



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DEL NODO FOSFOENOLPIRUVATO-PIRUVATO-
OXALOACETATO EN *STREPTOMYCES COELICOLOR* M145**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RENEÉ MARTHA LLAMAS RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CD. DE MÉXICO. NOVIEMBRE, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DEL NODO FOSFOENOLPIRUVATO-PIRUVATO-
OXALOACETATO EN *STREPTOMYCES COELICOLOR* M145**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RENEÉ MARTHA LLAMAS RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. DE MÉXICO. NOVIEMBRE, 2018



OFICIO CPCB/1039/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de agosto del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LLAMAS RAMÍREZ RENEE MARTHA** con número de cuenta **9309208-9** con la tesis titulada **“Expresión de las enzimas del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor* M145”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO**:

Presidente: DR. WILHELM LUDWIG HANSBERG Y TORRES
Vocal: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Secretario: DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
Suplente: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
Suplente: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de octubre del 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a este proyecto mediante la beca número 609329.

A la Dirección de Asuntos del Personal Académico por el apoyo a través del proyecto PAPIIT-UNAM No. IN214116.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por abrirme las puertas y permitirme ser parte de la comunidad, así como por el apoyo otorgado mediante la beca complementaria.

A los miembros del comité tutor por guiarme con su experiencia y comentarios, por ayudarme a crecer como científico: Dra. María Elena Flores, Dra. Bertha González y Dr. Luis Servín.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Flores por enseñarme que es tan importante un buen trabajo en el laboratorio, como sustentar mis ideas y expresarlas claramente.

A la Dra. Bertha González por su disposición y su ejemplo.

Al Dr. Luis Servín por impulsarme a considerar distintas posibilidades y atreverme a proponer.

Al Dr. Wilhelm Hansberg, la Dra. Claudia Segal, la Dra. Laura Camarena y la Dra. Soledad Funes por la generosidad de compartirme su experiencia a través de observaciones y sugerencias que sin lugar a duda mejoraron mi trabajo.

A la Dra. Tóshiko Takahashi por la asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

Este trabajo está dedicado a las maravillosas mujeres de mi familia:

Mari Carmen, Daniela, Haydeé y Zara.

Son la fuerza que me impulsa.

ÍNDICE

RESUMEN	
1. ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVO GENERAL.....	3
3.1 Objetivos particulares.....	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Metabolismo del carbono.....	4
4.1.1 Glucólisis.....	4
4.1.2 Gluconeogénesis.....	5
4.1.3 Vía de las pentosas fosfato.....	6
4.1.4 Ciclo del ácido cítrico.....	6
4.1.5 Transporte y metabolismo de la glucosa en <i>Streptomyces coelicolor</i>	8
4.1.6 Transporte y metabolismo de la fructosa en <i>Streptomyces coelicolor</i>	9
4.1.7 Transporte y metabolismo de aminoácidos en <i>Streptomyces coelicolor</i>	10
4.2 El nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en bacterias aerobias.....	13
4.3 El nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
5. METODOLOGÍA.....	18
5.1 Microorganismos.....	18
5.2 Medios de cultivo.....	18
5.3 Preparación del inóculo.....	18
5.4 Cultivo.....	18
5.5 Cuantificación del crecimiento por proteína.....	19
5.6 Purificación de RNA.....	19
5.7 Oligonucleótidos.....	19
5.8 Elaboración de curvas estándar.....	20
5.9 Controles sin reverso transcripción (-RT).....	21
5.10 Reacciones de reverso transcripción (RT).....	22
5.11 PCR tiempo real para cuantificar los niveles de RNA mensajero de los genes de interés.....	22
6. RESULTADOS.....	24
6.1 Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> WT en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	24
6.2 Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	25
6.3 RNA total purificado de <i>S. coelicolor</i> WT y Δ - <i>mdh</i> crecidas en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	27
6.4 Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de <i>S. coelicolor</i> WT crecida en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	27

6.4.1	SCO3127: Gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	27
6.4.2	SCO4979: Gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxinasa.....	29
6.4.3	SCO0546: Gen que codifica para la piruvato carboxilasa.....	30
6.4.4	SCO2014: Gen que codifica para la piruvato cinasa.....	31
6.4.5	SCO0208: Gen que codifica para la piruvato fosfato dicinasa.....	32
6.4.6	SCO5896: Gen que codifica para la enzima utilizadora de fosfoenolpiruvato.....	33
6.4.7	SCO2951: Gen que codifica para la enzima málica NAD ⁺ dependiente.....	34
6.4.8	6.4.8 SCO5261: Gen que codifica para la enzima málica NADP ⁺ dependiente...	35
6.5	Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> crecida en medio mínimo con glucosa.....	36
6.6	Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato piruvato-oxaloacetato de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> crecida en medio mínimo con fructosa.....	42
6.7	Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato piruvato-oxalacetato de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> , crecida en medio mínimo con casaminoácidos.....	47
7.	DISCUSIÓN.....	53
7.1	Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de <i>S. coelicolor</i> WT en medio mínimo.....	53
7.2	Efecto de la fuente de carbono en los niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de <i>S. coelicolor</i> WT.....	54
7.3	Efecto de la delección del gen <i>mdh</i> en el crecimiento de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	65
7.4	Efecto de la delección del gen <i>mdh</i> en los niveles de RNA mensajero, de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de <i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i> , crecida en medio mínimo con distintas fuentes de carbono.....	68
8.	CONCLUSIONES.....	80
9.	LITERATURA CITADA.....	81
	ANEXO 1.....	84

RESUMEN

En bacterias aerobias, el nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato es un punto de distribución entre las vías principales del metabolismo central del carbono, por lo que ha sido estudiado en organismos como *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum* con el fin de desarrollar estrategias de ingeniería metabólica que mejoren la producción de metabolitos secundarios de interés comercial. Como resultado de dichos estudios se sabe que las enzimas que lo constituyen, así como su actividad, varían entre los distintos organismos y condiciones de cultivo. En *Streptomyces* la información disponible se limita a algunas enzimas y la mayoría de ellas siguen siendo consideradas probables. En el presente estudio definimos a las enzimas que podrían formar parte del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor* utilizando la información disponible de la anotación del genoma. Además, con el fin de determinar si los genes seleccionados se expresan y en qué condiciones lo hacen, crecimos a *S. coelicolor* M145 y a una mutante carente del gen de la malato deshidrogenasa, en medio mínimo utilizando tres condiciones: dos con fuente de carbono glucolítica, y una con fuente de carbono gluconeogénica. Cuantificamos los niveles de RNA mensajero de los genes de interés en las distintas fases del crecimiento. Los resultados obtenidos muestran que los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato se expresan de manera diferente en *S. coelicolor* a en las distintas fases del crecimiento y que las fuentes de carbono utilizadas también tienen un efecto diferencial en los niveles de transcrito.

1. ABSTRACT

In aerobic bacteria, the phosphoenolpyruvate-pyruvate-oxaloacetate node is a distribution point among the main pathways of the central carbon metabolism, for this reason it has been studied in organisms such as *Escherichia coli* or *Corynebacterium glutamicum* to develop metabolic engineering strategies that improve the production of secondary metabolites of commercial interest. As result of these studies, it is known that the enzymes that constitute it, as well as its activity, vary among the different organism and culture conditions. In *Streptomyces* the available information is limited to few enzymes, and the rest of them are still considered putative. In the present study we defined the enzymes that could be part of the *Streptomyces coelicolor* phosphoenolpyruvate-pyruvate-oxaloacetate node using the information available from the genome annotation. In addition, to define if the selected genes are expressed and under what conditions they do, we grew *S. coelicolor* M145 and a *mdh* deleted mutant, malate dehydrogenase coding gene, in minimal medium using three carbon sources, two glycolytic and one gluconeogenic. We quantify the mRNA levels for these genes of interest throughout growth. The results obtained show that the phosphoenolpyruvate-pyruvate-oxaloacetate node genes are differentially expressed in *S. coelicolor* throughout growth and that carbon sources also have a differential effect on transcript levels.

2. INTRODUCCIÓN

Los estreptomicetos son bacterias aerobias de gran interés biotecnológico debido a que producen una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica, por ejemplo: antibióticos como la estreptomicina o antitumorales como la doxorubicina ¹. Se han realizado numerosos estudios para conocer las vías de síntesis de dichos metabolitos y con ello diseñar estrategias dirigidas a mejorar los procesos de producción ². Sin embargo, los precursores para estos compuestos son generados por el metabolismo primario del que se conoce muy poco.

Como parte del metabolismo del carbono, el nodo fosfoenolpiruvato (PEP)-piruvato-oxaloacetato ha sido estudiado en bacterias aerobias con el fin de identificar blancos metabólicos útiles para el diseño de estrategias de ingeniería metabólica^{2,3}. En los distintos estudios se ha destacado la importancia de las enzimas de este nodo como punto de distribución del flujo del carbono, entre las distintas vías centrales del metabolismo. Se sabe que las enzimas que lo constituyen varían entre los organismos y que la actividad de las mismas depende de las condiciones de cultivo⁴.

La información disponible en *Streptomyces* se limita a algunas enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato. Por esta razón seleccionamos un grupo de genes a partir de la información disponible del genoma (KEGG, entrada: [sco00620](#)) y encontramos que la mayoría de ellos codifica para enzimas que siguen siendo consideradas probables, es decir, que no hay evidencia experimental que confirme dicha actividad.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor*.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Cuantificar los niveles de expresión de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor* WT, crecida en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono.

Cuantificar los niveles de expresión de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor* Δ -*mdh*, crecida en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono.

4. ANTECEDENTES

4.1 Metabolismo del carbono en *Streptomyces*

El metabolismo central del carbono en *Streptomyces* está constituido por diversas vías, entre las que se incluyen: la glucólisis, la gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico^{5,6}.

4.1.1 Glucólisis

A través de la glucólisis, la célula obtiene energía en una serie de reacciones que inician con una molécula de glucosa y terminan con la formación de dos moléculas de piruvato (Figura 1). En el primer paso, la glucosa es fosforilada por acción de la glucosa cinasa, dando lugar a la glucosa-6-fosfato. Esta reacción forma parte del sistema de transporte de la glucosa al interior de la célula en estreptomicetos. La siguiente reacción de la glucólisis, es la isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato, catalizada por la fosfoglucosa isomerasa. La fructosa 6-fosfato es fosforilada a fructosa 1, 6-bifosfato, en una reacción catalizada por la fosofructo cinasa^{7,8}.

A continuación, la fructosa 1,6-bifosfato es hidrolizada en gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato en una reacción de condensación, catalizada por la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa. La dihidroxiacetona fosfato es convertida también en gliceraldehído 3-fosfato, pero en este caso a través de una reacción de isomerización catalizada por la triosa fosfato isomerasa. El gliceraldehído 3-fosfato es oxidado y fosforilado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, dando lugar a 1,3-bifosfoglicerato. Este compuesto es transformado en 3-fosfoglicerato, cuando la fosfoglicerato cinasa transfiere uno de los grupos fosforilo a una molécula de ADP, dando lugar a la formación de un ATP^{7,8}.

El 3-fosfoglicerato es transformado en 2-fosfoglicerato por la fosfoglicerato mutasa, en una reacción de isomerización. El 2-fosfoglicerato es deshidratado por acción de la enolasa para dar lugar al fosfoenolpiruvato. Finalmente, el grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato es transferido a una molécula de ADP, por acción de la piruvato cinasa, dando lugar a piruvato y ATP. En el balance final, a través de la glucólisis, por cada molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de ATP (energía), dos de NADH (poder reductor) y dos de piruvato^{7,8}.

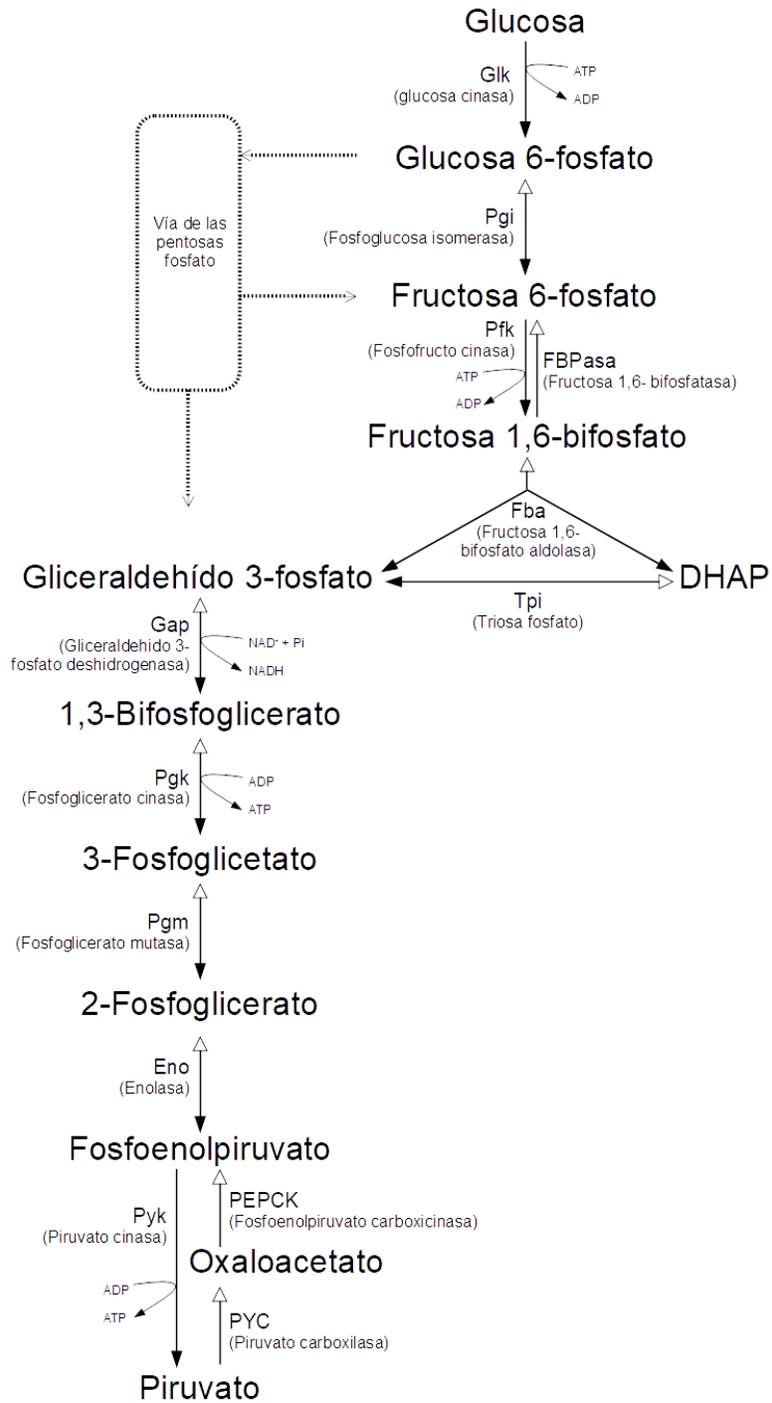


Figura 1. Glucólisis (▼) y gluconeogénesis (Δ), además se señalan los compuestos que las conectan con la vía de las pentosas fosfato^{5,8,9}. Ver detalles en el texto.

4.1.2 Gluconeogénesis

En general, la gluconeogénesis es el proceso opuesto a la glucólisis, con la cual la célula puede generar glucosa a partir de piruvato y requiere un aporte de ATP (Figura 1).

La mayoría de las enzimas de la glucólisis pueden catalizar las reacciones inversas, salvo por algunas excepciones. Estas excepciones son dos: el paso de piruvato a fosfoenolpiruvato, que puede involucrar dos reacciones en la gluconeogénesis; en la primera reacción el piruvato es carboxilado a oxaloacetato por la piruvato carboxilasa y en la segunda reacción el oxaloacetato es descarboxilado y fosforilado por la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, dando como resultado fosfoenolpiruvato. O bien, se puede llevar a cabo a través de una sola reacción, en el caso de *S. coelicolor* catalizada por la piruvato fosfato dicinasa⁹. La segunda excepción es la hidrólisis del grupo fosfato en el carbono 1 de la fructosa 1,6-bifosfato, dando como resultado fructosa 6-fosfato, esta reacción es catalizada por la fructosa 1,6-bifosfatasa. En *Streptomyces*, la gluconeogénesis concluye con la generación de glucosa 6-fosfato. Este compuesto puede servir como sustrato en otras vías metabólicas como la vía de las pentosas fosfato o las vías de síntesis de galactosa y glucógeno^{5,7-9}.

4.1.3 Vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato comparte metabolitos con la glucólisis y por tanto con la gluconeogénesis (Figura 1). Como su nombre lo indica, es una vía de síntesis de azúcares de cinco carbonos como la ribosa, molécula importante para la síntesis de nucleótidos. Durante mucho tiempo se consideró que la actividad de esta vía estaba asociada con la fase de transición hacia la etapa estacionaria y el metabolismo secundario¹⁰. Sin embargo, más recientemente se ha observado que, un incremento en la tasa de crecimiento se acompaña con un incremento en el flujo del carbono a través de esta vía en *Streptomyces lividans* y *Streptomyces coelicolor*, creciendo con glucosa como fuente de carbono⁵.

4.1.4 Ciclo del ácido cítrico

El ciclo del ácido cítrico, o de los ácidos tricarbóxicos, es una vía de degradación de compuestos que permite a la célula generar energía y poder reductor, además de proporcionar precursores para las vías de síntesis de otros compuestos (Figura 2). En general, inicia con una reacción de condensación entre el oxaloacetato y el acetil-CoA. En ésta, la citrato sintasa transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA al oxaloacetato, dando como resultado citrato. En la siguiente reacción, que es reversible, el citrato se transforma en isocitrato por acción de la aconitasa y se forma *cis*-aconitato como intermediario. Posteriormente, el isocitrato es oxidado a 2-oxoglutarato, en la primera reacción de

descarboxilación del ciclo, catalizada por la isocitrato deshidrogenasa y reduciendo una molécula de NADP^+ en NADPH e H^+ ^{7,8,11}.

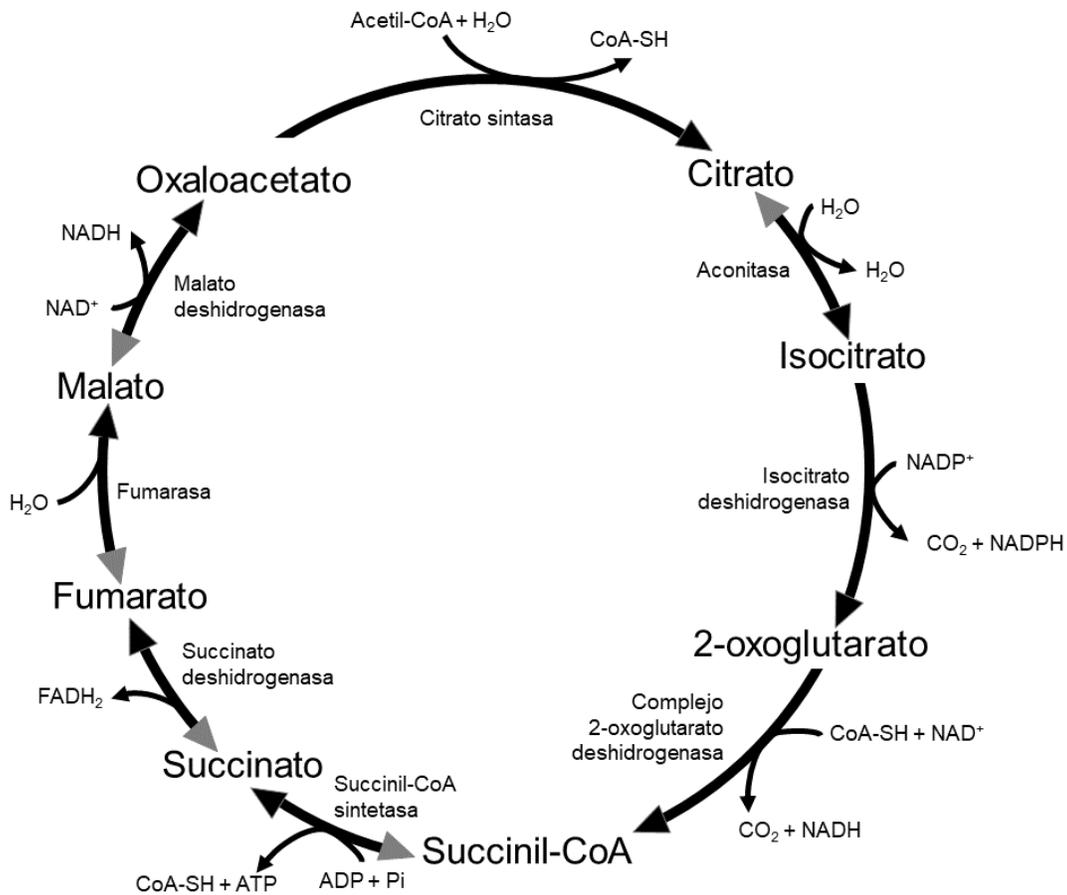


Figura 2. Ciclo del ácido cítrico con los cofactores de las enzimas de *Streptomyces coelicolor*^{6,8,12}. Las flechas negras indican la dirección en que se llevan a cabo las reacciones, mientras que las reacciones que son reversibles se señalan con flechas grises. Ver detalles en el texto.

En la segunda reacción de descarboxilación del ciclo, catalizada en este caso por la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, el 2-oxoglutarato es transformado en succinil-CoA, con la reducción de una molécula de NAD^+ a NADH e H^+ . El succinil-CoA es transformado a succinato; la energía liberada por la hidrólisis catalizada por la succinil-CoA sintetasa es utilizada para generar una molécula de ATP. Esta reacción también es reversible. A continuación, la succinato deshidrogenasa, en una reacción reversible, transforma al succinato en fumarato y se genera una molécula de FADH_2 . La fumarasa hidrata reversiblemente al fumarato y se transforma en malato. Finalmente, la malato deshidrogenasa oxida al malato para generar oxaloacetato. En esta reacción se reduce una

molécula de NAD⁺ en NADH e H⁺, como muchas de las reacciones del ciclo, ésta también es reversible^{6,8,12}.

4.1.5 Transporte y metabolismo de la glucosa en *Streptomyces coelicolor*

En su medio ambiente, los estreptomicetos utilizan una variedad de compuestos como nutrientes y no los consumen al mismo tiempo. El proceso que permite la asimilación preferente de algunos compuestos sobre otros se conoce como represión catabólica por carbono y puede ser inducido con fuentes de carbono como la glucosa. Ésta es la fuente de carbono preferente, no sólo en *Streptomyces* sino en una gran cantidad de bacterias. En dicho proceso, la glucosa causa la represión de genes relacionados con el consumo y la degradación de otras fuentes de carbono, como la fructosa¹⁰. El mecanismo específico en estreptomicetos, por el que se ejerce dicho control, no se conoce. Sin embargo, hay evidencia experimental de que algunas fuentes de carbono son consumidas preferentemente, como en el caso del ácido glutámico antes que la maltosa¹³.

En particular, los estreptomicetos cuentan con una gran variedad de enzimas hidrolíticas, como quitinasas y celulasas, que son secretadas al medio, lo que les permite degradar compuestos complejos en sus componentes, los cuales son transportados al interior de la célula^{10,14}. En *S. coelicolor* el complejo GlcP-Glk es el principal sistema de transporte de glucosa y el más estudiado. La GlcP es una permeasa de glucosa, codificada por dos genes distintos (*glcp1* y *glcp2*), pero cuya secuencia nucleotídica es prácticamente idéntica^{5,6,10}. La Glk codificada por el SCO2126 (*glkA*) es una glucosa cinasa que fosforila a la glucosa en el carbono seis, utilizando una molécula de ATP¹⁵. Una vez en el interior de la célula, la glucosa puede ser oxidada a través de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (Figura 1). Además de ser oxidada, la glucosa 6-fosfato puede ser utilizada como precursor para las vías de síntesis de galactosa y de glucógeno. Por todo lo anterior, la glucosa es una fuente de energía, poder reductor y como esqueleto de carbono útil para la síntesis de otros compuestos carbohidratos (aminoazúcares, por ejemplo) y no carbohidratos (como aquellos derivados del piruvato) para estos organismos^{5,6,10}.

Es importante mencionar que en el genoma de *S. coelicolor* se ha detectado seis genes probables de glucosa cinasa, que podrían ser dependientes de ATP y uno de fosfato glucocinasa que utiliza grupos polifosfato^{7,16}.

En lo que refiere a la vía Entner-Doudoroff, no se ha encontrado evidencia experimental de su actividad en *S. coelicolor*, como tampoco se ha identificado el gen que codifica para la 6-gluconato deshidratasa, que es la enzima exclusiva de esta vía^{5,7}.

4.1.6 Transporte y metabolismo de la fructosa en *Streptomyces coelicolor*

La fructosa en *S. coelicolor* es transportada al interior de la célula a través del sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato. Este sistema está constituido por tres componentes: la enzima EI (*ptsI*, SCO1391), la enzima Hpr (*ptsH*, SCO5841) y el complejo enzimático EII^{Fru} (*fruA*, SCO3196). Las dos primeras se encuentran en el citoplasma y pueden participar en el sistema de fosfotransferasa de otros compuestos, distintos al utilizado para el transporte de fructosa. El complejo EII^{Fru} está asociado con la membrana plasmática y es el único componente del sistema específico para la fructosa. Este sistema funciona a través de la transferencia secuencial de un grupo fosforilo entre los componentes del sistema (Figura 3)^{7,17,18}.

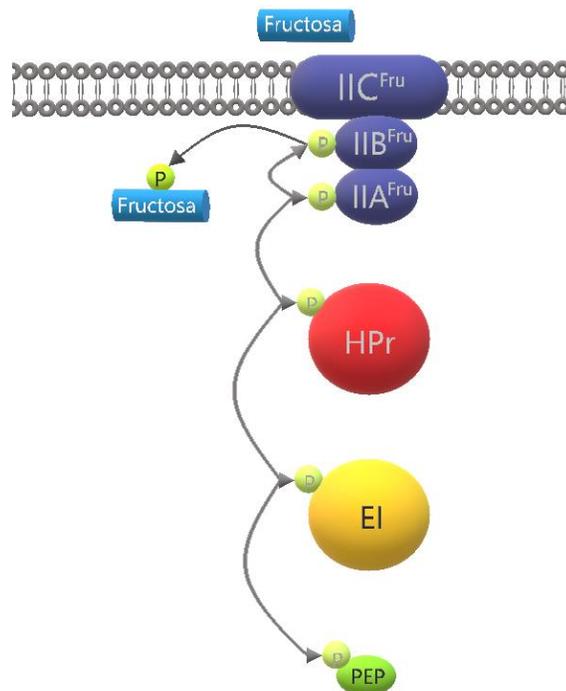


Figura 3. Sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato para el transporte de fructosa en *S. coelicolor*.

En el inicio de la reacción, el donador del grupo fosforilo es el fosfoenolpiruvato, que se transforma en piruvato y la EI es la primera enzima en ser fosforilada, que a su vez fosforila a la enzima Hpr. Finalmente, la Hpr fosforila el dominio IIA del complejo EII^{Fru} y el fosforilo es transferido de éste al dominio IIB, que es el que fosforila a la fructosa, que es translocada al interior de la célula por el dominio IIC, que está integrado en la membrana plasmática. La fructosa entra como fructosa 1-fosfato, que a su vez es fosforilada en el

carbono seis por la 1-fosfofructocinasa (SCO3197), dando como resultado fructosa 1,6-bisfosfato, que puede seguir hacia la glucólisis o la gluconeogénesis, dependiendo de las necesidades celulares^{7,17,18}.

4.1.7 Transporte y metabolismo de aminoácidos en *Streptomyces coelicolor*

Como ya mencionamos, los estreptomicetos pueden secretar al medio enzimas hidrolíticas que les permiten degradar macromoléculas. En este caso particular, pueden secretar proteasas capaces de degradar a las proteínas en pequeños oligopéptidos y aminoácidos. En distintos estudios se ha reportado en estreptomicetos la existencia de permeasas específicas para el transporte de aminoácidos. Por ejemplo, en *Streptomyces hydrogenans* se ha descrito la existencia de permeasas específicas para aminoácidos neutros, para aminoácidos básicos, para aminoácidos ácidos y una específica para arginina. En el caso de *Streptomyces clavuligerus*, las permeasas estudiadas fueron clasificadas como prolina-específicas y no-específicas. Una vez en el interior de la célula, los aminoácidos pueden ser utilizados directamente en la síntesis de proteínas, o como fuente de carbono y de nitrógeno, mientras que otros son útiles sólo como fuente de nitrógeno, lo que depende de la capacidad metabólica de cada especie, no solo por el transporte, sino por la disponibilidad de enzimas para catabolizarlos¹⁰.

Contrastan con lo anterior los resultados obtenidos al monitorear el consumo de aminoácidos de *S. lividans*. En dicho estudio se suplementó el medio con casaminoácidos y se dio seguimiento a la concentración de cada aminoácido en el medio de cultivo a lo largo del periodo de incubación. Es importante mencionar que los casaminoácidos son resultado de un proceso de hidrólisis química de la caseína que causa la destrucción del triptófano y de la cisteína, una disminución de serina y treonina, además de transformar a la asparagina en ácido aspártico y a la glutamina en ácido glutámico. Los resultados mostraron que *S. lividans* es capaz de consumir prácticamente todos los aminoácidos disponibles, con excepción de la alanina, que se incrementó con el tiempo. Además de ésta, fueron secretados al medio piruvato, lactato y succinato. Como en otros experimentos en los que se suplementa el medio con una mezcla de fuentes de carbono, en éste también se observaron distintas fases de crecimiento, una primera fase basada principalmente en glutamato y aspartato y una segunda fase basada en glucosa y amonio como principales fuentes de carbono y nitrógeno^{19,20}.

En el caso de *S. coelicolor*, de acuerdo con la información disponible del genoma, habría transportadores tipo ABC para el glutamato (*gluA-gluD*), la metionina (SCO1557,

SCO1558 y *metN*), la prolina (SCO1620, SCO1621, SCO4830-SCO4832), los aminoácidos de cadena ramificada (SCO0707-SCO0710, SCO2008-SCO2012 y SCO7181-7185) y para oligopéptidos (SCO5117-5121)^{7,14}. Además, se ha reportado que es capaz de crecer en medio mínimo suplementado con ácido glutámico y maltosa. La curva de crecimiento resultante mostró un crecimiento diáuxico. El ácido glutámico fue utilizado como fuente de carbono y nitrógeno durante la primera fase de crecimiento lineal y la maltosa y el amonio en la segunda fase¹³. En experimentos anteriores con *S. coelicolor*, en los que se suplementó el medio mínimo con ácido glutámico o asparagina como únicas fuentes de carbono y de nitrógeno, se observó que el máximo de biomasa obtenido con ácido glutámico fue similar a la condición control, en que el medio se suplementó, además de con ácido glutámico, con maltosa. Mientras que, en el caso de la asparagina, prácticamente no se observó crecimiento, lo que concuerda con lo reportado^{21,22}. Lo anterior sugiere que, el ácido glutámico es una fuente de carbono y de nitrógeno adecuada para el crecimiento de *S. coelicolor*, a diferencia de la asparagina, que no es adecuada para el crecimiento del organismo²¹.

Con base en la información disponible del genoma de *S. coelicolor*, se pudieron identificar los genes involucrados en las vías de síntesis y degradación de aminoácidos. En el caso particular de la alanina, están presentes en el genoma las vías entre este aminoácido y el piruvato, pero no así la vía que conecta a la alanina con el aspartato (metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato, número de acceso: [sco00250](#))⁷. En lo que respecta al catabolismo del glutamato, hay distintas vías. Puede ser utilizado como donador del grupo amino en reacciones de transaminación para generar otros aminoácidos como la glutamina. Además, el glutamato está conectado con el metabolismo de la arginina y de la prolina a través de una reacción de oxidación. Además, existe la posibilidad de que el esqueleto de carbono del glutamato entre al ciclo del ácido cítrico, en la forma de 2-oxoglutarato o de succinato, siguiendo alguna de las dos vías posibles. Una vía directa es la oxidación, catalizada por la glutamato deshidrogenasa, transformándose en 2-oxoglutarato. La otra, es a través de una descarboxilación catalizada por la glutamato descarboxilasa, lo que genera 4-aminobutirato, que requiere dos reacciones más para transformarse en succinato. Es importante destacar que la glutamato sintasa, además de catalizar reacciones de transaminación, participa en la asimilación de amonio. Esta enzima junto con la glutamina sintetasa y la glutamato deshidrogenasa, juegan un papel preponderante en el metabolismo del nitrógeno en *Streptomyces* (Figura 4)^{7,10,23}.

