



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CONSTRUCCIÓN DE UN BANCO DE
GENES DE *Streptomyces mexicanus* EN LA
MUTANTE 10-164 DE *Streptomyces*
lividans UTILIZANDO EL VECTOR pIJ702

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
TÓSHIKO TAKAHASHI ÍÑIGUEZ

DIRECTORA DE TESIS :
DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Construcción de un banco de genes de Streptomyces mexicanus en la mutante 10-164 de Streptomyces lividans utilizando el vector pIJ702"

realizado por **Takahashi Iñiguez Tóshiko**

con número de cuenta **40010295-5**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director	
Propietario	Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco
Propietario	Dr. Pavel Petrosyan
Propietario	M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz
Suplente	M. en C. Gabriela González Cerón
Suplente	M. en C. Silvia Guzmán Beltrán

Maria Elena del Carmen Flores Carrasco

Pavel Petrosyan

Sara Teresa Méndez Cruz

Gabriela González Cerón

Silvia Guzmán Beltrán

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

Juan Manuel Rodríguez Chávez

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

JURADO EXAMINADOR

PRESIDENTE

Dra. María Elena Flores Carrasco

SECRETARIO

Dr. Pavel Petrosyan

VOCAL

M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz

SUPLENTE

M. en C. Silvia Guzmán Beltrán

SUPLENTE

M. en C. Gabriela González Cerón

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT a través del proyecto 34866-B

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Elena Flores** por su apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al **Dr. Pavel Petrosyan** y a la **M. en C. Gabriela González Cerón** por su asesoría técnica.

A la **QFB Patricia de la Torre** por su colaboración en la secuenciación del DNA.

AGRADECIMIENTOS

A los **miembros del jurado** por sus comentarios y sugerencias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A los que se identifiquen:

“A los que Amo” · “Ya se verá, ya se verá” · “Ándale, acompáñame, no seas mala onda... (y...como la familia burrón)” · “Adelante con los faroles” · “Tienes que hablar con tu subconsciente y... relajarte” · “Relájate, tu mente entra en estado beta, piensa por un momento en lo que quieres, prográmate positivamente y verás que así será” · “No discutamos...tararirarirara” · “Quién quiere este poquito, ya es el último alguien cómaselo para que se acabe” · “A mi lo que me revienta y me prende es que me dejen plantada o esperando” · “Se acabichis rascabuchis” · “Así es esto de las xilanasas” · “No pus como” · “Bueno le dijo la mula al freno...no se qué, nunca me acuerdo... (incógnita resuelta: mientras más grande, más bueno)” · “Ya estas como la costurera...este es el largo, este es el ancho...es hora de un cigarrito” · “Suave el modo, firme el propósito” · “Seas lo que seas, siempre trata de ser la mejor en lo que haces” · “Más vale la atención que el dinero” · “Suerte te de dios que el saber nada te importa” · “Yo fui caballo de hacienda” · “Saluda hijito” · “¿Te fuiste?... como la noche cuando llega el día” · “No seas jarrito de Orizaba” · “Yo soy producto de la pasión” · “La educación empuja pero el ejemplo arrastra” · “Ya pensaste que vas a hacer después de la carrera sobrina... ¿ya elegiste?... ¿ya te decidiste?...” · “Lo que pasa es que no soy tu tío consentido” · “El mundo es curvo y continuo” · “Nadie dijo que fuera fácil” · “¡Qué pasó mija!” · “Ya estás ñacañaca” · “¡Ahí viene Paco! (léase con terror de camarón)” · “Ese lunar” · “Prudencia amiga, prudencia es una gran virtud” · “¿Tanto para once minutos?” · “Mientras avanzaba iba canturreando para sus adentros y emitiendo una serie de gruñidos en falsete...” · “Siempre es bueno contar un chiste, aunque sean las dos de la mañana y lo cuentes al revés” · “¿Porqué me dicen pajarito azul?” · “mmmmm no... yo digo que no porque.... no” · “Está bien, este evento de la colilla siempre quedará entre nosotras dos” · “Vieras que eso si que es exótico y gnóstico gasha” · “¡Buenos días florecita!” · “¡Se le parecía!” · “Me estoy electrocutando... ¿es en serio, alguien haga algo!” · “¿Jugamos a las Juanas? ¡Yo era Juana Valentina, va!” · “¿Qué andas haciendo?” · “Júramelo, que me aplaste el contraflujo y se patine en mi cerebro” · “A mí de chiquita lo que más me ha hecho llorar es cuando tontín llora junto a Blancanieves” · “Que onda razzza...ya mero te titulas o que” · “Que dios te lo pague...con muchos hijos” · “pues eso depende... ¿depende de qué?... de qué tan lejos esté” · “A veces no sirve de nada la inteligencia cuando no se tiene sentido común” · “¿La razón ha detenido la evolución?” · “La necesidad de actuar es la posibilidad de conocer” · “No entres en el delirio de persecución” · “¿Forma parte de la evolución genética humana que podamos alterar hoy la evolución genética humana?” · “Todo sea por la belleza...cierto?” · “No sé si hice mal pero traté de ponerlos a todos” ·

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE <i>Streptomyces</i>	2
2.2 COMPOSICIÓN GENÉTICA DE <i>Streptomyces</i>	9
2.3 PLÁSMIDOS DE <i>Streptomyces</i>	10
2.3.1 VECTOR pIJ702	11
2.4 METABOLISMO PRIMARIO	12
2.5 METABOLISMO SECUNDARIO	14
2.6 CARACTERÍSTICAS DE <i>Streptomyces mexicanus</i>	15
2.7 GENERALIDADES DE LA MUTANTE 10-164 XILANASA/CELULASA NEGATIVA DE <i>Streptomyces lividans</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 MICROORGANISMOS.....	19
5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	19
5.3 EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE <i>Streptomyces mexicanus</i>	20
5.4 CUANTIFICACIÓN DE DNA	21
5.5 DIGESTIÓN DEL DNA CROMOSOMAL DE <i>S. mexicanus</i>	21
5.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO pIJ702 Y DE DOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pIJ702 DE <i>Streptomyces lividans</i> (pTO39 y pTO3)	21
5.7 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO pIJ702.....	22
5.8 LIGACIONES PARA TRANSFORMAR EN <i>S. lividans</i> 10-164	22
5.9 FORMACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE <i>Streptomyces lividans</i> 10-164 (<i>xyl⁻ cel⁻</i>)	22
5.10 DIGESTIÓN DE DOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pIJ702 (pTO39 Y pTO3) Y DEL PLÁSMIDO pBlueScript SK ⁺ DE <i>Escherichia coli</i>	23
5.11 LIGACIÓN DE LOS INSERTOS EN EL PLÁSMIDO pBlueScript SK ⁺	24
5.12 TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> TOP10F'	24

5.13 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES DE <i>Escherichia coli</i> TOP10F' RENOMBRADOS COMO pTI39 y pTI3	24
5.14 SUBCLONACIÓN DE LOS INSERTOS DE LOS PLÁSMIDOS pTI39 y pTI3	24
5.15 SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	24
5.16 CÁLCULO PARA UNA GENOTECA REPRESENTATIVA	25
6. RESULTADOS	26
6.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE <i>Streptomyces mexicanus</i>	26
6.2 RESTRICCIÓN DEL DNA CROMOSOMAL DE <i>Streptomyces mexicanus</i> CON LA ENZIMA <i>Bam</i> HI.....	27
6.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pIJ702 DE <i>Streptomyces lividans</i>	28
6.4 PRIMER INTENTO DE FORMACIÓN Y TRASFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE LA MUTANTE 10-164 DE <i>Streptomyces lividans</i> CON PLÁSMIDO pIJ702.....	30
6.5 CUARTO INTENTO DE TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE <i>S. lividans</i> 10-164	33
6.6 FORMACIÓN DEL BANCO DE GENES DE <i>Streptomyces mexicanus</i> (INTENTO DE TRANSFORMACIÓN V).....	36
6.7 CARACTERIZACIÓN DE DOS PLÁSMIDOS DEL BANCO.....	37
6.8 SUBCLONACIÓN DE LOS INSERTOS OBTENIDOS DE LOS PLÁSMIDOS pTO39 Y pTO3 EN pBlueScript SK ⁺	39
6.9 RECONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pTI39 BASADA EN LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS FRAGMENTOS SUB-CLONADOS	49
6.10 RECONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pTI3 BASADA EN LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS SUB-FRAGMENTOS.....	50
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMA

FIGURAS	PÁGINA
Fig. 1. Micelio de <i>Streptomyces</i>	4
Fig. 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	4
Fig. 3. Tetrapéptidoglicano.....	5
Fig. 4. Estructura de la pared celular.....	6
Fig. 5. Micrografía de paredes Gram ⁺ y Gram ⁻	6
Fig. 6. Hidrofobicidad de las esporas de <i>Streptomyces</i>	7
Fig. 7. <i>Streptomyces coelicolor</i> J1501.....	8
Fig. 8. Plásmido pIJ702.....	11
Fig. 9. <i>Streptomyces mexicanus</i>	15
Fig. 10. Transporte activo de xilobiosa.....	16
Fig. 11. DNA de <i>S. mexicanus</i>	25
Fig. 12. DNA de <i>S. mexicanus</i> digerido con <i>Bam</i> HI.....	26
Fig. 13. Fragmentos de DNA de <i>S. mexicanus</i>	27
Fig. 14. <i>Streptomyces lividans</i> pIJ702.....	27
Fig. 15. Plásmido pIJ702.....	28
Fig. 16. Plásmido pIJ702 digerido con <i>Bg</i> III.....	28
Fig. 17. Digestión del plásmido pTO39 con <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I.....	36
Fig. 18. Digestión del plásmido pTO3 con <i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I.....	37
Fig. 19. Purificación de los fragmentos de DNA.....	38
Fig. 20. Fragmentos pTI39.....	39
Fig. 21. Fragmentos del plásmido pTI39 purificados del gel.....	40
Fig. 22. Fragmentos pTI3.....	44
Fig. 23. Fragmentos del plásmido pTI3 purificados del gel.....	44
Fig. 24. Plásmido pTI39.....	48
Fig. 25. Contexto genómico de SCF11.05.....	49
Fig. 26. Plásmido pTI3.....	50
Fig. 27. Contexto genómico de SCH22A.24c y SCH22A.22.....	50

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Tamaños de los fragmentos obtenidos por la digestión del DNA de <i>S. mexicanus</i> con <i>Bam</i> HI.....	22
Tabla 2. Primer intento de transformación de protoplastos (I) de <i>S. lividans</i> 10-164.....	29
Tabla 3. Pruebas de crecimiento inicial de <i>S. lividans</i> 10-164.....	30
Tabla 4. Pruebas de crecimiento de <i>S. lividans</i> 10-164 con glicina.....	31
Tabla 5. Análisis del quinto intento de transformación de protoplastos de <i>S. lividans</i> 10-164.....	35

ESQUEMA	PÁGINA
Esquema 1. Resumen de los pasos de clonación.....	37

ABREVIATURAS

Ap	Ampicilina
ATP	Adenosín Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
Fr.	Fragmento
Hmp	Hexosamonofosfato-pentosafofato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil-tiogalactósido
Kb	Kilobases
LB	Caldo Luria
M.P.M.	Marcador de pesos moleculares
Mb	Megabases
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEP:PTS	Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato
PTS	Sistema de fosfotransferasa
R2	Medio de regeneración
R2YE	Medio de regeneración con extracto de levadura
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TSB	Caldo triptona-soya
tsr	Tioestreptón
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-galactopiranosido
YEME	Medio completo
YEMEG	Medio completo con glucosa
YEMES	Medio completo con sacarosa

1. RESUMEN

Los *Streptomyces* son bacterias Gram⁺ que pertenecen al orden de *Actinomycetales*. Son saprófitos, oligotróficos facultativos, algunas especies son patógenas de plantas y solo se conoce una especie patógena de animales. Poseen un complejo ciclo de vida que involucra distintas fases de diferenciación morfológica que culmina en la formación de esporas hidrofóbicas unigenómicas. Tienen alto contenido de G+C en el DNA cromosomal y sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios con aplicaciones en la medicina y la agricultura. *Streptomyces mexicanus* pertenece a este género; es una bacteria aeróbica, moderadamente termofílica que tiene un importante potencial de uso a nivel industrial ya que produce 4 xilanasas, 2 proteasas, 4 pectinasas y 4 carboximetilcelulasas de diferentes pesos moleculares. En estudios previos se realizó un primer intento para llevar a cabo la clonación de los genes correspondientes a las xilanasas [51], sin embargo, la amplificación del DNA correspondiente a alguno de estos genes, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas con otras especies en estas proteínas no dio resultados. Debido a esto, la construcción de un banco de genes de *S. mexicanus* se hizo indispensable para la posterior identificación de los genes de interés. En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de dicho banco en la mutante 10-164 (xilanasas⁻-celulasa⁻) de *Streptomyces lividans* con la finalidad de poder identificar posteriormente los genes de xilanasas, utilizando el vector pIJ702, el cual facilita la selección de las clonas. Con las técnicas tradicionales reportadas para la transformación de protoplastos de *Streptomyces* [1, 31], se tuvieron muchos problemas para lograr obtener una buena eficiencia de transformación de la mutante 10-164 de *S. lividans*, por lo que se realizó la estandarización de los métodos para aumentar la eficiencia. Después de la obtención del banco en el que se encontraba representado el DNA de *S. mexicanus*, se llevó a cabo la purificación de dos plásmidos derivados de pIJ702 (pTO39 y pTO3) escogidos de la genoteca al azar, los cuales fueron purificados y sus fragmentos fueron sub-clonados en *Escherichia coli* TOP10F' para purificarlos y secuenciarlos. Las características que presentaron confirman que el DNA pertenece a *S. mexicanus*. El plásmido pTI39 contiene un fragmento cuyo producto de traducción tiene identidad con una probable proteína (SCF11.05) de *S. coelicolor* A3(2). El plásmido pTI3 contiene un fragmento de 4.5 kb que después de secuenciar y traducir una de las regiones laterales se encontró que presenta identidad con una probable proteína de membrana (SCH22A.24c) y otra parte presenta identidad con una probable proteína (SCH22A.22), ambas de *S. coelicolor* A3(2). Los insertos secuenciados tienen alto contenido de G+C (70-73%) lo que corrobora junto con las identidades de los productos de la traducción de cada secuencia clonada, que la cepa a la que pertenecen es de *Streptomyces mexicanus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE *Streptomyces*

Las bacterias Gram⁺ comprenden dos ramas principales: los organismos con bajo contenido de G+C que incluye a los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* y los organismos con alto contenido de G+C referidos como el orden de *Actinomycetales* [1]. Los miembros de este orden son, en su mayoría, bacterias del suelo, aeróbicas con metabolismo respiratorio, tienen forma de vara, son frecuentemente largas y delgadas con cierta tendencia a dividirse irregularmente y a formar filamentos ramificados. Los actinomicetos están divididos a su vez en tres subgrupos de acuerdo a estudios de homología de RNA 16S; el primer subgrupo incluye a organismos con células alargadas y delgadas como *Arthrobacter* y *Cellulomonas* y también al género *Micrococcus* de células esféricas; el segundo contiene al grupo *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*, organismos del suelo básicamente aeróbicos con características particulares en la pared celular, la cual contiene ácidos grasos de cadenas muy largas denominadas ácidos micólicos; el tercer subgrupo contiene a *Streptomyces*, organismos que crecen en agrupaciones de filamentos altamente ramificados y contienen ácido LL-diaminopimélico en su pared (Fig. 1) [2]. Las raíces etimológicas del nombre provienen del griego *Streptos*, plegarse y *myces*, hongos (literalmente “hongos plegables”) debido a su gran parecido con éstos. La naturaleza de procarionte se refleja en la carencia de una membrana limitante entre el citoplasma y el núcleo, como es el caso de los hongos, además en la ausencia de organelos citoplásmicos y la presencia de ribosomas tipo 70S en contraste al tipo 80S de los hongos. En adición, este género sintetiza peptidoglicano, polímero de las paredes celulares de casi todas las cepas bacterianas [3].

La clasificación infragenérica de los *Streptomyces* ha sido un tema difícil. Williams y colaboradores analizaron, en 1983, características fenotípicas de 475 cepas que incluían morfología de las esporas, producción de pigmentos y antibióticos, resistencia a estos compuestos y utilización de fuentes de carbono entre otras [3]. Este grupo de investigadores utilizaron clasificaciones numéricas clásicas resolviendo a las especies en 19 grupos principales, designados con letra capital (A-J) y 40 grupos menores, designados con números arábigos [4].

Los estreptomicetos son fácilmente aislables del suelo y parecen actuar como microorganismos saprófitos. Secretan enzimas extracelulares que actúan sobre

polímeros insolubles (principalmente generados por las plantas) como el almidón y la celulosa para generar productos solubles que pueden ser absorbidos. En el suelo, los estreptomicetos están en competencia con otros microorganismos tales como bacterias y hongos, por lo que se considera un ambiente oligotrófico o pobre en nutrientes. Williams (1985) sugiere que los estreptomicetos son oligotróficos facultativos, es decir, son capaces de crecer en condiciones pobres de nutrientes y en condiciones ricas en nutrientes (copiotróficas) [4].

Algunos estreptomicetos son patógenos de plantas; *Streptomyces scabies* es el causante de descamaciones (scab) en la raíz de algunos vegetales, debido a que penetra en la superficie de la raíz y causa una proliferación verrugosa en la dermis. Otra especie patógena es *Streptomyces somaliensis* que ha sido asociada repetidamente con actinomicetomas de animales, inclusive del hombre [4].

Los estreptomicetos llevan a cabo un complejo proceso de desarrollo que culmina en la producción de esporas unigenómicas. El ciclo de vida inicia con una espora, la cual germina formando uno o más tubos germinales que dan lugar a redes de hifas que contienen varias copias del cromosoma, conocidas como substrato micelial o micelio vegetativo. La diferenciación morfológica inicia con la formación de hifas aéreas especializadas que emergen de la superficie de la colonia dando lugar al micelio aéreo. En esta fase se da una intensa división celular en las hifas aéreas, las cuales sufren septación uniformemente espaciada generando después cadenas de esporas que contienen una sola copia del cromosoma y de pigmento característico (Fig. 2). La diferenciación morfológica está asociada a la producción de pigmentos, antibióticos y otros metabolitos secundarios [5, 6].

Durante el ciclo de vida existe una fase de transición que involucra la lisis del micelio vegetativo para obtener nutrientes y así constituir el micelio aéreo y en consecuencia las esporas. En esta fase de transición, el crecimiento de la colonia se detiene momentáneamente y se da una importante disminución de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, la cual aumenta nuevamente al inicio de la diferenciación morfológica. Al aumentar la masa celular durante el desarrollo de la colonia, el transporte de los nutrientes se ve afectado y se genera una situación de estrés que actúa como señal para iniciar la formación de micelio aéreo.

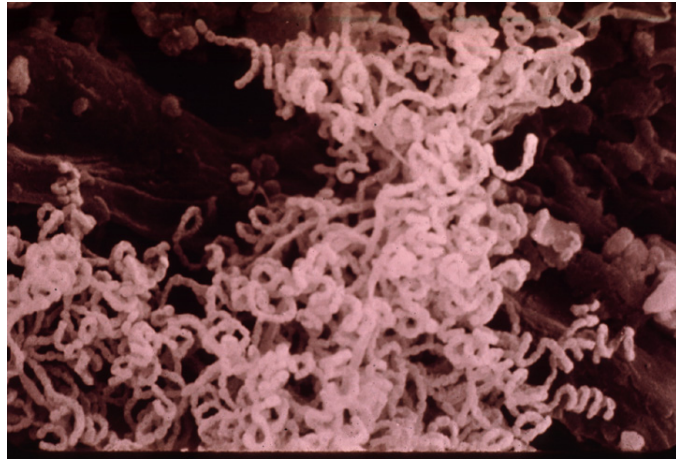


Fig. 1 Micelio de *Streptomyces* (Natural Resources Conservation Service).

