



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Secuenciación y análisis del posible activador
de la lipasa extracelular de Streptomyces
albus G”.

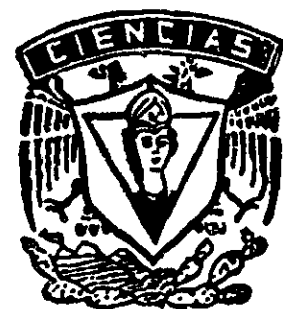
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
CLAUDIA HERNANDEZ FLORES

286020

DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS SERVIN GONZALEZ

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2000.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Secuenciación y análisis
del posible activador de la lipasa extracelular de Streptomyces albus G".

realizado por Claudia Hernández Flores

con número de cuenta 8729774-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DR. LUIS SERVIN GONZALEZ

Propietario DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Propietario M. EN C. PATRICIA GUADALUPE OROZCO SOTO

Suplente QFB. JOSE LUIS SILENCIO BARRITA

Suplente BIOL. ENRIQUE HERNANDEZ HERNANDEZ

Consejo Departamental de Biología

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
Coordinadora de Licenciatura

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mis Padres Eracleo Hernández R. y Ricarda Flores Mendoza, a mi hermano Enrique Hernández Flores, por todo su cariño y apoyo que me han ofrecido a lo largo de mi vida.

A Dios eterno por haberme dado todo lo que tengo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por el PAPIIT con número de proyecto IN201794 participando en el Proyecto "Lipasas de *Streptomyces*, estudios sobre su regulación genética y estructura".

Al Departamento de Biología Molecular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al Dr. Luis Servín González por su apoyo y ayuda incondicional en la realización de este Trabajo.

A Clementina Castro por su ayuda en el conocimiento de los *Streptomyces*.

A Fabiola Váldez Ortega por los datos recibidos de la secuencia de *Streptomyces coelicolor* A3(2).

A la Dra. Carmen Gómez-Eichelman por permitirme participar en el Proyecto de PAPIIT.

A MIS AMIGOS Kenya, Ivonne, Noé, Rocío, Ma. del Carmen, Carlos Gómez.

A el Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, a la Maestra en Ciencias Patricia Guadalupe Orozco, al QFB José Luis Silencio Barrita y al Biologo Enrique Hernández Hernández por las revisiones y consejos que realizaron durante la supervisión de la Tesis.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2-10
OBJETIVO	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19-29
Transformación y transfección de células competentes de <i>Escherichia coli</i> JM101.	19
Protocolo para la obtención de ADN plasmídico y de forma replicativa de fago M13	20
Digestiones con enzimas de restricción de ADN plasmídico y de forma replicativa del fago M13.	21
Purificación de ADN plasmídico por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión.	22
Purificación de ADN plasmídico por ultracentrifugación por gradientes de cloruro de cesio.	23
Preparación de moldes de cadena sencilla para secuencia en fago M13.	24
Elaboración de geles de poliacrilamida.	25
Secuenciación por el método enzimático de Sanger , <i>et al.</i> , 1977.	26
Análisis de la secuencia de ADN y proteína.	26
Diagrama de flujo de la Metodología	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30-61
Secuenciación de la región contigua al gen de lipasa de <i>Streptomyces albus</i> "G".	30
Análisis de la secuencia de ADN.	30
Posibles terminadores transcripcionales	31
Análisis de la secuencia peptídica	33
Motivo de unión a ADN	34
Alineamiento con otros posibles activadores	34
Análisis de aminoácidos	36
Sección de tablas y figuras de Discusión y Resultados	38-60
Conclusiones	61
APÉNDICE	62
Índice de abreviaturas I	63
Índice de abreviaturas II	64
Soluciones amortiguadoras y medios de cultivo	65-67
BIBLIOGRAFÍA.	68-72

RESUMEN

En un trabajo previo se clonó y secuenció el gen de lipasa de *Streptomyces albus* "G" (Cruz 1993), en el cual se habían detectado tres marcos de lectura ORF1 (*lip*), ORF2 y el ORF3.

El inicio del marco de lectura tres, se completó al secuenciar los fragmentos de 1.1 Kb y parcialmente el fragmento de 3.25 Kb de *Sma*I, obtenidos a partir de la clona pBG2. El tamaño del ORF3 es de 2672 pares de bases y codifica para una proteína de 890 aminoácidos. Al mismo tiempo se encontró un nuevo marco de lectura denominado ORF4 hacia abajo del ORF3, que no presenta similitud con ninguna proteína conocida de *Streptomyces*.

El producto del gen correspondiente al ORF3 es homólogo al activador transcripcional de la lipasa de *Streptomyces* sp M11 (Pérez, 1993) y al activador transcripcional de la lipasa de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Váldez. O. 1995 comunicación personal).

Sin embargo, a pesar de todas las similitudes en secuencia con otros activadores no se ha determinado si la baja producción de lipasa se deba a que el producto del ORF3 realmente no este funcionando como activador transcripcional de la lipasa de *Streptomyces albus* "G".

INTRODUCCIÓN.

El género bacteriano *Streptomyces*, pertenece a la familia Streptomycetaceae, del orden de los Actinomicetes; sus miembros se caracterizan por ser eubacterias gram +, con un alto contenido de G+C en su genoma, aproximadamente 73% mol (Wright *et al*; 1992). Son aerobios estrictos y un componente importante en la población bacteriana de muchos suelos, donde participan en el reciclamiento de nutrientes (Goodfellow *et al*; 1983).

La diferenciación morfológica-funcional que presentan es compleja. Su ciclo de vida comprende dos etapas, una fase vegetativa micelial colonizadora y otra fase reproductiva de dispersión (Chater y Merrick, 1979). A partir de una espora se desarrolla una colonia con crecimiento micelial de hifas ramificadas cenocíticas multinucleoidadas, que penetran en el intersticio del sustrato, las cuales secretan enzimas hidrolíticas extracelulares, tales como celulasas, amilasas, proteasas y nucleasas, a partir de los productos de degradación de estas enzimas la colonia obtiene sus nutrientes; una vez que estos se convierten en un factor limitante, el micelio vegetativo presenta lisis, mientras que algunas zonas de la colonia experimentan un proceso de diferenciación, dando lugar a micelio aéreo; durante esta etapa los cambios típicos en la colonia son la formación de metabolitos secundarios, tales como antibióticos y pigmentos así como el almacenamiento de glucógeno (Chater *et al*; 1989; Yoshitaka *et al*; 1992); la segmentación de las hifas aéreas forma cadenas de células haploides uninucleoidadas, que posteriormente se diferencian en esporas pigmentadas hidrofóbicas, las cuales son dispersadas por varios factores como viento, lluvia, insectos, artrópodos, etc. (Chater *et al*; 1989; Schauer *et al*; 1988); ver figura 1.

La coordinación de los mecanismos que controlan la interacción entre el desarrollo morfológico y funcional aún no se comprenden del todo, ya que en estos sistemas la regulación se da a diferentes niveles (Chater, 1989).

Algunas especies de *Streptomyces* coordinan la diferenciación de una colonia por el uso de feromonas, como lo es el factor "A", sirviendo como señales intercelulares en esta etapa. Asimismo la serie de genes *bld*, de los cuales se conocen diez loci en *Streptomyces coelicolor*; *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldF*, *bldG*, *bldH*, *bldI*, *bldK* y *bld261*; que participan directa o indirectamente en el control de la síntesis de algunos antibióticos y de algunos genes de esporulación; un ejemplo es el gen *bldA*, que codifica para un tRNA de leucina, el cual se acumula en la fase tardía del crecimiento bacteriano, este se considera como un mecanismo regulatorio traduccional para genes de esporulación y para la producción de antibióticos (Hopwood y Chater, 1989); este gen a su vez parece estar regulado por otro gen denominado *bldI*, el cual puede estar interfiriendo directa o indirectamente con la región promotora de *bldA* o podría ser requerido para la expresión de un factor transcripcional (Chater, 1989; Leskiw, 1995). El gen *bldB* esta claramente involucrado en la represión catabólica, el nivel de ARNm es bajo durante el crecimiento vegetativo y se incrementa en la iniciación del desarrollo y se ve involucrado en su propia transcripción ya que la proteína BldB interactúa directamente con su propio promotor y presenta un motivo de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice en el extremo carboxilo terminal. (Pope. M. *et al*, 1998). El locus *bldK* consiste de cinco marcos de lectura abiertos que son homólogos de transportadores de membrana de la familia de los oligopéptido permeasa, los cuales son responsables del importe de señales extracelulares para la iniciación de la morfogénesis. El gen *bldD* es requerido para la producción de antibióticos y diferenciación morfológica y ejerce sus efectos positivamente al nivel de transcripción de esas vías. La proteína BldD presenta un motivo de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice cerca del extremo carboxilo terminal y al parecer regula negativamente su propio producto (ELLIOT, M., *et al* 1998). La diferenciación es gobernada por una cascada jerárquica de señales intercelulares y los genes *bld* gobiernan indirecta o directamente la producción de señales extracelulares.

Implicados en la fase de esporulación se encuentran también los genes *whi*, de los cuales se conocen nueve clase de mutantes *whiA*, *whiB*, *whiC*, *whiD*, *whiE*, *whiF*, *whiG*, *whiH* y *whiI*. Los mutantes *whi* se caracterizan por desarrollar un micelio aéreo blanco ya que fallan en producir el pigmento gris que esta asociado con las esporas (Davis, N. y Chater K., 1992), como

ejemplo *whiG* codifica para un factor sigma (σ^{whiG}) el cual es necesario en la iniciación de la esporulación. El gen *whiB* codifica para una proteína similar a los factores de transcripción esencial para la esporulación y *whiE* codifica para la pigmentación normal de la espora (Yu Tin-Wein y Hopwood, 1995).

En *S. coelicolor* A3(2) también se han detectado cuatro genes *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* que codifican factores σ altamente homólogos a σ^{70} de *E. coli*, se ha demostrado que sólo *hrdB* es esencial para el crecimiento; genes homólogos de *hrdA*, *hrdB* y *hrdD* se encuentran en *S. aureofaciens* y se ha demostrado que estos últimos se requieren en diferentes etapas del desarrollo, *hrdB* se expresa en todos los estados de desarrollo de la colonia, *hrdD* se expresa sólo durante la diferenciación del micelio vegetativo adherido al sustrato y *hrdA* se presenta durante la formación de micelio aéreo (Kormanec *et al*; 1993).

Durante la fase del metabolismo secundario, se han reportado proteínas que poseen una característica región hélice-vuelta-hélice que se une a un sitio específico del ADN; como el gen activador *strR*, el cual codifica para una proteína que regula la producción de estreptomicina en *S. griseus* (Retzlaff *et al*; 1995); también los antibióticos actinorrodina, undecilprodigiosina, así como la producción de factor "A" en *Streptomyces coelicolor* se encuentran regulados por el gen *afsR*, el cual posee una similitud con estas proteínas reguladoras de unión a ácidos nucleicos; por otra parte, el producto de *afsR* también presenta una secuencia consenso de unión a ATP tipo A y B, es decir también se encuentra sujeta a una regulación por fosforilación (Horinuchi *et al*; 1990).

Un nivel de regulación adicional ocurre a nivel transcripcional, debido a la existencia de diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa; la heterogeneidad existente en los promotores y la evidencia de diferentes factores. Estas enzimas pueden reconocer diferencialmente secuencias promotoras de genes en *Streptomyces*. Un ejemplo de esto es el gen de la agarasa (*dagA*) de *S. coelicolor* A3(2), el cual presenta cuatro sitios de inicio de la transcripción y al menos tres diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa que intervienen en el reconocimiento de estos sitios; características similares han sido encontrados para el gen de resistencia a neomicina (*aphI*)

de *S. fradiae*, (Janssen *et al*; 1989); y en el operón de galactosa de *S. lividans* (Fornwald *et al*; 1987).

A nivel traduccional aparentemente en *Streptomyces* no siempre se requiere de un sitio de unión a ribosomas (Janssen *et al*; 1989). En algunos genes el primer codón nucleotídico del RNA mensajero actúa como sitio de iniciación traduccional, tal es el caso del gene *afs* el cual interviene en la formación del factor "A" de *S. griseus* (Horinuchi, *et al.*, 1989); un caso similar se presenta con el gene *aphI* de *S. fradiae* (Janssen *et al*; 1989).

La biosíntesis de metabolitos secundarios es normalmente regulada a nivel transcripcional por una rápida asimilación de fosfatos, carbono y nitrógeno (Liras *et al*; 1990); también muchas enzimas involucradas en el metabolismo primario son estimuladas por fosfatos y así proveen grandes cantidades de precursores requeridos para la biosíntesis de antibióticos (Asturias *et al*; 1990).

Durante la síntesis de antibióticos, se generan una serie de mecanismos de resistencia, los cuales van desde la metilación específica de RNAs ribosomales (*S. azureus*) para conferir resistencia a eritromicina y tioestreptona, hasta la adquisición de un transporte activo como alguna proteína de membrana, la cual se encarga de llevar a el antibiótico hacia el exterior (*S. coelicolor*, involucrado en la resistencia a metilenomicina), de esta manera se impide que los antibióticos generados intoxiquen al microorganismo productor (Hopwood y Chater, 1989).

Los estreptomicetos presentan una serie de elementos extracromosomales, como son plásmidos lineales y circulares conjugativos de alto y bajo número de copias, secuencias de inserción, profagos y minicírculos, en los cuales pueden llevar genes de producción y resistencia a inhibidores como los antibióticos, tal es el caso de *S. coelicolor* el cual presenta el plásmido conjugativo SCP1 el cual codifica para la metilenomicina (Hopwood & Chater, 1989). Así como una gran serie de mecanismos de reordenación genómica, ya sea deleciones o amplificaciones que no afectan el metabolismo primario de algunos *Streptomyces* en condiciones controladas, (Altenbuchner y Cullum, 1985; Dyson y Schrempf, 1987). Además se ha considerado seriamente

a *S. lividans* como un sistema de clonación y expresión de genes de *Streptomyces*, así como de bacterias relacionadas con este género, ya que se ha demostrado que la RNA polimerasa de *S. lividans* reconoce las señales de control transcripcional de *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus licheniformis* y *Mycobacterium bovis*. La ausencia de un sistema modificación-restricción, la presencia de una mínima cantidad de enzimas proteolíticas que no degradarían el producto secretado, y los vectores de clonación derivados de *Streptomyces* hacen de este sistema un recurso potencial para la investigación básica y aplicada (Hopwood, D:A: *et al* 1986; Henderson, G. *et al* 1987; Gusek, T.W *et al*; Bibb y Cohen, 1982)

La generación de agentes terapéuticos como antibióticos, anticancerígenos, enzimas de aplicación industrial (amilasas, lipasas. etc) y de uso en la investigación (enzimas de restricción) hacen de los *Streptomyces* una fuente potencial de recursos de interés humano (Chater, 1989; Rodicio *et al*, 1988), ver tabla 1.

Las lipasas (EC 3.1.1.3) se encuentran distribuidas en una gran variedad de organismos vivos; en bacterias y en eucariontes (hongos, plantas y animales). La presencia de actividad lipolítica se describió desde 1901 en *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* y hasta ahora han sido las bacterias productoras de lipasas más estudiadas. Otras fuentes a nivel industrial son *Pseudomonas fragi*, *Alcaligenes sp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* y *Candida cylindracea*. Dentro del género *Streptomyces* se han descrito varias cepas con actividad lipolítica (Sztajer *et al*; 1988; Hass *et al*; 1991; Pérez *et al*; 1993; Cruz *et al*; 1994).

Las lipasas son hidrolasas que actúan sobre los enlaces carboxil-ésteres, presentes en ésteres acilgliceroles, para liberar los correspondientes ácidos grasos y glicerol. Su principal sustrato son triacilgliceroles de cadena larga y su actividad depende de la presencia de una interfase agua-aceite. Se clasifican en tres grupos de acuerdo a la especificidad de su sustrato; el primero no muestra especificidad posicional respecto a la estructura química del ácido graso (*S. aureus*, *Corynebacterium acnes* y *Chromobacterium viscosum*); el segundo grupo sólo degrada enlaces ésteres primarios. es decir en la posición C1 y C3 del glicerol (*P. fragi*, *P. fluorescens* y

P. geniculata) y el tercer grupo rompe cadenas de ácidos grasos, como la lipasa B de *Geotrichum candidum*, la cual es específica para los dobles enlaces entre los carbonos C9 y C10.

Estas enzimas presentan una amplia versatilidad biotecnológica; la mayor aplicación es el desarrollo de sabores artificiales en la industria alimenticia, en la industria de los detergentes. en la hidrólisis de grasas y aceites, así como su contraparte, en las reacciones de síntesis; en estas últimas las más importantes son las transesterificaciones ya sea glicerólisis ó alcoholólisis, es decir la transferencia de un grupo acilo de un triglicérido a un alcohol ó un glicerol (Jaeger *et al*; 1994; Hass *et al*; 1991), ver figura 2, observar tablas 2 y 3.

La actividad de la lipasa depende de la presencia de una interfase, ya que estudios sobre la estructura tridimensional de estas proteínas revelan que el sitio activo de la lipasa se encuentra cubierta por una cadena polipeptídica la cual provoca que el sitio activo sea inaccesible a moléculas de sustrato monomérico. Pero cuando la lipasa se encuentra en una interfase lípido agua, hay un cambio conformacional que lleva a que la cadena polipeptídica se aparte y el sitio activo sea accesible. De esta manera una enzima muestra activación interfacial en la presencia de triglicéridos de cadena larga (Jaeger, *et al*; 1994).

Las lipasas solo muestran actividad cuando el límite de la solubilidad del sustrato es excedido, es decir cuando se forma una emulsión. A diferencia las esterasas (carboxil-esterasas Ec. 3.1.1.1) degradan ácidos grasos de cadena corta y su actividad se encuentra en función de la concentración de sustrato, como la descrita por la cinética de Michaelis-Menten, en la cual la formación de una emulsión no cambia la velocidad de la reacción, ver figura 3 (Jaeger, *et al.*, 1994).

La cinética de las lipasas no puede ser descrita con el modelo de Michaelis-Menten, Ya que esto sería válido en una fase homogénea para enzimas y sustratos solubles. La cinética de la catálisis para las enzimas lipolíticas consiste de dos pasos:

- 1.- La absorción física de la enzima a la interfase, la cual puede incluir una activación de la misma enzima.

2.- La formación de un complejo enzima-sustrato, en la cual el sustrato es hidrolizado para dar el producto y regenerar la enzima absorbida, ver figura 4 (Jaeger, *et al.*, 1994).

Las lipasas extracelulares normalmente aparecen en el medio de cultivo cuando las bacterias alcanzan el final de la fase de crecimiento logarítmico. De esta manera la regulación podría intervenir a nivel transcripcional, traduccional y en la subsecuente secreción de la enzima a través de las membranas celulares (Jaeger *et al.*; 1994).

