
### **Reversión del fenotipo de la mutante AllR<sup>-</sup>**

Debido a que las hipótesis anteriores resultaron incorrectas, en esta etapa del trabajo se planteó una nueva estrategia basada en los estudios proteómicos. Estos estudios muestran el aumento en los niveles de expresión de otras proteínas de la vía de la alantoína. Por esta razón, nos planteamos buscar si la inactivación de otras proteínas de la vía era capaz de revertir el fenotipo de producción de antibióticos en la mutante AllR<sup>-</sup>. La finalidad de esto fue encontrar el gen cuyo aumento de expresión por ausencia del represor AllR es responsable de la disminución en la producción de antibióticos.

De esta manera, se construyeron dos nuevas mutantes AllR<sup>-</sup>Gcl<sup>-</sup> y AllR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> utilizando nuevamente la metodología de inserción transposónica y partiendo de la cepa AllR<sup>-</sup> (Hyg<sup>R</sup>). La correcta construcción de estas cepas fue corroborada por PCR utilizando los oligos correspondientes (Tabla III).

La Figura 40 A y B muestra que únicamente la mutante AllR<sup>-</sup> Hyi<sup>-</sup> fue capaz de recuperar el fenotipo parental de producción de antibióticos mientras que la mutante AllR<sup>-</sup> Gcl<sup>-</sup> presentó un fenotipo de producción de antibióticos similar a la cepa AllR<sup>-</sup>.

Este resultado indica que el aumento de la actividad enzimática de la proteína Hyi es capaz de generar un cambio metabólico que afecta la producción de antibióticos en la cepa AllR<sup>-</sup>. Para verificar este resultado, la cepa AllR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> se complementó con una copia funcional del gen *hyi* bajo el control de su propio promotor y se cuantificó la producción de antibióticos. A su vez, también se obtuvo una mutante simple en el gen *hyi*, en este caso se observó un aumento significativo de la producción de tanto de actinorhodina como de undecilprodigiosina, lo que resulta de interés para una futura manipulación genética con el objetivo de aumentar la producción de antibióticos en *S. coelicolor* (Figura 40 B).



**Figura 40.** A) Producción de antibióticos en las cepas M145, AIIR<sup>-</sup>, AIIR<sup>-</sup>/*allR* y AIIR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup>/*hyi* en MM-GC. Las cepas AIIR<sup>-</sup>/*allR* y AIIR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup>/*hyi* corresponden a la cepa AIIR<sup>-</sup> y AIIR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> complementadas con una copia funcional del gen *allR* y *hyi*, respectivamente. B) Cuantificación de la producción de undecilprodigiosina y actinorhodina a 60 y 72 horas de crecimiento en MM-GC respectivamente. Las letras a, b, c y d denotan diferencias estadísticamente significativas aplicando Test de Student ( $P < 0,1$ ).

Este resultado estaría indicando que el producto de la enzima *Hyi*, hidroxipiruvato, o algún derivado metabólico del mismo, es el causante de la disminución de la producción de antibióticos en la mutante *AllR*<sup>-</sup>. La utilización de hidroxipiruvato en el interior celular no se conoce con exactitud, se presupone que es utilizado por la célula para la síntesis del aminoácido serina pero hasta el momento esto no ha sido comprobado.

### Conclusiones y discusión

En esta parte del trabajo se identificó y caracterizó el regulador transcripcional negativo de la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*. Este regulador pertenece a la familia de reguladores *lclR*, que se caracterizan por la presencia de un dominio HTH de unión a ADN en el extremo N-terminal y un dominio de unión a moléculas efectoras en el extremo C-terminal. Miembros de esta familia son también el regulador *AllR* de la vía de alantoína y el regulador *lclR* de la vía del glioxilato de *E. coli* y el regulador *TM-lclR* de *Thermotoga marítima* que regula el metabolismo de xilulosa, dentro de los más caracterizados [109, 200, 201].

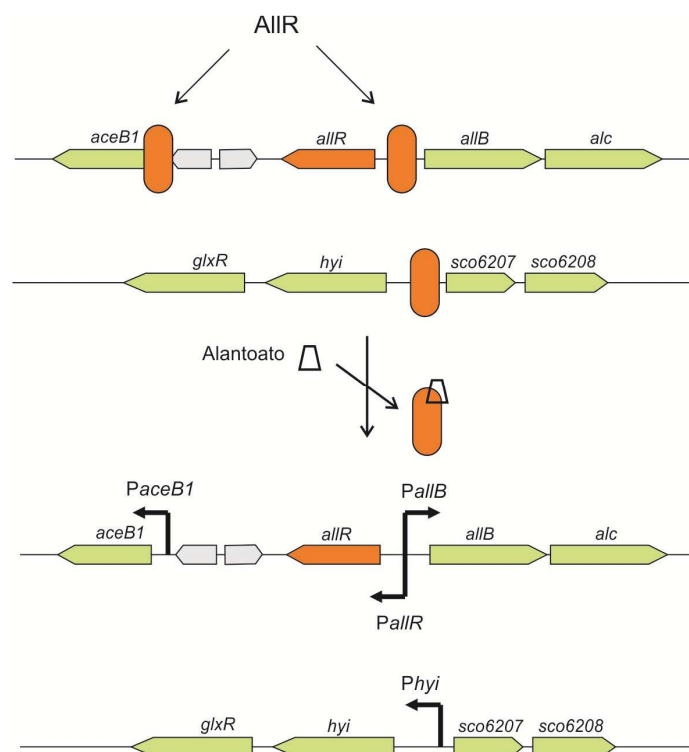
Estudios proteómicos permitieron identificar proteínas de la vía de degradación de alantoína cuya expresión se encontró alterada en la cepa mutante *AllR*<sup>-</sup>. Estos resultados evidenciaron una participación de la proteína *AllR* en la regulación del metabolismo de alantoína.

Posteriormente, a partir de estudios de retardo de la movilidad electroforética, se determinó que el regulador *AllR* reconoce sitios de unión en los promotores de los genes *allB*, *aceB1* y *hyi*. Estos sitios específicos de unión presentan una secuencia pseudo-palindrómica que fue identificada a partir de ensayos de protección a la digestión con nucleasa. Este sitio se encuentra conservado en regiones promotoras de genes ortólogos en otras especies de *Streptomyces*. Por otro lado, resulta interesante resaltar que tanto el regulador *AllR* como *lclR* de *E. coli* presentan secuencias totalmente palindrómicas de unión a ADN que son muy similares a la encontrada para *AllR* de *S. coelicolor*, donde los residuos 5' TTCC → GGAA 3' se encuentran presentes pero en sentido inverso (5' GGAA → TTCC 3') [199, 202].

La secuencia pseudo-palindrómica de unión de *AllR* sugiere una simetría de unión de este regulador al ADN. En *E. coli*, el regulador *AllR* se une en forma de

tetrámero a las regiones promotoras, requiriéndose cuatro dominios HTH para una unión efectiva [109].

El sitio de unión a moléculas efectoras en el extremo C-terminal de la familia de reguladores lclR no presenta amino ácidos conservados que participen en la unión de estas moléculas, por lo tanto, existe una gran potencialidad con respecto a la diversidad de compuestos que pueden actuar como efectores de los mismos [109]. En el caso del regulador de la vía de degradación de alantoína en este *E. coli*, esta propuesto que alantoína y glioxilato actúan como efectores, actuando el primero como co-represor y el segundo como activador de la vía [108, 202]. En este trabajo, se determinó que alantoato es una molécula efectora del regulador AllR en *S. coelicolor*, actuando como activador de la vía de degradación de alantoína (Figura 41). Posiblemente glioxilato también sea efector de AllR, sin embargo, se requiere un mayor número de ensayos para verificarlo.