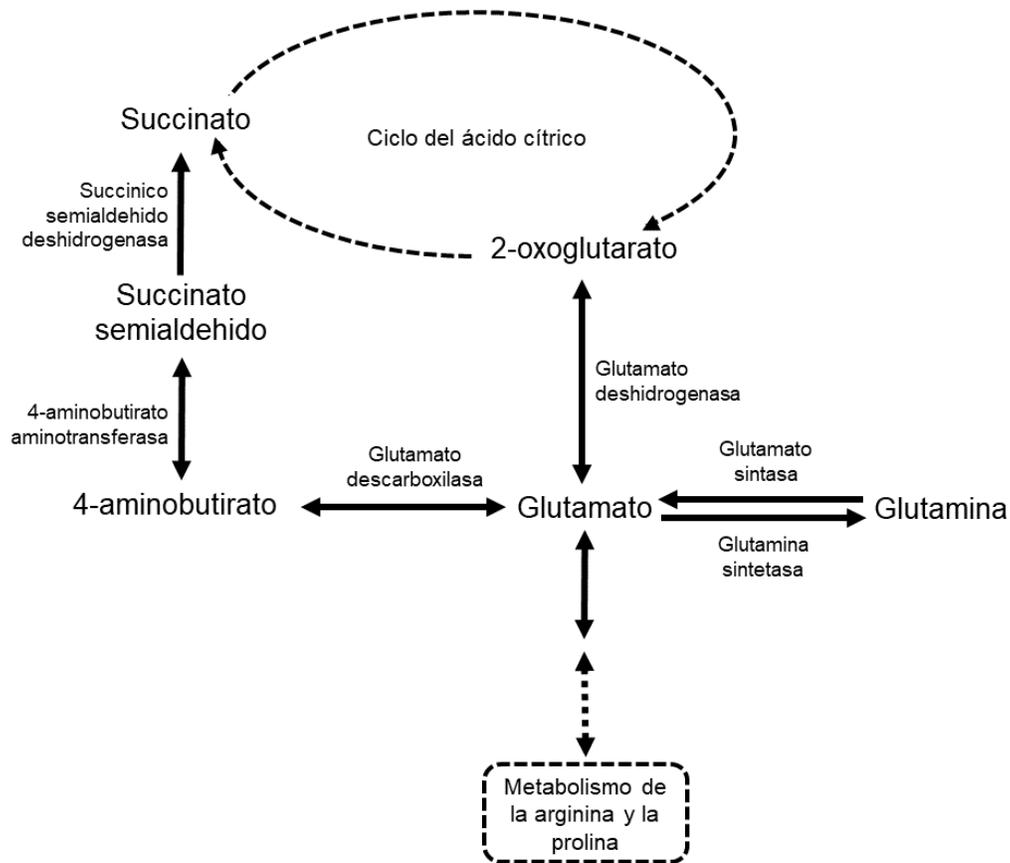


Figura 4. Metabolismo del glutamato en *S. coelicolor*. Elaborado con información de KEGG⁷.

Como en el caso del glutamato, el aspartato podría ser utilizado como donador del grupo amino en la síntesis de asparagina, en una reacción catalizada por la asparagina sintetasa. Además, en teoría también estaría conectado con el ciclo del ácido cítrico. Una posibilidad es a través de una reacción de descarboxilación catalizada por la aspartato oxidasa, dando como resultado oxaloacetato, y otra a través de dos vías distintas que generan en última instancia fumarato. Sin embargo, como ya se mencionó, la evidencia experimental sugiere que este aminoácido no es adecuado como única fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento del organismo, por lo que se ha propuesto que su principal contribución es como fuente de nitrógeno^{7,22}.

En términos bioquímicos, el glutamato, la glutamina, la alanina, el aspartato y la asparagina son considerados aminoácidos gluconeogénicos, ya que su desaminación permite que los esqueletos de carbono entren al ciclo del ácido cítrico o se transformen directamente en piruvato y a partir de este compuesto dar inicio a la gluconeogénesis⁸. Sin embargo, hay evidencia experimental que sugiere que en estreptomicetos sólo algunos de ellos pueden ser utilizados como fuente de carbono y que ello depende de cada especie.

Estos aminoácidos son: triptófano, treonina, histidina, lisina, prolina, arginina y glutamato^{10,21,22}.

4.2 El nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en bacterias aerobias

El nodo fosfoenolpiruvato PEP-piruvato-oxaloacetato ha sido estudiado en bacterias aerobias con el fin de identificar blancos metabólicos útiles para el diseño de estrategias de ingeniería metabólica^{2,3}. Cuando hablamos de un nodo metabólico, nos referimos a un compuesto en particular y a las reacciones enzimáticas que permiten conectar a éste con otros nodos, obteniendo así información sobre las vías para su síntesis y/o degradación, así como su papel en el resto del metabolismo²⁴. En varios estudios sobre el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato en bacterias, se ha destacado la importancia de estas enzimas como punto de distribución del flujo del carbono entre las distintas vías centrales del metabolismo. Se sabe que las enzimas que lo constituyen varían entre los organismos y que la actividad de las mismas depende de las condiciones de cultivo⁴.

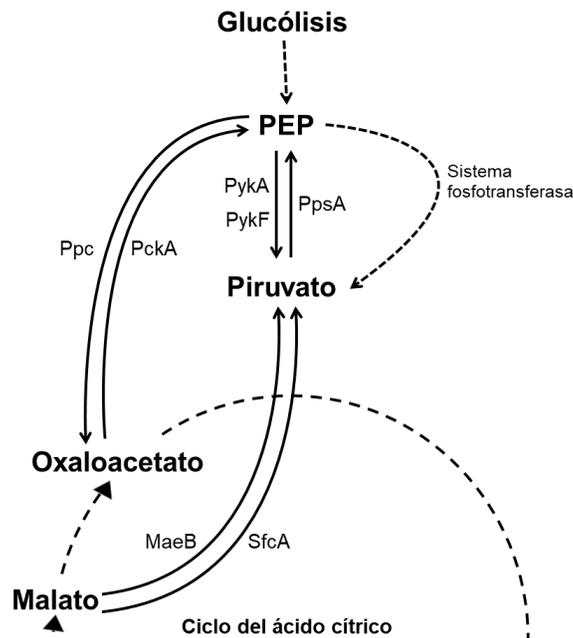


Figura 5. Las líneas continuas indican las enzimas en el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *E. coli*. Ppc: PEP carboxilasa, PckA: PEP carboxicinas, Pyk (A, F): piruvato cinasa, PpsA: PEP sintetasa, MaeB y SfcA: enzimas málicas. Las líneas discontinuas indican las vías que conectan con el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato.

En el caso de *Escherichia coli*, por ejemplo, como parte del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato hay diversas enzimas que catalizan reacciones en las que el piruvato es el producto final (Figura 5). Estas son: dos enzimas piruvato cinasa cuyo sustrato es el fosfoenolpiruvato, dos enzimas málicas que utilizan como sustrato al malato y finalmente el

sistema fosfotransferasa que utiliza fosfoenolpiruvato; cuando este compuesto dona su grupo fosforilo, se convierte en piruvato. A su vez, hay sólo dos reacciones que permiten la formación de fosfoenolpiruvato además de la vía glucolítica, éstas son catalizadas por la fosfoenolpiruvato sintetasa y la fosfoenolpiruvato carboxinasa, cuya actividad es modulada por la concentración de fosfoenolpiruvato y de oxaloacetato. La reacción inversa, que implica la carboxilación del fosfoenolpiruvato para generar el oxaloacetato, es catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa^{4,25,26}.

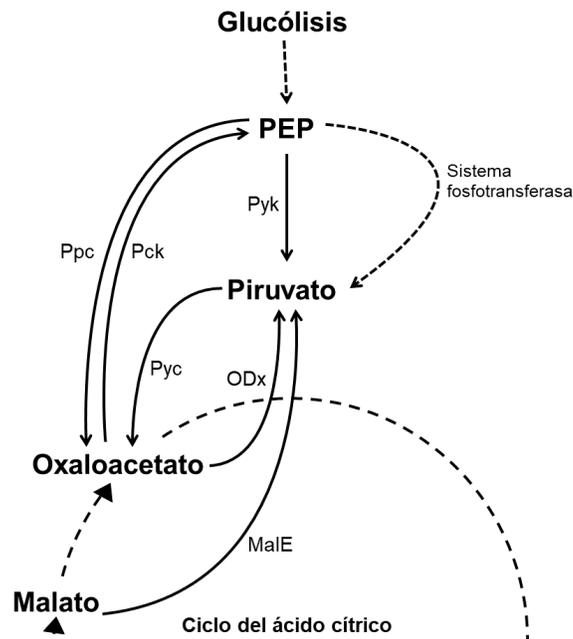


Figura 6. Las líneas continuas indican las enzimas en el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *C. glutamicum*. Ppc: PEP carboxilasa, Pck: PEP carboxinasa, Pyk: piruvato cinasa, Pyc: piruvato carboxilasa, ODx: oxaloacetato descarboxilasa, MalE: enzima málica. Las líneas discontinuas indican las vías que conectan con el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato.

En *Corynebacterium glutamicum*, la formación de piruvato puede ser catalizada por distintas enzimas. La primera utiliza a la piruvato cinasa a partir del fosfoenolpiruvato, la segunda, por la enzima málica a partir del malato y la tercera en que el oxaloacetato es descarboxilado por acción de la oxaloacetato descarboxilasa, o bien a través de la reacción en que participa el sistema fosfotransferasa (Figura 6). Para la formación del fosfoenolpiruvato, la fosfoenolpiruvato carboxinasa, cuya actividad depende de la concentración de oxaloacetato, puede catalizar la descarboxilación de este último, además de la generación del fosfoenolpiruvato por la vía glucolítica. En este caso, como con *E. coli*, la reacción inversa en que el fosfoenolpiruvato es utilizado como sustrato en la generación de oxaloacetato es catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa, solo que es este caso el

oxaloacetato se puede formar también a partir de piruvato, en una reacción de carboxilación en la que participa la piruvato carboxilasa, cuya actividad también responde a la concentración del producto de la reacción^{4,27}.

En algunos estudios sobre la anaplerosis en estos dos organismos, se han observado flujos bidireccionales del carbono, que involucran a las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato. En *C. glutamicum* se ha sugerido que se podría tratar de un mecanismo de control del metabolismo, que permite mantener un balance entre las vías del catabolismo y del anabolismo^{27,28}, o bien para mantener el balance entre los suministros de fosfoenolpiruvato y oxaloacetato, como se ha sugerido con respecto a la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxinasas específicamente (sumada a su función anaplerótica), en el caso de *E. coli*²⁵.

4.3 El nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato en *Streptomyces coelicolor*

En *Streptomyces* la información disponible se limita a algunas enzimas. Por esta razón seleccionamos un grupo de genes a partir de la información disponible del genoma de *S. coelicolor* y encontramos que la mayoría de ellos codifica para enzimas que se consideran como probables, es decir, que no hay evidencia experimental que confirme dicha actividad^{7,18}. En el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* participarían ocho enzimas: la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la fosfoenolpiruvato carboxinasas, la piruvato carboxilasa, la piruvato cinasa, la piruvato fosfato dicinasa, la enzima utilizadora de fosfoenolpiruvato y dos enzimas málicas (Figura 7)⁷.

Entre las enzimas para las que hay información disponible, se ha reportado actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*, SCO3127) en extractos libres de células de *S. coelicolor* WT a 40 horas de incubación con glucosa como única fuente de carbono. Bramwell y colaboradores consideran que la actividad de las enzimas anapleróticas podría estar regulada por el cambio entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario. En dichos estudios se determinó que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa es dependiente de acetil Co-A²⁹. Por mucho tiempo, ésta ha sido considerada la única enzima anaplerótica activa durante el crecimiento de *S. coelicolor* en estas condiciones^{5,6}. Además de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), la fosfoenolpiruvato carboxinasas (SCO4979) y la piruvato carboxilasa (SCO0546) son consideradas enzimas gluconeogénicas, sin embargo solo se mencionan en algunos trabajos de proteómica o transcriptómica, sin que se ofrezca mayor detalle respecto de las condiciones en que los genes se expresan o sobre la actividad de las enzimas codificadas^{9,30}. Estas enzimas catalizarían el primer paso de la

gluconeogénesis en que el piruvato se transforma en fosfoenolpiruvato a través de un par de reacciones: una primera reacción de carboxilación catalizada por la piruvato carboxilasa y una segunda reacción de descarboxilación y fosforilación catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas^{5,7,8}.

Lo mismo ocurre con la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) y la enzima utilizadora de fosfoenolpiruvato (SCO5896), ya que tampoco se ha reportado información adicional^{9,30}. Ambas enzimas catalizarían la fosforilación del piruvato, posiblemente utilizando una molécula de ATP y fosfato inorgánico, para producir fosfoenolpiruvato. Dicha reacción en otros organismos, como *E. coli*, es catalizada por la fosfoenolpiruvato sintetasa y también es considerada una reacción gluconeogénica^{5,7,9,14,18}.

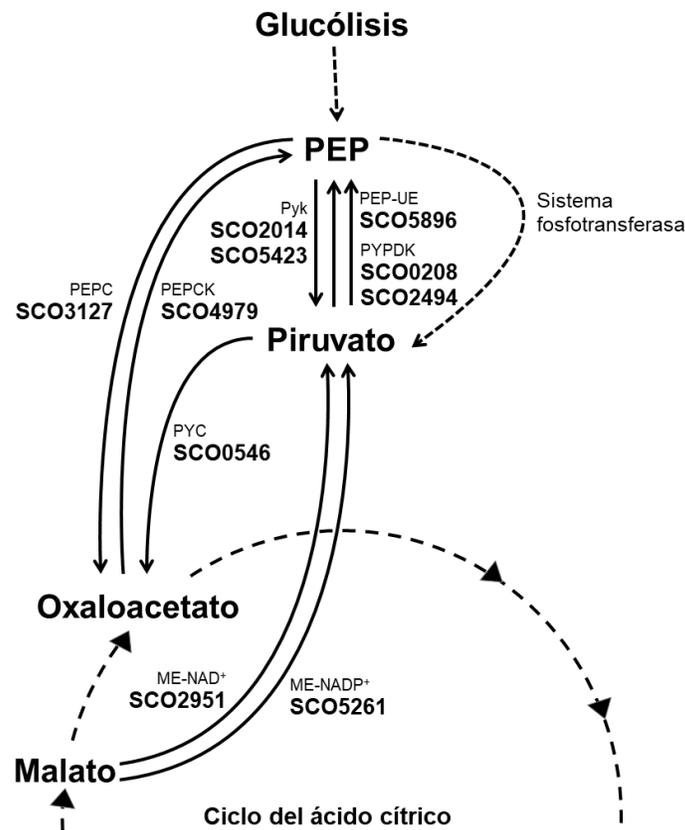


Figura 7. Las líneas continuas indican las enzimas en el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*. PEPC: PEP carboxilasa, PEPCK: PEP carboxicinasas, Pyk: piruvato cinasa, PEP-UE: enzima utilizadora de PEP, PYPDK: piruvato fosfato dicinasa, PYC: piruvato carboxilasa, ME-(NAD⁺ y NADP⁺): enzimas málicas. Las líneas discontinuas indican las vías que conectan con el nodo PEP-piruvato-oxaloacetato. Elaborado con datos obtenidos de KEGG⁷. Ver detalles en el texto.

Por su parte, Rodríguez y colaboradores caracterizaron las enzimas codificadas en el genoma de *S. coelicolor* por los genes SCO2951 y SCO5261 en experimentos de expresión heteróloga, utilizando a *E. coli* BL21(DE3) como cepa hospedera, y las definieron

como enzimas málicas -NAD⁺ dependiente y -NADP⁺ dependiente, respectivamente. En dichos estudios, únicamente se probaron NAD⁺ y NADP⁺ como cofactores para ambas enzimas. En el caso de la codificada por el gen SCO2951, sólo se observó actividad en presencia de NAD⁺, mientras que, en el caso de la enzima codificada por el gen SCO5261, se obtuvieron valores de actividad específica bajísimos en presencia de NAD⁺, mientras que la actividad en presencia de NADP⁺ fue 15 veces la observada para la enzima codificada por el SCO2951 en presencia de NAD⁺. No se incluyó información adicional que indique condiciones *in vivo* de expresión de dichos genes o de la actividad de las enzimas³¹.

Finalmente, la piruvato cinasa cataliza la última reacción de la glucólisis. En estudios recientes, se analizaron dos genes parálogos que codifican a la piruvato cinasa en *S. coelicolor*, el *pyk1* (SCO2014) y el *pyk2* (SCO5423). Ambas enzimas utilizan ADP como aceptor del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato, dando como resultado de la reacción una molécula de piruvato y una de ATP³². Además, se observó también en ambos casos, que el AMP funciona como efector positivo. Como resultado de dichos estudios, se consideró que la Pyk2 podría participar en las funciones de mantenimiento celular básicas ya que presenta una mayor afinidad por el fosfoenolpiruvato cuando las concentraciones intracelulares de AMP son bajas. Mientras que la Pyk1 se activa cuando aumenta la concentración de AMP, lo que en otros organismos como *E. coli*, es signo de escasez de nutrientes³².

En el presente estudio queremos determinar si los genes que codifican para las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato se expresan en *S. coelicolor* WT. Con el fin de asegurar la detección del RNA de los genes correspondientes, utilizamos tres fuentes de carbono y muestreamos en las distintas fases del crecimiento. Pensamos que será posible detectar el RNA mensajero de todos los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato durante el crecimiento de *S. coelicolor*, en las distintas condiciones, considerando que una mutante que carece de malato deshidrogenasa (Δ -*mdh*), que cataliza la última reacción del ciclo del ácido cítrico, crece con glucosa como única fuente de carbono. Esto sugiere que existen vías o reacciones alternas que permiten al organismo prescindir de la actividad de la malato deshidrogenasa. Las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato son las mejores candidatas.

La actividad de estas enzimas permitiría a la mutante Δ -*mdh* evitar la acumulación de malato, generar oxaloacetato y continuar con el ciclo del ácido cítrico, así como con el resto de las vías metabólicas necesarias para el crecimiento del organismo. Por lo anterior,

decidimos verificar si los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato se expresan en *S. coelicolor* Δ -*mdh*, al crecerla en las condiciones previamente descritas para la silvestre.

5. METODOLOGÍA

5.1 Microorganismos

Streptomyces coelicolor M145, carente de los plásmidos SCP1 y SCP2 y *Streptomyces coelicolor* Δ -*mdh*, carente del gen *mdh* (SCO4827) que codifica para la malato deshidrogenasa, aislada por la Dra. María Elena Flores Carrasco del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM¹².

5.2 Medios de cultivo

Medio MS: harina de soya 2%, manitol 2%, extracto de levadura 0.1% y agar 2%.

Medio LB (*Lysogenic Broth*): Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, pH 7.0.

Medio Mínimo (MM): MOPS 2%, PEG 8,000 5%, NaCl 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, ZnSO₄ 0.005%, FeSO₄ 0.002%, CaCl₂ 0.002%, MnCl₂ 0.001%, CoCl₂ 0.001%, pH 7.0.

Todos los medios de cultivo se esterizaron en autoclave por 30 minutos a 121 °C. En el caso del MM suplementado con distintas fuentes de carbono: la glucosa 1% y los casaminoácidos 1% se adicionaron junto con el resto de los compuestos antes de ajustar el pH. La fructosa 1% se preparó por separado, se ajustó el pH a 6.0 y se esterilizó por 20 min a 121 °C y se adicionó al medio justo antes de inocularlo.

5.3 Preparación del inóculo

Se sembró por estrías una caja de MS con esporas de *S. coelicolor* WT o Δ -*mdh* y se incubó a 29 °C por tres días. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente por cuatro días más. El total de las esporas del cultivo en una caja de MS se utilizó para inocular 200 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. El cultivo se incubó a 29 °C por 24 horas, con agitación rotatoria de 200 rpm.

Manteniendo condiciones estériles, se distribuyó el total del micelio del cultivo en medio LB en cuatro tubos y se colectó por centrifugación a 5,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se lavó un par de veces con agua bidestilada estéril, centrifugando en iguales condiciones. Se resuspendió el micelio de cada tubo en 10 mL de agua bidestilada y finalmente, se inoculó el MM utilizando un tubo por matraz Fernbach con 500 mL de MM.

5.4 Cultivo

S. coelicolor WT y Δ -*mdh* fueron crecidas en 500 mL de MM, con la fuente de carbono correspondiente, contenido en un matraz Fernbach siliconizado con Sigmacote (Sigma-Aldrich). Además, a cada matraz se le colocó un resorte de acero inoxidable para

obtener micelio disperso. Estos cultivos se incubaron a 29 °C a 200 rpm y se tomaron muestras para cuantificar el crecimiento y para la purificación de RNA.

5.5 Cuantificación del crecimiento por contenido de proteína

Se tomaron dos muestras de 3 mL por matraz a las 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El crecimiento se cuantificó con el método de Lowry de acuerdo con lo reportado por Flores y Sánchez³³. Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

5.6 Purificación de RNA

Se tomaron muestras de 10 a 40 mL de medio cada 12 horas hasta alcanzar 72 horas de incubación. El micelio se colectó por vacío utilizando una unidad de filtración fría y un filtro Whatman No. 4 de 5.5 cm de diámetro. El micelio obtenido se resuspendió en 200 a 400 µL de amortiguador Tris-HCl-EDTA (TE, 10 mM/1 mM, pH 8.0) por muestra, y cada muestra se sonicó por 10 segundos manteniéndolas en hielo. Posteriormente, las muestras se trataron con una solución de lisozima-amortiguador TE (5 mg/muestra) y se incubaron 10 minutos a 37 °C (condiciones previamente estandarizadas). Finalmente se continuó con la purificación del RNA utilizando el sistema MagJET RNA (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

El RNA obtenido se cuantificó por duplicado utilizando un espectrofotómetro (NANO-drop 1000/Thermo Scientific). Con base en los resultados de concentración, el RNA total se dividió en alícuotas de 10 µg y se almacenó a -70 °C. Posteriormente se trataron 10 µg de RNA por muestra con 9-12 unidades de DNasa (TURBO DNase, Ambion) de acuerdo a las indicaciones del proveedor, siguiendo el protocolo señalado como "riguroso". Después del tratamiento, el RNA se precipitó con el método de cloruro de litio³⁴.

Nuevamente, se tomaron alícuotas para cuantificar el RNA por espectrofotometría, así como verificar las relaciones de absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Con base en la cuantificación, se prepararon ocho alícuotas de 100 ng y una de 20 ng de RNA por muestra; salvo para el caso del RNA de *S. coelicolor* WT crecida en MM con casaminoácidos, para la que se prepararon doce alícuotas de 20 ng por muestra. Todas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.7 Oligonucleótidos

Tanto para estandarizar las condiciones de amplificación, como para obtener los estándares y cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés, se utilizaron los

oligonucleótidos que se describen en la Tabla 1. Para disolver los oligonucleótidos se adicionó amortiguador TE para obtener una concentración final de 500 mM. Se prepararon tres alícuotas de 5 µL, 500 µM, y seis alícuotas de 10 µL con una concentración de 50 µM. Todas se almacenaron a -22 °C hasta su uso.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para cuantificar el RNA mensajero de cada gen del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato en *S. coelicolor*.

Gene	Oligonucleótido	Temperatura de alineamiento	Producto de amplificación	Proveedor
SCO4979 sentido	AGGACCGGACCTTCATCTG	60 °C	163 pb	Invitrogen
SCO4979 anti-sentido	CAGAAGGGCAGACGTACAT			Invitrogen
SCO3127 sentido	CTCTCCAACCTCCATCCGGT	60 °C	168 pb	Invitrogen
SCO3127 anti-sentido	CTTGGTGTCTCCAGCTTCTG			Invitrogen
SCO5896 sentido	TCCTACCTGTTGGCCCAGT	60 °C	185 pb	Invitrogen
SCO5896 anti-sentido	TTCATCTGCGTCATCTCACG			Invitrogen
SCO2014 sentido	AAGAGCGCTACCACCGTGT	60 °C	152 pb	Invitrogen
SCO2014 anti-sentido	GACGGTGATGGTGAAGCTG			Invitrogen
SCO0546 sentido	ACTCGATGCTGGTCAAGCTC	62 °C	175 pb	Invitrogen
SCO0546 anti-sentido	ATGAACGAGGTGGTGACCC			Invitrogen
SCO0208 sentido	CGACATCGAGTTCACCATCG	62 °C	183 pb	T4 Oligo
SCO0208 anti-sentido	AAGCGCGGGAACATCAAC			Invitrogen
SCO2951 sentido	CATGACGACCCGTACGTT	60 °C	181 pb	Invitrogen
SCO2951 anti-sentido	CATCAACCTGGAGGACATCT			Invitrogen
SCO5261 sentido	ACGTCTTCATCGGCGTCTC	65 °C	185 pb	Sigma-Aldrich
SCO5261 anti-sentido	CAGCACGTTGTTGATCTGGTT			Sigma-Aldrich

5.8 Elaboración de curvas estándar

Para obtener los estándares de cada gen de interés para la cuantificación por PCR tiempo real, se realizaron reacciones de amplificación de acuerdo con las condiciones estandarizadas, utilizando el sistema DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), con 100 ng de DNA de *S. coelicolor* WT como molde, oligonucleótidos sentido y anti-sentido a una concentración final de 1 µM cada uno y 0.6 µL de DMSO, en un volumen final de 50 µL/reacción. Se utilizó el termociclador T100 (Bio-Rad) con el programa de amplificación que se muestra en la Tabla 2.

Para confirmar la obtención de una sola banda de tamaño esperado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris-borato-EDTA. Los productos de amplificación se purificaron por precipitación con acetato de sodio y etanol³⁴. El DNA del amplicón se resuspendió en 30 µL de agua grado biología molecular y se tomaron alícuotas

de cada estándar para cuantificarlo por triplicado por espectrofotometría (NANO-drop 1000/Thermo Scientific).

Tabla 2. Programa de amplificación para obtener los estándares de cada gen del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	10 seg	30
Alineamiento	60-65 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1

NOTA: La temperatura de alineamiento se ajustó a la requerida para cada par de oligonucleótidos.

5.9 Controles sin reverso transcripción (-RT)

Para los controles -RT se utilizó una de las alícuotas de 20 ng de RNA por muestra previamente preparadas. En el caso del RNA de *S. coelicolor* WT (MM suplementado con casaminoácidos) los controles -RT se realizaron utilizando el sistema SYBR Green One Step qRT-PCR (Biotool) con el programa de amplificación mostrado en la Tabla 3. Para el resto de las muestras se utilizó el sistema All-in-One qPCR Mix (GeneCopoeia) con el programa de amplificación señalado en la Tabla 4.

Tabla 3. Programa de amplificación para realizar los controles -RT de las muestras de RNA total de *S. coelicolor* WT crecida con casaminoácidos.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	40
Alineamiento	60°C	15 seg	
Extensión	60°C	15 seg	
Curva de disociación	95°C	-	1
	60°C	-	
	95°C	-	

Tabla 4. Programa de amplificación para realizar los controles -RT de las muestras de RNA total de *S. coelicolor* WT crecida con glucosa y fructosa, así como de *S. coelicolor* Δ -*mdh* crecida con distintas fuentes de carbono.

Etapa	Temperatura	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	40
Alineamiento	60°C	20 seg	

Extensión	72°C	15 seg	
Curva de disociación	95°C	-	1
	60°C	-	
	95°C	-	

5.10 Reacciones de reverso transcripción (RT)

Se llevaron a cabo reacciones de reverso transcripción para las muestras obtenidas a partir de cultivos de *S. coelicolor* WT en MM con fructosa y glucosa, así como para todas las muestras de la cepa Δ -*mdh*. Para obtener el DNA complementario (cDNA) se realizaron reacciones RT utilizando 100 ng de RNA total, 50 ng del oligonucleótido anti-sentido correspondiente y 200 unidades de reverso transcriptasa M-MLV (Promega) por reacción, de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Las mezclas de reacción se almacenaron a -22 °C hasta su uso.

5.11 PCR tiempo real para cuantificar los niveles de RNA mensajero de los genes de interés

En el caso de las muestras de *S. coelicolor* WT (MM+casaminoácidos) se utilizó el sistema SYBR Green One Step qRT-PCR, con 20 ng de RNA total por reacción, en las condiciones de amplificación utilizadas para los controles -RT con dos modificaciones: se incluyó un primer paso en el programa de amplificación de 50 °C por 15 minutos para la reacción de reverso transcripción, y las temperaturas de alineamiento se ajustaron para cada par de oligonucleótidos.

Para el resto de las muestras se utilizó el sistema All-in-One qPCR Mix (GeneCopoeia) y una alícuota de 1.25 μ L de la mezcla de reacción del cDNA en las condiciones de amplificación descritas previamente para este sistema, únicamente se modificó la temperatura de alineamiento específica para cada par de oligonucleótidos.

Para todos los casos, el RNA se cuantificó por duplicado y se utilizó el termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen). Además, se incluyeron en cada corrida controles: un punto de la curva estándar del gen correspondiente (que además sirvió como control positivo) y una reacción sin muestra (NTC, por sus siglas en inglés: *No Template Control*) como control negativo. Se siguieron las condiciones señaladas en los lineamientos MIQE³⁵.

Se utilizó el método de cuantificación absoluta para obtener la cantidad de RNA mensajero de cada gen de interés en las distintas muestras. Para la presentación de resultados se realizaron gráficas de “cajas y bigotes” y se calcularon intervalos de confianza

T ($\alpha=0.05$), se utilizó el programa Excel 2016 en ambos casos (Microsoft Office, versión 16.0.8528.2147)³⁶.

6. RESULTADOS

6.1 Crecimiento de *S. coelicolor* WT en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

Al evaluar el incremento de la biomasa con respecto al tiempo observamos en *S. coelicolor* WT un mayor crecimiento en cultivos suplementados con glucosa como fuente de carbono, en comparación con el obtenido en cultivos con fructosa y casaminoácidos (Figura 8). El máximo de biomasa observado en un medio con glucosa es aproximadamente cuatro veces el obtenido con casaminoácidos y diez veces el observado en cultivos con fructosa.