En 1997 Banchio y Gramajo describieron la primera caracterización del metabolismo de lípidos en *Streptomyces coelicolor* A3(2). A partir de estudios *in vivo* de la β -oxidación con dos enzimas de esta vía, la acil-CoA sintetasa y la acil-CoA deshidrogenasa, se llegó a la conclusión de que la degradación de los ácidos grasos en este organismo es constitutiva, sin la necesidad de la inducción de cualquier tipo de ácido graso. Los estudios de cinética indican que para ácidos grasos de cadena corta como el octanato ya sea ionizado o desionizado, la entrada a la célula es por difusión simple, para ácidos grasos de cadena larga como el palmitato en su forma ionizada la entrada a la célula es por un mecanismo de transporte activo y cuando la molécula esta desionizada esta difunde a través de la membrana celular.

En *Streptomyces coelicolor* A3(2) la expresión de varios genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de carbono se ven reprimidos por el metabolito glucosa. Pero los datos indican que la vía de la β -oxidación en este microorganismo en lugar de ser reprimidos por glucosa se ven estimulados, al menos para ácidos grasos de cadenas largas. Esta estimulación puede ser en dos niveles; 1) por incrementar la importación de los ácidos grasos, afectando el componente transmembranal que se encarga del paso de los ácidos grasos y 2) incrementado los niveles de al menos una de las enzimas del ciclo de la β -oxidación de la acil-CoA sintetasa al menos seis veces. Ellos concluyen que no pueden descartar la posibilidad de que parte del acil-CoA formado sea para la síntesis de fosfolípidos de membrana o de triacilglicerolos los cuales se ha encontrado que son moléculas de almacenamiento.

Se han descrito 3 lipasas correspondientes al género *Streptomyces*. La primera fue obtenida de *Streptomyces sp* M11 (Perez *et al*, 1993) y la segunda de *S. albus* "G" (Cruz *et al*. 1994) las cuales presentan un 74.7 % de aminoácidos idénticos y de residuos similares de 6.9% con todo y secuencia señal, al prescindir de ésta última la identidad aumenta a 82.1% y la similitud disminuye a 5.7% (Cruz, 1993); en *S. sp* M11 se ha demostrado que la producción de lipasa extracelular (gen *lip*) está regulado positivamente por otro gen denominado activador; además estos dos genes podrían estarse transcribiendo de manera monocistrónica ya que secuencia abajo del gen *lip* de *S. sp* M11 en su extremo 3' terminal presenta una estructura tallo-asa con un ΔG° de -33.2 Kcal/mol (Pérez *et al*, 1993). En *S. albus* "G" la producción de lipasa es menor a comparación con la de *S. sp* M11; Cruz comprueba que la baja actividad lipolítica presentada por la clona original pBG1, no se debe a el vector de clonación utilizado (plásmido pB21 generado de la cointegración del plásmido pJV1 y pIJ486, éste último derivado del plásmido pIJ101, Servín-González, 1993), ya que vuelve a subclonar el fragmento de 7.8 Kb en un vector de alto número de copias (pIJ486; Ward *et al* 1986) en el cual obtiene la misma baja actividad lipolítica; Cruz argumenta que la secreción de la lipasa podría deberse a factores extrínsecos e intrínsecos, como la ausencia de proteínas de exportación y las características del péptido señal. Váldez, O. 1995, clonó y secuenció la lipasa y el activador de *S. coelicolor* A3(2), estudios acerca de estos genes se encuentran en proceso.

En 1997 Sommer *et al*; clonó una lipasa extracelular de *Streptomyces cinnamomeus*, la cual presenta un marco de lectura abierto de 825 pb, correspondiente al gen *lipA*, codifica para una proteína de 275 aminoácidos, presenta una secuencia señal de 30 aminoácidos, con un sitio característico de procesamiento que reconoce la peptidasa señal, Ala-X-Ala; la lipasa una vez procesada presenta 245 aminoácidos. Presenta una alta similitud con el sitio catalítico propuesto para otras lipasas, serina-G-(H)-S¹²⁵-(O)-G-. A un lado de *lipA* se presentan dos marcos de lectura, uno corresponde a el ORFA el cual presenta similitud en secuencia con proteínas transmembranales involucradas en el transporte de antibióticos, azúcares y protones. También presenta un ORFB el cual muestra un motivo de unión al dinucleótido flavin adenina y un sitio NAD.

El gen *lipA* presenta un porcentaje de identidad de 29% y una similitud del 60% con tres lipasas de *Pseudomonas*. El sitio activo de serina de las lipasas se encuentra también localizado en los primeros 104 aminoácidos del extremo amino terminal, como lo demuestran los genes de lipasas de *Pseudomonas glumae* y *P. cepacia*.

La lipasa de *S. cinnamomeus* difiere de las dos lipasas de *Streptomyces* descritas anteriormente, Sommer argumenta que quizás las propiedades bioquímicas de las dos lipasas reportadas por Cruz y Pérez, difieran de la lipasa de *S. cinnamomeus*. Tampoco presenta similitud con las esterases de *S. scabies* y *S. diastatochromogenes*.

Un estudio indica que *lipA* de *S. cinnamomeus* expresado en *S. lividans* puede estar funcionando como un monómero activo de 27 kDa ó que esta puede reasociarse "in vitro" para formar un dímero activo de 50 kDa. Por otra parte la variabilidad de esta clase de enzimas puede ser mucho más alto de lo esperado en el grupo (Sommer *et al.*, 1997).

El conocimiento de los niveles de regulación en la producción de lipasas es imprescindible para la explotación de estos recursos biotecnológicos.

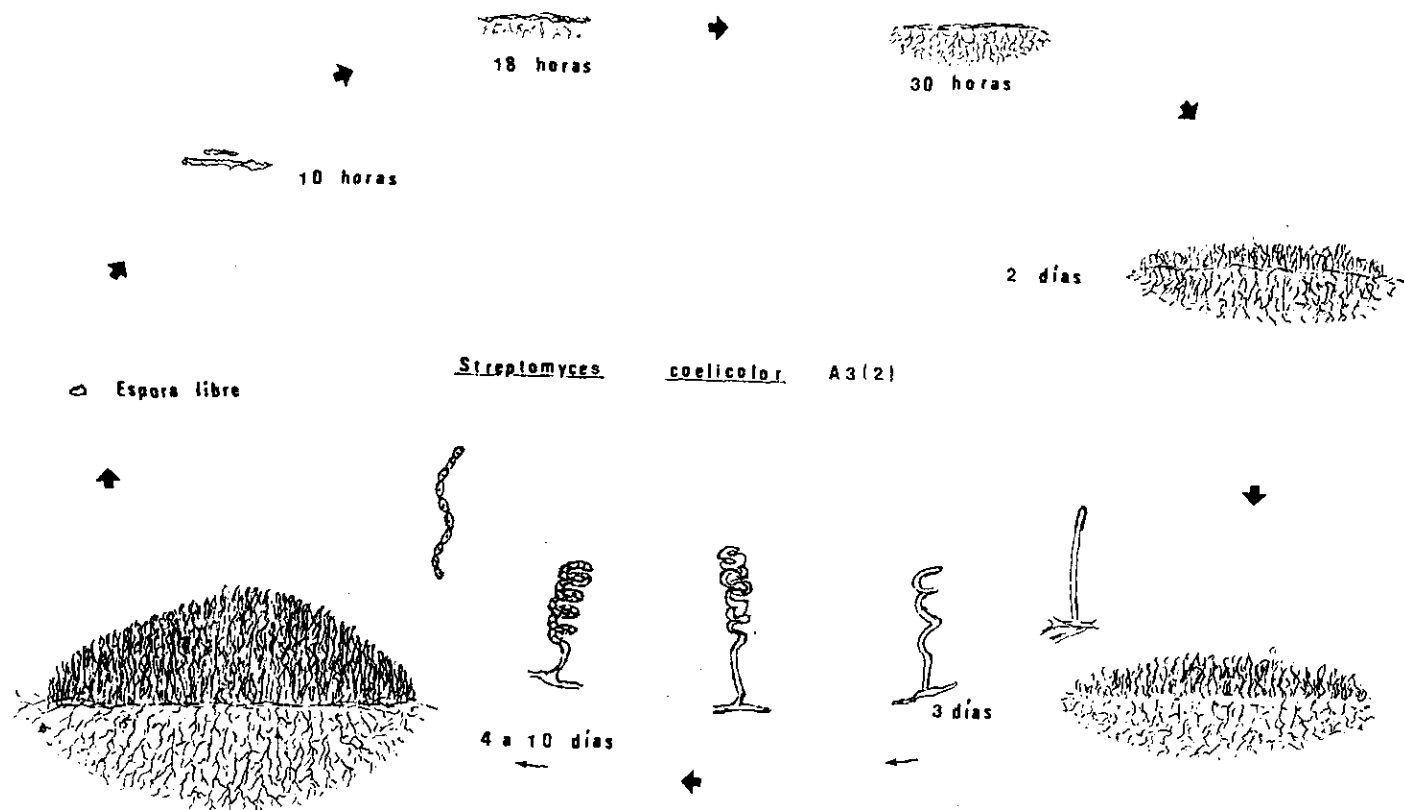


Fig. 1 CICLO DE VIDA DE *Streptomyces coelicolor* A3(2); Chater y Merrick. 1979.

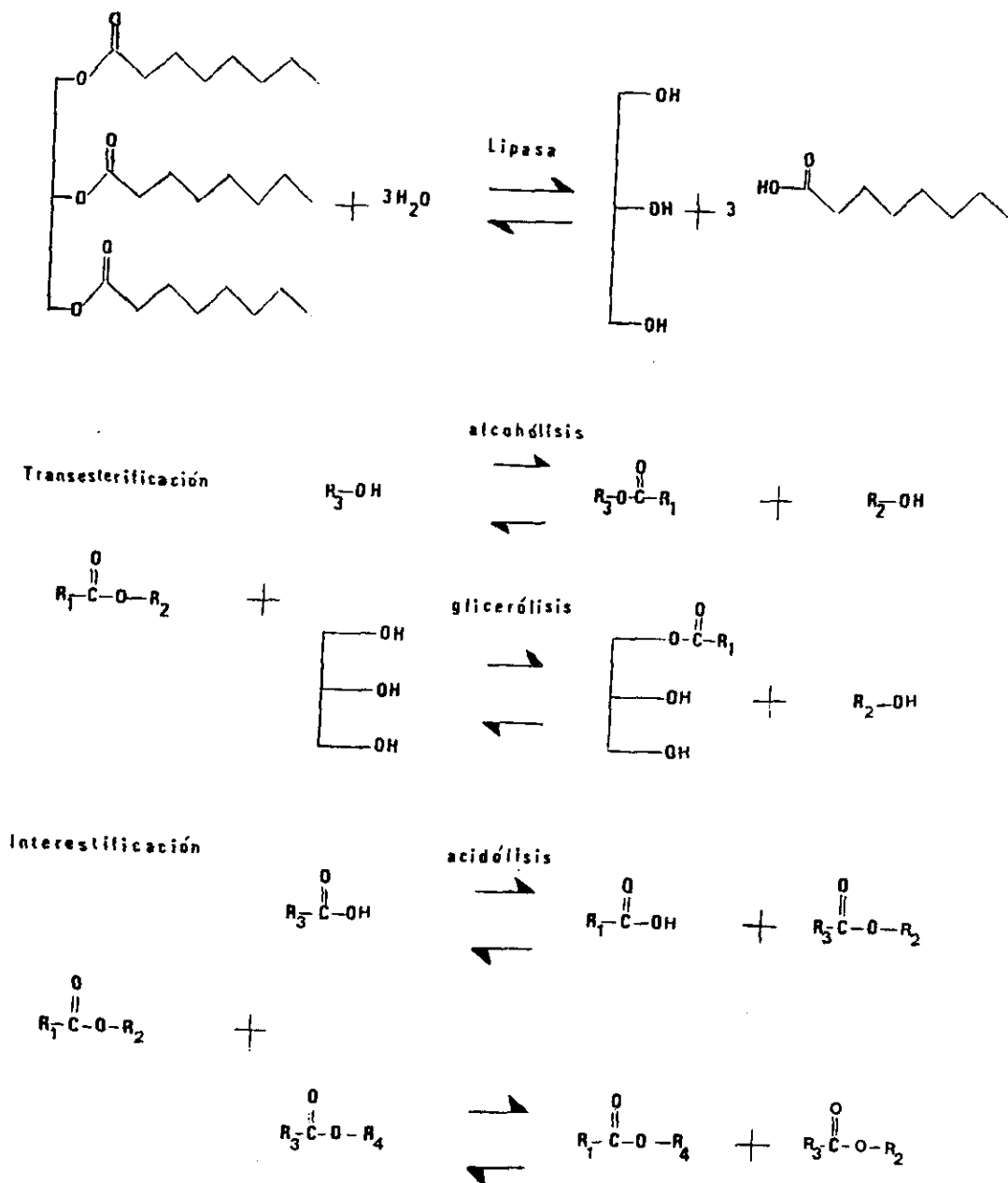


Fig. 2 Reacciones de síntesis y degradación características de las lipasas; Jaeger *et al*, 1994.

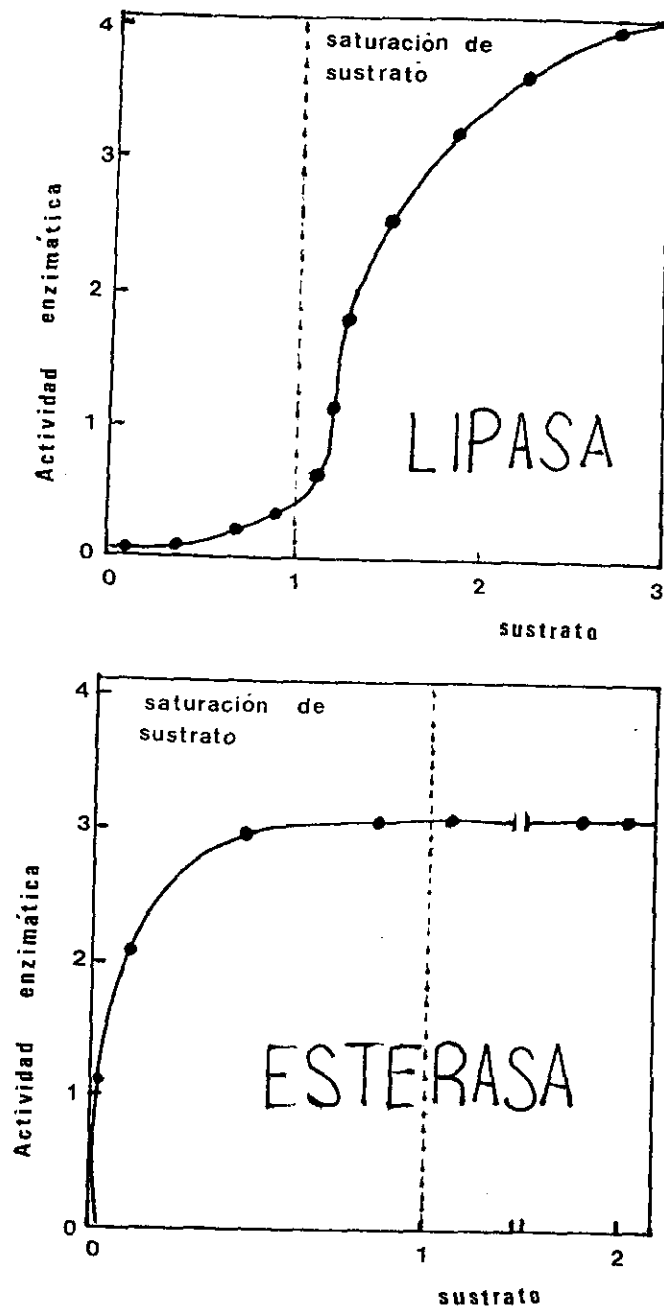


Fig. 3 Perfil de la actividad enzimática de una lipasa de páncreas y una esterasa de hígado de caballo a diferentes concentraciones de sustrato excediendo el punto de saturación Jaeger *et al*, 1994.

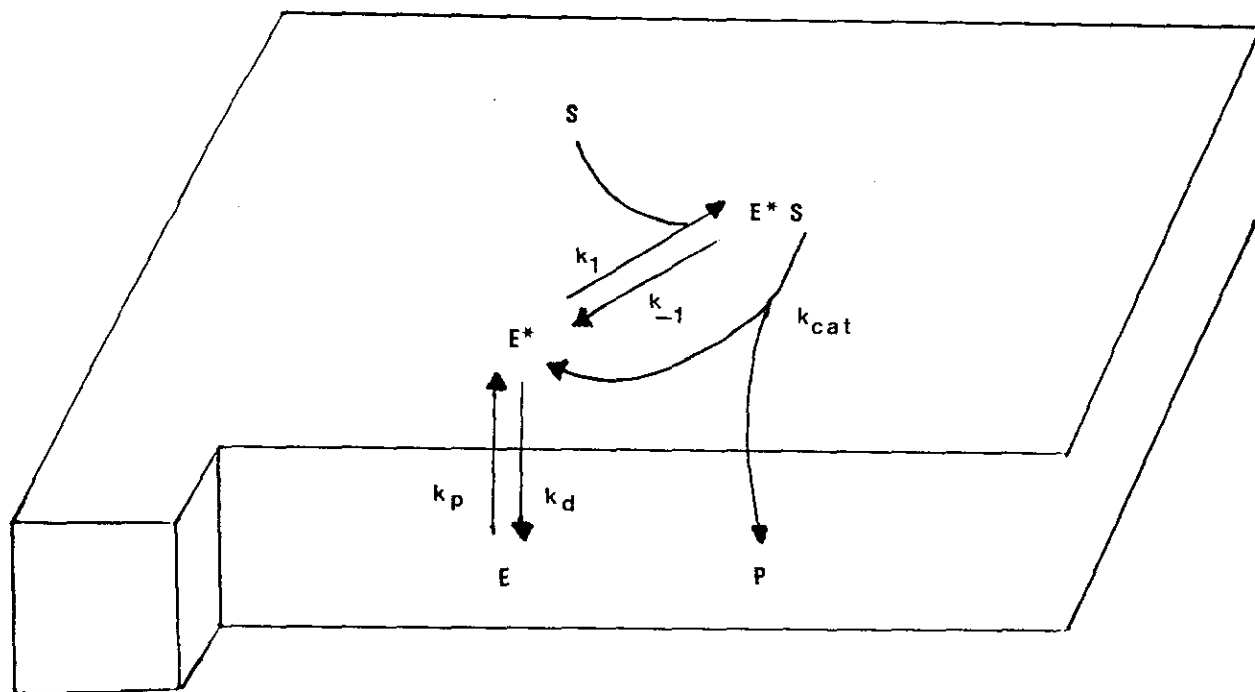


Fig. 4 Modelo de la cinética interfacial de una lipasa soluble en agua la cual actúa en un sustrato insoluble; Jaeger *et al*, 1994.