**Figura 41.** Modelo propuesto de regulación de la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*.

Por otra parte, la mutante AllR<sup>-</sup> presentó una marcada disminución de la producción de antibióticos, siendo la producción de actinorhodina la más afectada.

Esta disminución no se debe a una falta de precursores para la biosíntesis de los mismos; esto fue demostrado mediante el estudio de la acumulación de TAGs, que no se encontraron afectados en la cepa mutante AllR<sup>-</sup>, y mediante la construcción de una doble mutante AllR<sup>-</sup> AceB1<sup>-</sup> que no revirtió la producción de antibióticos a sus niveles normales. A su vez, también se estudió la posibilidad de una alteración en los niveles purinas que podrían afectar la síntesis de la molécula señalizadora (p)ppGpp en la mutante AllR<sup>-</sup> como causa de la disminución de la producción de antibióticos. Si bien los valores de esta molécula no pudieron ser cuantificados, la construcción de la triple mutante  $\Delta$ P-AllB permitió descartar esta hipótesis ya que tampoco revirtió la producción de antibióticos como se esperaba.

Por último, se identificó un gen cuyo aumento de expresión en la mutante AllR<sup>-</sup> posiblemente causa el desbalance metabólico que, directa o indirectamente, es capaz de afectar la síntesis de antibióticos. Este gen codifica para una enzima con actividad hidroxipiruvato isomerasa, capaz de catalizar la conversión de tartronato semialdeído en hidroxipiruvato. Si bien no se comprobó experimentalmente, podemos especular que el aumento en los niveles de hidroxipiruvato en el interior celular podría generar un efecto citotóxico que no afecta el crecimiento celular pero sí la producción de metabolitos secundarios. Ha sido propuesto que el hidroxipiruvato presenta efectos tóxicos para la célula, debido a que es capaz de autooxidarse generando moléculas reactivas de oxígeno y provocando estrés oxidativo [203, 204]. A su vez, el estrés oxidativo ha sido estudiado en varias especies de *Streptomyces* como uno de los factores capaces de regular el metabolismo secundario, por ejemplo, en *S. natalensis* es capaz de alterar la producción de pimaricina y en *S. hygroscopicus* la producción de validamicina A [205-207]. Sin embargo, en estos casos el aumento de moléculas reactivas de oxígeno provoca un aumento de la producción de estos antibióticos. Por lo cual, se pone en duda esta última hipótesis y se deja abierta una línea de trabajo interesante para continuar estudiando.

Proteínas homólogas a la enzima hidroxipiruvato isomerasa se encuentran ampliamente distribuidas tanto en procariontes como en eucariotes, esto indica que la reacción enzimática que cataliza o bien la enzima misma es de gran importancia fisiológica. Se ha propuesto que el tartronato semialdeído generado a partir de glioxilato se utiliza para derivar energía y para la generación de bloques de carbono

para la síntesis de otros metabolitos, como ser hidroxipiruvato que sirve de precursor para el aminoácido serina [96].

Como alternativa para poder encontrar una respuesta al fenómeno observado analizamos el resto de las proteínas cuya expresión se encontraba alterada en la mutante *AllR<sup>-</sup>* en los experimentos previos de proteómica. Varias proteínas del metabolismo de aminoácidos se evidenciaron alteradas, dentro de las mismas podemos destacar la proteína SerA (Sco5515), que cataliza el primer paso de síntesis de serina, convirtiendo 3-fosfoglicerato en 3-fosfohidroxipiruvato. Este paso se considera el limitante de la velocidad de reacción en la vía de síntesis de este aminoácido [208]. Los niveles de expresión de SerA se encontraron aumentados a 46 horas de crecimiento en MM-GC en la mutante *AllR<sup>-</sup>*, lo cual podría estar relacionado con la generación de hidroxipiruvato en esta cepa.

En *S. auerofasiens* SP2 y *S. rimosus* la presencia de altas concentraciones de serina en el medio provocan una marcada disminución de la producción del antibiótico tetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente, aunque el mecanismo por lo cual esto ocurre se desconoce [209]. En el caso de la mutante *AllR<sup>-</sup>* la síntesis de serina a partir de hidroxipiruvato podría estar provocando la disminución de la producción de undecilprodigiosina y actinorhodina. Experimentos futuros de cuantificación de metabolitos intracelulares podrían aclarar esta última hipótesis.

Por otro lado, proteínas del metabolismo de carbono y de nitrógeno también se encontraron afectadas en los experimentos de proteómica, lo cual denota una alteración general del metabolismo primario; sin embargo, no se pudieron sacar conclusiones generales de estos estudios.

Finalmente, durante los estudios del gen *hyi* se evidenció que una mutación en el mismo provoca un aumento de la producción de antibióticos en MM-GC. Esto abre una importante línea de trabajo a futuro debido a que representaría una nueva estrategia de manipulación genética para el mejoramiento de la producción de metabolitos secundarios en este género bacteriano; y resalta la importancia del estudio de vías metabólicas primarias en el entendimiento del flujo metabólico hacia la síntesis de compuestos bioactivos.

# CONCLUSIONES GENERALES

Mediante estudios de crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M145, se determinó que esta especie bacteriana es capaz de crecer en alantoína como única fuente de carbono y nitrógeno.

A partir de experimentos proteómicos se identificaron seis proteínas involucradas en el metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*: alantoicasa, Alc, ureidoglicolato liasa, Ugl, malato sintasa, AceB1, glioxilato carboligasa, Gcl, hidroxipiruvato isomerasa, Hyi, y tartronato semialdehído reductasa, GlxR. Posteriormente, mediante ensayos bioquímicos y de ingeniería genética, se caracterizó la vía completa de degradación de alantoína en esta bacteria que incluye también las proteínas alantoinasa, AllB, y el complejo ureasa, Ure.

Se determinó que las proteínas AllB y Alc presentan actividad alantoinasa y alantoicasa, respectivamente, y que las mismas son esenciales para el crecimiento con alantoína como única fuente de carbono y nitrógeno. Estos resultados demostraron que la vía estudiada es la única implicada en el metabolismo de alantoína en *S. coelicolor*. A su vez, también se caracterizaron las proteínas Hyi y GlxR como hidroxipiruvato isomerasa y tartronato semialdehído reductasa, respectivamente. De estas cuatro enzimas se obtuvieron los parámetros cinéticos específicos, siendo los mismos similares a los encontrados para proteínas ortólogas en otros géneros bacterianos.

El metabolismo de alantoína provoca una marcada disminución de la producción de antibióticos que se debe a una disminución en la transcripción de los genes de biosíntesis de los mismos, consecuencia de la reducción de la transcripción del activador ActIIORF4 de la vía. A su vez, el metabolismo en exceso de alantoína genera un aumento de amonio, que se evidencia mediante técnicas metabolómicas y determinaciones de urea y amonio en el medio extracelular. Se plantea que el aumento de amonio provoca la disminución de la transcripción del activador de los genes de biosíntesis y como consecuencia la disminución de la producción de antibióticos. Esto se propone ya que la construcción de una mutante en el complejo

ureasa que no libera amonio al medio de cultivo permite revertir la producción de antibióticos a los niveles de producción de la cepa parental en medio sin alantoína.

Se identificó y caracterizó el regulador transcripcional negativo AllR de la vía de degradación de alantoína en *S. coelicolor*. Se determinó que este regulador controla su propia expresión y la de los genes *allB*, *aceB1* y *hyi*. Se determinó el sitio de unión específico a los promotores de estos genes, el cual resultó altamente conservado en genes ortólogos de otras especies de *Streptomyces*.

Se estableció que alantoato es una molécula efectora del regulador AllR, activando la vía de degradación de alantoína y se propuso un modelo de regulación para la misma.

