



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS Y REGULACIÓN
DE LA REGIÓN *sco2127* DE *Streptomyces
coelicolor***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA)**

P R E S E N T A

YOLANDA GUADALUPE GARCIA HUANTE

TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MÉXICO, D.F.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Sergio Sánchez Esquivel** en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria; Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en mayo de 2010.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente:	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario:	Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente:	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM
Suplente:	Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM

Tutor:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Sustentante:

Yolanda Guadalupe García Huante

∞ DEDICATORIAS ∞

- * A ustedes **mamá** y **papá**, por su ejemplo de lucha ante la vida, por los valores que me han inculcado y por formar parte fundamental de ese motorcito que me intensiva a seguir avanzando. Gracias por todos los consejos que ustedes me han dado, y por apoyarme a lo largo de vida.
- * A mis hermanos, **Liss y Alex** por todo su apoyo y porque son los mejores hermanos que me pudieron haber tocado.

∞ AGRADECIMIENTOS ∞

- Al **Dr. Sergio Sánchez Esquivel**, por sus consejos, confianza y apoyo incondicional. Además por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.
- A los integrantes del comité tutorial: **Dra. Elizabeth Langley** y **Dra. Maricarmen Quirasco Baruch**, por sus aportaciones al proyecto y a mi formación profesional.
- Al **Dr. Adán Chávez** y a la **Dra. Beatriz Ruiz**, por las observaciones y sugerencias académicas que me hicieron al realizar este trabajo.
- A la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja**, por sus valiosos comentarios y su apoyo para concluir este trabajo.
- Al jurado de examen, por todas las contribuciones aportadas para mejorar este trabajo.
- **A mis compañeros del InDRE:** Yola, Don Mario, Olga, América, Ara Zavala, Ara “chiquita”, Ricardo, Toño, Juan, por compartir conmigo su tiempo y conocimientos durante el tiempo que estuve colaborando con ellos.
- **A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial:** Diana, Alba, Tania, Tere, Anita, Cecy, Rich, Mauri, Hugo, José Perea, Chucho, Caty, Fore, Brenda, Mariana, Oliver, Silvia, Daniel, Allan, Alex, por generar un ambiente de armonía en el laboratorio y por compartir varios momentos de diversión.
- **A mis amigas y amigos de toda la VIDA**, con los que aún sigo compartiendo momentos muy lindos de camaradería: Tona, Isabel, Ivón, Ana, Norma, Ada, Ely, Jou, Beto, Jacob, Isra, Armando y José Hegel. **A todos gracias!!!**

ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Generalidades sobre los actinomicetos	4
2.2 Generalidades del género <i>Streptomyces</i>	4
2.3 Generalidades de <i>Streptomyces coelicolor</i>	5
2.4 Represión catabólica por fuente de carbono	6
2.5 Modelo de RCC en <i>E. coli</i>	7
2.6 Mecanismo de RCC en <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.7 Mecanismo de RCC en el género de <i>Streptomyces</i>	9
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Métodos utilizados para la producción de anticuerpos	15
6.1.1 Producción y purificación de SCO2127-His ₆	15
6.1.2 Elaboración de anticuerpos monoclonales	15
6.1.3 Preparación de geles SDS-PAGE	15
6.1.4 Transferencia y revelado Western-blot	15
6.2 Métodos de Biología molecular	16
6.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos	16
6.2.2 Clonación de la región promotora de <i>sco2127</i> en pGEM-T easy	17
6.2.3 Clonación de la región promotora de <i>sco2127</i> en pIJ8660	19
6.2.4 Introducción de pIJ8627 en <i>S. coelicolor</i> M145	19
6.3 Métodos microbiológicos y bioquímicos	19
6.3.1 Cinéticas de crecimiento	19
6.3.1.1 Preparación del preinóculo	20

ÍNDICE GENERAL (continuación)

	PÁG.
6.3.1.2 Determinación de pH	20
6.3.1.3 Determinación de sustrato residual	20
6.3.1.4 Cuantificación de proteína	22
6.3.2 Expresión de <i>sco2127</i> en <i>S. coelicolor</i> M145	22
6.3.3 Expresión de <i>sco2127</i> en <i>S. coelicolor</i> M145 transformada con pIJ8627 (SMP27)	22
7. RESULTADOS	22
7.1. Producción de anticuerpos monoclonales anti-SCO2127	22
7.1.1 Clonación	26
7.2 Determinación de la síntesis de la región <i>sco2127</i>	31
7.3. Determinación de la síntesis de <i>sco2127</i> utilizando a la proteína verde fluorescente, Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), como gen reportero	36
7.3.1 Amplificación de la región promotora de <i>sco2127</i>	36
7.3.2. Clonación del promotor en el plásmido pGEM	37
7.3.3 Expresión de la EGFP	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	49
10. PERSPECTIVAS	49
11. REFERENCIAS	50
ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO	55
ANEXO B. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SCO2127-His₆	57
ANEXO C. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI- SCO2127	58
ANEXO D. ELECTRO-TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i>	60
ANEXO E. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA	61

ÍNDICE GENERAL (continuación)

	PÁG.
ANEXO F. LISADO DE CÉLULAS POR SONICACIÓN	65
ANEXO G. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)	66
ANEXO H. WESTERN-BLOT	69
ANEXO I. PESO SECO	71
ANEXO J. DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES POR LA TÉCNICA DE FENOL-SULFÚRICO	71
ANEXO K. MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS	72

INDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	5
Figura 2. Modelo de represión catabólica por carbono (RCC) en <i>E. coli</i>	8
Figura 3. Modelo de represión catabólica por carbono (RCC) en <i>B. subtilis</i>	9
Figura 4. Modelo propuesto de represión catabólica por carbono (RCC) en el género <i>Streptomyces</i>	10
Figura 5. Fragmento de 2.9 kb obtenido a partir de la digestión del cósmido SC6E10 de <i>S. coelicolor</i> empleando la enzima <i>BclI</i> .	11
Figura 6. Secuencia de la región comprendida por ORF1 y parte del ORF2	17
Figura 7. Secuencia correspondiente a parte de las regiones de ORF1 (sco2128) y de ORF2 (sco2127)	18
Figura 8. Ciclo de PCR por gradiente que se utilizó para determinar la temperatura de alineamiento a la que se obtiene mayor cantidad de producto amplificado	18
Figura 9. Gel SDS-PAGE de la purificación de SCO2127	23
Figura 10. Transferencia y revelado western-blot para identificar a SCO2127, mediante un anticuerpo anti-His	23
Figura 11. Prueba de ELISA de los títulos de anticuerpos de los sueros de los ratones inmunizados con SCO2127-His ₆	24
Figura 12. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos producidos por las clonas mediante un western blot	29
Figura 13. Transferencia y revelado western blot para identificar a SCO2127 en condiciones nativas	30
Figura 14. Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> M145 en presencia de 50 mM y 100 mM de glucosa	32
Figura 15. Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> M145 en presencia de 50 mM y 100 mM de manitol	33
Figura 16. Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> M145 en presencia de 50 mM y 100 mM de glutamato	34
Figura 17. Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> M145 en presencia de 50 mM y 100 mM de arabinosa	35
Figura 18. Gel de agarosa al 2% para visualizar el producto de PCR de la región promotora de SCO2127 para ser clonada en el plásmido pIJ8660	36

INDICE DE FIGURAS (continuación)

	PÁG.
Figura 19. Gel de agarosa al 2% de la digestión con EcoRI para liberar el producto de PCR del plásmido pGEM	37
Figura 20. Gel de agarosa al 2% de la región promotora de sco2127 purificado a partir de gel utilizando el kit Qiagen®	38
Figura 21. Digestión del plásmido pIJ8660 utilizando las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>XbaI</i> . MPM: Marcador de peso molecular	38
Figura 22. Gel al 0.8% de agarosa que muestra el plásmido pIJ8660 purificado utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction de Qiagen®	39
Figura 23. Digestión del plásmido pIJ8627 extraído de cuatro diferentes colonias de <i>E. coli</i> DH5α utilizando las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>XbaI</i>	40
Figura 24. Miniprep realizado para extraer el plásmido pIJ8627 a partir de colonias de <i>E. coli</i> ET12567	40
Figura 25. Gel de agarosa al 0.8%, que muestra las digestiones realizadas al plásmido pIJ8627 extraído de <i>E. coli</i> ET12567	41
Figura 26. Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo monoclonal anti-GFP contra extractos proteicos de tres exconjugantes SMP27 cultivadas 48 h en medio NMMP con 100 mM de Glc	42
Figura 27. Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo monoclonal anti-GFP contra extractos proteicos de los cultivos de SMP27 obtenidos a las 24 y 32 h de crecimiento 50 mM y 100 mM de Glc, Mtl, Ara y Glu	42
Figura 28. Posible mecanismo de acción de SCO2127	48

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. RCC para la producción de antraciclinas en <i>S. peucetius</i> var. <i>Caesius</i>	12
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas	16
Tabla 3. Plásmidos utilizados	16
Tabla 4. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 1 de los sobrenadantes de los hibridomas	25
Tabla 5. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 2 de los sobrenadantes de los hibridomas	25
Tabla 6. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 3 de los sobrenadantes de los hibridomas	26
Tabla 7. Prueba de ELISA realizado a la clonación del pozo 3H9	27
Tabla 8. Resultados del ELISA realizado a la clonación del pozo 3C5	27
Tabla 9. Resultados del ELISA realizado a la clonación del pozo 3E3	27
Tabla 10. Resultados del ELISA realizado a la subclonación del pozo 3H9-H9	28
Tabla 11. Resultados del ELISA realizado a la subclonación del pozo 3H9-H9	28
Tabla 12. Parámetros cinéticos de <i>S. coelicolor</i> M145	36

TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
RCC	Represión catabólica por fuente de carbono
Glc	Glucosa
Mtl	Manitol
Ara	Arabinosa
Glu	Glutamato
cAMP	Adenosil monofosfato cíclico
Glk	Glucosa cinasa
PTS	Sistema de fosfotransferasa
TF's	Factores transcripcionales
EGFP	Proteína verde fluorescente de fluorescencia aumentada
MDH	Manitol deshidrogenasa
GOD	Glucosa oxidasa
POD	Peroxidasa
LGDH	Glutamato deshidrogenasa
wt	Cepa de tipo silvestre

RESUMEN

Varias especies del género *Streptomyces* producen metabolitos secundarios de importancia industrial, como antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, etc. Sin embargo, su síntesis se ve inhibida por fuentes de carbono que son fácilmente metabolizables como la glucosa, fenómeno conocido como represión catabólica por fuente de carbono (RCC). *Streptomyces coelicolor*, es la cepa mejor caracterizada a nivel genético de éste género. En ella se ha establecido que la enzima glucosa cinasa (Glk) juega un papel central en el mecanismo de la RCC. Por otra parte, mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, que muestran deficiencias tanto en Glk como en el transporte de glucosa e insensibilidad a RCC, al ser transformadas con el gen *glkA* de *S. coelicolor*, recuperan su sensibilidad a RCC así como la actividad de Glk pero no el transporte. Adicionalmente, al transformar dichas mutantes con una región ubicada río arriba de *glkA*, denominada *sco2127*, se restituye tanto la Glk como el transporte de glucosa a niveles similares o mayores a los de la cepa original y la cepa se hace supersensible a la RCC. Con el fin de conocer la dinámica de síntesis de la expresión de *sco2127* y su posible correlación con el fenómeno de RCC, en este trabajo se practicaron análisis de tipo western blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-SCO2127, a extractos proteicos intracelulares de *S. coelicolor* M145 obtenidos a diferentes horas de crecimiento en medio mínimo con 50 mM (condición no represora) y con 100 mM (condición represora) de glucosa. Asimismo, también se evaluaron las siguientes fuentes de carbono: manitol, arabinosa y glutamato. Se observó que a 50 y 100 mM de glucosa, manitol y arabinosa, la síntesis de SCO2127 ocurrió durante toda la fermentación, pero no así en glutamato. Nuestros resultados sugieren que SCO2127 se encuentra involucrado en el catabolismo de carbohidratos pero no de glutamato. Asimismo, la expresión de la región *sco2127* parece ser dependiente de la concentración de glucosa y de manitol presente en el medio. Este resultado correlaciona bien con la función que se ha conferido a SCO2127 como facilitador del catabolismo de glucosa, sin embargo también podría ser una proteína necesaria para formar las señales responsables del consumo de carbohidratos para ejercer la RCC en el género *Streptomyces*.

1. INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son organismos pertenecientes al orden de los Actinomycetales que poseen un alto contenido de GC en su genoma, alrededor del 60 al 70% (Kieser y col., 2000), forman micelio aéreo cuando crecen en un medio de cultivo sólido y poseen la capacidad de formar esporas.

El género *Streptomyces* pertenece a este orden y es de gran interés para la industria debido a que varias especies tienen la capacidad de producir metabolitos con actividad de tipo antibacteriana, antifúngica, herbicida, antitumoral, entre otras. Una de las especies mejor caracterizada a nivel genético es *S. coelicolor*, la cual produce al menos cuatro metabolitos secundarios, entre los que se encuentra: la actinorrodina, la undecilprodigiosina, la metilenomicina y un antibiótico dependiente de Ca^{+2} .

Sin embargo, la producción de varios metabolitos secundarios se ve reprimida por el fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono (RCC), que ocasiona la inhibición de genes necesarios para metabolizar fuentes de carbono secundarias, y que es causada por la presencia de sustratos carbonados que pueden ser metabolizados fácilmente, como es el caso de la glucosa.

Los mecanismos de RCC mayormente estudiados son los de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En ambas especies el sistema de fosfotransferasa (PTS), es el encargado de ocasionar la RCC, el cual involucra un mecanismo global y varios mecanismos regulatorios operón-específicos tales como: la exclusión del inductor y la prevención de la inducción, mientras que en el género de *Streptomyces*, el sistema PTS no parece jugar un papel importante para ocasionar dicho fenómeno.

Por otro lado, en *Streptomyces coelicolor* se ha visto que la Glucosa cinasa (Glc) juega un papel clave para generar RCC, y que el producto proteico SCO2127 está involucrado en este mecanismo regulatorio, ya que en mutantes Dog^R de *S. coelicolor* A3(2), insensibles a RCC, cuya actividad de Glc y transporte de glucosa se encuentran disminuidos, al ser transformadas con *glkA* la actividad de la Glc se restauró por completo pero no así la RCC, mientras que al ser transformadas de manera simultánea con *glkA* y *sco2127*, la sensibilidad por RCC se restauró por completo, pensando así que *sco2127* codifica para una proteína involucrada en la activación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa o en el

transporte de la misma. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de SCO2127, estimada a partir del DNA, no presenta dominios de unión al ADN, ni parece codificar para la permeasa de glucosa ni para alguna hexoquinasa (Angell y col., 1992). Asimismo, recientemente se ha encontrado que SCO2127 tiene la capacidad de unirse a proteínas involucradas en la diferenciación morfológica temprana de *S. coelicolor* (Chávez y col., en preparación).

Por lo anterior y dado la importancia industrial que presentan los metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces*, cuya síntesis se ve muchas veces reprimida por el fenómeno de RCC, y en virtud de nuestro desconocimiento sobre la síntesis y regulación de *sco2127*, el interés de este trabajo es conocer si la síntesis de SCO2127 se lleva a cabo en un tiempo determinado del crecimiento o si se encuentra de alguna manera regulada por la presencia de glucosa u otras fuentes de carbono diferentes a ésta y conocer un poco más acerca de la naturaleza de SCO2127 y de la fisiología de este género.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades sobre los actinomicetos

Los actinomicetos son organismos pertenecientes al orden de los Actinomycetales que poseen un alto contenido de GC en su genoma, alrededor del 60 al 70% (Kieser y col., 2000), forman micelio aéreo cuando crecen en un medio de cultivo sólido y poseen la capacidad de formar esporas. La mayoría de los actinomicetos son bacterias encontradas en el suelo que tienen un papel importante en los procesos de mineralización de la naturaleza. Además, constituyen un grupo muy importante de bacterias, debido a que más del 50% de los antibióticos son producidos por ellos (Demain, 2006). Asimismo, estas bacterias pueden ser clasificadas en diferentes géneros, de acuerdo a criterios morfológicos, físicos y químicos. Los actinomicetos poseen paredes celulares del tipo I al IV, dependiendo de la presencia de ácido L-diaminopimérico (DAP) y de glicina (tipo I), meso-DAP y glicina (tipo II), meso-DAP (tipo III), o meso-DAP, arabinosa y galactosa (tipo IV), (Goodfellow, et al 1992).

2.2 Generalidades del género *Streptomyces*

Los estreptomicetos son un género de bacterias Gram-positivas (Embley y Stackebrandt, 1994), que presentan varias similitudes con los hongos, pues ambos crecen formando hifas para dar origen a un micelio vegetativo, el cual origina hifas aéreas que emergen desde la colonia al aire, las cuales a su vez se diferencian para dar paso a estructuras especializadas de reproducción llamadas esporas (Fig. 1). Al igual que los hongos, muchos *Streptomyces* viven como saprófitos en el suelo, sin embargo pueden habitar en un amplio rango de nichos, tanto terrestres como acuáticos. Por otro lado, la gran diversidad y riqueza del metabolismo secundario de *Streptomyces*, ha hecho que estos microorganismos sean invaluable proveedores de antibióticos y otras moléculas bioactivas. La producción de éstos compuestos se encuentra coordinada con las etapas de desarrollo en que el microorganismo se encuentre (Flårdh & Buttner, 2009), pues muchos de ellos son producidos durante la transición del crecimiento vegetativo al miceliar, por lo que el paso del metabolismo primario al secundario no solo se debe a las diferenciaciones bioquímicas complejas sino que también coincide con un proceso de diferenciación morfológica (Chater, 1993).

Por lo anterior, las especies pertenecientes al género *Streptomyces* han llegado a ser microorganismos de gran importancia industrial, y tanto la producción de metabolitos

secundarios como la diferenciación morfológica son iniciadas como respuesta a la limitación de nutrientes y otras señales (Flärdh & Buttner, 2009).

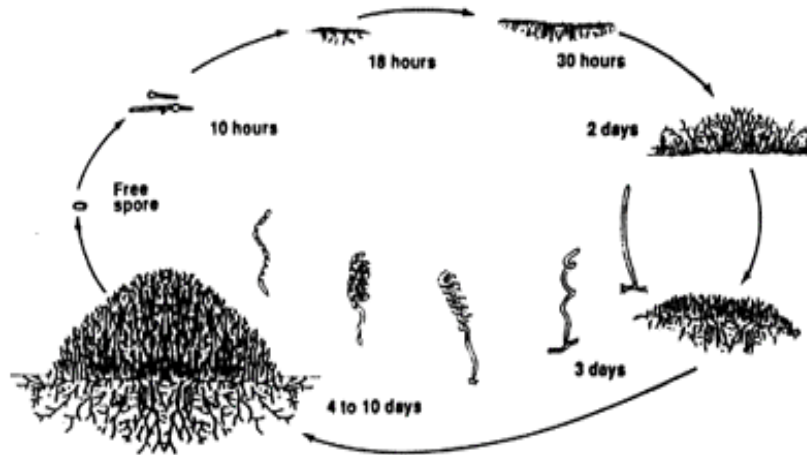


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces* (Kieser y col., 2000).