Tabla 1. Productos que se obtienen a partir de las especies del género *Streptomyces* sp.

producto	Organismo	referencia
lipasas	<i>S. exfoliatus</i> M11	Pérez, 1993.
	<i>S. albus</i> "G"	Cruz, 1993.
	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Valdéz, 1995.
	<i>S. cinnamomeus</i>	Sommer, 1997.
esterasas	<i>S. scabies</i>	Raymer, 1990.
	<i>S. diastatochromogenes</i>	Tesch, 1996.
chitinasa	<i>S. lividans</i>	Miyashita, 1993.
α -amilasa	<i>S. limosus</i>	Virolle, 1988.
xilanasa	<i>S. lividans</i>	Mondou, 1986.
manasa	<i>S. lividans</i>	Arcand, 1993.
celulasas	<i>S. lividans</i>	Shareck, 1987.
agarasa	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Bibb, 1987.
actinorhodina	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Wright, 1976.
metilenomicina	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Kirby 1977.
kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Nakano, 1984.
tilosina	<i>S. fradiae</i>	Brahimi-Horn, 1992.
tetracenomicina	<i>S. glaucensces</i>	Martin, 1989.
puromicina	<i>S. alboniger</i>	Martin, 1989.
undecilprodigiosina	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Malpartida, 1990.
doxorubicina	<i>S. peuceticus</i>	Kauer, 1997.
daunorubicina	<i>S. peuceticus</i>	Kauer, 1997.
bialafos	<i>S. hygroscopicus</i>	Martin, 1989.
estreptomina	<i>S. griseus</i>	Martin, 1989.
avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Dutton, 1991.

Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de lipasas bacterianas

Tipo de reacción	origen de la lipasa	producto (aplicación)
Hidrólisis de grasas y aceites	<i>Pseudomonas</i>	
Glicerólisis de grasas y aceites	<i>Pseudomonas</i>	Monoacilgliceroles (surfactantes)
Esterificación a glicerol	<i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
(Trans)esterificación a glicerol inmovilizado	<i>Chromobacterium viscosum</i>	
Acilación de alcoholes azucarados	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Monoacilesteres azucarados (surfactantes). Enriquecedor de PUFAs.
Acidólisis/Alcoholisis de aceites de pescado	<i>Pseudomonas</i>	
Resolución de alcoholes/esteres racémicos	<i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i>	Construcción de bloques para insecticidas drogas quirales
Politransesterificación de diesteres con dioles	<i>Chromobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	oligomeros, alquilos (intermediarios poliester) lactonas macrocíclicas
Transesterificación de monosacáridos	<i>Pseudomonas cepacia</i>	esteres acrilados (intermediario de poliacrilatos)
Esterificación intramolecular	<i>Pseudomonas</i>	lactonas macrocíclicas

Tabla 3. Lipasas usadas como aditivos en detergentes de uso doméstico

Origen de la lipasa	Nombre del producto	Compañía, año de introducción
Fungica, <i>Humicola lanuginosa</i>	lipolasa	NOVO-Nordisk (Dinamarca) 1988
Bacteriana, <i>Pseudomonas mendocina</i>	Lumafast	Genencor (USA), 1992
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Lipomax	Gist-brocades (Nva. Zelanda), 1995
<i>Pseudomonas glumae</i>		Unilever (Nva. Zelanda)
<i>Pseudomonas sp</i>		Solvay (Bélgica)
<i>Bacillus pumilus</i>		Solvay (Bélgica)

Objetivo general: Secuenciar y analizar el posible activador de la lipasa extracelular de *Streptomyces albus* "G".

Objetivos particulares: Obtención de fragmentos de ADN para secuenciación.

Análisis de la secuencia nucleotídica y peptídica mediante el uso de paquete de Software DNAMAN, PCGENE y la base de datos CDPROT24.

Comparación con otros activadores transcripcionales a nivel de secuencia de ADN y proteínas.

MATERIAL Y MÉTODOS

TRANSFORMACIÓN Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli* JM101. (Método modificado de Hanahan, Inoue, *et al*; 1990).

Un paso central en los experimentos de clonación es la introducción de moléculas de ADN recombinantes sintetizadas "*in vitro*" a células hospederas de *Escherichia coli* y la posterior identificación de clones recombinantes.

Existen dos estrategias para la introducción de ADN recombinante en *E. coli*:

- a) Transformación: si el ADN recombinante se basa en plásmido ó transfección si el ADN de interés se clona en un fago.
- b) Empacamiento "*in vitro*" de ADN recombinante en partículas de fagos.

La estrategia para la selección de clones recombinantes depende de los marcadores genéticos del vector.

Algunos de los más importantes para plásmidos son:

- a) resistencia a antibióticos
- b) bloqueo de la actividad β -galactosidasa (operon *lac*)

Para fagos de tipo M13:

- a) bloqueo de la actividad β -galactosidasa (operon *lac*)

1.- A partir de una caja de medio mínimo se obtuvieron varias colonias de *E. coli* de la cepa JM101 y se inocularon en un matraz de 1000 ml con 250 ml de medio SOB y se crecieron a una temperatura de 18°C hasta una densidad óptica de 0.6, con agitación vigorosa (200-250 rpm).

2.- Las células se colocaron en hielo y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El paquete de células se resuspendió en 80 ml de TB y se incubó en hielo por 10 minutos, se centrifugó nuevamente.

3.- Se resuspendió el paquete de células en 20 ml de TB y se le agregó DMSO suavemente hasta una concentración final de 7%.

4.- Después de incubar en hielo por 10 minutos, la suspensión se distribuyó en alícuotas de 0.2 ml en tubos Eppendorf los cuales fueron inmediatamente congeladas por inmersión en un baño de hielo seco/etanol y se almacenaron a -70°C .

5.- En el momento de la transfección ó transformación se descongelaron las células a temperatura ambiente, se les añadió el ADN y se dejaron en hielo durante 30 minutos.

6.- Transcurrido este tiempo se sometió a un cambio brusco de temperatura (42°C durante 40 seg.) y se colocó nuevamente en hielo.

7.- En el caso de transformación con plásmidos se puso a crecer en medio SOC durante 30 minutos a 37°C , y se inocularon las células con espátula de vidrio sobre cajas de medio Luria con carbenicilina (200 mg/ml); para transfecciones con ADN de fago se hicieron las diluciones correspondientes y se plaqueron inmediatamente con 0.6 ml de un inóculo de células de *E. coli* JM101 por cada 10 ml de LB suave a 42°C . En ambos casos se indujo el operon *lac Z* para lograr la "α-complementación" con IPTG 0.1 mM y X-Gal 40 µg/ml (concentraciones finales).

8.- Se incubaron a 37°C para posteriormente tomar las placas incoloras. estas presentaron el inserto de interés en el sitio múltiple de clonación.

PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y DE FORMA REPLICATIVA DE FAGO M13 ("MINIPREPARACIONES").

Las colonias transformantes de *E. coli* JM101 se crecieron con agitación en 2 ml de LB con carbenicilina 200 µg/ml. Cuando se trabajó con fago, se picaron las placas blancas con palillos estériles y se inocularon en 2 ml de medio LB con células de *E. coli* JM101; ambas se crecieron durante 5 horas a 37°C . A éste paso se le denomina amplificación de ADN.

1.- El paquete de células se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl pH8, EDTA pH8, 25 mM cada uno.

2.-Se incubaron en hielo 5 minutos y posteriormente se les añadieron 200 µl de una solución fresca de NaOH 0.2N y SDS 1%. Se mezcló por inversión hasta homogeneizar, se incubó 10 minutos en hielo.

3.- Se añadieron 150 µl de acetato de potasio 3M pH5.3 y se mezcló por inversión hasta eliminar la viscosidad; se incubó 15 minutos en hielo.

4.- Se agregaron 400 μ l de fenol/cloroformo, se agitó 30 segundos en vórtex y se centrifugó 2 minutos en la microcentrífuga.

5.- La fase acuosa se pasó a otro tubo y se dejó precipitando con 1 ml de etanol absoluto frío, por 5 minutos a temperatura ambiente.

6.- Se procedió a centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga retirándose todo el sobrenadante.

7.- La pastilla se resuspendió en 50 μ l de TE (Tris 10 mM y EDTA 0.1mM pH8), y se añadieron 150 μ l de acetato de sodio 4M pH6, se mezcló e incubó una hora a -20°C .

8.- Se centrifugó la muestra 10 minutos a 14,000 rpm; el sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se añadieron 200 μ l de isopropanol. Se precipitó 10 minutos en hielo.

9.- Nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se eliminó, se resuspendió la pastilla en 45 μ l de TE, posteriormente se precipitó con 5 ml de acetato de sodio 3M pH6 y 125 μ l de etanol absoluto frío, durante 10 minutos en hielo.

10.- Se centrifugó nuevamente, eliminándose el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 70%, después de secarlo se resuspendió en 25 μ l de TE.

11.- Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN plasmídico y de forma replicativa de M13 (doble cadena de ADN) para someterlo a digestiones con enzimas de restricción y posteriormente visualizarlo en geles de agarosa.

12.- Las "minipreparaciones" que contenían el fragmento deseado en tamaño y orientación en el vector, se utilizaron en posteriores subclonaciones.

DIGESTIONES DE ADN PLASMÍDICO Y ADN DE FAGO M13 (FORMA REPLICATIVA).

El ADN amplificado en *E. coli* se sometió a digestiones con enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias determinadas en el ADN.

De esta manera se puede reconocer :

- a) el número de sitios en los cuales actúa la enzima de restricción.
- b) el tamaño del fragmento clonado.
- c) la orientación del fragmento clonado en el vector.

En un tubo Eppendorf se agregó una décima parte de amortiguador del volumen total de la reacción específica para cada enzima, el ADN disuelto en TE y la enzima de restricción correspondiente; para eliminar barridos en los geles de agarosa se añadió RNAsa a una concentración de 10 µg/ml.

Se incubó de una a dos horas a la temperatura requerida para cada enzima.

Para verificar el patrón de restricción, se tomó una parte del volumen de la reacción y se aplicó en un gel de agarosa ó si se deseaba tener algún fragmento en particular se aplicó todo el volumen en un gel de agarosa de bajo punto de fusión para su posterior purificación.

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROFORÉISIS EN GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN.

Los fragmentos obtenidos en las digestiones se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

1.- Las alícuotas de ADN digeridos se corrieron en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0.6%.

2.- Los fragmentos de ADN se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml; para obtener las bandas se visualizaron con luz UV de onda larga, y se cortaron con una navaja.

3.- Las rebanadas de agarosa se fundieron a 65-70°C, durante 10 minutos; se calculó el volumen de la agarosa fundida y se le agregó 1/10 del volumen de NaCl 5M, se mezcló bien y se colocó en el baño de 65-70°C cinco minutos más.

4.- En un tubo Eppendorf se mezclaron 100 µl de NaCl 5M, 400 µl de agua y 500 µl de fenol. Se procedió a centrifugar un minuto y se retiró la fase acuosa; el fenol se atemperó a 37°C.

5.- La agarosa fundida se colocó a 37°C.

6.- Al tubo con la agarosa se le agregaron 2/3 de volumen del fenol saturado y se agitó rápidamente en vórtex durante 30 segundos, evitando que la agarosa se gelificara.

7.- Se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y se recuperó la fase acuosa colocándola en un tubo limpio.

8.- Al fenol se le añadieron 45 μ l de TE y 5 μ l de NaCl 5M, agitándose en vórtex.

9.- Se centrifugó 2 minutos, la fase acuosa se mezcló con la anterior.

10.- A la fase acuosa se le añadió un volumen de fenol/cloroformo y se agitó 15 segundos en vórtex; se volvió a centrifugar 2 minutos a 14,000 rpm.

11.-Se recuperó la fase acuosa y se procedió como en el paso anterior pero solamente con cloroformo.

12.- La fase acuosa se obtuvo nuevamente y se precipitó con un volumen de isopropanol. Para aumentar la cantidad de ADN a recuperar se le puede agregar 10 μ g de tRNA, siempre y cuando la muestra no vaya a ser tratada con fosfatasa alcalina o cinasa; posteriormente se precipita al menos 2 horas.

13.- El ADN se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm, eliminándose todo el alcohol, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y resuspendió en un volumen adecuado de TE pH 8 (Tris 10 mM y EDTA 0.1mM).

Las bandas obtenidas se sometieron a posteriores subclonaciones, transformaciones, amplificaciones y purificaciones.

PURIFICACION DE ADN PLASMÍDICO POR ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO.

Otro método de purificación de ADN es mediante un gradiente de CsCl, así se puede obtener ADN superenrollado libre de hebras de ADN rotas, de proteínas y de ARN total.

1.-El ADN se resuspendió en 4.4 ml de amortiguador TE; y se le agregaron 100 μ l de bromuro de etidio 10 μ g/ μ l.

2.- En un vaso de precipitados se pesaron 4.500 g de CsCl y se disolvieron en los 4.5 ml de la mezcla anterior.

3.- La solución se transfirió a un tubo "Quick-Seal" (BECKMAN) de una capacidad de 4.5 ml, se equilibró y posteriormente se selló.

4.- La centrifugación se realizó con el siguiente programa secuencial, 90 minutos a 90,000 rpm, 15 minutos a 87,000 rpm, 15 minutos a 83,000 rpm, 30 minutos a 80,000 rpm (20°C, rotor NVT90, Ultracentrifuga Beckman XL-90).

5.- Se recuperó con una jeringa la banda inferior correspondiente al plásmido circular superenrollado

6.- El ADN recuperado se colocó en un tubo Eppendorf y se procedió a eliminar el bromuro de etidio, mediante extracciones con volúmenes iguales de isopropanol saturado con NaCl 5M.

7.- Se agregaron 2 volúmenes de H₂O desionizada y estéril y 6 volúmenes de etanol absoluto frío, se dejó precipitando al menos 1 h a -20°C.

8.- Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. la pastilla se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE y se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo 1:1, se mezcló y centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm.

9.- La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se le agregó 1/25 de volumen de NaCl y un volumen de etanol absoluto frío, se precipitó a -20°C durante 1 h.

10.- Las pastillas obtenidas de una centrifugación a 14,000 rpm, se resuspendieron en TE y se sometieron a una nueva ronda de precipitación, centrifugación y resuspensión.

11.- Se cuantificó la concentración de ADN por absorbancia en UV a 260 nm.

PREPARACIÓN DE TEMPLADOS DE CADENA SENCILLA PARA SECUENCIA EN FAGO M13.

El fago M13 presenta la gran ventaja de poder obtener ADN de cadena sencilla a partir de las partículas víricas que se localizan en el sobrenadante de las células de *E. Coli* que han sido sometidas a transfección.

1.- En un tubo Eppendorf se colocaron 225 µl de PEG-8000 al 20% en NaCl 2.5M.

2.- Las células de *E. coli*, se eliminaron del sobrenadante del cultivo recentrifugando a 14,000 rpm durante 10 minutos

3.- Del sobrenadante se tomaron 1.2 ml y se mezclaron con el PEG/NaCl. se incubó durante 30 minutos en hielo.

- 4.- Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 200 μ l de TE.
- 5.- Se agregaron 100 μ l de fenol saturado, agitándose durante 1 minuto en vórtex fuertemente, se añadieron otros 100 μ l de fenol/cloroformo y se vortexearon durante 1 minuto nuevamente.
- 6.- Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 14,000 rpm, obteniéndose la fase acuosa.
- 7.- La fase recuperada se extrajo con 200 μ l de fenol/cloroformo. Se centrifugó durante 10 minutos, a la fase acuosa se le añadió 20 μ l de acetato de sodio 3M pH6 y 200 μ l de isopropanol, se mezcló y se dejaron precipitando al menos 1 h a -20°C .
- 8.- Se centrifugó a 14,000 rpm, eliminando todo el etanol, la pastilla se resuspendió en 45 μ l de TE; posteriormente se añadieron 5 μ l de acetato de sodio 3M pH6 y se precipitaron con 125 μ l de etanol absoluto, al menos durante 1 h a -20°C .
- 9.- Se centrifugó durante 10 minutos, eliminando el alcohol y se dejó secar la pastilla, ésta última se resuspendió en 25 μ l de Tris 10 mM y EDTA 0.1 mM, pH7.6.
- 10.- La concentración de templado obtenido se estimó con una muestra de 2 μ l en un minigel de agarosa al 0.8%.

ELABORACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA.

- 1.- Se prepararon los vidrios de secuencia, uno de ellos se siliconizó, separados 4 mm entre sí y se sellaron con cinta adhesiva a los lados y en la parte inferior.
- 2.- Se disolvieron 31.5 gr de Urea ultrapura en 18 ml de H_2O desionizada, y se agregaron 15 ml de TBE 5X y 12 ml de una solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1); esta mezcla se aforó a 75 ml. La concentración final de TBE fue de 1X, acrilamida 5% y Urea 7M.
- 3.- Se sometió a degasificación mediante vacío y se le hizo pasar a presión por un filtro con un poro de 0.45 μm .
- 4.- Se añadieron 300 μ l de persulfato de amonio al 25% y 20 μ l de TEMED como catalizador, inmediatamente se inyectó la solución entre los dos vidrios de secuencia; se colocaron los peines tipo "diente de liburón" en forma invertida en la parte superior introduciéndolos aproximadamente 2 mm y presionándose los vidrios con unas pinzas.

5.- Cuando la acrilamida polimerizó, se retiraron las pinzas, eliminándose el exceso de Urea y se montó en una cámara vertical de electroforesis con amortiguador TBE 1X.

6.- Se quitaron los peines y el gel se precurrió 20 minutos a 50W constantes antes de colocar los peines nuevamente.

7.- Antes de cargar las muestras se eliminó el exceso de Urea presente en los carriles, para evitar bandas difusas.

SECUENCIACIÓN DE ADN POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO (Sanger *et al*, 1977).

Los templados de cadena sencilla se secuenciaron como lo indican "Taquence 2.0 kit" y "Sequenase 2.0 kit" de USB. las reacciones se hicieron con dGTP y deaza-dGTP para resolver posibles compresiones en las bandas; se utilizó ^{35}S αS -dATP en el marcaje radioactivo.

Se realizaron electroforesis largas (aproximadamente 5 horas) y cortas (aprox. 2 horas) de cada templado secuenciado; una vez terminadas estas los geles se fijaron con una mezcla de metanol al 10% y ácido acético al 5% durante 30 minutos, se transfirieron a un papel Whatman 3MM, se secaron con calor y vacío, y se obtuvieron autoradiografías de los geles para su posterior lectura.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADN Y PROTEÍNICA.