La inactivación del gen *allR* provoca una significativa disminución de la producción de antibióticos debida a un aumento de la expresión de la proteína Hyi. Esto se evidencia mediante la construcción de la mutante AllR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> que revierte la producción de antibióticos a los niveles de producción de la cepa parental M145. Estudios proteómicos y transcripcionales sugieren que la sobreexpresión de *hyi* provoca un desbalance metabólico que lleva en última instancia a la disminución de la expresión de los activadores transcripcionales específicos de la síntesis de undecilprodigiosina y actinorhodina. La conexión entre la sobreexpresión de *hyi* y los activadores transcripcionales debe ser confirmada.

La inactivación del gen *hyi* genera un aumento de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, representando una nueva herramienta de manipulación genética para el mejoramiento de la producción de metabolitos secundarios en este género bacteriano.

# RESUMEN

Las purinas y derivados como la alantoína son componentes abundantes del suelo, constituyendo una fuente de carbono y nitrógeno muy importante del hábitat natural de *Streptomyces*. En este trabajo de tesis se caracterizó la vía metabólica de degradación de alantoína como así también la regulación de la misma en *S. coelicolor*, mediante técnicas proteómicas, metabolómicas, bioquímicas, de biología molecular y de ingeniería genética.

A partir de experimentos de proteómica se identificaron la mayor parte de las proteínas involucradas en la degradación de alantoína en esta bacteria. Posteriormente, se caracterizaron cuatro enzimas de esta vía, alantoinasa y alantoicasa, las cuales son esenciales para el crecimiento de la bacteria en medio con alantoína, e hidroxipiruvato isomerasa y tartronato semialdehído reductasa mediante técnicas bioquímicas y de ingeniería genética.

Por otra parte, se identificó el regulador transcripcional negativo AllR del metabolismo de la alantoína en *S. coelicolor*. Ensayos *in vitro* permitieron identificar los sitios de unión de este regulador a tres promotores de la vía. Estos sitios se encuentran altamente conservados en otras especies de *Streptomyces* lo que denota una preservación en la regulación de esta ruta metabólica en este importante género bacteriano. Estos estudios permitieron proponer un modelo de regulación mediado por alantoato.

A su vez, este trabajo permitió realizar una conexión importante entre el metabolismo primario de alantoína y el metabolismo secundario de producción de antibióticos en *S. coelicolor*. Por un lado, se evidenció que la degradación de alantoína provoca una marcada disminución de la producción de antibióticos. Mediante técnicas de metabolómica y análisis de compuestos nitrogenados en los cultivos se pudo determinar que el producto final de esta vía es amonio. El aislamiento de una mutante en el complejo ureasa, que no genera acumulación de amonio extracelular pero es capaz de producir niveles normales de antibióticos en medio con alantoína, permitió conectar el exceso de amonio con la inhibición de la producción de antibióticos durante el metabolismo de alantoína. Por otro lado, se estableció que el normal funcionamiento del regulador AllR es necesario para la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, ya que la inactivación del gen *allR* afecta notablemente la síntesis de los mismos. La inactivación de genes que aumentan su expresión en ausencia del

regulador AllR permitió identificar al gen *hyi*, que codifica para la enzima hidroxipiruvato isomerasa, como responsable de este efecto. La mutante AllR<sup>-</sup>Hyi<sup>-</sup> revierte la producción de metabolitos secundarios a los niveles de la cepa parental. Para agregar a esto, una mutación en el gen *hyi* en la cepa parental provoca un aumento de la síntesis de antibióticos y abre una puerta para estudios futuros como estrategia para aumentar la producción de compuestos bioactivos en esta especie bacteriana.

Este trabajo expresa la importancia del estudio de las vías metabólicas primarias, no solo para aumentar el conocimiento general de este importante género bacteriano sino también debido a la interacción de estas vías con el metabolismo secundario y la posibilidad de una futura manipulación para beneficio del ser humano.

## REFERENCIAS

1. **Madigan, M.T., Martinko, J. M. y Parker, J.,** *Brock, Biología de los microorganismos.* Vol. 8ª edición. 1999: Prentice Hall Iberia, Madrid.
2. **Chater, K.F., S. Biro, K.J. Lee, T. Palmer, and H. Schrempf,** *The complex extracellular biology of Streptomyces.* FEMS Microbiol Rev, 2010. 34(2): p. 171-98.
3. **Manteca, A., M. Fernandez, and J. Sanchez,** *A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of Streptomyces antibioticus.* Microbiology, 2005. 151(Pt 11): p. 3689-97.
4. **Pope, M.K., B. Green, and J. Westpheling,** *The bldB gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in Streptomyces coelicolor.* J Bacteriol, 1998. 180(6): p. 1556-62.
5. **Pope, M.K., B.D. Green, and J. Westpheling,** *The bld mutants of Streptomyces coelicolor are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling.* Mol Microbiol, 1996. 19(4): p. 747-56.
6. **Eccleston, M., R.A. Ali, R. Seyler, J. Westpheling, and J. Nodwell,** *Structural and genetic analysis of the BldB protein of Streptomyces coelicolor.* J Bacteriol, 2002. 184(15): p. 4270-6.
7. **Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader,** *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.* Journal of natural products, 2003. 66(7): p. 1022-1037.
8. **Olukoshi, E.R. and N.M. Packter,** *Importance of stored triacylglycerols in Streptomyces: possible carbon source for antibiotics.* Microbiology, 1994. 140 ( Pt 4): p. 931-43.
9. **Arabolaza, A., E. Rodriguez, S. Altabe, H. Alvarez, and H. Gramajo,** *Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in Streptomyces coelicolor.* Appl Environ Microbiol, 2008. 74(9): p. 2573-82.
10. **Demain, A.L. and A. Fang,** *The natural functions of secondary metabolites.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2000. 69: p. 1-39.
11. **Hopwood, D.A. and D.H. Sherman,** *Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis.* Annu Rev Genet, 1990. 24: p. 37-66.
12. **Katz, L. and S. Donadio,** *Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics.* Annu Rev Microbiol, 1993. 47: p. 875-912.
13. **Miyadoh, S.,** *Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach.* Actinomycetologica, 1993. 7: p. 100-106.
14. **Walsh, C.,** *Antibiotics: actions, origins, resistance* 2003: American Society for Microbiology (ASM).

15. **Du, L., C. Sanchez, and B. Shen**, *Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules*. *Metab Eng*, 2001. 3(1): p. 78-95.
16. **Bibb, M.**, 1995 *Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Microbiology*, 1996. 142 ( Pt 6): p. 1335-44.
17. **Kieser, H.M., T. Kieser, and D.A. Hopwood**, *A combined genetic and physical map of the Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome*. *J Bacteriol*, 1992. 174(17): p. 5496-507.
18. **Bentley, S.D., K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill, and D.A. Hopwood**, *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Nature*, 2002. 417(6885): p. 141-7.
19. **Bystrykh, L.V., M.A. Fernandez-Moreno, J.K. Herrema, F. Malpartida, D.A. Hopwood, and L. Dijkhuizen**, *Production of actinorhodin-related "blue pigments" by Streptomyces coelicolor A3(2)*. *J Bacteriol*, 1996. 178(8): p. 2238-44.
20. **Tsao, S.W., B.A. Rudd, X.G. He, C.J. Chang, and H.G. Floss**, *Identification of a red pigment from Streptomyces coelicolor A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1985. 38(1): p. 128-31.
21. **Gorst-Allman, C.P., B.A. Rudd, C.-J. Chang, and H.G. Floss**, *Biosynthesis of actinorhodin. Determination of the point of dimerization*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1981. 46(2): p. 455-456.
22. **Cerdeño, A.M., M.J. Bibb, and G.L. Challis**, *Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of Streptomyces coelicolor A3 (2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes*. *Chemistry & biology*, 2001. 8(8): p. 817-829.
23. **Chong, P.P., S.M. Podmore, H.M. Kieser, M. Redenbach, K. Turgay, M. Marahiel, D.A. Hopwood, and C.P. Smith**, *Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of Streptomyces coelicolor A3 (2)*. *Microbiology*, 1998. 144(1): p. 193-199.
24. **Kinashi, H., M. Shimaji, and A. Sakai**, *Giant linear plasmids in Streptomyces which code for antibiotic biosynthesis genes*. 1987.