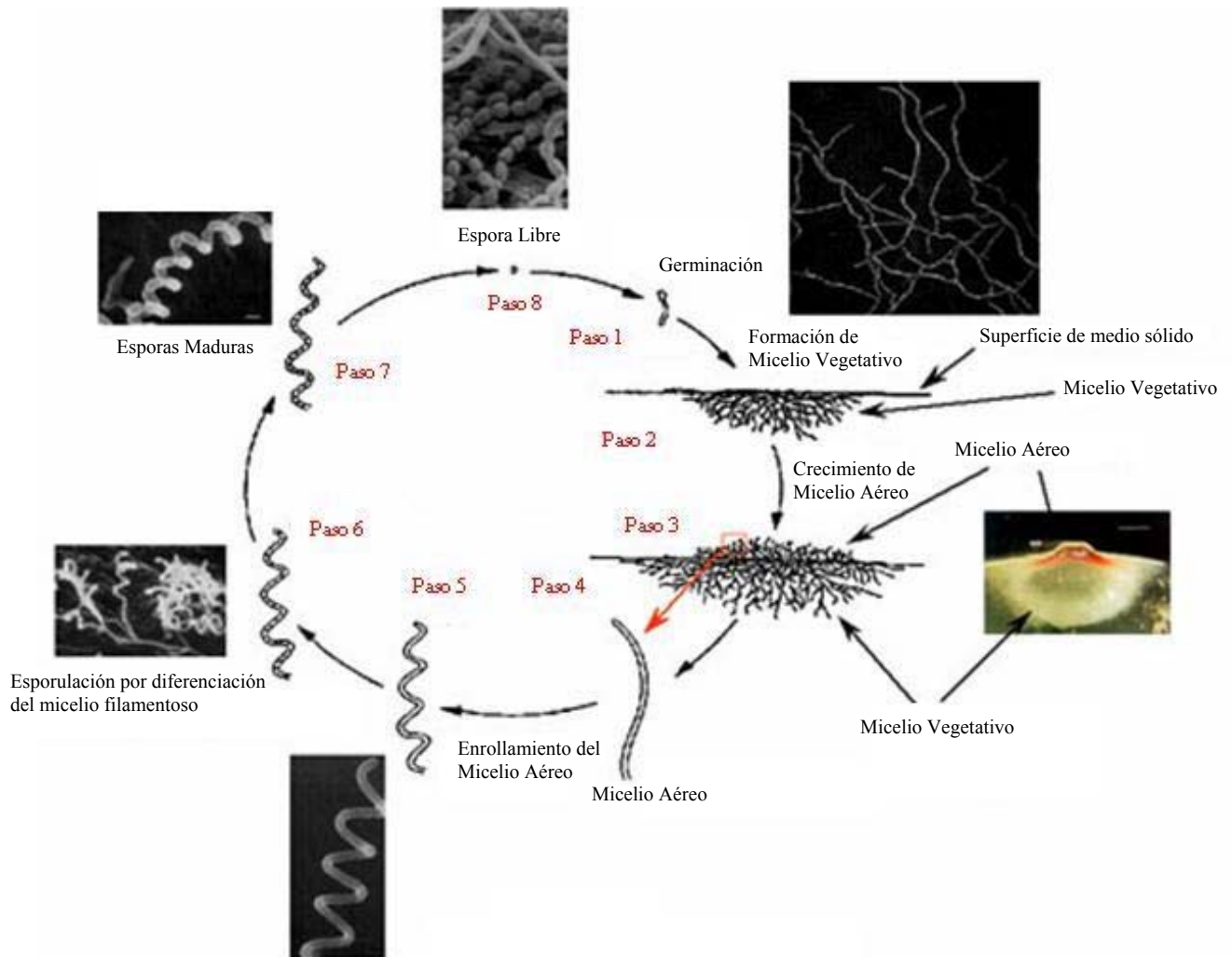


Fig. 2 Ciclo de Vida de *Streptomyces* ([http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto\(Eng\).html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto(Eng).html)).

La pared celular está formada por el peptidoglicano (o mureína), polímero cuya unidad básica es un disacárido constituido por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces $\beta(1-4)$ y un pequeño grupo de aminoácidos, que comprende L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y lisina, unidos al residuo carboxilo de este último. Estos constituyentes están conectados para formar una estructura repetida tetrapeptídica. El peptidoglicano es una capa covalente continua alrededor de la célula en donde los enlaces glucosídicos por sí mismos, a pesar de ser muy fuertes, no le proporcionan rigidez; únicamente cuando las cadenas formadas por los azúcares están conectadas por enlaces peptídicos cruzados formados con los aminoácidos, la estructura adquiere fuerza y resistencia (Fig. 3). En bacterias Gram⁺, el 90% de la pared celular consiste en peptidoglicano y otros constituyentes en pequeñas cantidades como polisacáridos ácidos denominados ácidos teicóicos o ácidos lipoteicoicos por su asociación con lípidos de membrana (Fig. 4), a diferencia de las bacterias Gram⁻ cuya pared celular esta formada en mayor parte por lipopolisacáridos y solo el 10% es peptidoglicano (Fig. 5) [11].

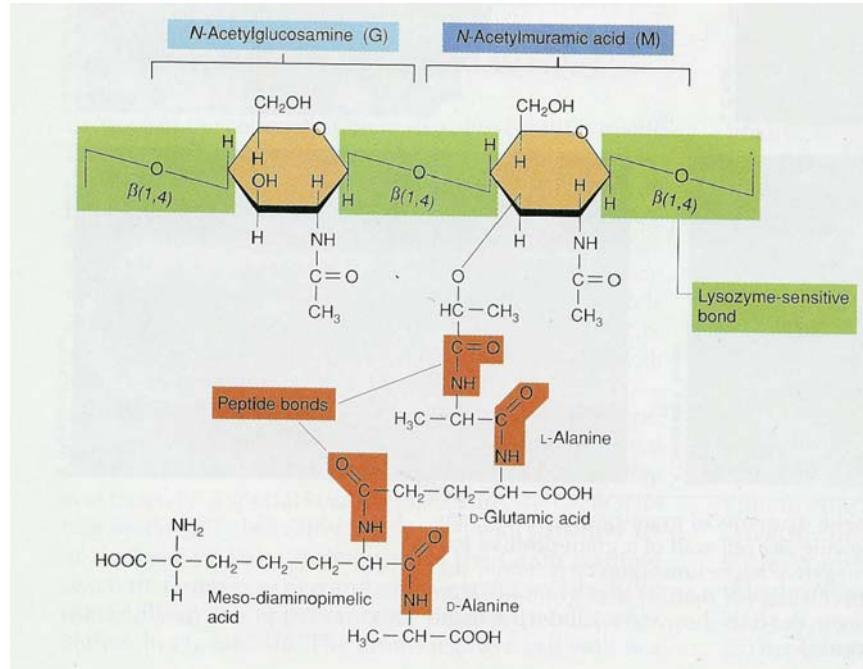


Fig. 3. Estructura del tetrapeptidoglicano una de las unidades repetidas del peptidoglicano en la pared celular [11].

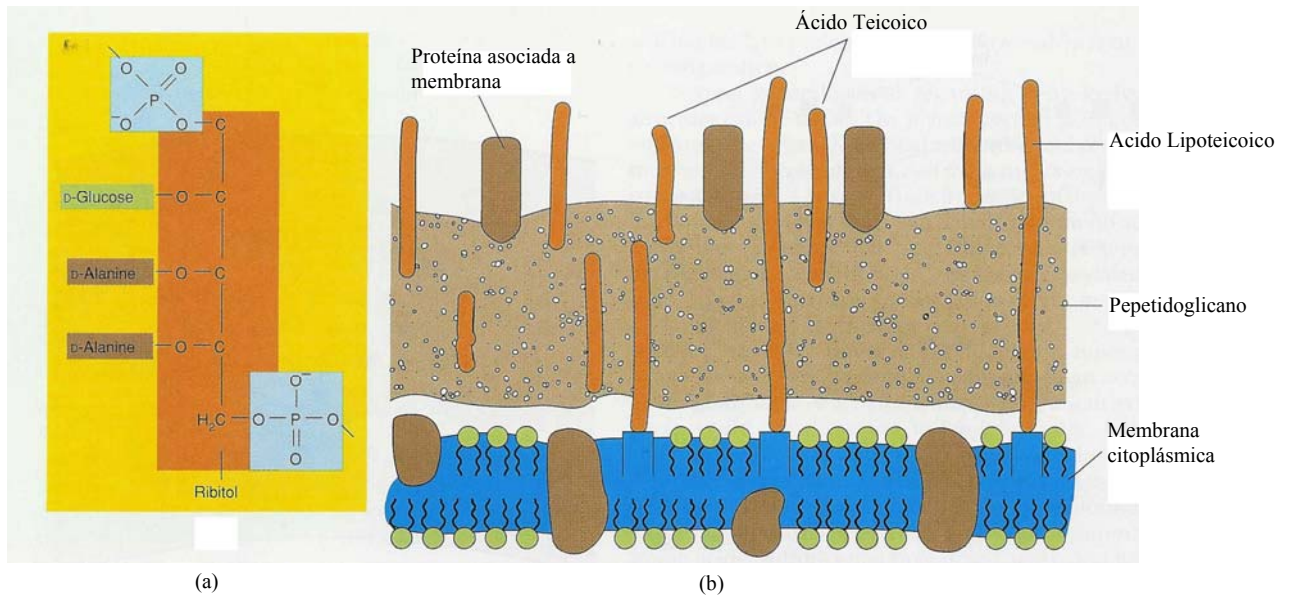


Fig. 4. Ácidos teicoicos y estructura de la pared celular Gram⁺. (a) Unidad de ribitol que forma el ácido teicoico de *Bacillus subtilis*; (b) Diagrama de pared celular de organismos Gram⁺ [11].

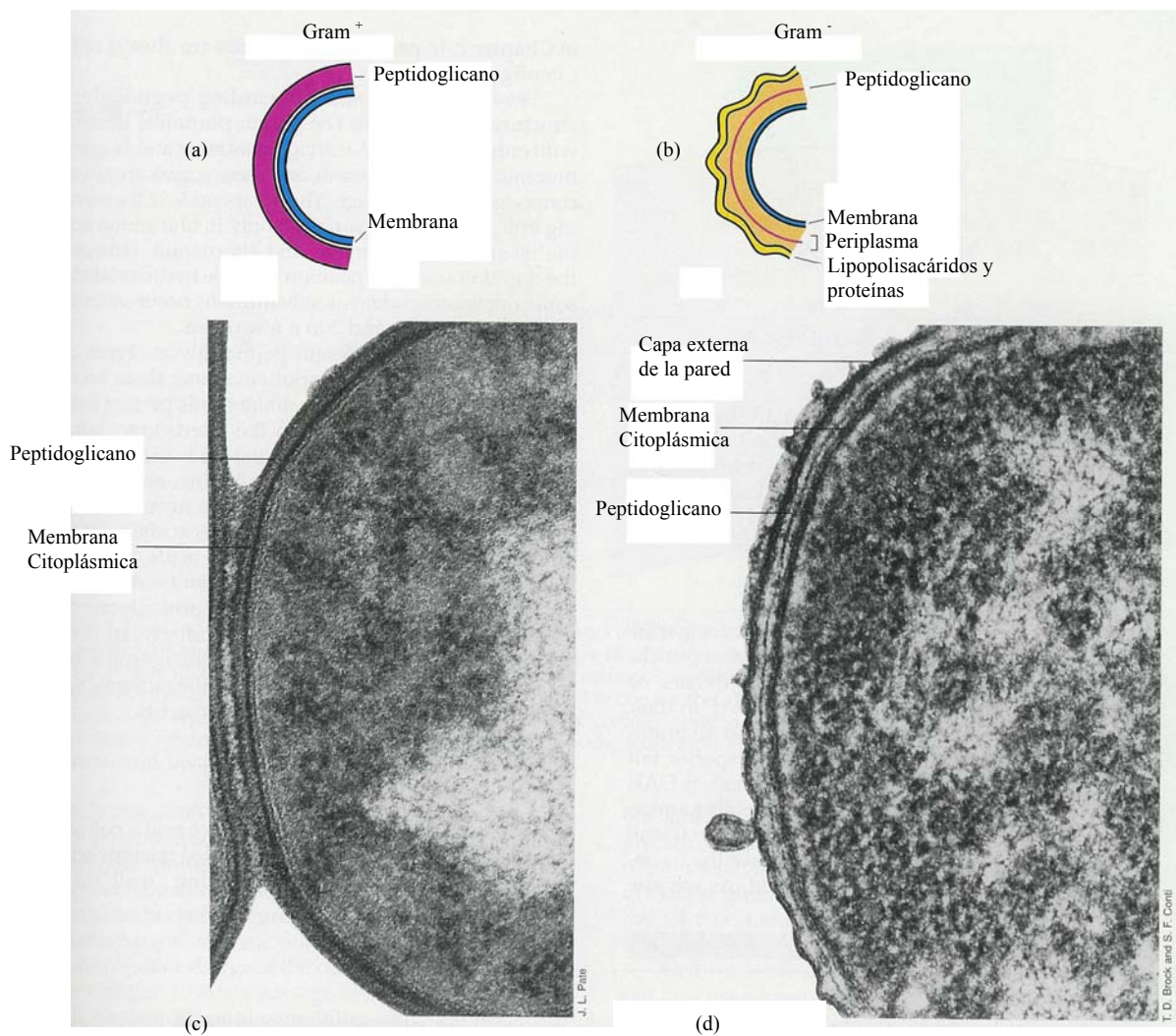


Fig. 5. Diagramas esquemáticos de paredes (a) Gram⁺ y (b) Gram⁻; (c) Micrografía electrónica de la pared celular de la bacteria Gram⁺ *Arthrobacter crystallopoietes*; (d) Bacteria Gram⁻ *Leucothrix mucur* [11].

Por medio de un experimento de adición de N-acetil-D-glucosamina marcada en *Streptomyces coelicolor* A3(2) se demostró que el crecimiento de las hifas se lleva a cabo por la incorporación de material de la pared, recién sintetizado, en la zona apical de extensión (parte más puntual de la hifa). El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la incorporación de material nuevo aún no se conoce a detalle. Se piensa que el material es transportado a la zona de extensión por difusión y conforme se aleja del ápice esta incorporación disminuye notablemente. Se han propuesto numerosos modelos matemáticos para relacionar el mecanismo de adición de nuevo material en la zona de extensión y la forma adoptada por la hifa en esta zona. Saunders y Trinci, en 1979 [10] propusieron que la forma de la punta de la hifa resulta de la interacción entre la presión hidrostática interna y las propiedades elásticas de la pared en esta área, de tal manera que la forma resultante es aquella que minimiza la energía de superficie dentro de la pared. La elasticidad de la pared celular disminuye rápidamente conforme se aumenta la distancia con respecto al ápice, culminando en una completa rigidez en la base de la zona de extensión y obteniendo de esta manera un diámetro constante de la hifa. Existe otra aproximación similar denominada Teoría de Estrés Superficial propuesta por Koch en 1982, la cual establece que la relación entre el trabajo de la presión-volumen resultado del crecimiento es equivalente al trabajo de la superficie de tensión-área resultado del crecimiento de la pared celular. Esta última teoría ha sido aplicada y sustenta fuertemente la extensión de las hifas en hongos [10].

Con respecto a la erección de las hifas aéreas, se han identificado proteínas

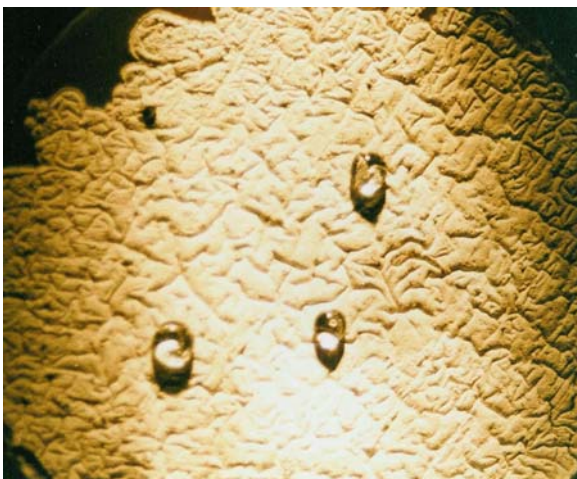


Fig. 6. Hidrofobicidad de las esporas en *Streptomyces lividans* 10-164.

denominadas chaplinas secretadas por la misma colonia, que revisten la superficie de estas hifas y de las esporas con la función de ayudar a romper la tensión superficial del medio acuoso del substrato, permitiendo su crecimiento hacia el espacio aéreo y contribuyendo a formar una superficie hidrofóbica en las esporas para evadir al medio acuoso circundante y permitiendo su posterior dispersión (Fig. 6) [13]. Las chaplinas

tienen un dominio hidrofóbico de aproximadamente 40 residuos de aminoácidos y todas tienen señal secretora [29]. Cuando las hifas aéreas detienen su crecimiento inicia una

intensa división celular apareciendo septos uniformemente espaciados a lo largo de estas hifas dando lugar a compartimentos que darán origen a las esporas con una sola copia del cromosoma.

En las hifas esporulantes se pueden identificar claramente dos zonas: una basal, cercana al punto de ramificación en forma de tallo sin septos y una zona distal que es la que sufre septación y se enrolla sobre sí misma formando cadenas que contienen cientos de esporas (Fig. 7).



Fig. 7. Análisis ultraestructural de *Streptomyces coelicolor* J1501. (a) Después de 2-3 días de crecimiento, las flechas señalan los puntos de ramificación; (b) septación; (c) cadenas de esporas [13].

Los septos se forman por el crecimiento hacia adentro de un doble anillo de la membrana y la pared celular de la hifa, el cual se une en el centro para formar un travesaño doble. Esta distribución de la pared celular permite la separación de las esporas adyacentes. Después de que el septo se ha formado, se deposita nuevo peptidoglicano, tanto en el septo como en la cara interna de la pared de la hifa parental, lo cual hace que la pared de la spora se engrose significativamente [14]. Se ha observado que durante la formación de micelio aéreo hay una acumulación de glucógeno, el cual se degrada al iniciar la esporulación; esta etapa va acompañada de un nuevo almacenamiento de glucógeno y éste es degradado durante la maduración de las esporas. También se ha detectado la presencia de trehalosa durante todas las etapas de desarrollo de la colonia pero en mayor cantidad en la etapa de micelio aéreo y esporas maduras [15]. En las cadenas maduras de esporas, éstas son mantenidas juntas por una frágil envoltura constituida por restos de la pared celular de la hifa parental y una capa externa hidrofóbica [14].

El glucógeno se acumula en dos fases diferentes. La primera fase de depósito ocurre en la zona central del micelio, entre la presencia de micelio vegetativo y la aparición de hifas aéreas. La segunda fase de depósito se da en las cadenas de esporas en desarrollo, coincidiendo con la formación de septos de esporulación. No hay detección de glucógeno en el micelio vegetativo joven, en los soportes de las cadenas de esporas ni en las esporas maduras, lo que sugiere que este compuesto de

almacenamiento tiene un papel importante en la diferenciación morfológica. Puede ser que el glucógeno formado en la primera fase actúe como fuente de nutrientes para el crecimiento de las hifas aéreas y así, los productos de degradación se reciclen depositándose en los ápices de las hifas durante la maduración de las esporas [15].

2.2 COMPOSICIÓN GENÉTICA DE *Streptomyces*

El DNA cromosomal de *Streptomyces* tiene un alto contenido de G+C en su genoma, en un rango de 70-74% que en ocasiones puede ser mayor, encontrándose que la tercera posición de los codones es donde se presenta el mayor contenido, del 76.4%-98.3%; en la primera posición hay un contenido medio y la segunda posición tiene el contenido más bajo de G+C [16]. Se han localizado segmentos cortos de bajo contenido de G+C en regiones no codificantes del grupo de genes de actinorodina en *Streptomyces coelicolor*. En cuanto a la composición de los plásmidos nativos se han encontrado diferencias poco significativas con respecto al DNA cromosomal. Para los fagos nativos existe un rango mucho más amplio, del 63% en Φ C31 y otros que tienen entre 60 y 73% o inclusive un 49% ha sido reportado en fagos virulentos [1].

Se han hecho muchos experimentos para calcular el tamaño del genoma en *Streptomyces*, los cuales han revelado que el tamaño es cercano a 8 Mb para *S. coelicolor* A3(2), *Streptomyces lividans*, 3 cepas de *Streptomyces ambofaciens* y *Streptomyces griseus* IFO03237. El cromosoma de la mayoría de los estreptomicetos es lineal, lo que fue descubierto por primera vez en *S. lividans* 66 [17] y estudios posteriores en *Streptomyces moderatus*, *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces antibioticus*, *S. coelicolor* y *Streptomyces lipmanii* revelaron que quizá la linealidad de los cromosomas es común entre los estreptomicetos. Esta afirmación ha sido apoyada por la caracterización de cromosomas en otras especies, tales como: *Streptomyces rimosus* y su plásmido pPZG101 [20, 23], *S. griseus* [21] y *S. ambofaciens* [22]. El cromosoma de *Streptomyces* tiene proteínas unidas covalentemente a ambos extremos 5' libres. La secuencia de DNA de un extremo del cromosoma está inversamente repetida en el otro extremo en un rango de 24-600 kb en diferentes especies, como por ejemplo en *S. griseus* (24 kb) o en *S. rimosus* (550 kb) al igual que en algunos plásmidos lineales [17, 18]. Estas secuencias palindrómicas se encuentran repetidas en los primeros 200 pb aproximadamente [19]. La linearización del cromosoma puede estar relacionada a la tendencia que tiene de sufrir largas deleciones o amplificaciones, las cuales pueden ocurrir con una frecuencia de 0.1-1%

espontáneamente y se vuelven más frecuentes después de tratar con compuestos que dañan el DNA o interfieren en su replicación, como acridinas o bromuro de etidio y también por choque a bajas temperaturas o formación de protoplastos. Se ha encontrado que estas deleciones ocurren cerca de los extremos del cromosoma (también llamadas regiones inestables) las cuales pueden empalmar para producir un cromosoma circular capaz de replicarse [1].