Los paquetes de software utilizados en el análisis de la secuencia fueron: PC/GENE Versión 6.8 de Intelligenetics y DNAMAN versión 2 de Lynnon BioSoft, para analizar secuencias de ADN y proteínas.

La secuencias de nucleótidos se ensamblaron utilizando el programa ASSEMBL.

Para localizar los marcos de lectura abiertos se utilizó el programa FRAME (Bibb *et al*: 1984) y el programa COD_FICK.

El análisis estadístico de uso de codones se llevó a cabo con el programa CDUSAGE.

En la búsqueda de estructuras tipo "tallo-asa" se utilizó el programa HAIRPIN.

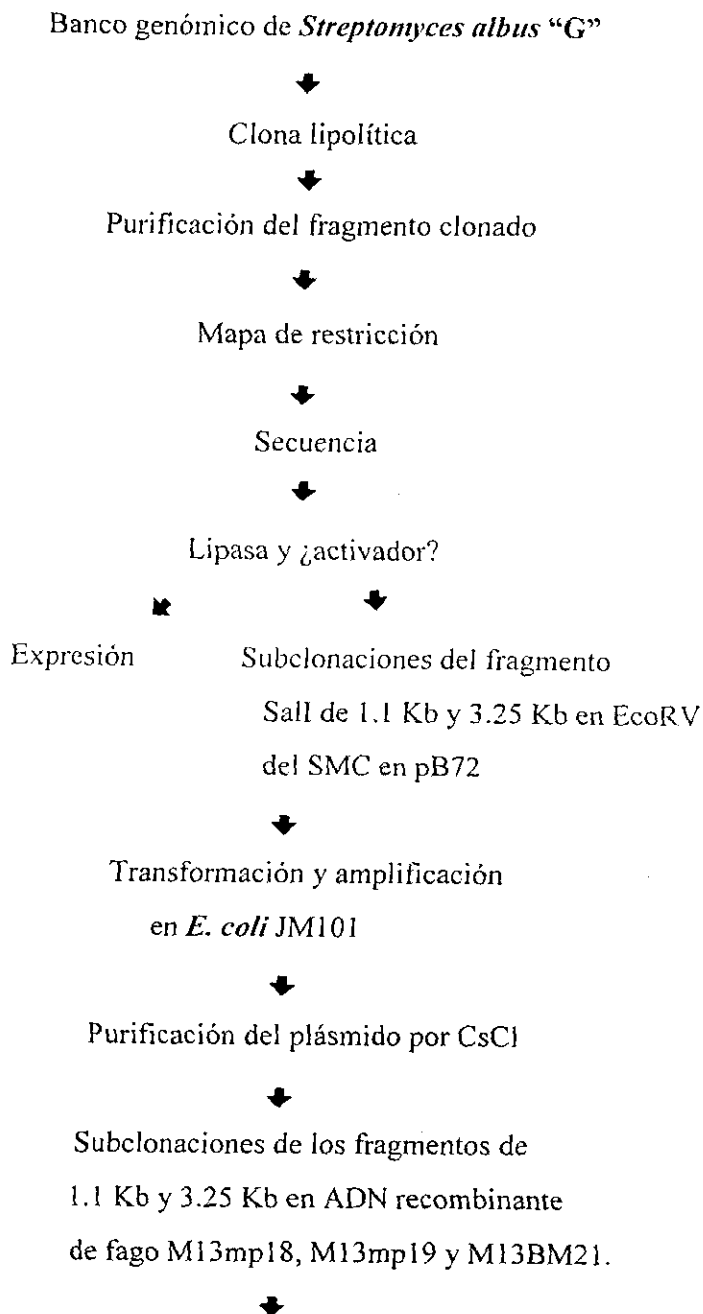
El programa **REGULAT** se utilizó en la predicción de sitios de unión de proteínas a un sitio específico de ADN, del tipo hélice-vuelta-hélice. Esta estructura se sometió a el análisis de los autores Dodd y Egan, 1990.

El análisis de restricción y el mapa correspondiente de la secuencia se muestran en los resultados (Programa **RESTRI**).

Con el programa **TRANSL** se obtuvo la secuencia y composición de aminoácidos.

Para la comparación de secuencias de proteínas se utilizaron los programas **PCOMPARE**, **PALIGN**, **CLUSTAL** y **DOTPLOT**.

Se hicieron análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad con los programas **SOAP**, los porcentajes de hidrofobicidad e hidrofiliidad que se muestran en las tablas se realizaron de acuerdo a la clasificación de los aminoácidos hecha por Kyte y Doolittle, 1982 y Hopp y Woods, 1981 (**DNAMAN** versión 2 de Lynnon BioSoft).



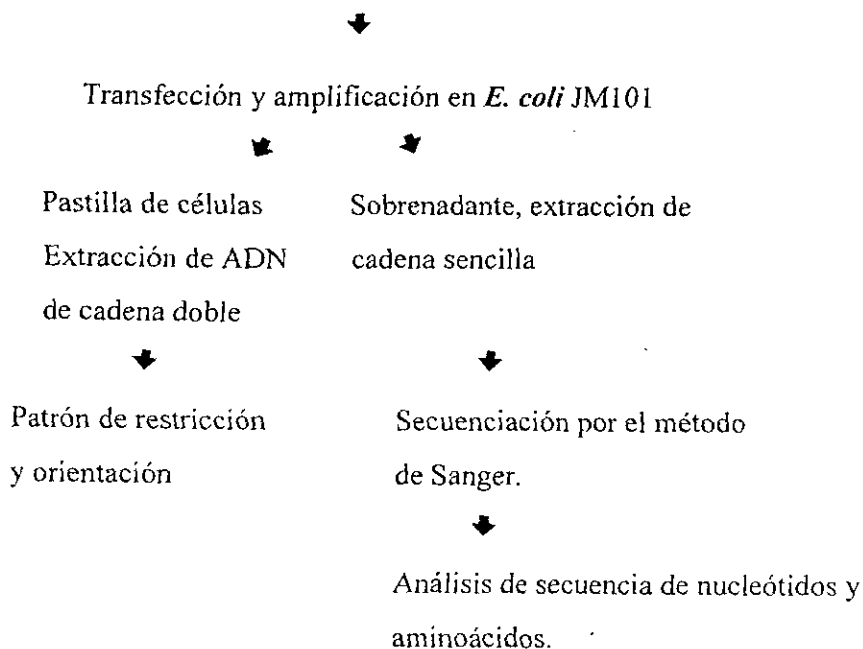


Figura 5. Metodología utilizada para la obtención y análisis de la secuencia del posible activador de la lipasa de *Streptomyces albus* "G".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuenciación de la región contigua al gen de lipasa de *S. albus* G.

En un trabajo previo Cruz (1993) obtuvo una región de ADN del cromosoma de *Streptomyces albus* "G" en la que se localizaba el gen de la lipasa extracelular de esta especie. La secuencia de un fragmento de *SalI* de 2.5 kb demostró que dicho fragmento contenía al gen de la lipasa, y contiguos a este gen se localizaban dos marcos de lectura abiertos, denominados ORF2 y ORF3, el ORF3 presentaba el inicio de un marco de lectura que codifica una proteína similar al activador transcripcional del gen de lipasa de *S. sp* M11. Con el fin de determinar si este gen codifica en realidad una proteína homóloga al activador transcripcional del gen de lipasa de *S. sp* M11 se decidió secuenciar la región de ADN contigua al fragmento de *SalI* de 2.5 kb. como se muestra en la figura 6; el plásmido pBG2 contiene esta región de dos fragmentos de *SmaI*, uno de los cuales sobrelapa 336 pares de bases con el fragmento de *SalI* de 2.5 kb. Estos fragmentos se subclonaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pB72 (Servin, 1995). Los plásmidos así obtenidos se purificaron mediante gradientes de CsCl, y a partir de ellos se hicieron diferentes construcciones utilizando enzimas que cortan internamente dichos fragmentos, en los fagos M13mp18. M13mp19 y M13BM21. La estrategia de clonación se muestra en la figura 7.

Análisis de la secuencia de ADN.

La secuencia completa del fragmento obtenido por Cruz *et al.*, 1993, aunada a la secuencia obtenida de este trabajo se encuentra en la figura 8. La búsqueda de marcos de lectura abiertos mediante el análisis de FRAME (Figura 9) reveló que el marco de lectura identificado por Cruz (1993) hacia abajo del gen de lipasa comienza en el nucleótido 1771 con un codon de inicio ATG y termina hasta la base 4443, con un marco de lectura abierto de 2672 nt. Este marco de lectura abierto codifica para una proteína de 890 aminoácidos, no presenta ningún sitio potencial de unión a ribosomas como lo describió anteriormente Cruz, R. 1993, este ORF se transcribiría en la misma dirección que el gen de lipasa, figura 7.

El marco de lectura localizado hacia abajo del gen de lipasa, presenta un alto porcentaje de G+C en la tercera posición de los codones, sesgo característico en el genoma de los Streptomicetos, (Bibb *et al.*, 1984). En la primera y segunda posición de este gen se observan valores por arriba de los teóricos (datos obtenidos a partir de una tabla de uso de codones para *Streptomyces sp.*, utilizando el programa GCG Codon frequency, 1995), siendo el promedio total en G+C's mucho más alto en este marco de lectura, que en el gen de la lipasa, (tabla 4) mostrando variaciones existentes en el uso de codones en genes diferentes de un mismo organismo. (Wright, *et al.*, 1992). En la tabla 5 se puede observar el uso de codones para el posible activador, ver figura 9.

Hacia abajo del posible activador de la lipasa de *S. albus* "G" se encuentra un marco de lectura abierto, el cual comienza en la posición 4581, no presenta un probable sitio de unión a ribosomas cerca del codon de inicio (Figura 8). Este ORF se comparó con los marcos de lectura abiertos que se encuentran hacia abajo de los activadores de las lipasas de *S. coelicolor* (Valdéz, com. per.) y *Streptomyces sp* M11 (Pérez, 1993); basados en el método de Needleman y Wunsch 1970, se encontró un índice de 0.3 desviaciones estándar muy por abajo del valor teórico de 3.0 D. S., el cual indicaría alguna similitud entre estas proteínas; así mismo se comparó en la base de datos CDPROT24 y no se encontró similitud significativa con alguna otra proteína conocida de *Streptomyces*, lo cual indica que es un gen totalmente diferente a los encontrados debajo de los activadores transcripcionales tanto de *S. coelicolor* A3(2) y *S. sp* M11.

Posibles terminadores transcripcionales.

Se buscaron estructuras tipo "tallo-asa" las cuales podrían ser potencialmente estables en solución acuosa y que pudieran verse involucradas en la terminación transcripcional del gen que codifica el posible activador de la lipasa; se encontraron varias secuencias invertidas repetidas (IRs) con ΔG° menores a -10 Kcal/mol, la más significativa posee un ΔG° de -28 Kcal/mol (2145-2175nt), esta se encuentra hacia el extremo 5' terminal del gen (Figura 10); esta estructura no representaría en este caso una estructura de terminación ya que se encuentra interno en el gen.

a 374 nucleótidos del codon del inicio. Esto solo demuestra que la zona presenta una alta estructura secundaria, es muy probable que la complejidad de la zona no se vea involucrada en una baja transcripción del gen activador y por lo tanto no sería un factor determinante en la baja producción de la lipasa, ver figura 11.

La clona pB13 aislada por Pérez en 1993 de la cepa de *S. sp* M11, presenta arriba del gen *lip* una estructura invertida repetida que forma una estructura "tallo-asa" con un valor de ΔG° de -33.2 kcal/mol (68-109 nt) y río abajo se localiza una región que también presenta un sitio potencial de estructura secundaria con un ΔG° de -27.6 Kcal/mol (1272-1309 nt). Probablemente el gen *lip* y su activador se transcriben de manera monocistrónica (Pérez *et al.*, 1993). Ver figura 11.

Las regiones intergénicas en la clona obtenida por Cruz son pequeñas, la región entre el ORF2 y el ORF1 (*lip*) presenta 153 nt. y entre el ORF1 y el ORF3 (posible activador) presenta 72 nt., el autor describe que no encontró ninguna región promotora localizada arriba del gen *lip* y al final de este no presenta estructuras tipo "tallo-asa". Al analizar la región que se encuentra entre el gen del posible activador de *lip* y el gen del cual solo se tiene su inicio (ORF4) con el programa HAIRPIN, no se encontraron secuencias invertidas repetidas (IRs) que representen una zona potencial de terminación transcripcional. Este hecho junto con la orientación de los genes podría sugerir que se estuvieran transcribiendo de manera policistrónica. (Cruz, 1993).

Es muy probable que al caminar sobre el cromosoma y completar el ORF2 se localice un promotor que permita la transcripción normal de estos genes. Por otra parte la actividad lipolítica de cada una de las cepas en un principio fue remarcable porque *S. sp* M11 muestra mayor actividad lipolítica que la cepa de *S. albus* "G"; además, Cruz comprueba que al clonar la región que comprende a la lipasa y al posible activador en el vector pIJ486 (vector de alto número de copias en el cual anteriormente se había clonado y logrado producir a la lipasa de *S. sp* M11) la actividad lipolítica no se ve incrementada. Entonces sugirió que algunos factores extrínsecos como la falta de algunas proteínas y genes involucrados en la exportación de la lipasa y factores

intrínsecos como su péptido señal pudieran estar afectando la producción de esta proteína. (Cruz, 1993).

Váldez O. en 1995 (comunicación personal) aisló una clona con actividad lipolítica a partir de *S. coelicolor* A3(2); al comparar las regiones intergénicas en la clona se observa que presentan estructuras "tallo-asa", una de las cuales se localiza arriba del gen de lipasa con un ΔG° de -11.2 Kcal/mol, la segunda estructura se presenta adentro del marco de lectura del gen de lipasa hacia el extremo 5' terminal a 52 pares de bases después del codon de inicio (911-930 nt) con un valor de ΔG° de -11.2 Kcal/mol, otra se localiza a 26 pb del codon de inicio del gen activador (2117-2138 nt) con un ΔG° de -20 Kcal/mol, los cuales pueden considerarse como posibles terminadores transcripcionales. Por último en la región que comprende a el gen que se encuentra hacia abajo del activador, se localiza otra estructura con un ΔG° de -20.4 Kcal/mol (5977-5995 nt), Valdéz, 1995. No existe una similitud en cuanto a las regiones intergénicas, ya que *S. sp* M11 presenta regiones mucho más grandes y estructuras tallo-asa bien definidas. *S. coelicolor* presenta regiones mucho más pequeñas con estructuras tallo-asa arregladas en zonas intragénicas e intergénicas y por último *S. albus* en la que se presenta un potencial "tallo-asa" en una región intragénica con valores altos de energía libre de activación. Esto lleva implícito una regulación transcripcional diferente en cada una de las tres cepas de *Streptomyces* descritas. *S. coelicolor* A3(2) y *S. sp* M11 podrían transcribir sus genes de manera monocistrónica, mientras que *S. albus* "G" lo haría policistricamente. ver figura 11.

Análisis de la secuencia peptídica.

Con el programa TRANSL se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir del gen que codifica el posible activador de la lipasa de *S. albus* "G". Al realizar el alineamiento de las secuencias aminoácidas con el programa "Clustal" y el programa PALIGN de la proteína del posible activador de la lipasa de *S. albus* "G" con el activador de la lipasa de *S. coelicolor* A3(2) (Valdéz, 1995), muestra un porcentaje de Identidad de 59.21% y una Similitud de 7.19%, también el activador de la lipasa de *S. sp* M11 (Pérez, *et al.*, 1993) respecto al activador de *S. albus* "G" presenta un valor de Identidad menor que es de 46.63% y una Similitud de 7.3%. El

mismo análisis se realizó para los tres activadores en conjunto, mostrando una Identidad que fue de 34.5% y la Similitud de 29.6%, (tabla 6).

El análisis de PCOMPARE realizado con un máximo estadístico, nos muestra un índice muy alto de significancia para *S. albus* "G" de 66.193 con el activador de *S. coelicolor*, y un valor mucho menor para *S. sp* M11 con el activador en estudio que es de 44.976. Como puede observarse en el alineamiento aminoacídico (Figura 12), existe una mayor homología a lo largo de los tres activadores hacia el extremo carboxilo terminal; los alineamientos de las secuencias de aminoácidos y el dendograma de la figura 13, nos muestra que el activador de la lipasa de *S. albus* "G" y el de *S. coelicolor* A3(2) muestran mayor homología entre sí que con el activador transcripcional del gen lip de *S.sp* M11. La relación filogenética entre ellas se muestra claramente en el dendograma. La similitud existente entre las proteínas se muestra en los Dot-plots (Figura 14).

Motivos de unión a ADN.

En la búsqueda de regiones reguladoras (REGULAT), se encontró que el posible activador de la lipasa de *S. albus* "G", presenta una región reguladora positiva en la posición 845-864 con un valor porcentual de 20.95 (Figura 15, tabla 7); este sitio muestra homología con la región reguladora de *S. coelicolor* A3(2) y con una de las dos regiones presentes en *Streptomyces sp.* M11 (871-890 aa.); estas tres regiones se encuentran hacia el extremo carboxilo terminal de sus péptidos correspondientes.

Alineamiento con otros posibles activadores.

Para saber si la posible secuencia activadora presentaba alguna homología con otras proteínas que fueran activadores potenciales, se realizó una búsqueda en el GENBANK. Se encontraron varias, la más representativa fue *cho-orf3* de *Streptomyces sp.* SA_COO descritas por MOLNÁR en 1993; ellos anteriormente habían clonado y secuenciado el gen de una colesterol oxidasa y al realizar la ruptura de la región en la que se encuentran *cho-orf3* junto con

otros genes homólogos a este (*cho-orf4* y *cho-orf1*), la producción de colesterol oxidasa decrecía; lo cual indicaba que estaba regulando de alguna manera a esta última. Ellos describen que estos genes presentan similitudes con genes reguladores como *UhpA* y *FixJ*; el primero es un activador transcripcional del sistema de transporte de azúcares y el segundo es una proteína que participa en la regulación de la fijación del nitrógeno, ambas de *E. coli*. Las proteínas descubiertas por MOLNÁR presentan regiones muy conservadas entre ellas, este hecho hace sugerir que el parecido que presentan estas proteínas se debe a que sus genes experimentaron un proceso de amplificación y que esto representa un primer paso hacia una evolución divergente (MOLNÁR, 1993), ver el dendograma de la figura 13.