25. **Gottelt, M., S. Kol, J.P. Gomez-Escribano, M. Bibb, and E. Takano**, *Deletion of a regulatory gene within the cpk gene cluster reveals novel antibacterial activity in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Microbiology, 2010. 156(Pt 8): p. 2343-53.
26. **Gomez-Escribano, J.P. and M.J. Bibb**, *Streptomyces coelicolor as an expression host for heterologous gene clusters*. Methods Enzymol, 2012. 517: p. 279-300.
27. **Bibb, M.J.**, *Regulation of secondary metabolism in streptomycetes*. Current opinion in microbiology, 2005. 8(2): p. 208-215.
28. **van Wezel, G.P. and K.J. McDowall**, *The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances*. Nat Prod Rep, 2011. 28(7): p. 1311-33.
29. **Gramajo, H.C., E. Takano, and M.J. Bibb**, *Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2) is transcriptionally regulated*. Mol Microbiol, 1993. 7(6): p. 837-45.
30. **Rodriguez, M., L.E. Nunez, A.F. Brana, C. Mendez, J.A. Salas, and G. Blanco**, *Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from Streptomyces cattleya*. Mol Microbiol, 2008. 69(3): p. 633-45.
31. **Chen, Y., E. Wendt-Pienkowski, and B. Shen**, *Identification and utility of FdmR1 as a Streptomyces antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in Streptomyces griseus ATCC 49344 and heterologous hosts*. J Bacteriol, 2008. 190(16): p. 5587-96.
32. **Bate, N., G. Stratigopoulos, and E. Cundliffe**, *Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis*. Mol Microbiol, 2002. 43(2): p. 449-58.
33. **Takano, E., H. Gramajo, E. Strauch, N. Andres, J. White, and M. Bibb**, *Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Mol Microbiol, 1992. 6(19): p. 2797-2804.
34. **Wilson, D.J., Y. Xue, K.A. Reynolds, and D.H. Sherman**, *Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of Streptomyces venezuelae*. J Bacteriol, 2001. 183(11): p. 3468-75.
35. **Molnar, I., J.F. Aparicio, S.F. Haydock, L.E. Khaw, T. Schwecke, A. Konig, J. Staunton, and P.F. Leadlay**, *Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in Streptomyces hygroscopicus: analysis of genes flanking the polyketide synthase*. Gene, 1996. 169(1): p. 1-7.

36. **McKenzie, N.L. and J.R. Nodwell**, *Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in Streptomyces coelicolor through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters*. J Bacteriol, 2007. 189(14): p. 5284-92.
37. **Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A.W. Thomae, D.A. Hopwood, and G.P. van Wezel**, *Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces*. EMBO Rep, 2008. 9(7): p. 670-5.
38. **Uguru, G.C., K.E. Stephens, J.A. Stead, J.E. Towle, S. Baumberg, and K.J. McDowall**, *Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2005. 58(1): p. 131-50.
39. **Rigali, S., H. Nothaft, E.E. Noens, M. Schlicht, S. Colson, M. Muller, B. Joris, H.K. Koerten, D.A. Hopwood, F. Titgemeyer, and G.P. van Wezel**, *The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development*. Mol Microbiol, 2006. 61(5): p. 1237-51.
40. **Potrykus, K. and M. Cashel**, *(p)ppGpp: still magical?* Annu Rev Microbiol, 2008. 62: p. 35-51.
41. **Strauch, E., E. Takano, H.A. Baylis, and M.J. Bibb**, *The stringent response in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 1991. 5(2): p. 289-98.
42. **Chakraborty, R., J. White, E. Takano, and M. Bibb**, *Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (relA) of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 1996. 19(2): p. 357-368.
43. **Hesketh, A., J. Sun, and M. Bibb**, *Induction of ppGpp synthesis in Streptomyces coelicolor A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis*. Mol Microbiol, 2001. 39(1): p. 136-44.
44. **Sun, J., A. Hesketh, and M. Bibb**, *Functional analysis of relA and rshA, two relA/spoT homologues of Streptomyces coelicolor A3(2)*. J Bacteriol, 2001. 183(11): p. 3488-98.
45. **Martin, J.F.**, *Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story*. J Bacteriol, 2004. 186(16): p. 5197-201.
46. **Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C. Gardner, F. Flett, and S.G. Oliver**, *Pigmented antibiotic production by Streptomyces coelicolor A3 (2): kinetics and the influence of nutrients*. Journal of general microbiology, 1990. 136(11): p. 2291-2296.
47. **Martin, J.F., A. Sola-Landa, F. Santos-Beneit, L.T. Fernandez-Martinez, C. Prieto, and A. Rodriguez-Garcia**, *Cross-talk of global nutritional regulators in the control of*

- primary and secondary metabolism in Streptomyces*. Microb Biotechnol, 2011. 4(2): p. 165-74.
48. **Reuther, J. and W. Wohlleben**, *Nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor: transcriptional and post-translational regulation*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007. 12(1-2): p. 139-46.
  49. **Wray, L.V., Jr. and S.H. Fisher**, *Cloning and nucleotide sequence of the Streptomyces coelicolor gene encoding glutamine synthetase*. Gene, 1988. 71(2): p. 247-56.
  50. **Weißschuh, N., D. Fink, S. Vierling, M. Bibb, W. Wohlleben, and A. Engels**, *Transcriptional analysis of the gene for glutamine synthetase II and two upstream genes in Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Molecular and General Genetics MGG, 2000. 264(4): p. 461-469.
  51. **Rexer, H.U., T. Schaberle, W. Wohlleben, and A. Engels**, *Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Arch Microbiol, 2006. 186(6): p. 447-58.
  52. **Tiffert, Y., P. Supra, R. Wurm, W. Wohlleben, R. Wagner, and J. Reuther**, *The Streptomyces coelicolor GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes*. Mol Microbiol, 2008. 67(4): p. 861-80.
  53. **Fink, D., N. Weissschuh, J. Reuther, W. Wohlleben, and A. Engels**, *Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 2002. 46(2): p. 331-47.
  54. **Fink, D., D. Falke, W. Wohlleben, and A. Engels**, *Nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2): modification of glutamine synthetase I by an adenylyltransferase*. Microbiology, 1999. 145 ( Pt 9): p. 2313-22.
  55. **Omura, S., Y. Tanaka, H. Mamada, and R. Masuma**, *Ammonium ion suppresses the biosynthesis of tylosin aglycone by interference with valine catabolism in Streptomyces fradiae*. J Antibiot (Tokyo), 1983. 36(12): p. 1792-4.
  56. **Brana, A.F., S. Wolfe, and A.L. Demain**, *Ammonium repression of cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus*. Can J Microbiol, 1985. 31(8): p. 736-43.
  57. **Brana, A.F., S. Wolfe, and A.L. Demain**, *Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in Streptomyces clavuligerus*. Arch Microbiol, 1986. 146(1): p. 46-51.
  58. **Merrick, M.J. and R.A. Edwards**, *Nitrogen control in bacteria*. Microbiol Rev, 1995. 59(4): p. 604-22.