En el centro de los cromosomas de *Streptomyces* se localiza el origen de replicación (*oriC*) indicando que el proceso de replicación es bidireccional hacia los telómeros. Este mecanismo de replicación puede dejar huecos de cadena sencilla en el extremo terminal de la cadena 3', los cuales son "parchados" por un mecanismo desconocido que supuestamente involucra a las proteínas unidas en los extremos del cromosoma [19].

2.3 PLÁSMIDOS DE *Streptomyces*

Una gran cantidad de cepas de *Streptomyces* contienen plásmidos, los cuales son factores de fertilidad autotransmisibles que pueden ser lineares y/o circulares. Los plásmidos lineares tienen un tamaño entre 10 y 600 kb y como el cromosoma, tienen secuencias invertidas repetidas y proteínas unidas en los extremos 5'. *S. coelicolor* A3(2) tiene tres factores de fertilidad, SCP1, SCP2 y SLP1. El primero es lineal de 350 kb, el segundo es circular de 30 kb y el tercero tiene un tamaño de 17 kb y es integrativo en el cromosoma. Algunos plásmidos circulares de estreptomicetos tienen genes de tipo *int* y *xis* del fago λ para sitios específicos de integración no mutagénica en genes de RNA de transferencia altamente conservados, como SLP1 de *S. coelicolor* y pSAM2 (11 kb) de *S. ambofaciens*. Estos plásmidos normalmente se introducen en el cromosoma huésped, pero se transfieren independientemente por conjugación a cepas que carecen del plásmido, donde se convierten en plásmidos replicativos autónomos con número de copias moderado únicamente si su gen *int* o su sitio *att* no son inactivados por mutación o por deleción durante o después de la escisión del cromosoma. Los plásmidos convencionales no integrativos son muy comunes siendo SCP2 uno de los más grandes con un bajo número de copias, el cual se replica probablemente en forma bidireccional a partir del origen para generar nuevas copias del plásmido de doble cadena. Los plásmidos pequeños tienden a ser de alto número de copias, como pIJ101 de 8.9 kb, que tiene 300 copias por cromosoma y se replica por un mecanismo de círculo rodante teniendo un intermediario replicativo circular de cadena sencilla; la

replicación inicia por una proteína replicativa característica codificada por el plásmido. La mayoría de los plásmidos en estreptomicetos no tienen genes de resistencia ni de biosíntesis de antibióticos excepto SCP1 que tiene ambas características. Los plásmidos de cepas silvestres de estreptomicetos que han sido utilizados como vectores de clonación son: pIJ101, pJV1, pSG5, SCP2, SLP1 y pSAM2 que, como ya se mencionó son plásmidos integrativos [1].

2.3.1 VECTOR pIJ702

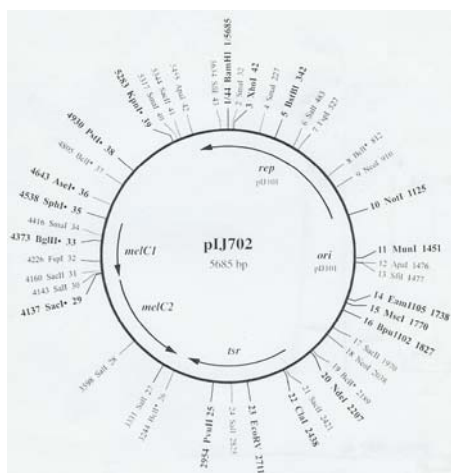


Fig. 8 Plásmido pIJ702.

El plásmido pIJ101 tiene un tamaño de 8.9 Kb, es autónomo y está presente en cepas cercanamente relacionadas a *S. lividans* como *S. lividans* ISP5434 y *S. coelicolor* A3(2); está considerado como miembro del grupo de plásmidos pertenecientes a *Streptomyces violaceosruber*. Aparte de éste, *S. lividans* ISP5434 contiene también los plásmidos pIJ102 (4 kb), pIJ103 (3.9 kb) y pIJ104 (4.9 kb). Solo pIJ101 se comporta como plásmido conjugativo eficiente por lo que el fenotipo de cigosis letal está erradicado, con una recombinación cromosomal promovida con alta frecuencia en *S. lividans* 66 y *S. coelicolor* A3(2) y posee gran cantidad de sitios de restricción convenientes para inserción de DNA heterólogo [24]. Se han construido plásmidos derivados de pIJ101 en la búsqueda de marcadores fenotípicos seleccionables y sitios únicos de restricción en regiones no esenciales del vector. Es así como surge pIJ350 (4.1 kb) el cual contiene el gen de resistencia a tiorstreptón (*tsr*) adquirida de *Streptomyces azureus* y presenta una gran eficiencia de transformación (5×10^6 transformantes por microgramo de DNA). La resistencia que adquieren los estreptomicetos que contienen pIJ350 es importante como marcador ya que la mayoría de ellos son sensibles a este antibiótico. Gran cantidad de estreptomicetos que producen antibióticos se autoprotegen de sus productos a través de uno de tres mecanismos posibles: por la presencia de enzimas modificadoras del antibiótico, alteración de los sitios blanco o reducción de la toma de antibióticos [25, 26]. La resistencia bacteriana al *tsr* está mediada por una metilasa (codificada por el gen *tsr*) específica para el RNA 23S

de la subunidad ribosomal 50S. Esta enzima metila la base(s) blanco y evita la interrupción de la síntesis de proteínas [27].

La habilidad de producir melanina o pigmentos similares a ésta es una propiedad común entre estreptomicetos. La enzima responsable de ello es la tirosinasa (fenoloxidasas), inducida por diferentes aminoácidos, sintetizada intracelularmente y después secretada al medio de cultivo. La secuencia *mel* es entonces un buen marcador ya que, por medio de inserciones y por lo tanto inactivación, permite diferenciar entre colonias sin pigmento y colonias con pigmento. Es así como pIJ350, con resistencia a *tsr*, fue modificado subclonándole el gen de tirosinasa (*mel*) de *S. antibioticus* dando lugar al plásmido pIJ702 (5685 pb) con resistencia a *tsr* y producción de melanina (Fig. 8). En consecuencia, las ventajas de utilizar pIJ702 como vehículo de clonación son: al presentar genes de resistencia a *tsr* y tener el operón *melC* (melanina-coloración café) la selección de las clonas es más fácil, ya que las clonas con plásmidos recombinantes son reconocidas porque la inserción de un fragmento externo en el operón *melC* (sitios *SstI*, *BglIII* y *SphI*) lo interrumpe y elimina la actividad de tirosinasa y el fenotipo de melanina, por lo que las transformantes de interés no tienen coloración y tienen resistencia a *tsr*. Además, pIJ702 no conjuga lo que es benéfico durante el “shotgun”, de manera que es difícil que clonas no conjugativas superinfecten a clonas recombinantes. Es un plásmido de alto número de copias lo que le confiere una gran estabilidad y la presencia del promotor en el operón de *melC* permite la expresión de genes que requieren inductores en ausencia de ellos [27].

2.4 METABOLISMO PRIMARIO

El metabolismo primario involucra las reacciones catabólicas y anabólicas que resultan en el incremento de la biomasa. Se han presentado diversas evidencias que soportan la presencia de las rutas Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y hexosamonofosfato-pentosafofosfato (Hmp) en todos los *Streptomyces* estudiados hasta ahora. También Dekleva y Strohl, en 1988, demostraron que la ruta Etner-Doudoroff está ausente en *Streptomyces* C5, *S. lividans* y *S. aureofaciens* [41]. Se presumía que el origen de glucosa-6-fosfato a partir de glucosa era a través del sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP:PTS) como en la mayoría de las bacterias, pero en 1985 Novotna y Hostalek [42] confirmaron la ausencia de esta ruta y detectaron la presencia de una glucocinasa ATP-dependiente. Otro trabajo, en 1995,

confirmó la presencia de un sistema PEP:PTS mínimo para el transporte y fosforilación de fructosa y N-acetilglucosamina en *Streptomyces* [44].

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) ha sido estudiado ampliamente en un gran número de estreptomicetos debido a su importancia para generar precursores para el metabolismo secundario. En 1961, Cochrane [43] demostró la presencia de TCA completo y activo en estreptomicetos y posteriormente en 1988, Dekleva y Strohl lo confirmaron [41].

Los estreptomicetos producen una gran cantidad de enzimas para degradar distintos carbohidratos que son importantes para generar materiales para catabolismo y anabolismo, tales como amilasas, glucanasas, celulasas, laminarinasas, xilanasas, arabinofuranosidasas, glucuronidasas, estererasas, agarasas, manasas y quitinasas. También producen enzimas que degradan disacáridos tales como maltasas, celobiasas, xilosidasas y galactosidasas. En estos microorganismos se ha observado que existe represión catabólica por glucosa, glicerol y fructosa sobre enzimas intracelulares y extracelulares [45]. Además se han reportado trabajos que demuestran represión de catabolismo de carbohidratos por aminoácidos [46, 47].

El glucógeno, trehalosa y lípidos neutros como los triacilgliceroles son moléculas de reserva en estreptomicetos, además la trehalosa protege a las proteínas y membranas de daños causados por enfriamiento, altas temperaturas y deshidratación [52], así como también juega un papel importante junto con el glucógeno durante la diferenciación morfológica [14, 15, 53].

La fuente de nitrógeno para el crecimiento de los estreptomicetos, es importante desde el punto de vista comercial, debido a que gran cantidad de metabolitos secundarios están sujetos a represión por nitrógeno. Durante el metabolismo primario, la represión por nitrógeno es un mecanismo de jerarquía en la toma de fuentes de nitrógeno para ser utilizada (por ejemplo, amonio, glutamato y glutamina son preferidos con respecto a nitrato o histidina), de tal manera que la primera fuente de nitrógeno utilizada es la más fácil de asimilar. Este mecanismo es muy complejo e involucra regulación a nivel de expresión de genes y a nivel de actividad enzimática [48]. La represión por nitrógeno durante el metabolismo secundario se refiere a la inhibición, reducción o al retraso de la formación de metabolitos secundarios por la presencia de una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable [49]. Las proteínas son una importante fuente de nitrógeno al ser degradadas por proteasas y peptidasas, muchas de las cuales

han sido estudiadas en estreptomicetos debido a su aplicación en biotecnología para curtido de pieles, ablandadores de carne, clarificación de cerveza, etc. [50].

2.5 METABOLISMO SECUNDARIO

Los productos de origen natural han contribuido ampliamente en la historia de la medicina para la fabricación de medicamentos. De las 525 nuevas drogas aprobadas entre los años 1983 y 1994, el 39% fueron productos naturales o derivados de los mismos y entre el 60 y 80% de los medicamentos anticancerígenos y antibacteriales derivaron de productos naturales [35]. Los *Streptomyces* son conocidos por su capacidad para sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios que tienen aplicaciones en la medicina y la agricultura. La historia de los antibióticos inicia con el descubrimiento de la estreptomina en 1942, ocasionando la intensa búsqueda de otros antibióticos dentro del género. En 1995 de los 12,000 metabolitos secundarios conocidos con actividad antibiótica, el 55% es producido por *Streptomyces* y el 11% por otros actinomicetos. Además de los antibacteriales, existen otros compuestos que han sido aprobados como inmunopresores (FK-506, rapamicina, ascomicina), como anticancerígenos (bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, estaurosporina), como antimicóticos (anfotericina B, nistatina), como herbicidas (fosfotricina), como compuestos para el tratamiento de la diabetes (acarbose) y como agentes antihelmínticos (ivermectina, milbemicina). En adición a todas estas actividades, este género también produce una gran cantidad de enzimas extracelulares que incluyen proteasas, fosfatasas, xilanasas, celulasas, amilasas, lipasas y nucleasas [36]. En cultivos sólidos de *Streptomyces*, la secreción de las enzimas extracelulares y la biosíntesis de antibióticos coinciden temporalmente con el inicio de la diferenciación morfológica, los cuales son reprimidos por las condiciones nutricionales que favorecen altas velocidades de crecimiento [37].

El interés en la búsqueda de productos naturales se atribuye a necesidades terapéuticas, a la gran demanda de estructuras químicas y actividades biológicas de metabolitos secundarios, la utilidad de productos bioactivos naturales como sondas moleculares y bioquímicas, el desarrollo de técnicas nuevas y sensibles para detectar productos naturales biológicamente activos entre muchas otras [38]. La secuenciación y el desciframiento de genomas completos de organismos modelo como *S. coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* permite hacer un análisis profundo sobre el potencial genético de las rutas biosintéticas generando nuevos conocimientos acerca de la regulación y

producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo de esto es el estudio realizado en *S. coelicolor*, en donde el 5% de su genoma corresponde aproximadamente a 23 grupos de genes de metabolitos secundarios y en *S. avermitilis* cuyos grupos de genes de metabolitos secundarios es aun más grande, de aproximadamente 30% [36].

Al hacer una reflexión de la gran cantidad de antibióticos descubiertos y producidos por las grandes industrias farmacéuticas surge una pregunta: ¿Cuántos compuestos más pueden ser descubiertos en este género? Debido a la disminución en el descubrimiento de nuevos antibióticos aunado con el resurgimiento de ciertas enfermedades infecciosas, la adquisición de resistencias y el cambio en el espectro de los patógenos, la respuesta parece ser obvia pero errónea. La predicción que contesta correctamente a dicha pregunta fue resuelta mediante una ecuación matemática planteada por Watve y sus colaboradores [39] aseverando que solo el 3% de todos los agentes sintetizados por estreptomicetos ha sido reportado, por lo que la cantidad de posibles nuevos medicamentos por descubrir es muy amplia. Utilizando la combinación de técnicas de biosíntesis combinatorial, genética reversa, proteómica y la tecnología automatizada se ha aumentado la producción de nuevos medicamentos. Recientemente se ha enfocado la investigación en los metagenomas de microorganismos denominados “no cultivables” extraídos del suelo y del mar, los cuales parecen ser una fuente muy amplia de compuestos bioactivos y que no han sido explorados debido a que el cultivo de éstas, así como las técnicas de extracción de DNA y amplificación por PCR no se han estandarizado aún [40].

2.6 CARACTERÍSTICAS DE *Streptomyces mexicanus*

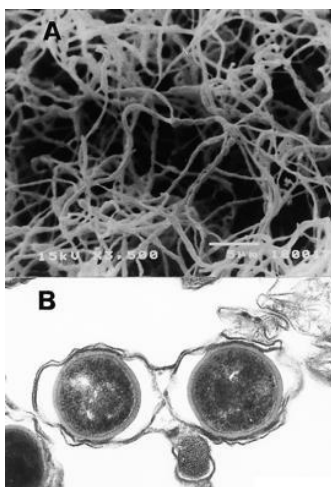


Fig. 9. (A) Electromicrografía de escaneo y (B) de transmisión de hifas rectiflexibles de *S. mexicanus* [12].

Es un organismo aeróbico, Gram⁺ moderadamente termofílico. Fue aislado del suelo de un ingenio azucarero en el estado de Morelos. Su micelio es ramificado y produce hifas aéreas, las cuales se diferencian en cadenas largas y rectiflexibles (Fig. 9) con 10 o más esporas de color verde. Sus esporas son rugosas, esféricas o ligeramente ovaladas, con un diámetro aproximado de 0.88 μm . Experimentos realizados por Petrosyan y colaboradores [12] comprobaron que *S. mexicanus*

es capaz de degradar arbutina, almidón, xilano, adenina, caseína, hipoxantina y L-tirosina, pero no guanina o testosterona. Utiliza diversas fuentes de carbono como L-arabinosa, fructosa, glucosa, rafinosa, manitol, manosa, xilosa, galactosa, maltosa, glicerol, lactosa, celobiosa, trehalosa y acetato de sodio. Crece entre los 20 y 55 °C (a altas temperaturas no forma esporas), a un pH de 4.3 a 8.0 y en presencia de NaCl al 6%. Es resistente a ampicilina (100 µg ml⁻¹) y sensible a cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, rifamicina, tetraciclina y tiostreptón. No presenta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* JM 109 ni contra cepas representativas de *Aspergillus flavipes*, *Aureobasidium* sp., *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Sarcina lutea* o *Trichoderma viridae*. Se amplificó y clonó el gen del rDNA de la subunidad 16S de *S. mexicanus* (número de acceso en el GenBank AF441168) y por medio de análisis filogenéticos se encontró una relación con otros estreptomicetos termofílicos, posicionándola en el árbol como especie hermana de *Streptomyces thermocoprophilus*, otro organismo xilanolítico. Produce 4 xilanasas con una alta actividad específica, así como algunas otras enzimas hidrolíticas [12].

2.7 GENERALIDADES DE LA MUTANTE 10-164 XILANASA/CELULASA NEGATIVA DE *Streptomyces lividans*

El transporte de los disacáridos celobiosa y xilobiosa en *S. lividans* no depende del sistema PTS (Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato), sino de un sistema de transporte activo de azúcares que involucra el consumo de una molécula de ATP. Es incierto cual es el funcionamiento de éste último y solo se sabe que involucra una proteína de unión a ATP (Fig. 10).

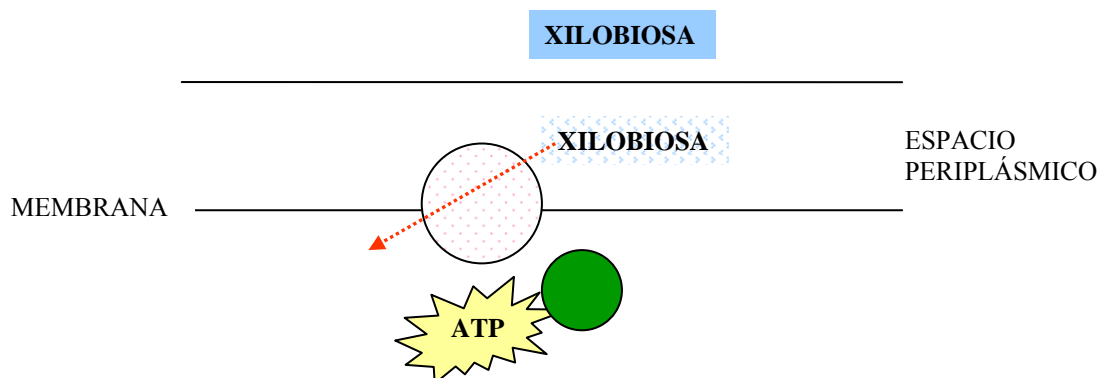


Fig. 10. Transporte activo de xilobiosa y celobiosa en *S. lividans* 1326.

Hurtubise y colaboradores realizaron experimentos en los cuales comparaban *S. lividans* 1326 (cepa silvestre) y *S. lividans* 10-164 (mutante xil⁻cel⁻) en tres aspectos: medición de K_m y V_{max} del transporte de glucosa, xilosa, celobiosa y xilobiosa en ambas cepas, disminución de éstos azúcares del medio de cultivo (monitoreado durante 24 horas por HPLC y por ensayo de azúcares reductores) y evaluación del sistema de transporte de carbohidratos por lapsos cortos a través de la incorporación de azúcares marcados con radioactividad. Como resultado confirmaron que la mutante 10-164 esta afectada en el sistema de transporte activo de azúcares, por lo tanto los disacáridos inductores de las enzimas celulasa y xilanasas no pueden ser introducidos a la célula, lo que generó que la mutante sea xilanasas/celulasas negativa. La proteína responsable de este transporte se denominó MsiK, la cual tiene identidad con proteínas como MalK, LacK y MsmK que son conocidas por ser las responsables de dar energía de acoplamiento en los sistemas de transporte activo de azúcares y que pertenecen a una familia de proteínas con dominio de unión a ATP. En la cepa 10-164, la mutación está en el gen *msiK* en el nucleótido 397, en donde hay un cambio de una G por una A que se traduce en asparagina en lugar de ácido aspártico [28].

3. JUSTIFICACIÓN

Streptomyces mexicanus es un actinomiceto termofílico moderado que tiene un importante potencial de uso a nivel industrial ya que produce 4 xilanasas [12], 2 proteasas, 4 pectinasas y 4 carboximetilcelulasas de diferentes pesos moleculares cuando crece en un medio mínimo con bagacillo de caña como fuente de carbono [30]. Por esta razón se consideró interesante, en primer lugar, llevar a cabo la clonación de los genes correspondientes a las xilanasas. Sin embargo, la amplificación del DNA correspondiente a alguno de estos genes [51], utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas en otras especies en estas proteínas no dio resultados positivos, por lo que la construcción de un banco de genes de *Streptomyces mexicanus* se hizo indispensable para la posterior identificación de los genes de interés. El uso de la mutante 10-164 de *S. lividans* en particular ayudaría a la identificación de los genes que codifican para xilanasas.