El alineamiento de los activadores de las lipasas y de las proteínas activadoras encontradas por MOLNÁR se muestra en la figura 12, la región de la homología es la correspondiente a el motivo hélice-vuelta-hélice, al realizar el análisis de PCOMPARE con el posible activador de *S. albus* "G" y los genes descritos por MOLNÁR se encontró que el único gen con el que muestra un valor significativo es con el denominado *cho-orf3*, el cual posee un valor de 7.858 desviaciones estándar, para *cho-orf1* presenta un valor de 4.25 D. S; y para *cho-orf4* un valor de 1.103 D. S. En la figura 13 se muestra el dendograma en el que se puede observar la relación filogenética de los diferentes activadores de *S. albus* "G", *S. coelicolor* A3(2) y *S. sp* M11 y con los genes reguladores descritos por MOLNÁR. Estos se ramifican en dos grupos debido a la diferencia de tamaño en las secuencias y a los genes a los cuales regulan.

Los proteínas activadoras descritas anteriormente, se caracterizan por tener una similitud estructural que permite a estas proteínas interactuar con el ADN, los motivos hélice-vuelta-hélice, generalmente contienen una secuencia de 20 aminoácidos semejantes, (Pabo, 1984); de los cuales incluyen el invariable patrón

Posición			
5	9	15	18
Ala	Gly	Val	Leu
Gly	Ser	Ile	Ala
Ser	Asn		Trp

Lys	Cys	Ile
		Leu
		His
		Glu

Las hélices α poseen un patrón característico de residuos no polares con un Gly conservada en la posición número 9, pero se ha visto que no se requiere de esta y que puede ser sustituido por otro aminoácido con características polares semejantes; tal es el caso del posible activador de *S. albus* "G", en la que la Gly es sustituido por una serina.

Dodd y Egan en 1990 propusieron un método estadístico con la que se puede determinar la probabilidad de que la secuencia de nucleótidos forme un motivo hélice-vuelta-hélice, en las distintas proteínas reguladoras. Otras secuencias reguladoras fueron comparadas y analizadas con este método, entre ellas se encuentran los activadores transcripcionales *luxR* de *V. fischeri* y *SdiA* de *E. coli*, ver figura 16.

La secuencia nucleotídica que corresponde a la región reguladora del posible activador de *S. albus* "G" mostró poseer un valor de 3.6 D. S. con una probabilidad de que la secuencia forme una estructura hélice-vuelta-hélice del 73%, estos valores son menores que los obtenidos para las regiones reguladoras de *S. coelicolor* A3(2), el cual es de 3.7 D. S. con una probabilidad de formar una hélice-vuelta-hélice del 75 %, para *S. sp* M11 de 4.1 D. S. con un 92 % de formar H-V-H y para el activador transcripcional de *SdiA* de *E. coli*, con una D. S. de 3.7 y una probabilidad de formar H-V-H del 75 %. Dodd y Egan indican que un valor por debajo de 2.5 D. S. no son valores significativos de formación de H-V-H. Para el posible activador transcripcional de la lipasa extracelular de *Streptomyces albus* "G" se presenta un valor óptimo, sin embargo factores en "cis" como la secuencia misma del activador, la falta de un promotor característico ó factores en "trans" como proteínas de exportación pueden estar interfiriendo con la producción de la lipasa

Análisis de aminoácidos.

En la tabla 8 se observa que la composición de aminoácidos del posible activador de *S. albus* "G".

La composición de aminoácidos de los tres activadores tabla 9, nos muestra que el activador de *S. albus* "G" es una proteína que posee un valor porcentual de aminoácidos polares de 56; 12.49% más polar que el activador de *S. coelicolor* A3(2) y 24.30% más hidrofílica que el activador de M11. Al analizar la secuencia peptídica con el programa SOAP, éste indica una proteína de tipo periférica para el posible activador de la lipasa de *S. albus* "G" con un valor Gravy de -5.165491.

Se realizaron análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad del activador de *S. albus* "G", mostrando una ligera tendencia hacia la hidrofiliidad, ver figura 17.

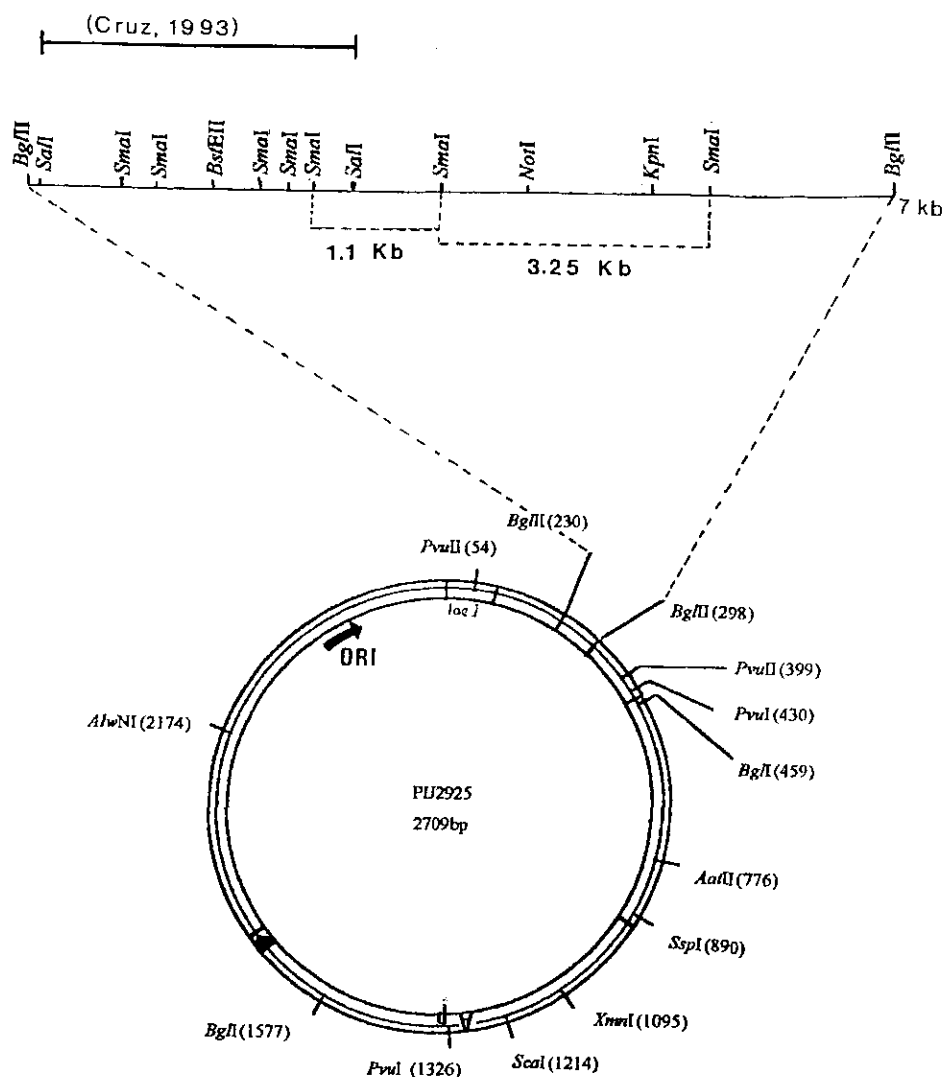
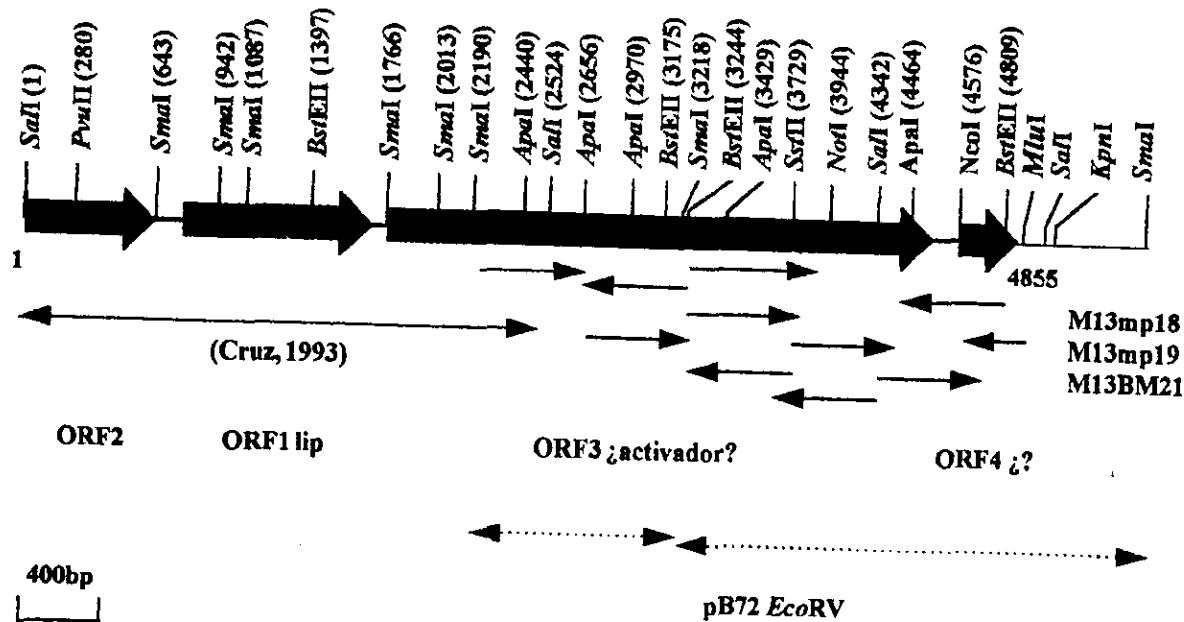


Fig. 6 Plásmido pBG2, mapa de restricción parcial del inserto de 7 Kb del genoma de *Streptomyces albus* "G" clonado en el sitio *Bgl*II del sitio múltiple de clonación del vector pIJ2925 (Cruz, 1993).



S. albus G

Fig. 7 Estrategia de clonación y secuenciación de los fragmentos *Sma*I de 1.1 Kb y 3.25 Kb obtenidos a partir de la clona pBG2 (Cruz, 1993). Las flechas $\rightleftarrows$ indican los segmentos de ADN obtenidos por las diferentes enzimas de restricción de las subclonaciones realizadas en los fagos M13mp18, M13mp19 y M13BM21.

Sali
 1 GTCTGAAGCTCTCCCTCACTTACTTCTCTTCATGACCTTCGCCACCACTCTCCCTCCCTG
 1 S T L S V T Y L S F M T L A T T L A A C
 61 CGGGGTGGTCTCTGACAAACCGGTCTGATCGTGGAGCCATGGGCCATCGGCCCCGACTT
 21 G V V L D N A V L Y V G A M A Y G P D F
 121 CGGTCCCTGGCCGGGTCTCTGTTGGCCATGTTGAGCGCGCTCACCGGCTCTGTGGCGCG
 41 G P L A G V S V A M V E R R H R L V A R
 181 CTGCCTGATCTGCTGCTGGTTCGGGTTCGCCCTCGCCATCGCCGTGACCGTCTGTTCAG
 61 C L I C L L V G F A V A Y A V T V L F S
 241 CCTCGCCATGGAGCGCGCGCTGACTCTTCCACGCGGAGCAGCTGACCAAGGCACCGCCGAT
 81 L A M D A A G L F H A E Q L T R H R P I
 301 CACCGAGTTCATCGTCTCGCCCGACGAGTCTCCCTGATCGTGGCGTCTCTCCCGGAGT
 101 T E F I V S P D E F S L I V G V L A G V
 361 CGCGCGCACCTCTCTCTCACTCTCCGCAAGTCCGCGCCCTGGTTCGGCGTGGCCATCTC
 121 A G T L S L T S A K S G A L V G V A I S
 421 COTACCAACCATCCCGGCGCCCGCAACCGCCCGTTCGCCCTCTCTACCGCAACTACGC
 141 V T T I P A A A N A A V A L S Y G N Y A
 481 CCAGACCCGCGCTCCAGCGAAGAGCTCTCTCAACCTGGTGGCCATCTCCGTCGCGG
 161 Q T R A S S E Q L L L N L V A Y C S V A G
 541 GACGCTGACCTGCTGGCGCAGAAGTGGCTGTGGCGGATGCGCGGGGACGGGGGGCCGC
 181 T L T L L A Q K W L W R M R R G R G A A
 601 GCGCGCGGACGGGCGCCAGGACCGGTGATTCTGCGCGTGCGCGGGCGCGGTGGGCGACC
 201 P A D G R Q D R *
 661 GACAGTGGCAGAGCAACTCGCCCGTGAAGCGGTGTCTCGTGGGCTCTGTGGCGCCTGGGC
 721 GCGCGGTCTCCGCGCGGACCGCGCCCGCGCGCGGCCCAACGACCGAGAGGACGCTCGCGG
 781 TGCACTCCACCCACGTACCGGAACACCCAGGCCCCCGGCTGAGCGCGCGCTGGCGG
 2 M H S T P R T G T T Q A P G L S R R L A
 841 CCTCGGCCCGCGCTGGCGCGCGTCTCGGCTCACCAGCTCTCCACCCCGCGCGC
 22 A S A A A V A A V V G L T T L S T P G A
 901 AGGCGCGGACAAACCGTACGAGCGCGCGCCCGCGCCACCGGGCGAGCATCGAGCGC
 42 Q A A D N P Y E R G P A P T R A S Y E A
 961 CGCGCGCGCGTACGCGCTCTCGCAGACCTCCGTCTCTCGTGTGTCTCGGCTTCG
 62 P R G P Y A V S Q T S V S S L V V S G F
 1021 GCGCGCGCACCATCTACTACCGACACGACCGCGACCGCACCTTCGGGGCGCTCGTG
 82 G G G T Y Y Y P T S T G D G T F G A V V
 1081 TCACCCCGGCTTACCGCGACCGAGTCTCCATGGCTGGCTCGGGCGCGCTGGCT
 102 V T P Q F T A T E S S M A W L G P R L A
 1141 CGCAGGGCTTCGTGCTTTCACCATCGACACGCTGACCAACCTCGACACGCGGACTCAC
 122 S Q G P V V F T I D T L T T L D Q P D S
 1201 CGGCGCGCAGATGCTCGCGCCCTCGACTACCTGACCGAGCGCAGCTCGGCGCGAACAC
 142 R G R Q M L A L D Y L T E R S S A R T
 1261 GGATCGAGCGCACCCGCTCTCGGCTCATCGGCCACTCGATGGGCGGCGCGCAGCTGG
 162 R I D G T R | L G V I G H S M G G G G T L
 1321 AGGCGGCAAGTGGCGGCCCTCGCTGAAGGCGGCGATCCCGCTCACGCGTGAACCTGG
 182 E A A K S R P S L K A A I P L T P W N L

BstEII

1381 ACAAGACCTGGCCCGAGGTGACCAACCCGACGCTGGTCGCGCGCCGACGGGGACACCG
202 D K T W P E V T T P T L V V G A D G D T

1441 TCGCCCGGGTCCGACCCACCCGAAAGCCCTTCTACTCCAGCTGCGGCTCCAGCACGAGCC
222 V A P V A T H A K P F Y S S L P S S T D

1501 GCGCCTACCTGGAGCTGAACAACGCCACCCACTTCGCGCCCAACCTCTCCAAACACCA
242 R A Y L E L N N A T H F A P N L S N T T

1561 TCGCCAAGTACAGCCTCTCCTGCTGAAAGCGCTTCATCGACGACGACACCCGCTACGAGC
262 I A K Y S V S W L K R F I D D D T R Y E

1621 AGTTCTCTGCGCGCTGCCGCTGCCGACCGCGACATCGAGGAGTACCGGGGACGTCGC
282 Q F L C P L P V P D R D Y E E Y R G T C

1681 CCCTCGGTGCTGACGACCGCGCCCTGCGACGCGGAAAGTGCGGACGCGCCGCTTCCGC
302 P L G G

MluI

SmaI

1741 ACCGGGTATACGACGCGTAACCTCCCGGGGATGACCGCGGAGGAACCGCCCTCCCGACG
1 M T G E E P A L P T

1801 GTGCGCTGACAGCGCCGCGACCGCAATTGAGCCCTGTCGCGCTGCTGGACCAACCCG
11 V R L H G R A P Q L S R V R A W W H Q P

1861 CCGGCGACCGGACCGCCCTGCTGGTGGCCGCGGAGCGCGGCTCGGCGGACCGCGGTG
31 P A H R T A L L V A G E P G L G R T A V

1921 CTGCGGTGGCGCGCCCTGCTGCGCGCGCGCAACCGGCGACCTGCTGCGCGGACCC
51 L R W A A R V L G A G S T G H L V A P

1981 GCGCGCGGCGCGCCGCGCACGAGTGGACCGCGCGGACCGCTGCTGCGCGCGCTGGAGAGC
71 G A O P R H Q E W T P G T L L H A V E S

2041 GCGGAGGCGCAAGGTCCCGCGGCTGCTGCTGCGCGGACGACCGGCGCGCGCGCGCGC
91 G E G R V P A L V C A D D A D R W P P A

2101 GCGCGGCGGCTCTCTCGGGGAGGCGGCGGCGGCTGTCGAGGCGGCTGGCGCGGCTCTG
111 A R R L L G E A A Q R L S E A G G G L L

2161 CTCACCGCGCGCACCAACCGTCCGCTGCGCGGGAACGCGCGGCTGCGCGGCTGCGC
131 L T A A T H R P L P G E L A A L P A V H

2221 CTGGACCGGCTGGCGCGCGGAGGCGCGGCGGCTGCTGCGGAGGCGGCGGCGGAGAC
151 L D P L A F Q E A A A L L A E A A R E T

2281 GTGGAGCCCTCCCTGCGCGCGCAATTGATCGCGGAGGCGGAGGCGCAACCGCGGCTGCTG
171 V E P S V A A E L I A E G E G N P A L L

2341 GCGCGCTGCTCCACCACTGTCTCCCGGCGGCGCTGCGGAGGCGGCGGCGGCTGCGCGG
191 R A L V H H L S P A A L R G R A P L P R

2401 CCGCTCGCGGACCGCGGCAACCTGCGGAGGCTGCGGCGGCGGCGGCTGCGCGGCGGAT
211 P L A D A A T L A R V A G P A L T G H D

2461 CCGCGGACGCGGCGGCTGCGGCTGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCGGAG
231 P R T A A L A V L V A A G T R P A G A D

2521 CGGCTGACACCGGCTGCGGCTGCGGCGGCTGAAAGGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGG
251 R V D T R L A L R A L N R L V P G A R P

2581 GACCGCGGCTGCGCACCGCGGCTGCTCCACGACGCGGCGGACACCTCGGCTTCCGAGC
271 D P A C P P A L L H D A G D T L G F R S

2641 CCGCTGCTGCGGCGGCGGCTGCTGCTGCGGCGGCGGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
291 P L L G R A L Y A A A S P A R R R A A H