2.3 Generalidades de *Streptomyces coelicolor*

Una de las especies de *Streptomyces* mejor estudiadas a nivel genético y con un mapa cromosómico muy bien caracterizado es *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Goodfellow y col., 1992). El genoma de *S. coelicolor* es un cromosoma lineal de 8,667,507 pb con la presencia de 7,825 genes probables, dentro de los cuales se incluyen más de 20 *clusters* implicados en la síntesis de metabolitos secundarios.

Como otros miembros del orden de Actinomycetales, los estreptomicetos tienen un ciclo de vida complejo. Se piensa que la diferenciación tanto morfológica como fisiológica y el inicio de la producción de metabolitos secundarios resultan de elementos comunes de regulación (Bibb, 1996). Así, algunos estudios han demostrado que mutantes incapaces de esporular son también incapaces de regular la producción de metabolitos secundarios (Hopwood y col., 1995; Pope y col., 1998). *S. coelicolor* A3(2) produce al menos cuatro metabolitos secundarios: actinorrodina, undecilprodigiosina, metilenomicina y un antibiótico dependiente de calcio (CDA) (Hobbs y col., 1992).

Los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de precursores del metabolismo primario. Durante el ciclo de vida de este microorganismo, el proceso de esporulación se presenta cuando el crecimiento se ve deteriorado por la carencia de oxígeno, nutrientes o por otros factores ambientales. Es en este punto del ciclo de vida donde los metabolitos secundarios

comienzan a producirse (Martín y Demain, 1980). Al contrario de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento de los microorganismos que los producen (Vining, 1992), ni poseen un papel vital en el metabolismo, sin embargo, les proporcionan ventajas competitivas a los mismos (Beppu, 1992).

2.4 Represión catabólica por fuente de carbono

Los procesos por los cuales la expresión de genes se enciende y se apaga a diferentes tiempos y bajo diferentes condiciones se conocen como expresión de la regulación genética. Las células regulan la expresión de sus genes por varias razones, una de ellas es el ahorrar la energía requerida para sintetizar RNA's y proteínas que no son necesarias en un tiempo determinado de su crecimiento, otra de ellas es evitar la expresión de productos génicos que puedan interferir con procesos celulares que se estén realizando al mismo tiempo y como parte de procesos del desarrollo.

Las bacterias deben ser capaces de adaptarse a una amplia variedad de condiciones ambientales para sobrevivir, por lo tanto, deben utilizar los nutrientes que estén disponibles en el ambiente en el cual se desarrollan, los cuales pueden llegar a ser escasos o nulos. Además, deben competir contra otros organismos por los mismos nutrientes, y una competencia efectiva pueden lograrla al tener la capacidad de utilizar dichos nutrientes de manera eficiente o utilizar otros, con los cuales alcancen velocidades de crecimiento altas y así conseguir aumentar su población respecto a los demás organismos presentes. Asimismo, ya que compuestos diferentes pueden estar disponibles para ser utilizados como fuentes de carbono y energía, las bacterias deben ser capaces de seleccionar la fuente de carbono que puedan utilizar eficientemente ignorando el resto, evitando así el gasto de energía en sintetizar enzimas que no sean necesarias para el empleo de la misma.

La presencia de fuentes de carbono preferenciales, como lo es la glucosa, evitan la expresión y la actividad de sistemas catabólicos que permiten el uso de sustratos secundarios, regulación llamada represión catabólica por fuente de carbono (RCC) (Görke y Stülke, 2008). La RCC se controla a varios niveles, incluyendo el nivel de expresión transcripcional y el de la actividad de algunas de sus proteínas (Brückner & Titgemeyer, 2002). Este mecanismo está presente en varios sistemas microbianos y asegura una utilización de las fuentes de carbono de forma

organizada y secuencial, cuando más de una de ellas se encuentra presente en el medio de cultivo (Saier 1991). Los mecanismos responsables de la RCC en los microorganismos son complejos y diversos y probablemente existen sistemas diferentes en un solo organismo. En *Saccharomyces cerevisiae*, la represión por glucosa involucra a varios activadores transcripcionales, represores, cinasas y ha sido propuesta una cascada de fosforilación de proteínas, en donde la hexoquinasa PII tiene un papel clave en la activación de la RCC (Trumbly, 1992).

En procariontes, los mecanismos de RCC mayormente estudiados y mejor entendidos son los de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En ambas especies la RCC involucra un mecanismo global y varios mecanismos regulatorios operón-específicos tales como: la exclusión del inductor y la prevención de la inducción.

2.5 Modelo de RCC en *E. coli*

Las principales moléculas involucradas en la RCC en *E. coli* son la proteína activadora de catabolitos (CAP), el AMP cíclico (cAMP), la adenilato ciclasa y la enzima EIIAGlc, perteneciente al sistema de fosfotransferasa (PTS). La RCC es llevada a cabo por la modulación del estado de la fosforilación de EIIAGlc. En presencia de glucosa o de otros carbohidratos, el fosfato de la EIIAGlc se transfiere a los azúcares. La disponibilidad del donador de fosfato del sistema PTS, el fosfoenolpiruvato (PEP), es también importante. Si la relación de PEP y piruvato es alta, entonces la proteína EIIAGlc estará en su forma fosforilada. Cuando las células de *E. coli* crecen en medios que contienen fuentes de carbono que se metabolizan rápidamente como la glucosa, entonces la enzima EIIAGlc se encontrará en su forma no fosforilada. La EIIAGlc fosforilada ejerce su efecto regulatorio activando a la adenilato ciclasa, la cual sintetiza cAMP a partir de ATP. Una vez que el cAMP ha sido sintetizado, éste se une a la CAP, la cual es su proteína receptora, y el complejo cAMP-CAP activa la transcripción de varios genes y operones catabólicos (Fig. 2). Resulta interesante que el complejo cAMP-CAP no solo media la RCC de genes codificantes para proteínas, sino también de pequeños RNA's regulatorios no codificantes, tales como Spot42 y CyaR en *E. coli* (Görke y Stülke, 2008).

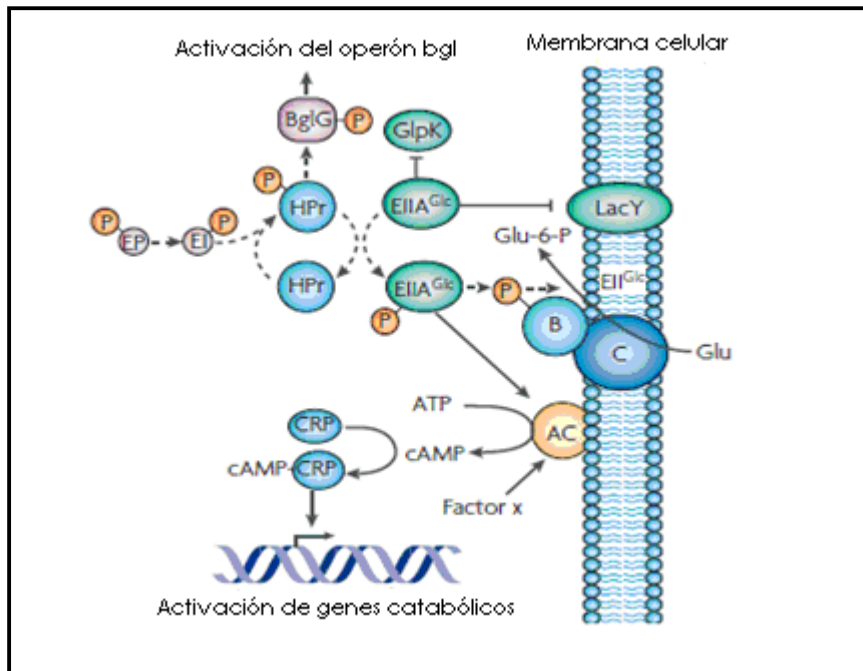


Figura 2. Modelo de represión catabólica por carbono (RCC) en *E. coli* (Görke y Stülke, 2008).

2.6 Mecanismo de RCC en *Bacillus subtilis*

En *B. subtilis* el mecanismo de RCC es diferente al que se presenta en bacterias Gram (-) (Fig. 3). Las moléculas clave involucradas en este proceso son: el factor pleiotrópico de la transcripción *ccpA* (proteína A del control catabólico), la proteína HPR del sistema PTS, la proteína bifuncional cinasa/fosfatasa de HPR (HPRK/P) y los intermediarios glicolíticos fructosa-1,6-bisfosfato y glucosa-6-fosfato (Görke y Stülke, 2008). A diferencia de *E. coli*, la proteína HPR del sistema PTS puede ser fosforilada en dos sitios, en el residuo de His 15 y en el residuo de Ser 45, que es lo que indica el estado nutricional de la célula. La forma en que se lleva a cabo es la siguiente: la enzima EI cede el grupo fosfato obtenido del PEP a la HPR, fosforilándola en el residuo Histidina 15 (HPR-His), la cual es necesaria para mediar el transporte de carbohidratos a través del sistema PTS. A medida que los sustratos del PTS son metabolizados, el nivel de intermediarios catabólicos (como la fructosa-1,6-bisfosfato) aumenta, estimulando a la HPRK/P, la cual fosforila al HPR en la Serina 45 (HPR-Ser), y ésta es un correpressor del regulador transcripcional global *ccpA* que está generalmente involucrado en la RCC de genes utilizados para metabolizar gluconato, xilosa e histidina (Titgemeyer y Hillen, 2002).

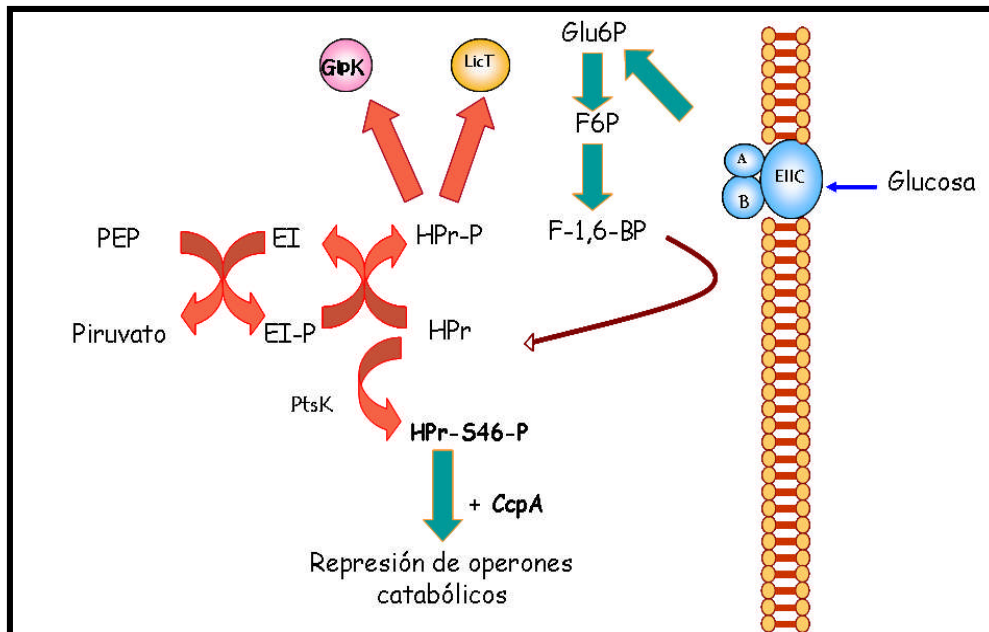


Figura 3. Modelo de represión catabólica por carbono (RCC) en *B. subtilis* (Stülke y Hillen, 1999).

2.7 Mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*

En varias especies de *Streptomyces*, la glucosa ejerce represión catabólica no solo sobre la utilización de varias fuentes de carbono, sino también sobre la síntesis de metabolitos secundarios (Demain, 1989). Los mecanismos utilizados por los estreptomicetos para llevar a cabo la regulación catabólica han sido estudiados en *S. coelicolor*. Uno de estos mecanismos es el PTS (Saier y col., 1995; Stülke y Hillen, 1999), el cual responde solo a la presencia de fructosa y *N*-acetilglucosamina (Nothaf y col., 2003; Wang y col., 2002). Contrario a los mecanismos encontrados en enterobacterias y debido a la limitación de azúcares que maneja, el PTS parece tener un papel secundario en la RCC de los estreptomicetos (Titgetmeyer y col., 1995). Además, los niveles de cAMP no varían en respuesta al cambio de fuente de carbono (Hodgson, 1980). Por otro lado, se ha postulado que la enzima glucosa cinasa (Glc) está involucrada en la RCC de este microorganismo. Para ello se ha propuesto que la Glc interactúa con la permeasa de glucosa (GlcP) para convertir inmediatamente el azúcar entrante en Glc-6-P. La glucosa, así como otras fuentes de carbono, entran a la célula mediante permeasas específicas (c-Tp), generando catabolitos durante su metabolismo. Se piensa que una proteína sensora o algún catabolito es requerido para modificar postraduccionalmente a la Glc,

resultando en una Glk activa (Glk*). Y es la Glk* la que interactúa con algunos factores transcripcionales (TFs), tales como MalR, GylR, BldB, etc., para ejercer la RCC (Fig. 4) (van Wezel y col., 2007).

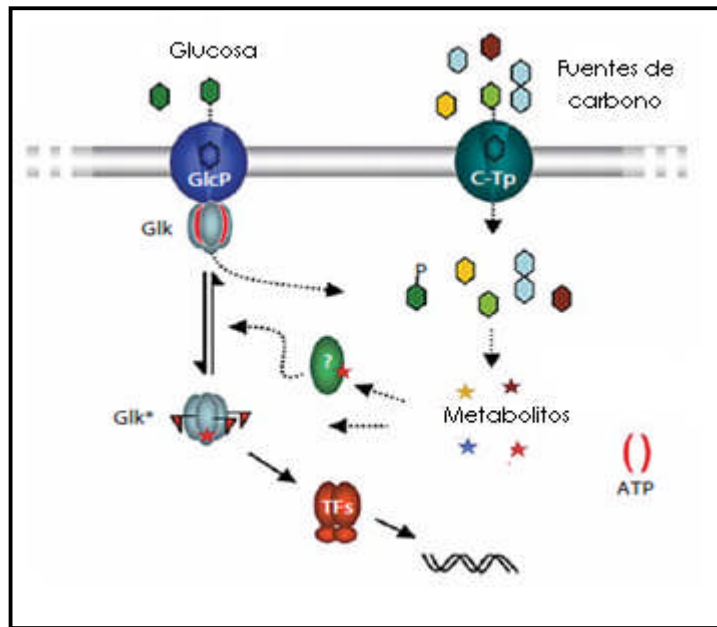


Figura 4. Modelo propuesto de represión catabólica por carbono (RCC) en el género *Streptomyces* (van Wezel y col., 2007).

La represión por glucosa en *S. coelicolor* A3(2) afecta la expresión de genes involucrados en la asimilación de fuentes de carbono secundarias, por ejemplo, la arabinosa (Hodgson, 1982), el glicerol (Smith y Chater, 1988) y la galactosa (Fornwald y col., 1987). Así también se afecta la expresión para la producción de enzimas que degradan polisacáridos, tales como la agarasa (Hodgson, 1982), la α -amilasa (Virolle y Bibb, 1988) y la quitinasa (Miyashita y col., 1991; Robbins y col., 1992; Delic y col., 1992). En varios de estos ejemplos, la represión ocurre a nivel transcripcional, dado que se ha visto que en otros microorganismos, principalmente enterobacterias, la RCC también puede darse por exclusión del inductor, en el cual se generan compuestos fosforilados que inhiben la actividad de varias permeasas y/o enzimas encargadas de metabolizar fuentes de carbono secundarias como son: lactosa, maltosa y melobiosa, entre otras.

En *S. coelicolor*, Hodgson (1982) observó que la represión por glucosa de la utilización de fuentes de carbono alternativas y de la producción de varias enzimas hidrolíticas extracelulares, no se presenta en mutantes *Dog^R*, resistentes al efecto negativo que un análogo no metabolizable de glucosa, 2-desoxiglucosa (2-DOG), ejerce sobre el crecimiento de la cepa silvestre en lactosa o glicerol. Estas mutantes presentaron una disminución en la sensibilidad a RCC por varias fuentes de carbono, y aunque no podían utilizar a la glucosa, no se vieron afectadas en el transporte de la misma. La ausencia de represión por glucosa en estas mutantes se correlacionó con la pérdida de la actividad de la Glk dependiente de ATP (Hodgson 1982; Seno y Chater, 1983).

Cuando las mutantes *Dog^R* se complementaron con un fragmento *BclI* de 2.9 kb de *S. coelicolor*, se observó recuperación de la actividad de Glk y de la sensibilidad a RCC por glucosa (Ikeda y col., 1984).

Un análisis de la secuencia de nucleótidos del fragmento *BclI* de 2.9 kb indicó la presencia de dos marcos de lectura abiertos (ORFs), ORF2 (*sco2127*) y ORF3 (*glkA*) que codifican para proteínas de 20.1 kDa y de 33.1 kDa, respectivamente, presentando esta última (Glk) homología con proteínas regulatorias conocidas (Angell y col., 1992). A continuación se muestra un esquema de dicho fragmento:

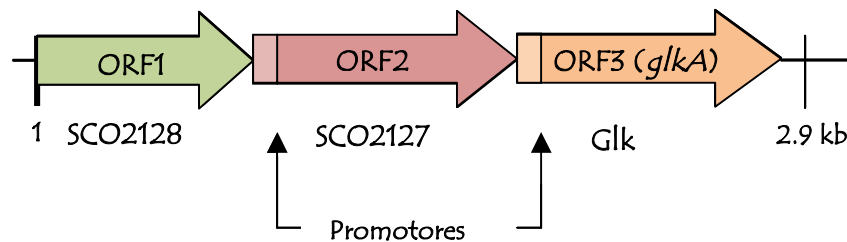


Figura 5. Fragmento de 2.9 kb obtenido a partir de la digestión del cósmido SC6E10 de *S. coelicolor* empleando la enzima *BclI*. El fragmento contiene un marco de lectura incompleto (*sco2128*) y dos marcos de lectura abiertos completos: ORF3 (*sco2126*) y ORF2 (*sco2127*), los cuales codifican para la Glk (*glkA*) y para la proteína SCO2127 (ORF2), respectivamente. Ambos genes poseen sus propias secuencias promotoras a pesar de que no se han detectado secuencias de paro entre ellas, por lo que es probable que *glkA* pueda cotranscribirse a partir de la transcripción de *sco2127*.