4. OBJETIVOS

- ✚ Estandarización de la metodología para lograr una buena eficiencia de transformación de protoplastos de *Streptomyces lividans* 10-164 (mutante xilanasasa⁻ celulasasa⁻).
- ✚ Obtener la biblioteca genómica de *Streptomyces mexicanus* clonada en *Streptomyces lividans* 10-164.
- ✚ Análisis de dos plásmidos de la biblioteca genómica construida.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MICROORGANISMOS

Se utilizaron las siguientes cepas:

- ✚ *Streptomyces mexicanus* [12],
- ✚ *Streptomyces lividans* 1326 [pIJ702] (donada por el Dr. Luís Servín, IIBM),
- ✚ *Streptomyces lividans* 10-164 (mutante xilanasas⁻ celulasas⁻; donada por el Dr. D. Kluepfel de la Universidad de Quebec, Canadá)
- ✚ *Escherichia coli* TOP10F' (F' {lacI^q, tn10(Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsd RMS – mcrBC) φ 80 lacZ Δ M15 Δ lac X74 rec A1 deo R ara D 139; Invitrogen).

5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Para la conservación de las cepas de *Streptomyces* como suspensión de esporas, se utilizó medio YEMEG (extracto de levadura 4 g/L, extracto de malta 10 g/L, glicerol 400 mL/L). Cuando fue requerido se adicionaron 50 µg/mL de tioestrepón (tsr) [1]. *E. coli* TOP10F' fue conservada en cajas con medio LB. Cuando fue requerido se adicionaron 250 µg/mL de ampicilina (Ap) [33].

Para la extracción y purificación del DNA cromosomal de *S. mexicanus* se utilizó el medio YEMEG (YEME + 4 g/L de glucosa) y YEMEG con glicina (5 mg/mL).

Para la extracción y purificación del plásmido pIJ702, se creció a *S. lividans* en medio TSB (caldo triptonas/soya 30 g/L) con tsr a una concentración de 50 µg/mL y TSB + glicina (5 mg/mL) + tsr [32].

Para la formación y transformación de protoplastos de *S. lividans xil cel* se probaron los siguientes medios: YEME, YEME + Glicina (5 mg/mL), YEME + Sacarosa (0.34 g/mL) + Glicina (8 mg/mL), TSB, TSB + Glicina (5 mg/mL), YEMEG, YEMEG + Glicina (5 mg/mL) y, para comprobar la esporulación de la mutante en medio líquido, se utilizó medio sólido YEMES [1].

Para regenerar los protoplastos transformados de *S. lividans* 10-164 se utilizaron cajas de R2 [1] con extracto de levadura a una concentración de 0.2 g/mL. Para la selección de las transformantes se adicionó tsr a una concentración de 8 µg/mL a las 20 horas después de sembrar los protoplastos.

Para el almacenamiento del banco de genes de *S. mexicanus* se utilizó YEMEG.

Para la selección de las colonias transformantes de *E. coli* TOP10F', se utilizó medio LB con IPTG (0.1 mM), Xgal (40 µg/mL) y Ap. Para la purificación de plásmidos de *E. coli* TOP10F' recombinantes se utilizó medio LB con Ap.

5.3 EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE *Streptomyces mexicanus*

Se realizó utilizando la técnica descrita por Hunter [32] con las siguientes modificaciones a la metodología original:

1. Del cultivo de 24 horas crecido con glicina tomar únicamente 10 mL y centrifugar en tubos con tapón de rosca estériles a 5000 rpm durante 15 minutos.
2. Lavar el micelio con 10 mL de solución de sacarosa (0.103 g/mL) y centrifugar 10 minutos a 5000 rpm. Eliminar el sobrenadante y repetir el lavado.
3. Resuspender en 5 mL de buffer P [1] con 10 mg de lisozima. Incubar a 37°C durante media hora. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 1.5 mL de la misma solución de sacarosa. Agregar 40 µL de EDTA 0.5 M. Adicionar 0.2 mL de SDS 0.1 g/mL (de preferencia con pipeta automática de 1000 µL) agitando suavemente con la pipeta. INMEDIATAMENTE agregar 1.5 mL de fenol saturado con TRIS-HCl pH 7.4 y 0.3 mL de NaCl 5 M. Pasar a un tubo estéril y mezclar por inversiones lentas durante 20 minutos. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.
5. Repartir la fase superior acuosa en tubos Eppendorf de 1.5 mL (500 µL en cada tubo). Agregar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M o NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Dejar precipitando toda la noche a -20°C.
6. Centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm. Quitar el etanol absoluto con una pipeta de 200 µL y dejar secar sobre una sanita o gasa estéril.
7. Agregar 200 µL de buffer TE pH 7.5 al pellet. Colocar 2 µL de RNAsa (10 mg/mL; Sigma) e incubar 1 hora a 50°C. Después colocar 8 µL de SDS (0.1 g/mL) para el volumen manejado y 4 µL de NaCl 5M. Después agregar 2 µL de proteinasa K (20 mg/mL; Roche) e incubar 1 hora a 37°C.
8. Agregar un volumen de fenol/cloroformo (1:1) y mezclar por inversión. Centrifugar 3 minutos en microcentrífuga a 13,000 rpm y pasar la fase acuosa a otro tubo.

9. Agregar 1 mL de etanol absoluto a la fase acuosa y mezclar por inversiones. Dejar precipitando toda la noche a -20°C.
10. Centrifugar 7 minutos en microcentrífuga a 13,000 rpm y quitar el etanol con pipeta automática.
11. Lavar el pellet con 1 mL de etanol al 70% y centrifugar 3 minutos en microcentrífuga, eliminar el alcohol con pipeta sin tocar el pellet. Repetir el lavado 2 veces más. Dejar secar el pellet sobre una sanita o gasa estéril, resuspender en 200 µL de agua estéril y guardar a -20°C.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE DNA

La concentración del DNA se cuantificó en un espectrofotómetro GeneQuant *pro* (Pharmacia Amersham) a 260 nm.

5.5 DIGESTIÓN DEL DNA CROMOSOMAL DE *S. mexicanus*

Se llevó a cabo utilizando la enzima de restricción *Bam*HI (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO pIJ702 Y DE DOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pIJ702 DE *Streptomyces lividans* (pTO39 y pTO3)

Se llevó a cabo empleando la técnica de lisis alcalina y precipitación con acetato de potasio reportada por Birnboim y Doly [1] cambiando únicamente los siguientes pasos:

1. Para crecer la cepa, inocular con 10⁶ esporas frescas en medio TSB con tsr e incubar a 30°C durante 24 horas, con agitación a 200 rpm.
2. Posteriormente transferir 5 mL del cultivo a un matraz que contenga 50 mL de TSB con glicina (5mg/mL) y tsr. Incubar 24 horas con agitación (200 rpm) a 30°C.
3. Después de la incubación en hielo durante 5 minutos, centrifugar 30-45 minutos a 15,000 rpm.
4. Una vez agregado el fenol-cloroformo (1:1) y después de haber centrifugado 5 minutos, agregar un volumen de isopropanol a 20°C a la fase acuosa, mezclar con fuerza y centrifugar a 15,000 rpm durante 30-45 minutos.

5.7 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO pIJ702

Se llevó a cabo utilizando la enzima *Bgl*III (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, cuyo sitio es homólogo al de la enzima de restricción *Bam*HI, interrumpiendo el operón de *melC*. Para la purificación del plásmido digerido se corrió toda la muestra en un gel de agarosa 0.8% y se recortó la banda del gel para posteriormente purificar el plásmido con el kit Gel Extraction Kit QIAquick (QIAGEN).

5.8 LIGACIONES PARA TRANSFORMAR EN *S. lividans* 10-164

Se llevaron a cabo mezclando 3 µg de DNA digerido con *Bam*HI, 225 ng de plásmido pIJ702 digerido con *Bgl*III y 1U de ligasa de T4 (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Debido a que el sitio de ligación *Bam*HI/*Bgl*III no se regenera, la ligación fue sometida posteriormente a digestión con la enzima de restricción *Bgl*III para disminuir la cantidad de vector autoligado (Esquema 1).

5.9 FORMACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Streptomyces lividans* 10-164 (*xyI cel*)

El primer intento de formación y transformación (I) de protoplastos de *S. lividans* 10-164 con pIJ702 se realizó utilizando el método descrito por Kieser y colaboradores [1].

El segundo intento de transformación (II) se llevó a cabo utilizando fragmentos de DNA de *S. mexicanus* de diferentes pesos moleculares purificados de gel de agarosa al 0.8% utilizando la metodología reportada por Kieser [1]. El tamaño de los fragmentos utilizados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos obtenidos por digestión del DNA de *S. mexicanus* con *Bam*HI

Fracción	Tamaño aproximado (pb)
B1	~6300-8700
B2	~4500-6500
B3	~4300-5500
B4	~2000-4300
B5	~1000-2000

El tercer intento de transformación (III) se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Kieser [1] utilizando el DNA de *S. mexicanus* digerido con *Bam*HI, pero para la obtención de los protoplastos se creció *S. lividans* 10-164 en TSB (25 mL en matraz de 200 mL) a 30°C y agitación a 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente se tomaron 2.5 mL de este cultivo para inocular un matraz de 200 mL que contenía 25 mL de YEME + glicina (5 mg/mL). El micelio resuspendido en buffer P se dividió en alícuotas, las cuales se congelaron a -20°C. Los protoplastos se formaron utilizando 2 mg/mL de lisozima, se filtraron y se exprimió el algodón con una pipeta. Se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm por 7 minutos utilizando una centrifuga Sorvall.

Después de transformar, los protoplastos se colocaron en 3 mL de agar suave (en g/100 ml: sacarosa 10.3 g, MgCl₂.2H₂O 1.012 g, 10 mL de Buffer TRIS-HCl 30 g/L, pH 7.2, 400 µL de CaCl₂.2H₂O 5M, Agar 0.65 g) a 45°C y se vaciaron sobre cajas con medio R2YE. Las cajas se incubaron invertidas a 30°C durante 18 horas. Después de este tiempo se agregó el tsr.

El cuarto intento de transformación (IV) se llevó a cabo con pIJ702 utilizando el método anterior con otras modificaciones que se señalan en resultados.

El quinto intento de transformación (V) se realizó utilizando el método anterior pero ahora utilizando pIJ702 ligado a los fragmentos obtenidos después de digerir DNA total de *S. mexicanus*.

5.10 DIGESTIÓN DE DOS PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pIJ702 (pTO39 Y pTO3) Y DEL PLÁSMIDO pBlueScript SK⁺ DE *Escherichia coli*

Para liberar los insertos de los dos plásmidos derivados de pIJ702 (nombrados como pTO39 y pTO3), cada uno de ellos fue digerido con las enzimas de restricción *Kpn*I y *Sac*I (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante.

El plásmido pBlueScript SK⁺ fue digerido con las mismas enzimas. Posteriormente las digestiones fueron corridas en un gel de agarosa al 0.8% y se cortaron las bandas correspondientes para posteriormente purificarlas con el kit Gel Extraction Kit QIAquick (QIAGEN) (Esquema 1). Las electroforesis del DNA o plásmidos se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0.8 % (w/v) en buffer TAE (0.4 M de Tris-acetato y 1 mM de EDTA, pH 8.3) a 100 V durante una hora aproximadamente [33].

5.11 LIGACIÓN DE LOS INSERTOS EN EL PLÁSMIDO pBlueScript SK⁺

Se llevaron a cabo mezclando plásmido pBlueScript SK⁺ digerido con las enzimas *KpnI* y *SacI*, con cada uno de los insertos resultado de las digestiones de pTO39 y pTO3 con las mismas enzimas y T4 DNA ligasa (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Esquema 1).

5.12 TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli* TOP10F'

Primero se hicieron células competentes de *E. coli* por el método de cloruro de rubidio [34] y después se realizó la transformación empleando el método descrito por Invitrogen.

5.13 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli* TOP10F' NOMBRADOS COMO pTI39 y pTI3

Se llevó a cabo utilizando el kit de purificación *DNA isolation Kit* (Promega).

5.14 SUBCLONACIÓN DE LOS INSERTOS DE LOS PLÁSMIDOS pTI39 y pTI3

Cada uno de los plásmidos pBlueScript SK⁺ recombinantes se volvieron a digerir con las enzimas *XmaI* ó *SallI* (Invitrogen) y uno de los fragmentos generados con *XmaI* de cada plásmido se digirió con *KpnI*, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De la misma manera se digirió plásmido pBlueScript SK⁺ para cada uno de los casos. Se hicieron ligaciones mezclando cada uno de los sub-fragmentos con plásmido digerido con la enzima correspondiente y ligasa T4 DNA, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente se transformó *E. coli* TOP10F' con cada una de las ligaciones obtenidas utilizando el método descrito en la sección 5.12. Se sembraron 4 colonias blancas de cada caso en cajas de LB+IPTG+Ap+Xgal divididas en 4 cuadrantes colocando una colonia en cada uno y se incubaron toda la noche a 37°C. Después se inoculó medio LB con Ap con cada una de las transformantes sembradas para llevar a cabo la purificación de los plásmidos productos de la sub-clonación la cual se llevó a cabo igual que en la sección 5.13.

5.15 SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Se llevó a cabo con los oligonucleótidos reverse y -21 utilizando el Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versión 3.1 (Applied Biosystems)

utilizando un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

5.16 CÁLCULO PARA UNA GENOTECA REPRESENTATIVA [33]

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

En donde:

N = Número de clonas necesarias

P = Posibilidad dada (0.99-0.95)

f = Tamaño de los Fragmentos/Tamaño del Genoma

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE *Streptomyces mexicanus*

S. mexicanus es un microorganismo recientemente aislado [12] por ello no se tiene referencia en cuanto a su manipulación en biología molecular. Debido a ello se tuvieron que estandarizar las condiciones para la extracción y purificación del DNA del cual se tuvieron que eliminar contaminantes que impedían la ligación en los vectores seleccionados, a pesar de que el DNA se observaba en buen estado y con alta pureza tanto en los geles (Fig. 11), como por la relación A_{260}/A_{280} que se obtuvo dentro de los rangos permitidos (1.84). Para resolver este problema, se hicieron precipitaciones y lavados repetidas veces.



Fig. 11. DNA cromosomal purificado de *S. mexicanus*. La electroforesis fue llevada a cabo en un gel de agarosa al 0.8% de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

6.2 RESTRICCIÓN DEL DNA CROMOSOMAL DE *Streptomyces mexicanus* CON LA ENZIMA *Bam*HI

Después de haber resuelto el problema de la pureza del DNA, se procedió a la digestión con *Bam*HI y a la purificación de fragmentos de acuerdo a su tamaño. En virtud de que el DNA cromosomal de *S. mexicanus* presenta un alto contenido de G+C, se seleccionó a la enzima *Bam*HI para digerirlo, cuyo sitio de corte es compatible con el sitio *Bgl*III presente en el plásmido pIJ702 en la región de *melC*. Como se puede observar en la fig. 12, la enzima genera fragmentos de una gran diversidad de tamaños, los cuales se fraccionaron purificando directamente del gel para utilizarlos posteriormente en la clonación (Fig. 13).

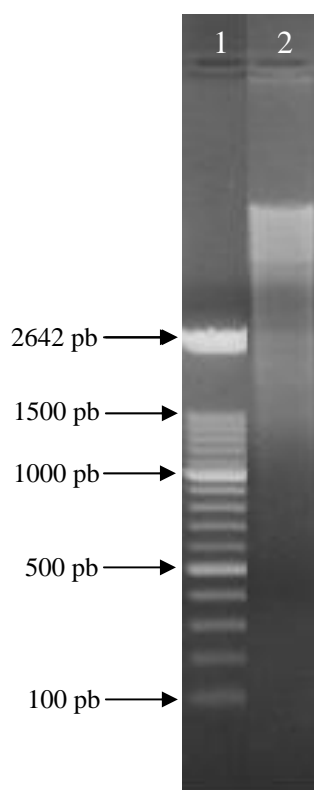


Fig. 12. Digestión del DNA de *S. mexicanus*.
Carril 1. M.P.M. Escalera de 100 pb (Roche).
Carril 2. DNA *S. mexicanus* digerido con *Bam*HI.
La electroforesis fue realizada como se describe en
Material y Métodos.

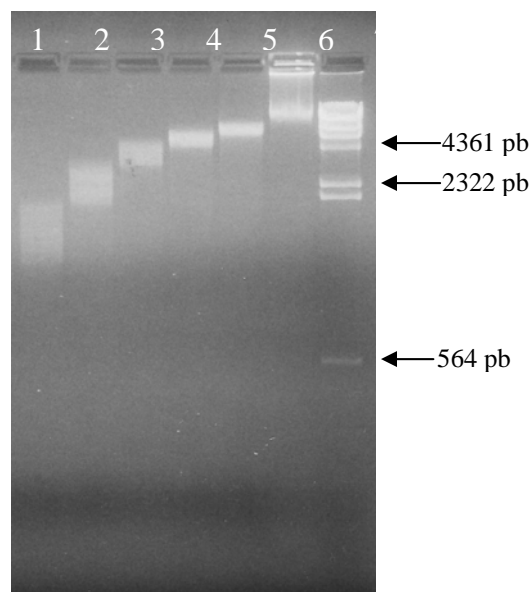


Fig. 13. Fragmentos de DNA de diferentes tamaños purificados del gel de agarosa. **Carril 1.** B5 (~1000-2000); **Carril 2.** B4 (~2000-4300); **Carril 3.** B3 (~4300-5500); **Carril 4.** B2 (~4500-6500); **Carril 5.** B1 (~6300-8700); **Carril 6.** DNA *S. mexicanus* sin digerir y **Carril 7.** M.P.M. λ -*Hind* III(Roche).

6.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pIJ702 DE *Streptomyces lividans*

El plásmido pIJ702 es un vector multicopia que tiene como marcadores la resistencia a tioestreptón y la producción de melanina, la cual se manifiesta con una coloración oscura alrededor de la colonia de *S. lividans* (Fig. 14).

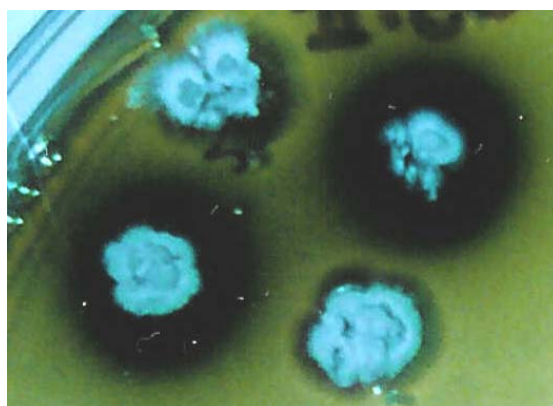
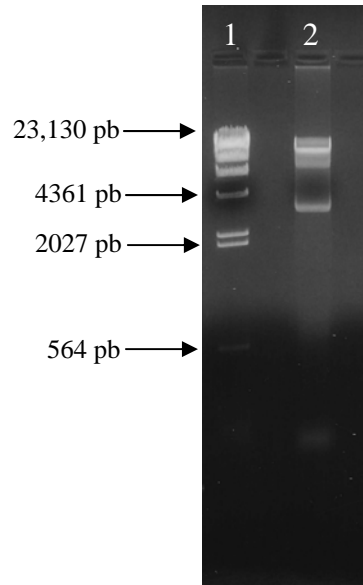


Fig. 14. *S. lividans* pIJ702 crecido en MM+Xilano+tirosina+CuSO₄.



El plásmido pIJ702 fue extraído de *S. lividans* siguiendo la metodología reportada por Birnboim y Doly [1] con algunas modificaciones (Fig. 15) y posteriormente digerido con *Bgl*II y purificado del gel (Fig. 16) para tenerlo disponible y poder llevar a cabo la ligación con los fragmentos de DNA de *S. mexicanus* purificados previamente.

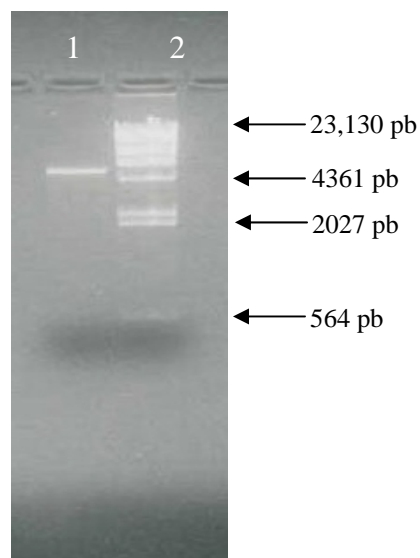


Fig. 16. Purificación del plásmido pIJ702 digerido con *Bgl*II. **Carril 1.** Plásmido pIJ702 digerido y purificado del gel; **Carril 2.** M.P.M. λ -*Hind* III (Roche).