[illegible]

```

4021 GACCGGCACGCGCGCGCGCGCGCGCTTCGAGCACGCGCGGTACGACCGTCTGCAACGTC
751 D R H A A A G G G F E H A R T T L L H G

4081 AAATGGCTGCGACGGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGGCACGCGACAGGCTCGCGCGCGCGCTC
771 K W L R R R R R P R E A R D R L G A A V

4141 GCGCGCTTCGCGCGCTCGCGCGCGCGCGCGTGTGGCGCGCTCAGGCGCGGTACGACGCTGCG
791 A G F A R C G A G V W A R Q A R D E L R

4201 TCGCTGCTACGCGCGCGTCCCGCGCGGACCTCACCGCGCTGTCCTCTCTCACCCCGCAG
811 S L V T P P S P P D L T A L S S L T P Q

4261 CAGCGCGCATCGCGCGGTTCGCGCGCGCGTGCACGAAAGCGGAGACCGCGCTCGCG
831 Q R R I A R F V A R G A T N R E T A L A

4321 CTCTCCGTCAGCGTCCGACCGTCCGACTACCACTGCGCGCGGATCTTCGCGCGCGCTCGGC
851 L S V S V R T V D Y H L R R I F A A L G

4381 GTCCGTTCCCGCTGGAAGTGGCGCGCTGCTGGACGAGCGGAGCACTCGCGCGGAGGG
871 V R S R L E L A R L V D E A E Q S A G G

4441 TGAGGGCACGCGCGCGCGCGCGCCACACGGTCTTCACACCGCGTGC CGCGGCTCACGCG
891 *

4501 GGATCGCTATGCGGAAACCAACACAGCGCGCGGTAGCGTCACTTCTCAGAGGGAACGTT
Neal

4561 TGTCTCACCGGGAGTCCATGTTAAACCGCGCGCTCTTTCGCGCGCACTCTCACTGGCACTGG
I M N R R S L P A V S L A V

4621 CCGCGCGCTGCGCTGTCCGCTGCGCGGGCGGGGACGGGAAGTCCGCTGAGGACGACA
15 A A A L A L S A C G G G D G K S G E D D

4681 AGATCCCGGGGCGGACGCGCGCGCGGTTCCAGCGCGCGCGCGGAGCGCGGTGCGTCGC
35 K I A G A D G G G G S S A A P E P G A S

4741 CCGAGGCGGAGCGCGCGCGGATCAAGCTGCGGACGGACATGAAGAACGTCTTCGAGGGCG
55 P E A E R P A I K L P T D M K N V F E G

4801 GCGGCACGGGTACCGCGTGGCGGAGCGCGTCTTCCCGGACAGCGAGGCGCGGA
75 G G T G D P V A E A V L A G Q R G A

```

Fig. 8 Secuencia de nucleótidos del fragmento *SalI* de 2.5Kb clonado y secuenciado por Cruz en 1993, aunada a esta se presenta la secuencia del fragmento de *SmaI* de 1.1 Kb y la secuencia parcial del fragmento de 3.25 Kb de *SmaI* obtenidos a partir del plásmido pBG2 (Cruz, 1993). La secuencia muestra 46 pb arriba del sitio *BstEII* en la posición 4809. — Sitio de unión a ribosomas, ↑ punto de procesamiento del péptido señal, --- región hidrofóbica que rodea al sitio de procesamiento del péptido señal, * marcan el término de un ORF, la secuencia que forma el motivo hélice-vuelta-hélice se encuentra enmarcado.

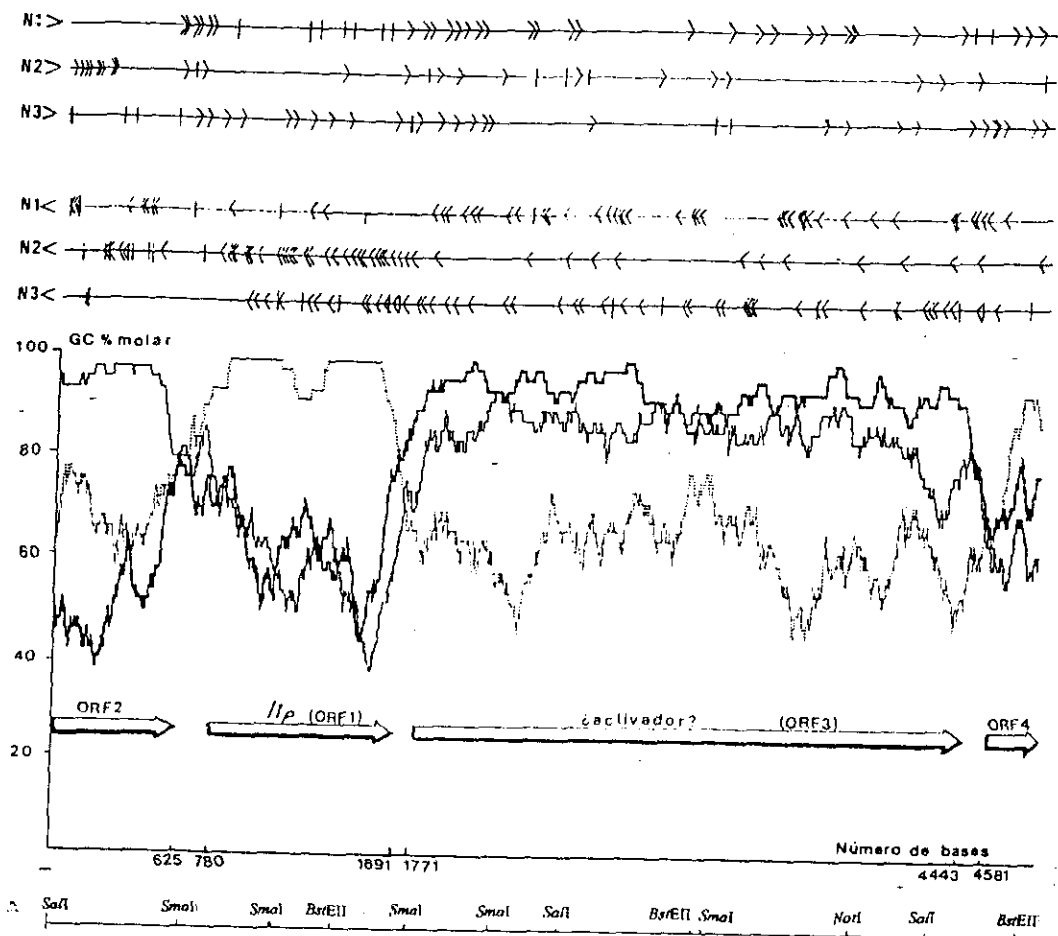


Fig. 9 Análisis de la secuencia de nucleótidos con el programa FRAME (Bibb *et al.*, 1984) el cual determina la cantidad de G+C de las posiciones de los nucleótidos en cada codón, Cruz demostró la presencia de tres ORFs uno correspondiente a el gen *lip* (ORF1), un ORF2 y el inicio del ORF3. En este trabajo se completa el ORF3 (posible activador) y el inicio de un nuevo ORF4. La flecha horizontal indica la posición en la que se transcribe cada gen. En la parte superior se encuentran indicados los posibles codones de inicio -ATG y GTG- y los codones de término en cada una de las tres posiciones. -N1, N2, N3- en ambos sentidos a lo largo de las dos hebras de ADN.

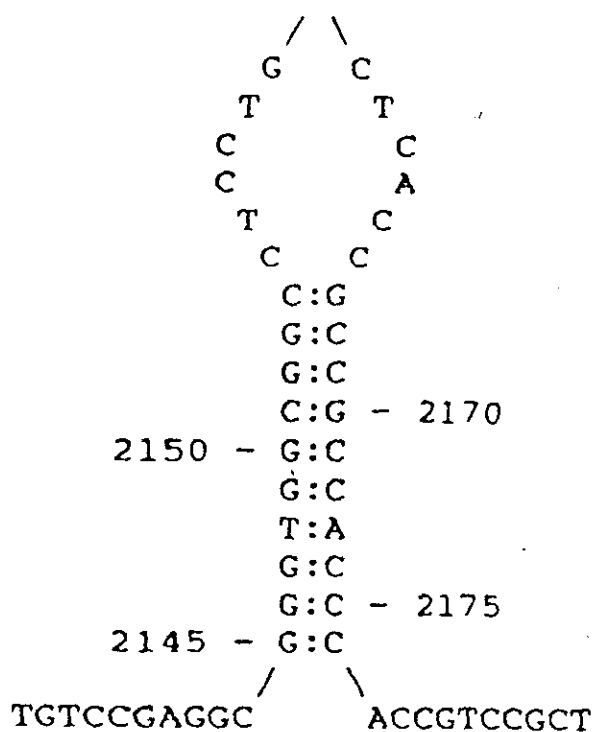
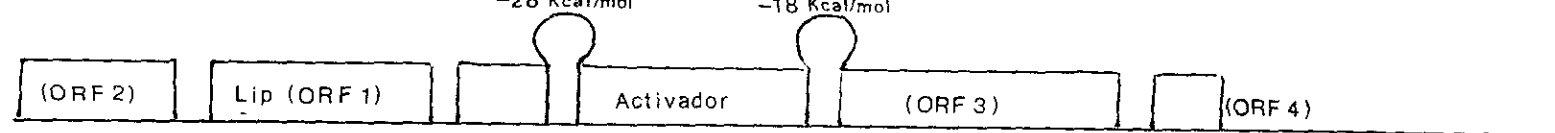
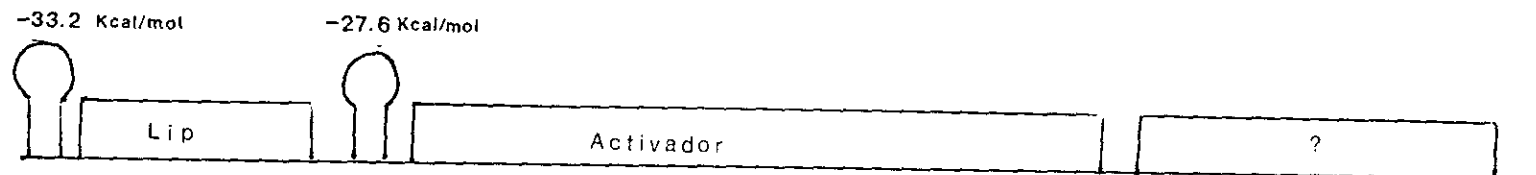


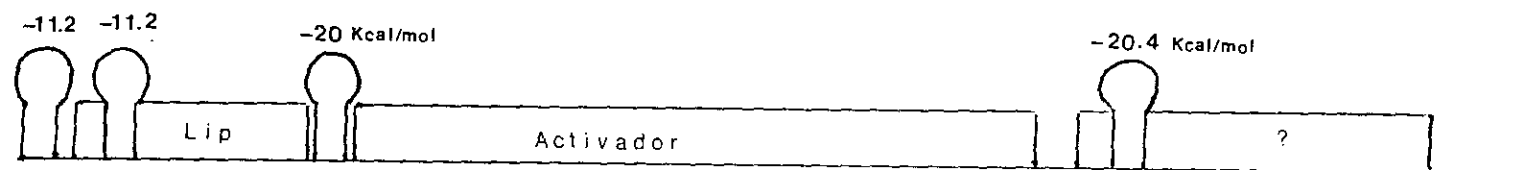
Fig. 10 Estructura invertida repetida (IR) en la región 5' del gen del posible activador de la lipasa de *Streptomyces albus* "G".



Streptomyces albus "G"



Streptomyces sp M11



Streptomyces coelicolor A3(2)

Fig. 11 Estructuras invertidas repetidas (IRs) localizados en las regiones intergénicas e intragénicas de las clonas obtenidas a partir de *S. albus* "G", *S. sp* M11 y *S. coelicolor* A3(2).

ACT_LIPM11	M--LYGTASAAGTAATASADSAGLPDPVGPAAVTGPAARA-----ASA	41
ACT_SALBUS	M-----TGEERALPTVRLHGRAPQLSRVRAWWHQPPAHRTALLVAGEPGL	45
ACT_SCOELI	M-----TGQTTVRTAVRVHGRSAQRRALRAMLDALPAHGGRLLLAGEPGL	45
CHO_ORF1	MTAV-----VLVALQ-----TRDAELA	17
CHO_ORF3	MSPLPGRRDEEDLLNSLLSALRRGRPALVGVHGGPPGIGRSALLDRAAALA	50
CHO_ORF4	TA-----	2
ACT_LIPM11	GRAGSADRGGRATHAAPADRAGPVPAPPEPFTPEPLTPEELLARLRDSTD	91
ACT_SALBUS	GRTAVLRWAARVLGAGSTGHLVAGPGAGPRHQE-WTPGTLLHAVESGEGR	94
ACT_SCOELI	GRTTLLQWAARSFRAGPVLHLGPGPDANHL----TAGQLLDTLRAAAVA	91
CHO_ORF1	RR-----	19
CHO_ORF3	ERAGVRTVAAQACREETDLPHGVAEQLHAALGTGRQPADLCRALLAAARE	100
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	RPLLVCADDAHAWDPACRTALAAAAARRLGPGS-----GVGILIAADD--	133
ACT_SALBUS	VPALVCADDADRWPPAARRLLGEAAQRLSEAG-----GGLLLTAATHR	137
ACT_SCOELI	APVLVCVDDAHRWDAPARTELARAARLLSTAD-----RVGLLLSVASDR	135
CHO_ORF1	-----LLSHRREG-----	27
CHO_ORF3	QPLLVVDDVQWADTPSLRALQALARRLAGTSLMLLTARS DALPPGPDDR	150
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	--GPAFA-----GLPTRRLGPLDEDASAALLDRLAGAGAGATTDPLDPVV	176
ACT_SALBUS	PLPGELA-----ALPAVHLDPLAPQEEAAALLAEAA-----RETVEPSV	175
ACT_SCOELI	AVGPEFA-----RLPVVHLDPLAPARAAALLDDLT-----DGVAAPAV	173
CHO_ORF1	-----DGH-----GY	32
CHO_ORF3	IEPCPLTDGHAVARHTLDLGPLTQDAVGEILGRAWGT-----AVDPGF	193
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	RAELLREGAGNPRLLTALLGHLTPGRLTGRTPLPSPLPGAEGVLEAYAYR	226
ACT_SALBUS	AAELIAEGEGNPALLRALVHHLSPAALRGRAPLPRPLADAATLARVAGPA	225
ACT_SCOELI	REQLLAEAEGNPALLVALVRRLSPAELRGHRPLPSPLAEAGVLAEEAGGV	223
CHO_ORF1	RPSSLQLIRGSNAAARGDL-----	51
CHO_ORF3	REAAQAQAVEGNPMVLRSVVRRFGR---HGWRPVDHLPH---LTDSAAEA	237
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	LDALPAPARALL--LAAAQEHPEPAGAGTDALLLLRAGTR---AGLPR	270
ACT_SALBUS	LTGHDPRTAALAV--LVAAG-TRPAGADRVDTLRLALRNRLVP-----	266
ACT_SCOELI	PTGPSAHARDLLL--TVAAA-GEASDGSADAGLVRDALRRRLRPAPGHGP	270
CHO_ORF1	-----	51
CHO_ORF3	VRERTLRTLAMLPEELLDVLRVVAAGEDCSTGMIASLAEPRTTGAARAL	287
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	DFLDDALFGPAATE----GLLQAGSRVHFSPPLAARAVLHHTPPARRRA	316
ACT_SALBUS	-----GARPDPAFPALLHDAGDTLGFRSPLLGRALYAAASPARRRA	308
ACT_SCOELI	GLGPDPLGLPDPGAEPPLPGQLVLGDRRLFRSPPLVRRTVHATAAADRRRA	320
CHO_ORF1	-----PTALEYFLDW-----	61
CHO_ORF3	TLLSGTG-----LLTPGPRPAFREPKAAEAVLARLSTERREE	324
CHO_ORF4	-----	2

ACT_LIPM11	AHELLAALLGEAGGRAGTAAQA--CAAPGPDHALAARLEAAATA--	362
ACT_SALBUS	AHRALAEYYAADGHR---LTALLHRSWSAADGAADAGLADRLAAEATAAG	355
ACT_SCOELI	VHRALADALDGGGHR---LTALLHRSWSLDGPAPAPASADRLAATAADGA	367
CHO_ORF1	--GRAAERADW-----C-	71
CHO_ORF3	LHARAADWAHRWAVPDSGVARMMLGARVLGAAWA----VDVLRREAAARCR	370
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	-PYSHAERSSALARAAALTPDPPLRSARFAAAAEQAAHAGDPDRARALLA	411
ACT_SALBUS	AKEPPALRSLACARAAVLAGPGPESAGROTRAAELALDAGDAHRARLLAA	405
ACT_SCOELI	VPASHRLRATAYARAAELTADGARRAERYTAAAEQALLAGRPERARPLLA	417
CHO_ORF1	-----NPAVF-----	76
CHO_ORF3	LAGKRAAAARLLQRALREPMPPPLRVRLLELSAAVLLSEPEAADRHL--	418
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	RTAAPAETGSGLIAPTGTGGPGLAPYVHGLLALRSGPAVDAHEALLAAALL	461
ACT_SALBUS	---AVPEHLLPFG-TGAPRPRTR---PGTLVDGPAGDAHHALARRSPL-	446
ACT_SCOELI	---AARDRAAP---DAVRGRAELLRGMTTELRDGPVGDHQSLLLAASLL	460
CHO_ORF1	-----PWRSWAAGLH-----	86
CHO_ORF3	-----RQALLVPADAGAGPFVWRAAELLVARGDVVAAQPLIAQCIGRT	461
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	GPHDSGRALHALLGAADAAWVRGDAGGYLEAMGRVDP-----TPYGDAF	505
ACT_SALBUS	HARRPRTGRGRPLAAADAAWAAGDLAACLTSLGPDTPGGPEPEAPG----	492
ACT_SCOELI	AADDPAEAAAAALAAADAAWAAGDLPACLATLAPEPPLRAEHSPGSDGP	510
CHO_ORF1	-----YRLG-----RPDHAHDL-----VDE-----	101
CHO_ORF3	EPGSADRAALRALYWLAEQ-SQPEAAHELDL-PPVDELPELPEQPAEAAA	509
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	ASYRAGMCAVLAGRTAEGHALLRRCCLDPDGSAGHPVLRRCPDPA---GL	552
ACT_SALBUS	-----DQRAGMRALLEGRFGPAARRLGRVREQGTTTPAAPETL	530
ACT_SCOELI	AAARTA--AVVHDHVRGMRALLEGRDLDRAGAPLGQVVRRSRTG-DRPETL	557
CHO_ORF1	-----EYERAVAWGT-----	111
CHO_ORF3	AAWRTAL---LGRDVDRARQLARAALGPEAR-----PVVPPTL	544
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	LRAGVAALVL-GEVAAACRIGARALGAVRTRGPVLLPQALEYLAYAE LR	601
ACT_SALBUS	LSATAALL-GEVEAARRTGARALAGARQEGSAALVPRALEYLAYAE LR	579
ACT_SCOELI	LSAAAAALL-GDVDAARSGGARALAAARQLGSDALVPQALEYLAYAE LR	606
CHO_ORF1	-----	111
CHO_ORF3	QVAACHALVLSGDFAEARAALDRVLVYAHTDSRAVAGLALLVAGLTEL R	594
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	AGLHAAAR---AHAEGLHAARRTGQPNSSARLHAVLALAASVEGPGEAC	648
ACT_SALBUS	AGRHAEAR---AHAEGLRAALRSGQRNTAAHHHAVLALAASIEDEPHVV	626
ACT_SCOELI	AGRHPQAR---THAEGLRTALRAGQRNTAAHHRAVLALAASIEEEDAV	653
CHO_ORF1	-----PVAIGRAQRV-----KGAVTEG	128
CHO_ORF3	RERPEAATVALARAQEVMPHCW--HPLMTPGLVALMALRYLERGDRAAA	642
CHO_ORF4	-----	2