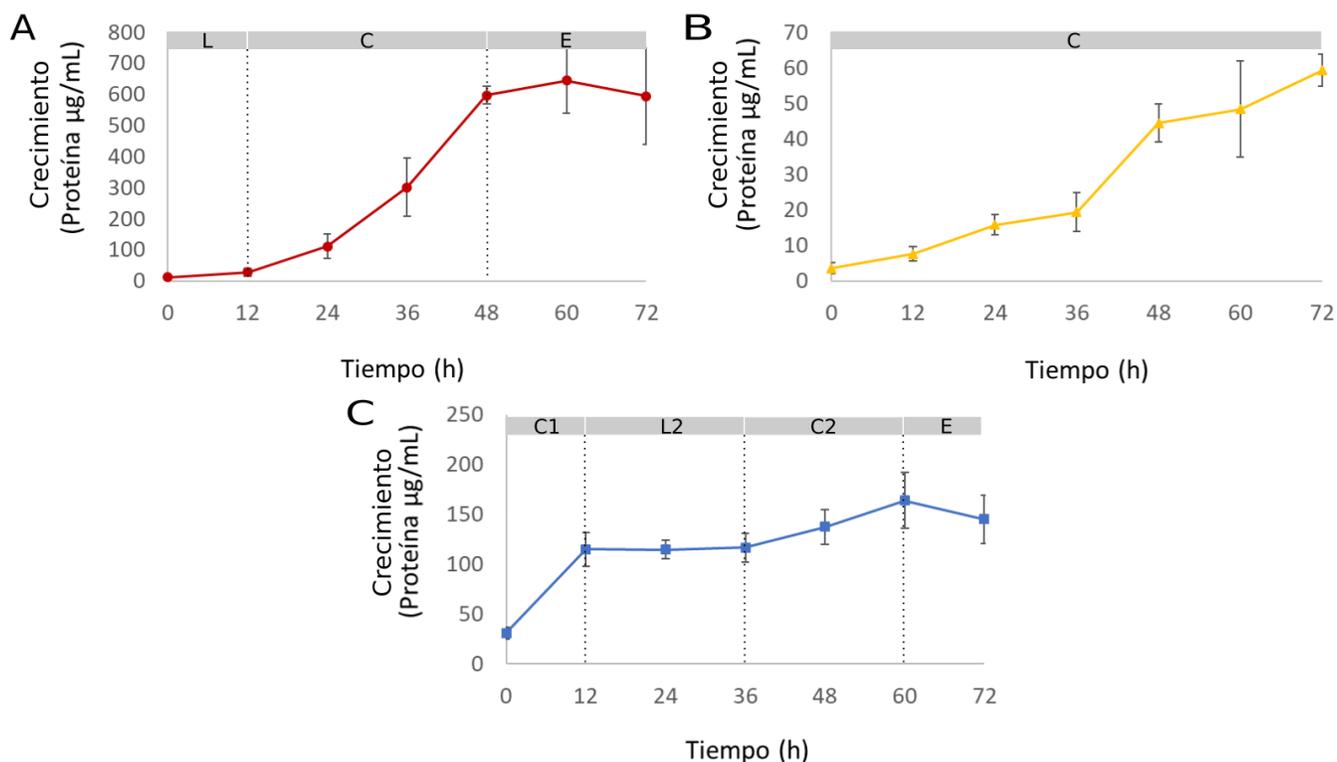


Figura 8. Curvas de crecimiento de *S. coelicolor* WT en MM con **A:** 1% de glucosa, **B:** 1% de fructosa y **C:** 1% de casaminoácidos. Los puntos son el promedio de duplicados biológicos y cuatro réplicas experimentales, se muestra la desviación estándar correspondiente. Las distintas fases del crecimiento se delimitan con líneas punteadas: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). En el caso de casaminoácidos se señalan: primera fase de crecimiento lineal (C1), segunda fase lag (L2) y segunda fase de crecimiento lineal (C2).

En lo que respecta a los perfiles de crecimiento de esta cepa, con glucosa se obtuvo una curva de crecimiento con una fase lag de 0 a 12 horas, una fase de crecimiento lineal de 12 a 48 horas y una fase estacionaria a partir de las 48 horas (Figura 8A). En el caso del cultivo con fructosa, se obtuvo una curva de crecimiento constante durante las 72 horas de incubación, con una mayor velocidad de crecimiento entre las 36 y las 48 horas ($\mu X=2.1$, Figura 8B). Para el cultivo con casaminoácidos, se obtuvo una curva de crecimiento

diaúxico con las siguientes fases: primera fase de crecimiento lineal entre 0 y 12 horas, fase lag entre las 12 y 36 horas, segunda fase de crecimiento lineal entre 36 y 60 horas, y una estacionaria a partir de las 60 horas (Figura 8C).

6.2 Crecimiento de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

Al comparar las curvas de crecimiento de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* observamos que, al cultivarlas en MM suplementado con glucosa, los perfiles de crecimiento de ambas son similares (Figura 9). Ambas muestran una fase lag en las primeras 12 horas, seguidas de un periodo de 36 horas de crecimiento lineal y una fase estacionaria en las últimas 24 horas de incubación (Figura 9A). En lo que respecta al incremento de la biomasa, en las curvas de crecimiento se observa un mayor nivel en la mutante con respecto a la WT a partir de las 36 horas. Además, la velocidad de crecimiento de la mutante, entre las 12 y 48 horas, es 1.5 veces la velocidad de crecimiento de la silvestre en el mismo intervalo de tiempo ($\mu X^{\Delta\text{-mdh}}=24.4$ y $\mu X^{\text{WT}}=15.8$).

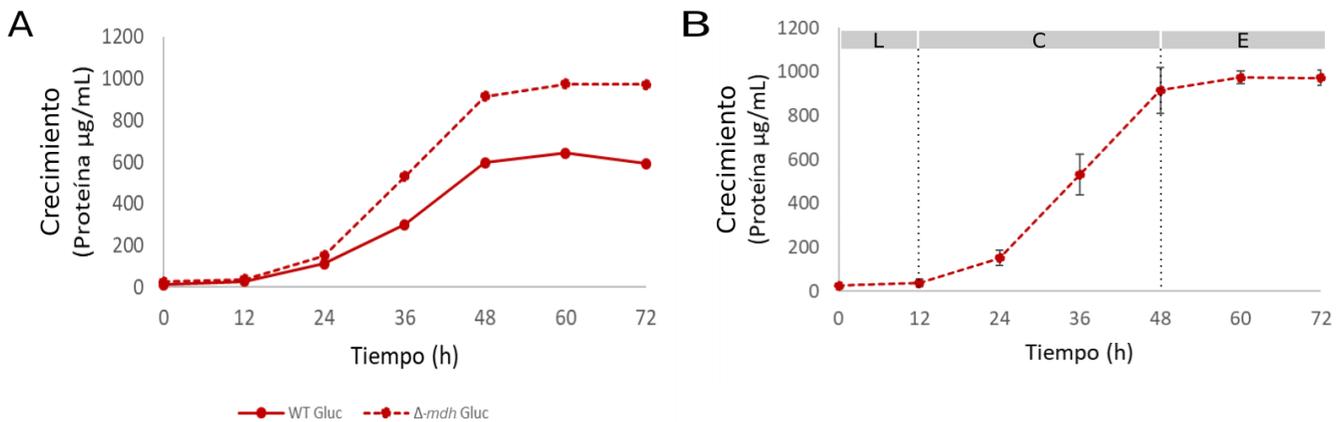


Figura 9. Curvas de crecimiento en MM suplementado con 1% de glucosa de **A:** *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh*, y **B:** *S. coelicolor* Δ -*mdh*. Para esta última se señalan las distintas fases: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). En ambas gráficas los puntos son el promedio de duplicados biológicos y cuatro réplicas experimentales, además se muestra la desviación estándar correspondiente.

Para el crecimiento de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* en MM con fructosa, observamos que la cepa mutante creció más que la silvestre (Figura 10A). El máximo de biomasa de la mutante, alcanzado a las 72 horas, es casi catorce veces el máximo de biomasa alcanzado por la silvestre, también a las 72 horas. Además, mientras que la curva de crecimiento de la silvestre muestra un crecimiento continuo durante las 72 horas de incubación, en el caso de la mutante se puede observar una fase lag en las primeras 12 horas, seguida por una

fase de crecimiento lineal entre las 12 y 60 horas y una fase estacionaria en las últimas 12 horas de incubación (Figura 10B).

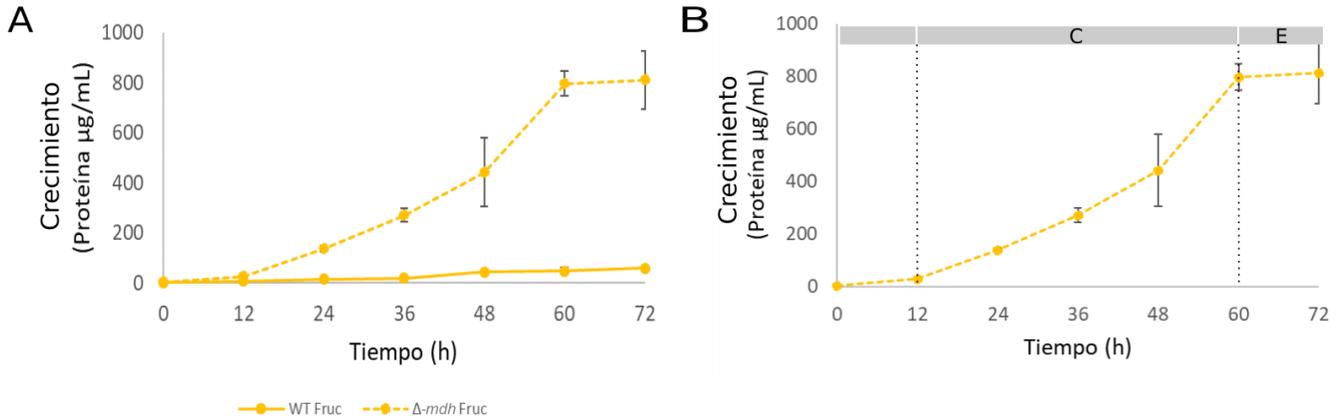


Figura 10. Curvas de crecimiento en MM suplementado con 1% de fructosa de **A:** *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh*, y **B:** *S. coelicolor* Δ -*mdh*. Para esta última se señalan las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). En ambas gráficas los puntos son el promedio de duplicados biológicos y cuatro réplicas experimentales, además se muestra la desviación estándar correspondiente.

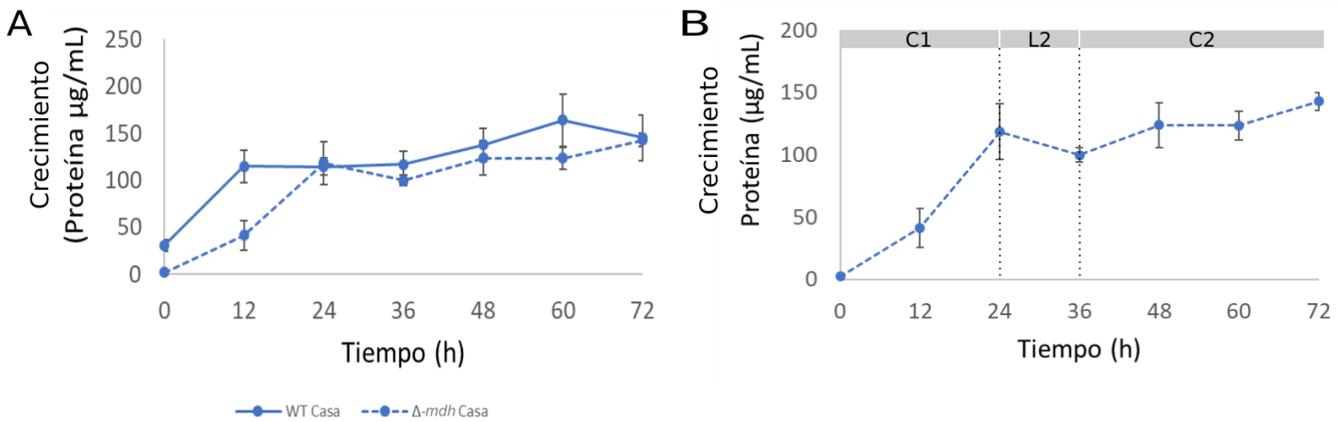


Figura 11. Curvas de crecimiento en MM suplementado con 1% de casaminoácidos de **A:** *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh*, y **B:** *S. coelicolor* Δ -*mdh*. Para esta última se señalan las distintas fases: primera fase de crecimiento lineal (C1), segunda fase lag (L2) y segunda fase de crecimiento lineal (C2). En ambas gráficas los puntos son el promedio de duplicados biológicos y réplicas experimentales, además se muestra la desviación estándar correspondiente.

En el caso de los cultivos suplementados con casaminoácidos podemos observar que los perfiles se modifican un poco (Figura 11A). En el caso de la mutante se observa una primera fase de crecimiento lineal de 0 a 24 horas, una fase lag entre las 24 y 36 horas, y una segunda fase de crecimiento lineal a partir de las 36 horas que se mantiene hasta el final del periodo de incubación. No se alcanzó a observar una fase estacionaria, lo que sí ocurrió en el caso de la silvestre, y tampoco se pudo observar una primera fase lag (Figura 11B). Además, la velocidad de crecimiento en la primera fase lineal es mayor en la silvestre

con respecto a la mutante ($\mu X^{WT}=7.0$ y $\mu X^{\Delta-mdh}=4.8$), aunque dicha fase tuvo una duración de 12 horas en la silvestre y de 24 horas en la mutante. También se observaron diferencias entre cepas en la duración de la segunda fase lineal: 24 horas para la silvestre y 36 horas para la mutante. En lo que respecta al incremento de la biomasa, el máximo observado para ambas cepas es el mismo.

6.3 RNA total purificado de *S. coelicolor* WT y Δ -mdh crecidas en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

A partir del análisis por espectrofotometría del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* WT y Δ -mdh crecidas en MM con glucosa (Anexo 1, Tablas 1.1 y 1.2), fructosa (Anexo 1, Tablas 1.3 y 1.4) y casaminoácidos (Anexo 1, Tablas 1.5 y 1.6), realizado después del tratamiento con DNAsa se determinó que, tanto las relaciones de absorbancia como la cantidad fueron adecuados en casi todos los casos para realizar los controles sin reverso transcripción (-RT) correspondientes y cuantificar los niveles de RNA mensajero de los ocho genes de interés. Las únicas excepciones para la WT fueron el M2-36 con glucosa y M2-72 con fructosa y para la mutante el M2-72 con fructosa, ya que la cantidad de RNA fue insuficiente y las relaciones de absorbancia $A_{260/230}$ fueron inadecuadas, por lo que se decidió no utilizar estas muestras de RNA para la cuantificación por PCR en tiempo real. Para todas las demás muestras, se obtuvieron valores cercanos a 2.0 para las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, lo que indica que el RNA obtenido es de buena calidad, sin exceso de proteínas o reactivos que pudieran interferir en la reacción de reverso transcripción y amplificación.

6.4 Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT crecida en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

A continuación, se presentan los perfiles de expresión en función del tiempo de crecimiento de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato obtenidos para *S. coelicolor* WT con glucosa, fructosa y casaminoácidos.

6.4.1 SCO3127: Gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxilasa

Para el gen *ppc* (SCO3127) observamos que el perfil de expresión con glucosa muestra un incremento hacia las 36 horas y a partir de este punto disminuye significativamente (Figura 12A). Los niveles de RNA permanecen sin cambio durante la fase estacionaria en esta condición. Con fructosa también se observa un incremento hacia las

36 horas, pero en este caso, a partir de este punto los niveles de RNA disminuyen gradualmente (Figura 12B). En esta condición no se observó fase estacionaria. Finalmente, con casaminoácidos se observan dos puntos máximos que corresponden a las dos fases de crecimiento lineal, con una disminución estadísticamente significativa en la fase lag entre la primera fase de crecimiento lineal y la segunda y una disminución gradual hacia la fase estacionaria (Figura 12C).

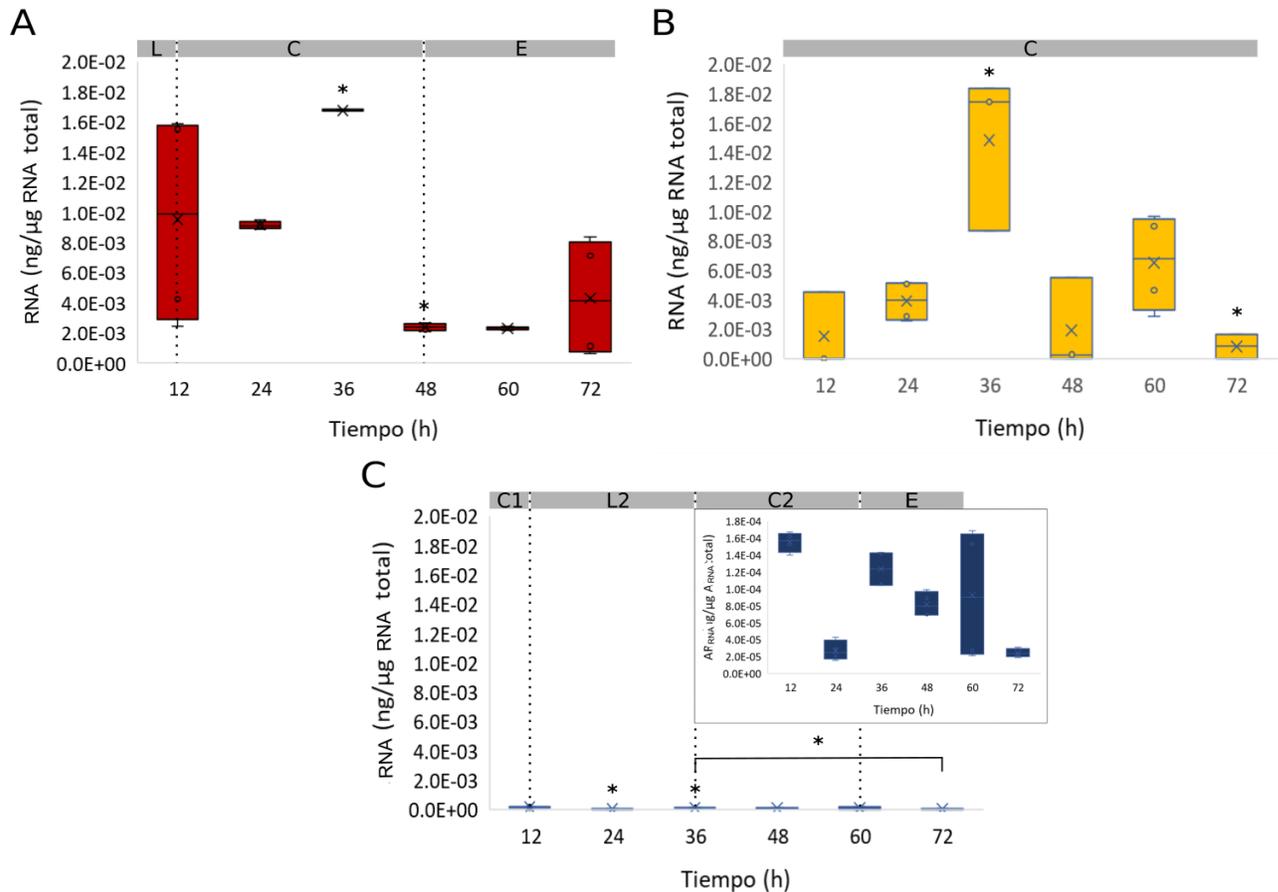


Figura 12. Niveles de RNA mensajero del gen *ppc* de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (en el inserto en **C** se muestra a detalle el perfil de expresión en esta condición). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Al comparar los niveles de RNA del gen *ppc* en las tres condiciones utilizadas se observa un nivel máximo de RNA con glucosa durante la fase de crecimiento lineal a las 36 horas, cuya mediana es siete veces la observada durante la fase estacionaria en esta misma condición (Figura 12A). Los niveles de RNA de este gen durante la fase de crecimiento lineal con glucosa y fructosa son dos órdenes de magnitud mayores a los

observados con casaminoácidos (Figura 12). Cabe destacar que los máximos niveles de RNA del gen *ppc* en *S. coelicolor* WT, fueron detectados durante las fases de crecimiento lineal en las tres fuentes de carbono utilizadas.

6.4.2 SCO4979: Gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxicinasa

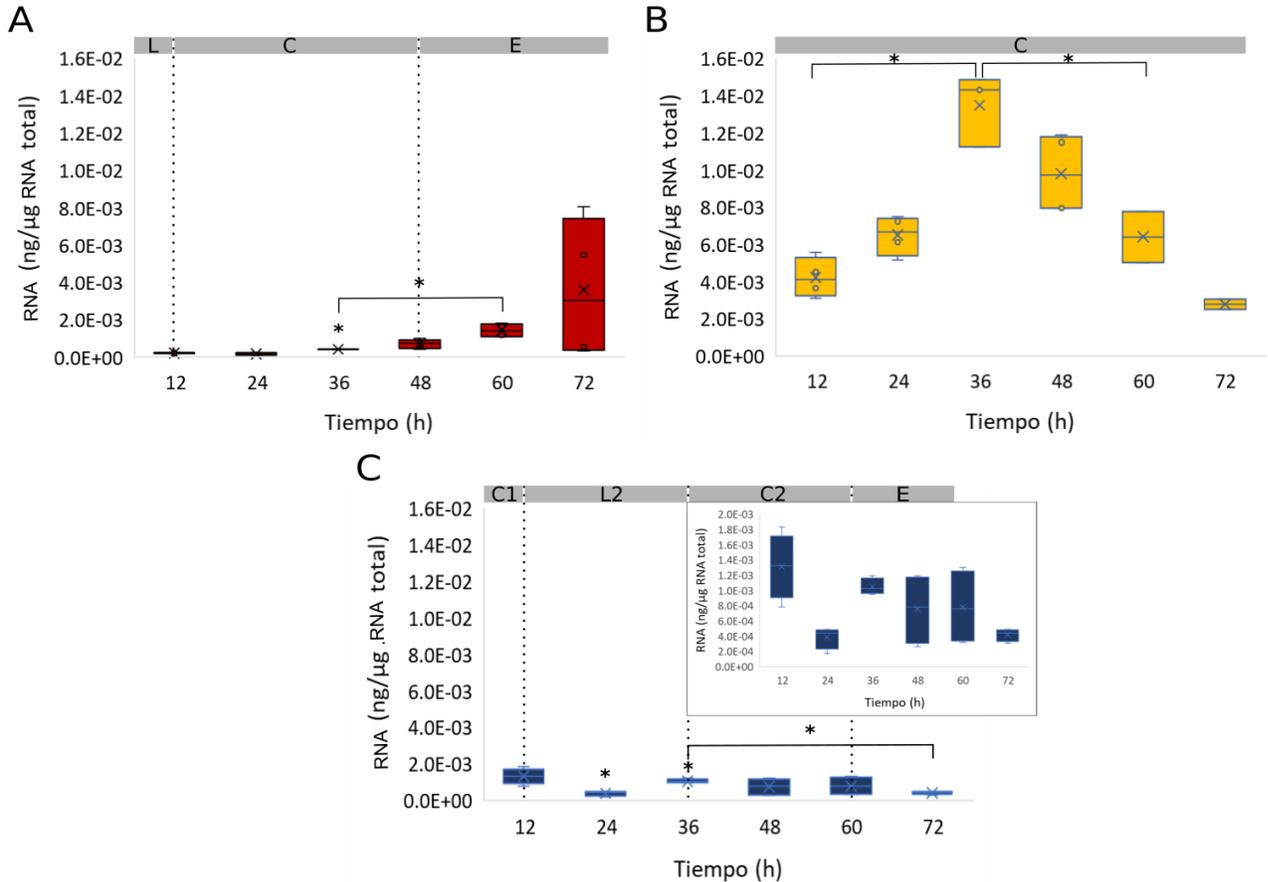


Figura 13. Nivel del RNA mensajero del gen SCO4979 (PEPCK) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (en el inserto se muestra a detalle el perfil de expresión con casaminoácidos). Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

En el caso del gen SCO4979 (PEPCK) se observa un perfil de expresión con glucosa con niveles crecientes de RNA mensajero hacia la fase estacionaria (Figura 13A), mientras que con fructosa se observa un caso similar al descrito anteriormente, en que se alcanza el nivel máximo a las 36 horas y los niveles de RNA disminuyen a partir de este punto (Figura 13B). Para el caso del perfil de expresión con casaminoácidos, de nuevo hay dos picos en

los niveles de RNA a las 12 y 36 horas, que corresponden a la primera y segunda fase de crecimiento lineal, con niveles menores en las fases lag y estacionaria (Figura 13C).

Al comparar los resultados obtenidos en cada una de las condiciones, se observa que el nivel máximo de RNA para el gen SCO4979 (PEPCK) corresponde al obtenido con fructosa a las 36 horas (Figura 13B), seguido por los niveles obtenidos durante el crecimiento con casaminoácidos y glucosa (Figura 13C y 13A), cuyas medianas fueron diez y 35 veces menores, respectivamente. Además, los máximos niveles de RNA de este gen durante el crecimiento con casaminoácidos, son similares a los observados durante la fase estacionaria con glucosa.

6.4.3 SCO0546: Gen que codifica para la piruvato carboxilasa

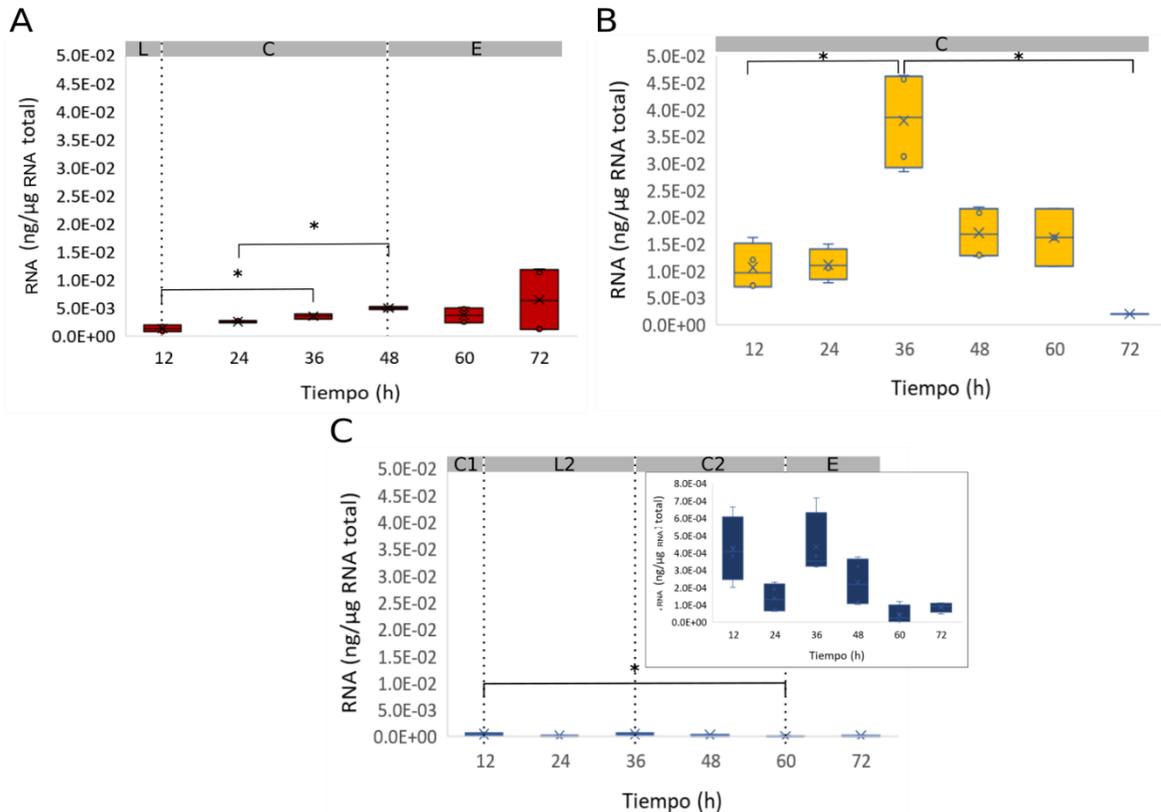


Figura 14. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0546 (PYC) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (en el inserto se muestra a detalle el perfil de expresión en esta condición). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas conectarlos.

Como en el caso anterior, en el perfil de expresión del gen SCO0546 (PYC) con glucosa se observan niveles crecientes de RNA que alcanzan el máximo al final del periodo

de incubación. Para los cultivos con fructosa, el perfil de expresión de este gen también muestra un incremento en los niveles de RNA con un máximo a las 36 horas y una disminución menos gradual que en el gen anteriormente descrito. Con casaminoácidos, se observan incrementos con niveles máximos en ambas fases del crecimiento lineal.

Al observar los resultados de las distintas condiciones, los mayores niveles de RNA del gen SCO0546 (PYC) durante la fase de crecimiento lineal fueron los obtenidos con fructosa a las 36 horas, seguidos por los obtenidos para glucosa y casaminoácidos, con medianas diez y cien veces menores, respectivamente (Figura 14).

6.4.4 SCO2014: Gen que codifica para la piruvato cinasa

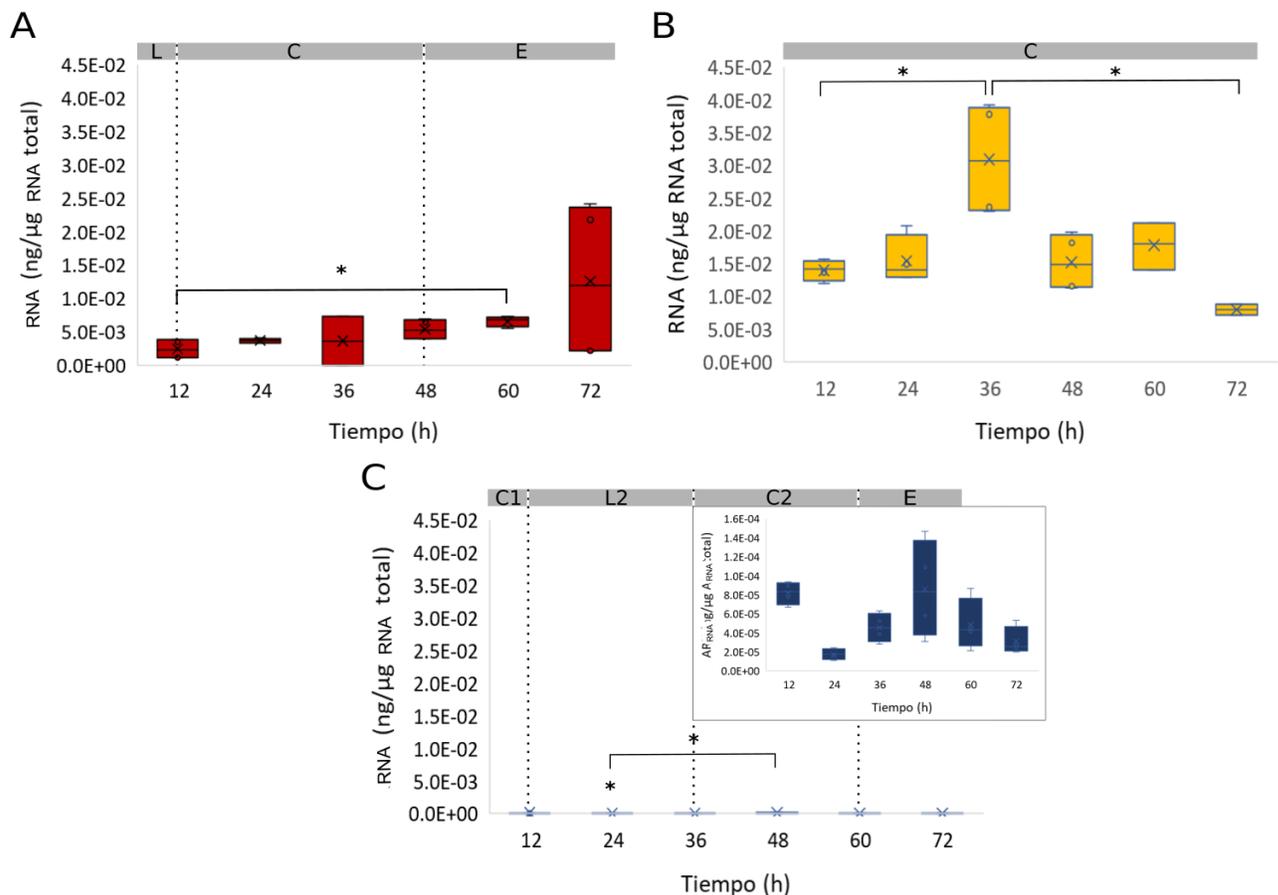


Figura 15. Niveles de RNA mensajero del gen *pyk1* de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (en el inserto se muestra a detalle el perfil de expresión en esta condición). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

El perfil de expresión del gen *pyk1* (SCO2014) con glucosa muestra un incremento gradual en los niveles de RNA hacia la fase estacionaria, mientras que, con fructosa aún y

cuando se observa incremento estadísticamente significativo a las 36 horas, para el resto de las muestras, los niveles de RNA son muy similares, salvo por el de las 72 horas, que sería el más bajo (Figura 15A y B).