El marco de lectura abierto ORF3 codifica para la enzima Glk. Se ha encontrado que la región *glkA*, parece estar involucrada en la represión que ejerce la glucosa sobre algunos genes catabólicos en *S. coelicolor* A3(2). En este sentido, se observó que cuando las mutantes *Dog^R* fueron complementadas con *glkA*, la actividad de la glucosa cinasa se restauró por completo, mientras que la sensibilidad a la RCC fue parcialmente recuperada (Angell y col., 1994), por lo que se piensa que Glk tiene un papel en este proceso regulatorio. La sensibilidad a la RCC se recuperó por completo cuando las mutantes se complementaron con *sco2127* y *glkA* de manera simultánea (Angell y col., 1994), por lo que se pensó que *sco2127* codifica para una proteína involucrada en la activación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa o en el transporte de la misma. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de *sco2127*, estimada a partir del DNA, no parece codificar para la permeasa de glucosa ni para alguna hexoquinasa (Angell y col., 1992).

Por otro lado, un efecto similar fue observado en mutantes *Dog^R* de *S. peucetius* var. *caesius*, seleccionadas por su capacidad para utilizar lactosa o glicerol, en presencia de 2-DOG. En la tabla 1 se muestra cómo dichas mutantes presentaban disminución en los niveles de Glk y deficiencia en el transporte de glucosa. Cuando a las mutantes se les transformó con *glkA*, la actividad de la glucosa cinasa se restauró por completo pero no así el transporte de glucosa. No obstante, recuperaron su sensibilidad a RCC. Mientras que cuando se les transformó con la secuencia de *sco2127*, los valores de transporte de glucosa y de Glk se incrementaron a niveles similares o mayores a los de la cepa original, además de que las cepas se hicieron supersensibles a la RCC (Guzmán y col., 2005a).

Tabla 1. RCC para la producción de antraciclinas en <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>					
Cepas (inserto)	% Transporte	%Glk	Producción de antraciclinas (µg/mg proteína)		S-RCC
			100 mM Glucosa	500 mM Glucosa	
Original	100	100	127.73 ± 10.33	6.71 ± 0.04	S
Dog^R	51	15	547.08 ± 22.58	235.45 ± 7.12	R
SDR-1 (<i>glkA</i>)	49	95	45.49 ± 4.67	7.39 ± 0.23	S
SDR-2 (<i>sco2127</i>)	108	115	4.91 ± 0.34	5.38 ± 0.38	SS

S-RCC sensibilidad a la RCC respecto a la producción de antraciclinas
 S= sensible; R=resistente; SS=supersensible

Guzmán y col., 2005a

Con base en estos resultados se pensó que la función de los genes *sco2127* y *glkA* en *S.coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* es similar. Adicionalmente, cuando se compararon los niveles de RNA mensajero de *glkA* de la cepa original y de la mutante Dog^R con los de la cepa SDR-2 (Dog^R transformada con *sco2127*), se observó un incremento en los niveles de mensajero de *glkA* en la mutante transformada con relación a las otras cepas. Estos resultados sugieren que *sco2127* aumenta la transcripción de *glkA* y posiblemente también de la permeasa de glucosa. La consecuencia fisiológica de este efecto sería un incremento en los catabolitos de la glucosa (Ramos y col., 2004), los cuales podrían ser responsables de la RCC en este género (Guzmán y col., 2005b).

Por otro lado, se determinó el transporte de glucosa y galactosa en *S. peucetius* var. *caesius* y en una mutante Dog^R de esta cepa, cuya producción de antraciclinas es insensible a la RCC. Se observó que en la cepa original, la incorporación de glucosa y galactosa fue estimulada cuando a la bacteria se le cultivó en un medio conteniendo a estos azúcares por separado. Además la incorporación de galactosa disminuye a un nivel basal cuando se creció al microorganismo (wt) en un medio con galactosa y glucosa juntas. En la cepa mutante Dog^R se observó una reducción en la incorporación de glucosa (48%) y de galactosa (81%) comparada con la cepa original. Además, el transporte de galactosa en esta mutante redujo su sensibilidad al efecto negativo de glucosa. El transporte deficiente de estos azúcares, así como la sensibilidad de represión por glucosa o galactosa fue corregida cuando se le transformó con la región *sco2127* del genoma de *S. coelicolor* (Guzmán y col., 2005b). Al correlacionar estos resultados en *S. peucetius* var. *caesius* con los experimentos de la expresión de *glcP1* reportados para *S. coelicolor* (van Wezel y col., 2005; Guzmán y col., 2005b), se observó que existe un transporte de glucosa inducible en ambas especies y se concluyó que *sco2127* no codifica para el mismo (Guzmán y col., 2005a).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado la capacidad que tiene SCO2127 de unirse con otras proteínas, BldkB y un polipéptido homólogo a una endopeptidasa membranal (SCO2582), ambas involucradas en la diferenciación morfológica temprana en *S. coelicolor* (Chávez y col., en preparación).

3. JUSTIFICACIÓN

La utilización de varias fuentes de carbono así como la producción de metabolitos secundarios por *Streptomyces*, están frecuentemente limitadas debido a la RCC. Aparentemente, los productos de las regiones *glkA* y *sco2127* de *S. coelicolor* están implicados en este mecanismo regulatorio. Con relación a *SCO2127*, se desconoce si posee alguna actividad catalítica posible de cuantificar, sin embargo, se ha demostrado su participación en la RCC en *S. peucetius* var. *caesius* provocando un incremento en la actividad de *glkA* y como consecuencia en la formación de catabolitos de la glucosa (Guzmán y col., 2005b). Además, se tiene evidencia experimental, de que *SCO2127* tiene la capacidad de unirse a proteínas involucradas en la diferenciación celular (Chávez y col., en preparación). Sin embargo, aún se desconocen aspectos fundamentales de *SCO2127* como son su dinámica de síntesis y su regulación.

4. HIPÓTESIS

- Si *SCO2127* es necesario para generar el efecto de RCC, su síntesis deberá ocurrir en las etapas iniciales del crecimiento microbiano, como respuesta a la presencia de glucosa en el medio de cultivo, y para que el microorganismo pueda utilizar este carbohidrato de manera eficiente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

- Conocer la cinética de síntesis y posible regulación de la región *sco2127* de *S. coelicolor*.

5.2 Objetivos específicos:

- Identificar el producto de expresión de *sco2127* empleando un gen reportero regulado por el promotor de *sco2127* y anticuerpos anti-SCO2127.
- Determinar la síntesis de SCO2127 en función del tiempo de fermentación.
- Conocer la influencia de glucosa en la síntesis de la región *sco2127*.
- Evaluar si la síntesis se ve influida por otras fuentes de carbono.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Métodos utilizados para la producción de anticuerpos

6.1.1 Producción y purificación de SCO2127-His₆

Ver el anexo B

6.1.2 Elaboración de anticuerpos monoclonales

Ver el anexo C

6.1.3 Preparación de geles SDS-PAGE

Ver el anexo G

6.1.4 Transferencia y revelado Western-blot

Ver el anexo H

6.2 Métodos de Biología molecular

6.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y los plásmidos utilizados en esta investigación están descritas en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas		
Cepas	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogene
<i>E.coli</i> ET12567	<i>recA dam::Tn9 dcm-6</i> Genera DNA no metilado	Donada amablemente por el Dr. Luis Servín G.
<i>E. coli</i> M15	Contiene el plásmido pREP4 que codifica para el represor <i>lac</i> Contiene el plásmido pQE31	Chávez y col., 2009
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145	SCP-1, SCP-2	Donada amablemente por el Dr. Luis Servín G.
SMP27	<i>S. coelicolor</i> M145 conteniendo el plásmido pIJ8627	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos utilizados		
Plásmidos	Características	Referencia
pGEM-T easy	Plásmido especial para clonar productos de PCR	Promega
pUC-ORF2	Plásmido con el fragmento de <i>Bcl</i> 2.9 kb clonado	Angell y col., 1992
pQE31-2127	Plásmido que tiene clonada a la proteína SCO2127-His ₆	Chávez y col., 2009
pIJ8660	Plásmido integrativo en el cromosoma de especies del género <i>Streptomyces</i> en el sitio de unión para el fago Φ C31; contiene al gen de la EGFP	Sun y col., 1999 Amablemente donado por el Dr. Justin Nodwell
pIJ8627	Plásmido derivado de pIJ8660 que contiene a la secuencia promotora de <i>sco2127</i> de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo

6.2.2 Clonación de la región promotora de *sco2127* en pGEM-T easy

La región promotora de *sco2127* fue amplificada utilizando como DNA molde el plásmido pUC-ORF2. Los oligos utilizados fueron diseñados a partir de la secuencia de *S. coelicolor* reportada por Angell y col., 1992 (Fig. 6). En la figura 7 se muestra la región amplificada (5' a 3'), en donde el oligo forward inicia en la región 5' de *sco2128* marcado con negritas y subrayado, mientras que el reverse abarca 21 pares de base río arriba del ATG de inicio de la transcripción de *sco2127*.

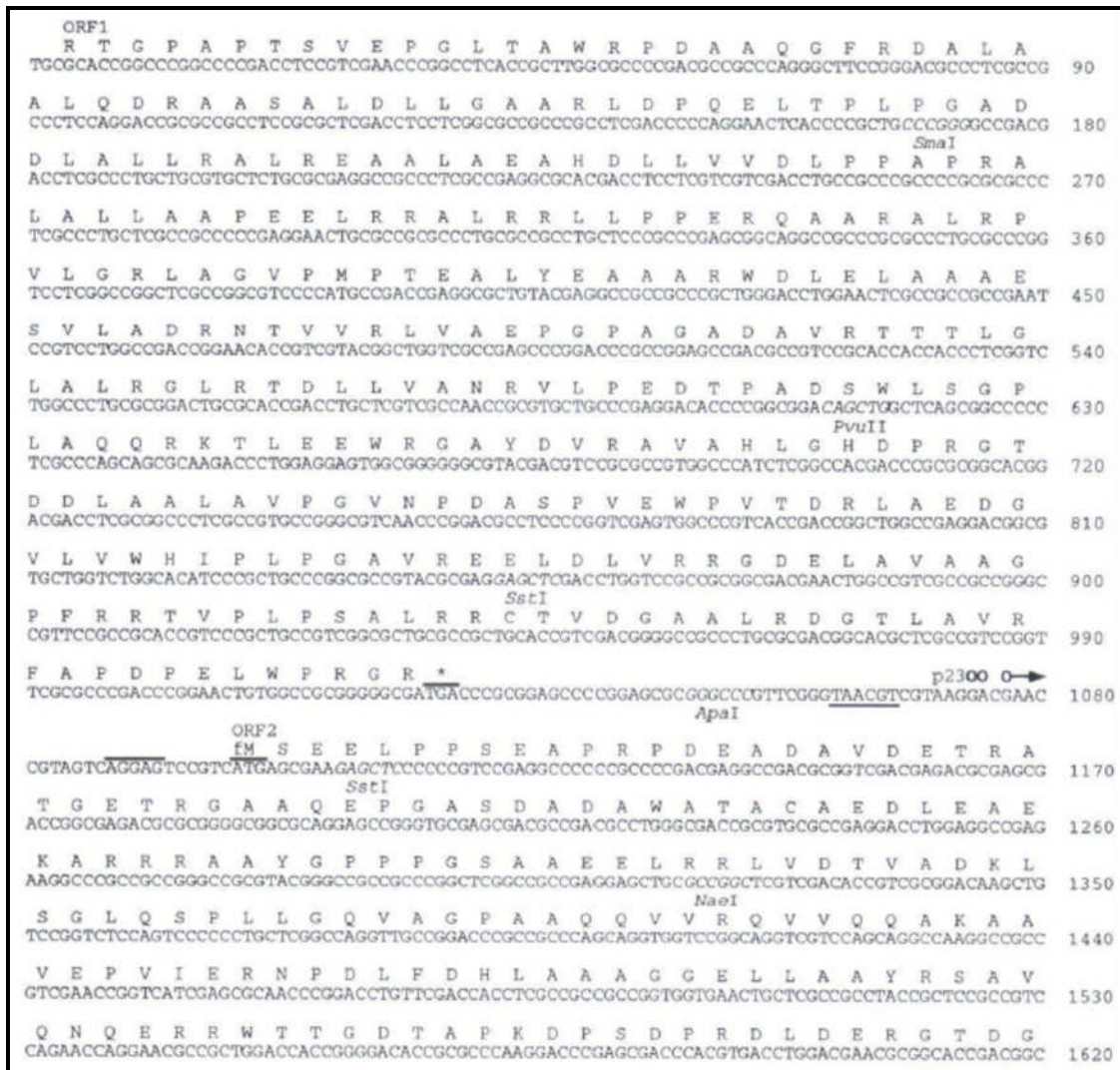


Figura 6. Secuencia de la región comprendida por ORF1 y parte del ORF2, que se consideró para la realización de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Angell y col., 1992). En donde ORF son los marcos de lectura abiertos que fueron localizados en la secuencia, ORF2 es el correspondiente a *sco2127*; p23 indica la secuencia promotora en donde se subrayan las regiones -10 y -35; fM indica el inicio de la transcripción para *sco2127*.

```

...GCGTGCTGGTCTGGCACATCCCGCTGCCCGGCGCCGTACGCGAGGA
GCTCGACCTGGTCCGCCGCGGGCAGCAACTGGCCGTCGCCGCCGGGCCGT
TCCGCCGCACCGTCCCGCTGCCGTCGGCGCTGCGCCGCTGCACCGTCGAC
GGGGCCGCCCTGCGCGACGGCACGCTCGCCGTCCGGTTCGCGCCCCGACCCG
GAACTGTGGCCGCGGGGGCGATGACCCGCGGAGCCCCGGAGCGCGGGCCC
GTTCCGGGTAACGTCGTAAGGACGAACCGTAGTCAGGAGTCCGTCATGA...
          -35                               -10

```

Figura 7. Secuencia correspondiente a parte de las regiones de ORF1 (*sco2128*) y de ORF2 (*sco2127*), que fue amplificada empleando los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Angell y col., 1992). **T** indica el inicio del forward de la región amplificada, **A** y **G** corresponden a la región -35 y -10, respectivamente. El ATG indica el sitio de inicio de la transcripción.

A estos oligonucleótidos se les introdujeron sitios de restricción reconocidos por *Xba*I y *Eco*RV. Los oligos utilizados fueron los siguientes:

FW: 5' GGCG**GATATC**TGCTGGTCTGGCACAT 3' Sitio *Eco*RV

RV: 5' CAT**TCTAGAG**ACGGACTCCTGACTACGGTT 3'. Sitio *Xba*I

La región amplificada tenía un tamaño de 310 pb. Para conocer las mejores condiciones de amplificación de la región promotora de *sco2127* se llevó a cabo un PCR en gradiente, partiendo de una temperatura de alineamiento de 52 °C, con incrementos de 1.9 °C, hasta alcanzar una temperatura final de 72 °C, de 30 ciclos la reacción. En la figura 8 se muestran las condiciones a las cuales se realizó esto.

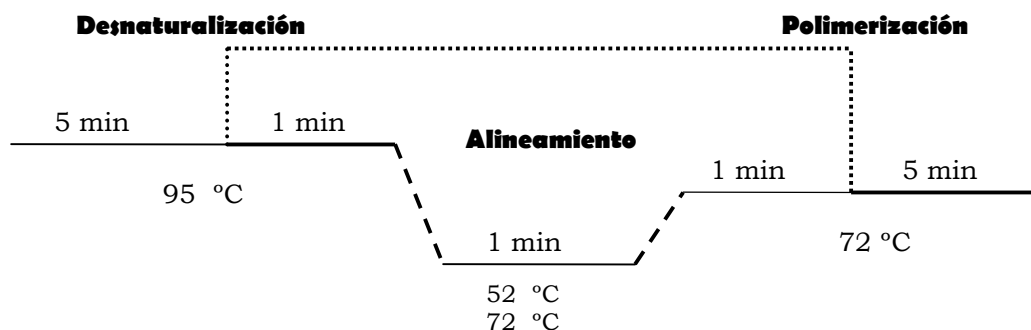


Figura 8. Ciclo de PCR por gradiente que se utilizó para determinar la temperatura de alineamiento a la que se obtiene mayor cantidad de producto amplificado.

En este caso la temperatura a la cual se obtuvo mayor cantidad de producto amplificado fue la de 62.8 °C. El fragmento amplificado se ligó al plásmido pGEM-T easy vector® siguiendo las indicaciones del proveedor.

La comprobación de la ligación del fragmento se hizo mediante la digestión del plásmido utilizando *EcoRI* y el fragmento obtenido fue de 300 pb, posteriormente se mandó a secuenciar, con lo que se verificó que fuera la secuencia de interés.

6.2.3 Clonación de la región promotora de *sco2127* en pJ8660

Los plásmidos pJ8660 y pGEM-T easy vector conteniendo al promotor de *sco2127* fueron digeridos con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRV*. El plásmido digerido pJ8660 y la secuencia promotora de *sco2127* se corrieron en un gel de 0.8 y 2% de agarosa respectivamente, la banda correspondiente se cortó directamente del gel y el ADN se purificó mediante columnas de fibra de vidrio y posteriormente se ligaron el plásmido pJ8660 y la región promotora *sco2127*, utilizando la T4 ligasa de Promega®.

6.2.4 Introducción de pJ8627 en *S. coelicolor* M145

Debido a que *S. coelicolor* M145 posee un sistema de restricción que no permite que se le introduzca DNA metilado, lo primero que se realizó fue transformar a la cepa de *E. coli* ET12567 con el plásmido pJ8627, por medio de electroporación (Anexo D).

Una vez transformada la cepa ET12567 con el plásmido, se pusieron a conjugar con esporas de *S. coelicolor* M145, tal y como describe Kieser y col., 2000. Las colonias exconjugantes de *S. coelicolor* M145 fueron seleccionadas por la capacidad de crecer en presencia de apramicina. Para comprobar que la EGFP se estuviera expresando, se realizó un western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP de Invitrogen®, siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.3 Métodos microbiológicos y bioquímicos

6.3.1 Cinéticas de crecimiento

Se inocularon 50 ml de medio NMMP (Anexo A) con 1 ml de solución concentrada de micelio (preinóculo), ya sea de *S. coelicolor* M145 o *S. coelicolor* M145 transformada con pJ8627. Se

probaron las siguientes condiciones: 50 y 100 mM de glucosa, 50 y 100 mM de manitol, 50 y 100 mM de glutamato, 50 y 100 mM de arabinosa como fuentes de carbono. Los cultivos se incubaron a 29 °C con una agitación de 180 rpm. Se tomaron muestras de 25 ml de cultivo a las 0, 8, 12, 24, 32, 48, 56, 72 y 96 h, para determinar el crecimiento por peso seco (Anexo I), por lo que se tuvo un cultivo de 50 ml para cada tiempo y la toma de muestra se llevó a cabo sacrificando el matraz correspondiente al tiempo de toma de muestra. Cada cinética se llevó a cabo por triplicado.