ACT_LIPM11	AAHCDAAAGAVPHGLAQPATLATWARGRADLAAGRPEEAAARLGLPLVRP	698
ACT_SALBUS	EEHVEAACATARSHGLAQVLTLAQWAAAGRADLGRGRPLEAADRLGLLVLP	676
ACT_SCOELI	ARHVAAALDTARRHGLAQAAALAQWAAARADLGRGRPFDAADRLGLLVLP	703
CHO_ORF1	ERGIELLRESAAT--LDRS--VN--AMERATA-----	155
CHO_ORF3	GRSLALARPAGAEGGLAWAYLLY--TRGRVRLAGGQREEALADL-----	684
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	GPGQGHFAVRTLAVPCYVEAVVLGGRGGELSSVDEFAAWADRTADPQAP	748
ACT_SALBUS	GPRRGHFAVWRLAVPCFVEAAVPAGRAAEARTLLDEGAGWASFGADPQAA	726
ACT_SCOELI	GPGRGHFAVWRLAVPCFVEAAVLGRDEEDARRVLTDFADWAAFGADPQAA	753
CHO_ORF1	-----LLLGRRLQAAG-----RPAEAEVR--	174
CHO_ORF3	-----LEC--GRLLARRVTNPALLP-----WRSAAALAHGP	714
CHO_ORF4	-----	2
ACT_LIPM11	AQLARCRALTAPADEADARYAEALAHHDRAAGDGFERARTLL--LYGQWLR	796
ACT_SALBUS	AQLARCAALLDPTEEADALYRLALDRHAAAGGGFEHARTTL--LHGKWL	774
ACT_SCOELI	AQLARCHALLAPAEHADALYRHALDRHDEAGDGFERARTAL--LYGKWL	801
CHO_ORF1	-----LRQARDQALACGAPWIVERA-----	194
CHO_ORF3	A--PDCPV-----AAGLLAEERRLALAWGAPGVVTTESLLGTLTGGRRLH	755
CHO_ORF4	-----GGRMP	7
ACT_LIPM11	RRRRTREARTPLRDALVAFQRC SARAWAERAGGELRAAGEPVAGAVRDTG	846
ACT_SALBUS	RRRRPREARDRLGAAVAGFARCGAGVWARQARDELRSVTPPSPPDLTA-	823
ACT_SCOELI	RRRRPREARGRLGTALAGFERCGAGVWAAQARDELRALGAAPRSPGAGAG	851
CHO_ORF1	-----RRELHTMA-----SGHTSL	208
CHO_ORF3	HTHPDAGAPASWQYRQALVALGTAPFSGHRTIDSLGSGATAARPAPAKP	805
CHO_ORF4	Q-----LATSP	14
ACT_LIPM11	GDGVLS----ALTPQQQRIARCVAEGATNREVALRLSLSFRTVDHHLRNV	892
ACT_SALBUS	-----LS----SLTPQQQRIARFVARGATNRETALALSVSVRTVDYHLRRI	865
ACT_SCOELI	TPARLG----RLTPQQLRIARQVAEGATNREVALTLGVSTRVTDYHLRKV	897
CHO_ORF1	-----AVEALTPTEERRVAGLAHGAANKDIAEQLDVSSRAVEKHLTRA	251
CHO_ORF3	PAARVPGPPHGLTDAELRVAALADGMANRAIAAELQVTLRTVELHLTKA	855
CHO_ORF4	-----DSLTESERRVAALAQGGVSNKKIAEALFITTRTVEMHLTNV	55
	* . * . * . * . * . * . * . * . * .	
ACT_LIPM11	FAALSVRSRTELARLLGPQTSPMPRTSRSPQSPQSPQSPQ--P	934
ACT_SALBUS	FAALGVRSRLELRLVDEAEQSAGG-----	890
ACT_SCOELI	FAALGVRSRLELARMVGQAERAQEAQAAQDARRAGHQEKTGAQP	941
CHO_ORF1	YRKLQVGGRTELAALAHLLPGPTAA-----VRP	279
CHO_ORF3	YRKLGI RGRPQLATALDSPHPLPM-----EHS	883
CHO_ORF4	YRKLAVRGRADLPGLGGMGPALP-----GH-	82
	. * . * . *	

Fig. 12 Alineamiento de la secuencia de residuos de aminoácidos del posible activador del gen de la lipasa de *S. albus* "G" y los activadores transcripcionales de la lipasa de *S. coelicolor* A3(2) (Váldez, O. 1995; *S. sp* M11 (Pérez, 1993) y los productos de los genes *cho_orf3*, *cho_orf4* y *cho_orf1*, de *Streptomyces sp.* SA-Coo (MOLNÁR, 1993). Los asteriscos (*) muestran los aminoácidos que son idénticos y los puntos (.) los que son similares.

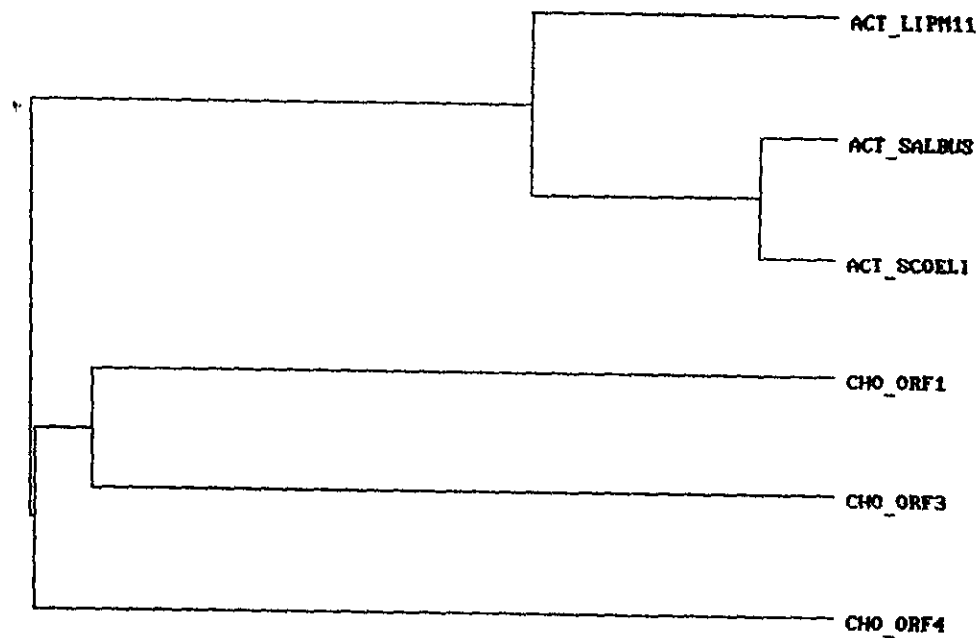


Fig. 13 Dendrograma obtenido a partir del alineamiento de los aminoácidos de los activadores de *S. albus* "G"; *S. coelicolor* A3(2) y *S. sp* M11, así como los productos de los genes reguladores *cho-orf1*, *cho-orf3* y *cho-orf4*, de la colesterol oxidasa de *Streptomyces sp* SA_Coo.

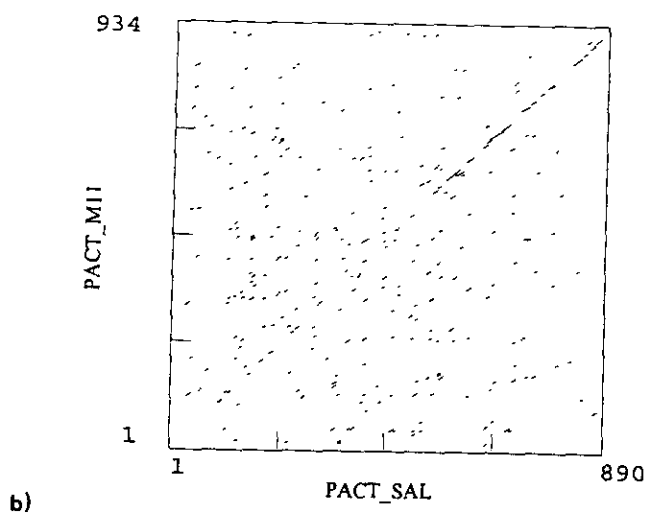
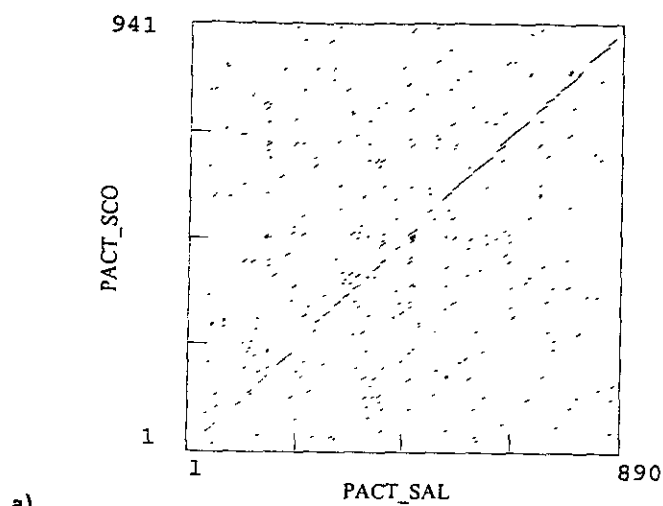


Fig. 14 Dot-plots en los que se muestran la similitud del posible activador de *S. albus* "G" respecto a los activadores de a) *S. coelicolor* A3(2) y b) *S. sp* M11

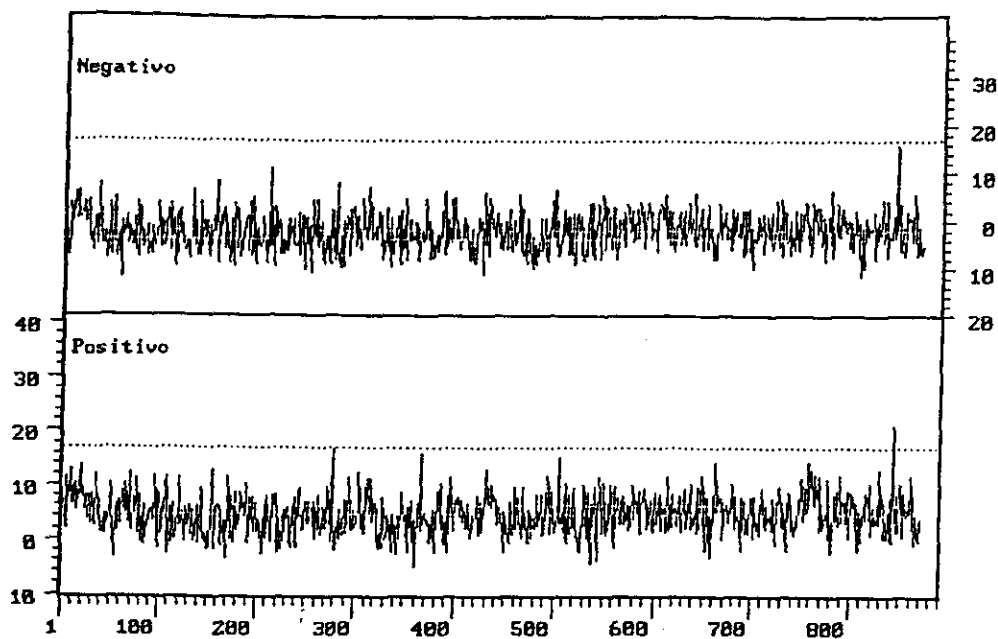


Fig 15 Gráfica en la que se muestran los valores de la secuencia de aminoácidos del posible activador de la lipasa, la región reguladora positiva está representada por el pico sobresaliente.

Dodd y Egan %H-V-H

HTH_SALBUS	NRETALALSVSVRTVDYHLR 1298	3.6	73%
HTH_SCOELI	NREVALTLGVSTRITVDYHLR 1327	3.7	75%
HTH_SPM11	NREVALRLSLSPRTVDHHLR 1459	4.1	92%
ECOLIUHPA	VKEIAAELGLSPKTVHVVHRA 1243	3.4	68.9%
REMILFIXJ	NKSIAYDLDISPRTVEVHRA 9072		----
ECOLIFIMZ	NKEIADKLLLSNKTVSAHKS 1248	3.4	68.9%
VFISCHLXR	SWDISKILGCSERTVTFHLT 1125	3.0	50%
ECOLISDIA	SAEIAMILSISENTVNFHQK 1343	3.7	75%
CHO_ORF3	MANRAIAAELQVTLRTVLHLT		50%
CHO_ORF4	VSNKKIAEALFITTRTVELHLT	2.24	----
CHO_ORF1	AANKDIAEQLDVSSRAVEKHLT	1.4	----

Fig. 16 Alineamiento de los motivos hélice-vuelta-hélice del posible activador de la lipasa de *Streptomyces albus* "G" con diferentes proteínas reguladoras, los valores de los motivos fueron comparados individualmente con la matriz generada por Dodd y Egan, 1990. Un valor estadístico por debajo de 2.5 desviaciones estándar no representa un valor significativo para la formación de H-V-H.

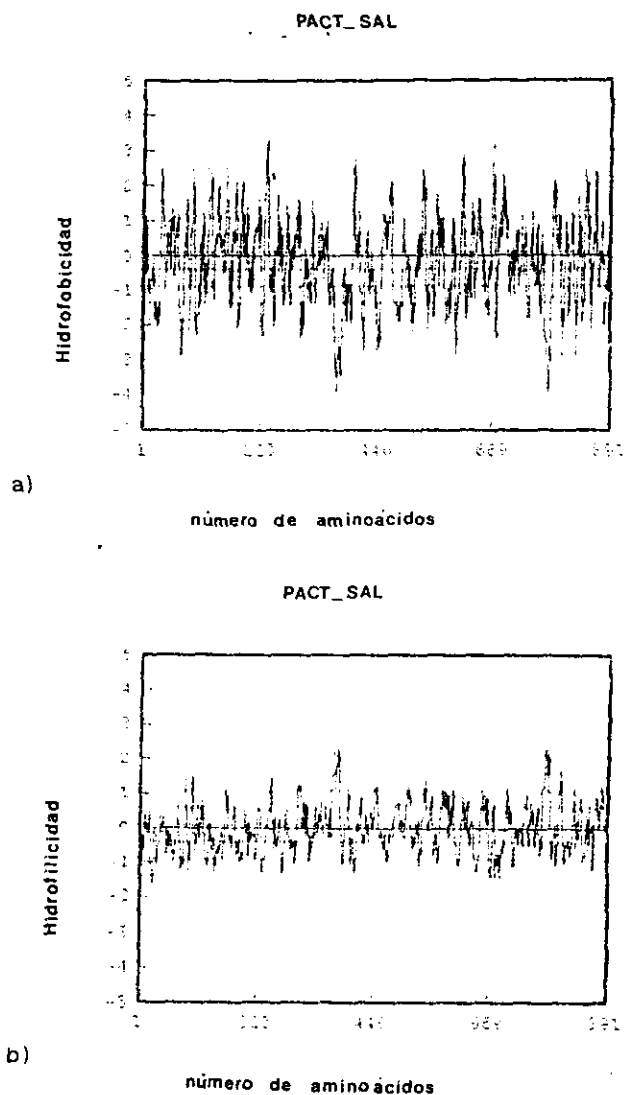


FIG. 17 Análisis de la a) hidrofobicidad y b) hidrofiliidad del posible activador transcripcional del gen de la lipasa de *S. albus* "G", (DNAMAN, Lynnon Biosoft).

Tabla 4. Porcentaje de G+C en las tres posiciones de codones de los marcos de lectura abiertos de la lipasa y su activador en *S. albus* "G".

Posición	% G+C en codones			
	1a.	2a.	3a.	Total
Valor teórico	74.7	51.4	89.1	71.7
Act. Salbus	85.7	62.5	93.6	80.6
Lip. Salbus	62.7	58.1	97.3	72.7

Tabla 5. Uso de codones del posible activador del gen *lip* de *Streptomyces albus* "G".

Codón	Aa	Uso	Codón	Aa.	Uso	Codón	Aa	Uso	Codón	Aa.	Uso
TTT	Phe	0	TCT	Ser	1	TAC	Tyr	6	TGT	Cys	0
TTC	Phe	10	TCC	Ser	14	TAT	Tyr	0	TGC	Cys	8 1
TTA	Leu	0	TCA	Ser	0	TAA	---	0	TGA	---	1
TTG	Leu	3	TCG	Ser	4	TAG	---	0	TGG	Trp	28
CTT	Leu	0	CCT	Pro	3	CAT	His	1	CGT	Arg	10
CTC	Leu	39	CCC	Pro	30	CAC	His	32	CGC	Arg	49
CTA	Leu	0	CCA	Pro	2	CAA	Gln	1	CGA	Arg	3
CTG	Leu	78	CCG	Pro	34	CAG	Gln	18	CGG	Arg	44
ATT	Ile	0	ACT	Thr	0	AAT	Asn	0	AGT	Ser	0
ATC	Ile	4	ACC	Thr	31	AAC	Asn	4	AGC	Ser	9
ATA	Ile	0	ACA	Thr	0	AAA	Lys	1	AGA	Arg	0
ATG	MET	2	ACG	Thr	13	AAG	Lys	1	AGG	Arg	3
GTT	Val	0	GCT	Ala	1	GAT	Asp	1	GGT	Gly	5
GTC	Val	22	GCC	Ala	133	GAC	Asp	35	GGC	Gly	51
GTA	Val	1	GCA	Ala	9	GAA	Glu	8	GGA	Gly	8
GTG	Val	20	GCG	Ala	59	GAG	Glu	46	GGG	Gly	21

Tabla 6. Porcentajes de Similitud e Identidad entre el activador de *S. albus* "G" con los activadores de *S. coelicolor* A3(2) y *S. sp* M11.