Como en los casos anteriores, los niveles de RNA más altos fueron los obtenidos con fructosa a las 36 horas, más de ocho veces la mediana del máximo observado con glucosa en la fase de crecimiento lineal, y más de 300 veces la mediana del máximo observado con casaminoácidos en la misma fase (Figura 15). Cabe señalar que el máximo nivel de RNA del gen *pyk1* en casaminoácidos se obtuvo en las primeras 12 horas de crecimiento, muy similar al obtenido a las 48 horas, a mitad de la segunda fase de crecimiento lineal (Figura 15C).

6.4.5 SCO0208: Gen que codifica para la piruvato fosfato dicinasa

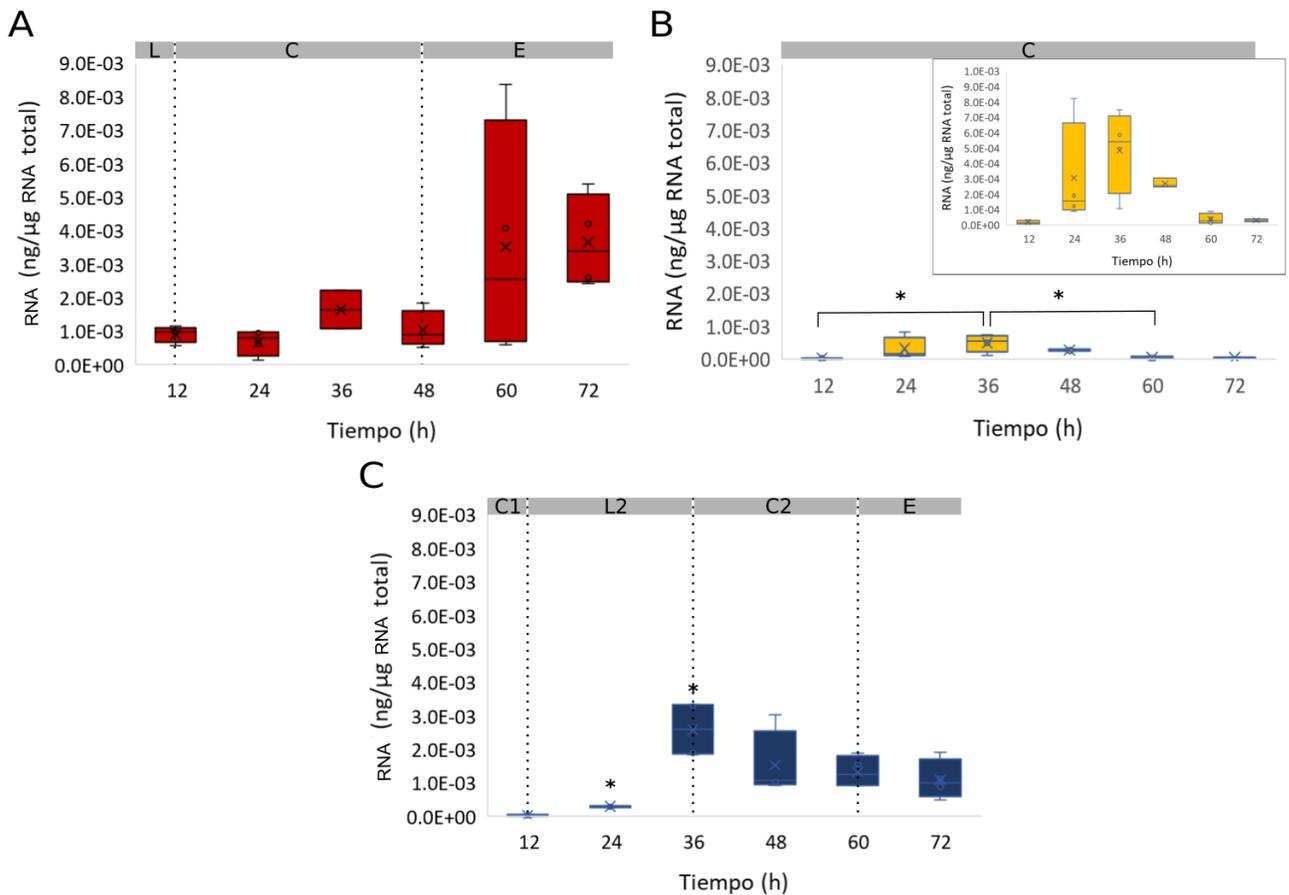


Figura 16. Nivel del RNA mensajero del gen SCO0208 (PYPDK) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

El perfil de expresión del gen que corresponde al SCO0208 (PYPDK) con glucosa muestra niveles de RNA con ligeros aumentos y disminuciones durante todo el periodo de incubación (Figura 16A). El nivel máximo durante la fase de crecimiento lineal fue el alcanzado a las 36 horas, que es menor al máximo registrado para este gen con glucosa, que corresponde al de la fase estacionaria. Con fructosa, nuevamente el nivel máximo es el de las 36 horas (Figura 16B), mientras que con casaminoácidos los menores niveles de RNA fueron los de las primeras 24 horas, seguidos por el nivel máximo alcanzado en esta condición al inicio de la segunda fase de crecimiento lineal (Figura 16C). A partir de este punto, los niveles de RNA disminuyen gradualmente.

En este caso, al comparar los niveles de RNA del gen SCO0208 (PYPDK) entre las distintas condiciones observamos que los mayores fueron los obtenidos al inicio de la segunda fase de crecimiento lineal con casaminoácidos, cuya mediana es 1.5 veces la del nivel máximo obtenido en la fase de crecimiento lineal con glucosa y casi cinco veces la mediana del máximo obtenido con fructosa en la misma fase, que es lo esperado para el gen de una enzima gluconeogénica (Figura 16). Sin embargo, no se observaron los mismos niveles durante la primera fase de crecimiento lineal con casaminoácidos (Figura 16C).

6.4.6 SCO5896: Gen que codifica para la enzima utilizadora de fosfoenolpiruvato

Para el gen que corresponde al SCO5896 (PEP-UE), el perfil de expresión con glucosa muestra niveles bajos durante la fase de crecimiento lineal, con respecto a los obtenidos durante la fase estacionaria, que son tres veces mayores (Figura 17A). El nivel mínimo obtenido fue el de las 36 horas, mientras que los niveles de la fase estacionaria (48 a 72 horas) fueron muy similares. Con fructosa, el nivel máximo de RNA a las 36 horas es por lo menos un orden de magnitud mayor a los obtenidos para el resto de las muestras en esta condición (Figura 17B). Finalmente, los pequeños niveles de RNA de este gen durante la fase de crecimiento lineal con casaminoácidos, son mayores a los observados en fase estacionaria (Figura 17C).

Además, al considerar las tres condiciones, observamos que los niveles más altos de RNA del gen SCO5896 (PEP-UE) fueron con fructosa a las 36 horas, como sucede para la mayoría de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato en *S. coelicolor* WT (Figura 17B). La mediana del máximo nivel de RNA del gen SCO5896 (PEP-UE) a las 36 horas con fructosa es casi 100 veces la mediana a las 12 horas con glucosa y más de 5,000 veces la mediana con casaminoácidos a las 36 horas (Figura 17).

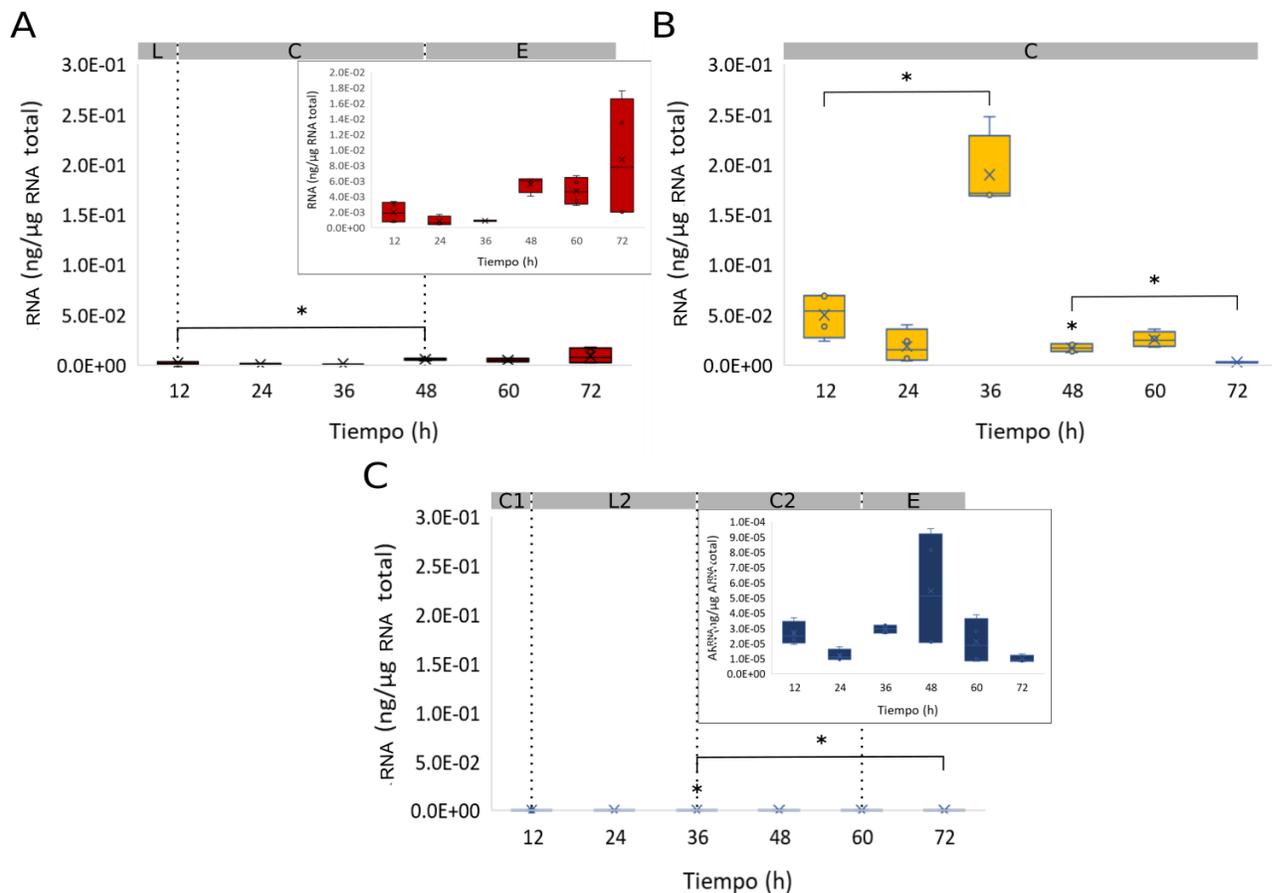


Figura 17. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5896 (PEP-UE) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (los insertos en **A** y **C** muestran a detalle el perfil de expresión en las condiciones correspondientes). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

6.4.7 SCO2951: Gen que codifica para la enzima málica NAD⁺ dependiente

Los niveles de RNA del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) son un caso particular, debido a que son los únicos para los que se obtuvieron valores en el mismo orden de magnitud en las tres condiciones probadas (Figura 18). Con glucosa se observan niveles crecientes de RNA hacia las 36 horas, seguidos de una disminución estadísticamente significativa al final de la fase de crecimiento lineal (48 horas) y un incremento gradual hacia el final del periodo de incubación (Figura 18A). Con fructosa, los niveles de RNA son muy similares (Figura 18B), mientras que con casaminoácidos, el nivel máximo de RNA es el de las 12 horas, que disminuye significativamente durante la fase lag, y se incrementa ligeramente al inicio de la

segunda fase de crecimiento lineal. A partir de este punto se observan pequeñas variaciones, por lo que los niveles de RNA son muy similares (Figura 18C).

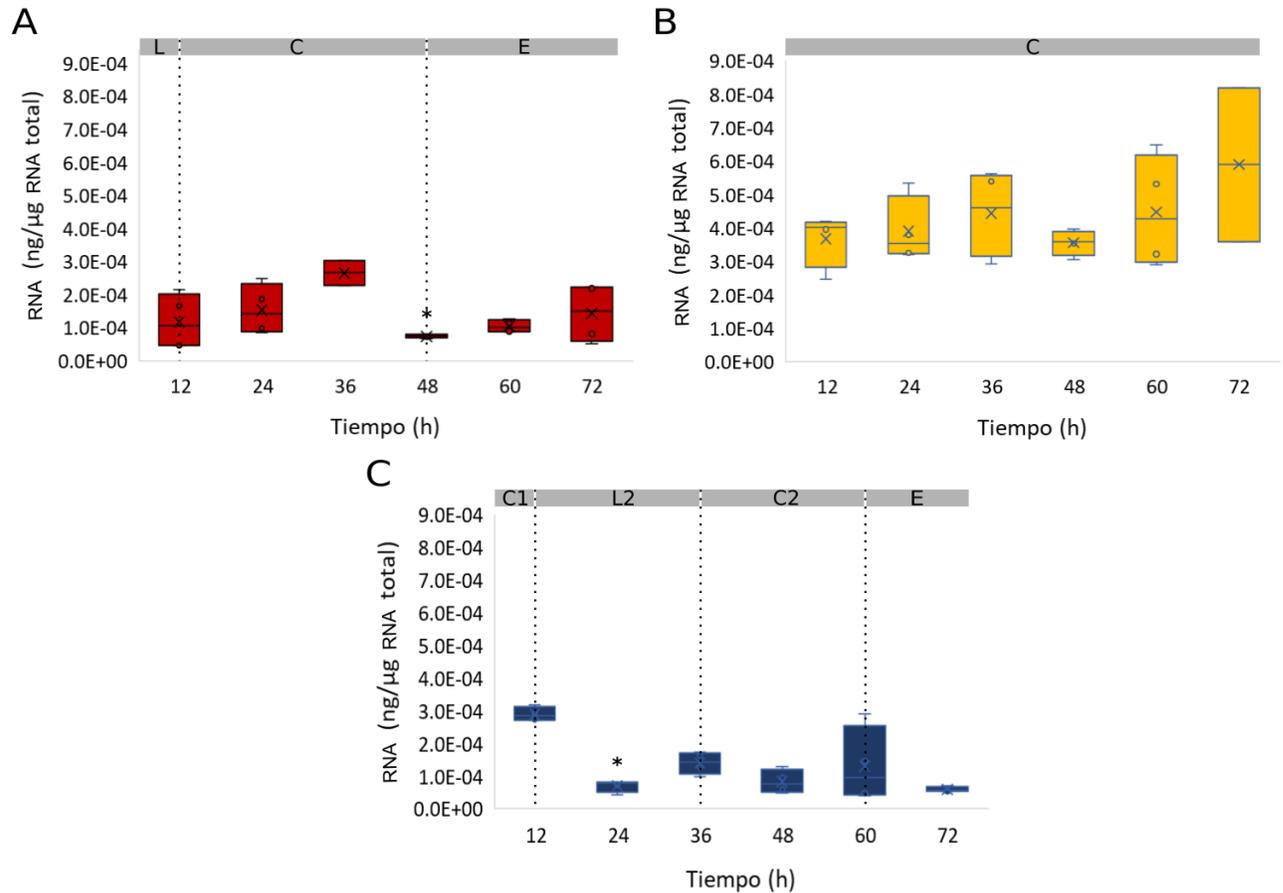


Figura 18. Niveles de RNA mensajero del gen SCO2951 (ME-NAD⁺ dependiente) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

6.4.8 SCO5261: Gen que codifica para la enzima málica NADP⁺ dependiente

El perfil de expresión del gen SCO5261 (ME-NADP⁺) con glucosa muestra niveles de RNA crecientes hacia la etapa estacionaria, mientras que con fructosa se observa un pico máximo a las 36 horas, cuya mediana es doce veces la obtenida a las 12 horas. Con casaminoácidos en general se observan niveles de RNA mayores en ambas fases de crecimiento lineal, con respecto a los obtenidos durante la fase lag. La mediana del nivel máximo durante la fase del crecimiento lineal es 10 veces la mediana de las 72 horas (Figura 19).

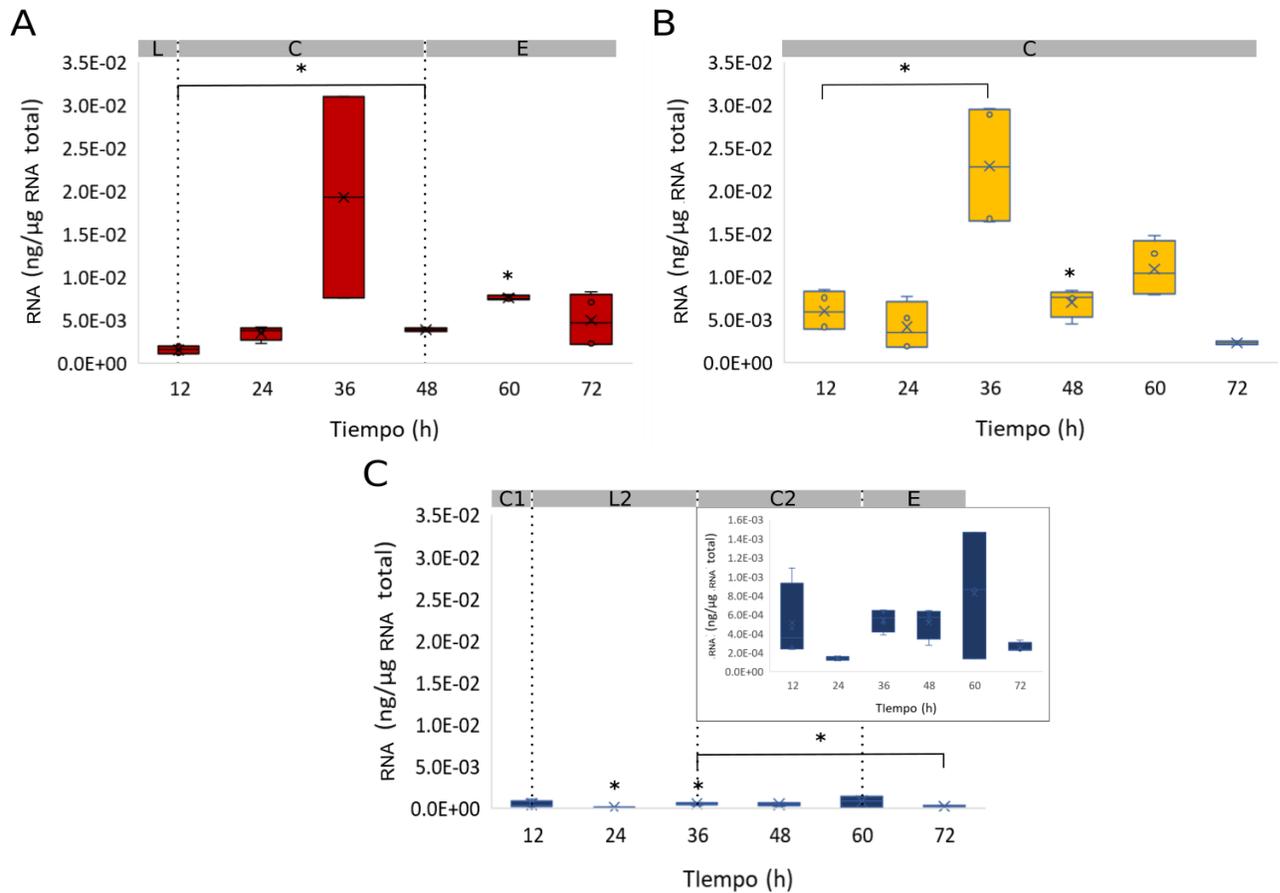


Figura 19. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5261 (ME-NADP⁺ dependiente) de *S. coelicolor* WT crecida en MM con **A:** 1% glucosa, **B:** 1% fructosa y **C:** 1% casaminoácidos (en el inserto se muestra a detalle el perfil de expresión en esta condición). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Para este gen, los niveles más altos de RNA fueron los obtenidos con fructosa a las 36 horas (Figura 19B). Esta última es seis veces la máxima obtenida con glucosa a las 24 horas; y 40 veces la máxima obtenida a las 36 horas con casaminoácidos, también durante la fase de crecimiento lineal (Figura 19A y 19C).

6.5 Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh* crecida en medio mínimo con glucosa

Al comparar los niveles de expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato, entre *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* al crecerlas con glucosa, observamos que, en el caso del gen *ppc*, en la mutante no se observa el nivel máximo de RNA a mitad de la fase de crecimiento lineal como en la silvestre, sino que en este caso los niveles de RNA

descienden gradualmente conforme transcurre el tiempo de incubación (Figura 20). Además, la mediana del nivel máximo de RNA en la silvestre (36 horas) es 8.7 veces la mediana de la mutante a la misma hora y 4.5 veces la mediana del máximo obtenido en la mutante (12 horas). En todas las muestras, los niveles de RNA mensajero en la mutante son por lo menos la mitad de los obtenidos para la silvestre.

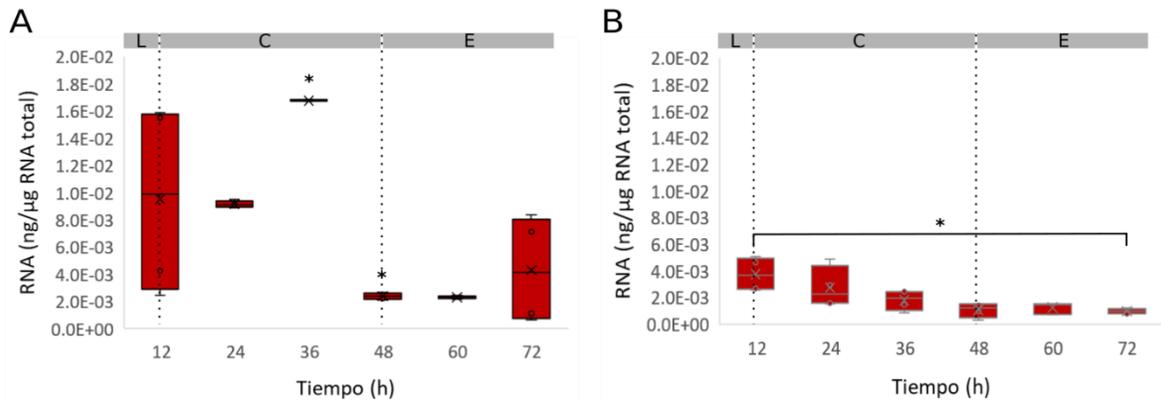


Figura 20. Niveles de RNA mensajero del gen *ppc* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

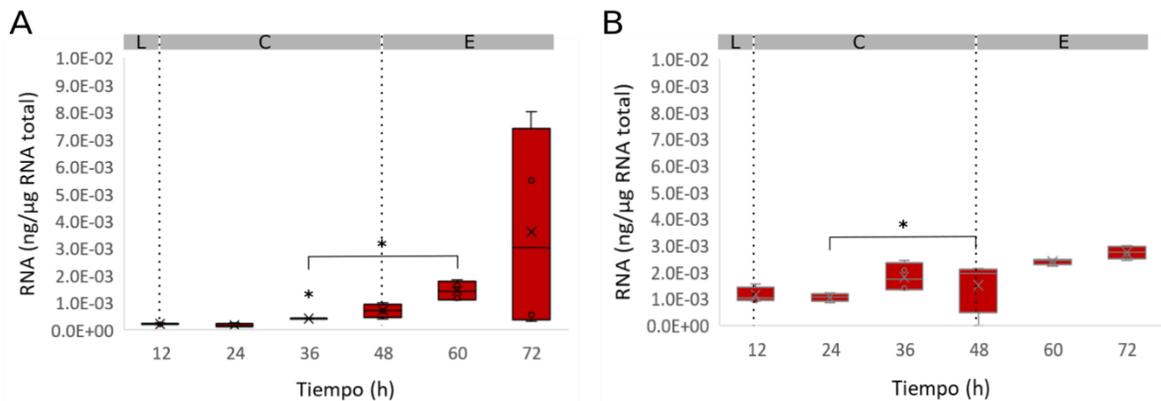


Figura 21. Niveles de RNA mensajero del gen SCO4979 (PEPCK) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

En lo que se refiere al perfil de los niveles de transcrito del gen SCO4979 (PEPCK), en general no se observan grandes diferencias entre la silvestre y la mutante, durante el periodo de incubación (Figura 21). Además, la mediana del nivel máximo de la silvestre (a las 72 horas), es muy similar a la máxima obtenida para la mutante, también a las 72 horas.

La diferencia más notable se observa en las primeras 24 horas de incubación. En la silvestre, la mediana de las 12 horas es ligeramente mayor a la de las 24 horas, mientras que en la mutante la mediana de las 12 horas es igual a la obtenida a las 24 horas. Al compararlas, observamos que los niveles de RNA de la mutante son casi 5 y 6 veces los observados para la silvestre, a las 12 y 24 horas respectivamente. Los niveles de las 48 y 60 horas son más o menos el doble y triple en la mutante con respecto a la silvestre en las mismas horas.

Para el gen que corresponde al SCO0546 (PYC), al comparar los niveles de RNA entre la cepa silvestre y la mutante, observamos diferencias en las primeras 36 horas de incubación, en que las medianas de la mutante fueron mayores a las obtenidas para la silvestre, entre dos y seis veces (Figura 22). Mientras que las medianas de la segunda mitad del periodo de incubación (48, 60 y 72 horas) son iguales en ambas cepas. La gran diferencia es el aumento, estadísticamente significativo, en los niveles de RNA mensajero de la mutante a las 36 horas, cuya mediana es 6 veces la obtenida para la silvestre a la misma hora. Para el resto de las muestras se observa un aumento gradual en los niveles de RNA hacia la etapa estacionaria en ambas cepas.

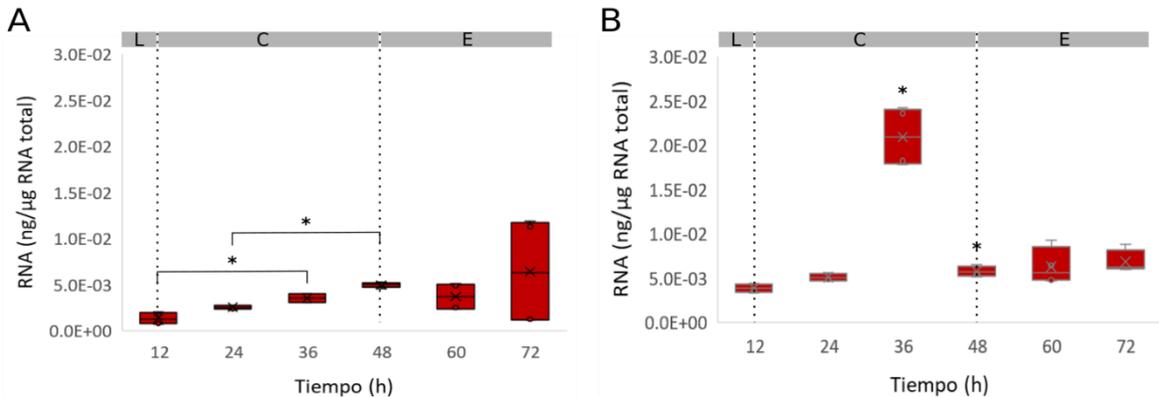


Figura 22. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0546 (PYC) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

En el caso del gen *pyk1* los perfiles entre ambas cepas son diferentes. Sin embargo, observamos que tanto en las primeras 24 horas de incubación, como a las 48 y 60 horas, las medianas obtenidas para ambas cepas son muy similares. No así para los niveles de RNA a las 36 y 72 horas en que la mediana de la mutante es el doble y el triple de la obtenida para la silvestre, respectivamente (Figura 23).

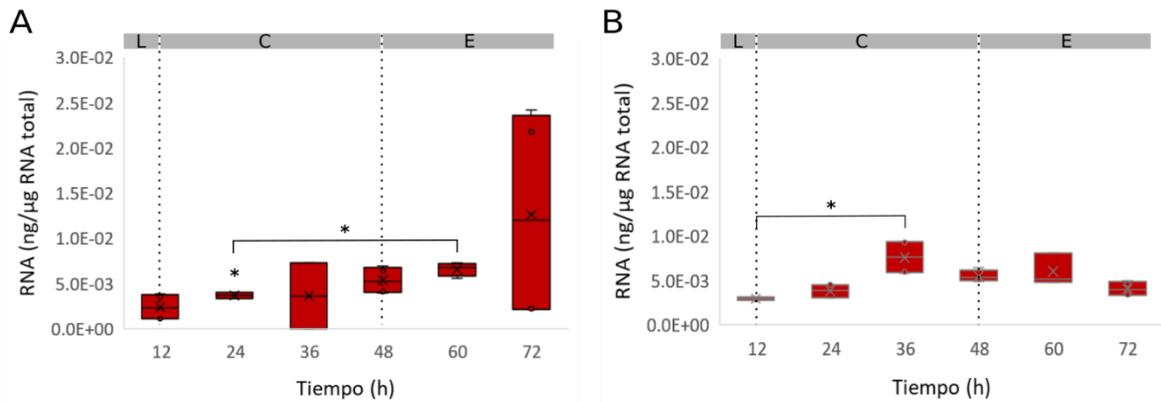


Figura 23. Niveles de RNA mensajero del gen *pyk1* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Los niveles de RNA del gen SCO0208 (PYPDK) en la mutante son mayores a los de la silvestre a las 12, 24 y 60 horas, mientras que a las 48 y 72 horas son menores. El único punto en que las medianas son muy similares es a las 36 horas. El nivel máximo de RNA mensajero de este gen en la mutante es el de las 12 horas, cuya mediana es catorce veces la obtenida para la silvestre en ese mismo punto (Figura 24).

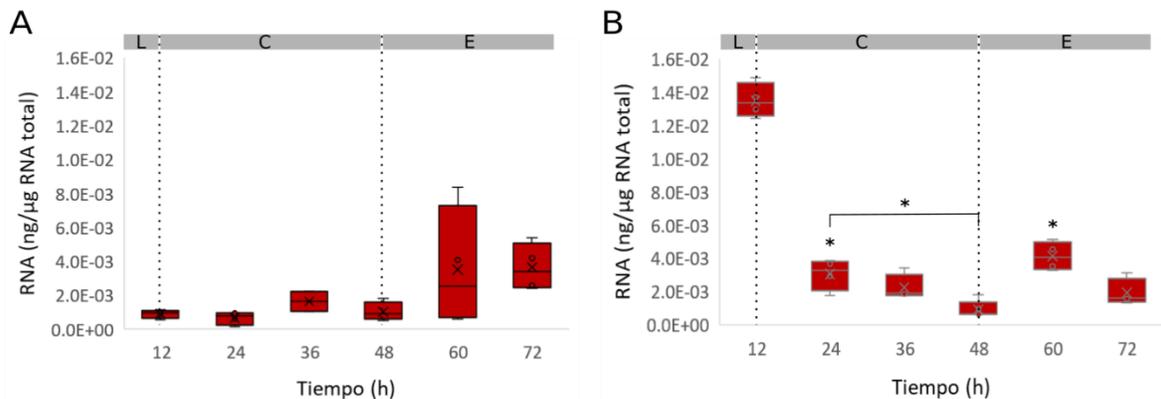


Figura 24. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0208 (PYPDK) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Para el gen que corresponde al SCO5896 (PEP-UE) en la mutante, los niveles de RNA mensajero muestran niveles decrecientes en las primeras 24 horas de incubación (Figura 25). Posterior a dicho periodo, en ambas cepas, los niveles de RNA muestran un aumento estadísticamente significativo. Dichos niveles en la mutante muestran una

disminución estadísticamente significativa a las 48 horas, y a partir de este punto se mantienen niveles similares hasta las 72 horas.