59. **Kim, E.S., H.J. Hong, C.Y. Choi, and S.N. Cohen**, *Modulation of actinorhodin biosynthesis in Streptomyces lividans by glucose repression of afsR2 gene transcription*. J Bacteriol, 2001. 183(7): p. 2198-203.
60. **Cortes, J., P. Liras, J.M. Castro, and J.F. Martin**, *Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in Streptomyces lactamdurans is exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase*. J Gen Microbiol, 1986. 132(7): p. 1805-14.
61. **Demain, A.L. and E. Inamine**, *Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (alpha-D-mannosidase) formation*. Bacteriol Rev, 1970. 34(1): p. 1-19.
62. **Colson, S., J. Stephan, T. Hertrich, A. Saito, G.P. van Wezel, F. Titgemeyer, and S. Rigali**, *Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of streptomycetes are DasR-responsive elements*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007. 12(1-2): p. 60-6.
63. **Takano, E.**, *Gamma-butyrolactones: Streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation*. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(3): p. 287-94.
64. **Takano, E., H. Kinoshita, V. Mersinias, G. Bucca, G. Hotchkiss, T. Nihira, C.P. Smith, M. Bibb, W. Wohlleben, and K. Chater**, *A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2005. 56(2): p. 465-79.
65. **D'Alia, D., D. Eggle, K. Nieselt, W.S. Hu, R. Breitling, and E. Takano**, *Deletion of the signalling molecule synthase ScbA has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Microb Biotechnol, 2011. 4(2): p. 239-51.
66. **Lee, S.Y., H.U. Kim, J.H. Park, J.M. Park, and T.Y. Kim**, *Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production*. Drug Discovery Today, 2009. 14(1): p. 78-88.
67. **Ryu, Y.G., M.J. Butler, K.F. Chater, and K.J. Lee**, *Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in Streptomyces coelicolor*. Appl Environ Microbiol, 2006. 72(11): p. 7132-9.
68. **Viollier, P., K. Nguyen, W. Minas, M. Folcher, G. Dale, and C. Thompson**, *Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 2001. 183(10): p. 3193-3203.

69. **Viollier, P.H., W. Minas, G.E. Dale, M. Folcher, and C.J. Thompson**, *Role of acid metabolism in Streptomyces coelicolor morphological differentiation and antibiotic biosynthesis*. J Bacteriol, 2001. 183(10): p. 3184-3192.
70. **Borodina, I., J. Siebring, J. Zhang, C.P. Smith, G. van Keulen, L. Dijkhuizen, and J. Nielsen**, *Antibiotic overproduction in Streptomyces coelicolor A3 2 mediated by phosphofructokinase deletion*. J Biol Chem, 2008. 283(37): p. 25186-99.
71. **Rodriguez, E., L. Navone, P. Casati, and H. Gramajo**, *Impact of malic enzymes on antibiotic and triacylglycerol production in Streptomyces coelicolor*. Appl Environ Microbiol, 2012. 78(13): p. 4571-9.
72. **Wang, P., C. Kong, B. Sun, and X. Xu**, *Allantoin-induced changes of microbial diversity and community in rice soil*. Plant and Soil, 2010. 332(1-2): p. 357-368.
73. **Vogels, G.D. and C. Van der Drift**, *Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms*. Bacteriol Rev, 1976. 40(2): p. 403-68.
74. **Keilin, J.**, *The biological significance of uric acid and guanine excretion*. Biological Reviews, 1959. 34(3): p. 265-294.
75. **Fujiwara, S. and T. Noguchi**, *Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals*. Biochem. J, 1995. 312: p. 315-318.
76. **Mommsen, T. and P. Walsh**, *Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes*. Experientia, 1992. 48(6): p. 583-593.
77. **Hayashi, S., S. Jain, R. Chu, K. Alvares, B. Xu, F. Erfurth, N. Usuda, M.S. Rao, S.K. Reddy, and T. Noguchi**, *Amphibian allantoinase. Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression*. Journal of Biological Chemistry, 1994. 269(16): p. 12269-12276.
78. **Needham, J.**, *chemical embryology. volume 3*. Vol. 2. 1931: CUP Archive.
79. **Reinbothe, H. and K. Mothes**, *Urea, ureides, and guanidines in plants*. Annual Review of Plant Physiology, 1962. 13(1): p. 129-149.
80. **Vogels, G.v.d. and C. Van der Drift**, *Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms*. Bacteriol Rev, 1976. 40(2): p. 403.
81. **de Koning, H. and G. Diallinas**, *Nucleobase transporters*. Molecular membrane biology, 2000. 17(2): p. 75-94.
82. **Lee, Y., D.H. Lee, C.W. Kho, A.Y. Lee, M. Jang, S. Cho, C.H. Lee, J.S. Lee, P.K. Myung, and B.C. Park**, *Transthyretin-related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction*. FEBS Lett, 2005. 579(21): p. 4769-4774.

83. **Ramazzina, I., C. Folli, A. Secchi, R. Berni, and R. Percudani**, *Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes*. *Nature chemical biology*, 2006. 2(3): p. 144-148.
84. **Maynes, J.T., R.G. Yuan, and F.F. Snyder**, *Identification, expression, and characterization of Escherichia coli guanine deaminase*. *J Bacteriol*, 2000. 182(16): p. 4658-4660.
85. **Xi, H., B.L. Schneider, and L. Reitzer**, *Purine Catabolism in Escherichia coli and Function of Xanthine Dehydrogenase in Purine Salvage*. *J Bacteriol*, 2000. 182(19): p. 5332-5341.
86. **Nygaard, P., P. Duckert, and H.H. Saxild**, *Role of adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterization of the ade gene in Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1996. 178(3): p. 846-853.
87. **Nygaard, P., S.M. Bested, K.A. Andersen, and H.H. Saxild**, *Bacillus subtilis guanine deaminase is encoded by the yknA gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source*. *Microbiology*, 2000. 146 Pt 12: p. 3061-9.
88. **Rouf, M. and R.F. Lomprey**, *Degradation of uric acid by certain aerobic bacteria*. *J Bacteriol*, 1968. 96(3): p. 617-622.
89. **Bongaerts, G., I. Sin, A. Peters, and G. Vogels**, *Purine degradation in Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas testosteroni*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1977. 499(1): p. 111-118.
90. **CLARKE, P.H. and P.M. MEADOW**, *The effect of 8-azaguanine on the inducible oxidation of guanine by Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of general microbiology*, 1966. 44(2): p. 195-208.
91. **Saeed, H.M., Y.R.A.-F. Yousry, M. Gohar, and M.A. Elbaz**, *Purification and characterization of extracellular Pseudomonas aeruginosa urate oxidase enzyme*. *Polish Journal of Microbiology*, 2004. 53(1): p. 045-052.
92. **Trijbels, F. and G. Vogels**, *Degradation of allantoin by Pseudomonas acidovorans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 1966. 113(2): p. 292-301.
93. **Percudani, R., D. Carnevali, and V. Puggioni**, *Ureidoglycolate hydrolase, amidohydrolase, lyase: how errors in biological databases are incorporated in scientific papers and vice versa*. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2013. 2013.
94. **Cusa, E., N. Obradors, L. Baldomà, J. Badía, and J. Aguilar**, *Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen*