6.4 PRIMER INTENTO DE FORMACIÓN Y TRASFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS (I) DE LA MUTANTE 10-164 DE *Streptomyces lividans* CON PLÁSMIDO pIJ702

La mutante 10-164 de *S. lividans* tiene la característica de no producir xilanasas ni celulasas y fue seleccionada por Kluepfel y colaboradores para utilizarla durante la clonación de los genes que codifican a dichas enzimas del mismo *S. lividans* [31]. Sin embargo, siguiendo la metodología reportada por Kieser [1] para la formación y transformación de protoplastos de *Streptomyces* en general y utilizando el plásmido pIJ702 purificado, se obtuvo una eficiencia de transformación dos órdenes de magnitud más baja con respecto a lo reportado por estos autores (Tabla 2).

Tabla 2. Primer intento de transformación (I) de protoplastos de *S. lividans* 10-164.

Cantidad de Plásmido	Número de Transformantes (Colonias color café/tsr ^R)	Eficiencia de Transformación (Número de colonias/μg de DNA)
750 ng	7227	9 x 10 ³
3 μg	7364	2.5 x 10 ³

Aún con esta baja eficiencia se hicieron algunos ensayos para la construcción de la biblioteca de genes de *S. mexicanus*, obteniéndose eficiencias de transformación mucho más bajas que las obtenidas con el plásmido puro (intentos de transformación II y III).

Estos resultados pueden deberse a varias causas, siendo una de ellas la calidad y cantidad de protoplastos utilizados para la transformación. Para tratar de resolver este punto, se probaron varios medios para el crecimiento de la mutante 10-164 antes del crecimiento en presencia de glicina para la obtención de protoplastos.

Como se puede observar en la tabla 3, esta mutante creció poco en medio YEME y YEMEG comparado con el crecimiento en TSB, en los cuales la cepa silvestre de *S. lividans* 1326 tiene un buen crecimiento [1]. Además al observar muestras del micelio en el microscopio se detectaron diferencias morfológicas en cada uno de los medios. Es probable que la mutante 10-164 al carecer del sistema de transporte de celobiosa y

xilobiosa, no pueda tampoco transportar otros azúcares y esto impida su buen crecimiento [28].

El siguiente paso es el crecimiento en un medio con glicina para permitir la formación de los protoplastos en tiempos cortos, por lo que el micelio obtenido bajo estas condiciones sirvió para inocular el medio suplementado con este aminoácido.

Tabla 3. Pruebas de crecimiento inicial de *S. lividans* 10-164.

Medio	Condiciones de Crecimiento	Aspecto del micelio
YEME	25 mL de medio en matraz de 200 mL, 30°C, 200 rpm durante 36 horas.	Poco crecimiento, el micelio tiene un aspecto normal.
TSB	25 mL de medio en matraz de 200 mL, 30°C, 200 rpm durante 36 horas.	Gran cantidad de crecimiento, el micelio tiene un aspecto normal.
YEMEG	25 mL de medio en matraz de 200 mL, 30°C, 200 rpm durante 36 horas.	Muy poco crecimiento, el micelio se ve más grueso comparado con los otros.

En el caso del medio YEME se probaron dos condiciones variando la cantidad de sacarosa, la concentración de glicina y con o sin homogeneización previa del micelio en cada una de ellas. Como resultado del crecimiento en sacarosa a una concentración de 0.34 g/mL y glicina 8 mg/mL con micelio homogenizado previamente, se obtuvo un crecimiento medio, pero al observarlo al microscopio el micelio se apreciaba estresado por lo que no se llevó a cabo la formación de protoplastos; bajo estas condiciones de crecimiento el micelio esporula, lo cual fue observado al microscopio y comprobado al colocarlo en una caja de medio YEMES en donde, después de 72 horas de incubación a 30°C, creció y nuevamente formó esporas. La segunda condición de crecimiento, con sacarosa a una concentración de 0.2 g/mL y glicina 5 mg/mL, dio una cantidad de crecimiento aceptable y relativamente una muy buena formación de protoplastos, mientras que, en el medio TSB con glicina se obtuvo el mayor crecimiento de micelio pero no se pudieron formar los protoplastos probablemente por la falta de MgCl₂ en este medio. Finalmente en el medio YEMEG con glicina hubo muy poco crecimiento comparado con los otros medios por lo que no se intentó la formación de protoplastos (Tabla 4). Es importante mencionar que estos problemas de crecimiento no se observan en la cepa silvestre de *S. lividans*.

Tabla 4. Pruebas de crecimiento de *S. lividans* 10-164 en diferentes medios con glicina para la formación de protoplastos.

Medio Original	Medio Inoculado	Condiciones de Crecimiento	Aspecto del Micelio	Formación de Protoplastos
YEME	YEME + GLICINA (8 mg/mL) + Sacarosa (0.34 g/mL)	Pellet homogenizado, 25 mL de medio en matraz de 200 mL, con resorte, 30°C, 200 rpm durante 40 horas.	Crecimiento medio, debido a la alta concentración de sacarosa el micelio crece estresado (se ven muchas bolitas en medio del micelio), además de un exceso de ruptura.	No se llevó a cabo la formación de protoplastos debido al aspecto del micelio (estresado y esporulado).
	YEME + GLICINA (5 mg/mL)	25 mL de medio en matraz de 200 mL, con perlas, 30°C, 200 rpm durante 40 horas.	Crecimiento medio, el micelio se aprecia normal, con algunos pellets.	Muy buena cantidad de protoplastos.
TSB	TSB + GLICINA (0.5%)	25 mL de medio en matraz de 200 mL, 30°C, 200 rpm durante 40 horas.	Gran cantidad de crecimiento, el micelio tiene un aspecto normal.	A pesar de la gran cantidad de micelio, no se formaron los protoplastos.
YEMEG	YEMEG + GLICINA (0.5%)	25 mL de medio en matraz de 200 mL, 30°C, 200 rpm durante 40 horas.	Muy poco crecimiento, el micelio se ve más grueso comparado con los otros.	No se llevó a cabo la formación de protoplastos debido a la escasa cantidad de micelio.

6.5 CUARTO INTENTO DE TRANSFORMACIÓN (IV) DE PROTOPLASTOS DE *S. lividans* 10-164

Una vez resuelto el problema de la formación de los protoplastos haciendo las modificaciones a la técnica original que se indican más adelante, se procedió a transformarlos con plásmido pIJ702 para establecer si con mayor cantidad y calidad de los mismos, la eficiencia de transformación aumentaba. Después de hacer varios intentos de transformación todos los resultados fueron inadmisibles, por lo que se procedió a revisar y analizar la metodología nuevamente.

Otro de los puntos clave en la transformación de protoplastos es el polietilenglicol (PEG). Kieser y colaboradores [1] reportan que se debe pesar y esterilizar por autoclave para poderlo utilizar. Sin embargo al momento de agregarlo a los protoplastos se observó que la mezcla se tornaba viscosa, reflejo de la lisis de los mismos. Al consultarlo con miembros del grupo del Dr. Luis Servín (IIBM) que tenían el mismo problema, se llegó a la conclusión de que el PEG esterilizado por autoclave se hidrolizaba y esto genera la lisis de los protoplastos durante la transformación. El procedimiento entonces se cambió a pesar el PEG en un tubo estéril en el momento y poco antes de usarlo resuspenderlo en buffer P y esterilizarlo por filtración. Otro punto importante que se cuidó fue la velocidad de centrifugación (3500 rpm) de los protoplastos antes y después de transformarlos para evitar lizarlos.

Finalmente la metodología para la formación y transformación de protoplastos quedó como se señala a continuación, marcando los cambios realizados a la técnica original con letras color rojo.

- 1) Inocular 25 mL de YEME contenidos en un matraz de 200 mL con 10^6 esporas de *S. lividans* 10-164. Incubar 36 horas a 30°C y agitación a 200 rpm.
- 2) Centrifugar el cultivo anterior a 5000 rpm durante 15 minutos, decantar y lavar el pellet con solución de sacarosa 0.34 g/mL. Decantar y con el pellet resuspendido en la gota de sacarosa que queda, inocular 25 mL de medio YEME + Glicina a una concentración de 5 mg/mL contenidos en un matraz de 200 mL con perlas de vidrio de 0.5 cm de diámetro. Incubar 40 horas a 30°C en una incubadora con agitación a 200 rpm.
- 3) Vaciar en un tubo con tapa de rosca y centrifugar a 3500 rpm (en centrífuga Sorvall, rotor SS-34) durante 12 minutos.

- 4) Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 15 mL de solución de sacarosa 0.34 g/mL. Centrifugar a 3500 rpm durante 12 minutos.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 25 mL de la misma solución de sacarosa y repartir en tubos de rosca de vidrio, cada uno con 5 mL.
- 6) Centrifugar los tubos (colocándolos en camisas) 12 minutos a 3500 rpm. Decantar sacudiendo el tubo. Utilizar el micelio de un tubo por cada condición de transformación, el micelio que no se va a usar se congela a -20°C.
- 7) Antes de continuar con la formación de los protoplastos se debe suplementar el Buffer P [1] y dejar reposar 30 minutos; pesar 5 mg de lisozima en un tubo estéril y resuspender en 5 mL de buffer P completo (1 mg/mL). Después filtrar el buffer P completo a través de una membrana de 0.45 µm (Millipore) en un recipiente lavado y esterilizado para evitar la formación de cristales que pueden lisis los protoplastos. Con la misma membrana, filtrar la lisozima resuspendida en el buffer P sobre el/los tubos a transformar. Mezclar por inversiones e incubar el/los tubos a 30°C durante 1 hora exactamente.
- 8) Cuando transcurra la hora de incubación, revisar la formación de los protoplastos en el microscopio. Si ya están formados, filtrar a través de una columna de algodón (utilizando un tubo filtro), enjuagar el algodón agregando 5 mL de buffer P completo y exprimir el algodón con una pipeta; el filtrado debe verse lechoso y uniforme. Si hay una gran cantidad de protoplastos, el filtrado se puede repartir en dos tubos de vidrio con tapa de rosca y transformar con 20 µL de mezcla de ligación en cada tubo para obtener mayor cantidad de transformantes.
- 9) Sedimentar los protoplastos suavemente por centrifugación a 3500 rpm durante 12 minutos*. Tirar el sobrenadante, sacudiendo el tubo para eliminar todo el buffer (los protoplastos no deben verse embarrados en la pared del tubo, sino hasta abajo formando un pellet). Resuspender con los nudillos en la gota de buffer P que queda.

* Dos minutos antes de que terminen de centrifugarse, preparar el PEG 1000 de la siguiente manera: raspar con una espátula desinfectada el PEG1000, pesando 0.5 g en un tubo estéril. Después agregar 1.5 mL de buffer P completo y esterilizarlo por filtración en otro tubo estéril. Separar 0.6 mL del PEG en tubos estériles por cada

transformación y colocar una pipeta Pasteur (que debe ser nueva y estéril) en cada tubo, todo con mechero encendido para mantener condiciones de esterilidad.

Transformación de Protoplastos:

- 1) INMEDIATAMENTE después de centrifugar y resuspender los protoplastos, agregar el DNA (plásmido o ligación) en un volumen menor a 20 μL hasta el fondo de cada tubo de protoplastos y agregar con la pipeta Pasteur 0.6 mL de PEG 1000. Subir y bajar varias veces con la misma pipeta hasta que se vea homogéneo. Agregar 5 mL de buffer P completo. Centrifugar 12 minutos a 3500 rpm.
- 2) Desechar el sobrenadante, sacudiendo el tubo y resuspender el pellet en 200 μL de Buffer P completo. Resuspender con los nudillos y colocar 100 μL en una caja de R2YE (las cuales deben estar bien secas; 3 horas en campana) y agregar 3 mL de agar suave para transformaciones a una temperatura entre 45 y 50°C. Extender por toda la caja con movimientos rotatorios. Con los 100 μL restantes, hacer diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y colocar 100 μL de cada dilución en cajas de R2YE de igual manera que la primera alícuota.
- 3) Incubar las cajas invertidas a 30°C durante 20 horas. Después de las 20 horas agregar el tioestreptón, el cual se prepara diluyendo 20 μL de solución stock (50 mg/mL) en 5 mL de buffer P, de aquí se coloca 1 mL por caja. Observar diariamente las cajas. Aproximadamente después de 4 días se observaron las transformantes.

Con este método se obtuvieron en los 200 μL de protoplastos resuspendidos originalmente aproximadamente 100,000 colonias transformantes. Si la concentración de pIJ702 era de 100 ng/ μL entonces la eficiencia de transformación fue 1×10^6 colonias por μg de pIJ702, lo que es más congruente con lo reportado en la bibliografía [1].

6.6 FORMACIÓN DEL BANCO DE GENES DE *Streptomyces mexicanus* (INTENTO DE TRANSFORMACIÓN V)

Después de haber estandarizado la metodología de formación y transformación de los protoplastos de la mutante 10-164 de *S. lividans*, se utilizó la mezcla de ligación que incluía DNA de *S. mexicanus* total digerido con *Bam*HI para poder obtener el banco de genes. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y se puede observar que se obtuvieron, 11,980 colonias transformantes blancas (debido a que el inserto interrumpió el operón *melC* inactivando la producción de melanina) y resistentes a *tsr* y 12,160 colonias transformantes negras resistentes a *tsr* en base a la dilución 10^{-1} .

Tabla 5. Análisis del quinto intento de transformación de protoplastos (V) de *S. lividans* 10-164 con plásmidos derivados de pIJ702.

Transformación	Dilución	Colonias Negras	Colonias Blancas
1	10^{-3}	16	24
	10^{-1}	239	369
	10^0	IN	IN
2	10^{-3}	0	3
	10^{-2}	15	12
	10^{-1}	163	230
	10^0	IN	IN

IN = Incontables.

Los números 1 y 2 hacen referencia a 2 tubos distintos de micelio transformados con la misma mezcla de ligación.

Ya que fueron transformados 1.2 μ g de DNA, la eficiencia de transformación, tomando en cuenta colonias blancas y negras porque ambas son transformantes, fue de 1×10^4 colonias por μ g de DNA. Aunque esta eficiencia es menor a la obtenida en la transformación con puro plásmido pIJ702, es la más alta obtenida en nuestras condiciones con la mutante 10-164. Si el tamaño promedio de los insertos clonados es de 4,800 pb aproximadamente, podemos utilizar la fórmula descrita para calcular el número de colonias necesarias para tener representado todo el genoma de *S. mexicanus*:

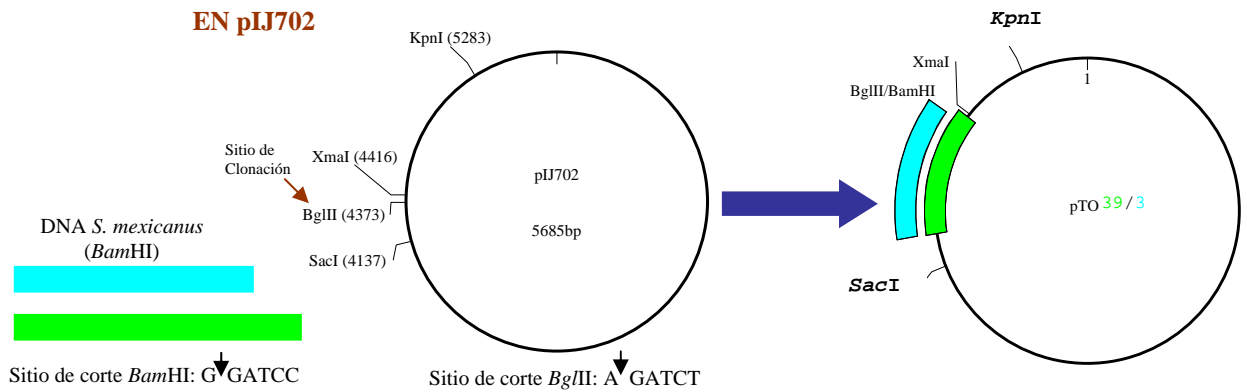
$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} = \frac{\ln(1 - 0.99)}{\ln\left(1 - \frac{4800}{8000000}\right)} = \frac{-4.605}{\ln(1 - 0.0006)} = \frac{-4.605}{-0.0006} = 7,675$$

Por lo tanto, si se requieren 7,675 colonias y el banco es de 11,980, entonces la genoteca construida si es representativa.

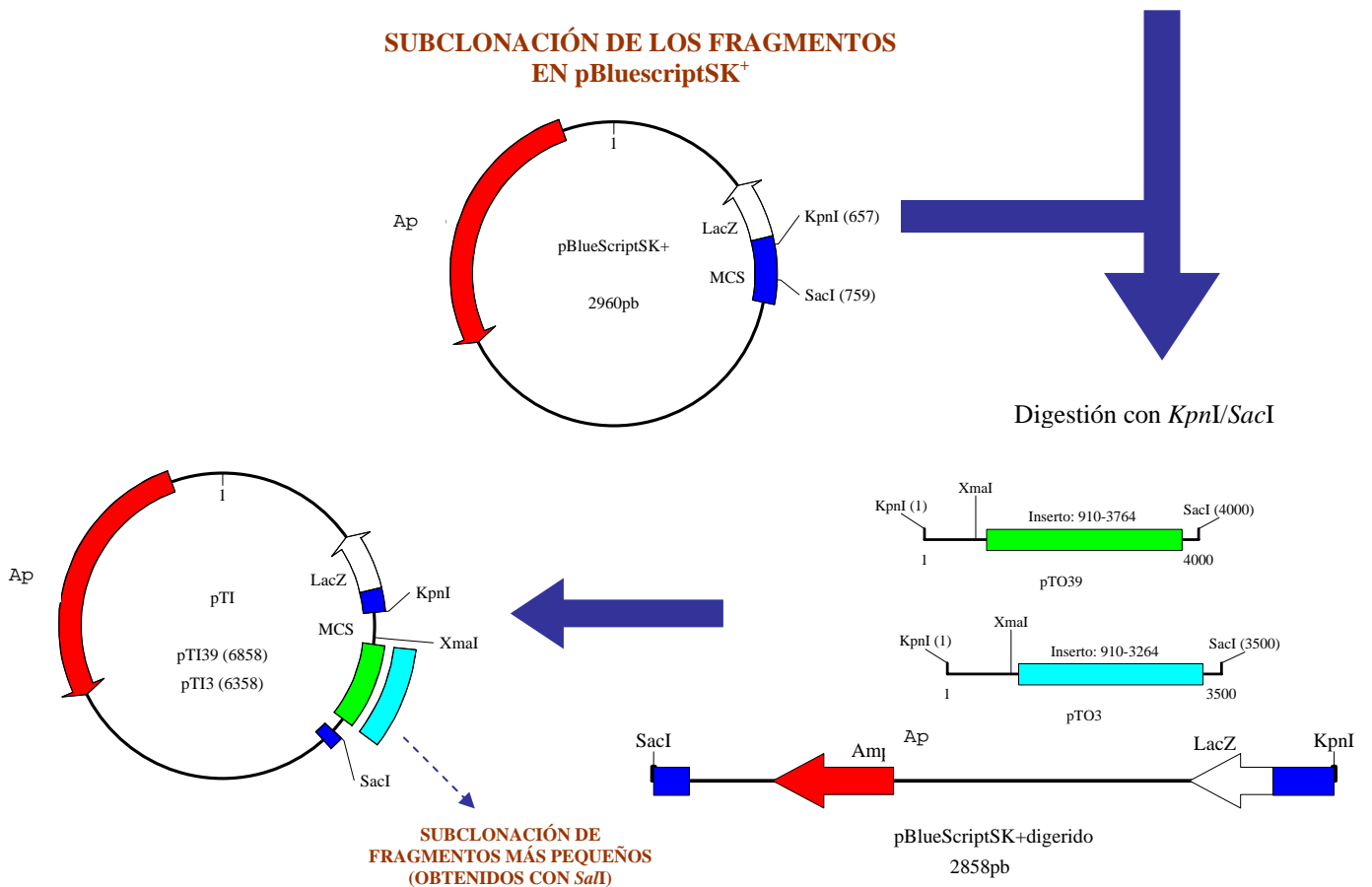
6.7 CARACTERIZACIÓN DE DOS PLÁSMIDOS DEL BANCO

El siguiente esquema muestra los diferentes pasos en el proceso de clonación con el fin de hacer más explícito el procedimiento que se llevó a cabo para la caracterización de los plásmidos del banco.

CLONACIÓN DEL DNA DE *S. mexicanus* EN pIJ702



SUBCLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS EN pBlueScriptSK⁺



Esquema 1: Resumen de los pasos de clonación y subclonación de fragmentos de DNA de *S. mexicanus*.

Para llevar a cabo la caracterización de dos plásmidos del banco, éstos se purificaron de dos clonas elegidas al azar y se recuperó el inserto por digestión con las enzimas *KpnI* y *SacI*, ubicadas a cada lado del sitio *BglII* que se utilizó para clonar pero que no se regeneró (Esquema 1), por lo cual los insertos tienen 1146 pb que corresponden a pIJ702.