6.3.1.1 Preparación del preinóculo

El preinóculo se obtuvo agregando 10^6 esporas a matraces bafleados de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo NMMP con 50 mM de manitol (Hodgson, 1982). Se incubaron durante 36 horas a 29 °C con una agitación de 180 rpm. El micelio obtenido a partir de las esporas se lavó dos veces con solución salina isotónica (0.85% NaCl), y fue resuspendido en 1/10 del volumen del cultivo (5 ml). De esta solución de micelio se tomó 1 ml para inocular 50 ml de medio NMMP.

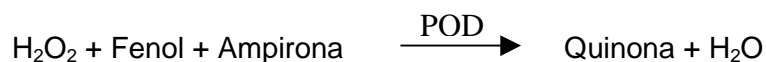
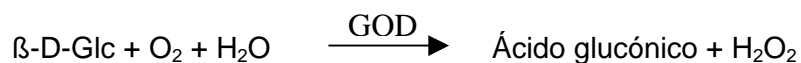
6.3.1.2 Determinación de pH

Se tomaron 5 ml de sobrenadante a las a las 0, 8, 12, 24, 32, 48, 56, 72 y 96 h, y el pH se determinó en un potenciómetro marca Hanna Instruments modelo pH211.

6.3.1.3 Determinación de sustrato residual

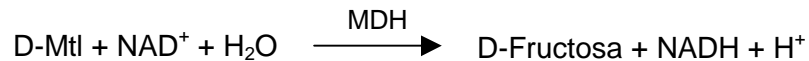
Glucosa. La glucosa residual se determinó mediante la utilización del kit de la glucosa-oxidasa llamado GOD-POD de la marca Spinreact, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Este kit se basa en la siguiente reacción:



En donde la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), donde este último se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, el fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

Manitol. La determinación del manitol está basada en una reacción enzimática catalizada por la enzima Manitol deshidrogenasa (MDH), la cual lleva a cabo la oxidación del manitol para convertirlo en fructosa con la formación concomitante de NADH, en donde la conversión de NAD⁺ a NADH se mide espectrofotométricamente a 340 nm y es equivalente al manitol oxidado (Hendrik y col., 2003):



Glutamato. La determinación de glutamato residual se realizó utilizando el kit para la determinación de glutamina/glutamato de Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del proveedor y cuyo método se basa en la deshidrogenación del L-glutamato a α-cetoglutarato acoplada con la reducción del NAD⁺ a NADH, llevada a cabo por la glutamato deshidrogenasa (L-GLDH):



La conversión de NAD⁺ a NADH es medido espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de glutamato oxidado.

Arabinosa. La determinación de arabinosa residual se realizó mediante la técnica de fenol-sulfúrico (anexo I), el cual es un método colorimétrico en donde se forma un color amarillo-anaranjado, como resultado de la interacción entre los hidratos de carbono y el fenol. Mientras que el ácido sulfúrico provoca que todos los azúcares no reductores se conviertan a azúcares reductores, de modo que este método permite determinar el total de azúcares presentes en la muestra, donde la absorbancia a 420 nm es proporcional a la concentración de los mismos. Dado que este método no es estequiométrico, es necesario preparar una curva de calibración.

6.3.1.4 Cuantificación de proteína

Para determinar la cantidad de proteína intracelular de *S. coelicolor* M145, se rompieron las células por sonicación, y se llevó a cabo la técnica de Bradford tal y como indica el proveedor (BIORAD). La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro marca Spectronic, modelo Spectronic® 21D.

6.3.2 Expresión de *sco2127* en *S. coelicolor* M145

Para llevar a cabo la detección de SCO2127, la biomasa obtenida en 50 ml de cultivo de cada tiempo fue sonicada (Anexo E) y posteriormente los extractos proteicos intracelulares se corrieron en geles SDS-PAGE al 10%, y estos fueron transferidos a una membrana de PVDF para hacerles western-blot utilizando anticuerpos policlonales anti- SCO2127 (Chávez y col., 2009) (Anexo H).

6.3.3 Expresión de *sco2127* en *S. coelicolor* M145 transformada con pIJ8627 (SMP27)

Se realizaron geles SDS-PAGE al 10% y éstos fueron transferidos a una membrana de PVDF para realizársele western-blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor.

7. RESULTADOS

7.1 Producción de anticuerpos monoclonales anti-SCO2127

Con el fin de evaluar la expresión de *sco2127* y debido a que aún se desconoce que posee alguna función catalítica que se pueda cuantificar, se intentó obtener un anticuerpo monoclonal anti-SCO2127, para lo cual se purificó a SCO2127-His₆ utilizando una columna de sefarosa niquelada como se señala en el Anexo B.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la purificación de SCO2127. La figura 9 muestra la purificación de SCO2127-His₆. Los carriles 1-5 muestran las 5 eluciones que se hicieron, el carril 6 corresponde al décimo lavado realizado, mientras que el carril 7 corresponde a las proteínas no adsorbidas, y finalmente el carril 8 muestra el marcador de peso molecular.

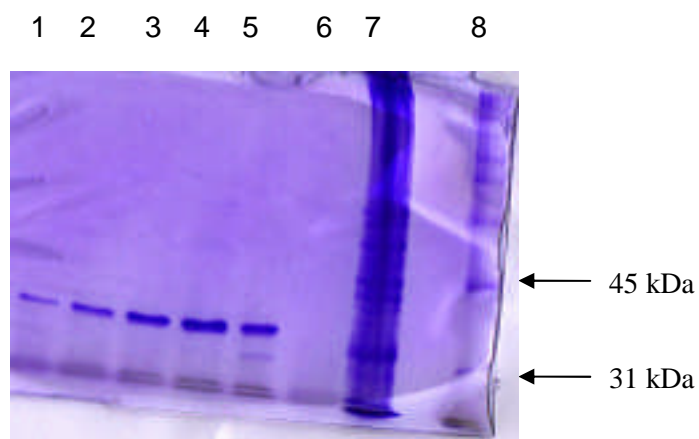


Figura 9. Gel SDS-PAGE de la purificación de SCO2127. De derecha a izquierda se muestra el marcador de peso molecular (carril 8), proteínas no adsorbidas (carril 7), lavado diez (carril 6), las eluciones 1 a la 5 (carriles 5,4, 3, 2 y 1).

Posteriormente se realizó la transferencia western-blot del gel a una membrana de PVDF y mediante el uso de un anticuerpo anti-His, se confirmó que la proteína que se purificó fue SCO2127-His₆ (Fig. 10).

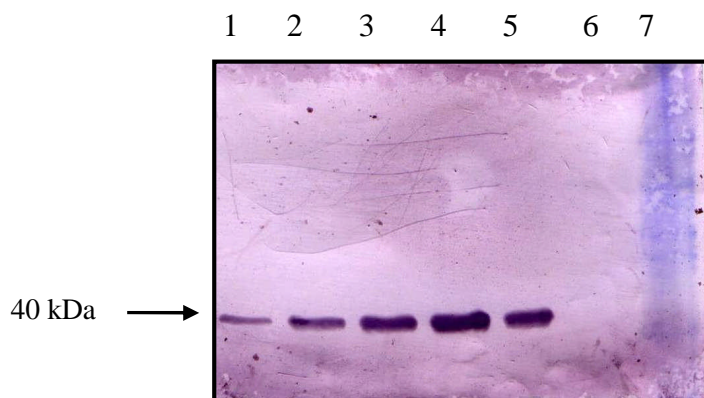


Figura 10. Transferencia y revelado western-blot para identificar a SCO2127, mediante un anticuerpo anti-His. De derecha a izquierda se muestra proteínas no adsorbidas (carril 7), lavado diez (carril 6), las eluciones 1 a la 5 (carriles 5,4, 3, 2 y 1).

Una vez purificada la proteína, ésta se utilizó para inmunizar una vez por semana durante quince días, a un lote de cuatro ratones de la cepa Balb-c, marcados cada uno con ácido pícrico en la cola, cabeza, costado izquierdo y costado derecho, respectivamente, para poder identificarlos.

En la figura 11, se presentan los valores de absorbancia a 495 nm registrados en la prueba de ELISA. Como se puede observar el ratón que obtuvo mejor respuesta inmune hacia SCO2127 fue el ratón marcado con ácido pícrico en la cabeza, por lo tanto, se decidió extraer el bazo de dicho ratón para obtener las células esplénicas y realizar la fusión de las mismas con las células del mieloma. Además como puede observarse, a pesar de hacer las diluciones no se observa una disminución de absorbancia tal y como ocurre para los demás ratones, debido probablemente a que el ratón produjo gran cantidad de anticuerpo que rebasaba lo medible en el espectrofotómetro, saturando el sistema.

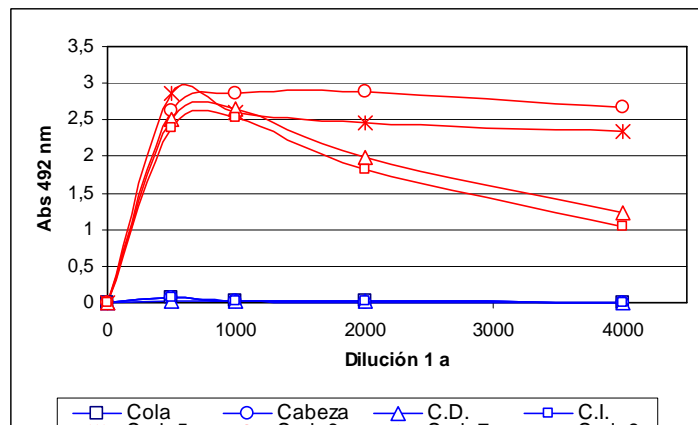


Figura 11. Prueba de ELISA de los títulos de anticuerpos de los sueros de los ratones preinmunizados (líneas azules) y del suero de los ratones de la segunda inmunización (líneas rojas). (*) ratón marcado en la cola; (□) ratón marcado del costado izquierdo; (Δ) ratón marcado del costado derecho; (o) ratón marcado de la cabeza.

Se realizaron ensayos de ELISA con 10 µg/ml de SCO2127-His₆ con el objetivo de identificar aquellos pozos con hibridomas que estén produciendo el anticuerpo de interés. En las tablas 4, 5 y 6, se muestran las absorbancias a 492 nm registradas para los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas, después de quince días de haber hecho la fusión. Los datos resaltados en negrito indican los cultivos de hibridomas que fueron elegidos para su clonación. El criterio de selección de los microcultivos fue el siguiente: aquéllos que dieron absorbancias iguales o mayores a 0.5 se tomaron como positivos. Cabe señalar que una vez realizada la prueba de ELISA se observaron los pozos al microscopio para ver si las células eran viables y si no había presencia de macrófagos o de contaminación.

Tabla 4. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 1 de los sobrenadantes de los hibridomas.

PLACA 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.543	0.062	0.078	0	0.067	0.328	0.126	0.056	0.193	0	0.087	0
B	0.089	0.198	0.01	0.21	0.184	0.058	0.2	0.223	0.084	0.31	0.136	0
C	0	0.004	0	0.159	0.091	0	0.345	0.248	0.11	0.152	0.118	0
D	0	0	0.036	0.116	0.01	0.09	0.6	0.055	0.004	0.061	0.077	0.067
E	0	0.191	0.009	0.283	0.075	0	0.259	0	0.059	0	0.038	0
F	0.122	0.185	0.102	0.163	0.103	0.237	0	0.247	0.312	0.065	0.359	0
G	0	0.056	0.05	0.055	0.128	0.276	0.09	0.577	0.066	0.152	0.011	0
H	0.026	0	0.082	0.54	0.152	0.1	0.12	0	0.068	0	0	2.518

Las celdas A12 y H12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Tabla 5. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 2 de los sobrenadantes de los hibridomas.

PLACA 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0.295	0.185	0.187	0.893	0.064	0.378	0.092	0.367	0.14	0.058	0.099
B	0.121	0.202	0.27	0.081	0.198	0.336	0.077	0.119	0.18	0.122	0.089	0.088
C	0.348	0.283	0.132	0.361	0.36	0.923	0.295	0.63	0.381	0.224	0.432	0.458
D	0.063	0.166	0.31	0.056	0.193	0.056	0.076	0.342	0.326	0.171	0.236	0.15
E	0.032	0.251	0.371	0.257	0.068	0.325	0.3	0.127	0.187	0.622	0.149	0.086
F	0.138	0.484	0.155	0.37	0.296	0.363	0.283	0.276	0.523	0.124	0.615	0.064
G	0.068	0.2	0.295	0.487	0.265	0.308	0.3	0.218	0.37	0.1	0.092	0.134
H	0.028	0.274	0.164	0.137	0.312	0.056	0.266	0.157	0.258	0.282	0.204	2.557

Las celdas A12 y H12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Tabla 6. Prueba de ELISA de la microplaca de cultivo 3 de los sobrenadantes de los hibridomas.

PLACA 3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.11	0.708	0.467	0.259	0.603	0.495	0.159	1.328	0.255	0.526	1.427	0
B	0.166	0.27	0.343	0.539	0.351	0.375	0.274	0.535	0.507	0.39	0.4	0.112
C	0.365	0.545	0.219	0.204	0.831	0.406	0.317	0.299	0.318	0.92	0.481	0.191
D	0.241	0.565	0.262	0.103	0.42	0.479	0.082	0.065	0.322	0.481	0.618	0.351
E	0.518	0.046	0.980	0.571	0.453	0.485	0.306	0.097	0.988	0.527	0.482	0.273
F	0.2	0.582	0.7	0.45	0.686	0.386	0.26	0.414	0.571	0.339	0.197	0.328
G	0.183	0.14	0.149	0.269	0.784	0.508	0.325	0.406	0.434	0.402	0.287	0.274
H	0.504	0.402	0.522	0.473	0.84	0.555	0.336	0.335	1.793	0.446	0.175	2.598

Las celdas A12 y H12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

7.1.1 Clonación

Con la clonación lo que se pretende es que quede una sola célula por pozo para que ésta pueda duplicarse y generar clonas de ella misma, además de separar a los hibridomas productores del anticuerpo de interés de los no productores.

Los pozos positivos 1A1, 3E3, 3C5 y 3H9 correspondientes a la fusión se clonaron. Una vez que se obtuvo un buen crecimiento celular, se prosiguió a evaluar los sobrenadantes mediante la técnica del ELISA. Los resultados que se obtuvieron se muestran en las tablas 7, 8 y 9. Cabe señalar que los resultados obtenidos de la clonación del cultivo 1A1 fueron similares a los obtenidos con el cultivo 3E5, por lo que se decidió omitirlos. Lo que pudo ocurrir al momento de clonar los cultivos celulares de 1A1, 3E5 y 3C5, es que los hibridomas no tuvieron la capacidad de duplicarse y por lo tanto, de generar un cultivo confluyente, y los hibridomas que si lo llegaron a generar, fueron hibridomas no productores que obtuvieron absorbancias menores de 0.5 unidades (Tabla 8).

Tabla 7. Prueba de ELISA realizado a la clonación del pozo 3H9

CLONACIÓN DE 3H9												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0.162	0	0	0	0	0	0	0	2.371
B	0.008	0	0.036	1.242	0.056	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0.057	0.026	1.120	0.078	0	0	0	0	0.272
D	0	0	0.487	0	1.250	0.127	0	0	0.440	1.528	0.260	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0.051	0	1.405	0.067	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	1.252	0.075	0	0	0	0	0	0.080	0.094	0	0
H	0.197	0	0	0	0.423	0.070	0	0	1.56	0	0	0.070

Celdas A1 y A12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Tabla 8. Resultados del ELISA realizado a la clonación del pozo 3C5

CLONACIÓN DE 3C5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0.354	0	0.419	0.188	0.333	0	0	0	0	2.679
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Celdas A1 y A12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Tabla 9. Resultados del ELISA realizado a la clonación del pozo 3E3

CLONACIÓN DE 3E3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0.005	0.042	0.021	0.001	0.025	0.020	0.005	0.003	0.013	2.671
B	0.006	0.008	0.022	0.019	0.019	0	0.004	0	0	0	0.018	0
C	0	0	0.018	0.018	0.011	0	0	0.011	0	0	0	0.005
D	0.017	0	0.003	0.015	0.001	0	0	0	0	0	0.007	0.025
E	0.004	0	0.002	0.002	0.002	0.001	0	0	0	0.010	0.007	0.007
F	0.023	0	0	0.001	0	0	0	0	0	0	0.022	0.325
G	0.620	0.010	0.011	0	0	0.009	0	0	0	0.012	0.052	0.033
H	0	0.010	0	0	0	0.025	0	0	0	0	0	0

Celdas A1 y A12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Los pozos considerados como positivos (resaltados en negrita) se subclonaron y la producción del anticuerpo anti-SCO2127 fue evaluada nuevamente mediante la técnica de ELISA. En este caso, solo se encontraron clonas positivas en la clonación del pozo localizado en las coordenadas H9 de la microplaca del cultivo 3H9 (Tabla 10). Cabe señalar que se tuvo que subclonar dos veces para aumentar la probabilidad de tener células viables debido a que el cultivo presentaba muerte celular.

Tabla 10. Resultados del ELISA realizado a la subclonación del pozo 3H9-H9

SUBCLONACIÓN DE 3H9-H9 PLACA A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.138	0.004	0.014	0.017	0.500	0.560	0.400	0.176	0.472	0.209	0.213	0.078
B	0.012	0.005	0.686	0.008	0	0.311	0.008	0.005	0.007	0.007	0.754	0.170
C	0.017	0	0	0	0.540	0	0	0	0	0	0.132	0.011
D	0.027	0	0	0	0	0	0	0.229	0	0	0.196	0.027
E	0.015	0.661	0	0.636	0.269	0.616	0	0	0.667	0	0.013	0.000
F	0.013	0.740	0.004	0.472	0	0.653	0.544	0.464	0.076	0	0.015	0.011
G	0.003	0.587	0	0.626	0.003	0.694	0.001	0.001	0.653	0	0.005	0.005
H	0.046	0.006	0.005	0.022	0.090	0.008	0.012	0	0.205	0.002	0.030	2.510

Celdas A12 y H12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

Tabla 11. Resultados del ELISA realizado a la subclonación del pozo 3H9-H9

SUBCLONACIÓN DE 3H9-H9 PLACA A'												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.23	0.068	0.014	0.019	0.029	0.007	0.007	0.604	0.023	0.011	0.024	0.081
B	0.011	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.137	0.002	0.009
C	0.003	0.015	0.420	0.115	0.002	0	0.001	0.005	0.003	0.005	0.605	0.019
D	0.003	0.000	0.263	0.017	0.002	0.498	0.000	0.002	0.005	0.007	0.004	0.008
E	0.007	0.522	0.427	0.025	0	0	0	0	0	0	0	0.005
F	0.004	0	0.001	0.009	0.531	0.000	0.459	0	0.624	0.008	0	0.001
G	0.034	0	0.530	0.016	0	0	0.468	0.007	0.002	0.001	0	0.008
H	0	0	0.010	0.006	0.010	0.012	0.514	0.025	0.017	0.008	0.050	2.320

Celdas A12 y H12 corresponden al suero preinmunizado e inmunizado, respectivamente.