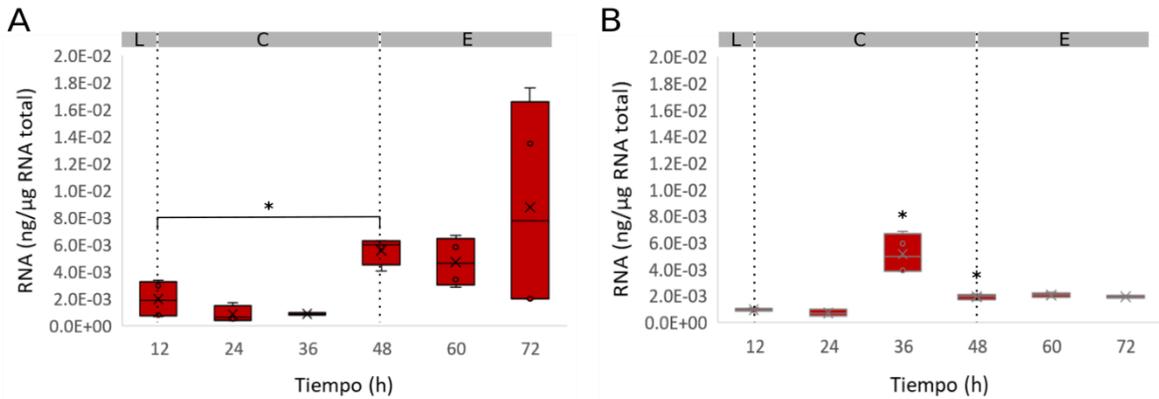


Figura 25. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5896 (PEP-UE) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

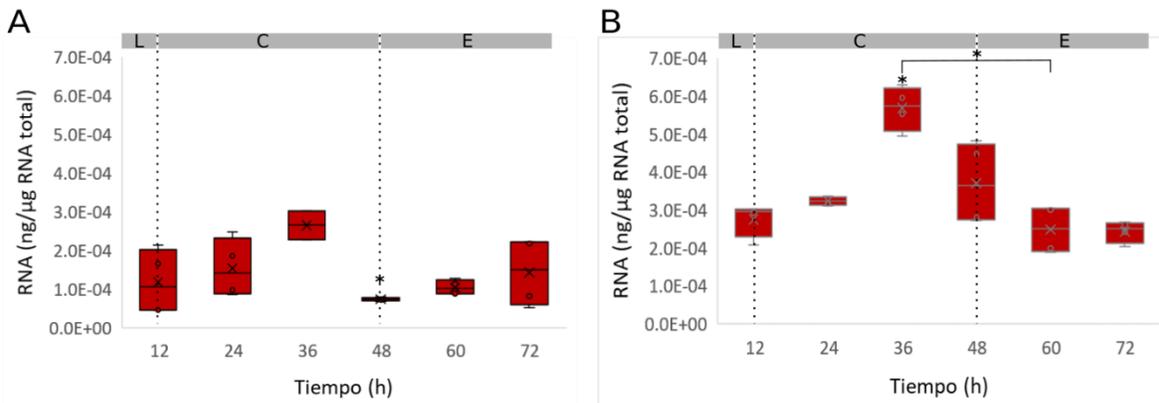


Figura 26. Niveles de RNA mensajero del gen SCO2951 (ME-NAD⁺ dependiente) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

En general, los niveles de RNA mensajero de este gen son menores en la mutante con respecto a los obtenidos para la silvestre, entre una cuarta parte y la mitad, a las 12, 48, 60 y 72. El único punto en que los niveles de RNA son mayores en la mutante es a las 36 horas, en que la mediana es 5.6 veces la obtenida para la silvestre a la misma hora.

En el caso del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) en la mutante observamos un aumento en los niveles de RNA mensajero en las primeras horas de incubación, estadísticamente significativo a las 36 horas (Figura 26). La mediana de la mutante en este punto es el doble

de la obtenida para la silvestre a la misma hora. En la segunda mitad del periodo de incubación en la mutante se observa una disminución gradual de los niveles de RNA.

Para el gen SCO5261 (ME-NADP⁺) se observan perfiles de expresión diferentes entre la silvestre y la mutante. Para la mutante se observó un aumento en los niveles de RNA de las 24 horas, con respecto a lo observado a las 12 horas. Dichos niveles permanecen prácticamente sin cambios desde las 24 horas y hasta las 72 horas (Figura 27). Es importante destacar que los valores obtenidos para la mutante son menores a los obtenidos para la silvestre en todas las muestras. Los puntos en que son mucho menores son a las 36 y 60 horas, en que las medianas de la silvestre son 7.6 y 8.5 veces las medianas obtenidas para la mutante, respectivamente.

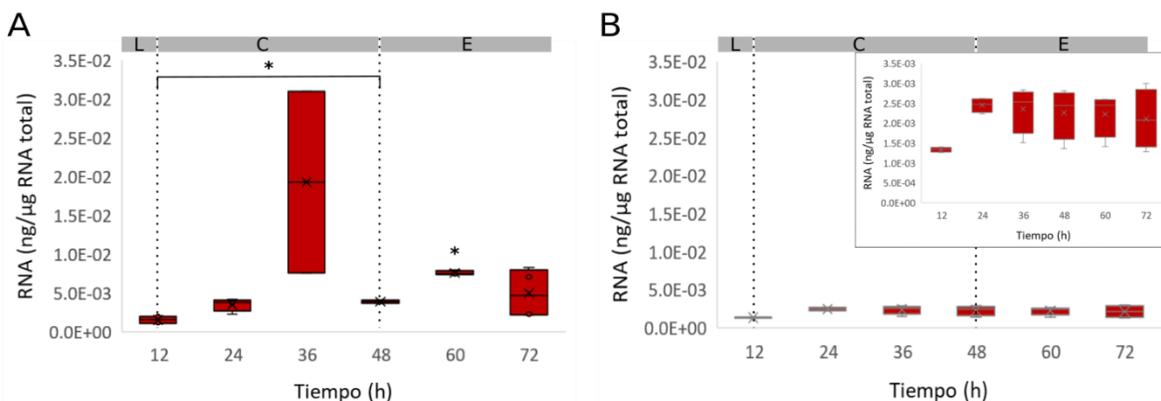


Figura 27. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5261 (ME-NADP⁺ dependiente) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% glucosa (el inserto en **B** muestra a detalle el perfil de expresión de la mutante). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

6.6 Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh* crecida en medio mínimo con fructosa

Al comparar los niveles de RNA de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* crecidas en medio mínimo suplementado con fructosa, se consideró que en la curva de crecimiento de la silvestre la fase de crecimiento lineal abarca el total del periodo de incubación (72 horas), mientras que en la mutante la fase de crecimiento lineal tiene una duración de 48 horas (entre las 12 y 60 horas de incubación), y en este caso si se observó una fase estacionaria. En la mayoría de los genes analizados, durante la fase de crecimiento lineal de la mutante, los niveles máximos de RNA fueron los obtenidos a las 48 horas, las excepciones se detallan más adelante.

En específico, el perfil de expresión del gen *ppc* en la mutante es ligeramente

diferente al obtenido para la silvestre (Figura 28). En la mutante se observan niveles crecientes de RNA hacia la segunda mitad de la fase de crecimiento lineal (a las 48 horas), que decrecen y que muestran un aumento estadísticamente significativo a las 72 horas. La mediana máxima de la mutante, a las 48 horas, es la mitad de la máxima obtenida para la silvestre. Además, la mediana del nivel máximo de RNA en la mutante a las 48 horas es 1.3 veces la mediana de la fase estacionaria (72 horas, Figura 28B).

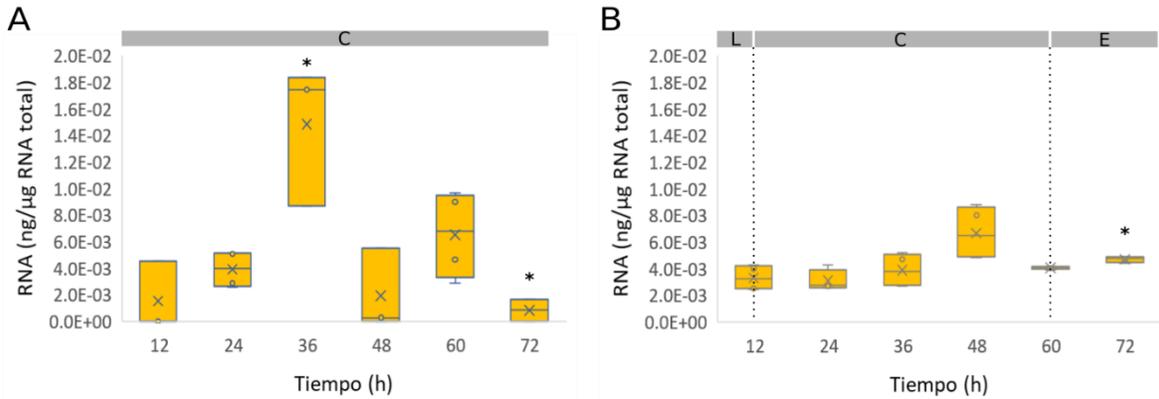


Figura 28. Niveles de RNA mensajero del gen *ppc* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$.

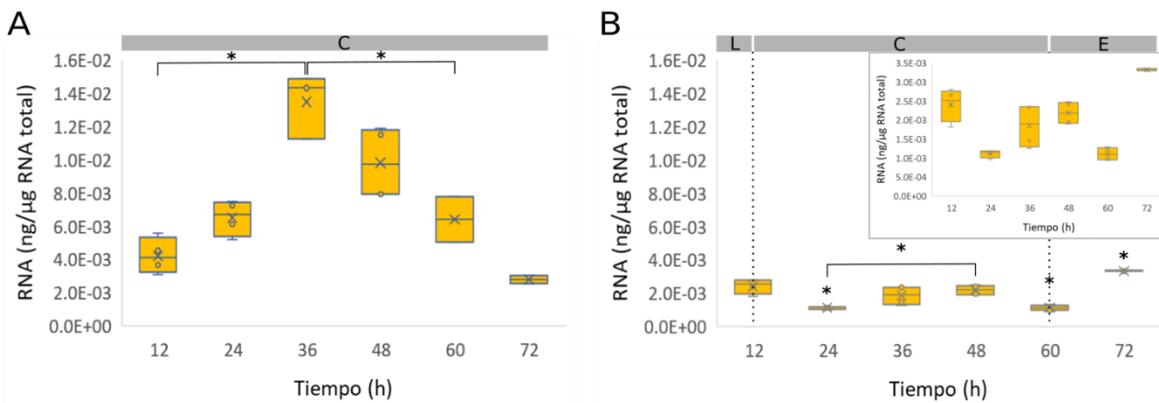


Figura 29. Niveles de RNA mensajero del gen *SCO4979* (PEPCK) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa (en el inserto en **B** se muestra a detalle el perfil de expresión de la mutante). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas continuas.

En lo que respecta al perfil de expresión del gen *SCO4979* (PEPCK) en la mutante, se observan dos puntos con niveles máximos de RNA durante la fase de crecimiento lineal (a las 12 y 48 horas, Figura 29). La mediana máxima obtenida en la silvestre a las 36 horas

es 5.9 y 6.8 veces las obtenidas para la mutante, a las 12 y 48 horas respectivamente. Además, en la mutante se observa un incremento en los niveles de RNA en la fase estacionaria, cuya mediana es ligeramente mayor a las obtenidas a las 12 y 48 horas, 1.3 y 1.5 veces respectivamente (Figura 29B).

En el caso del gen SCO5896 (PEP-UE), en el perfil de expresión de la mutante los niveles de RNA muestran variaciones estadísticamente significativas, con dos puntos máximos durante la fase de crecimiento lineal, y un incremento más durante la fase estacionaria (Figura 30B). La mediana máxima de la silvestre a las 36 horas es 21 veces la máxima obtenida para la mutante durante la fase de crecimiento lineal, a las 48 horas. Además, en la mutante la mediana máxima de la fase de crecimiento lineal, es ligeramente mayor a la obtenida durante la fase estacionaria (1.3 veces).

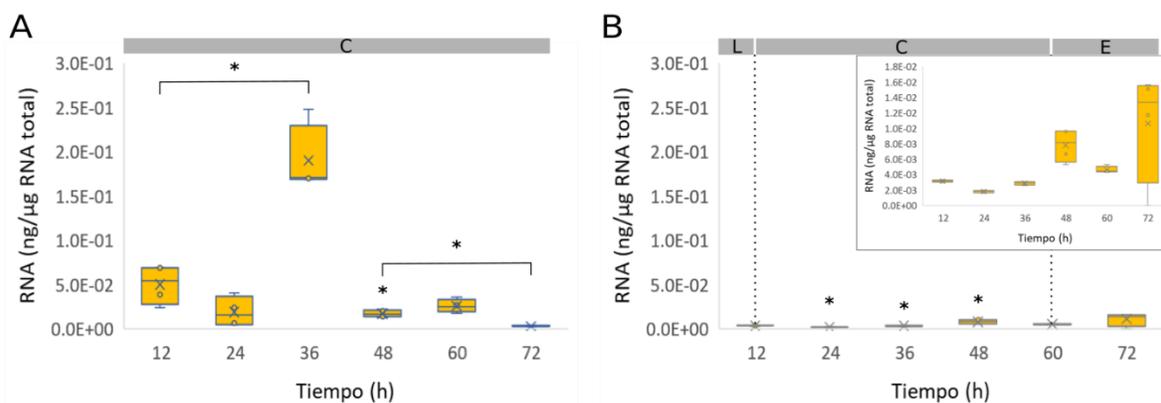


Figura 30. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5896 (PEP-UE) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa (en el inserto en **B** se muestra a detalle el perfil de expresión de la mutante). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas continuas.

En el perfil de expresión del gen *pyk1* en la mutante se observan niveles crecientes de RNA hacia la etapa estacionaria, en que se alcanza el máximo a las 72 horas (Figura 31B). Como en otros casos, la mediana máxima de la mutante para este gen durante la fase lineal, a las 48 horas, es casi un tercio de la máxima obtenida para la silvestre a las 36 horas. Finalmente, en la mutante la mediana del nivel máximo de RNA de las 72 horas es 1.7 el obtenido a las 48 horas.

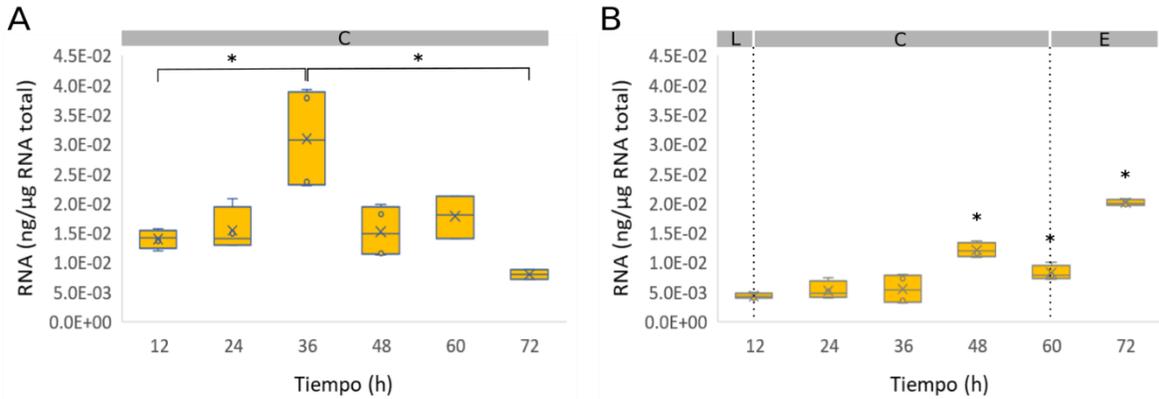


Figura 31. Niveles de RNA mensajero del gen *pyk1* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas continuas.

Nuevamente, los perfiles de expresión del gen que corresponde al SCO0546 (PYC) son similares durante la fase de crecimiento lineal de ambas cepas (Figura 32). En la mutante se observaron niveles de RNA que se incrementan hasta la segunda mitad de la fase de crecimiento lineal, a las 48 horas, que muestran una disminución estadísticamente significativa después de este punto, y se mantienen en la fase estacionaria (Figura 32B). La mediana del nivel máximo en la mutante, a las 48 horas, es la mitad del máximo obtenido para la silvestre, a las 36 horas. Además, la mediana de este máximo de la mutante es 2.3 veces la mediana de las 72 horas.

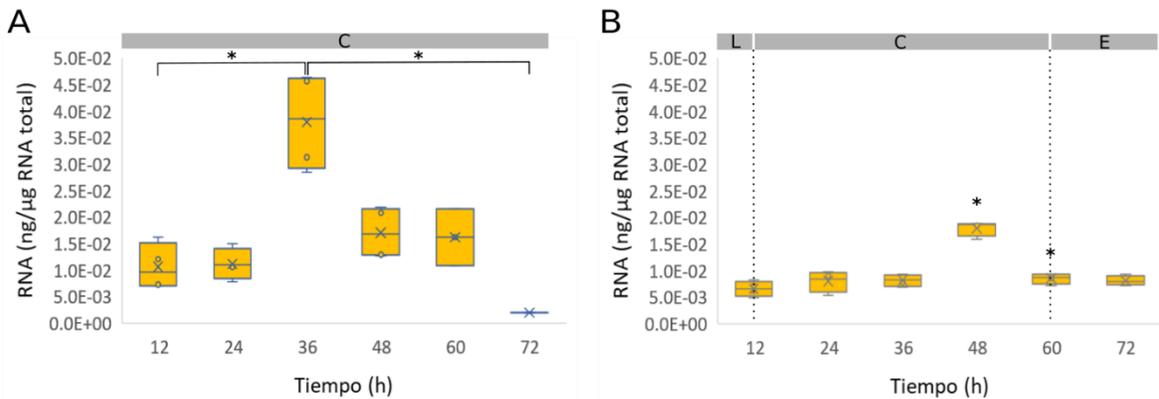


Figura 32. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0546 (PYC) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Para el gen que corresponde al SCO0208 (PYPDK) en la mutante, se observaron altos niveles de RNA a las 12 horas. Dichos niveles muestran una disminución estadísticamente significativa hacia las 24 horas, y a partir de este punto se incrementan hasta las 48 horas, momento en que vuelven a disminuir (Figura 33B). Finalmente, el nivel de RNA se vuelve a incrementar en la fase estacionaria. Cabe destacar que el perfil de expresión entre ambas cepas es similar durante la fase de crecimiento lineal (Figura 33A). La mediana máxima de la mutante, a las 12 horas, es 46.4 veces la mediana máxima obtenida para la silvestre a las 36 horas. Además, en la mutante la mediana de las 12 horas es 1.8 veces la de las 48 horas, mientras que la mediana máxima de la fase de crecimiento lineal es casi el doble de la obtenida durante la fase estacionaria.

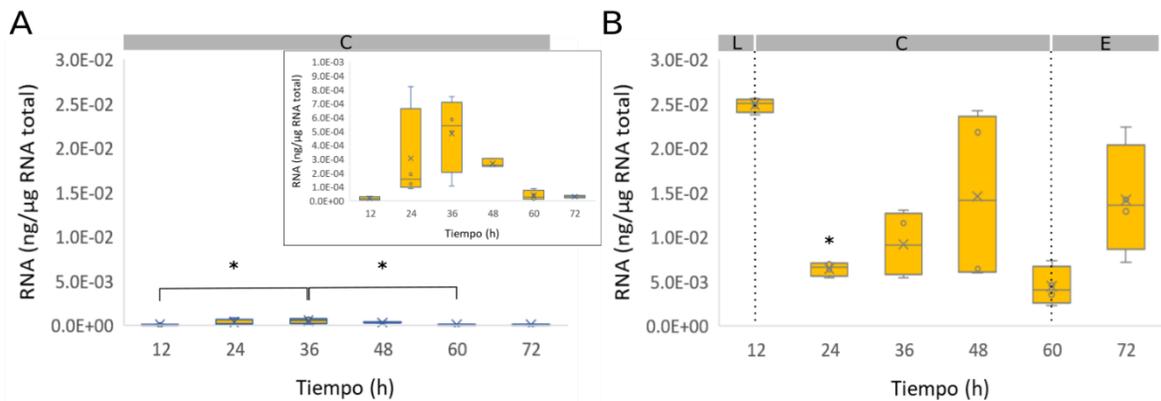


Figura 33. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0208 (PYPDK) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

El caso del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) es de llamar la atención, pues es el único gen en esta condición para el que los niveles de RNA entre ambas cepas son muy similares (Figura 34). Aunque los perfiles de expresión muestran variaciones, en ninguno de los dos casos se pueden establecer diferencias estadísticamente significativas durante la fase de crecimiento lineal. En la mutante habría variaciones que alcanzan niveles de RNA ligeramente mayores a las 12 y 36 horas, además de un incremento estadísticamente significativo hacia la fase estacionaria, a las 72 horas.

Finalmente, el perfil de expresión del gen que corresponde al SCO5261 (ME-NADP⁺) muestra diferencias entre ambas cepas (Figura 35). En la mutante se observan niveles crecientes de RNA hacia la etapa estacionaria. La mediana máxima de la mutante durante la fase de crecimiento lineal es casi un tercio de la mediana máxima de la silvestre.

Además, la mediana máxima de la mutante, obtenida en la fase estacionaria (72 horas) es 1.5 la máxima de la fase de crecimiento lineal (Figura 35B).

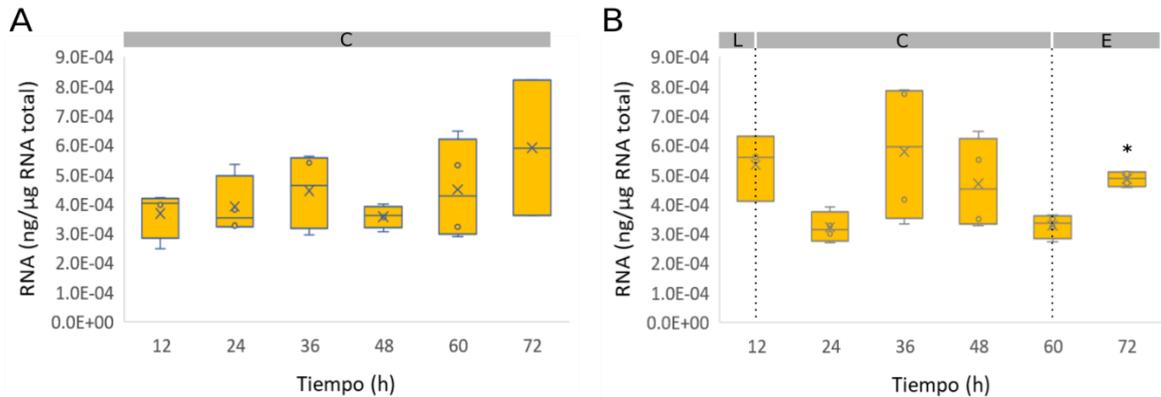


Figura 34. Niveles de RNA mensajero del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$.

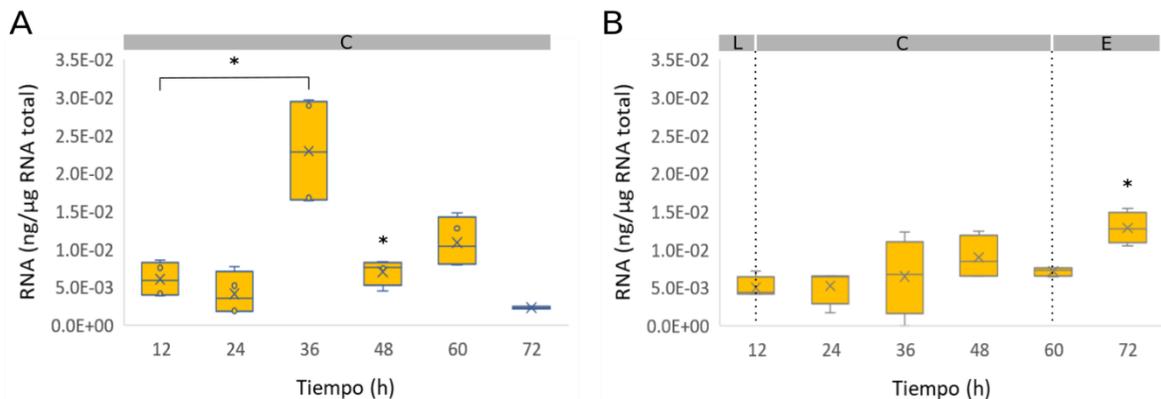


Figura 35. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5261 (ME-NADP⁺) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% fructosa. Se muestran los valores de duplicados biológicos y dos réplicas experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

6.7 Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato piruvato-oxalacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh*, crecida en medio mínimo con casaminoácidos

Al comparar los niveles de RNA mensajero de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato al crecer a *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* con casaminoácidos, en general se observan niveles mayores en la mutante con respecto a los obtenidos para la silvestre. En el caso particular del gen *ppc*, en ambas cepas se observan niveles mayores durante las fases de crecimiento lineal, que disminuyen en la fase lag (Figura 36). En la mutante, las

medianas de las 12 y 36 horas son 18 y 20 veces las obtenidas para la silvestre, respectivamente, en esos mismos puntos. Después de las 36 horas, se observa una disminución a las 48 horas en la mutante, pero se mantienen el mismo nivel de RNA hasta las 72 horas.

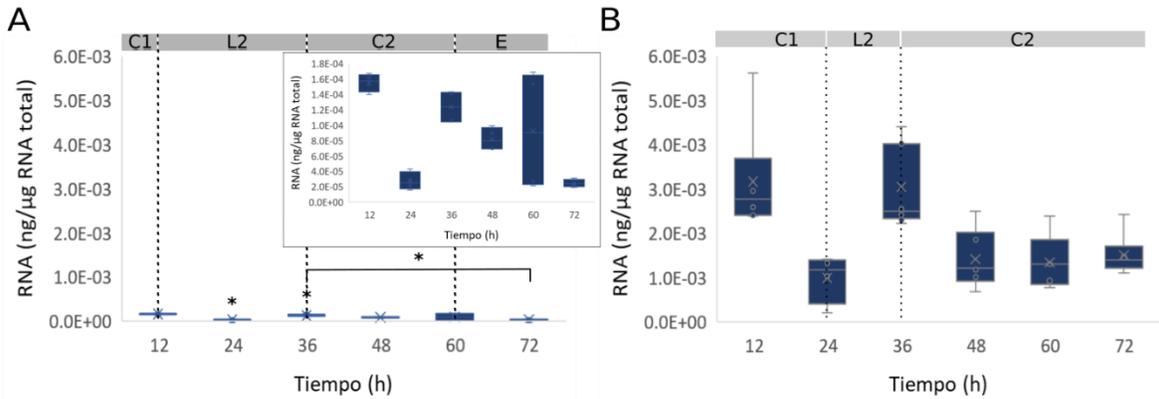


Figura 36. Niveles de RNA mensajero del gen *ppc* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

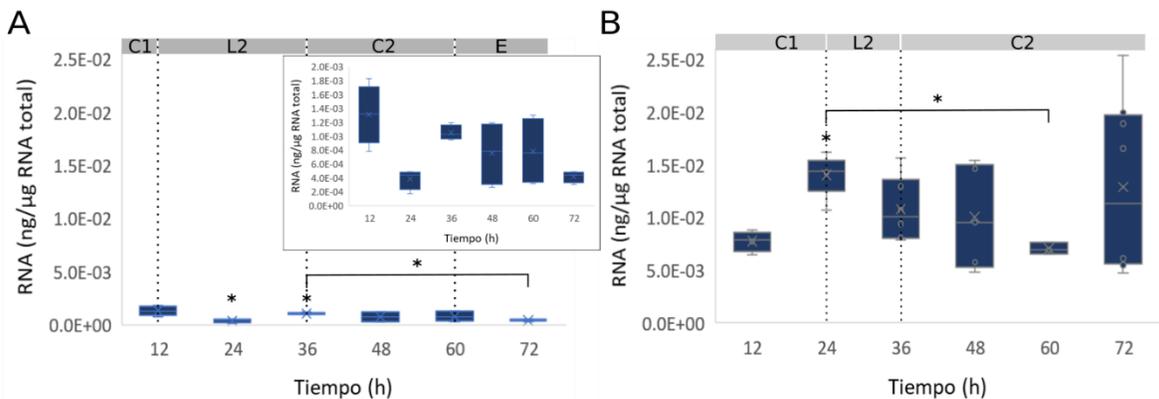


Figura 37. Niveles de RNA mensajero del gen SCO4979 (PEPCK) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

Para el gen SCO4979 (PEPCK), los niveles de RNA mensajero muestran perfiles distintos entre ambas cepas. En la mutante el máximo nivel de RNA se alcanza al final de la primera fase de crecimiento lineal (Figura 37). Este nivel permanece prácticamente sin cambios hasta las 48 horas, y en las 60 horas se observa una disminución estadísticamente

significativa. La mediana de la mutante a las 24 horas es 11 veces la máxima obtenida para la silvestre (12 horas).

En general, los niveles de RNA del gen SCO0546 (PYC) en la mutante son un orden de magnitud mayores a los observados en la silvestre (Figura 38). En la mutante el máximo obtenido fue a las 12 horas, y a partir de ese punto se observa una disminución estadísticamente significativa a las 24 horas (Figura 38B). En específico, la mediana de la mutante a las 12 horas es 70 veces la obtenida para la silvestre a la misma hora. En la mutante, los niveles de RNA se mantuvieron prácticamente sin cambios entre las 24 y las 72 horas.

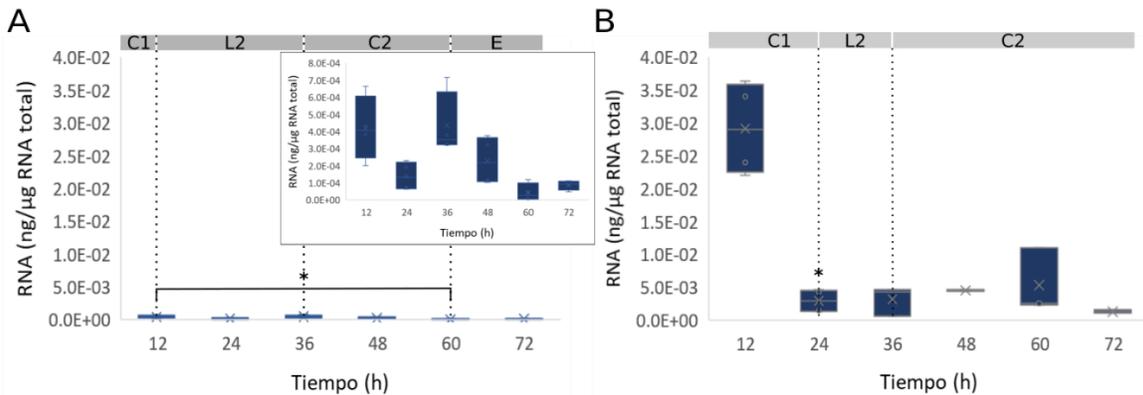


Figura 38. Niveles de RNA mensajero del gen SCO0546 (PYC) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: fase lag (L), fase de crecimiento lineal (C) y fase estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

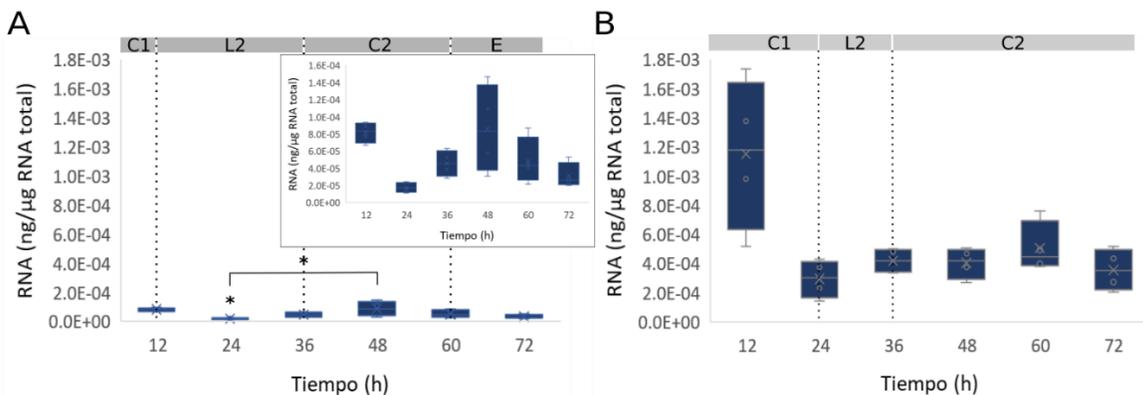


Figura 39. Niveles de RNA mensajero del gen *pyk1* de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas continuas.