En las figuras 17 y 18 se muestran los plásmidos derivados de pIJ702, nombrados pTO39 y pTO3 digeridos con estas enzimas y puede observarse que tienen un inserto de DNA heterólogo de ~4000 y de ~3500 pares de bases respectivamente, de los cuales ~2854 y ~2354 pb corresponden al DNA de *S. mexicanus* respectivamente.

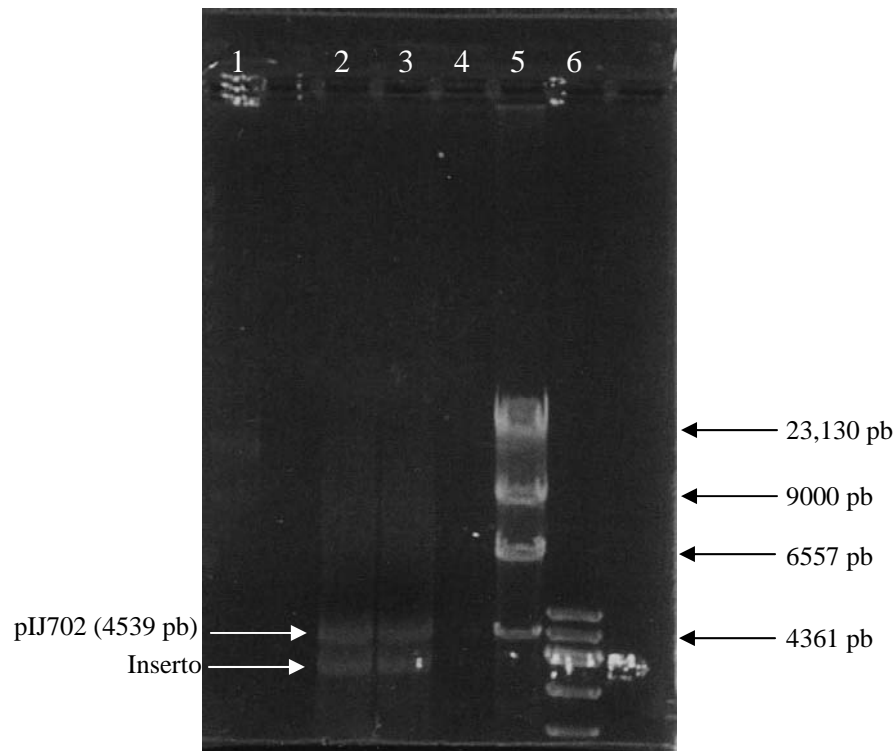


Fig. 17. Digestión del plásmido pTO39 con *KpnI/SacI*.
Carril 1. pTO39 sin digerir
Carriles 2, 3. pTO39 digerido *KpnI/SacI*.
Carril 5. M.P.M. λ -*Hind III* (Roche).
Carril 6. M.P.M. 500 pb (Roche).

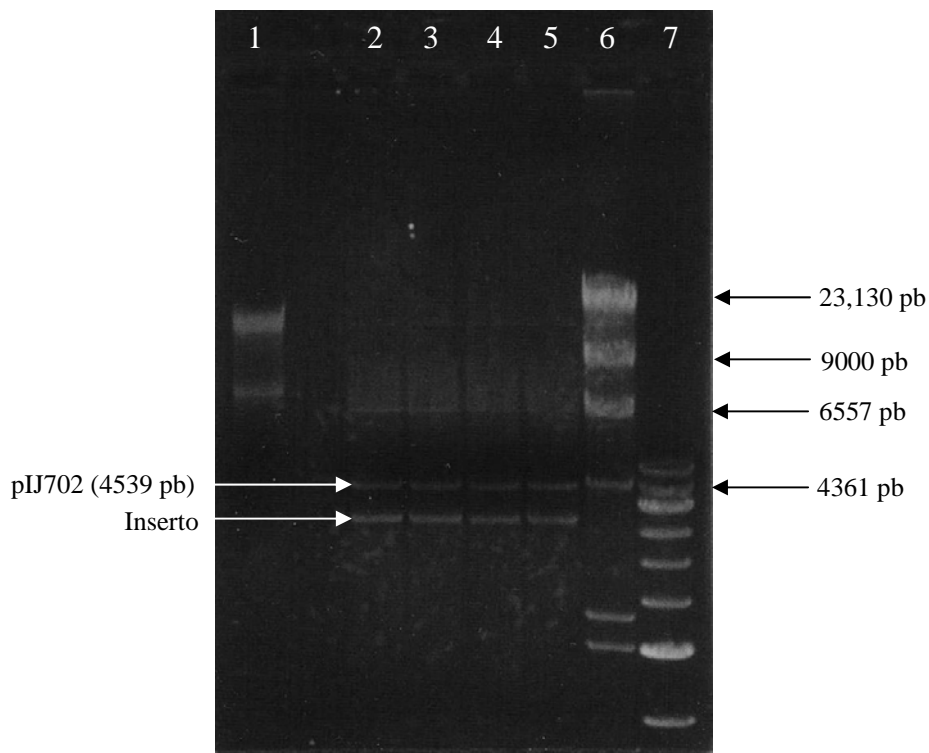


Fig. 18. Digestión del plásmido pTO3 con *KpnI/SacI*.

Carril 1. pTO3 sin digerir

Carriles 2, 5. pTO3 digerido *KpnI/SacI*.

Carril 6. M.P.M. λ -*Hind* III (Roche).

Carril 7. M.P.M. 500 pb (Roche).

6.8 SUBCLONACIÓN DE LOS INSERTOS OBTENIDOS DE LOS PLÁSMIDOS pTO39 Y pTO3 EN pBlueScript SK⁺

Los insertos provenientes de los plásmidos pTO39 y pTO3 se purificaron del gel después de la digestión con *KpnI/SacI* (Fig. 19) y se subclonaron en pBlueScript SK⁺, para purificarlos de *E. coli* TOP10F['] y posteriormente poderlos secuenciar con los oligonucleótidos -21 y reverse. Los plásmidos construidos que contenían los insertos de *S. mexicanus* fueron renombrados pTI39 y pTI3.

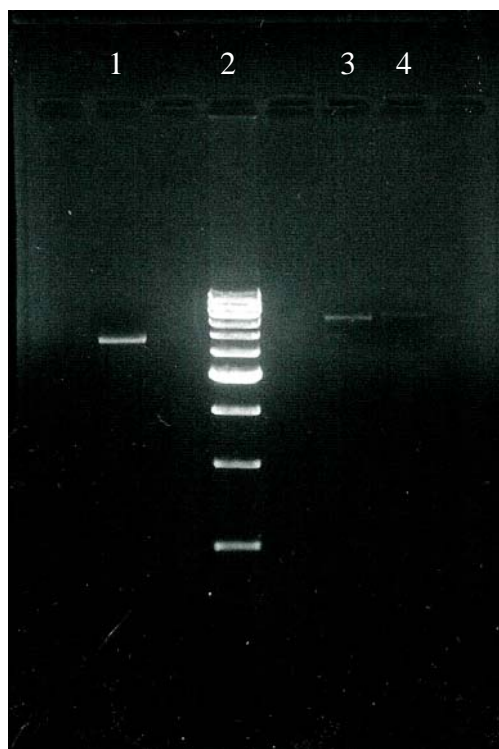


Fig. 19. Purificación de los fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión de pTO39 y pTO3 con *KpnI* y *SacI*.

Carril 1. pBlueScript SK⁺ digerido con *KpnI* y *SacI*

Carril 2. M.P.M. 500 pb (Roche)

Carril 3. Inserto del plásmido pTI3 digerido con *KpnI* y *SacI*

Carril 4. Inserto del plásmido pTI39 digerido con *KpnI* y *SacI*

La secuencia obtenida del plásmido pTI39 con el oligonucleótido reverse fue la siguiente:

1	TCCTCGACGACGGCTCACGGGGCATCGACCCGGACTTCGAACGCGCCAGGACGCCTACA
61	ACGCCAGCGGCGCCGTCCCCTACGTGCTGCGCAGCGTCGAGGAGATCACCGCCTTCTTCG
121	ACGGCCTGGATCTGCTGGAGCCCAGGGTGGTCCCGGTGCCGAGTGGCGCCCGGACGACG
181	ACACGGACCCCGCCGCGCCGGTCCCGTCGCCGAGCACGGCGGCGTCCCGCAAACCCCT
	<i>Bam</i> HI/ <i>Bg</i> III
241	GAGGGCGGCCCTGAGACAAACCCGAGCGCGGATCTACAAGGGCCCGGATACAGGGG
301	CCGGACGGTCACCGACGGCGGGGGCCACCACGGCGCGGTACGGCGGTGACGGTCACGG
361	CGGCGCCATCACGGCGGCGTTACGCCGTGTTTCGTGGACGGCGTCAACTGCATGTGAT
421	GCGCAACGCCGACGGCTCGTGGATCAGCGTCGTGTCAGCCACTACGAGCCGGTGGACACCC
	<i>Sa</i> I <i>Sac</i> I
481	GCGCGCCGCGGCCCGCGCTGCGGT <u>CGACGAGCTC</u>

La secuencia traducida corresponde a una parte del operón *melC* del plásmido pIJ702 (236 aminoácidos, color rojo) y la otra parte perteneciente al inserto de *S. mexicanus* presentó un 62% de identidad con una proteína hipotética conservada de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (SCF 11.05; azul). También tiene identidad con una

proteína hipotética (SAV5890) de *Streptomyces avermitilis* MA-486 (67%) y a una proteína hipotética (SAV5639) de *S. avermitilis* MA-4680 (60%). La secuencia con el oligonucleótido -21 no se llevó a cabo porque hubiera dado como resultado el operón de *melC* que en este extremo se extiende por 910 pb.

Para secuenciar completamente el inserto, el plásmido pTI39 se digirió con *XmaI/KpnI*, con *XmaI* y con *SalI*. Con la doble digestión se obtuvieron 4 fragmentos de aproximadamente 200, 600, 867 y 1800 pb y el pBlueScript SK⁺ con otra parte del inserto. El fragmento de 867 pb (enmarcado con negro en la Fig. 20) corresponde a la región de *melC* liberado con la digestión *KpnI/XmaI*. La digestión con *XmaI* generó 3 fragmentos de aproximadamente 200, 600, 1800 pb (iguales a los de la doble digestión) y el pBlueScript SK⁺ con parte del inserto, mientras que con la digestión con *SalI* se obtuvieron 2 fragmentos de aproximadamente 200 y 800 pb y el plásmido pBlueScript SK⁺ con la mayor parte del inserto (Fig. 20).

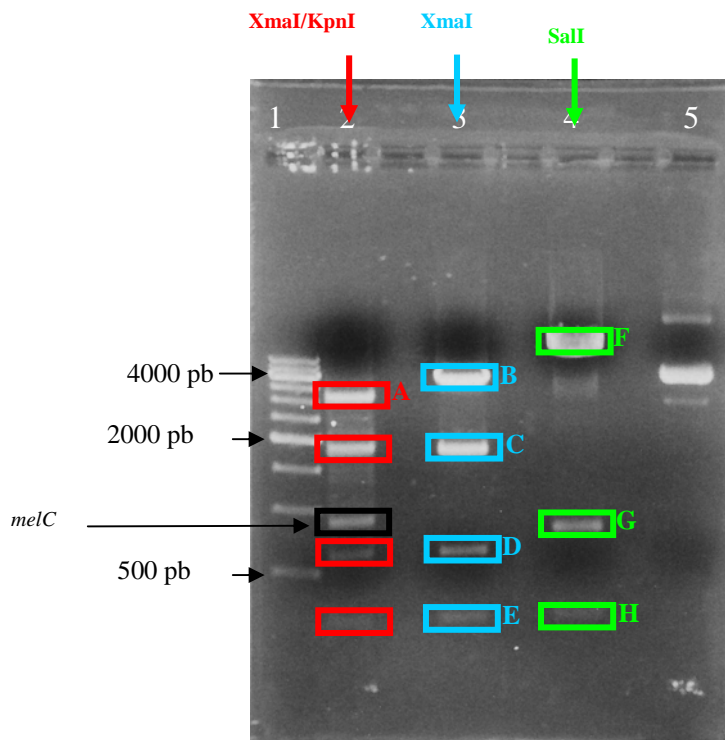


Fig. 20. Fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión de pTI39 con diferentes enzimas de restricción. **Carril 1.** M.P.M. 500 pb (Roche); **Carril 2.** pTI39 cortado con *XmaI/KpnI*; **Carril 3.** pTI39 cortado con *XmaI*; **Carril 4.** pTI39 cortado con *SalI* y **Carril 5.** pTI39 sin digerir.

Algunos fragmentos producto de las digestiones (enmarcadas en la figura 20) se purificaron nuevamente de los geles y se intentaron subclonar en pBlueScript SK⁺ o, en el caso de los que estaban en pBlueScript SK⁺, éstos fueron religados (B y F) (Fig. 21).

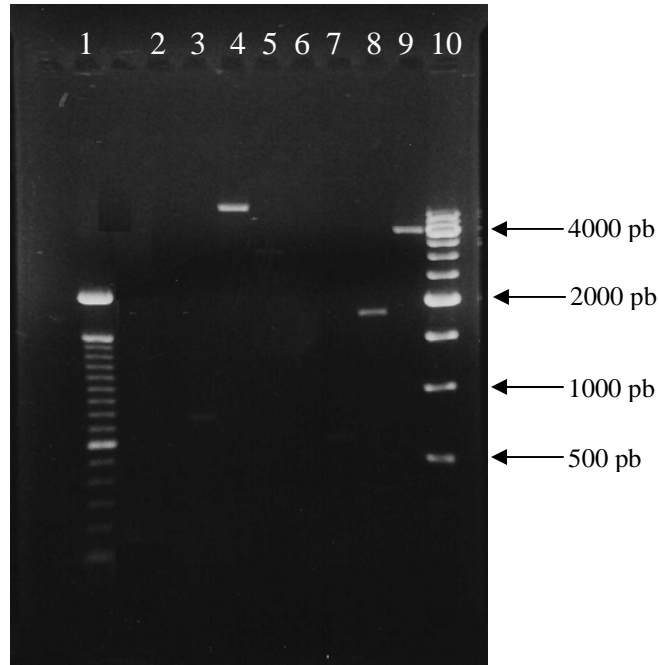


Fig. 21. Fragmentos del plásmido pTI39 purificados del gel.

- Carril 1.** M.P.M. 100 pb (Promega)
- Carril 2.** pTI39 Fr. *SalI* **H**
- Carril 3.** pTI39 Fr. *SalI* **G**
- Carril 4.** pTI39 Fr. *SalI* **F**
- Carril 5.** pTI39 Fr. *XmaI/KpnI* **A**
- Carril 6.** pTI39 Fr. *XmaI* **E**
- Carril 7.** pTI39 Fr. *XmaI* **D**
- Carril 8.** pTI39 Fr. *XmaI* **C**
- Carril 9.** pTI39 Fr. *XmaI* **B**
- Carril 10.** M.P.M. 500 pb (Roche)

Se obtuvieron un gran número de transformantes de *E. coli* TOP10F' con los plásmidos que contenían los fragmentos F, G y H, se purificaron los plásmidos de clonas seleccionadas al azar y se obtuvo la secuencia utilizando los oligonucleótidos -21 y reverse.

El fragmento H que es el más ligero se pudo secuenciar completamente:

	<i>SalI</i>
1	<u>GTCGACT</u> CCCCGGGCCGCGCAGCGCCTACACCGCCGTCTTCCCCGGGCATCGTCACCATCGCC
61	CGCAGCAGCCGCGCCTTCCTGCGCCGCGCCCTGACCCATCTGGTCACCGAGGCGGGCATC
121	CGGCAGTTCCTGGACGTCGGCACC GGCTGCCACC GCGACAACACCCACGAGGTCGCC
	<i>SalI</i>
181	CAGCGCCTCGCACCCGAGTCCCGGATCGTCTAC <u>GTCGAC</u>

La proteína traducida a partir de esta secuencia dio identidad con la misma proteína hipotética conservada SCF 11.05 de *S. coelicolor*, con una identidad del 75% y con otras proteínas como SAV 5639 de *S. avermitilis* (71%) y SAV 5890 del mismo microorganismo.

La secuencia del fragmento G fue la siguiente:

```

1      SalI
      GTCGACAACGACCCGATGGTCCTGGCCCACGCCCGCCCTGCTGTACTCCACCCCGCAG
61     GGCGCCACCGCCTACGTGGACGCCGACGTACGCGACCCCGACCGCATCCTGGCCGCGCC
121    GCGAAGACGCTGGACCTGACCCGTCCCACCGCCCTCGTCCTCAGCAACATCCTCGGCCAC
181    GTCGCCGACCACGACCAGGCGCGGTCCGTGACCCGCTGATGGACGCCCTGCCCTCC
241    GGCAGCCACCTGGTCTCGACGACGGCTCACGGGGCATCGACCCGGACTTCGAACGCGCC
301    CAGGACGCCTACAACGCCAGCGCGCCGTCCCTACGTGCTGCGCAGCGTCGAGGAGATC
361    ACCGCCTTCTTCGACGGCCTGGATCTGCTGGAGCCCGGGTGGTCCCGGTGCCCGAGTGG
421    CGCCCCGACGACGACACGGACCCCGCGCGCCGGTCCCGTCCGCGAAGCACGGCGGGCT
      BamHI/BglII
481    CGCCCGCAAACCTGAGGGCGGCCCTGAGACAAACCCGAGCGCGGATCTACAAGGGCC
541    GCCGGATACAGGGCCGGACGGTCACCGACGGCGGGGCCACCACGGCGGGTTCACGGCG
601    TGACGGTCACGGCGCGGCCATCACGGCGGGGTTACGCCGTGTTCTGAGCGGGCTCGA
661    ACTGCATGTGATGCGCAACGCCGACGGCTCGTGGATCAGCGTCGTCCAGCCACTACGAG
721    CGGTGGACACCCCGCGCGCCGCGCCCGCTGCGGTCGAC
      SalI

```

cuyo producto (sección en azul) dio identidad con la proteína hipotética SCF 11.05 de *S. coelicolor* y una parte del operón de *melC* proveniente de pIJ702 (sección en rojo). La sección azul marcada con negritas es la secuencia que ya había sido obtenida.

El fragmento que quedó en el plásmido religado también fue secuenciado:

```

1      TTCCCTGGTGCAGCTCAGAAACCGGCCGTGCGGGGAGGATGGGGGAGAGCGGCGAGGGG
61     ACGAAGATCGGGCGTTCGGCGGTGCCGGGCGCTCGCCTCAAGACGGACAAGTCTCGTATG
121    TCGCCGGAGCGGTCTCTACTATGCACCCCGAGTAGGTCCCCAGCGGGTGTGACGCATGT
181    CATGCGACCACGCCTCCGGCCGGGGCCAGGCCGCCCGGTGGCGGTGTCGCCGGGCCG
241    GGCGGGGCCGCGCCGGATGTGCGAACGGTCCGGGCGGGGACCGCGCCCGGGATGTCC
301    GAAGTGGGCGTGCAGCGGTACGGCCCTTGGGCGTAGGTTGTCCGCGTCCGACCCCTCTCTG
361    CCCGACGACGACGGACGGTAGCCATGACCCACCCCGGACGACGCCCGAACCGGCGCAG
421    CACCGGACGATCGACAGCTCGGTGCCGCACTCGGCCCGCATCTGGAATACTGGCTGGGC
481    GGCAAGGACAACCTACCCCGTCGAC
      SalI

```

cuyo producto da identidad nuevamente con la misma proteína hipotética mencionada anteriormente.