A los cultivos celulares que resultaron positivos para la producción del anticuerpo anti-SCO2127 después de la subclonación se les evaluó la especificidad contra SCO2127 y el tallo de histidinas mediante un western-blot. Para ello se realizaron dos geles preparativos en condiciones desnaturizantes, uno de SCO2127-His₆ semipurificada y el otro del extracto

de *E. coli* con un plásmido que expresa una amilasa que contiene tallo de histidinas (amy-His₆) utilizada como control. Asimismo, se realizó el western-blot utilizando el suero preinmune del ratón como control negativo, suero hiperinmune como control positivo, y contra el medio de cultivo solo, este último para observar si había alguna reacción cruzada de algún componente del medio (Fig. 12).

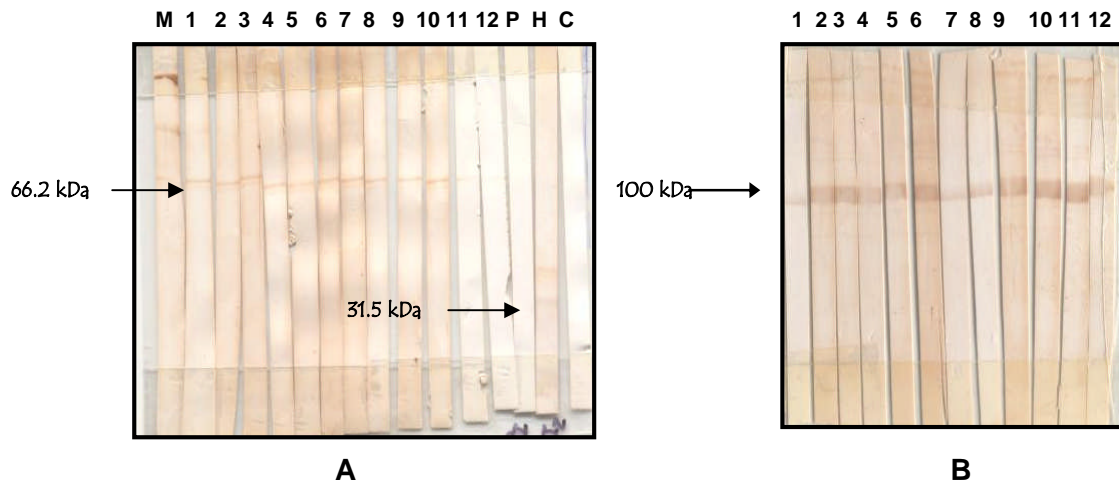


Figura 12. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos producidos por las clonas mediante un western blot. **A.** Evaluación de las diferentes clonas contra SCO2127-His₆. **B.** Evaluación de las diferentes clonas contra una proteína con tallo de histidinas (amy-His₆). M: Marcador de peso molecular; 1: AF2; 2: AB11; 3: AE2; 4: AG2; 5: AB3; 6: AG6; 7: AF6; 8: AE9; 9: AG9; 10: AA6; 11: A'A8; 12: A'F9; P: Suero preinmune del ratón; H: Suero hiperinmune; C: Medio de cultivo solo. La primera letra del nombre clave de los cultivos de hibridomas corresponde al nombre de la placa, y los dígitos siguientes corresponden a la ubicación en la placa correspondiente.

Se puede observar que ninguna clona fue positiva para SCO2127 en condiciones desnaturizantes (Fig. 12 A), ya que la banda que dio señal no corresponde al peso esperado, sin embargo, se observó señal contra una proteína proveniente del lisado de *E.coli* de 66.2 kDa, por lo cual se pensaron dos cosas: que el anticuerpo que producían las clonas podría ser de tipo conformacional y por lo tanto, en un gel realizado en condiciones desnaturizantes no había reconocimiento del anticuerpo hacia su antígeno o que el anticuerpo producido era contra alguna proteína de *E. coli*. Asimismo, también se pudo ver que el anticuerpo producido por las clonas no era tan específico, pues reconoció a la amy-His₆ (Fig. 12 B), de 100 kDa de peso, utilizada como control contra el tallo de histidinas, ya que se ha visto que el tallo de histidinas es inmunogénico, por lo que se corría el riesgo de

que la respuesta inmune obtenida por los ratones, estuviera dirigida hacia las histidinas, observando que la amilasa-His₆ fue reconocida, se concluye que el anticuerpo producido es contra el tallo de histidinas. Dado que el anticuerpo producido pudiera ser conformacional y a causa de esto no ser reconocido en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se decidió realizar un gel en condiciones nativas de lisados de *S. coelicolor* M145 como control positivo, *S. coelicolor* ΔSCO2127::Apra como control negativo y de *S. peucetius* var *caesius*, para ver si el anticuerpo era capaz de reconocer al producto proteico de *spvc2563*, proteína homóloga de SCO2127 en este microorganismo, las tres cepas fueron crecidas en un medio complejo (TSB) y posteriormente se realizó un western-blot utilizando el anticuerpo monoclonal producido. Lo anterior es observado en la figura 13.

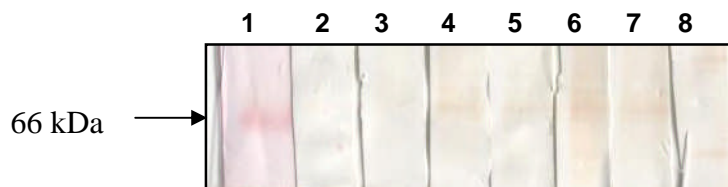


Figura 13. Transferencia y revelado western blot para identificar a SCO2127 en condiciones nativas, evaluando la 3 diferentes clonas. 1: BSA; 2, 4 y 6: *S.coelicolor* M145; 3,5 y 7: *S. coelicolor* ΔSCO2127::Apra, 8: *S. peucetius* var *caesius*.

Se puede observar que varias bandas mostraron reacción positiva, tanto en la cepa silvestre como en la mutante, por lo tanto, el anticuerpo producido fue inespecífico para SCO2127. Analizando la metodología, esto pudo deberse a que la proteína utilizada para inmunizar a los ratones se obtuvo directo de los eluatos del gel, y probablemente, la proteína no estaba completamente pura, ocasionando que se produjeran anticuerpos contra otra proteína de *E. coli*, ya que la única forma en que se observaba la pureza de la proteína era mediante la visualización del gel de la purificación teñido con azul de coomassie, el cual sabemos que es menos sensible que si se hubiera teñido el gel con plata. Por lo tanto, se repitió la metodología, sin embargo, no se pudo obtener el anticuerpo monoclonal anti-SCO2127, atribuyéndoselo a la falta de estabilidad genética que presentaron los hibridomas productores, así como a la inespecificidad de otros, por lo que se optó por utilizar el anticuerpo policlonal anti-SCO2127 elaborado por Chávez y col., 2009, para evaluar la síntesis de la región *sco2127*.

7.2 Determinación de la síntesis de la región *sco2127*

Para evaluar si la síntesis de la región *sco2127* se ve influida por glucosa y otras fuentes de carbono, así como por la concentración de las mismas, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia de glucosa (Glc), manitol (Mtl), glutamato (Glu) y arabinosa (Ara), a las concentraciones de 50 mM y 100 mM para cada una. En este trabajo se decidió trabajar con glucosa debido a que es una fuente de carbono represora por ser de rápida asimilación. Respecto a manitol, éste se decidió evaluar ya que es reportado como fuente de carbono no represora (van Wezel y col., 2007). Asimismo, se decidió evaluar arabinosa ya que este compuesto se metaboliza a través de la vía de las pentosas, mientras que se evaluó el glutamato por ser un aminoácido que entra al metabolismo a nivel del ciclo de Krebs. Es decir, estos dos últimos sustratos mencionados, se metabolizan por una vía diferente a la glucólisis, y de ahí la importancia de evaluarlos. Posteriormente se evidenció la presencia de SCO2127 en extractos proteicos intracelulares a diferentes horas de la fermentación mediante un western-blot utilizando anticuerpos policlonales anti-SCO2127 (Chávez y col., 2009).

En las figuras 14 A y B se pueden observar las cinéticas de crecimiento y el consumo de sustrato de *S. coelicolor* M145, en cultivos empleando Glc como fuente de carbono a 50 y 100 mM, respectivamente. Mientras que en las figuras 14 C y D, se observan los resultados obtenidos del western blot realizado a partir de los extractos proteicos obtenidos a lo largo de la cinética para cada concentración probada y revelados con el anticuerpo policlonal anti-SCO2127. Se observa que a 50 mM el microorganismo consumió por completo la fuente de carbono mientras que a 100 mM la concentración final de glucosa residual fue de aproximadamente 30 mM a las 96 h de cultivo. Asimismo, se puede observar que la expresión de SCO2127 se realizó a lo largo de toda la fermentación de una forma similar utilizando 100 mM Glc (Fig. 14 D), mientras que a 50 mM se observa una disminución de la señal de SCO2127 a partir de las 32 horas de iniciado el cultivo (Fig. 14 C). Por lo que estos resultados indican que la síntesis de SCO2127 se lleva a cabo en presencia de glucosa tanto en condiciones represoras como no represoras.

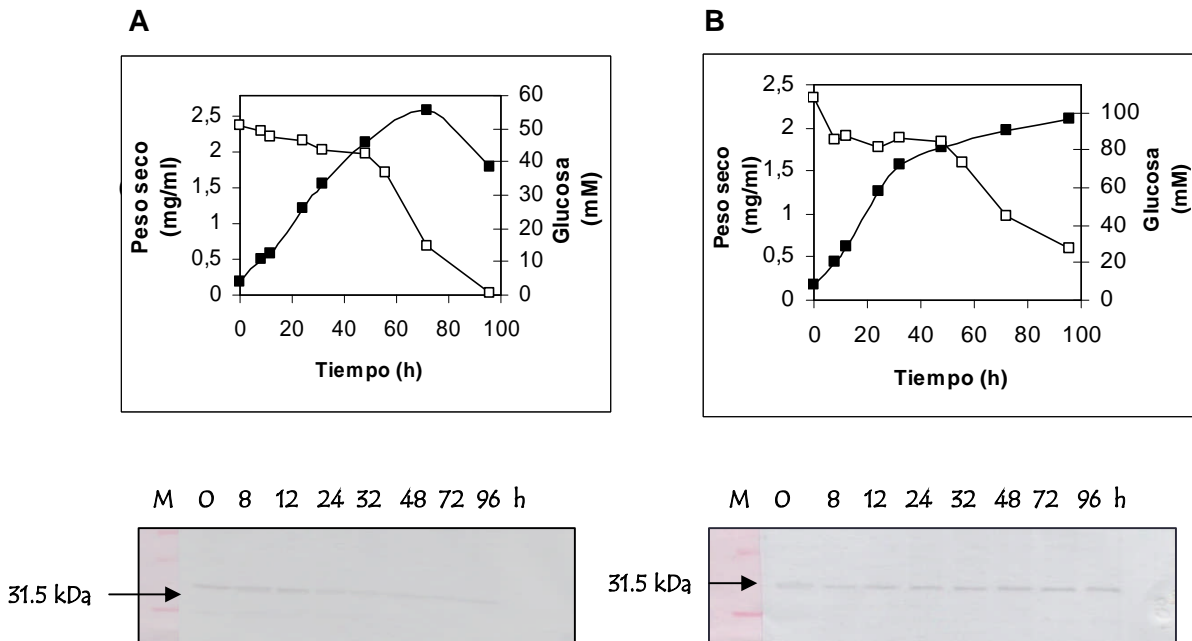


Figura 14. Crecimiento de *S. coelicolor* M145 (■) y consumo de sustrato (□) en presencia de 50 mM (A) y 100 mM de glucosa (B). Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo policlonal de conejo anti-SCO2127 contra extractos proteicos de los cultivos obtenidos a 50 mM (C) y 100 mM (D) de glucosa.

En las figuras 15 A y B se pueden observar las cinéticas de crecimiento y el consumo de sustrato de *S. coelicolor* M145, en cultivos empleando Mtl como fuente de carbono a 50 y 100 mM, respectivamente. Mientras que en las figuras 15 C y D, se observan los resultados obtenidos del western blot realizado a partir de los extractos proteicos obtenidos a lo largo de la cinética para cada concentración probada y revelados con un anticuerpo policlonal anti-SCO2127. Se puede observar que a 50 mM Mtl, al igual que pasó con Glc, el microorganismo consumió completamente el sustrato, mientras que a 100 mM la concentración final de Mtl fue de 30 mM. En cuanto a la síntesis de SCO2127 se observa que a 100 mM de Mtl, ésta se llevó a cabo durante toda la fermentación (Fig. 15 D), mientras que a 50 mM la señal del western blot se ve disminuida a partir de las 32 h de crecimiento (Fig. 15 C), lo cual podría indicar que la concentración de la fuente de carbono tiene algún efecto sobre la síntesis de SCO2127.

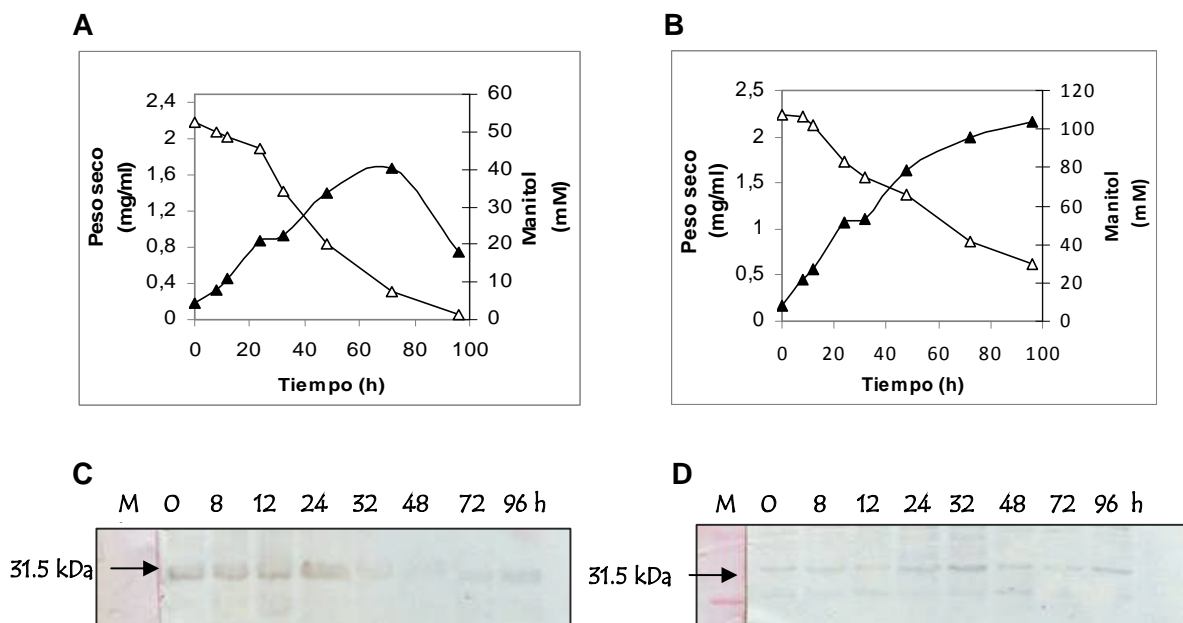


Figura 15. Crecimiento de *S. coelicolor* M145 (▲) y consumo de sustrato (Δ) en presencia de 50 mM (A) y 100 mM de manitol (B). Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo policlonal de conejo anti-SCO2127 contra extractos proteicos de los cultivos obtenidos a 50 mM (C) y 100 mM (D) de manitol.

En las figuras 16 A y B se pueden observar las cinéticas de crecimiento y el consumo de sustrato de *S. coelicolor* M145, en cultivos empleando Glu como fuente de carbono a 50 y 100 mM, respectivamente. Mientras que en las figuras 16 C y D, se observan los resultados obtenidos del western blot realizado a partir de los extractos proteicos obtenidos a lo largo de la cinética para cada condición probada y revelados con el anticuerpo policlonal anti-SCO2127.

Se observa que el Glu fue la fuente de carbono en donde el microorganismo creció menos a comparación de las otras fuentes utilizadas llegando a un peso seco de 1.2 mg/ml comparado con Glc donde llegó hasta 2 mg/ml, sugiriendo que el Glu fue utilizado por la bacteria como una fuente de energía, en lugar de ser una fuente de carbono para generar biomasa. Asimismo, se observa que a 50 mM de Glu la concentración de sustrato residual al último tiempo de fermentación fue de 10 mM, aproximadamente (Fig. 16 A), mientras que la concentración final de Glu residual a 100 mM fue de 25 mM, aproximadamente (Fig. 16 B).

Por otro lado, en cuanto a los resultados de western blot se puede observar una señal tenue a las 24 horas de iniciado el cultivo utilizando una concentración de 50 mM de Glu (Fig. 16 C), mientras que utilizando 100 mM no se observó señal positiva a lo largo de todo el

crecimiento (Fig. 16 D), sugiriendo que existen más factores y no solo la fuente de carbono presente en el medio que pueden ocasionar que se lleve a cabo la síntesis de SCO2127.

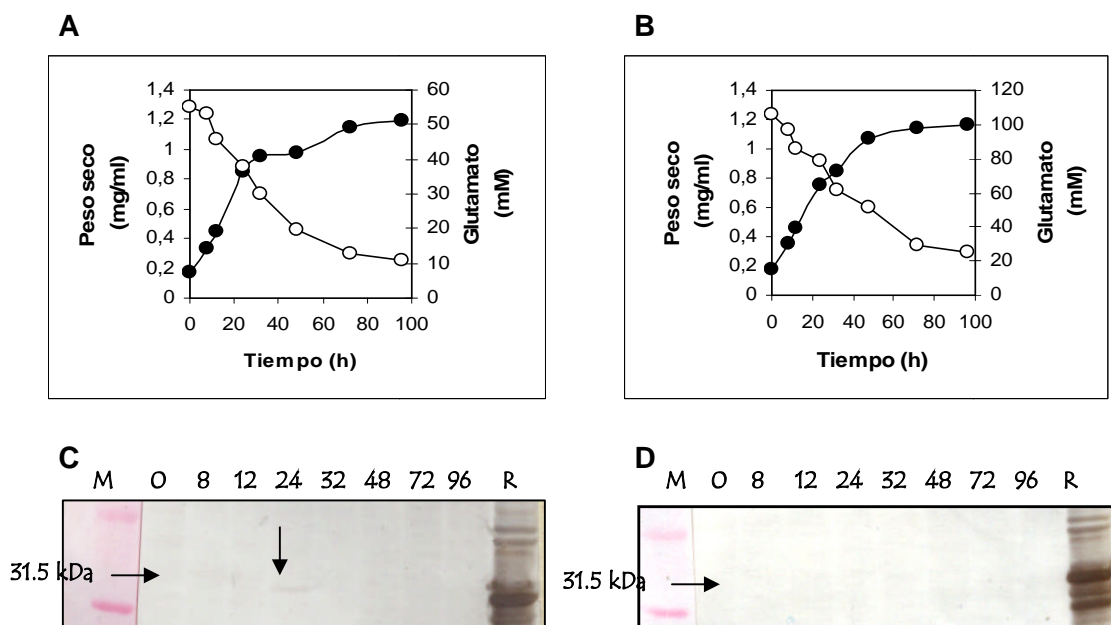


Figura 16. Crecimiento de *S. coelicolor* M145(●) y consumo de sustrato(○) en presencia de 50 mM (A) y 100 mM de glutamato (B). Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo policlonal de conejo anti-SCO2127 contra extractos proteicos de los cultivos obtenidos a 50 mM (C) y 100 mM (D) de glutamato. M: Marcador de peso molecular; R:SCO2127-His₆.