En el caso del gen *pyk1* se observa algo similar a lo ocurrido con el gen SCO0546 (PYC) en la mutante, en que el nivel máximo de RNA mensajero de las 12 horas es seguido por una disminución a las 24 horas, y a partir de este punto los niveles de RNA permanecen prácticamente sin cambios (Figura 39B). Además, en general los niveles de RNA del gen *pyk1* en la mutante son un orden de magnitud mayores a los obtenidos para la silvestre (Figura 39). La mediana de la mutante a las 12 horas es 14 veces la mediana del máximo obtenido para la silvestre, también a las 12 horas.

Los perfiles de expresión del gen SCO5896 (PEP-UE) entre ambas cepas son similares, solo que en la mutante la mediana de las 36 horas es más del doble de la obtenida a las 12 horas (Figura 40). Al comparar los niveles de RNA entre ambas cepas, la mediana máxima de la mutante, a las 36 horas, es 12 veces la mediana de la silvestre a la misma hora.

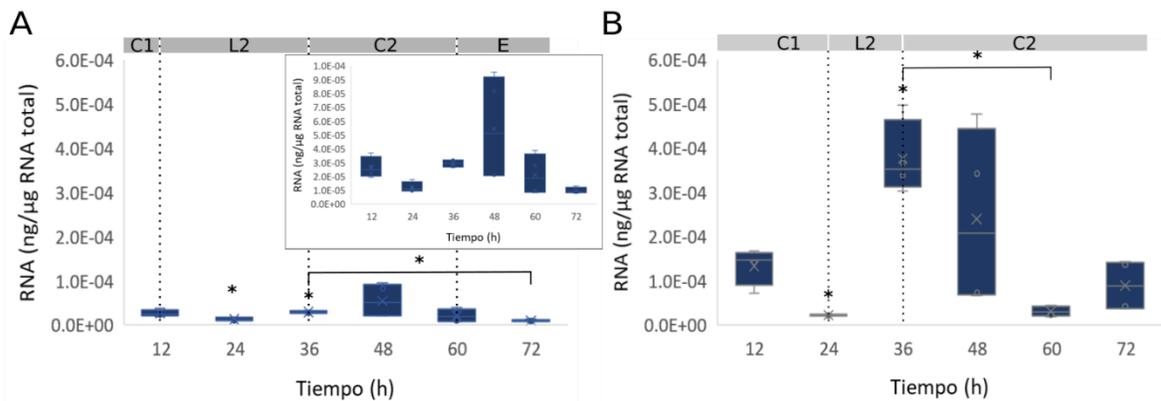


Figura 40. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5896 (PEP-UE) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

También para el gen SCO5261 (ME-NADP⁺), los niveles de RNA mensajero son mayores en la mutante con respecto a los obtenidos para la silvestre (Figura 41). Aun así, en ambas cepas se observan mayores niveles de RNA a las 12 y 36 horas, aunque en la mutante los incrementos son graduales, por lo que no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas entre las distintas horas. Para la mutante, el nivel máximo de RNA en esta condición es el de las 36 horas, que es 21 veces la obtenida para la silvestre a la misma hora. Mientras que, a las 12 horas, la mediana de la mutante es 15 veces la obtenida para la silvestre.

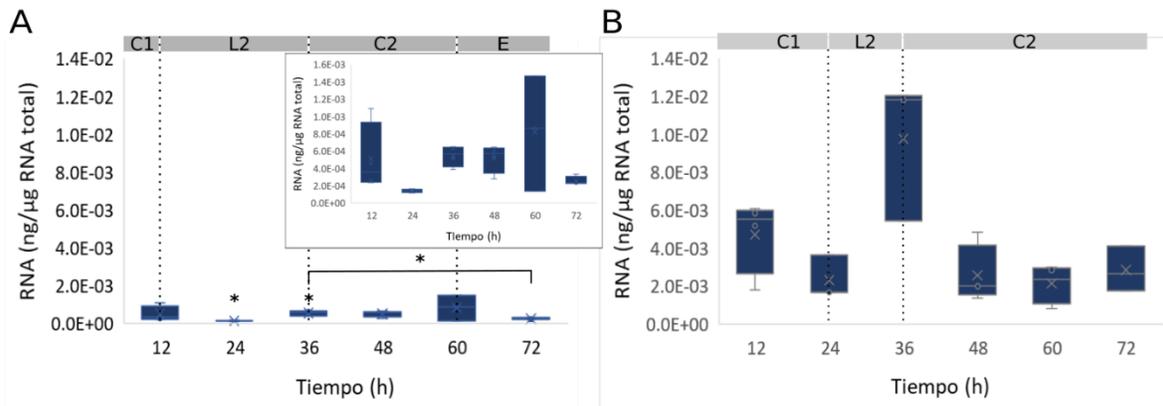


Figura 41. Niveles de RNA mensajero del gen SCO5261 (ME-NADP⁺ dependiente) de *S. coelicolor* **A:** WT y **B:** Δ -*mdh*, crecidas en MM con 1% casaminoácidos (en el inserto en **A** se muestra a detalle el perfil de expresión de la silvestre). Los valores graficados son el resultado de duplicados biológicos y duplicados experimentales en las distintas fases de crecimiento: lag (L), crecimiento lineal (C) y estacionaria (E). Los (*) indican diferencias significativas entre la mediana del punto señalado y la mediana del punto anterior, con $P=0.05$. En los casos en que los puntos no son consecutivos se utilizan líneas para conectarlos.

En la siguiente tabla se presentan, a manera de resumen, las medianas de los niveles de RNA mensajero cuantificados en *S.coelicolor* WT y Δ -*mdh* en las distintas condiciones de cultivo (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de RNA mensajero de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato en *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* a distintas horas de incubación en tres condiciones para fuente de carbono.

Gen	Tiempo (h)	Mediana (ng/ μ g de RNA total)					
		<i>S. coelicolor</i> WT			<i>S. coelicolor</i> Δ - <i>mdh</i>		
		MM+Glu	MM+Fru	MM+Cas	MM+Glu	MM+Fru	MM+Cas
SCO3127 (<i>ppc</i>)	12	9.9E-03	3.4E-06	1.6E-04	3.7E-03	3.3E-03	2.8E-03
	24	9.1E-03	4.0E-03	2.5E-05	2.2E-03	2.7E-03	1.2E-03
	36	1.7E-02	1.7E-02	1.2E-04	1.9E-03	3.8E-03	2.5E-03
	48	2.4E-03	2.5E-04	8.0E-05	1.2E-03	6.5E-03	1.2E-03
	60	2.3E-03	6.8E-03	9.0E-05	1.5E-03	4.1E-03	1.3E-03
	72	4.1E-03	8.2E-04	2.4E-05	9.6E-04	4.8E-03	1.4E-03
SCO4979 (PEPCK)	12	2.3E-04	4.1E-03	1.3E-03	1.0E-03	2.5E-03	7.9E-03
	24	1.7E-04	6.7E-03	4.4E-04	1.1E-03	1.1E-03	1.4E-02
	36	4.2E-04	1.5E-02	1.0E-03	1.7E-03	1.9E-03	1.0E-02
	48	7.3E-04	9.7E-03	7.8E-04	2.0E-03	2.2E-03	9.5E-03
	60	1.4E-03	6.4E-03	7.6E-04	2.4E-03	1.1E-03	7.0E-03
	72	3.0E-03	2.8E-03	4.4E-04	2.8E-03	3.3E-03	1.1E-02
SCO5896 (PEP-UE)	12	1.9E-03	5.4E-02	2.5E-05	9.0E-04	3.1E-03	1.5E-04
	24	6.4E-04	1.5E-02	1.1E-05	6.3E-04	1.9E-03	2.1E-05
	36	8.7E-04	1.7E-01	3.0E-05	4.9E-03	2.9E-03	3.5E-04
	48	6.0E-03	1.7E-02	5.1E-05	2.0E-03	8.1E-03	2.1E-04

	60	4.6E-03	2.5E-02	1.9E-05	2.0E-03	4.5E-03	2.8E-05
	72	7.7E-03	2.7E-03	9.1E-06	1.9E-03	1.3E-02	8.8E-05
SCO0546 (PYC)	12	1.3E-03	9.6E-03	4.1E-04	3.8E-03	6.6E-03	2.9E-02
	24	2.6E-03	1.1E-02	1.3E-04	5.1E-03	8.4E-03	2.9E-03
	36	3.5E-03	3.8E-02	3.5E-04	2.1E-02	8.3E-03	4.3E-03
	48	5.0E-03	1.7E-02	2.2E-04	5.7E-03	1.9E-02	4.4E-03
	60	3.7E-03	1.6E-02	2.5E-05	5.6E-03	8.8E-03	2.5E-03
	72	6.3E-03	1.9E-03	9.3E-05	6.2E-03	8.0E-03	1.3E-03
SCO2014 (<i>pyk1</i>)	12	2.3E-03	1.4E-02	8.4E-05	2.9E-03	4.2E-03	1.2E-03
	24	3.7E-03	1.4E-02	1.7E-05	3.8E-03	4.8E-03	3.0E-04
	36	3.6E-03	3.1E-02	4.6E-05	7.6E-03	5.4E-03	4.2E-04
	48	5.3E-03	1.5E-02	8.4E-05	5.3E-03	1.2E-02	4.2E-04
	60	6.7E-03	1.8E-02	4.3E-05	5.1E-03	7.9E-03	4.5E-04
	72	1.2E-02	8.0E-03	2.6E-05	4.0E-03	2.0E-02	3.5E-04
SCO0208 (PYPDK)	12	9.7E-04	1.3E-05	3.7E-05	1.3E-02	2.5E-02	N/C
	24	7.9E-04	1.6E-04	3.1E-04	3.3E-03	6.6E-03	N/C
	36	1.6E-03	5.4E-04	2.6E-03	1.9E-03	9.1E-03	N/C
	48	9.0E-04	2.6E-04	1.1E-03	6.3E-04	1.4E-02	N/C
	60	2.5E-03	2.7E-05	1.3E-03	4.0E-03	4.1E-03	N/C
	72	3.4E-03	3.0E-05	1.0E-03	1.6E-03	1.4E-02	N/C
SCO2951 (ME-NAD ⁺)	12	1.1E-04	4.0E-04	2.8E-04	3.0E-04	5.6E-04	N/C
	24	1.4E-04	3.5E-04	7.7E-05	3.2E-04	3.1E-04	N/C
	36	2.7E-04	4.6E-04	1.4E-04	5.7E-04	6.0E-04	N/C
	48	7.3E-05	3.6E-04	7.7E-05	3.6E-04	4.5E-04	N/C
	60	1.0E-04	4.3E-04	9.6E-05	2.5E-04	3.4E-04	N/C
	72	1.5E-04	5.9E-04	5.7E-05	2.5E-04	4.9E-04	N/C
SCO5261 (ME-NADP ⁺)	12	1.6E-03	5.8E-03	3.6E-04	1.3E-03	4.3E-03	5.5E-03
	24	3.8E-03	3.5E-03	1.4E-04	2.5E-03	6.4E-03	1.7E-03
	36	1.9E-02	2.3E-02	5.7E-04	2.5E-03	6.7E-03	1.2E-02
	48	3.9E-03	7.6E-03	5.7E-04	2.4E-03	8.5E-03	2.0E-03
	60	7.5E-03	1.0E-02	8.7E-04	2.5E-03	7.3E-03	2.4E-03
	72	4.7E-03	2.3E-03	2.3E-04	2.1E-03	1.3E-02	2.6E-03

NOTA: Medio mínimo (MM), glucosa (Glu), fructosa (Fru), casaminoácidos (Cas), no se detectó RNA mensajero (N/C).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de *S. coelicolor* WT en medio mínimo

La glucosa es considerada una fuente de carbono preferente para *Streptomyces*¹⁰, lo que concuerda con lo observado al evaluar el incremento de la biomasa con respecto al tiempo. El máximo de biomasa con glucosa fue cuatro y diez veces el máximo observado con casaminoácidos y con fructosa, respectivamente. En lo que respecta a los perfiles de crecimiento, las distintas fases de la curva con glucosa corresponden a lo esperado. Sin embargo, con fructosa creció muy poco en comparación con las otras dos condiciones. Es de llamar la atención si consideramos que la glucosa es transformada en fructosa en las primeras reacciones de la glucólisis; las posibles causas serán discutidas más adelante.

Los casaminoácidos representan una fuente de carbono mixta. La mezcla de casaminoácidos DIFCO es el resultado de un proceso de hidrólisis química que causa la destrucción de triptófano y cisteína, la disminución de serina y treonina y la descomposición de asparagina y glutamina en ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente¹⁹. Lo anterior se ha confirmado en análisis experimentales, en los que no se detectaron ni glutamina ni asparagina, mientras que la arginina y la cisteína no se pudieron cuantificar²⁰. En estos estudios se ha observado que la cantidad específica de cada uno varía entre diferentes lotes, y aun así, los que se encuentran en mayor proporción son glutamato, prolina, aspartato y leucina (se enlistan en orden de mayor a menor abundancia)²⁰.

En *Streptomyces* se ha observado que algunos aminoácidos pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno, mientras otros sólo sirven como fuente de nitrógeno¹⁰. En *S. coelicolor* en específico, previamente observamos crecimiento con ácido glutámico como única fuente de carbono²¹. En otros estudios, en los que se suplementó el medio con ácido glutámico y maltosa, se obtuvo una curva de crecimiento diaúxico, con una primera fase de crecimiento lineal basada en ácido glutámico y una segunda fase de crecimiento lineal basada en maltosa y amonio¹³. Una situación similar se ha reportado para el crecimiento de *S. lividans*, en el que al monitorear el crecimiento con casaminoácidos y glucosa se observó un consumo preferente de glutamato sobre el resto de los aminoácidos utilizables como fuente de carbono²⁰.

Lo anterior apoya lo que observamos para el crecimiento de *S. coelicolor* WT en MM suplementado con casaminoácidos. La curva de crecimiento obtenida sugiere una primera fase de crecimiento lineal con glutamato como fuente de carbono y una segunda fase de crecimiento lineal basada en prolina (también como fuente de carbono), si consideramos

que son los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción en el medio y que pueden ser utilizados por *Streptomyces* como fuente de carbono¹⁰. Además, en la segunda fase de crecimiento lineal se observa un máximo de biomasa que es solo una fracción del máximo de biomasa de la primera fase de crecimiento lineal (aproximadamente el 40%). Lo anterior concuerda con el hecho de que la cantidad de glutamato disponible en la mezcla inicial de casaminoácidos es tres veces la cantidad disponible de prolina²⁰. Otra posibilidad sería que el crecimiento de la segunda fase lineal se deba a un conjunto de fuentes de carbono, cuyas bajas concentraciones, no permiten que se observen los puntos de transición metabólica en la curva de crecimiento, pero que son la razón por la que el crecimiento es más lento.

7.2 Efecto de la fuente de carbono en los niveles de RNA mensajero de los genes del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT

Para determinar la función de un gen existen diversas estrategias que permiten aproximaciones a distintos niveles. En una de ellas se utiliza como punto de partida una secuencia de DNA identificada como un gen probable. En el proceso de análisis de dicha secuencia, se buscan genes con secuencia similar de una función conocida, lo que permite predecir la función para el gen de interés. Este tipo de análisis se conoce como “búsqueda de homología” y es la base metodológica para la anotación de genomas³⁷.

Otra estrategia para determinar la función de genes es utilizar los patrones o perfiles de expresión como base. Al igual que con las secuencias de nucleótidos, se analiza el perfil de expresión de un gen o grupo de genes cuya función se desconoce, tomando como referencia perfiles de genes de función conocida. Este tipo de análisis se conoce como “análisis en grupo”. Con esta técnica se pueden identificar grupos de genes cuyos niveles de expresión aumentan o disminuyen coordinadamente en una variedad de circunstancias. La función de un gen se puede deducir al identificar genes con los que comparte el mismo patrón de expresión. Las proteínas codificadas por estos genes podrían participar en un mismo proceso celular o bien formar parte del mismo complejo proteico. Esta estrategia ha sido utilizada para analizar perfiles de expresión de grupos de genes que subyacen a procesos celulares complejos³⁷.

En el presente estudio se generaron los perfiles de expresión de los ocho genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*, a partir de los resultados de la cuantificación absoluta del RNA mensajero de cada uno de ellos, en función del tiempo. Estos, sumados a la cuantificación del crecimiento, nos permitieron contrastar los cambios en los niveles de RNA con respecto a las distintas fases del crecimiento. Además, los genes

del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* para los que se ha determinado la función de las proteínas codificadas en estudios previamente publicados se utilizaron como referencia para analizar los perfiles de expresión de aquellos para los que sólo se ha asignado una función por homología.

Para la enzima codificada por el gen *ppc* (SCO3127), la fosfoenolpiruvato carboxilasa, Bramwell y colaboradores reportaron actividad en extractos libres de células, durante la fase estacionaria del crecimiento de *S. coelicolor* A3(2) 1147 en cultivos suplementados con glucosa²⁹. Contrasta con lo anterior que nosotros observamos el nivel máximo de RNA mensajero durante la fase de crecimiento lineal de *S. coelicolor* WT con glucosa, que además es el máximo registrado para ese gen en todas las muestras analizadas. Los niveles de transcrito durante la fase estacionaria, siete veces menores a los de la fase de crecimiento lineal, podrían ser suficientes para detectar la actividad reportada por Bramwell y colaboradores durante la fase estacionaria. Sin embargo, los altos niveles de RNA de este gen durante la fase de crecimiento lineal con glucosa, sugieren actividad de la enzima durante esta fase. Considerando los altos niveles de RNA del gen *ppc* con glucosa, la enzima codificada por este gen podría ser importante para el crecimiento de *S. coelicolor* en esta condición.

Además, los perfiles de expresión para el gen *ppc* en las otras dos condiciones (con fructosa y casaminoácidos) son similares al obtenido con glucosa. En estas tres condiciones se observa que los máximos niveles de RNA mensajero son los que corresponden a la fase de crecimiento lineal. Lo que podría sugerir una contribución importante de la enzima codificada por este gen en la generación de oxaloacetato durante la fase de crecimiento lineal, que podría alimentar el ciclo del ácido cítrico, o bien utilizarse para la síntesis de aminoácidos⁷ cumpliendo una función anaplerótica. Cabe destacar que mientras el máximo con glucosa es ligeramente mayor al obtenido con fructosa, estos dos son mucho mayores al máximo obtenido con casaminoácidos, de tal forma que los niveles de expresión son mayores en condiciones glucolíticas al compararlos con los obtenidos en condiciones gluconeogénicas.

Para el gen *pyk1* (SCO2014), que codifica para la piruvato cinasa, enzima que cataliza la última reacción de la glucólisis, se observaron niveles mayores de RNA en condiciones glucolíticas, con respecto a condiciones gluconeogénicas, lo que corresponde a lo esperado⁵. El perfil de expresión de este gen para los cultivos con fructosa y casaminoácidos es similar al descrito para el gen anterior. De hecho, con fructosa este nivel máximo se alcanzó también a las 36 horas, mientras que con casaminoácidos los máximos

fueron los obtenidos en ambas fases de crecimiento lineal. La gran diferencia es el perfil con glucosa, en que además se obtuvo el nivel máximo de RNA.

De nuevo, los altos niveles con fructosa corresponden a lo esperado para un gen que codifica para una enzima que participa en la glucólisis^{5,7,10}. Sin embargo, el nivel de transcrito obtenido a las 36 horas con glucosa, que es un tercio del máximo obtenido durante la fase estacionaria, es de llamar la atención. Durante la fase de crecimiento lineal estos niveles de RNA podrían ser suficientes para que la enzima codificada cumpla la función esperada, pero mayores niveles durante la fase estacionaria sugieren una función anaplerótica de la enzima codificada, ya que el piruvato es un precursor en la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor*, cuya síntesis corresponde a lo esperado durante la fase estacionaria^{5,7,13}.

En los cultivos con casaminoácidos, los niveles máximos de RNA para el gen *pyk1* observados durante las dos fases de crecimiento lineal son de llamar la atención para un gen que codifica para una enzima glucolítica^{5,7,10}. Al crecer a *S. lividans* con casaminoácidos, se observó una gran síntesis y secreción de alanina al medio, además de secreción de otros compuestos como piruvato y ácido succínico²⁰. El motivo para que estos compuestos sean secretados al medio no se aclaró en dichos estudios. En *S. alboniger*, se observó que la acumulación de ácidos orgánicos indujo un envenenamiento metabólico que reprimió la formación del micelio aéreo¹⁰. Por lo anterior, una posibilidad es que durante la fase de crecimiento lineal de *S. coelicolor* con casaminoácidos se presente un fenómeno similar al observado para *S. lividans* y se secreten al medio piruvato y alanina, entre otros compuestos. En este contexto, los altos niveles de RNA del gen *pyk1* sugieren que la piruvato cinasa podría ser la enzima responsable de generar dicho piruvato, que podría ser secretado, además de utilizarse como precursor para la síntesis de alanina, que también podría ser secretada.

En lo que respecta a los genes SCO4979 y SCO0546, de acuerdo a la función predicha por homología, la fosfoenolpiruvato carboxinasas (SCO4979) y la piruvato carboxilasa (SCO0546) catalizarían las primeras reacciones de la gluconeogénesis^{7,14}, por lo que no se esperaría observar expresión de estos genes durante la fase de crecimiento lineal con fuentes de carbono glucolíticas^{5,7}. Contrasta con lo anterior que los perfiles de expresión para ambos genes son similares a los obtenidos para el gen *pyk1*, que codifica para una enzima glucolítica. Es decir, el perfil de expresión con glucosa muestra niveles de RNA crecientes hacia la etapa estacionaria, mientras que con fructosa y casaminoácidos los máximos obtenidos fueron aquellos que corresponden a las fases de crecimiento lineal.

Lo anterior sugiere que la enzima codificada por el gen SCO0546, la piruvato carboxilasa, genera oxaloacetato a partir de piruvato^{5,7}, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxinasa (SCO4979) utiliza al oxaloacetato como sustrato para generar fosfoenolpiruvato^{5,7} durante la fase de crecimiento lineal, tanto con fuentes de carbono glucolíticas como con fuentes de carbono gluconeogénicas.

Es importante destacar que los niveles de transcrito del gen SCO4979 (PEPCK) son mayores con casaminoácidos que aquellos obtenidos con glucosa, lo que tendría sentido para la expresión de un gen que codifica para una enzima gluconeogénica^{5,7,10}. Se suma a lo anterior que los niveles máximos de RNA para este gen durante el crecimiento lineal con casaminoácidos son similares a los observados durante la fase estacionaria con glucosa. Esto corresponde con el hecho de que durante el crecimiento con casaminoácidos se esperaría que el flujo del carbono se dirija desde el ciclo del ácido cítrico hacia la gluconeogénesis, mientras que para los cultivos con glucosa el flujo del carbono descrito sería lo esperado durante la fase estacionaria^{7,10,13}.

En lo que respecta a los cultivos con fructosa, los altos niveles de RNA del gen SCO4979 (PEPCK) podrían estar relacionados con el hecho de que esta fuente de carbono es transportada al interior de la célula por el sistema fosfotransferasa que requiere PEP en *S. coelicolor*^{10,17}. El perfil de expresión de este gen sugiere que la enzima codificada, la fosfoenolpiruvato carboxinasa, genera fosfoenolpiruvato durante la fase de crecimiento lineal de *S. coelicolor* con fructosa.

Se observa un caso similar para los niveles de RNA del gen SCO0546, que codifica para la piruvato carboxilasa; durante la fase de crecimiento lineal los mayores niveles fueron los obtenidos con fructosa, seguidos por los obtenidos con glucosa y casaminoácidos. En el caso de los cultivos con fructosa, los altos niveles del gen SCO0546 sugieren que la piruvato carboxilasa genera oxaloacetato durante la fase de crecimiento lineal, que podría ser utilizado como sustrato por la fosfoenolpiruvato carboxinasa (SCO4979), apoyando lo discutido en el párrafo anterior.

Por otra parte, contrario a lo esperado para el gen SCO0546 (PYC)^{5,10}, los niveles de transcrito son mayores durante el crecimiento lineal con glucosa con respecto a los obtenidos en la misma fase con casaminoácidos. En este caso, no se puede considerar al sistema fosfotransferasa debido a que no es el sistema principal de transporte de glucosa¹⁵. Por lo tanto, los altos niveles con glucosa sugieren que la enzima codificada, la piruvato carboxilasa, genera oxaloacetato durante la fase de crecimiento lineal en esta condición. Este oxaloacetato podría ser utilizado para la síntesis de aminoácidos, lo que implica una

función anaplerótica de la enzima codificada en condiciones glucolíticas^{7,8}. Los menores niveles de expresión con casaminoácidos apoyan lo anterior ya que en esta condición no se requeriría la síntesis de aminoácidos durante la fase de crecimiento lineal^{5,10}.

Para el gen que codifican para la enzima málica NAD⁺ dependiente³¹, SCO2951, se obtuvieron niveles de RNA mensajero con el mismo orden de magnitud en las tres condiciones. Esto sugiere que el gen SCO2951 se expresa durante el crecimiento de *S. coelicolor* WT, independientemente de la fuente de carbono utilizada. Para el perfil de expresión con fructosa solo se observan pequeñas variaciones en los niveles de RNA, por lo que se podría decir que la expresión es constitutiva. Lo anterior se podría deber a que la fructosa no es considerada una fuente de carbono represora¹⁰. No ocurre lo mismo con los perfiles de expresión con glucosa y casaminoácidos, cuyos niveles de RNA aumentan durante las fases de crecimiento lineal, similares a los descritos en las mismas condiciones para el gen *ppc*. Esto sugiere que la enzima málica codificada por el gen SCO2951 (ME-NAD⁺) genera piruvato durante la fase del crecimiento lineal, tanto en condiciones glucolíticas como en condiciones gluconeogénicas.

En el caso del gen SCO5261, que codifica para la enzima málica NADP⁺ dependiente³¹, los perfiles de expresión son similares a los obtenidos para el gen *pyk1*, con niveles de RNA crecientes hacia la etapa estacionaria con glucosa y niveles máximos de RNA con casaminoácidos durante las fases de crecimiento lineal. También para el gen SCO5261 (ME-NADP⁺), los niveles de expresión son mayores en condiciones glucolíticas que aquellos obtenidos en condiciones gluconeogénicas. Todo lo anterior sugiere que la enzima málica NADP⁺ dependiente genera piruvato durante la fase de crecimiento lineal en las tres condiciones. Adicionalmente, mayores niveles de RNA para este gen durante la fase estacionaria con glucosa sugieren que la enzima málica NADP⁺ dependiente podría cumplir una función anaplerótica en esta fase y condición, considerando que el piruvato es un precursor en la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor*^{13,31}.

En la revisión hecha por Keulen y colaboradores, se detallan las vías del metabolismo central del carbono en *Streptomyces* y se enlistan las enzimas de cada vía junto con el número de copias de genes que las codifican, en distintas especies de estreptomicetos⁵. Para el caso de la gluconeogénesis, se incluye a la PEP sintasa, y se señalan dos genes probables para el caso de *S. coelicolor* con base en lo reportado en la base de datos KEGG⁵. En nuestra búsqueda en la misma base de datos, la reacción que va de piruvato a fosfoenolpiruvato puede ser catalizada por dos tipos de enzimas, la piruvato

fosfato dicinasa (SCO0208 y SCO2494), y la enzima utilizadora de PEP (SCO5896, KEGG: Emisión 80.1, Noviembre 1, 2016)⁷.

El perfil de expresión del gen SCO0208 (PYPDK) con glucosa muestra cierta similitud con el perfil de expresión del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) en esta misma condición. En ambos casos, durante la fase de crecimiento lineal se alcanza el nivel máximo de RNA a las 36 horas y a partir de las 48 horas se observa un segundo incremento hacia el final del periodo de incubación. Estos niveles de expresión sugieren que la enzima codificada, la piruvato fosfato dicinasa, genera fosfoenolpiruvato durante la fase de crecimiento lineal de *S. coelicolor* con glucosa. En esta condición, el fosfoenolpiruvato podría ser utilizado como precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos, cumpliendo una función anaplerótica^{7,8}. En lo que respecta al incremento en los niveles de RNA durante de fase estacionaria con glucosa, podría responder a que lo esperado durante esta fase es que el flujo del carbono se dirija hacia la gluconeogénesis y la enzima codificada, la piruvato fosfato dicinasa, es considerada gluconeogénica^{5,10,13}.

Para el caso de los cultivos con fructosa, el perfil de expresión del gen SCO0208 (PYPDK) es similar al de la mayoría de los genes analizados, con un punto máximo de RNA a las 36 horas. De nuevo, los altos niveles de RNA sugieren que la enzima codificada genera fosfoenolpiruvato durante la fase de crecimiento lineal en esta condición; este compuesto podría ser utilizado por el sistema fosfotransferasa para el transporte de la fructosa¹⁷.

Finalmente, en el perfil de expresión de este gen con casaminoácidos, se observa un nivel máximo de RNA sólo durante la segunda fase de crecimiento lineal, lo que contrasta con lo observado para el resto de los genes analizados en esta condición, con máximos niveles de RNA en ambas fases del crecimiento lineal. Cabe destacar que la primera fase del crecimiento lineal podría estar fundamentada en ácido glutámico. Estudios previos de proteómica de *S. coelicolor*, sólo se detectó a la proteína correspondiente al gen SCO0208 (PYPDK) después de 30 horas de cultivo, al crecerla en fermentadores con medio suplementado con glucosa y glutamato⁹. Además, se ha observado que en *S. coelicolor* el ácido glutámico es consumido antes que la glucosa^{20,38}. Todo lo anterior sugiere que el ácido glutámico podría tomar parte de un mecanismo que regula la expresión del gen SCO0208 (PYPDK), ya sea que en presencia de este compuesto no se induce la expresión de dicho gen, o bien se reprime.

En el caso del gen SCO5896 (PEP-UE), los perfiles de expresión con fructosa y casaminoácidos son similares a los obtenidos para el gen *ppc*, con niveles máximos de

RNA en las fases de crecimiento lineal. Estos niveles de expresión sugieren que la enzima utilizadora de PEP genera fosfoenolpiruvato durante la fase de crecimiento lineal con fructosa y también podría alimentar al sistema fosfotransferasa, sumándose a la acción de la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208). La propuesta de esta función anaplerótica es apoyada por el hecho de que el nivel máximo de RNA del gen SCO5896 (PEP-UE) fue el obtenido con fructosa, como ha sucedido con la mayoría de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*, seguido por el de glucosa y finalmente el de casaminoácidos (que fue mucho menor), todos durante la fase de crecimiento lineal en las distintas fuentes de carbono.

Además, los perfiles de expresión del gen SCO5896 (PEP-UE) con glucosa muestran niveles decrecientes de RNA entre las 12 y las 36 horas, para los que no es posible determinar diferencias estadísticamente significativas, lo que podría significar que los niveles de expresión se mantienen constantes durante las primeras 36 horas de incubación en esta condición. Niveles de expresión menores en glucosa con respecto a los de fructosa apoyan lo expuesto en el párrafo anterior, ya que con glucosa no se requiere el sistema fosfotransferasa. A partir de las 48 horas en esta condición se observa un incremento durante la fase estacionaria que sugiere que la enzima codificada, la enzima utilizadora de PEP, genera fosfoenolpiruvato durante la fase estacionaria del crecimiento de *S. coelicolor* con glucosa, lo que es congruente con lo esperado para esta fase del crecimiento en que se lleva a cabo la gluconeogénesis^{5,7,10}.

Por su parte, los pequeños niveles de RNA de este gen durante la fase de crecimiento lineal con casaminoácidos, son mayores a los observados en fase estacionaria. Dichos niveles de RNA indican que la enzima utilizadora de PEP (SCO5896) cumple la función esperada durante la fase de crecimiento lineal en condiciones gluconeogénicas^{5,7,10}.

Si consideramos a los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT en conjunto, observaremos que algunos tienen niveles de RNA mensajero mayores con respecto al resto en una fase de crecimiento específica, y que además éstos varían con la fuente de carbono. En el caso de lo observado durante la fase de crecimiento lineal de la silvestre con glucosa, los genes con mayores niveles de RNA son (de mayor a menor): SCO5261 (ME-NADP⁺), *ppc*, *pkyl* y SCO0546 (PYC); estos dos últimos con niveles similares de RNA (Figura 42A). Además, podríamos agregar al SCO0208 (PYPDK), considerando que la mediana del nivel máximo con glucosa es muy cercana a la mediana máxima obtenida al considerar todas las condiciones (1.6 veces).