- and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999. 181(24): p. 7479-7484.
95. **Rintoul, M.R., E. Cusa, L. Baldomà, J. Badia, L. Reitzer, and J. Aguilar**, *Regulation of the Escherichia coli Allantoin Regulon: Coordinated Function of the Repressor AllR and the Activator AllS*. *J Mol Biol*, 2002. 324(4): p. 599-610.
  96. **Krakow, G., S.S. Barkulis, and J.A. Hayashi**, *Glyoxylic acid carboligase: an enzyme present in glycolate-grown Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1961. 81: p. 509-18.
  97. **Schultz, A.C., P. Nygaard, and H.H. Saxild**, *Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in Bacillus subtilis and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator*. *J Bacteriol*, 2001. 183(11): p. 3293-302.
  98. **Ramazzina, I., L. Cendron, C. Folli, R. Berni, D. Monteverdi, G. Zanotti, and R. Percudani**, *Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(34): p. 23295-23304.
  99. **Vogels, G.**, *Specificity of binding subsites of allantoinase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1969. 185(1): p. 186-197.
  100. **Rijnierse, V., C.v.d. Drift, and G. Vogels**, *Allantoinase and allantoinase synthesis in Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 1977. 23(5): p. 633-637.
  101. **Trijbels, F. and G.D. Vogels**, *Allantoate and ureidoglycolate degradation by Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*, 1967. 132(1): p. 115-26.
  102. **Matsumoto, H., S. Ohta, R. Kobayashi, and Y. Terawaki**, *Chromosomal location of genes participating in the degradation of purines in Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1978. 167(2): p. 165-176.
  103. **Pope, S.D., L.L. Chen, and V. Stewart**, *Purine utilization by Klebsiella oxytoca M5al: genes for ring-oxidizing and -opening enzymes*. *J Bacteriol*, 2009. 191(3): p. 1006-17.
  104. **Cooper, T.**, *Regulation of allantoin catabolism in Saccharomyces cerevisiae*, in *Biochemistry and Molecular Biology* 1996, Springer. p. 139-169.
  105. **Marzluf, G.A.**, *Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. 61(1): p. 17-32.
  106. **Scazzocchio, C. and A. Darlington**, *The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1968. 166(2): p. 557-568.
  107. **Beier, L., P. Nygaard, H. Jarmer, and H.H. Saxild**, *Transcription analysis of the Bacillus subtilis PucR regulon and identification of a cis-acting sequence required for PucR-*

- regulated expression of genes involved in purine catabolism.* J Bacteriol, 2002. 184(12): p. 3232-41.
108. **Hasegawa, A., H. Ogasawara, A. Kori, J. Teramoto, and A. Ishihama,** *The transcription regulator AllR senses both allantoin and glyoxylate and controls a set of genes for degradation and reutilization of purines.* Microbiology, 2008. 154(11): p. 3366-3378.
  109. **Walker, J.R., S. Altamentova, A. Ezersky, G. Lorca, T. Skarina, M. Kudritska, L.J. Ball, A. Bochkarev, and A. Savchenko,** *Structural and biochemical study of effector molecule recognition by the E. coli glyoxylate and allantoin utilization regulatory protein AllR.* J Mol Biol, 2006. 358(3): p. 810-828.
  110. **Hodgson, D.A.,** *Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria.* Adv Microb Physiol, 2000. 42: p. 47-238.
  111. **Ohe, T. and Y. Watanabe,** *Purification and Properties of Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase from Streptomyces cyanogenus* Agricultural and Biological Chemistry, 1980. 44(9): p. 1999-2006.
  112. **Ohe, T. and Y. Watanabe,** *Purification and properties of urate oxidase from Streptomyces cyanogenus.* J Biochem, 1981. 89(6): p. 1769-76.
  113. **Watanabe, Y.,** *Studies on the Formation of Uricase by Streptomyces Part III. The Effect of Incubation with of without Purines.* Agricultural and Biological Chemistry, 1971. 35(13): p. 2008-2014.
  114. **Ohe, T. and Y. Watanabe,** *Purification and properties of xanthine dehydrogenase from Streptomyces cyanogenus.* J Biochem, 1979. 86(1): p. 45-53.
  115. **Ohe, T. and Y. Watanabe,** *Purification and properties of hypoxanthine phosphoribosyltransferase from Streptomyces cyanogenus.* Agricultural and Biological Chemistry, 1980. 44.
  116. **WATANABE, Y., T. OHE, and Y. TSUJISAKA,** *Changes in the metabolic pathways of hypoxanthine in Streptomyces.* The Journal of General and Applied Microbiology, 1976. 22(1): p. 13-23.
  117. **Ohe, T. and Y. Watanabe,** *Effects of glucose and ammonium on the formation of xanthine dehydrogenase of Streptomyces sp.* Agricultural and Biological Chemistry, 1977. 41.
  118. **Tatsuhiko, O. and Y. WATANABE,** *Purification and properties of urate oxidase from Streptomyces cyanogenus.* Journal of Biochemistry, 1981. 89(6): p. 1769-1776.
  119. **Pfrimer, P., L.M.P.d. Moraes, A.S. Galdino, L.P. Salles, V.C.B. Reis, J.L. De Marco, M.V. Prates, C. Bloch, and F.A.G. Torres,** *Cloning, purification, and partial characterization*

- of Bacillus subtilis urate oxidase expressed in Escherichia coli*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010. 2010.
120. **Wu, X., C.C. Lee, D.M. Muzny, and C.T. Caskey**, *Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. 86(23): p. 9412-9416.
  121. **Beedkar, S.D., C. Khobragade, R.G. Bodade, and A.S. Vinchurkar**, *Comparative structural modeling and docking studies of uricase: Possible implication in enzyme supplementation therapy for hyperuricemic disorders*. Computers in Biology and Medicine, 2012. 42(6): p. 657-666.
  122. **Jun, H.-k., T.-S. Kim, and T. Sakai**, *Purification and characterization of extracellular adenosine deaminase from a Streptomyces sp.* Journal of fermentation and bioengineering, 1991. 71(1): p. 6-11.
  123. **Pornbanlualap, S. and P. Chalopagorn**, *Adenosine deaminase from Streptomyces coelicolor: Recombinant expression, purification and characterization*. Protein Expression and Purification, 2011. 78(2): p. 167-173.
  124. **Hillerich, B. and J. Westpheling**, *A new TetR family transcriptional regulator required for morphogenesis in Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 2008. 190(1): p. 61-67.
  125. **Elzainy, T. and Z. El-Awamry**, *Utilization and Degradation of Xanthine by Streptomyces viridiviolaceus*. Zentralblatt für Mikrobiologie, 1982. 137(2): p. 133-137.
  126. **Hanahan, D.**, *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. 166(4): p. 557-580.
  127. **Paget, M.S., E. Leibovitz, and M.J. Buttner**, *A putative two-component signal transduction system regulates  $\sigma E$ , a sigma factor required for normal cell wall integrity in Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Mol Microbiol, 1999. 33(1): p. 97-107.
  128. **Studier, F.W. and B.A. Moffatt**, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. 189(1): p. 113-130.
  129. **Kieser, T., M. Bibb, M. Buttner, K. Chate, and D. Hopwood**, *Practical Streptomyces Genetics (The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom)*. 2000.
  130. **Redenbach, M., H.M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, and D. Hopwood**, *A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb Streptomyces coelicolor A3 (2) chromosome*. Mol Microbiol, 1996. 21(1): p. 77-96.
  131. **Bierman, M., R. Logan, K. O'brien, E. Seno, R. Nagaraja Rao, and B. Schoner**, *Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp.* Gene, 1992. 116(1): p. 43-49.