Origen de los activadores			
	<i>S. albus</i> "G"	<i>S. albus</i> "G"	<i>S. albus</i> "G"
	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. sp</i> M11	<i>S. coelicolor</i>
			<i>S. sp</i> M11
IDENTIDAD	59.21 %	46.63 %	34.5 %
SIMILITUD	7.19 %	7.30 %	29.6 %

Tabla 7. Comparación de las regiones reguladoras positivas de los tres activadores de lipasa en diferentes cepas del género *Streptomyces*.

Origen del Activador	Índice %	Posición	Secuencia
<i>S. albus</i> "G"	20.95	845-863	NRETALALSVSVRTVDYHLR
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	22.92	876-895	NREVALTLGVSTRRTVDYHLR
<i>S. sp</i> M11	23	871-890	NREVALRLSLSPRTVDHHLR

Tabla 8. Análisis de la composición aminoacídica (AACOMP) de los activadores de las diferentes lipasas de *Streptomyces* y del activador cho_orf3. Se muestran los valores absolutos y porcentuales de los 20 a.a. en cada péptido.

Amino Ácido	¿activador?		Origen de los activadores	
	<i>S. albus</i> "G"	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. sp</i> M11	<i>S. sp</i> SA_Coo cho-orf3
Ala	202	202	218	172
%	22.73	22.6	24.53	19.4
Arg	109	109	98	98
%	11.93	12.2	11	11
Asn	4	4	4	4
%	0.4	0.4	0.4	0.4
Asp	36	59	47	41
%	4.0	6.3	5.0	4.6
Cys	8	5	13	10
%	0.9	0.5	1.4	1.1
Gln	19	27	20	23
%	2.1	2.9	2.1	2.6
Glu	54	43	44	56
%	6.1	4.6	4.7	6.3
Gly	85	86	97	68
%	9.6	9.1	10.4	7.7
His	33	31	28	25
%	3.7	3.3	3.0	2.8
Ile	4	2	4	9
%	0.4	0.2	0.4	1
Leu	120	128	122	133
%	13.5	13.6	13.1	15
Lys	2	3	0	5
%	0.2	0.3	0	0.5
Met	2	5	4	12
%	0.2	0.5	0.4	1.3
Phe	10	11	12	6
%	1.1	1.2	1.3	0.6
Pro	69	62	80	71
%	7.8	6.6	8.6	8
Ser	28	27	37	29
%	3.1	2.9	4.0	3.2
Thr	44	39	46	42
%	4.9	4.1	4.9	4.7
Trp	12	9	6	15
%	1.3	1.0	0.6	1.6
Tyr	6	7	14	7
%	0.7	0.7	1.5	0.7
Val	43	52	40	57
%	4.8	5.5	4.3	6.4

Tabla 9. Porcentaje global de los residuos de aminoácidos de las proteínas de acuerdo a los grupos R del posible activador de la lipasa de *S. albus* "G", los activadores de lipasas de *S. coelicolor* A3(2), *S. sp* M11 y del activador de la colesterol-oxidasa cho_orf3 de *S. sp* SA_Coo.

Composición aminoacídica del posible activador y los proteínas de la proteínas activadoras

carga de los grupos R	Origen del activador			
	<i>S. albus</i> "G"	<i>S coelicolor</i>	<i>S. sp</i> M11	cho-orf3
Hidrofóbicos	462 (51.9%)	471 (51.7%)	486 (52%)	475 (53.79%)
polares sin carga	194 (21.79%)	195 (21.4%)	231 (24.7%)	183 (20.72%)
Positivos	144 (16.17%)	143 (15.7%)	126 (13.49)	128 (14.49%)
Negativos	90 (10.11%)	102 (11.1%)	91 (9.74%)	97 (10.98%)

CONCLUSIONES

El ORF3 comienza en el nucleótido 1771 y termina en el nucleótido 4443, codifica para una proteína de 890 aminoácidos.

Los residuos de aminoácidos demuestran que es una proteína altamente polar, los análisis de hidrofiliidad e hidrofobicidad indican que es una proteína de tipo periférica.

La secuencia demuestra que si existen estructuras tallo-asa, pero estas pudieran no estar involucradas en la terminación transcripcional del gen del posible activador de la lipasa extracelular de *Streptomyces albus* "G", y los correspondientes ORF2 y ORF4, lo cual sugiere que se transcriben policistricamente.

La diferencia en el rearreglo intergénico de los ORFs de la lipasas y activadores en cada una de las cepas de *Streptomyces* puede representar una forma diferencial de regulaci3n transcripcional.

El posible activador transcripcional de la lipasa de *Streptomyces albus* "G" presenta una mayor homología con el activador transcripcional de la lipasa de *Streptomyces coelicolor* A3(2) que con el activador de *Streptomyces sp* M11. Esta homología se ve incrementada hacia el extremo carboxilo terminal; en este extremo del posible activador de *Streptomyces albus* "G", se presenta un motivo hélice-vuelta-hélice con una probabilidad de formaci3n del 73%.

El motivo de uni3n a el ADN se compar3 con otros motivos hélice-vuelta-hélice de proteínas que son reguladoras y se encontr3 una gran similitud con una proteína activadora de la colesterol oxidasa de *Streptomyces sp* SA-COO, codificada por el gen *cho-orf3*.

Las evidencias estructurales mostradas anteriormente indican que el posible activador de la lipasa de *Streptomyces albus* "G" es una proteína activadora semejante a la que se encuentra activando al gen de lipasa de *Streptomyces coelicolor* A3(2) y al gen *lip* de *Streptomyces sp* M11. Sin embargo las pruebas experimentales no son reveladoras en cuanto a esta actividad por parte de la posible proteína activadora de *Streptomyces albus* "G".

Más evidencias experimentales se necesitan ya que es necesario completar el ORF2 y encontrar una regi3n promotora hacia el extremo amino terminal de la secuencia que se vea involucrada en el proceso transcripcional de los genes de ORF2, ORF1 (lipasa), ORF3 y ORF4.

Abreviaturas I

ADN: Ácido desoxirribonucleico
 ARN: Ácido ribonucleico
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
 ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia
 dNTP: desorribonucleótidos fosfato
 DMSO: Dimetilsulfóxido
 EDTA: Etilendiamino-tetraacetato
 HVH: Hélice-vuelta-hélice
 IPTG: Isopropil- β -tiogalactósido
 IR: secuencia invertida repetida
 Kb: Kilobase
 Kcal: kilocalorias
 Lb: Medio Luria Bertoni
 lip: lipasa
 μ g: microgramo
 μ l: microlitro
 mg: miligramo
 mM: milimolar
 M: molaridad
 ng: nanogramo
 nt: nucleótidos
 ORF: Open Reading Frame (marco de lectura abierto)
 pb: pares de bases
 PEG: Polietilenglicol
 SDS: duodecilsulfato de sodio
 SMC: Sitio Múltiple de Clonación
 TEMED: Amortiguador Tris-boratos-EDTA
 TBE: Tris-boratos-EDTA
 Tris: Tris-hidroximetil-aminometano
 Ufp: unidades formadoras de placas
 X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactósido

Abreviaturas II
SÍMBOLOS DE LOS AMINOÁCIDOS. Voet y Voet, 1992.

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triftofano
Y	Tyr	Tirosina

GLOSARIO

Cis: configuración, se refiere a dos sitios sobre la misma molécula de ADN.

Loci: plural de locus.

Locus: se refiere a la posición fija de un gen sobre un cromosoma. El locus puede ser ocupado por cualquiera de los alelos para el gen.

Posición fija ocupada en un cromosoma por un determinado gene o por uno de sus alelos

Trans: configuración, es la que se refiere a dos sitios presentes sobre dos moléculas diferentes de ADN o de proteínas.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Buffer TBE 5X

(Maniatis *et al.*, 1982)

Para 1000 ml

Trizma base 54.0 g

Acido bórico 27.5g

EDTA-Na.0.5 M pH8 20 ml

se afora con agua desionizada y se esteriliza en autoclave.

Buffer TE (10: 1mM)

(Maniatis *et al.*, 1982)

Para 100 ml

Tris-HCl 1M pH8 1.0 ml

EDTA-Na 0.5M pH8 0.2ml

se afora con agua desionizada y se esteriliza en autoclave.

Buffer TE 25 mM

(Maniatis *et al.*, 1982)

Para 100 ml

Tris-Cl 1M pH8 2.5 ml

EDTA-Na 0.5M pH8 5.0 ml

se afora con agua desionizada y se esteriliza en autoclave.

Buffer TB para transformación.

(Inoue, 1996)

PIPES 10 mM

MnCl 55mM

CaCl 15 mM

KCl 250 mM

Se mezclan todos los componentes excepto el MnCl y se ajusta con KOH a pH 6.7. El MnCl se esteriliza por filtración (0.45mM) y se almacena a 4 C.

MEDIOS DE CULTIVO.

Medio LB (Luria Broth)

(Maniatis *et al.*,1982)

Para 100 ml:

Bacto-triptona (Difco) 1.0 g

Extracto de levadura (Difco) 0.5 g

NaCl 0.5 g

Para el medio LB sólido, agregar:

Bacto-agar (Difco) 1.5 g

El medio sólido, se vacía en cajas Petri y se secan en campana de flujo laminar durante 30 minutos.

Para el agar suave, agregar:

Bacto-agar (Difco) 0.75 g

Se utiliza en el plaqueo de fagos

Medio YT2X

(Maniatis *et al.*,1982)

Para 100 ml:

Bactotriptona (Difco) 1.6 g

Extracto de levadura 1.0 g

NaCl 0.5 g

Medio SOB**(Hanahan, 1986)****Bacto-triptona** 2%**Extracto de levadura** 0.5%**NaCl** 10 mM**KCl** 2.5 mM**MgCl** 10 mM**MgSO** 10 mM

El medio SOC es idéntico a el SOB pero el primero contiene 20mM de glucosa.

BIBLIOGRAFÍA.

- Arcand, N. Kluepfel,, D. Paradis, F. W. Morosoli, R. and Shareck, K. F. 1993. b-mannase of *Streptomyces lividans* 66; cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* 290: 857-863.
- Asturias, A. J; Liras, P; Martín, F. J. 1990. Phosphate control of *pabS* gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene.* 93: 79-84.
- Bibb, M. J. Jones, G. H. Joseph, R. Buttner M. J. Ward, J. M. 1987. The agarase genes from *Streptomyces coelicolor* A3(2) affinity purification and characterization of the cloned gene product. *J. Gen. Microbiol.* 133:2089-2096.
- Bibb, J. M; Findlay, R. P; Johnson, W. M. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequence. *Gene.* 30:157-166.
- Brahimi-Horn, M. C. Luo, S-H. Wang, S-L. Gau, S-W and Mou, D_G. 1992. Synthesis of hydrolytic enzymes during production of tylosin by *Streptomyces fradiae*. *Journal of Industrial Microbiology.* 10:25-30.
- Buttner, J.M; Smith, M.A; and Bibb, J.M. 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the Agarose gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell.* 52, 599-607.
- Cruz, H; Pérez, C; Wellington, E; Castro, C. Scavín, G. L. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene.* 144, 141-142.
- Cruz, R. H. Clonación y expresión de un gen de lipasa extracelular de *S. albus* "G" en *S. lividans*. Agosto, 1993. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.
- Chater, K. F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *TIG* 5(11):372-377.
- Chater, K. F. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*, in *Microbial Development*; Losick, R and Shapiro, L; Eds; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1984.
- Davis, N.K; Chater, K. F. 1992. The *Streptomyces coelicolor* *whiB* gene encodes a small transcription factor like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 232:351-358.
- Dodd, B. I.; Egan, B: J: 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Research.* 18(17):5019-5026.

- Dutton, C. J. Gibson, S. Goudie, A. C. Holdom, K. S. Pacey, M. S. Ruddock, J. C. Bullock, J. D. And Richards, M. K. 1991. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J. Antibiot.* 44:357-365.
- Elliot, M; DAMJI, F; Passantino, R; Chater, K; Leskiw, B. 1998. The *bldD* Gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a Regulatory Gene Involved in Morphogenesis and Antibiotic Production. *Journal of bacteriology.* 180(6)1549-1555.
- Fornwald, J. A; Schmidt, F. S; Adams, C. W; Rosenberg, M; Bawna, M. E. 1987. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon, *PNAS.* 84, 2130-2134.
- Goodfellow, M. S.T Williams. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37,189-216.
- Hass, J. M; Allen, J; Berka, R. T. 1991. Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene.* 109: 107-113.
- Horinuchi, S; Mishiya. M.K; Furuya, M; Tung,S; Miyake, K; Beppu, T. 1990. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene.* 95, 49-56.
- Horinuchi, S; Suzuki, H; Nishiyama, M, Beppu, T. 1989. Nucleotide sequence and Transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* Gene (*afsA*). Responsible for A-factor Biosynthesis. *J Bacteriology.* 171(2), 1206-1210.
- Hopwood A. D.; Chater, F. K. 1989, Genetics of bacterial diversity. USA. Academic Press Inc. 449 pág.
- Inoue, H; Nojima, H; Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene.* 96, 23-28.
- Jaeger, E-K; Ransac, S;Dijkstra, W.B; Colson, Ch; Heuvel, M; Misset,O. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews.* 15, 29-63.
- Janssen, G. R; Ward, J. M; Bibb, M. J. 1989. Unusual transcriptional and translational features in the aminoglycosidase phosphotransferase gene (*aphI*) from *Streptomyces fradiae*. *Genes Dev.* 3, 415-429.
- Jorgensen, S;Skov, W.RK; Diderichsen, B. 1991. Cloning, sequence and expression of a Lipase Gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase Production in Heterologous Hosts Requires Two *Pseudomonas* genes. *Journal of Bacteriology.* 173(2), 559-567.

- Kauer, P. 1977. Expression and Characterization of DrrA and DrrB Proteins of *Streptomyces peuceticus* in *Escherichia coli*; DrrA is an ATP Binding Protein. *Journal of Bacteriology*. 179(3):569-575.
- Kirby, R. and Hopwood, D. A. 1977. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 98:239-252.
- Kormanec, J., and Farsasovsky, M. 1993. Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage. *Nucleic Acids Research*. 21(16):3647-3652.
- Leskiw, K. B; Mah, R. 1995. The bldA-encoded tRNA is poorly expressed in the *bldI* mutant of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 141, 1921-1926.
- Liras, P; Asturias, J. A; Martin, J. F. 1990. Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *TIBTECH*. 6, 184-189.
- Malpartida, F., Fernández-Moreno, M Martínez, E. Hutchinson, C. R. and Hopwood, D. A. 1990. Molecular genetics analysis reveals a bifunctional polyketide cyclase dehydrase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces violaceuruber* and a cyclase o-methyltransferase from *Streptomyces glaucescens*. *Tetrahedron* 47:6029-6043.
- Martin, F. J. And Liras, p. 1989. Organization and Expression of Genes induced in the Biosynthesis of Antibiotics and other secondary Metabolites.
- Miyashita, K. And Fujii, T. 1993. Nucleotide Sequence and analysis of a gene (*chiA*) for a chitinase from *Streptomyces lividans* 66. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1691-1698.
- Mondow, F. Shreck, F. Morosoli, R. Kluepfel, D. 1986. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* Gene. 49:323-329.
- Nakano, M. M. Mashiko, H. and Ogawara, H. 1984. Cloning of the kanamycin-producing *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 157:79-83.
- Pérez, C; Juárez K; García-Castells, E; Soberón, G; Servín, G. L. 1993. Cloning characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp M11. *Gene*. 123, 109-114.
- Pope, K. M; Green, B; Westpheling, J. 1998. The *bldB* Gene Encodes a Small Protein Required for morphogenesis, Antibiotic Production, and catabolite Control in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*. 180(6):1556-1562.
- Potúcková, L; Kelemen, H. G; Findlay, C. K; Lonetto, A. M; Buttner, J. M; Kormanec, J. 1995. A new RNA polymerase sigma factor, σ^L , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* sp. *Molecular Microbiology*. 17(1), 37-48.

- Raymer, G. J; Willard M: A. and Schottel, J. L. 1990. Cloning, sequencing and regulation of the expression of an Extracellular esterase gene from plant pathogenic *Streptomyces scabies*. Journal Bacteriology. 172:7020-7026.
- Retzlaff, L; Distler, J. 1995. The regulator of streptomycin gene expression. StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. Molecular Microbiology. 18(1), 151-162.
- Rodicio, M. R; and Chater, F. K. 1988. Cloning and expression of the *SalI* restriction-modification genes of *Streptomyces albus* G. Mol. Gen. Genet. 213, 346-353.
- Sanger F.; Dicklen, S. y Coldson A. R. (1977). Sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463.
- Sambrook, J; Fritsch, E; and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schauer, A; Ranes, M; Santamaría, R; Guijarro, J; Lawlor, E; Méndez, C; Chater, K; Losick, R. 1988. Visualizing Gene Expression in Time and Space in the filamentous Bacterium *Streptomyces coelicolor*. Science 240, 768-772.
- Shareck, F. Mondou, F. Morosoli, R. and Kluepfel, D. 1987. Cloning of DNA sequences involved in overproduction of endoglucanase activity in *Streptomyces lividans* 66 Biotechnol. Lett. 9:169-174.
- Soliveri, J; Vijgenboom, E; Granoszzi, C; Plaskitt, A. K; Chater, F.K. 1993. Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes. Journal of General Microbiology. 139, 2569-2578.
- Sommer, P. Bormann, Ch. Gotz, F: 1997. Genetic and Biochemical Characterization of a New Extracellular Lipase from *Streptomyces cinnamomeus*
- Sztajer, H; Maliszewska, I. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol. 10, 492-497.
- Tesch, C. Nikoleit, K. Gnau, V. Gotz, F. Bormann, C. 1996. Biochemical and Molecular Characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. J. Bacteriol. 178:1858-1865.
- Virolle, M. J. and Bibb, M. J. 1988. Cloning Characterization and Regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces limosus*. Mol. Microbiol. 2:197-208.
- Voet, D. Y G. Voet, J. Bioquímica. Ed. OMEGA S. A. Barcelona, España. 1992.

- Wright, L. F. And Hopwood, D. A. 1976.. Actinorhodin is a cromosomally determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 96:289-297.
- Wohlfarth, S; Hoesche, C; Strunk, C; Winkler, K. N. 1992. Journal of General Microbiology. 138, 1325-1335.
- Yhoshitaka, U; Kumagai, I; Miura, K. 1992. The effects of a unique D-loop structure of a minor tRNA^{Leu} UUA form *Streptomyces* on its structural stability and amino acid accepting activity. Nucleic Acid Research. 20(15)3911-3917.
- Yu Tin-Wein; Hopwood, D. A. 1995. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor* whiE genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction whit the act genes for actinorhodin biosynthesis. Microbiology. 141,2779-2791.