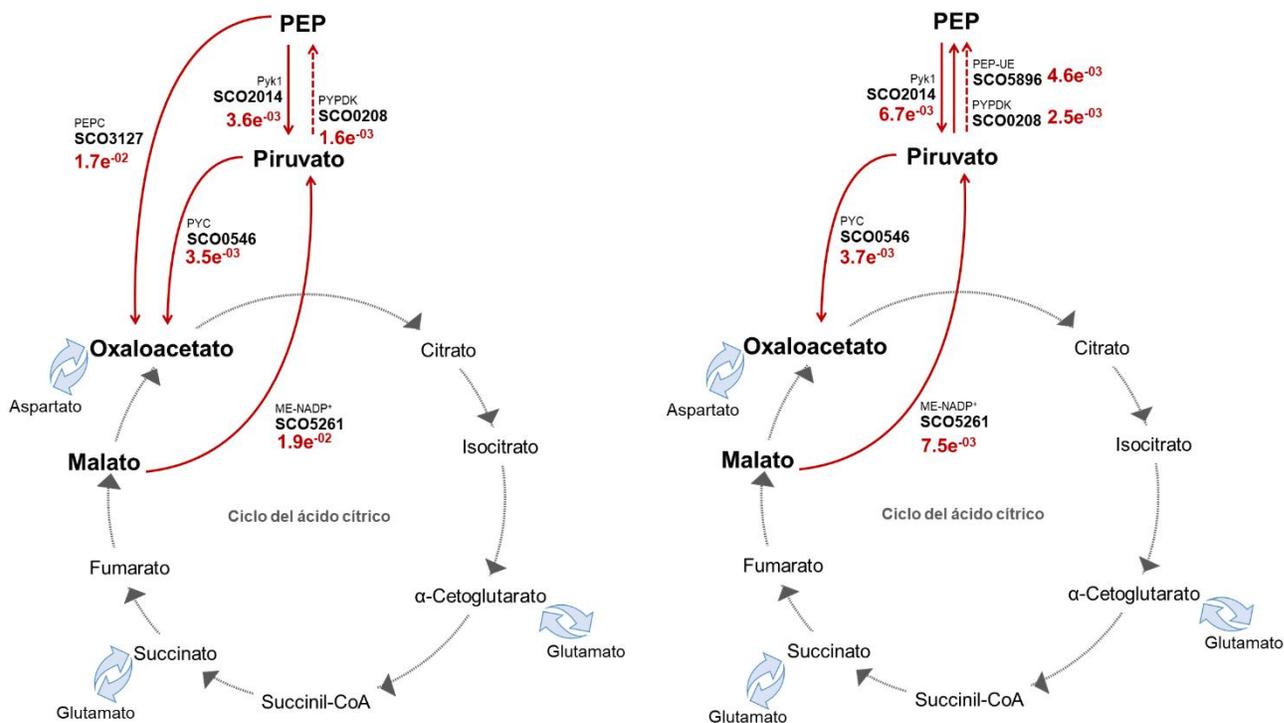


Figura 42. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT. Las líneas continuas identifican a los genes con mayores niveles de RNA mensajero en cultivos con glucosa durante **A**: la fase de crecimiento lineal y **B**: la fase estacionaria. Los números al lado del identificador de cada gen señalan la cantidad de RNA mensajero. Las líneas discontinuas identifican al gen cuyos niveles de RNA mensajero en esta condición son cercanos al máximo registrado.

En *C. glutamicum*, también crecida con glucosa, se ha reportado flujo simultáneo del carbono a través de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la piruvato carboxilasa. En dicho estudio, se observó que el oxaloacetato generado por estas dos enzimas fue tres veces el necesario para reacciones de biosíntesis y que el excedente se recicló a fosfoenolpiruvato por acción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas²⁸. En nuestro caso, podría estar sucediendo una dinámica similar en la fase de crecimiento lineal con glucosa, en que tanto la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) como la piruvato carboxilasa (SCO0546) generen oxaloacetato simultáneamente. Por lo tanto, las enzimas codificadas por los genes *ppc* y SCO0546 podrían cumplir varias funciones, dependiendo de la vía que tome el oxaloacetato producido por éstas: una es alimentando al ciclo del ácido cítrico directamente, lo que constituye una vía alternativa de la glucólisis hacia el ciclo del ácido cítrico; otra es que el oxaloacetato sea utilizado para la síntesis de aminoácidos⁷, cumpliendo una función anaplerótica⁸; y finalmente otra generando poder reductor. En esta última vía, podría participar la malato deshidrogenasa, al catalizar la reacción en que el oxaloacetato se transforma en malato⁷ y este, por acción de las enzimas málicas (SCO2951 y SCO5261),

de nuevo en piruvato³¹. En este paso, la acción de las enzimas málicas generaría poder reductor en la forma de NADH y NADPH, como resultado de la descarboxilación oxidativa del malato³¹. A continuación, el piruvato podría reciclarse a fosfoenolpiruvato, por acción de la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) y de éste de nuevo a oxaloacetato por acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*). Los altos niveles del gen *ppc* sugieren el uso de esta vía para la generación del oxaloacetato, además de que a diferencia de la piruvato carboxilasa (SCO0546), esta enzima no consume ATP^{7,18}.

Durante la fase estacionaria, también con glucosa, los genes con los niveles de RNA mensajero más altos varían poco (Figura 42B): se mantienen el gen SCO5261 (ME-NADP⁺), seguido por el gen *pyk1* y el SCO0546 (PYC). En esta fase, a diferencia de la fase de crecimiento lineal, se incluye el gen SCO5896 (PEP-UE) con un nivel de RNA mayor al del gen SCO0546 (PYC). Además, se incluiría de nuevo el gen SCO0208 (PYPDK), considerando que la mediana del máximo en esta fase es un tercio del nivel máximo registrado para este gen. Durante la fase estacionaria del crecimiento con glucosa se esperaría un redireccionamiento del flujo del carbono hacia la gluconeogénesis^{5,10,13}. Los genes para los que se obtuvieron los mayores niveles de expresión en esta fase y condición sugieren que este redireccionamiento podría llevarse a cabo a través de las reacciones catalizadas por la enzima málica NADP⁺ dependiente (SCO5261), la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) y/o la enzima utilizadora de PEP (SCO5896), además de a través del ciclo generador de poder reductor propuesto en el párrafo anterior, en el que podrían participar la piruvato cinasa (*pky1*), la piruvato carboxilasa (SCO0546), la malato deshidrogenasa (*mdh*) y la enzima málica NADP⁺ dependiente (SCO5261). Por otro lado, los altos niveles de expresión del gen *pyk1*, también podrían sugerir que la piruvato cinasa dirige parte del flujo del carbono hacia piruvato, para suministrar precursores para la síntesis de antibióticos, cumpliendo una función anaplerótica.

Al considerar los genes con mayores niveles de RNA mensajero en cultivos suplementados con fructosa, hay que destacar que en esta condición solo se observó fase de crecimiento lineal, sin que se alcanzara la fase estacionaria en las 72 horas de incubación. Los genes con los mayores niveles son los que corresponden a los SCO5896 (PEP-UE), SCO0546 (PYC), *pyk1*, SCO5261 (ME-NADP⁺), *ppc* y SCO4979 (PEPCK, Figura 43). Los altos niveles de RNA mensajero observados para los genes SCO5896 (PEP-UE), SCO5261 (ME-NADP⁺) y SCO4979 (PEPCK) sugieren la participación conjunta de las enzimas codificadas para suministrar el fosfoenolpiruvato necesario para el transporte de la fructosa a través del sistema fosfotransferasa¹⁷. Lo anterior podría realizarse

a través de dos vías, una que involucra a la fosfoenolpiruvato carboxicinasas (SCO4979)^{5,7} y otra vía a través de la enzima málica NADP⁺ (SCO5261) y la enzima utilizadora de PEP (SCO5896).

En lo que respecta al gen *pyk1*, que se incluya en este grupo de genes, corresponde a lo esperado en condiciones glucolíticas^{5,7}. Sin embargo, que los altos niveles de expresión de este gen con fructosa sean mucho mayores a los observados con glucosa en la misma fase, sumados a los altos niveles de expresión del gen SCO0546 (PYC), sugieren que las enzimas codificadas podrían participar en la vía para generar poder reductor previamente descrita, junto con la malato deshidrogenasa (*mdh*) y la enzima málica NADP⁺ (SCO5261).

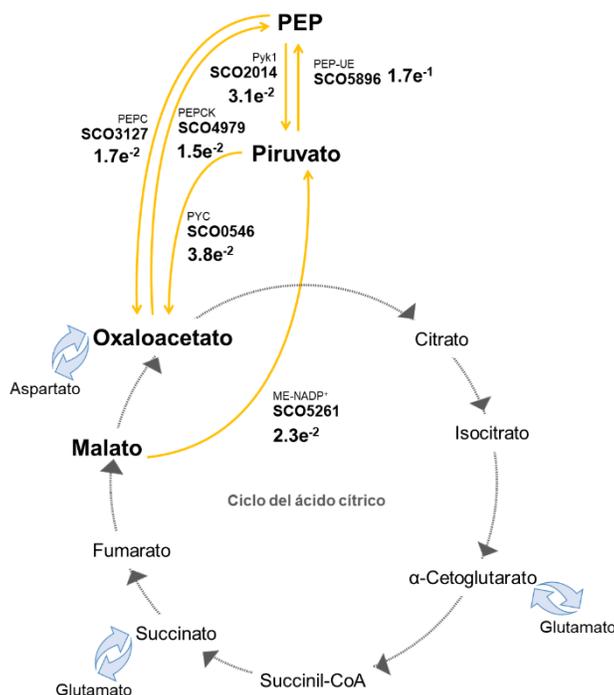


Figura 43. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT. Las líneas continuas identifican a los genes con mayores niveles de RNA mensajero en la fase de crecimiento lineal con fructosa. Los números al lado del identificador de cada gen señalan la cantidad de RNA mensajero.

En investigaciones hechas en *E. coli*, se generó una mutante capaz de consumir glucosa a través de la proteína de membrana GalP, y fosforilada por la Glk, además de inhabilitarse el sistema fosfotransferasa. Al comparar el crecimiento de esta cepa con respecto al de la silvestre, se observó que en la mutante la tasa de consumo de glucosa fue menor, pero que el rendimiento de biomasa a partir de glucosa se incrementó un 20%²⁶. Estos resultados sugieren que el consumo de energía del transporte de la glucosa a través del sistema fosfotransferasa podría impactar negativamente el crecimiento *E. coli*. Algo similar a lo expuesto podría estar sucediendo con *S. coelicolor*. En este punto cabe destacar

que los genes con los mayores niveles de RNA con fructosa, también son los niveles de RNA más altos registrados para dichos genes en todas las condiciones analizadas, por lo que el costo energético del transporte de la fructosa a través del sistema fosfotransferasa en este caso incluiría el costo energético requerido para producir tales cantidades de RNA mensajero, lo que podría impactar negativamente el crecimiento de *S. coelicolor* WT con fructosa como única fuente de carbono.

En el caso de los genes con mayores niveles de RNA mensajero en la fase de crecimiento lineal con casaminoácidos, lo esperado es que se incluyan aquellos que codifican a las enzimas gluconeogénicas^{5,7,10}. Esto se confirma en la mayoría de los casos (Figura 44A), ya que el gen con el nivel de RNA más alto es el gen SCO0208, que codifica a la piruvato fosfato dicinasa, le sigue el gen SCO4979 que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxinasa, después el gen SCO5261 que codifica a la enzima málica NADP⁺ dependiente, la única que no es considerada gluconeogénica sino anaplerótica^{5,8}, y finalmente el gen SCO0546, que codifica a la piruvato carboxilasa. Los altos niveles de expresión de estos genes en conjunto sugieren que el flujo del carbono se dirige desde el ciclo del ácido cítrico hacia la gluconeogénesis por dos vías, la esperada en esta condición a través de la piruvato carboxilasa (SCO0546) y la fosfoenolpiruvato carboxinasa (SCO4979) y una segunda vía en la que participaría la enzima málica (SCO5261) y la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208).

Durante la fase estacionaria con casaminoácidos, entre los genes con los niveles de RNA más altos se mantienen los genes SCO0208 (PYPDK), SCO5261 (ME-NADP⁺) y SCO4979 (PEPCK. Figura 44B), pero en este caso no se incluye el gen SCO0546 (PYC). Durante la fase estacionaria, lo esperado sería que el ciclo del ácido cítrico deje de operar^{5,10,13}. Los altos niveles de expresión de estos genes sugieren que el flujo del carbono podría salir del ciclo del ácido cítrico por dos vías, una directa a través de la enzima codificada por el gen SCO4979, la fosfoenolpiruvato carboxinasa y una segunda vía en dos pasos a través de la enzima málica (SCO5261) y la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208).

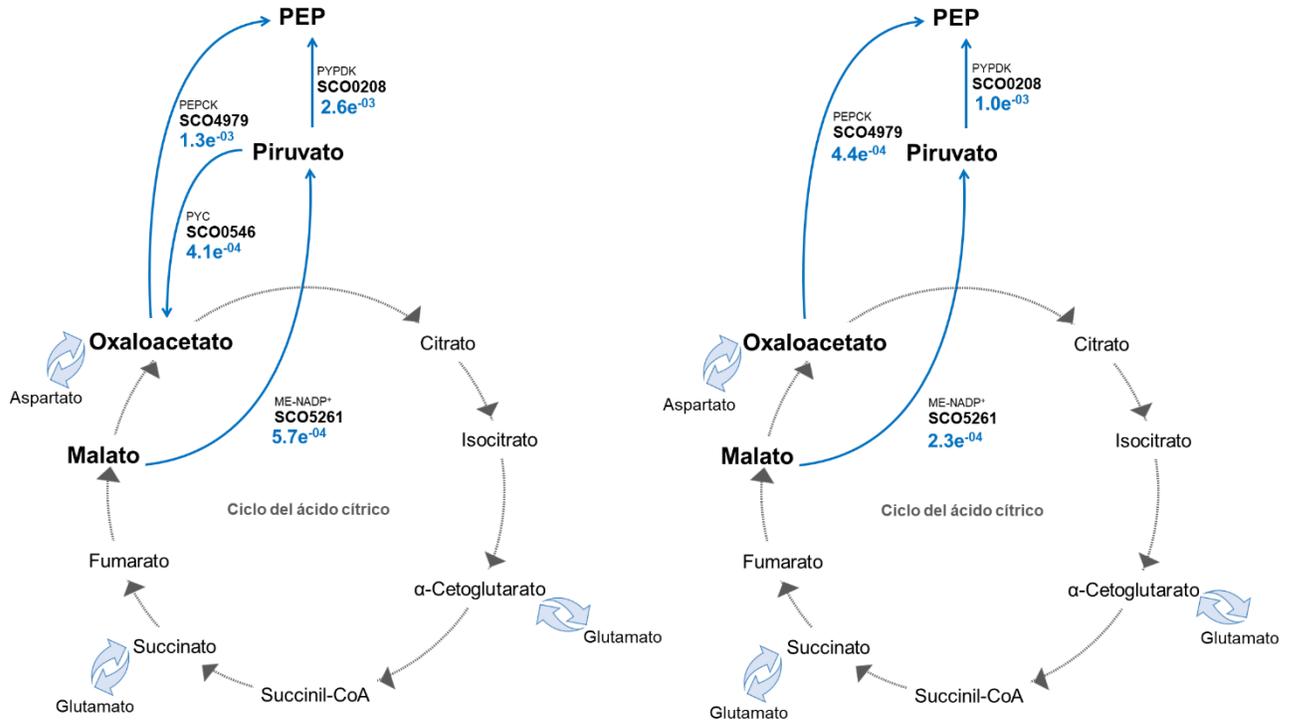


Figura 44. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* WT. Las líneas continuas identifican a los genes con mayores niveles de RNA mensajero en cultivos con casaminoácidos durante **A**: la fase de crecimiento lineal, y **B**: la fase estacionaria. Los números al lado del identificador de cada gen señalan la cantidad de RNA mensajero.

7.3 Efecto de la delección del gen *mdh* en el crecimiento de *S. coelicolor* en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

En estudios previos, al comparar el crecimiento de *S. coelicolor* WT con el de la mutante Δ -*mdh* en medio mínimo suplementado con glucosa, se observó un crecimiento mayor en la silvestre. En dichos estudios se utilizaron 600 mL de medio de cultivo por cada matraz Fernbach¹². Las condiciones de cultivo utilizadas en el presente estudio fueron iguales en lo que respecta a la formulación del medio y el tipo de matraces utilizados, pero sólo se utilizaron 500 mL de medio de cultivo, lo que modifica la relación superficie/volumen para al intercambio gaseoso³⁹. A menor cantidad de medio de cultivo, con igual superficie de contacto con la fase gaseosa, lo esperado es que haya una mayor disponibilidad de oxígeno en el cultivo de 500 mL.

Se ha reportado que la disponibilidad de oxígeno puede afectar el crecimiento de *Streptomyces*, a mayor disponibilidad de oxígeno, mayor el máximo de biomasa alcanzado^{39,40}. Es probable que *S. coelicolor* Δ -*mdh* requiera mayor disponibilidad de oxígeno que la silvestre, lo que implicaría que la cantidad mínima de oxígeno necesaria para el crecimiento de la mutante es mayor que el mínimo necesario para la silvestre, por

lo que, al incrementarse la disponibilidad de oxígeno en el cultivo con 500 mL de medio mínimo, se incrementa el máximo de biomasa alcanzado por la mutante. Apoya lo anterior que el máximo de biomasa de la silvestre fue muy similar en ambos estudios, lo que indicaría que la disponibilidad de oxígeno no fue un factor limitante para el crecimiento de la esta cepa en ninguno de los dos casos¹².

Por otro lado, se ha reportado que en *S. coelicolor* la relación NADH/NAD⁺ toma parte en la regulación de la expresión de genes de vías de la respiración celular, como el operón *cydABCD*, al actuar como efector alostérico del regulador Rex. Esto permite al organismo responder a las condiciones intracelulares, independientemente de cambios en la disponibilidad de oxígeno⁴¹. Con base en lo anterior cobra relevancia que la malato deshidrogenasa puede catalizar tanto la reacción en que el malato se transforma en oxaloacetato, como la reacción opuesta, de tal forma que si ocurre la formación de oxaloacetato se genera además una molécula de NADH, mientras que con la reacción opuesta, el NADH es oxidado nuevamente a NAD^{+5,12,42}; además se considera que el ciclo del ácido cítrico es el máximo consumidor de NAD⁺⁴¹. En este contexto, la mutante carente de malato deshidrogenasa podría consumir menor cantidad de NAD⁺, afectando la relación NADH/NAD⁺ intracelular y con ello lograr un incremento máximo de biomasa, mayor al alcanzado por la silvestre.

Algo similar podría estar ocurriendo con el crecimiento de *S. coelicolor* Δ -*mdh* con fructosa. Sin embargo, en el caso de los cultivos con glucosa, la diferencia entre el máximo de biomasa alcanzado por la silvestre y la mutante es pequeña en comparación con la diferencia en el máximo de biomasa entre ambas cepas en los cultivos con fructosa. Esto podría deberse a varios factores. En lo que respecta al poco crecimiento de la silvestre en esta condición se discutió la posibilidad de que se deba a que la alta demanda energética del sistema de transporte de la fructosa, en combinación con los altos niveles de expresión de los genes analizados, podrían tener un impacto negativo en el crecimiento. El que la mutante haya crecido mucho más que la silvestre (14 veces el máximo de biomasa) y que la curva de crecimiento alcanzó la fase estacionaria, sugiere que *S. coelicolor* Δ -*mdh* fue capaz de consumir la mayoría de la fructosa disponible en el medio, por lo que el transporte de la fructosa no parece ser la razón principal del limitado crecimiento de la silvestre.

La otra posibilidad es que los altos niveles de expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato observados en la silvestre sean la razón, lo que estaría apoyado por el hecho de que los niveles de expresión de dichos genes en la mutante son menores en la mayoría de los casos, lo que se discutirá en detalle más adelante. Otra posibilidad es que

las diferencias entre ambas cepas en los niveles de expresión de los genes analizados sean más bien indicadores de procesos regulatorios que se suceden durante el crecimiento del organismo con una fuente de carbono no represora¹⁰, que además se ven afectados por la ausencia de la malato deshidrogenasa, dando como resultado los cambios observados en el crecimiento de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* en esta condición.

En lo que respecta al crecimiento de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* con casaminoácidos, los aminoácidos útiles como fuente de carbono para *Streptomyces* contenidos en la mezcla son considerados gluconeogénicos, es decir, los esqueletos de carbono de éstos se incorporan al ciclo del ácido cítrico y posteriormente a la gluconeogénesis^{8,10,19}. Además, si en *S. coelicolor* el consumo de casaminoácidos es similar al reportado para *S. lividans*, la primera fase de crecimiento lineal estaría basada en ácido glutámico y asparagina en ambas cepas²⁰. Al comparar el máximo de biomasa entre *S. coelicolor* Δ -*mdh* y la silvestre en esta condición, observamos que prácticamente crecieron lo mismo. Lo anterior podría deberse a que, aún y cuando el flujo de carbono a través del ciclo del ácido cítrico procedente de la incorporación de esqueletos de carbono del ácido glutámico, podría acumularse como malato en ausencia de la malato deshidrogenasa, las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato catalizarían dos, máximo tres reacciones que permitirían la generación de oxaloacetato, lo que podría explicar la disminución en la velocidad de crecimiento de la mutante con respecto a la silvestre, durante la primera fase de crecimiento lineal. Las reacciones del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato que podrían generar oxaloacetato se discutirán más adelante con detalle.

En el caso de la asparagina, aun cuando hay evidencia de que ésta no constituye una fuente de carbono adecuada para el crecimiento del organismo^{21,22}, podría proporcionar el oxaloacetato necesario para establecer un flujo del carbono a través del ciclo del ácido cítrico al inicio del crecimiento, que eventualmente recibiría la contribución del oxaloacetato resultante de las reacciones catalizadas por las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato, lo que permitiría que la velocidad de crecimiento en ambas cepas sea más parecida durante la segunda fase de crecimiento lineal, probablemente basada en prolina que se incorporaría al ciclo del ácido cítrico también por la vía del glutamato^{7,10,20}. Los resultados del crecimiento para ambas cepas sugieren que las reacciones catalizadas por las enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato permitirían a la mutante crecer tanto como la silvestre en medio mínimo suplementado con casaminoácidos.

7.4 Efecto de la delección del gen *mdh* en los niveles de RNA mensajero, de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*, crecida en medio mínimo con distintas fuentes de carbono

Durante el crecimiento de *S. coelicolor* con glucosa como fuente de carbono, la glucosa es oxidada a través de la glucólisis, generándose piruvato que se transforma en acetil-CoA, este último puede entrar al ciclo del ácido cítrico a través de una reacción de condensación con el oxaloacetato^{5,10}. En el caso de la mutante, la ausencia de la malato deshidrogenasa (Δ -*mdh*) interrumpiría el flujo del carbono del ciclo del ácido cítrico, ya que esta enzima cataliza la última reacción en que el malato se transforma en oxaloacetato⁴². Por lo anterior, de acuerdo con la función predicha o asignada (según sea el caso) para cada enzima codificada por los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato, lo esperado es que las enzimas málicas (SCO2951 y SCO5261) eviten la acumulación de malato³¹, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) y la piruvato carboxilasa (SCO0546) podrían generar el oxaloacetato necesario para alimentar el ciclo del ácido cítrico^{7,29}.

Al comparar los perfiles de expresión entre la mutante y la silvestre, crecidas con glucosa, observamos que, en el caso del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) son muy similares, pero los niveles en la mutante son por lo menos el doble de los observados para la silvestre, lo que corresponde a lo esperado en ausencia de la malato deshidrogenasa⁷. Mayores niveles de expresión del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) sugieren que la enzima málica codificada participa entre las enzimas que permiten a la mutante crecer con glucosa. En lo que respecta al perfil de expresión del gen SCO5261 (ME-NADP⁺), hay diferencias entre cepas. En el caso de la mutante se observa un incremento en las primeras 24 horas de incubación, pero los niveles se mantienen constantes a partir de este punto. Además, los niveles de la silvestre son ligeramente mayores a los obtenidos para la mutante, 1.5 veces el máximo obtenido durante la fase de crecimiento lineal. Aún con estos cambios, en la mutante los niveles de expresión del gen SCO5261 (ME-NADP⁺) son mayores a los del gen SCO2951 (ME-NAD⁺). Todo lo anterior sugiere que las enzimas málicas (ME-NAD⁺ y ME-NADP⁺) podrían evitar la acumulación de malato en la mutante, al catalizar la reacción en la que el malato se transforma en piruvato durante la fase de crecimiento lineal con glucosa³¹. Además, si el aumento en los niveles de RNA del gen SCO2951 (ME-NAD⁺) está relacionado con la disminución de los niveles de RNA del gen SCO5261 (ME-NADP⁺), entonces podría ser que tanto la acumulación de sustrato (malato) como de producto (piruvato) de la reacción catalizada por estas enzimas⁸, sumado al estatus de la relación NADH/NAD⁺⁴¹, sean factores que influyen en los niveles de expresión diferenciales de

ambos genes.

En lo que respecta a la generación de oxaloacetato en cultivos con glucosa, en el caso de la silvestre se observaron altos niveles de expresión del gen *ppc* que codifica a la fosfoenolpiruvato carboxilasa, cuya actividad catalítica genera oxaloacetato²⁹. Sin embargo, éste no fue el caso para la mutante, ya que no sólo los niveles de RNA del gen *ppc* fueron menores en esta cepa y condición, sino que el perfil de expresión mostró niveles de RNA decrecientes hacia la etapa estacionaria. En su lugar, en la mutante los niveles del gen SCO0546 que codifica a la piruvato carboxilasa, que también puede generar oxaloacetato^{5,7}, fueron mayores a los obtenidos para la silvestre en la misma condición. Además, se observaron cambios en el perfil de expresión del gen SCO0546 (PYC) entre ambas cepas, mientras en la silvestre los niveles de RNA se incrementaron hacia la etapa estacionaria, en el perfil de la mutante se observó un máximo a las 36 horas. Por lo anterior, el perfil con glucosa del gen SCO0546 (PYC) de la mutante es más parecido al perfil del gen *ppc* de la silvestre en la misma condición. Cabe recordar que ambos genes se expresan en esta condición en las dos cepas de forma simultánea, por lo que el oxaloacetato podría ser generado por ambas enzimas. Sin embargo, tanto los cambios en los perfiles de expresión, como los cambios en los niveles de RNA de estos dos genes, sugieren que mientras en la silvestre hay una importante participación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) en la generación de oxaloacetato durante la fase de crecimiento lineal con glucosa, en la mutante esta función sería llevada a cabo por la piruvato carboxilasa (SCO0546).

En el caso del gen SCO4979 (PEPCK) llama la atención que, aún y cuando los perfiles de expresión entre la silvestre y la mutante son muy similares, los niveles de RNA en esta última son mayores, lo que sugiere que la enzima codificada, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, podría reciclar parte del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato^{5,7}. Por tanto, el incremento en los niveles de expresión sugiere que la enzima codificada se suma a las otras enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato que compensan la ausencia de la malato deshidrogenasa, durante el crecimiento de *S. coelicolor* Δ -*mdh* con glucosa.

En lo que respecta al gen *pyk1*, que codifica para la enzima glucolítica piruvato cinasa^{5,7,32}, los perfiles de expresión en ambas cepas son muy similares, el único cambio sería que, el máximo nivel de RNA de este gen durante la fase de crecimiento lineal fue alcanzado 12 horas después en la silvestre. Por lo demás, los niveles de RNA no muestran grandes diferencias entre ambas cepas. Todo lo anterior sugiere que en ausencia del gen *mdh*, la enzima codificada por el gen *pyk1*, la piruvato cinasa, podría cumplir la función

esperada en la glucólisis^{5,7,32} en ambas cepas, sin tomar parte en el grupo de enzimas que compensan la ausencia de la malato deshidrogenasa en la mutante.

Cabe recordar que en *S. coelicolor*, la piruvato cinasa esta codificada por dos genes, los genes: *pyk1* y *pyk2*. En estudios previos se determinó que ambas enzimas utilizan ADP como aceptor del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato, pero que mientras la enzima codificada por el gen *pyk2* tiene una mayor afinidad por fosfoenolpiruvato a bajas concentraciones de AMP, la enzima codificada por el gen *pyk1* tiene mayor afinidad por el sustrato a altas concentraciones de AMP³². Lo anterior cobra relevancia si consideramos que la reacción inversa en *S. coelicolor* sería catalizada por la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) y que como resultado de la actividad catalítica de esta última podría generarse AMP^{7,18}. Los altos niveles de expresión del gen SCO0208 (PYPDK) durante la fase de crecimiento lineal de la mutante con glucosa, sugieren que las condiciones intracelulares podrían coincidir con aquellas en que la piruvato cinasa codificada por el gen *pyk1* tiene mayor afinidad por el fosfoenolpiruvato.

Las enzimas codificadas por los genes SCO0208 (PYPDK) y SCO5896 (PEP-UE) catalizaría la misma reacción, utilizando como sustrato al piruvato para generar fosfoenolpiruvato^{5,7}. Al analizar los perfiles de expresión de estos genes en la mutante crecida con glucosa, observamos cambios con respecto a la silvestre en la misma condición. Para el gen SCO0208 (PYPDK) se observa un pico máximo de RNA a las 12 horas, mientras que para el gen SCO5896 (PEP-UE) el pico máximo es a las 36 horas, ninguno de los cuales se observa en la silvestre durante la fase de crecimiento lineal. En contraste, en esta última, el nivel máximo de RNA es alcanzado durante la fase estacionaria. Estos picos en los niveles de expresión en la mutante sugieren que la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) tienen un papel preponderante en la generación de fosfoenolpiruvato al inicio de la fase de crecimiento lineal con glucosa, mientras que esta función es cumplida por la enzima utilizadora de PEP (SCO5896) en la segunda mitad de la misma fase. Considerando todo lo anterior es probable que la actividad de las enzimas codificadas por los SCO0208 (PYPDK) y SCO5896 (PEP-UE) contribuya al crecimiento de la mutante con glucosa como fuente de carbono en ausencia de la malato deshidrogenasa.

Al igual que las enzimas místicas con glucosa, los genes SCO0208 (PYPDK) y SCO5896 (PEP-UE) se expresan diferencialmente, aún y cuando ambas enzimas catalizan la misma reacción, por lo que los factores determinantes para que ello suceda podrían estar relacionados con la concentración de sustrato y producto de la reacción, así como de la relación entre los cofactores requeridos por cada enzima^{8,32}. Se ha propuesto que la

reacción catalizada por la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) requiere de ATP y fosfato como cofactores y como resultado se genera fosfoenolpiruvato, AMP y difosfato⁹. Desafortunadamente los detalles de la reacción catalizada por la enzima utilizadora de PEP (SCO5896) son menos claros en la literatura, por lo que se requiere más información para poder definir si la diferencia entre ambas enzimas radica en los cofactores.

Al considerar a los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* en conjunto, se puede identificar a aquellos cuyos niveles de RNA mensajero muestran las mayores diferencias entre la mutante y la silvestre durante la fase de crecimiento lineal con glucosa. Partiendo del hecho de que los perfiles de crecimiento son iguales en ambas cepas en esta condición, para el análisis se ubicó la mediana máxima obtenida para cada gen durante la fase de crecimiento lineal y se comparó con la mediana obtenida para la otra cepa a la misma hora. Los genes con mayores diferencias fueron: el gen SCO0208 (PYPDK), el gen *ppc*, el gen SCO5896 (PEP-UE), el gen SCO0546 (PYC) y el gen SCO4979 (PEPCK, Figura 45).