En las figuras 17 A y B se pueden observar las cinéticas de crecimiento y el consumo de sustrato de *S. coelicolor* M145, en cultivos empleando arabinosa (Ara) como fuente de carbono a 50 y 100 mM, respectivamente. En las figuras 17 A y B se observa que en ambas concentraciones del carbohidrato, este no se consumió por completo, en contraste con lo que se observó en glucosa y manitol (Figuras 14 A y 15 A, respectivamente). Asimismo, se puede observar que a una concentración de 100 mM de Ara la biomasa obtenida fue de 2.6 mg/ml de peso seco, mientras que a 50 mM se obtuvieron 1.2 mg/ml de peso seco, indicando que el microorganismo creció un 50% más a 100 mM de Ara a comparación de 50 mM. Mientras que en las figuras 17 C y D, se observan los resultados obtenidos del western blot para cada condición probada y revelados con el anticuerpo policlonal anti-SCO2127, en los cuales se ve que la síntesis de SCO2127 se llevó a cabo durante toda la fermentación, tanto en 50 mM como en 100 mM de Ara.

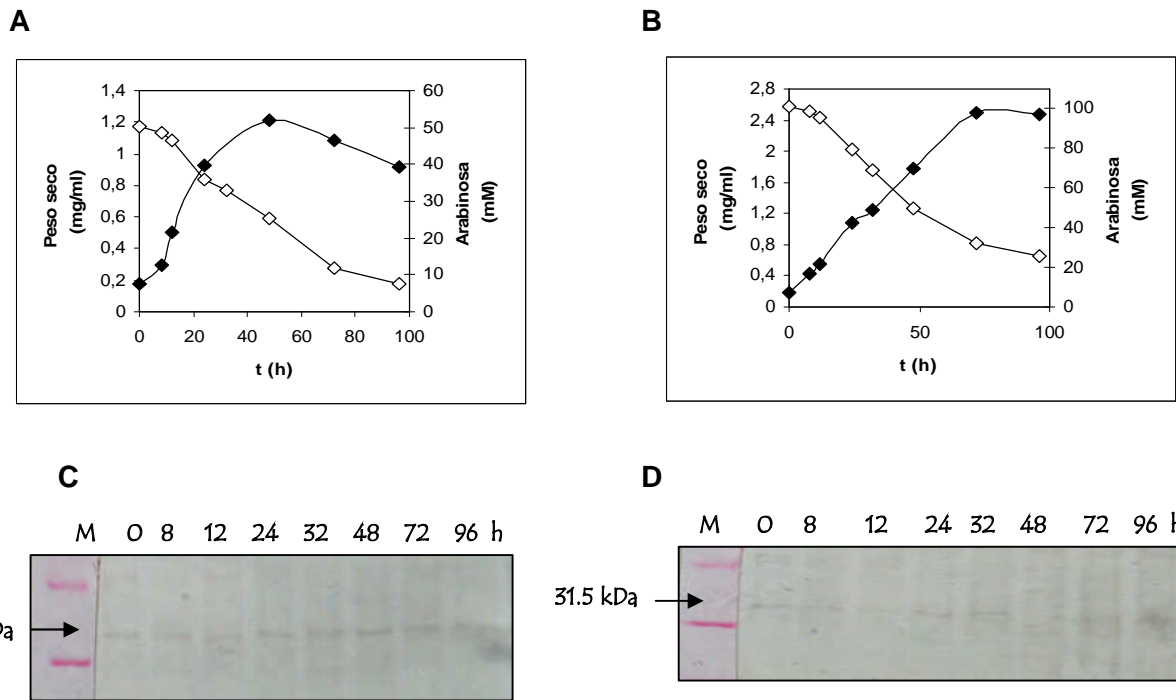


Figura 17. Crecimiento de *S. coelicolor* M145(♦) y consumo de sustrato (◇) en presencia de 50 mM (A) y 100 mM de arabinosa (B). Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo policlonal de conejo anti-SCO2127 contra extractos proteicos de los cultivos obtenidos a 50 mM (C) y 100 mM (D) de arabinosa.

Por otro lado, en la tabla 12 se muestran los parámetros cinéticos de *S. coelicolor* M145 calculados a partir de las cinéticas de crecimiento realizadas bajo cada una de las condiciones probadas, en donde se puede observar que a 50 mM la fuente de carbono a la cual se obtuvo mayor rendimiento de biomasa en base a la utilización de sustrato ($Y_{x/s}$) fue la glucosa, mientras que a 100 mM fue la arabinosa. Asimismo, en ambas concentraciones de sustrato, la fuente de carbono con la que se obtuvo menor rendimiento $Y_{x/s}$ fue el glutamato, sin embargo, las velocidades de consumo de sustrato (q_s) fueron mayores utilizando glutamato a 50 y 100 mM como fuente carbono, sugiriendo que este aminoácido fue utilizado por el microorganismo para obtener energía en lugar de utilizarlo para aumentar su biomasa. Respecto a las velocidades específicas de crecimiento (μ) obtenidas en las diferentes fuentes de carbono, se puede observar que estas fueron similares entre si, sin embargo la velocidad específica de crecimiento menor fue al utilizar 100 mM de Glu, mientras que la mayor fue al utilizar Arabinosa como fuente de carbono en ambas concentraciones.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de <i>S. coelicolor</i> M145 para cada condición						
Fuente de Carbono	μ (h^{-1})		Y x/s		qs	
	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM	50 mM	100 mM
Glucosa	0.063	0.066	0.38	0.155	0.164	0.424
Manitol	0.058	0.063	0.189	0.129	0.307	0.488
Arabinosa	0.076	0.079	0.256	0.213	0.296	0.37
Glutamato	0.057	0.051	0.121	0.067	0.47	0.76

μ = velocidad específica de crecimiento
Yx/s = Rendimiento biomasa-sustrato (g biomasa/g sustrato)
qs = velocidad de consumo de sustrato (g sustrato/g biomasa * h)

7.3. Determinación de la síntesis de *sco2127* utilizando a la proteína verde fluorescente, Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), como gen reportero

7.3.1 Amplificación de la región promotora de *sco2127*

Se llevó a cabo un PCR en gradiente para determinar las condiciones óptimas de amplificación del promotor de *sco2127* (ver metodología). Siendo la temperatura en la que se obtuvo mayor cantidad de amplificado la de 61.2 °C (Fig. 18). Este producto de PCR posteriormente fue clonado dentro del plásmido pIJ8660, utilizando los sitios de restricción *EcoRV* y *XbaI*.

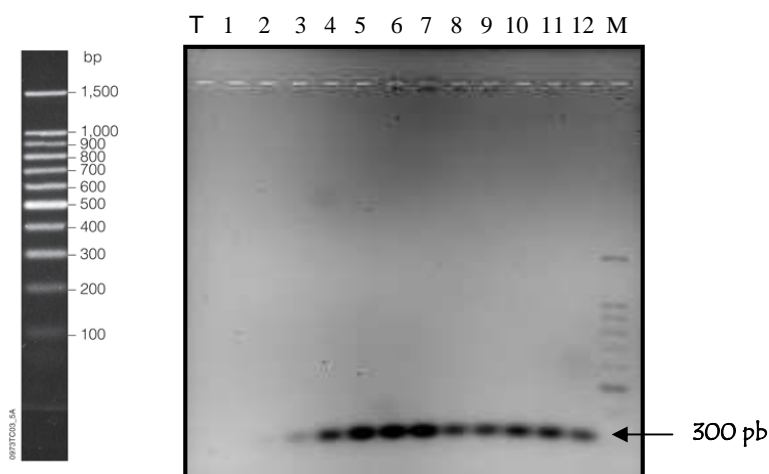


Figura 18. Gel de agarosa al 2% para visualizar el producto de PCR de la región promotora de *SCO2127* para ser clonada en el plásmido pIJ8660. T: Testigo negativo; Carril 1: 72°C; Carril 2: 70.1°C; Carril 3: 68.2°C; Carril 4: 66.3°C; Carril 5: 64.5°C; Carril 6: 62.8°C; Carril 7: 61.2°C; Carril 8: 59.5°C; Carril 9: 57.7°C; Carril 10: 55.8°C; Carril 11: 53.9°C; Carril 12: 52 °C; M: Marcador de peso molecular.

7.3.2. Clonación del promotor en el plásmido pGEM

Antes de clonar el promotor de *sco2127* en pJ8660, el amplificado de dicha región del DNA se introdujo en el plásmido pGEM-T, el cual es específico para clonar productos de PCR, ya que contiene una timidina sin aparear en el extremo 3' de ambas cadenas de DNA. Además de que las colonias transformadas con el plásmido que tiene el inserto pueden ser fácilmente identificadas por el color blanco que presentan (mapa en el anexo K). Una vez que se realizó la reacción de ligación de pGEM con la región promotora de *sco2127*, se prosiguió a transformar con dicha construcción a la cepa de *E. coli* DH5 α , y fueron sembradas en medio LB sólido con IPTG y ampicilina; se incubaron a 37°C durante 18 h, a ocho colonias blancas se les creció en medio líquido y se les extrajo el plásmido, para digerirlo posteriormente con *EcoRI* y liberar el fragmento amplificado. Para observar lo anterior, se realizó un gel de agarosa al 2% (Fig. 19), en donde el carril llamado M corresponde al marcador de peso molecular, los carriles del 1-8 corresponden a las ocho colonias o clonas evaluadas, y los carriles 9 y 10 corresponden al plásmido pGEM sin digerir.

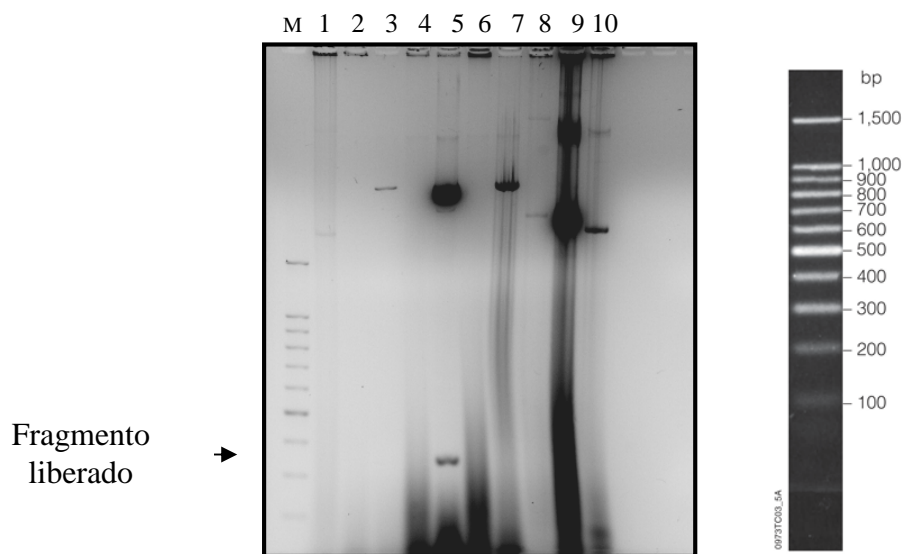


Figura 19. Gel de agarosa al 2% de la digestión con *EcoRI* para liberar el producto de PCR del plásmido pGEM. M: Marcador de peso molecular; Carril 1: Clona 1; Carril 2: Clona 2; Carril 3: Clona 3; Carril 4: Clona 4; Carril 5: Clona 5; Carril 6: Clona 6; Carril 7: Clona 7; Carril 8: Clona 8; Carril 9: pGEM sin digerir; Carril 10: pGEM sin digerir.

Ya que se clonó la región promotora de *sco2127* en pGEM se prosiguió a introducirlo en el plásmido pJ8660, el cual contiene el gen que codifica para la EGFP (Sun y col., 1999). Para esto, se digirió el plásmido pGEM+p2127 con las enzimas *EcoRV* y *XbaI*, y así liberar el inserto. Posteriormente, el producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 2%, y posteriormente se purificó directo del gel utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction de Qiagen®. En la figura 20 se muestra la región promotora purificada a partir de pGEM + p2127 (carril 1).

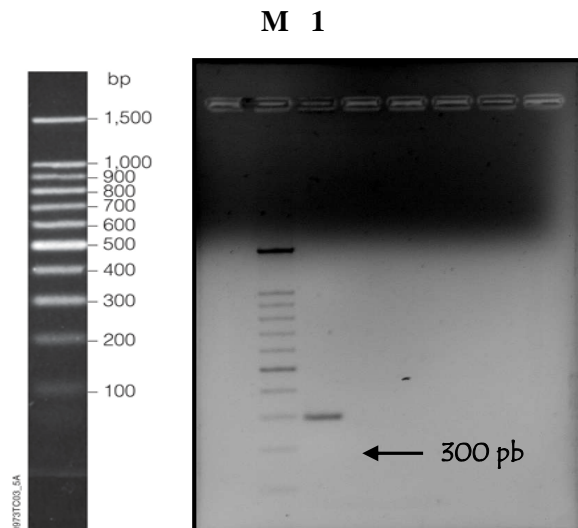


Figura 20. Gel de agarosa al 2% de la región promotora de *sco2127* purificado a partir de gel utilizando el kit Qiagen®. M: Marcador de peso molecular; 1: Región que abarca al promotor de *sco2127*.

Por otro lado, se digirió a pJ8660 con *EcoRV* y *XbaI* (Fig.19).

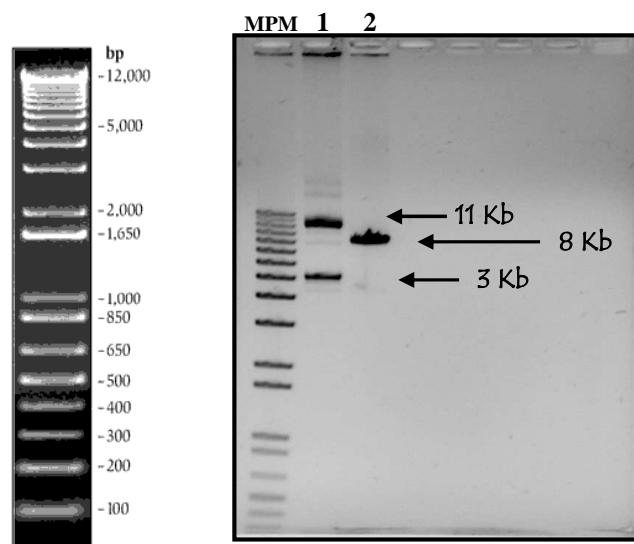


Figura 21. Digestión del plásmido pJ8660 utilizando las enzimas *EcoRV* y *XbaI*. MPM: Marcador de peso molecular; 1: pJ8660 sin digerir; 2: pJ8660 digerido.

Se puede observar que el plásmido no se digirió completamente, a pesar de que se ve la banda de interés (8 Kb), también se observa una de sus conformaciones (3 Kb) por lo tanto, se cortó la banda correspondiente al peso del plásmido (8 Kb) directamente del gel (carril 2) y se purificó utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction de Qiagen®. En el carril 1 de la figura 22 se puede observar el plásmido purificado directo del gel.

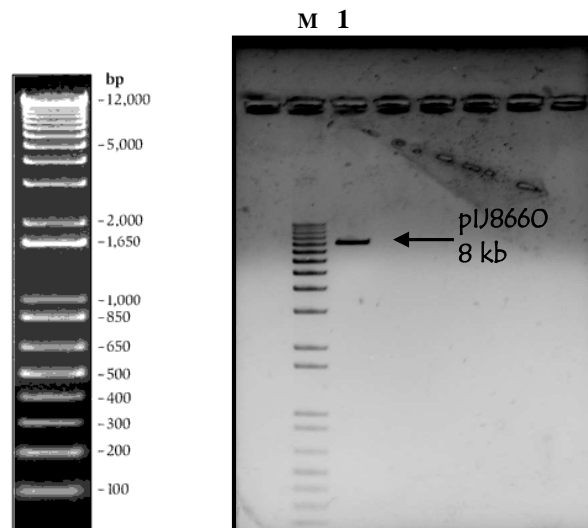


Figura 22. Gel al 0.8% de agarosa que muestra el plásmido pIJ8660 purificado utilizando el kit QIAEXII Gel Extraction de Qiagen®. M: Marcador de peso molecular; 1: pIJ8660.

Una vez purificados el plásmido pIJ8660 y el promotor de *sco2127*, se prosiguió a ligarlos para formar el plásmido pIJ8627, y transformar mediante electroporación a *E. coli* DH5 α con dicho plásmido. La cepa transformada se sembró en 5 ml de LB conteniendo apramicina (50 μ g/ml) y se incubó a 37°C durante 18 horas. Para determinar cuál de estas colonias tenían la construcción deseada, se les extrajo el plásmido y se digirió con *EcoRV* y *XbaI*.

En la figura 23 se observa la digestión con *EcoRV* y *XbaI* del plásmido pIJ8627 obtenido a partir de cuatro colonias de *E. coli* DH5, observándose que en las cuatro se liberó el inserto (carriles 1 – 4), por lo tanto, se escogió a la clona 1 para producir más cantidad de pIJ8627 y transformar a la cepa de *E. coli* ET12567 con dicho plásmido, la cual no metila el DNA. Cabe señalar que se tuvo que hacer esto porque *S. coelicolor* tiene un sistema de restricción metilo-específico muy potente, el cual ocasiona que cuando se le introduce DNA foráneo metilado, éste sea degradado.

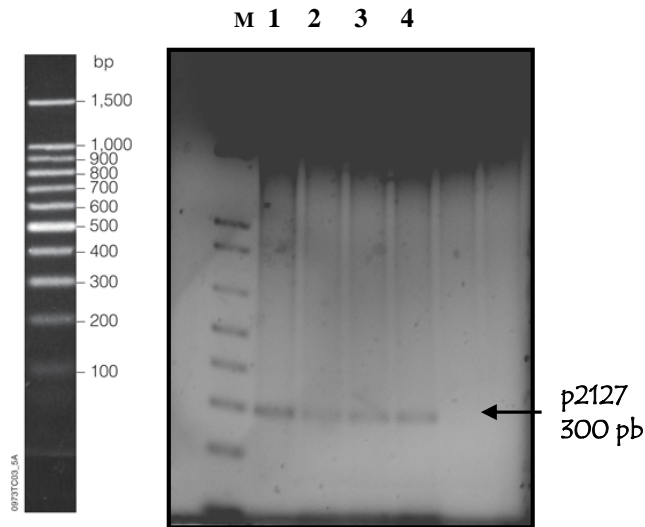


Figura 23. Digestión del plásmido pJ8627 extraído de cuatro diferentes colonias de *E. coli* DH5 α utilizando las enzimas EcoRV y XbaI. M: Marcador de peso molecular; 1-4: pJ8627 extraído y digerido a partir de las colonias de *E. coli* DH5 α 1-4 respectivamente.