Arreglando las secuencias de nucleótidos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la proteína SCF 11.05, el gen correspondiente de *S. mexicanus* está completo como se puede observar en la traducción *in silico* que se presenta a continuación:

```

1   TTCCCTGGTGCACGTCAGAAACCGGCCGTGCGGGGAGGATGGGGGAGAGCGGCGAGGGG
1   F P G A T S E T G R A G R M G E S G E G
61  ACGAAGATCGGGCGTTCCGGCGTGCCGGGCGCTCGCCTCAAGACGGACAAGTCTCGTATG
21  T K I G R S G V P G A R L K T D K S R M
121 TCGCCGGAGCGGTCTCTACTATGCACCCCGAGTAGGTCCCCCAGCGGGTGTGACGCATGT
41  S P E R S L L C T P S R S P S G C D A C
181 CATGCGACCACGCTCCGGCCGGGGCCAGGCCGCCCGCGGTGGCGGTCTGCGGGGCCG
61  H A T T P P A G A R P P A V A V V P G P
241 GGCGGGGCCGCGCCGGGATGTGCGAACGGGTCCGGGGCGGGGACC GCGCCCGGGATGTCC
81  G G A A P G C A N G S G R G T A P G M S
301 GAAGTGGGCGTGC GCGGTACGGCCCTTGGGCCGTAGGTTGTCCGCGTCGGACCCTCTCTG
101 E V G V R G T A L G P *
361 CCCGCACGACGACGGACGGTAGCCATGACCCACCCCGCGACGACGCCCGAACCGGCGCAG
121 M T H P A T T P E P A Q
421 CACCGGCAGATCGACAGCTCGGTGCCGCACCTCGGCCCGCATCTGGAAC TACTGGCTGGGC
141 H R Q I D S S V P H S A R I W N Y W L G
481 GGCAAGGACAACTACCCCGTTCGACGTCGACTCCCGGGCCGGCGACGCCTACACCGCCGTC
161 G K D N Y P V D V D S R A G D A Y T A V
541 TTCCCCGGCATCGTCACCATCGCCCGCAGCAGCCGCGCCTTCTGCGCCCGCCCTGACC
181 F P G I V T I A R S S R A F L R R A L T
601 CATCTGGTTCACCGAGGCGGGCATCCGGCAGTTCCTGGACGTCGGCACCGGCCTGCCACC
201 H L V T E A G I R Q F L D V G T G L P T
661 GCGACAACACCCACGAGGTCGCCAGCGCCTCGCACCCGAGTCCCGGATCGTCTACGTC
221 A D N T H E V A Q R L A P E S R I V Y V
721 GACAACGACCCGATGGTCTTGGCCCACGCCGCGCCCTGCTGTACTCCACCCCGCAGGGC
241 D N D P M V L A H A R A L L Y S T P Q G
781 GCCACCGCCTACGTGGACGCGGACGTACGCGACCCCGACCGCATCCTGGCCGCGCCGCG
261 A T A Y V D A D V R D P D R I L A A A A
841 AAGACGCTGGACCTGACCCGTCACCCGCCCCTCGTCCCTCAGCAACATCCTCGGCCACGTC
281 K T L D L T R P T A L V L S N I L G H V
901 GCGACCACGACACGAGCGCGGTCCGTGCTGACCCGCTGATGGACGCCCTGCCCTCCGGC
301 A D H D Q A R S V V T R L M D A L P S G
961 AGCCACCTGGTCTCTGACGACGGCTCACGGGGCATCGACCCGGACTTCGAACGCGCCAG
321 S H L V L D D G S R G I D P D F E R A Q
1021 GACGCTACAACGCCAGCGGGCGCCGTCCCCCTACGTGCTGCGCAGCGTCGAGGAGATCACC
341 D A Y N A S G A V P Y V L R S V E E I T
1081 GCCTTCTTCGACGGCCTGGATCTGCTGGAGCCCGGGTGGTCCCGGTGCCCGAGTGGCGC
361 A F F D G L D L L E P G V V P V P E W R
1141 CCCGACGACGACACGGACCCCGCCGCGCCGGTCCCGTCCGCGAGCACGGCGGGCGTCGCC
381 P D D D T D P A G A G P V A E H G G V A
1201 CGCAAACCTGAGGGCGGCCCTGAGACAAACCCCGAGCGCG
401 R K P *

```

De la secuencia podemos observar que la primera parte corresponde a otro gene cuyo producto no presenta identidad con proteínas de *Streptomyces*, probablemente

porque está incompleto. Marcado en color naranja se muestra la proteína completa que presenta identidad con la SCF 11.05 de *S. coelicolor*.

Por otro lado, el inserto contenido en el plásmido pTI3 también fue primero secuenciado en sus extremos. La secuencia con el oligonucleótido reverse fue:

1	GGCCAGCAGCACGGGGACGAGGACCACTCCGAGCGTCACATGCACACCTTGGGTCAGCCG
61	TACAGCCAGTACGGGTGCGTGGGCCAGGCCAAGAGGTAGAAACCCAGCAGGCCCTTGTCG
121	GGGGTCTGGTCGTTGAGGCGCCCCAGGTCCGGGTTGTACGAGGCGTAGGAGAGCATCCCC
181	GTGACGAAGATCAGCGGGATGCCGATCAGCAGCACCAGCCCCGAACACGGACGTCAGCCAC
241	GGTCCCGGAGGGGACTGCGCCAGAATCCGGGCCGGAACGGACCGCGGGGGAGTGCTCC
	<i>Bam</i> HI/ <i>Bg</i> III
301	CTGCCCGCCGCGCAAGATCCCGGATCTAGATCTACAAGGGCCCGGATACAGGGGCCGG
361	ACGGTCACCGACGGCGGGGGCCACCACGGCGCGGTACGGCGGTGACGGTCACGGCGGC
	<i>Bam</i> HI/ <i>Bg</i> III
421	GGCCATCACGGCGCGGTTACGCCGTTCGTGGACGGCGTCAACTGCATGTGATGCGC
481	AACGCCGACGGCTCGTGGATCAGCGTCGTACGCCACTACGAGCCGGTGGACACCCCGCGC
	<i>Sal</i> I <i>Sac</i> I
541	GCCGCGGCCCGCGCTGCGGTGACGAGCTC

El producto correspondiente a la parte de color rojo da identidad con una sección del operón de *melC* de pIJ702 y la región azul presenta una identidad del 77% con una probable proteína de membrana (SCH22A.24c) de *S. coelicolor* A3(2), con la proteína hipotética SAV 4570 de *S. avermitilis* MA-4680 (77%) y con una proteína hipotética Rv0281 de *Mycobacterium tuberculosis* H3 (55%).

La secuencia con el oligonucleótido -21 no se llevó a cabo porque hubiera dado como resultado el operón de *melC* que en este extremo se extiende por 910 pb.

Para secuenciar completamente el inserto, el plásmido pTI3 se digirió con *Xma*I/*Kpn*I, con *Xma*I y con *Sal*I. La digestión con *Xma*I/*Kpn*I dio 3 fragmentos de aproximadamente 800, 1400, 2100 pb y el pBlueScript SK⁺ con parte del inserto (aproximadamente 4100 pb). El fragmento de 867 pb corresponde a la región de *melC* del plásmido pIJ702.

En la digestión con *Xma*I se obtuvieron 2 fragmentos de aproximadamente 1400 pb (igual al obtenido con la doble digestión), 3500 pb y el plásmido pBlueScript SK⁺ con una parte del inserto (aproximadamente de 4500 nucleótidos).

En la digestión con *Sal*I se obtuvieron 2 fragmentos de 200 y 2100 pb (igual que el originado por la doble digestión) y el plásmido pBlueScript SK⁺ con una parte muy pequeña correspondiente al genoma de *S. mexicanus* (Fig. 22).

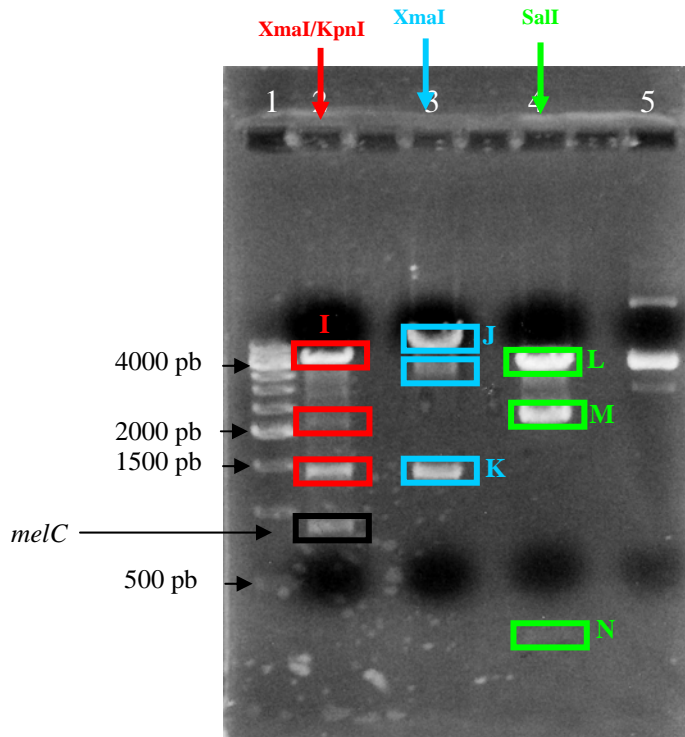
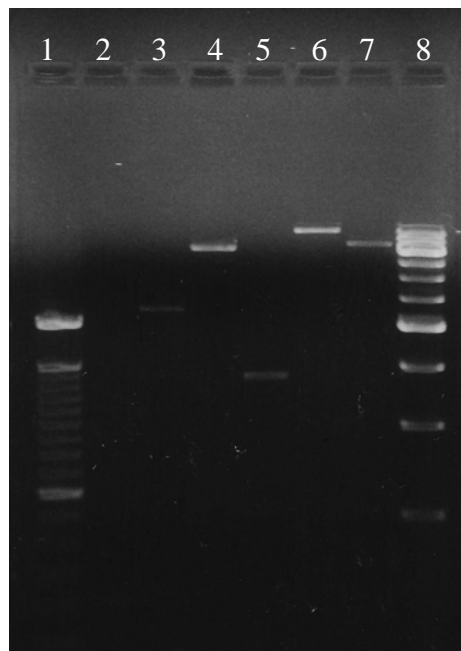


Fig.22. Fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión de pTI3 con diferentes enzimas de restricción. **Carril 1.** M.P.M. 500 pb (Roche); **Carril 2.** pTI3 cortado con *XmaI/KpnI*; **Carril 3.** pTI3 cortado con *XmaI*; **Carril 4.** pTI3 cortado con *SalI* y **Carril 5.** pTI3 sin digerir.

Nuevamente los fragmentos enmarcados y asignados con una letra (Fig. 22) fueron recortados, purificados del gel y subclonados en pBlueScript SK⁺ ó religados en el caso de pBlueScript SK⁺ que tiene parte del fragmento (J y L) (Fig. 23).



Carril 1. M.P.M. 100 pb (Promega)
Carril 3. pTI3 Fr. *SalI* M
Carril 4. pTI3 Fr. *SalI* L
Carril 5. pTI3 Fr. *XmaI* K
Carril 6. pTI3 Fr. *XmaI* J
Carril 7. pTI3 Fr. *XmaI-KpnI* I
Carril 8. M.P.M. 500 pb (Roche)

Fig.23 Fragmentos del plásmido pTI3 purificados del gel.

Las secuencias que se obtuvieron fueron las del fragmento M. La secuencia del fragmento M con el oligonucleótido reverse y que está contenida en la secuencia anterior (negrita) fue:

```

1      CCAGTACGGGTGCGTGGGCCAGGCGAAGAGGTAGAAACCAGCAGGCCCTTGTCGGGGGT
61     CTGGTCGTTGAGGCGCCCCAGGTCGGGTTGTACGAGGCGTAGGAGAGCATCCCCGGTGAC
121    GAAGATCAGCGGGATGCCGATCAGCAGCACCAGCCCAGAACACGGACGTGACCCACGGTCC
181    GCGGAGGGGACTGCGCCAGAATCCGGGCCGGAACCGGACCGGGCGGCGGGGAGTGCTCCC
      BamHI/BglII
241    TGCCCGCCGCGCAAGATCCCGATCTACAAGGGCCGCGGATACAGGGCCGGACGGTAC
301    CGACGGCGGGGGCCACCACGGCGCGGTACGGCGGTGACGTACGGCGGCGGCCATCAC
361    GGCGGCGGTTACGCCGTGTTCTGTGGACGGCGTGAAGTGCATGTGATGCGCAACGCCGAC
421    GGCTCGTGGATCAGCGTCTGTCAGCCACTACGAGCCGGTGGACACCCCGCGCGCCGCGCC
      SalI
481    CGCGCTGCGGTGCGAC

```

cuyo producto presenta un 75% de identidad con la misma probable proteína de membrana SCH22A.24c de *S. coelicolor* A3(2) y con SAV 4570 de *S. avermitilis* MA-4680 (75%), entre otras. También da identidad con *melC* que corresponde al plásmido pIJ702 (rojo).

La secuencia de mismo fragmento por el otro extremo da como resultado la siguiente secuencia:

```

      SalI
1      GTCGACGCCGAGCGCGAACACTCCGCGGCACAACAGCGCCCGGCACAGCCGGCCCGGTCC
61     GCAACCGACGTCGAGAACGGGGCCGACACAGCGATCGAGCACCGATTTCGTGCGCCACGGT
121    GGGGTGGGCGAACAGCGGTGCACGGGCATCACGATCCGTCTCCCGTCCGCCAGCCTCAG
181    ATACACCGGACCGTGGCCGCCCCGAGGGCGAGGGCGTAAGGATCGTCGCTCGCGCGAGA
241    GGAGCGGTTCCCGTCCGGTCTCATGGCGGGCACCGTGACTTGACGCAGGCCGCTCCTCG
301    CCGCGCGGTGGATACGCCGAGGCGGGCGGAGCCGGAAGGCGAACGCGACGGCGGACGCC
361    AGGAAGAGCACGGCGGTTATGGCCAGCCACCGGCCGAGGTAGACGTGATGGACAGCCCG
421    GTGGCACCCGGATAGGGCGTGGACAGGGCGAAGACGAGGGGAACCAGACGAGCAGCAGCA
481    CACCGGAGAGGAAGCGGGCACGCGAAGGTAGTTGATCCACGGTGGGTGCGGCAGGCGGGT
541    GGCACGGTGTGCGCAGCACCGCCGGTGCCGACTGGTGGCGAGCGAGTACAGCGGGCAGCA
601    GG

```

cuyo producto presenta una identidad del 57% con una probable proteína de membrana SCH22A.22 de *S. coelicolor* A3(2). También tiene identidad con SAV 4571 de *S. avermitilis* MA-4680 (60%) y una posible lipoproteína de *S. coelicolor* A3(2) (57%).

La traducción *in silico* de estos fragmentos se presentan a continuación:

```
1   CGGGATCTTGCGCGGCGGGCAGGGAGCACTCCCCCGCCGGTCCGTTCCGGCCCCGATTCT
1   G S C A A G R E H S P A G P F R P G F W
61  GGCGCAGTCCCCTCCGCGGACCGTGGCTGACGTCCGTGTTCCGGGCTGGTGTGCTGATCG
21  R S P L R G P W L T S V F G L V L L I G
121 GCATCCCGCTGATCTTCGTACCGGGATGCTCTCCTACGCCTCGTACAACCCGGACCTGG
41  I P L I F V T G M L S Y A S Y N P D L G
181 GGCGCCTCAACGACCAGACCCCGACAAGGGCCTGCTGGGTTTCTACCTCTTCGCCTGGC
61  R L N D Q T P D K G L L G F Y L F A W P
241 CCACGCACCCGTAAGTGGCTGTACGGCTGACCCAAGGTGTGCATGTGACGCTCGGAGTGGT
81  T H P Y W L Y G *
301 CCTCGTCCCCGTGCTGCTGGCC
```

que corresponde a uno de los extremos del plásmido y que da identidad con la proteína SCH22A.24c de *S. coelicolor*.

```
1   CCTGCTGCCCCGTGTAAGTTCGCTCGCCGACCGTCCGGCACCAGTCCGGCACCAGGCGGTGCTGCGACACCGTG
1   C C P L Y S L A D Q S A P A V L R H R A
61  CCACCCGCCTGCCGCACCCACCGTGGATCAACTACCTTCGCGTGCCCGCTTCCTCTCCGG
21  T R L P H P P W I N Y L R V P A S S P V
121 TGTGCTGCTGCTCGTCTGGTTCCCCTCGTCTTCGCCCTGTCCACGCCCTATCCGGGTGCC
41  C C C S S G S P R L R P V H A L S G C H
181 ACCGGGCTGTCCATCGACGTCTACCTCGGCCGGTGGCTGGCCATAACCGCCGTGCTCTTC
61  R A V H R R L P R P V A G H N R R A L P
241 CTGGCGTCCGCCGTGCGTTCGCTTCGGGCTCCGCCGCTGCGGCGTATCCACCGCGCC
81  G V R R R V R L P A P P P A A Y P P R R
301 GGCGAGGAGCGGCCTGCGTCAAGTACGGTCCCGCGCCATGACGACCGGACGGGAACCGCT
101 R G A A C V K S R C R A M T T D G N R S
361 CCTCTCGCGCGAGCGACGATCCTTACGCCCTCGCCCTGCGGGCCGGCCACGGTCCGGTGT
121 S R A S D D P Y A L A L R A G H G P V Y
421 ATCTGAGGCTGGCGGACGGGAGACGGATCGTGATGCCCGTGCACCGCTGGTTCGCCCACC
141 L R L A D G R R I V M P V H R W F A H P
481 CCACCGTGGCCGACGAATCGGTGCTCGATCGTGTGTCGGCCCCGTTCTCGACGTCGGTT
161 T V A D E S V L D R C V G P V L D V G C
541 GCGGACCGGGCCGGCTGTGCCGGGCGCTGTTGCGCCGCGGAGTGTTCGCGCTCGGCGTCG
181 G P G R L C R A L L R R G V F A L G D S
601 AC
```

que corresponde al producto con identidad a la proteína SCH22A.22 de *S. coelicolor*.

6.9 RECONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pTI39 BASADA EN LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS FRAGMENTOS SUBCLONADOS

De acuerdo a las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de los nucleótidos de los insertos del plásmido pTI39, se pudo establecer el orden de los fragmentos obtenidos con *SalI* (Fig. 24) y se puede observar que el gen correspondiente a la proteína hipotética SCF 11.05 está completo (271 aminoácidos).

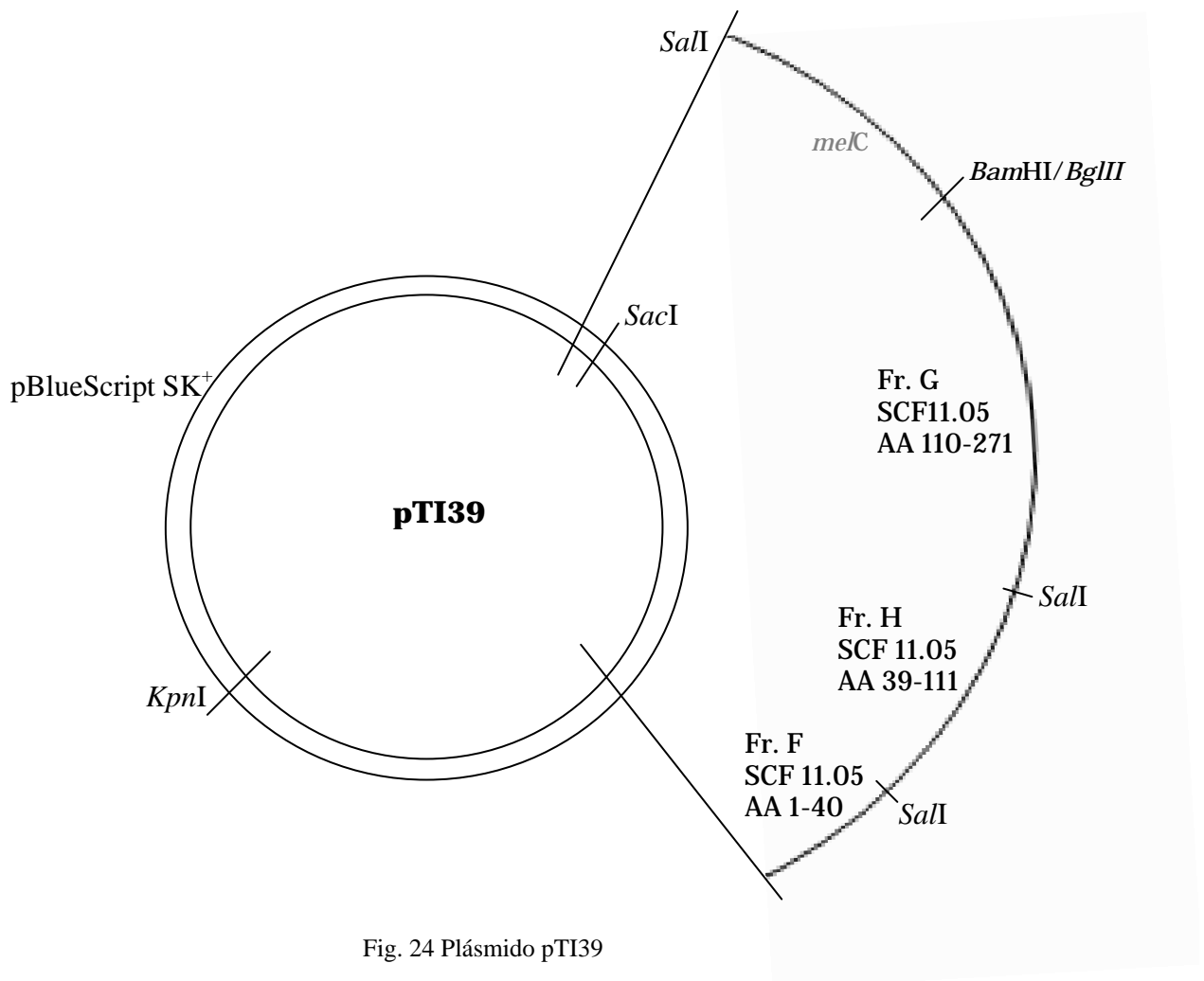


Fig. 24 Plásmido pTI39

La proteína SCF11.05 es una proteína hipotética de *S. coelicolor* A3(2), registrada también con el número SCO0525 y abarca del nucleótido 557029 al 557844, por lo que está ubicada en el brazo izquierdo del cromosoma de este microorganismo. Está flanqueada por una probable gluconolactonasa (SCO0524) y una probable oxidoreductasa (SCO0526) (Fig. 25).