132. **Gregory, M.A., R. Till, and M.C. Smith**, *Integration site for Streptomyces phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors*. J Bacteriol, 2003. 185(17): p. 5320-3.
133. **Sambrook, J., E.F.Fritsch, and T.Maniatis**, *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed*1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
134. **Mulrooney, S.B. and R.P. Hausinger**, *Metal ion dependence of recombinant Escherichia coli allantoinase*. J Bacteriol, 2003. 185(1): p. 126-34.
135. **Jones, G.H., M.S. Paget, L. Chamberlin, and M.J. Buttner**, *Sigma-E is required for the production of the antibiotic actinomycin in Streptomyces antibioticus*. Mol Microbiol, 1997. 23(1): p. 169-178.
136. **Herron, P.R., G. Hughes, G. Chandra, S. Fielding, and P.J. Dyson**, *Transposon Express, a software application to report the identity of insertions obtained by comprehensive transposon mutagenesis of sequenced genomes: analysis of the preference for in vitro Tn5 transposition into GC-rich DNA*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(14): p. e113-e113.
137. **Datsenko, K.A. and B.L. Wanner**, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. 97(12): p. 6640-6645.
138. **Bystrykh, L.V., M.A. Fernández-Moreno, J.K. Herrema, F. Malpartida, D.A. Hopwood, and L. Dijkhuizen**, *Production of actinorhodin-related "blue pigments" by Streptomyces coelicolor A3 (2)*. J Bacteriol, 1996. 178(8): p. 2238-2244.
139. **Bradford, M.M.**, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. 72(1): p. 248-254.
140. **Laemmli, U.K.**, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-685.
141. **Burnette, W.N.**, *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal.Biochem., 1981. 112(2): p. 195-203.
142. **González-Cerón, G., P. Licona, and L. Servín-González**, *Modified xylE and xylTE reporter genes for use in Streptomyces: analysis of the effect of xylT*. FEMS Microbiol Lett, 2001. 196(2): p. 229-234.
143. **Takada, Y. and T. Noguchi**, *The degradation of urate in liver peroxisomes. Association of allantoinase with allantoinase in amphibian liver but not in fish and invertebrate liver*. J Biol Chem, 1983. 258(8): p. 4762-4.

144. **Shilov, I.V., S.L. Seymour, A.A. Patel, A. Loboda, W.H. Tang, S.P. Keating, C.L. Hunter, L.M. Nuwaysir, and D.A. Schaeffer**, *The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. 6(9): p. 1638-55.
145. **Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman**, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(17): p. 3389-3402.
146. **Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson**, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(22): p. 4673-4680.
147. **Bailey, T.L., N. Williams, C. Misleh, and W.W. Li**, *MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs*. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(suppl 2): p. W369-W373.
148. **Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J.A. Leunissen**, *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3*. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(suppl 2): p. W71-W74.
149. **Pfaffl, M.W.**, *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
150. **Lisec, J., N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, and A.R. Fernie**, *Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants*. *Nature Protocols*, 2006. 1(1): p. 387-396.
151. **Loke, P. and T.S. Sim**, *Molecular cloning, heterologous expression, and functional characterisation of a malate synthase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2)*. *Can J Microbiol*, 2000. 46(8): p. 764-9.
152. **Njau, R.K., C.A. Herndon, and J.W. Hawes**, *Novel beta -hydroxyacid dehydrogenases in *Escherichia coli* and *Haemophilus influenzae**. *J Biol Chem*, 2000. 275(49): p. 38780-6.
153. **Ashiuchi, M. and H. Misono**, *Biochemical evidence that *Escherichia coli* hyi (orf b0508, gip) gene encodes hydroxypyruvate isomerase*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1435(1-2): p. 153-9.
154. **Gupta, N.K. and B. Vennesland**, *Glyoxylate Carboligase of *Escherichia Coli*: A Flavoprotein*. *J Biol Chem*, 1964. 239: p. 3787-9.
155. **Loewen, P.C. and J. Switala**, *Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12*. *Biochem Cell Biol*, 1986. 64(7): p. 638-46.
156. **Trijbels, F. and G.D. Vogels**, *Allantoicase and ureidoglycolase in *Pseudomonas* and *Penicillium* species*. *Biochim Biophys Acta*, 1966. 118(2): p. 387-95.

157. **Molina, I., M.T. Pellicer, J. Badia, J. Aguilar, and L. Baldoma**, *Molecular characterization of Escherichia coli malate synthase G. Differentiation with the malate synthase A isoenzyme*. Eur J Biochem, 1994. 224(2): p. 541-8.
158. **McIninch, J.K., J.D. McIninch, and S.W. May**, *Catalysis, stereochemistry, and inhibition of ureidoglycolate lyase*. J Biol Chem, 2003. 278(50): p. 50091-100.
159. **Kronmeyer, W., N. Peekhaus, R. Krämer, H. Sahm, and L. Eggeling**, *Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol, 1995. 177(5): p. 1152-1158.
160. **Ho, Y.-Y., H.-C. Hsieh, and C.-Y. Huang**, *Biochemical characterization of allantoinase from Escherichia coli BL21*. The Protein Journal, 2011. 30(6): p. 384-394.
161. **Mulrooney, S.B. and R.P. Hausinger**, *Metal ion dependence of recombinant Escherichia coli allantoinase*. J Bacteriol, 2003. 185(1): p. 126-134.
162. **Buckholz, R.G. and T.G. Cooper**, *The allantoinase (DAL1) gene of Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1991. 7(9): p. 913-923.
163. **Martínez-Gómez, A.I., P. Soriano-Maldonado, M. Andújar-Sánchez, J.M. Clemente-Jiménez, F. Rodríguez-Vico, J.L. Neira, F.J. Las Heras-Vázquez, and S. Martínez-Rodríguez**, *Biochemical and mutational studies of allantoinase from Bacillus licheniformis CECT 20T*. Biochimie, 2013.
164. **Yang, J. and K.-H. Han**, *Functional characterization of allantoinase genes from Arabidopsis and a nonureide-type legume black locust*. Plant physiology, 2004. 134(3): p. 1039-1049.
165. **Mobley, H., M.D. Island, and R.P. Hausinger**, *Molecular biology of microbial ureases*. Microbiol Rev, 1995. 59(3): p. 451-480.
166. **Kim, G.J., D.E. Lee, and H.-S. Kim**, *Functional expression and characterization of the two cyclic amidohydrolase enzymes, allantoinase and a novel phenylhydantoinase, from Escherichia coli*. J Bacteriol, 2000. 182(24): p. 7021-7028.
167. **Raymond, S., A. Tocilj, E. Ajamian, Y. Li, M.N. Hung, A. Matte, and M. Cygler**, *Crystal structure of ureidoglycolate hydrolase (AllA) from Escherichia coli O157: H7*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2005. 61(2): p. 454-459.
168. **McIninch, J.K., J.D. McIninch, and S.W. May**, *Catalysis, stereochemistry, and inhibition of ureidoglycolate lyase*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(50): p. 50091-50100.
169. **Yoo, H.-S., F.S. Genbauffe, and T.G. Cooper**, *Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 1985. 5(9): p. 2279-2288.

170. **Loke, P., L. Goh, B.S. Soh, P. Yeow, and T. Sim**, *Purification and characterization of recombinant malate synthase enzymes from Streptomyces coelicolor A3 (2) and S. clavuligerus NRRL3585*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002. 28(4): p. 239-243.
171. **Gupta, N.K. and B. Vennesland**, *Glyoxylate carboligase of Escherichia coli: a flavoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 1964. 239(11): p. 3787-3789.
172. **Ashiuchi, M. and H. Misono**, *Biochemical evidence that Escherichia coli hyi (orf b0508, gip) gene encodes hydroxypyruvate isomerase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999. 1435(1): p. 153-159.
173. **Cruz-Ramos, H., P. Glaser, L. Wray, and S.H. Fisher**, *The Bacillus subtilis ureABC operon*. J Bacteriol, 1997. 179(10): p. 3371-3373.
174. **Bishop, A., S. Fielding, P. Dyson, and P. Herron**, *Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production*. Genome research, 2004. 14(5): p. 893-900.
175. **Kim, G. and H. Kim**, *Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring*. Biochem. J, 1998. 330: p. 295-302.
176. **Seibert, C.M. and F.M. Raushel**, *Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily*. Biochemistry, 2005. 44(17): p. 6383-6391.
177. **Thoden, J.B., G.N. Phillips, T.M. Neal, F.M. Raushel, and H.M. Holden**, *Molecular structure of dihydroorotase: a paradigm for catalysis through the use of a binuclear metal center*. Biochemistry, 2001. 40(24): p. 6989-6997.
178. **Abendroth, J., K. Niefind, and D. Schomburg**, *X-ray Structure of a Dihydropyrimidinase from Thermus sp. at 1.3 Å Resolution*. J Mol Biol, 2002. 320(1): p. 143-156.
179. **Cheon, Y.-H., H.-S. Kim, K.-H. Han, J. Abendroth, K. Niefind, D. Schomburg, J. Wang, and Y. Kim**, *Crystal structure of D-hydantoinase from Bacillus stearothermophilus: insight into the stereochemistry of enantioselectivity*. Biochemistry, 2002. 41(30): p. 9410-9417.
180. **Vigetti, D., G. Binelli, C. Monetti, M. Prati, G. Bernardini, and R. Gornati**, *Selective pressure on the allantoinase gene during vertebrate evolution*. Journal of molecular evolution, 2003. 57(6): p. 650-658.
181. **Agarwal, R., S.K. Burley, and S. Swaminathan**, *Structural Analysis of a Ternary Complex of Allantoate Amidohydrolase from Escherichia coli Reveals its Mechanics*. J Mol Biol, 2007. 368(2): p. 450-463.