En la figura 24 se muestra la extracción del plásmido pJ8627 a partir de diez colonias de *E. coli* ET12567, en donde los carriles 1 – 10 corresponden a las colonias nombradas 1 -10, respectivamente.

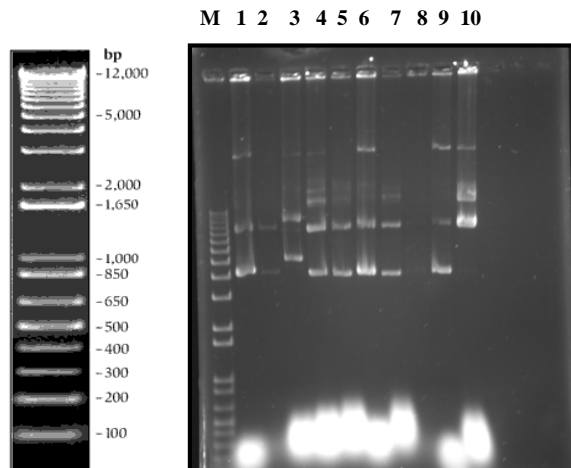


Figura 24. Miniprep realizado para extraer el plásmido pJ8627 a partir de colonias de *E. coli* ET12567. M: Marcador de peso molecular; Carril 1 a 10: colonias 1 a10 respectivamente.

Una vez extraído el plásmido se digirió con *EcoRV* y *XbaI*, pero después de la digestión en el gel se observó degradación del DNA, probablemente porque el DNA no se encontraba metilado, ocasionando que las enzimas de restricción realizaran cortes inespecíficos, degradando el DNA (Fig. 25).

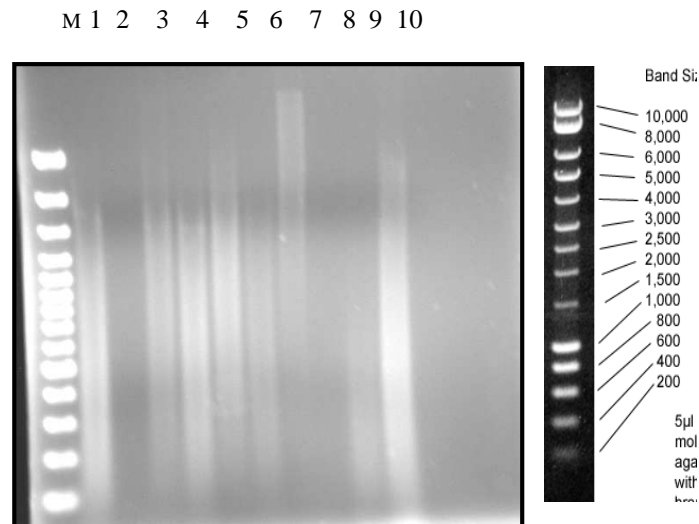


Figura 25. Gel de agarosa al 0.8%, que muestra las digestiones realizadas al plásmido pIJ8627 extraído de *E. coli* ET12567. M: Marcador de peso molecular; Carril 1 a 10: colonias 1 a 10 respectivamente.

7.3.3 Expresión de la EGFP

Una vez transformada a la cepa de *E. coli* ET12567 con el plásmido pIJ8627 éste se le introdujo a *S. coelicolor* M145 mediante conjugación (Hopwood y col., 1985), se seleccionaron las exconjugantes de *S. coelicolor* (SMP27) con apramicina y se realizó un western blot de los extractos proteicos intracelulares de dicha cepa crecida en NMMP con 100 mM Glc y 48 h de cultivo, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP para evidenciar la expresión del reportero.

La figura 26 muestra que en las tres colonias probadas de la cepa SMP27, se expresó la EGFP a 100 mM de Glc, la diferencia entre 1 y 2 es que la proteína de los carriles 1 tiene 30 días más de almacenamiento mientras que los carriles 2 son extractos proteicos obtenidos el mismo día de haber hecho el gel SDS-PAGE 10%. Este resultado indica que hubo degradación de la muestra proteica por almacenamiento ya que la señal es menos intensa en las muestras 1 que en las 2.

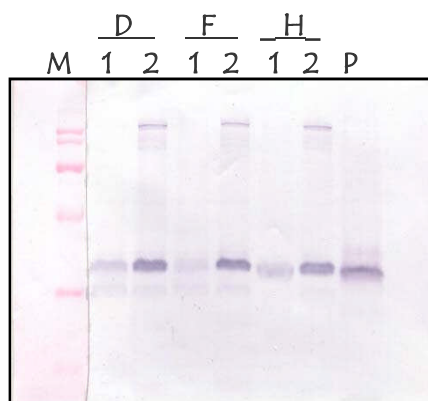


Figura 26. Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo monoclonal anti-GFP contra extractos proteicos de tres exconjugantes SMP27(D, F y H) cultivadas 48 h en medio NMMP con 100 mM de Glc; P: GFP-His₆; M: Marcador de peso molecular.

Con el fin de comparar los resultados de la expresión de la región *sco2127*, empleando el gen de la EGFP como reportero, con los observados de *S. coelicolor* M145 empleando el anticuerpo policlonal anti-SCO2127, se llevó a cabo un western blot con los extractos proteicos obtenidos de la cepa SMP27 crecidos en Glc, Mtl, Ara y Glu como fuentes de carbono a las 24 y 32 horas de crecimiento (Fig. 26). Pudiéndose observar que la expresión de la EGFP se llevó a cabo en todas las fuentes de carbono, inclusive en glutamato, en donde se observa una señal considerable comparada con la encontrada a las 24 horas utilizando los anticuerpos policlonales (Fig. 16C).

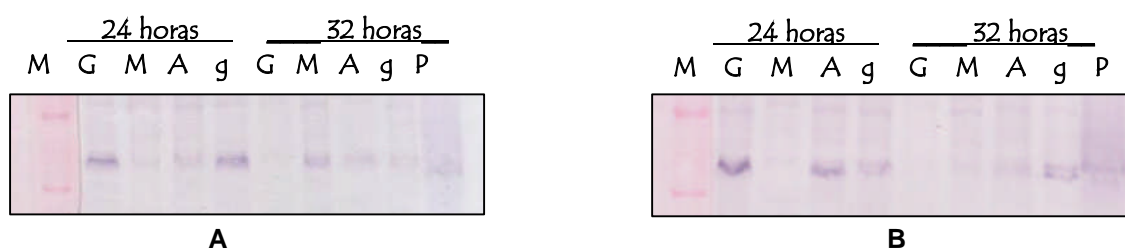


Figura 27. Ensayo de western-blot mostrando la reacción del anticuerpo monoclonal anti-GFP contra extractos proteicos de los cultivos obtenidos a las 24 y 32 h de crecimiento 50 mM (A) y 100 mM (B) de Glc (G), Mtl (M), Ara (A), glu (g); P: GFP-His₆; M: Marcador de peso molecular.

8. DISCUSIÓN

Con el fin de conocer bajo qué condiciones se lleva a cabo la expresión de *sco2127* y su posible correlación con el fenómeno de RCC, en este trabajo se empleó la metodología de western blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-SCO2127. Los resultados obtenidos sugieren que SCO2127 es sintetizado en la fase logarítmica de crecimiento guardando una correlación estrecha con la concentración de glucosa (Glc) presente en el medio de fermentación, ya que a 50 mM de glucosa, condición no represora, la señal de la proteína en el western-blot disminuyó conforme la concentración de Glc iba disminuyendo (Fig. 14 A y C), mientras que a 100 mM, condición represora, esta señal se mantuvo más o menos constante (Fig. 14 D), considerando que en este último caso la Glc no se consumió por completo (Fig. 14 B).

Por otra parte se evaluó el efecto de otras fuentes de carbono sobre la formación de SCO2127. Estas fuentes incluyeron al manitol (Mtl), por ser considerado como una fuente de carbono no represora, a la arabinosa (Ara) y glutamato (Glu), ya que ambos son metabolizados por una vía diferente a la glucólisis, en donde el primero se metaboliza a través de la vía de las pentosas y el segundo entra al metabolismo al nivel del ciclo de Krebs. Todas las fuentes de carbono se probaron en concentraciones de 50 y 100 Mm, para comparar los resultados con los obtenidos con Glc. Asimismo, para éste estudio se utilizó además del anticuerpo policlonal anti-SCO2127, un gen reportero (EGFP) conteniendo el promotor del sistema que codifica para SCO2127.

Se puede observar en las cinéticas de crecimiento y en los ensayos de expresión de *sco2127* realizadas en cada una de las fuentes de carbono y utilizando el anticuerpo policlonal anti-SCO2127, que la expresión de dicha región se llevó a cabo a lo largo de toda la fermentación utilizando glucosa, manitol y arabinosa como fuentes de carbono (Fig. 14, 15 y 17, respectivamente), a 50 y 100 mM. Mientras que al utilizar 50 mM de Glu se observó una señal a las 24 h de crecimiento, no así a 100 mM de Glu, condición bajo la cual no se observó síntesis de SCO2127 a lo largo de todo el crecimiento (Fig. 16 D).

Respecto a los resultados de la síntesis de SCO2127 obtenidos en Glc, se tiene como antecedente que en mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* la complementación de dichas mutantes con el gen *sco2127* hizo que se restableciera la actividad de la Glk y del transporte, en valores mayores a los de la cepa silvestre, recuperando así la sensibilidad al

fenómeno de RCC, y dado que la Glc es una fuente de carbono preferencial y que se sabe ejerce RCC sobre la utilización de varias fuentes de carbono secundarias, se esperaba que SCO2127 estuviera presente cuando al microorganismo se le hiciera crecer en esta fuente de carbono. Sin embargo, puede observarse que a 50 mM de Glc la expresión de SCO2127 presentó mayor intensidad en las primeras 12 h de crecimiento, y comenzó a disminuir a partir de las horas subsecuentes de crecimiento. Lo cual concuerda con la disminución de sustrato presente en el medio, pues podemos observar que después de las 48 horas de crecimiento la Glc residual disminuye rápidamente hasta llegar a agotarse por completo, mientras que utilizando una concentración de 100 mM de glucosa la intensidad en la señal de la banda correspondiente a SCO2127 se mantiene más o menos constante a lo largo de toda la fermentación, además de que en esta condición la Glc no se llegó a consumir por completo, observándose que el crecimiento sigue aumentando lentamente. Lo anterior sugiere que la expresión de *sco2127* está influida por la concentración de Glc presente en el medio.

En cuanto a los resultados de expresión obtenidos utilizando Mtl como fuente de carbono, se observa que de manera similar a Glc, a 50 mM, la síntesis de SCO2127 fue mayor durante las primeras 24 horas de crecimiento comenzando a disminuir cuando la concentración de Mtl residual disminuye rápidamente (Fig. 15 C). Mientras que a 100 mM se observa más o menos constante (Fig. 15 D). Por lo que se puede afirmar, que la expresión de *sco2127* también se ve influida por la concentración de Mtl presente en el medio. Asimismo, respecto al crecimiento y al igual que en Glc, en 50 mM de Mtl a las 96 horas se observa una fase de muerte (Fig. 15 A), no así para 100 mM, en donde el cultivo se encuentra en fase estacionaria (Fig. 15 B). Debido a que el Mtl es considerado por algunos autores como una fuente de carbono no represora (van Wezel y col., 2007), en este trabajo se tomó como un control para la expresión de SCO2127, en donde se esperaba que no hubiera síntesis de dicha proteína, sin embargo, otros autores han visto que el Mtl es capaz de ejercer RCC para la producción de agarasas, enzimas necesarias para metabolizar agar como fuente de carbono (Kwakman & Postma, 1994), por lo que es probable que se observe la síntesis de SCO2127 utilizándolo como fuente de carbono. Además, se sabe que éste puede funcionar como un sustrato que da mucha energía a la célula (Graefe y col., 2003) y en bacterias Gram (+) de bajo contenido de guanina y citosina, el metabolismo del Mtl ya ha sido reportado, en donde el sistema PTS se encuentra involucrado y entra al metabolismo vía glicólisis al nivel de fructosa-6-fosfato (Gaspar y col., 2004; Olubolaji y col., 2008). A pesar de que en el género *Streptomyces* el sistema de PTS sirve para transportar N-acetilglucosamina (Rigali y col., 2006), estos antecedentes nos dan una aproximación de la

manera en que este género podría metabolizar a este polialcohol y dado que entra al metabolismo a nivel de fructosa-6-fosfato, sugiere que esta sea la razón por la cual, este azúcar pueda generar represión sobre la producción de agarasas.

Por otro lado, y refiriéndonos a los resultados obtenidos utilizando Ara como fuente de carbono, se puede observar que a 50 mM después de las 48 horas de crecimiento, el cultivo comenzó a morir teniendo aún presente en el medio una concentración de Ara alrededor de 25 mM (Fig.17 A), mientras que a 100 mM de Ara el cultivo a las 96 h se encontraba en fase estacionaria con una concentración de Ara residual final de aproximadamente 28 mM (Fig.17 B), señalando que bajo ninguna de las concentraciones probadas la Ara se consumió por completo. Respecto a la expresión del gen *sco2127*, se evidenció la presencia constante de su producto proteico a lo largo de toda la fermentación empleando ambas concentraciones de Ara (Fig. 17 C y D).

En cuanto a los resultados obtenidos utilizando glutamato (Glu) como fuente de carbono, se puede ver que a 50 mM a las 24 horas de cultivo se observó síntesis de SCO2127, mientras que, utilizando 100 mM de Glu no se observó síntesis de la proteína durante toda la fermentación. Cabe mencionar que al utilizar Glu como fuente de carbono, el cultivo de *S. coelicolor* comenzó a lisarse a las 48 h, por lo que la expresión que se ve a las 24 horas con 50 mM podría ser ocasionada por un posible estrés nutricional, ya que ocho horas después (32 h) el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento, ocasionando que a las 48 h comience la lisis celular, causando además que se obtuviera el menor $Y_{x/s}$. También, a partir de las 24 h de crecimiento se observó producción de actinorrodina, uno de los cuatro metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*, evidenciada por el vire del color del medio de cultivo al pasar de un color incoloro a uno de coloración azul-marino, y su producción temprana evidenciada a partir de las 24 h a comparación con las demás fuentes de carbono utilizadas en donde se comenzó a visualizar su producción a las 72 h de crecimiento, apoya la teoría de que el cultivo se encontraba bajo alguna situación de estrés, pues se sabe que la síntesis de metabolitos secundarios se da bajo alguna condición de estrés. Mientras que utilizando 100 mM de Glu, no se observó síntesis de SCO2127 a lo largo del crecimiento, sin embargo, este resultado podría sugerir que bajo esta concentración de aminoácido resultado las células se encontraban bajo un estrés menor comparado al utilizar 50 mM Glu, ya que a las 24 h se tenía una concentración aproximada de 80 mM Glu, mientras que se veía una producción de actinorrodina menor pues el medio de cultivo presentaba una coloración azul más tenue que la que presentaba el cultivo a 50 mM, señalando que había mayor disponibilidad del sustrato (Fig. 16 B), y quizá menor

condición de estrés, explicando así que a 100 mM de glutamato la proteína no se expresara y que en esta condición sea necesario que se susciten varios factores para que se exprese, pues ha sido evidenciado el efecto pleiotrópico que SCO2127 tiene en el género *Streptomyces* (Guzmán y col., 2005a). Sin embargo, cabe la posibilidad de que la síntesis de SCO2127 a 100 mM de Glu fuera tan baja que bajo las condiciones en las que se realizó el western-blot, ésta no haya podido evidenciarse mediante el uso del anticuerpo policlonal anti-SCO2127, ya que los resultados obtenidos al emplear el sistema del gen reportero (EGFP) indicaron otra cosa que más adelante se señala.

Por otro lado, se utilizó el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) como reportero para evaluar la síntesis de SCO2127 de manera indirecta, ya que la expresión de la EGFP estuvo bajo el control del promotor de *sco2127*, teniendo así dos métodos por los que se puedan evidenciar bajo qué condiciones se expresa SCO2127 además de poder compararlos entre sí. Utilizando a la cepa de SMP27, se observa que hay reproducibilidad de resultados en cuanto a la expresión de la proteína EGFP en presencia de cada una de las fuentes de carbono utilizadas, a las 24 y 32 horas de crecimiento. Sin embargo, la señal de expresión en presencia de glutamato a las 24 horas es más evidente a comparación de los resultados obtenidos utilizando el anti-SCO2127His₆, lo cual podría indicar que SCO2127 también se exprese en glutamato, pero que en la cepa de *S. coelicolor* M145 los niveles de expresión hayan sido tan bajos que no se haya detectado señal utilizando el anticuerpo policlonal anti-SCO2127, mientras que con la cepa SMP27 sí se haya logrado evidenciar dicha expresión. Cabe señalar que comparando la secuencia del promotor de *sco2127* con otros promotores, este es similar a los promotores del género *Streptomyces* que están agrupados dentro de los reconocidos por el factor σ^{70} de la RNA polimerasa de *E. coli*, los cuales comprenden a genes de tipo housekeeping o de mantenimiento (Strohl W., 1992). Sin embargo, otra posible razón que podría ocasionar esto, y dado que se ha visto que *sco2127* presenta un efecto pleiotrópico sobre el transporte de Glc, la actividad de la Glk y la RCC (Guzmán y col., 2005a), la proteína SCO2127 podría funcionar como una proteína sensora capaz de detectar la disponibilidad de algún tipo de nutriente que le sirva a la célula como fuente de carbono y/o energía, pues se ha encontrado que SCO2127 es similar en la secuencia de aminoácidos a los miembros de una familia de dominios denominado CHASE3 que forma parte de diferentes proteínas sensoras tales como: histidincinasas, adenilato ciclasas, entre otras, y que les sirve para reconocer citocinas y pequeños péptidos que son importantes para desencadenar el programa de desarrollo de varios organismos (Zhulin y col., 2003). Teniendo en cuenta lo anterior y considerando la capacidad que tiene SCO2127

de unirse a otras proteínas, se podría sugerir que SCO2127 cuando detecta una limitación de nutrientes, se une a alguna proteína, tal como BldkB (Chávez y col., en preparación) desencadenando una cascada de señalización para dar comienzo a la formación del micelio aéreo, el cual se sabe que comienza a formarse cuando el microorganismo se encuentra bajo una condición de escasez de nutrientes. Lo anterior concuerda con lo reportado en sistemas de quórum sensing de bacterias Gram (+) para llevar a cabo una expresión de genes controlada utilizando oligopéptidos modificados como autoinductores (Wai-Leung y col., 2009). Sin embargo, cuando la célula se encuentra en condiciones nutrimentales favorables, SCO2127 podría generar de alguna manera la señal necesaria para activar el transporte de los sustratos disponibles o la actividad de enzimas necesarias para llevar a cabo el metabolismo de dichos sustratos, ocasionando que se formen los metabolitos clave para ejercer la RCC, ya que se ha visto que la región *sco2127* estimuló la actividad de la Glk y el transporte de glucosa y galactosa en mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius*, (Guzmán y col., 2005b). Además, debido a que SCO2127 en un gel SDS-PAGE presenta un peso molecular de alrededor de 31.3 kDa, peso molecular mayor al teórico reportado de 20.1 kDa por Angell y col., en 1992, sugiere que la proteína puede sufrir alguna modificación post-traducciona, que no se evidencia al ser sobreexpresada en *E. coli*, por lo que se tendrían que hacer estudios en donde se logre dilucidar esto.