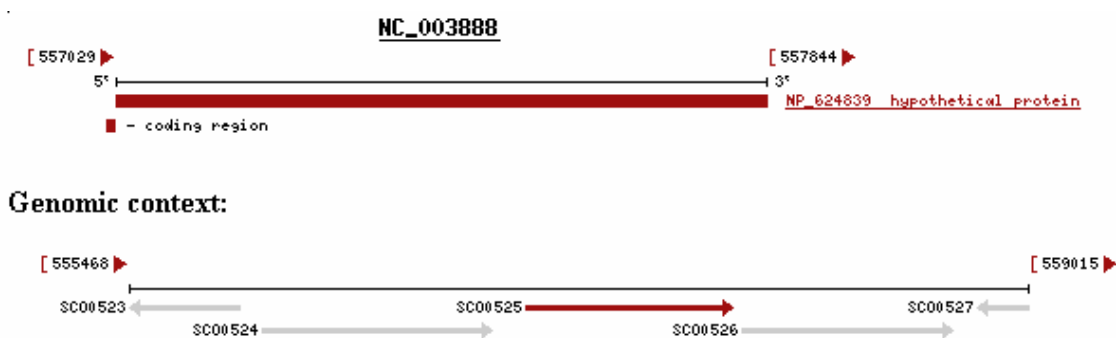


Fig. 25 Contexto genómico de SCF11.05 en el genoma de *S. coelicolor* A3(2).

6.10 RECONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pTI3 BASADA EN LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LOS SUBFRAGMENTOS

El orden de los fragmentos del plásmido pTI3 se muestra en la figura 26 y como puede observarse, el gen de la probable proteína de membrana de *S. mexicanus* (correspondiente a la proteína SCH22A.24c) no está secuenciado completamente. Esta proteína SCH22A.24c de *S. coelicolor* A3(2) es una probable proteína de membrana registrada también con el número SCO3746 y abarca del nucleótido 4116154 al 4116440 y esta flanqueada en un lado por una probable proteína integral de membrana (SCO3747) y en el otro por un gen que codifica a una proteína pequeña la cual es una probable lipoproteína (SCH22A.22 ó SCO3745); de este lado se encuentra también la probable proteína SCH22A.22 (SCO3744) (Fig. 27).

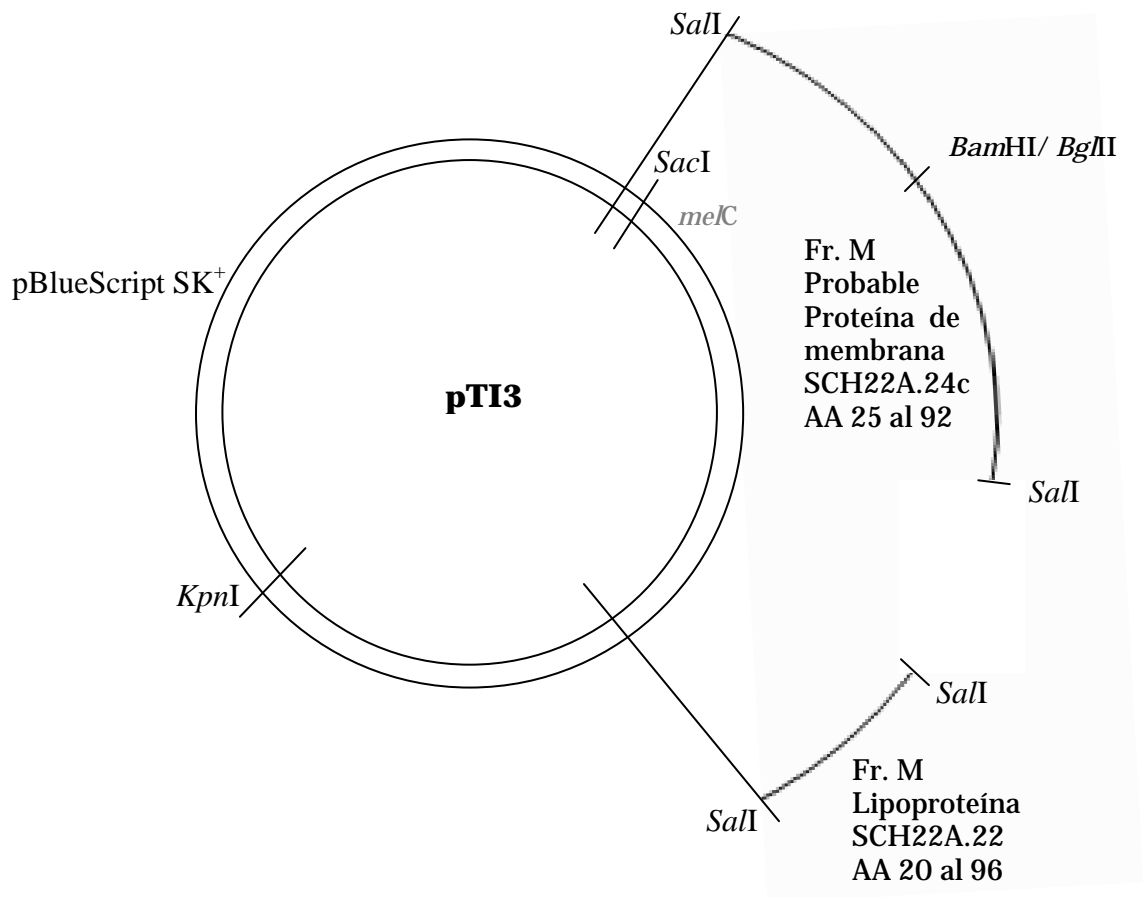


Fig. 26 Plásmido pTI3

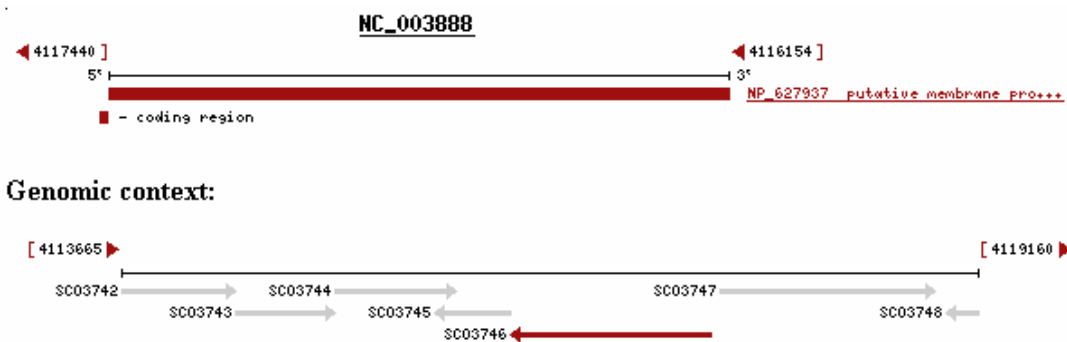


Fig. 27 Contexto genómico de SCH22A.24c y SCH22A.22 en el genoma de *S. coelicolor* A3(2)

7. DISCUSIÓN

Los actinomicetos y en particular los *Streptomyces* son microorganismos considerados importantes desde el punto de vista biotecnológico, porque producen una gran cantidad de enzimas y compuestos de interés industrial [35, 36, 38, 39]. Es por esto que se aisló *Streptomyces mexicanus* como un potencial productor de xilanasas ya que no produce celulasas [51], característica importante si se pretenden usar estas enzimas en el blanqueo del papel. Sin embargo al intentar clonar los genes correspondientes a las xilanasas [51], primero amplificando fragmentos que cubren zonas conservadas para posteriormente usarlos como sondas, no fue posible. Como tampoco se pudo identificar por hibridización con dos sondas provenientes de los 2 principales genes de xilanasas de *S. lividans*.

Por estas razones, se intentó la construcción de un banco de genes de *S. mexicanus* utilizando como hospedero a *Streptomyces lividans* pero se requería una mutante que no produjera xilanasas. En este sentido se consiguió la mutante 10-164 (donada por el Dr. D. Kluepfel de la Universidad de Quebec, Canadá) que es xilanasacelulasa negativa y que había sido utilizada para la clonación de los genes correspondientes a estas enzimas del mismo *S. lividans* [31].

Así, primero se extrajo y purificó el DNA de *S. mexicanus* siguiendo la metodología usada en el laboratorio para otros *Streptomyces* [32] y aunque estaba puro no se podía transformar, no solo en *S. lividans* sino tampoco en *Escherichia coli*, por lo que se tuvo que repurificar repetidas veces para eliminar cualquier contaminación que estuviera afectando la ligación o la transformación. Esto nos da una idea de los problemas, que no se reportan, a los que cualquiera se puede enfrentar cuando se trabaja con una cepa nueva aunque ya esté identificada.

Otra dificultad fue al momento de intentar formar los protoplastos de la mutante 10-164 de *S. lividans*, ya que a pesar de estar reportada la metodología general para *Streptomyces* y en especial para esta especie [1, 31], el comportamiento de la mutante en diferentes medios fue totalmente distinto al que presenta la cepa silvestre. Nuevamente se tuvo que enfrentar con problemas que no se reportan y que a veces son muy difíciles de resolver, por lo que hay que invertir mucho tiempo en ir averiguando cuales son las variables que pueden influir en el resultado final.

La importancia de la construcción de un banco de genes es incuestionable aunque en la actualidad hay toda una serie de metodologías que permitirían obviarlo, sin embargo en un trabajo anterior [51] fue imposible amplificar un gen o un fragmento de un gen utilizando oligonucleótidos reportados para las regiones conservadas de las xilanasas. Esto nos puede indicar que las enzimas de *S. mexicanus* o no son xilanasas verdaderas, es decir, que son proteínas con otra actividad principal y que pueden actuar sobre xilano o que son xilanasas poco comunes que no se parecen a las ya reportadas, inclusive de otros *Streptomyces*.

Por lo que respecta al banco construido en este trabajo, se comprobó que con el número de clonas recombinantes obtenidas (con fragmentos que tienen un tamaño promedio de 4800 pb) se encuentra representado el genoma de *S. mexicanus*, de acuerdo a la probabilidad reportada por Sambrook y colaboradores [33].

Se llevó a cabo la secuenciación de dos plásmidos elegidos al azar de la genoteca de *S. mexicanus* los cuales mostraron tener alto contenido de G+C en un rango de 70-73%. Además las secuencias mostraron tener identidad con *S. coelicolor* A3(2) y con *S. avermitilis*. Las secuencias de los fragmentos del plásmido pTI3 muestran que el orden de los genes en *S. mexicanus* se mantiene con otras especies de estreptomicetos.

8. CONCLUSIONES

- ✚ El DNA de *Streptomyces mexicanus* purificado bajo estas condiciones contiene contaminantes que dificultaron su clonación y por lo tanto la transformación de la mutante 10-164 de *Streptomyces lividans*.
- ✚ Las condiciones de crecimiento, formación y transformación de protoplastos deben ser estandarizadas para cada cepa o mutante que se este utilizando. En el presente trabajo se establecieron las condiciones y se elaboró un protocolo para la formación y transformación de la cepa mutante 10-164 de *S. lividans*.
- ✚ La mutante 10-164 de *S. lividans* esporula en líquido bajo las condiciones descritas.
- ✚ La preparación del polietilenglicol 1000 es crítica para la transformación de los protoplastos de *Streptomyces*.
- ✚ Los fragmentos clonados y secuenciados pertenecen al genoma de *Streptomyces mexicanus*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kieser, T., Bibb M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation. Capítulo I.
- [2] Glazer, A. N. & Nikaido, H. 1995. *Microbial Biotechnology*. W. H. Freeman and Co. USA. Pp: 72-75.
- [3] Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. & Sackin, M. J. 1983. *Numerical clasification of Streptomyces and related genera*. J. Gen. Microbiol. 129: 1743.
- [4] Hodgson D. A. 2000. *Primary metabolism and its control in Streptomyces: A most unusual group of bacteria*. Adv. Microb. Physiol. 42: 47-207.
- [5] Gehring, A. M., Nodwell, J. R., Beverley, S. M. & Losick, R. 2000. *Genome wide insertional mutagenesis in Streptomyces coelicolor reveals additional genes involved in morphological differentiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9642-9647.
- [6] Chater, K. F. 1989. *Towards an understanding of gene switching in Streptomyces, the basis of sporulation and antibiotic production*. Proc. R. Soc. Lond. B. 235: 121-138.
- [7] Granozzi, C., Billeta, B., Passantino, R., Sollazzo, M. & Pugli, A. M. 1990. *A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in Streptomyces coelicolor A3(2)*. J. Gen. Microbiol. 136: 713-716.
- [8] Méndez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. 1985. *Role of substrate mycelium in colony development in Streptomyces*. Can. J. Microbiol. 31: 446-450.
- [9] Chater, K. F. 1993. *Genetic differentiation in Streptomyces*. Ann. Rev. Microbiol. 47: 685-713.
- [10] Gray, D. I., Gooday, G. W. & Prosser, J. I. 1990. *Apical hyphal extension in Streptomyces coelicolor A3(2)*. J. Gen. Microb. 136: 1077-1084.
- [11] Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 1997. *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall Upper Saddle River. USA. Cap. 3. Pp: 70-75.
- [12] Petrosyan, P., García-Varela M., Luz-Madriral, A., Huitrón, C. & Flores, M. E. 2003. *Streptomyces mexicanus sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 269-273.
- [13] Tillotson, R. D., Wösten, H. A. B., Richter, M. & Willey, J. M. 1998. *A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus Schizophillum commune restores the capacity of a bald mutant of the filamentous*

bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. 1998. Mol. Microbiol. 30: 595-602.

[14] Wildermuth, H. 1970. *Development and organization of the aerial mycelium in Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol. 60: 43-50.

[15] Braña, A. F., Méndez, C., Díaz, L. A., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. 1986. *Glycogen and trehalose accumulation during colony development in Streptomyces antibioticus*. J. Gen. Microbiol. 132: 1319-1326.

[16] Wright, F. & Bibb, M. J. 1992. *Codon usage in G+C-rich Streptomyces genome*. Gene. 113: 55-65.

[17] Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. & Chen, C. W. 1993. *The chromosomal DNA of Streptomyces lividans 66 is linear*. Mol. Microbiol. 10: 923-933.

[18] Yang, C. C., Huang, C. H., Li, C. Y., Tsay, Y. G., Lee, S. C. & Chen, C. W. 2002. *The terminal proteins of linear Streptomyces chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins*. Mol. Microbiol. 43: 297-305.

[19] Huang, C. H., Lin, Y. S., Yang, Y. L., Huang, S. W. & Chen, C. W. 1998. *The telomeres of Streptomyces chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures*. Mol. Microbiol. 43: 905-926.

[20] Gravius, B., Glocker, D., Pandza, K., Hranueli, D. & Cullum, J. 1994. *The 387 kb linear plasmid pPZG101 of Streptomyces rimosus and its interactions with the chromosome*. Microbiology 28: 2271-2277.

[21] Lezhava, A. L., Mizukami, T., Kajitani, T., Kameoka, D., Redenbach, M., Shinkawa, H., et al. 1995. *Physical map of the linear chromosome of Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 28: 6492-6498.

[22] Leblond, P., Fischer, G., Francou, F., Berger, F., Guerineau, M. & Decaris, B. 1996. *The unstable region of Streptomyces ambofaciens includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA*. Mol. Microbiol. 28: 261-271.

[23] Pandza, K., Pfalzer, G., Cullum, J. & Hranueli, D. 1997. *Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of Streptomyces rimosus lies close to one end of the linear chromosome*. Microbiology 28: 1493-1501.

[24] Kieser, T., Hopwood, D. A., Wright, H. M. & Thompson, C. J. 1982. *pIJ101, a multi-copy broad host-range Streptomyces plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors*. Mol. Gen. Genet. 185: 223-235.

- [25] Yamamoto, H., Hotta, K., Okami, Y. & Umezawa, H. 1982. *Mechanism of resistance to aminoglycoside antibiotics in nebramycin-producing Streptomyces tenebrarius*. J. Antibiot. 35: 1020-1025.
- [26] Sugiyama, M., Mochizuki, H., Nimi, O. & Nomi, R. 1981. *Mechanism of protection of protein synthesis against streptomycin inhibition in a producing strain*. J. Antibiot. 34: 1183-1187.
- [27] Gusek, T. W. & Kinsella, J. E. 1992. *Review of the Streptomyces lividans/vector pIJ702 system for gene cloning*. Crit. Rev. Microbiol. 18: 247-260.
- [28] Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. & Morosoli, R. 1995. *A cellulase/xylanase-negative mutant of Streptomyces lividans 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins*. Mol. Microbiol. 17: 367-377.
- [29] Elliot, M. A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M. J., Cohen, S. N., Kao, C. M. & Buttner, M. J. 2003. *The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in Streptomyces coelicolor*. Genes Dev. 17: 1727-1740.
- [30] Sánchez, A. 2003. *Caracterización Electroforética de las Xilanasas, Carboximetilcelulasas, Pectinasas y Proteasas de Streptomyces mexicanus. sp. nov.* Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.
- [31] Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. & Kluepfel, D. 1986. *Cloning of the xylanase gene of Streptomyces lividans*. Gene. 49: 323-329.
- [32] Hunter, I. S. 1985. *DNA Cloning*. D. M. Glover ed. IRL PRESS. Washington, D. C. Pp: 32-33.
- [33] Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Pp: A.6, B.16 y B.17.
- [34] *Promega Protocols and Applications Guide*. Promega corporation. 1991.
- [35] Harvey, A. 2000. *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. Drug Discovery Today. 5: 294-300.
- [36] Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. & Wohlleben, W. 2003. *Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes*. J. Biotech. 106: 221-232.
- [37] Martin, J. F. & Liras, P. 1989. *Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites*. Annu. Rev. Microbiol. 43: 173-206.

- [38] Crark, A. M. 1996. *Natural products as a resource of new drugs*. Pharm. Res. 13: 1133-1144.
- [39] Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. 2001. *How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?*. Arch. Microbiol. 176: 386-390.
- [40] Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M. & Handelsman, J. 2004. *Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes*. Environ. Microbiol. 6: 981-989.
- [41] Dekleva, M. L. & Strohl, W. R. 1988. *Biosynthesis of ϵ -rhodomycinone from glucose by Streptomyces C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes*. Can. J. Microbiol. 34: 1235-1240.
- [42] Novotna, J. & Hostalek, Z. 1985 *Phosphorylation of hexoses in Streptomyces aureofaciens: evidence that the phosphoenolpyruvate:sugar:phosphotransferase system is not operative*. FEMS Microbiol. 28: 347-350.
- [43] Cochrane, V. W. 1961. *Physiology of actinomycetes*. Ann. Rev. Microbiol. 15: 1-26.
- [44] Titgemeyer, P., Walkenhorst, J. & Reizer, J. 1995. *Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system in three Streptomyces species*. Microbiology. 141:51-58.
- [45] Postman, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. 1993. *Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria*. Microbiol. Rev. 57: 543-594.
- [46] Roth, M., Neigenfind, M., Bormann, E. J. & Noack, D. 1986. *Use of chemostat for selection of Streptomyces hygrosopicus mutants altered in regulation of maltose utilization*. Biotechnol. Lett. 8: 479-484.
- [47] Grafe, U., Bormann, E. J., Roth, M. & Neigenfind, M. 1986. *Mutants of Streptomyces hygrosopicus deregulated in amylase and α -glucosidase formation*. Biotechnol. Lett. 8: 615-620.
- [48] Magasanik, B. & Neidhart, F. C. 1987. *Regulation of Carbon and Nitrogen Utilization in Escherichia coli and Salmonella tiphymurium*. F. C. Neidhardt ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C. Pp: 1318-1325.
- [49] Braña, A. F. & Demain, A. L. 1988. *Nitrogen Control of Antibiotic Biosynthesis in Actinomycetes*. In: *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*. CRC Press, Boca Raton. Fl, USA. Pp: 99-119.

- [50] Vitale, L., Turk, V. & Pokorny, M. 1980. *Hydrolytic enzymes complex from Streptomyces rimosus*. Period. Biol. 82: 485-490.
- [51] Burgos, M. *Clonación y secuenciación de probables peptidasas de Streptomyces mexicanus sp. nov.* Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.
- [52] Panek, A. D. 1995. *Trehalose metabolism--new horizons in technological applications*. Braz. J. Med. Biol. Res.28: 169-81.
- [53] Ferguson, A., Mitchell, M. & Elbein, A. 1973. *Trehalose metabolism in germinating spores of Streptomyces hygroscopicus*. J. Bacteriol. 116: 1084-1085.