182. **Xu, Z., F.E. de Windt, and C. van der Drift**, *Purification and Characterization of Allantoate Amidohydrolase from Bacillus fastidiosus*. Archives of biochemistry and biophysics, 1995. 324(1): p. 99-104.
183. **Piedras, P., A. Munoz, M. Aguilar, and M. Pineda**, *Allantoate amidinohydrolase (Allantoicase) from Chlamydomonas reinhardtii: its purification and catalytic and molecular characterization*. Arch Biochem Biophys, 2000. 378(2): p. 340-8.
184. **Osipiuk, J., M. Zhou, S. Moy, F. Collart, and A. Joachimiak**, *X-Ray crystal structure of GarR—tartronate semialdehyde reductase from Salmonella typhimurium*. J Struct Funct Genomics, 2009. 10(3): p. 249-253.
185. **De Windt, F. and C. Van der Drift**, *Purification and some properties of hydroxypyruvate isomerase of Bacillus fastidiosus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1980. 613(2): p. 556-562.
186. **Ramazzina, I., L. Cendron, C. Folli, R. Berni, D. Monteverdi, G. Zanotti, and R. Percudani**, *Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases*. J Biol Chem, 2008. 283(34): p. 23295-304.
187. **Winkler, R.G., D.G. Blevins, and D.D. Randall**, *Ureide catabolism in soybeans III. Ureidoglycolate amidohydrolase and allantoate amidohydrolase are activities of an allantoate degrading enzyme complex*. Plant physiology, 1988. 86(4): p. 1084-1088.
188. **Werner, A.K., T. Romeis, and C.-P. Witte**, *Ureide catabolism in Arabidopsis thaliana and Escherichia coli*. Nature chemical biology, 2009. 6(1): p. 19-21.
189. **Molina, I., M.T. Pellicer, J. Badia, J. Aguilar, and L. Baldoma**, *Molecular characterization of Escherichia coli malate synthase G*. European Journal of Biochemistry, 1994. 224(2): p. 541-548.
190. **Maloy, S.R. and W.D. Nunn**, *Genetic regulation of the glyoxylate shunt in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1982. 149(1): p. 173-180.
191. **Cooper, T., V. Chisholm, H. Cho, and H.-S. Yoo**, *Allantoin transport in Saccharomyces cerevisiae is regulated by two induction systems*. J Bacteriol, 1987. 169(10): p. 4660-4667.
192. **MacAlister, C.J.**, *The Action Of Symphytum Officinale*. The British Medical Journal, 1912. 2(2699): p. 702-704.
193. **Robinson, W.**, *Stimulation of healing in non-healing wounds by allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1935. 17(2): p. 267-271.
194. **Grassi, R.F., U.M. Resende, W.d. Silva, M.L.R. Macedo, A.P. Butera, E.d.O. Tulli, F.P. Saffran, and J.M.d. Siqueira**, *Phytochemical study and evaluation of allelopathy in*

- Memora peregrina*, 'ciganinha', Bignoniaceae, an invading species in pastures in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Química Nova*, 2005. 28(2): p. 199-203.
195. **Mallik, M. and R.D. Williams**, *Allelopathic growth stimulation of plants and microorganisms*. *Allelopathy Journal*, 2005. 16(2): p. 175.
196. **Shen, Y.Q., J. Heim, N.A. Solomon, S. Wolfe, and A.L. Demain**, *Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1984. 37(5): p. 503-11.
197. **Doull, J.L. and L.C. Vining**, *Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990. 32(4): p. 449-54.
198. **Akopiants, K., G. Florova, C. Li, and K.A. Reynolds**, *Multiple pathways for acetate assimilation in *Streptomyces cinnamonensis**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006. 33(2): p. 141-150.
199. **Donald, L.J., D.J. Hosfield, S.L. Cuvelier, W. Ens, K.G. Standing, and H.W. Duckworth**, *Mass spectrometric study of the *Escherichia coli* repressor proteins, *IclR* and *GclR*, and their complexes with DNA*. *Protein Science*, 2001. 10(7): p. 1370-1380.
200. **Sunnarborg, A., D. Klumpp, T. Chung, and D. LaPorte**, *Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR**. *J Bacteriol*, 1990. 172(5): p. 2642-2649.
201. **Zhang, R.G., Y. Kim, T. Skarina, S. Beasley, R. Laskowski, C. Arrowsmith, A. Edwards, A. Joachimiak, and A. Savchenko**, *Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the *IclR* transcriptional factor family*. *J Biol Chem*, 2002. 277(21): p. 19183-90.
202. **Rintoul, M.R., E. Cusa, L. Baldoma, J. Badia, L. Reitzer, and J. Aguilar**, *Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor *AllR* and the activator *AllS**. *J Mol Biol*, 2002. 324(4): p. 599-610.
203. **Yang, K., C. Feng, H. Lip, W.R. Bruce, and P.J. O'Brien**, *Cytotoxic molecular mechanisms and cytoprotection by enzymic metabolism or autoxidation for glyceraldehyde, hydroxypyruvate and glycolaldehyde*. *Chem Biol Interact*, 2011. 191(1-3): p. 315-21.
204. **Hedrick, J.L. and H.J. Sallach**, *The metabolism of hydroxypyruvate. I. The nonenzymatic decarboxylation and autoxidation of hydroxypyruvate*. *J Biol Chem*, 1961. 236: p. 1867-71.
205. **Beites, T., S.D. Pires, C.L. Santos, H. Osorio, P. Moradas-Ferreira, and M.V. Mendes**, *Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in *S. natalensis* ATCC*

- 27448: modulation of pimaricin production by intracellular ROS. PLoS One, 2011. 6(11): p. e27472.
206. **Wei, Z.H., H. Wu, L. Bai, Z. Deng, and J.J. Zhong**, *Temperature shift-induced reactive oxygen species enhanced validamycin A production in fermentation of Streptomyces hygroscopicus 5008*. Bioprocess Biosyst Eng, 2012. 35(8): p. 1309-16.
207. **Wei, Z.H., L. Bai, Z. Deng, and J.J. Zhong**, *Enhanced production of validamycin A by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced reactive oxygen species in fermentation of Streptomyces hygroscopicus 5008*. Bioresour Technol, 2011. 102(2): p. 1783-7.
208. **Tiffert, Y., M. Franz-Wachtel, C. Fladerer, A. Nordheim, J. Reuther, W. Wohlleben, and Y. Mast**, *Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in Streptomyces coelicolor M145*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. 89(4): p. 1149-1159.
209. **Parada, J.L.**, *Growth inhibition of Streptomyces species by L-serine and its effect on tetracycline biosynthesis*. Appl Environ Microbiol, 1981. 41(2): p. 366-370.