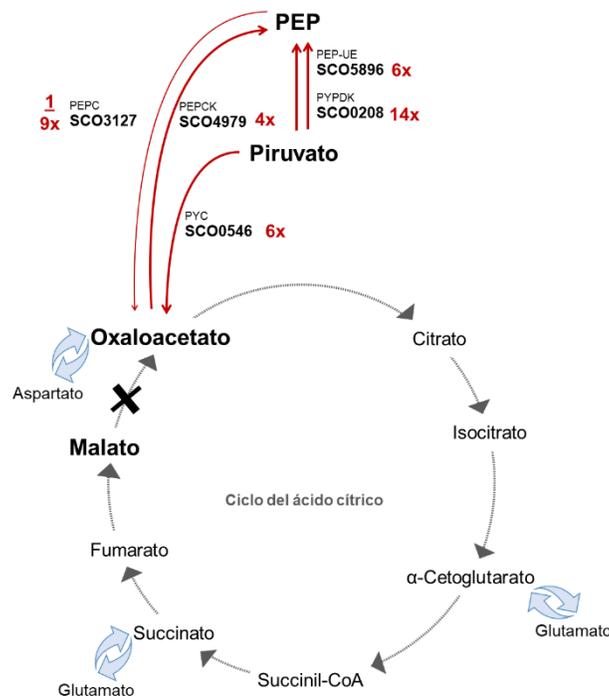


Figura 45. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ-*mdh*. Las líneas continuas identifican a los genes cuyos niveles de RNA mostraron las mayores diferencias en la mutante con respecto a la silvestre durante la fase de crecimiento lineal en cultivos con glucosa. Los números al lado del identificador de cada gen indican el número de veces que la mediana de la mutante fue mayor (14x) o menor ($\frac{1}{9x}$) a la mediana de la silvestre.

En este contexto es importante considerar que, en ausencia de la malato deshidrogenasa, el piruvato generado por la oxidación de la glucosa a través de la glucólisis

podría sumarse al generado por la acción de las enzimas málicas^{7,31}. Esto parece estar apoyado por el hecho de que tres de los cuatro genes con mayores niveles de expresión en la mutante, codifican a enzimas que catalizan reacciones cuyo sustrato es el piruvato. Estas son: la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208), la enzima utilizadora de PEP (SCO5896) y la piruvato carboxilasa (SCO0546)⁷. Estos altos niveles de expresión sugieren que, en la mutante, una gran cantidad del piruvato generado durante la fase del crecimiento lineal podría reciclarse a fosfoenolpiruvato, en una sola reacción catalizada por la piruvato fosfato dicinasa y la enzima utilizadora de PEP (SCO0208 y SCO5896), o a través de un par de reacciones catalizadas por la piruvato carboxilasa (SCO0546) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (SCO4979)^{5,7}. Estas dos últimas reacciones además podrían proporcionar parte del oxaloacetato necesario para alimentar el ciclo del ácido cítrico.

En los cultivos con fructosa, al analizar los niveles de expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh* con respecto a lo observado en la silvestre, es importante considerar las posibles diferencias en el metabolismo de la fructosa entre ambas cepas. Como se planteó para la glucosa, la fructosa puede ser metabolizada a través de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico^{5,7,10}. Sin embargo, en ausencia de la malato deshidrogenasa, la acción de las enzimas málicas permitiría evitar la acumulación de malato y generar piruvato, lo que conectaría el flujo del carbono del ciclo del ácido cítrico con otras vías metabólicas^{7,31}. Este piruvato se sumaría al producido por la glucólisis y el sistema fosfotransferasa, que consumiría parte del fosfoenolpiruvato para el transporte de la fructosa^{5,7,17}.

Al comparar los niveles de expresión entre *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* del gen que codifica a la piruvato cinasa (*pyk1*)⁷, observamos que los niveles de RNA durante la fase de crecimiento lineal en la mutante son menos de la mitad de los obtenidos para la silvestre en la misma fase y condición. Esto sugiere que, al consumirse parte del fosfoenolpiruvato para el transporte de la fructosa, una menor cantidad de fosfoenolpiruvato quedaría disponible como sustrato para la piruvato cinasa (*pyk1*), lo que podría ser la causa de la disminución en los niveles de expresión de este gen en la mutante.

Con respecto a los perfiles de expresión de las enzimas málicas, observamos cambios entre ambas cepas. Aunque para el gen SCO2951 (ME-NAD⁺) se observan variaciones entre ambas cepas, los niveles de RNA son muy similares. Mientras que para el gen SCO5261 (ME-NADP⁺), las variaciones entre ambas cepas incluyen cambios tanto en el perfil como en los niveles de expresión. La expresión de estos genes sugiere que efectivamente las enzimas málicas (NAD⁺ dependiente y NADP⁺ dependiente), evitan la

acumulación del malato en la mutante, aunque los niveles menores de RNA del gen SCO5261 en esta cepa con respecto a la silvestre sugieren que la enzima málica NADP⁺ podría tener un papel menos preponderante en esta condición.

Otro factor limitante para el crecimiento de la mutante con fructosa podría ser la disponibilidad de oxaloacetato para alimentar el ciclo del ácido cítrico^{7,8,12}, por lo que se esperarían mayores niveles de expresión en *S. coelicolor* Δ -*mdh* de los genes que codifican enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato cuya actividad catalítica genera oxaloacetato. Al comparar los perfiles de expresión de los genes *ppc* y SCO0546 (PYC) llama la atención que en ambos casos los niveles máximos de RNA en la mutante son la mitad de los máximos obtenidos para la silvestre durante la fase de crecimiento lineal. Estos niveles de expresión, sumados al hecho de que la mutante creció mucho más que la silvestre en esta condición sugieren que, tanto la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) como la piruvato carboxilasa (SCO0546) generan el oxaloacetato necesario para cubrir las necesidades de la mutante para crecer con fructosa como única fuente de carbono y que la disminución en los niveles de expresión podría tener un impacto positivo en el crecimiento del organismo.

Hay tres enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato que podrían generar fosfoenolpiruvato en *S. coelicolor*, estas son la fosfoenolpiruvato carboxilasa (SCO4979), la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) y la enzima utilizadora de PEP (SCO5896)^{7,18}. Estos tres genes son considerados gluconeogénicos, sin embargo, debido a que la actividad catalítica de las enzimas codificadas podría alimentar el sistema fosfotransferasa para el transporte de la fructosa, se espera que se expresen en esta condición en ambas cepas^{5,7,17}.

Al comparar los perfiles de expresión entre la silvestre y la mutante de estos tres genes durante la fase de crecimiento lineal, observamos variaciones entre cepas. Además, como en el caso de la mayoría de los genes de interés, los niveles de RNA los genes SCO4979 (PEPCK) y SCO5896 (EU-PEP) son menores en la mutante, mientras que el gen SCO0208 (PYPDK) es el único para el que se obtuvieron niveles de RNA mayores en la mutante. Esto sugiere que, en ausencia de la malato deshidrogenasa, la función de generar fosfoenolpiruvato podría recaer principalmente en la enzima codificada por el gen SCO0208 (PYPDK) durante la fase de crecimiento lineal con fructosa.

Al comparar la expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato en conjunto, se identificó a aquellos para los que se observaron mayores diferencias en los niveles de RNA entre la silvestre y la mutante durante la fase de crecimiento lineal con fructosa (Figura 46). Esta condición es la única en que los perfiles de crecimiento fueron distintos entre ambas cepas, además de que los niveles de la silvestre son mayores a los

de la mutante para la mayoría de los casos. Sin embargo, cabe destacar que el gen con la mayor diferencia entre cepas fue el gen SCO0208 (PYPDK), le siguen los genes correspondientes a los SCO5896 (PEP-UE) y SCO4979 (PEPCK).

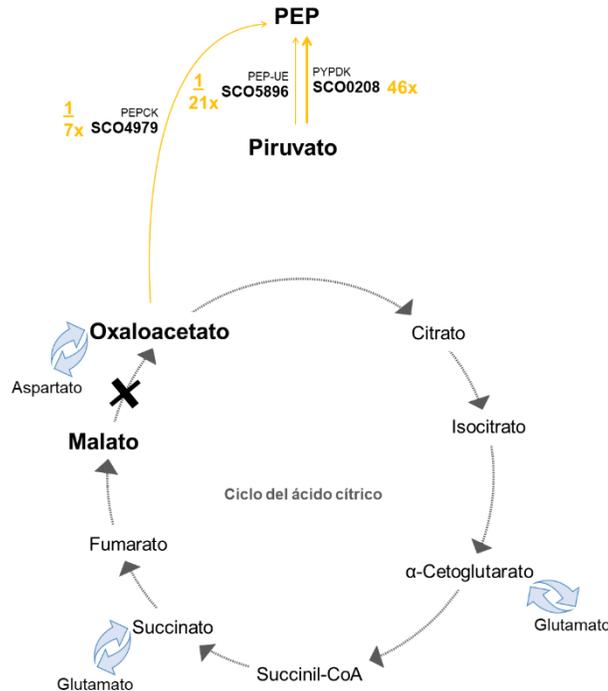


Figura 46. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh*. Las líneas continuas identifican a los genes cuyos niveles de RNA mostraron las mayores diferencias en la mutante con respecto a la silvestre, durante la fase de crecimiento lineal en cultivos con fructosa. Los números al lado del identificador de cada gen indican el número de veces que la mediana de la mutante es mayor (46x) o menor ($\frac{1}{7x}$) a la mediana de la silvestre.

Considerando los cambios en los niveles de expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato durante el crecimiento de *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* con fructosa, destaca el hecho de que en la cepa en que se observó el mayor incremento de biomasa (la mutante), los niveles de transcrito de la mayoría de los genes analizados fueron menores a los obtenidos para la cepa con menor incremento de biomasa (la silvestre). Específicamente, la mediana máxima de los genes *ppc*, *pyk1*, SCO0546 (PYC) y SCO5261 (ME-NADP⁺) en la mutante fueron entre un tercio y la mitad de las obtenidas para la silvestre, que se suman a los genes SCO5896 (PEP-UE) y SCO4979 (PEPCK) discutidos en el párrafo anterior. Todo lo anterior sugiere que en la mutante podría favorecerse la generación de piruvato por acción de las enzimas málicas (SCO2951 y SCO5261) en ausencia de la malato deshidrogenasa, y que la demanda de oxaloacetato para el ciclo del ácido cítrico podría limitar la disponibilidad del fosfoenolpiruvato, por lo que la acción de la piruvato fosfato dicinasa (SCO0208) sería fundamental para alimentar el sistema

fosfotransferasa. Estas limitaciones en el metabolismo de la fructosa en la mutante podrían de hecho impactar positivamente el crecimiento del organismo y por tanto ser la razón del crecimiento mayor de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en esta condición con respecto al de la silvestre.

En lo que respecta al crecimiento de *S. coelicolor* con casaminoácidos, se plantean algunas diferencias con respecto a las condiciones glucolíticas. Como ya se mencionó, en general los aminoácidos útiles como fuente de carbono se metabolizarían a través del ciclo del ácido cítrico y de éste el flujo del carbono se dirigiría hacia la gluconeogénesis, por lo que lo esperado es que se expresen los genes que codifican a enzimas que permiten dicha conexión, sumados a los gluconeogénicos^{7,8,10}. Otra diferencia es que, durante el crecimiento en condiciones glucolíticas, algunos intermediarios como el 2-oxoglutarato, el succinato y el oxaloacetato serían retirados del ciclo del ácido cítrico, al utilizarse como precursores para la síntesis de aminoácidos, mientras que durante el crecimiento con casaminoácidos dichas vías no serían necesarias, por el contrario dichos intermediarios representarían puntos de acceso del flujo del carbono como resultado del catabolismo de algunos aminoácidos^{7,10}.

Entre las enzimas que podrían conectar al ciclo del ácido cítrico con la gluconeogénesis se encuentran las enzimas málicas (SCO2951 y SCO5261) cuyo sustrato es el malato y la fosfoenolpiruvato carboxicina (SCO4979), cuyo sustrato es el oxaloacetato. Aunque, en ausencia de la malato deshidrogenasa, el oxaloacetato no podría ser generado por el ciclo del ácido cítrico, sino que tendría que ser suministrado por el catabolismo de algunos aminoácidos, o por acción de algunas enzimas del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor*. Al considerar a las enzimas málicas cabe recordar que en esta condición no se pudo detectar RNA mensajero del SCO2951 (ME-NAD⁺) en ninguna de las muestras analizadas de la mutante, mientras que los niveles de RNA del SCO5261 (ME-NADP⁺) fueron por lo menos el doble de los obtenidos para la silvestre, y hasta 21 veces mayores durante las fases de crecimiento lineal. En las vías de degradación de aminoácidos participan enzimas NAD⁺ dependientes y NADP⁺ dependientes, como la glutamato deshidrogenasa y la succínico semialdehído deshidrogenasa^{7,18}. Por lo que la generación de NADH y NADPH, resultado del catabolismo de los aminoácidos, podrían modificar el balance redox intracelular discutido en párrafos anteriores y éste a su vez provocar que el gen SCO2951 (ME-NAD⁺) no se exprese en ausencia de la malato deshidrogenasa con casaminoácidos. Además, la dinámica en los niveles de expresión de los genes que codifican a las enzimas málicas apoya lo discutido anteriormente, es decir, que el aumento en los niveles de RNA de uno de ellos podría estar relacionado con la

disminución en los niveles de RNA del otro. Por todo lo anterior, la expresión del gen SCO5261 durante el crecimiento lineal con casaminoácidos, sugiere que sólo la enzima málica NADP⁺ dependiente puede convertir el malato producido por el ciclo del ácido cítrico en piruvato de *S. coelicolor* Δ -*mdh*.

Entre las enzimas que podrían generar oxaloacetato están la piruvato carboxilasa (SCO0546), a partir de piruvato y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) a partir de fosfoenolpiruvato^{5,7,18}. Durante la fase de crecimiento lineal, en el perfil de expresión del gen SCO0546 (PYC) se observan niveles mayores en la mutante, siendo el punto de las 12 horas setenta veces el de la silvestre. Estos niveles de expresión sugieren una importante participación de la piruvato carboxilasa (SCO0546) en la generación de oxaloacetato durante la primera fase de crecimiento lineal de *S. coelicolor* Δ -*mdh* con casaminoácidos.

En el caso del perfil de expresión del gen *ppc*, no se observan grandes diferencias entre ambas cepas, pero como con el gen SCO0546 (PYC), los niveles de RNA son mayores en la mutante. En esta cepa, los niveles máximos durante las dos fases de crecimiento lineal son muy similares, lo que sugiere que la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) genera parte del oxaloacetato necesario para alimentar el ciclo del ácido cítrico en esta esta fase y condición.

Al comparar los perfiles de expresión con casaminoácidos para el gen SCO4979 (PEPCK), en la silvestre se observan dos picos de expresión a las 12 y 36 horas, mientras que en la mutante el nivel de RNA a las 12 horas es de los más bajos obtenidos en general para este gen, lo que llama la atención para un gen que codifica a una enzima gluconeogénica. Una posibilidad es que en la mutante el incremento en los niveles de RNA del gen SCO0546 (PYC), esté relacionado con el decremento de los niveles de RNA del gen SCO4979 (PEPCK). Esto tiene sentido si consideramos que como resultado de la actividad enzimática de la piruvato carboxilasa (SCO0546) se genera oxaloacetato, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxilasa (SCO4979) consume el oxaloacetato para generar fosfoenolpiruvato^{5,7,18}.

Mientras que los niveles de expresión de los genes SCO0546 (PYC) y *ppc* sugieren que las enzimas codificadas por ambos genes podrían generar oxaloacetato para alimentar el ciclo del ácido cítrico, el perfil de expresión del gen SCO4979 (PEPCK) sugiere que parte del oxaloacetato podría ser reciclado a fosfoenolpiruvato por acción de esta enzima. Esto está apoyado por estudios previos en que se ha observado un flujo bidireccional del carbono entre fosfoenolpiruvato y oxaloacetato en *E. coli*, y entre fosfoenolpiruvato/piruvato y oxaloacetato en *C. glutamicum*^{25,28}. Además, al comparar los perfiles de expresión del gen

pyk1 entre *S. coelicolor* WT y Δ -*mdh* con casaminoácidos, se observa que en esta última los niveles son mayores, sobre todo al inicio del periodo de incubación. La enzima codificada cataliza la reacción en la que el fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato, entonces los perfiles de expresión de los genes SCO4979 y *pyk1* en la mutante sugieren que el oxaloacetato reciclado por la fosfoenolpiruvato carboxinasa (SCO4979) podría ser utilizado por la piruvato cinasa (SCO2014) para generar piruvato⁷.

Con respecto a los dos genes restantes, SCO0208 (PYPDK) y SCO5896 (PEP-UE), ambos codifican para enzimas cuyo sustrato es el piruvato y el producto es el fosfoenolpiruvato^{5,7,18}. En el caso del gen SCO0208 (PYPDK), no se pudo detectar RNA mensajero en ninguna de las muestras de la mutante crecida con casaminoácidos. Sí como se discutió para el perfil de expresión de este gen en la silvestre, el ácido glutámico reprime la expresión de este gen durante la primera fase del crecimiento lineal, entonces se esperaría que en la mutante se detectara RNA mensajero a partir de las 36 horas, en que se inicia la segunda fase del crecimiento lineal, pero no fue así. Por tanto, que el gen no se exprese podría deberse a una combinación de factores. Por ejemplo, que en la mutante la represión por ácido glutámico se suma a la falta de inducción de la expresión del gen durante la segunda fase del crecimiento lineal con casaminoácidos. Otra posibilidad es que, tanto en las primeras horas del crecimiento de la silvestre, como en todo el periodo de incubación de la mutante, no se induzca la expresión del gen SCO0208 (PYPDK), al crecer a *S. coelicolor* con casaminoácidos.

Ya sea que se trate de represión y falta de inducción, o sólo de falta de inducción, es importante recordar que en el caso de *S. coelicolor* WT crecida con casaminoácidos el gen con los mayores niveles de RNA durante la fase de crecimiento lineal y la fase estacionaria fue el SCO0208 (PYPDK). Además, en la mutante el gen cuyos niveles de RNA mostraron las mayores diferencias con respecto a la silvestre, fue el SCO0208 (PYPDK) al crecer a *S. coelicolor* con fructosa y glucosa. Se suma a lo anterior que, en ausencia de la malato deshidrogenasa en condiciones glucolíticas, lo esperado es que las enzimas málicas conduzcan el flujo del carbono del ciclo de ácido cítrico hacia piruvato y que este se sume al generado por la glucólisis, mientras que en condiciones gluconeogénicas el piruvato solo sería generado por las enzimas málicas o la degradación de alanina⁷. Todo lo anterior sugiere que la concentración intracelular de piruvato podría estar relacionada con la inducción de la expresión del gen SCO0208 (PYPDK).

Finalmente, al considerar a los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* en conjunto durante la fase de crecimiento lineal con casaminoácidos, los niveles

de expresión de todos los genes analizados fueron mayores en *S. coelicolor* Δ -*mdh* a los de la WT; sin embargo, algunos de ellos muestran mayores diferencias entre ambas cepas. Estos fueron los genes SCO0546 (PYC), SCO5261 (ME-NADP⁺) y SCO3127 (PEPC. Figura 47). Estos niveles de expresión sugieren que en la mutante crecida con casaminoácidos se destacan dos procesos que se consideraban limitantes para la cepa en esta condición: por un lado, la salida del flujo del carbono del ciclo del ácido cítrico hacia la gluconeogénesis y por otro lado la generación de oxaloacetato. El primero gracias a la acción de la enzima mállica NADP⁺ dependiente (SCO5261) y el segundo a la acción de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) y piruvato carboxilasa (SCO0546).

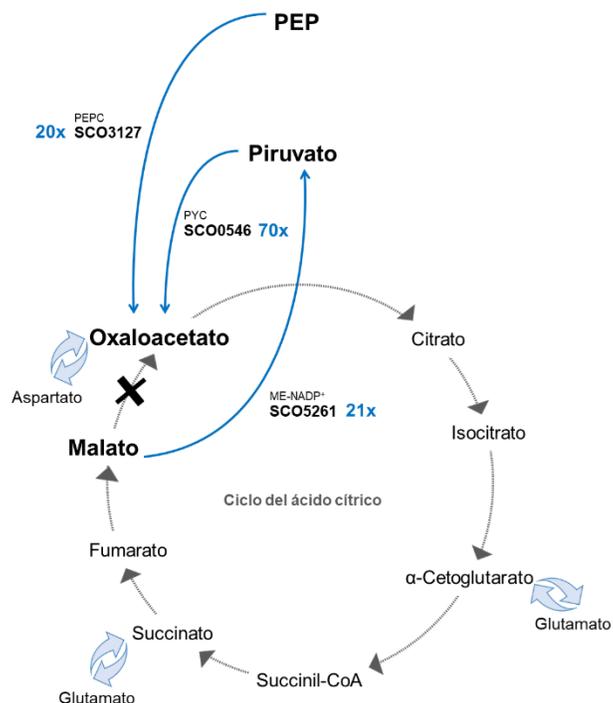


Figura 47. Nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* Δ -*mdh*. Las líneas continuas identifican a los genes cuyos niveles de RNA mostraron mayor proporción de cambio en la mutante con respecto a la silvestre, durante la fase de crecimiento lineal en cultivos con casaminoácidos. Los números al lado del identificador de cada gen indican el número de veces que la mediana de la mutante es mayor a la mediana de la silvestre.

8. CONCLUSIONES

- Los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato se expresan en *S. coelicolor* M145 y lo hacen diferencialmente a lo largo del crecimiento.
- La fuente de carbono tiene un efecto diferencial en los niveles de RNA mensajero de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato de *S. coelicolor* M145.
- La expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato está asociada al crecimiento de *S. coelicolor* en medio mínimo con casaminoácidos, salvo por el gen SCO0208 (PYPDK).
- La expresión de los genes *ppc*, *pyk1*, SCO0546 (PYC), SCO0208 (PPDK), SCO5896 (EU-PEP) y SCO2951 (ME-NAD⁺) no es reprimida por glucosa en *S. coelicolor* M145.
- La expresión del gen *ppc* es importante para el crecimiento de *S. coelicolor* M145 con glucosa como fuente de carbono.
- La expresión del gen SCO5261 (ME-NADP⁺) es importante para el crecimiento de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en medio mínimo suplementado con casaminoácidos.
- En ausencia de la malato deshidrogenasa (Δ -*mdh*) los genes SCO0208 (PYPDK) y SCO2951 (ME-NAD⁺) no se expresan en *S. coelicolor*, mientras que los niveles de expresión del resto de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato se incrementan durante el crecimiento en medio mínimo suplementado con casaminoácidos.
- La expresión de los genes del nodo PEP-piruvato-oxaloacetato sugieren que las enzimas codificadas proporcionan a *S. coelicolor* flexibilidad metabólica para aprovechar las distintas fuentes de carbono disponibles, así como responder a los cambios originados por las distintas fases del crecimiento.

9. LITERATURA CITADA

1. Lamb DC, Zhao B, Guengerich FP, Kelly SL, Waterman MR. Genomics of *Streptomyces* cytochrome P450: Caister Academic Press: Norfolk, UK; 2011.
2. Robertsen HL, Weber T, Kim HU, Lee SY. Toward Systems Metabolic Engineering of Streptomyces for Secondary Metabolites Production. *Biotechnol J.* 2018;13(1).
3. Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microb Cell Fact.* 2012;11:50.
4. Sauer U, Eikmanns BJ. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(4):765-794.
5. Keulen G, Siebring J, Dijkhuizen L. Central carbon metabolic pathways in *Streptomyces*. *Streptomyces: Molecular biology and biotechnology.* 2011;5:105-124.
6. Coze F, Gilard F, Tcherkez G, Virolle MJ, Guyonvarch A. Carbon-flux distribution within *Streptomyces coelicolor* metabolism: a comparison between the actinorhodin-producing strain M145 and its non-producing derivative M1146. *PLoS One.* 2013;8(12):e84151.
7. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research.* 2000;28(1):27-30.
8. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan; 2008.
9. Thomas L, Hodgson DA, Wentzel A, et al. Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and phoP mutant grown in batch culture. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(2):M111.013797.
10. Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 2000;42:47-238.
11. Takahashi-Iñiguez T, Cruz-Rabadán S, Burciaga-Cifuentes LM, Flores ME. Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of recombinant isocitrate dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor* M-145. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(9):1490-1494.
12. Takahashi-Iñiguez T, Barrios-Hernández J, Rodríguez-Maldonado M, Flores ME. Tricarboxylic acid cycle without malate dehydrogenase in *Streptomyces coelicolor* M-145. *Arch Microbiol.* 2018.
13. Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, et al. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol.* 2003;48(5):1289-1303.
14. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 2002;417(6885):141-147.
15. Romero-Rodríguez A, Rocha D, Ruiz-Villafan B, et al. Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol.* 2016;16:77.
16. Koide M, Miyanaga A, Kudo F, Eguchi T. Characterization of Polyphosphate Glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2013;77(11):2322-2324.
17. Nothhaft H, Parche S, Kamionka A, Titgemeyer F. In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 2003;185(3):929-937.

18. Consortium U. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 2016;45(D1):D158-D169.
19. Zimbro DAPMJ. Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media. 2003.
20. D'Huys PJ, Lule I, Van Hove S, et al. Amino acid uptake profiling of wild type and recombinant *Streptomyces lividans* TK24 batch fermentations. *J Biotechnol*. 2011;152(4):132-143.
21. Llamas RM. Perfiles de actividad de ICDH, α -CGDH y MDH en *Streptomyces coelicolor* WT y *mdh*⁻ crecidos en diferentes aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
22. Borodina I, Krabben P, Nielsen J. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res*. 2005;15(6):820-829.
23. Wohlleben W, Mast Y, Reuthler J. Regulation of nitrogen assimilation in Streptomycetes and other actinobacteria. *Streptomyces: molecular biology and biotechnology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2011:125-136.
24. Jeong H, Tombor B, Albert R, Oltvai ZN, Barabási AL. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*. 2000;407(6804):651-654.
25. Yang C, Hua Q, Baba T, Mori H, Shimizu K. Analysis of *Escherichia coli* anaplerotic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol Bioeng*. 2003;84(2):129-144.
26. Meza E, Becker J, Bolivar F, Gosset G, Wittmann C. Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2012;11:127.
27. Petersen S, Mack C, de Graaf AA, Riedel C, Eikmanns BJ, Sahm H. Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo. *Metab Eng*. 2001;3(4):344-361.
28. Petersen S, de Graaf AA, Eggeling L, Mollney M, Wiechert W, Sahm H. In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*. 2000;275(46):35932-35941.
29. Bramwell H, Nimmo HG, Hunter IS, Coggins JR. Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): purification of the enzyme, cloning of the ppc gene and over-expression of the protein in a streptomycete. *Biochem J*. 1993;293 (Pt 1):131-136.
30. Jeong Y, Kim JN, Kim MW, et al. The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat Commun*. 2016;7:11605.
31. Rodriguez E, Navone L, Casati P, Gramajo H. Impact of malic enzymes on antibiotic and triacylglycerol production in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(13):4571-4579.
32. Schniete JK, Cruz-Morales P, Selem-Mojica N, et al. Expanding Primary Metabolism Helps Generate the Metabolic Robustness To Facilitate Antibiotic Biosynthesis in. *MBio*. 2018;9(1).
33. Flores ME, Sánchez S. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS microbiology letters*. 1985;26(2):191-194.
34. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual: three-volume set*. 2012.
35. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622.

36. Bustin SA. AZ of quantitative PCR: International University Line La Jolla, CA; 2004.
37. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition: Routledge; 2002.
38. Wentzel A, Bruheim P, Øverby A, et al. Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2). BMC Syst Biol. 2012;6:59.
39. Olmos E, Mehmood N, Haj Husein L, Goergen JL, Fick M, Delaunay S. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. Bioprocess Biosyst Eng. 2013;36(3):259-272.
40. Ozergin-Ulgen K, Mavituna FJJoCT, Biotechnology: International Research in Process E, Technology C. Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. 1998;73(3):243-250.
41. Brekasis D, Paget MS. A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). EMBO J. 2003;22(18):4856-4865.
42. Takahashi-Íñiguez T, Aburto-Rodríguez N, Vilchis-González AL, Flores ME. Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase. Journal of Zhejiang University. Science. B. 2016;17(4):247-261.

ANEXO 1

Tabla 1.1. Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* WT en MM con glucosa.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	12U	2.14	2.20	165.65
M2-12	12U	2.13	2.25	259.25
M1-24	12U	2.12	2.20	193.45
M2-24	10U	2.19	2.23	38.30
M1-36	10U	1.95	2.22	412.95
M2-36	12U	1.56	0.52	6.90
M1-48	12U	2.10	2.08	235.80
M2-48	12U	2.09	2.11	274.35
M1-60	10U	2.11	2.19	192.70
M2-60	10U	2.11	2.16	177.65
M1-72	12U	2.07	1.96	172.15
M2-72	12U	2.10	2.10	28.40

Tabla 1.2 Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en MM con glucosa.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	12U	1.93	2.50	163.50
M2-12	12U	1.91	2.37	169.15
M1-24	12U	1.94	2.46	251.00
M2-24	12U	1.90	2.08	228.75
M1-36	12U	1.94	2.36	151.90
M2-36	12U	1.92	2.39	207.10
M1-48	12U	1.97	2.69	212.25
M2-48	12U	1.95	2.50	150.75
M1-60	12U	1.95	2.58	175.70
M2-60	12U	1.95	2.60	105.40
M1-72	12U	1.93	2.44	202.75
M2-72	12U	1.95	2.55	165.65

Tabla 1.3 Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* WT en MM con fructosa.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	9U	2.09	2.04	169.80
M2-12	9U	2.14	2.10	128.70
M1-24	12U	2.10	1.98	130.90
M2-24	12U	2.14	2.14	102.85
M1-36	12U	2.22	2.02	36.05
M2-36	12U	2.17	1.91	47.15
M1-48	12U	2.15	2.12	76.70

M2-48	12U	2.16	2.02	80.90
M1-60	9U	2.12	2.11	114.05
M2-60	12U	2.26	2.40	38.55
M1-72	9U	2.12	2.15	155.90
M2-72	9U	2.06	0.37	3.45

Tabla 1.4 Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en MM con fructosa.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	12U	1.91	2.38	133.30
M2-12	12U	1.90	2.30	157.85
M1-24	12U	1.91	2.26	231.40
M2-24	12U	1.87	2.40	210.15
M1-36	12U	1.95	1.98	41.25
M2-36	12U	1.90	2.13	188.45
M1-48	12U	1.89	2.25	224.95
M2-48	12U	1.92	2.21	153.25
M1-60	12U	1.93	2.29	146.80
M2-60	12U	1.94	2.26	115.80
M1-72	12U	1.90	2.19	126.90
M2-72	12U	-	-	-

Tabla 1.5 Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* WT en MM con casaminoácidos.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	9U	2.03	2.18	94.25
M2-12	9U	2.07	2.21	135.60
M1-24	9U	2.11	2.16	105.20
M2-24	9U	1.89	2.17	60.70
M1-36	9U	2.03	2.22	96.20
M2-36	9U	2.02	1.87	25.90
M1-48	9U	1.64	1.54	15.15
M2-48	9U	1.89	1.64	39.80
M1-60	9U	1.96	2.02	31.50
M2-60	9U	1.86	1.51	17.65
M1-72	9U	1.86	1.80	29.55
M2-72	9U	1.99	1.92	57.35

Tabla 1.6 Relaciones de absorbancia y concentración del RNA obtenido a partir de las muestras de cultivos de *S. coelicolor* Δ -*mdh* en MM con casaminoácidos.

Muestra	DNAsa	A _{260/280}	A _{260/230}	ng/uL
M1-12	9U	2.10	2.06	31.15
M2-12	9U	2.06	1.87	45.20

M1-24	9U	2.03	1.90	63.35
M2-24	9U	2.07	2.05	58.20
M1-36	9U	2.07	2.04	128.10
M2-36	9U	2.09	2.05	144.10
M1-48	9U	2.16	2.16	108.45
M2-48	9U	2.13	2.22	208.70
M1-60	9U	2.12	2.00	78.65
M2-60	9U	2.01	1.80	39.25
M1-72	9U	2.13	1.93	50.30
M2-72	9U	2.14	2.02	61.70