De acuerdo a los resultados de expresión de la región *sco2127*, en presencia de Glc, Mtl y Ara como fuentes de carbono, y dado que la Glc y el Mtl, convergen en la glucólisis a nivel de fructosa-6-fosfato, y que la arabinosa es una fuente de carbono que se metaboliza por medio de la vía de las pentosas, se puede decir que la expresión de dicha proteína está probablemente influida no solo por la naturaleza de la fuente de carbono utilizada, sino también por la presencia de algún catabolito producto del catabolismo de carbohidratos, ya que en los western-blots realizados con 100 mM de Glu como fuente de carbono, no se observó síntesis de SCO2127.

Con todo lo anteriormente mencionado, se propone lo esquematizado en la figura 28, en donde en presencia de sustratos disponibles SCO2127 detecte esta condición favorable para la célula, ya sea por la formación de algún catabolito, ocasionando que se activen permeasas específicas o enzimas implicadas en el metabolismo del sustrato. Mientras que, una vez que disminuya la concentración del catabolito, podría generarse la señal necesaria para que SCO2127 interactúe con otro tipo de proteínas capaces de desencadenar una cascada de señalización que culmine con el inicio de la formación del micelio aéreo, lo cual

se sabe ocurre cuando la célula se encuentra en un ambiente en donde haya limitación de nutrientes (Flärdh K. & Buttner J., 2009).

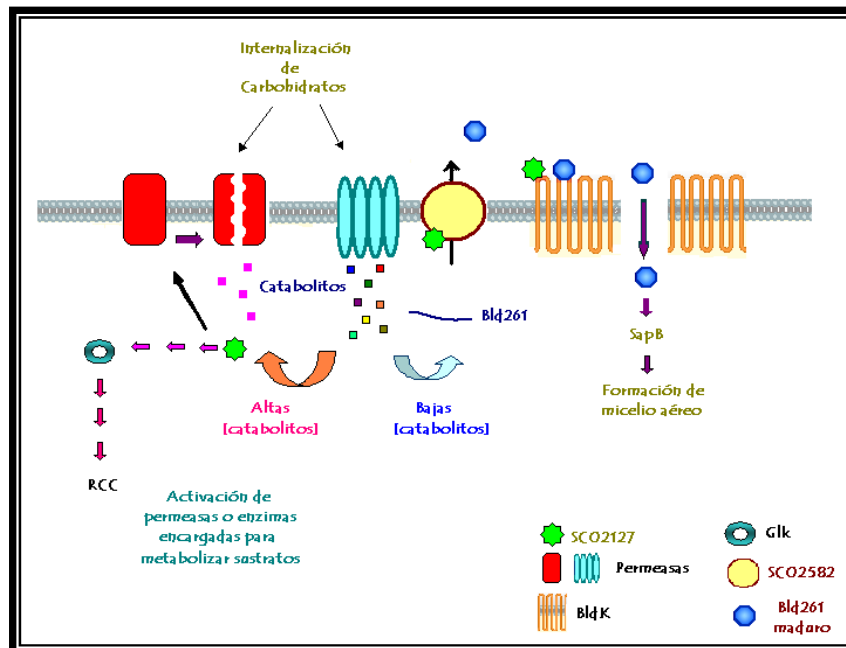


Figura 28. Posible mecanismo de acción de SCO2127. Al haber sustratos disponibles, éstos son internalizados por la célula para metabolizarlos, los catabolitos o intermediarios clave que se forman sirven como señal para que SCO2127 desencadene una serie de reacciones que culminen con la activación de permeasas y/o enzimas encargadas de introducir y de metabolizar los sustratos disponibles, ocasionando que se lleve a cabo la RCC. Una vez que la concentración de estos catabolitos disminuye, las condiciones para el microorganismo son adversas, generando la señal que provoca que SCO2127 interactúe con proteínas involucradas en la formación de micelio aéreo tales como SCO2582 y Bld261.

Puesto que SCO2127 podría actuar como una proteína sensora de nutrientes, explicaría el por qué se sintetiza de manera constitutiva, bajo todas las fuentes de carbono, sin embargo, dado que la señal en los western-blot realizados en condiciones de Glc y de Mtl a las primeras 32 horas de crecimiento es mayor a comparación de las mostradas por Ara y Glu, se indica su relación con el fenómeno de RCC ejercido por estas dos fuentes de carbono, pues al tener mayor cantidad de moléculas de SCO2127 implique que se aumente la señal a la célula de que se encuentra en un estado nutricional óptimo, sin embargo, se tendrían que hacer estudios cuantitativos al respecto para tratar de confirmar esto.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a lo discutido anteriormente se puede concluir que:

- La síntesis de la región *sco2127* no se llevó a cabo solamente a etapas iniciales del crecimiento, sino durante todo el crecimiento, y con las cuatro fuentes de carbono empleadas en este trabajo, por lo que se puede decir que se trata de un gen constitutivo.
- Debido a la intensidad de señal observada en los western-blot empleando 50 mM de Glc y Mtl como fuentes de carbono, la síntesis de la región *sco2127* parece estar influida por la concentración de dichos sustratos.
- Sin embargo, utilizando glutamato como fuente de carbono la síntesis de SCO2127 parece ser tan baja que no se logra detectar empleando el anticuerpo policlonal anti-SCO2127 y sí empleando el gen reportero.
- SCO2127 podría participar como una molécula sensora de nutrientes en la fisiología de *S. coelicolor*.

10. PERSPECTIVAS

Dado que este trabajo contribuye solo con una pequeña aproximación al conocimiento de la regulación de la síntesis de la región *sco2127*, se podrían realizar:

- Estudios de la secuencia promotora, con el fin de identificar sitios probables de interacción con factores de transcripción, y así conocer un poco más acerca de la naturaleza del promotor.
- Estudios de la localización *in vivo* de la proteína SCO2127 mediante la construcción de una proteína de fusión EGFP-SCO2127.
- Estudios con el objetivo de saber si SCO2127 sufre alguna modificación post-traducciona (fosforilación, acetilación, etc.).

11. REFERENCIAS

1. Angell S, Schwarz E y Bibb MJ. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844.
2. Angell S, Lewis CG, Buttner MJ y Bibb MJ. 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen Genet.* 244: 135 – 143.
3. Beppu, 1992. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriology.* 174: 7585-7594.
4. Bibb MJ. 1996. The regulation of antibiotics production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 142: 1335-1344.
5. Brückner R y Titgemeyer F. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett.* 209, 141-148.
6. Chater, 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol.* 47: 685-713.
7. Chávez A, García – Huante Y, Ruiz B, Langley E, Rodríguez – Sanoja R, Sánchez S. 2009. Cloning and expression of the *sco2127* gene from *Streptomyces coelicolor* M145. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36 (5): 649 – 54.
8. Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT. 2010. Current Protocols in Protein. *John Wiley and Sons, Inc.* 10.1
9. Delic I, Robbins P y Westpheling J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1885-1889.
10. Demain AL. 1989. Carbon source regulation of idiolite biosíntesis in actynomicetes. In *Regulation of Secondary Metabolism in Actynomicetes*, pp. 127-131. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
11. Demain AL. 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33 (7): 486 – 95.
12. Embley TM y E. Stackebrandt, 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 257-289.
13. Flärdht K. & Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature.* 7:36 – 49.

14. Gaspar P., Rute Neves A., Ramos A., Gason JM., Shearman CA. y Santos H. 2004. Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in Lactato dehydrogenase and the mannitol transport system. *Applied and Enviromental Microbiology*. 70 (3):1466 – 1474.
15. Goodfellow M, Ferguson EV, Sanglier. 1992. Numerical classification and identification of *Streptomyces* species--a review. *Gene*. 115: 225 – 33.
16. Görke B & Stülke J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*. 6 (8): 613 – 24.
17. Graefe H., Gütschow B., Gehring H. y Dibbelt L. 2003. Sensitive and specific photometric determination of mannitol in human serum. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41(8):1049 – 1055.
18. Guzmán S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, López R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sánchez S y Langley E. 2005a. Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*. 151: 1717-1723.
19. Guzmán S, Ramos I, Moreno E, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Escalante L, Langley E y Sánchez S. 2005b. Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 200-206.
20. Hendrik Graefe, Barbara Gütschow, Hartmut Gehring y Leif Dibbelt. 2003. Sensitive and specific photometric determination of mannitol in human serum. *Clin Chem Lab. Med.* 41 (8): 1049 – 1055.
21. Hobbs, G., Obanye A.I.C. Petiy, J., Clark-Mason, J., Barratt, E., Gardner, D.C.J., Flett, F., Smith, C.P., Broda, P., and Oliver, S.G. 1992. An Integrated Approach to Studying Regulation of Production of the Antibiotic Methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bacteriol* 174: 1487-1494.
22. Hodgson DA. 1980. Carbohydrate utilization in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Norwich: Ph.D. Thesis , University of East Anglia, UK.
23. Hodgson DA.1982. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol.* 128: 2417-2430.
24. Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ. 1995a. Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology*. 28:65-102.
25. Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM & Schrempf H. 1995b. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation.

26. Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ, Chater KF. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.
27. Kieser T, Chater KF, Bibb MJ, Buttner MJ y Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. 2-33.
28. Kwakman & Postma. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 176 (9): 2694 – 8.
29. Martin JF y Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews.* 44: 230-251.
30. Miyashita K, Fujii T y Sawada Y. 1991. Molecular cloning and characterisation of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *Gene.* 137: 2065-2072.
31. Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M, Titgemeyer F. 2003. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J Bacteriol.* 185 (23): 7019 – 23.
32. Olubolaji A., Reza K. y Patrick CC. 2008. *Current Opinion in Biotechnology.* 19: 461 – 467.
33. Pope MK, Green B y Westpheling J. 1998. The *bldB* gene encodes a small protein required protein required for morphogenesis, antibiotic productions, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180: 1556-1562.
34. Ramos I, Guzmán S., Escalante L., Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S y Langley E. 2004. Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 155: 267-274.
35. Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. 2006. The sugar phosphotranferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR–family Regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 61 (5): 1237 – 51.
36. Robbins PW, Overbye K, Albright C, Benfield B y Pero J. 1992. Cloning and high-level expression of chitinase-encoding gene of *Streptomyces plicatus*. *Gene* 111: 69-76.
37. Saier MH. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *New Biologist* 3: 1137-1147.
38. Saier MH, Jr. Chauvaux S, Deutcher J, Reizer J y Ye JJ. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in Gram-negative versus Gram-positive bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 20: 267-271.

39. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: *Molecular Cloning*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press, pp. 7.43 – 7.45.
40. Seno ET y Chater KF. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen Microbiol.* 129: 1403-1413.
41. Smith CP y Chater KF. 1988. Structure and controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J. Mol. Biol.* 204: 569-580.
42. Strohl William R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research.* 20 (5): 961 – 974.
43. Stülke J y Hillen W. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 195-201.
44. Sun J, Kelemen GH, Fernández Ávalos JM, Bibb MJ. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 145: 2221 – 7.
45. Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuver MH y Saier MH. 1995. Identification and characterization of the phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system in three *Streptomyces* species. *Microbiology.* 141: 51-58.
46. Titgemeyer F & Hillen W. 2002. Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82 (1 – 4): 59 – 71.
47. Trumbly RJ. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 15-21.
48. van Wezel GP, Mahr K, König M, Traga BA, Pimentel-Schmitt EF, Willimek A y Titgemeyer F. 2005. GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 55: 624-636.
49. van Wezel GP, König M, Mahr K, Nothaft H, Thomae AW, Bibb M, Titgemeyer F. 2007. A new piece of an old-jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport –dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12: 67 – 74.
50. Vining LC. 1992. Secondary metabolism inventive evolution and biochemical diversity. *Gene.* 115 (1-2): 135-140.
51. Virolle MJ y Bibb MJ. 1988. Cloning, characterization and regulation of an α -amilase gene from *Streptomyces limosus*. *Mol. Microbiol.* 2: 197-208.
52. Wai-Leung Ng y Bonnie L. Bassler. 2009. Bacterial quorum - sensing network architecture. *Annu. Rev. Genet.* 43: 197 – 222.

53. Wang F, Xiao X, Saito A y Schremp H. 2002. *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of *N*-acetylglucosamine. *Mol. Genet. Genomics*. 268: 344-351.
54. Zabarovsky ER y Winberg G. 1990. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* 18 (19): 5912.
55. Zhulin IB, Nikolskaya AN, Galperin MY. 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in *Bacteria* and *Archaea*. *Journal of Bacteriology*. 185 (1): 285 – 294.

ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO

A1. Medio Luria-Bertani (LB) para crecer a *E. coli* (Sambrook, 1989)

Compuesto	Cantidad (g/l)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10

Para medio LB sólido en cajas Petri se agrega agar al 1.5%.

Para medio LB con ampicilina la concentración final de ésta debe ser de 100 µg / ml.

A2. Medio SOC para electroporación (Sambrook y col., 1989)

Compuesto	Concentración
Tristona	2%
Extracto de Levadura	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
Mg ₂ Cl	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

A3. Medio RPMI-1640 para preparar 1 L

Complementos:

2 g de bicarbonato de sodio

2 g de HEPES

0.2 g de Ampicilina

16 ml de L-Glutamina 200 mM

1 ml β-mercaptoetanol 50 mM

10 ml de aminoácidos esenciales 100X (GIBCO)

0.2 g piruvato de sodio o 18.2 ml de piruvato de sodio 100 mM

1 ml de tilosina 1000X

Ajustar el pH a 6.8

Aforar a 1L con agua miliQ

Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm

Almacenar en frascos estériles y guardar a 4 °C

A4. Medio TSB (Kieser y col., 2000)

Triptona de soya 30 g
Agua destilada 1000 ml

A5. Medio NMMP (Kieser y col., 2000)

Reactivo	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Difco Casaminoacidos	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.6 g
PEG 6000	50 g
Solución de elementos menores	1 ml
Agua destilada	800 ml

Solución de elementos menores

Reactivo	g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	1
CaCl ₂	1

Al momento de usar agregar:

15 ml de buffer NaH₂PO₄/K₂HPO₄ (0.1 M, pH 6.8)
2.5 ml Fuente de carbono (20%)*

*En este trabajo lo que se hizo fue preparar una solución stock 1M de la fuente de carbono a utilizar y se agregó el volumen necesario para tener la concentración deseada.

ANEXO B. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SCO2127-His₆

B1. Crecimiento e inducción de la cepa

1. Inocular 500 ml de medio LB con 50 ml de un cultivo de *E. coli* M15 crecido durante 16 horas cultivo.
2. Monitorear la DO₆₀₀ hasta alcanzar 0.5 unidades.
3. Adicionar arabinosa necesaria para tener una concentración de 0.2% en el cultivo (inducción del cultivo).
4. Después de 2 horas de crecimiento, centrifugar a 16000 rpm/ 15 min en frío.
5. Recuperar el pellet y agregarle una solución de inhibidor de proteasas (5:1000).
6. Sonicar las células (Anexo E).
7. Recuperar el sobrenadante.

B2. Preparación de la columna de sefarosa niquelada

1. Tomar 1 ml de solución de sefarosa niquelada (GE Healthcare BioSciences AB)
2. Centrifugar (4000 rpm / 2 min)
3. Desechar el sobrenadante
4. Agregar 5 volúmenes de Start buffer (20 mM KH₂PO₄; 0.5 M NaCl; 30 mM Imidazol)
5. Agitar suavemente
6. Centrifugar igual que en 2
7. Decantar y añadirle el extracto de proteínas
8. Dejar en contacto toda la noche a 4°C

B3. Purificación de SCO2127

1. Después de dejar en contacto toda la noche, centrifugar a 2400 rpm/3min
2. Obtener el sobrenadante correspondiente a proteínas no adsorbidas
3. Agregar a la sefarosa 5 volúmenes de buffer de lavado (20 mM KH₂PO₄; 0.5 M NaCl; 50 mM Imidazol)
4. Agitar suavemente
5. Centrifugar la muestra a 2400 rpm/3min, decantar
6. Estos últimos 4 pasos se repiten 9 veces más
7. Almacenar los lavados 1, 5 y 10
8. Agregar 3 vol de buffer de elución (20 mM KH₂PO₄; 0.5 M NaCl; 300 mM Imidazol)
9. Agitar suavemente durante 5 min
10. Centrifugar la muestra a 2400 rpm/3min, y guardar el sobrenadante
11. Repetir esto 4 veces más

ANEXO C. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI- SCO2127

C1. ELISA para la determinación anticuerpos

1. SCO2127 se diluye con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS1X pH 7.2, para tener una concentración en el intervalo de 10 µg/ml. Se sensibilizan los pozos de poliestireno con un volumen de 100 µl de la solución de SCO2127.
2. Se incuba la placa de ELISA a 4 °C durante toda la noche.
3. Se elimina la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
4. La placa se lava 3 veces con 200 µl/pozo con la solución salina de fosfatos 1X y Tween 20 (0.05%), durante 5 min cada lavado; entre cada uno se sigue el paso 3.
5. Agregar a la placa 200 µl/pozo de leche descremada al 5% o albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween e incubar durante 30 min a 37 °C.
6. Se repiten los pasos 3 y 4.
7. Se hace una dilución 1:4000 del suero del ratón en PBS-Tween. Cada suero diluido se agrega en volumen de 100 µl/pozo y se incuba 2 h a 37°C
8. Se repiten los pasos 3 y 4.
9. En cada pozo se colocan 100 µl del anticuerpo secundario (anti-gamma globulina total de ratón-peroxidasa) a una concentración de 1:6000 en PBS-Tween.
10. Se incuba a 37°C durante 1.5 h y se procede como en los pasos 3 y 4.
11. En cada pozo se colocan 100 µl de la solución de cromógeno/sustrato (5 ml de Acido cítrico 0.1M, 5 ml de Citrato de Na 0.1M, 4 mg de ortofenilendiamina, 4 µl H₂O₂ .
12. Se incuba durante 30 min.
13. Se detiene la reacción enzimática añadiendo 100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2N
14. Se lee la absorbancia en un lector de ELISA a 492 nm.

C2. Fusión de células de bazo y células de mieloma

1. El ratón inmunizado con SCO2127-His₆ una vez por semana durante tres semanas, se sangra por vía retroorbital para obtener el suero y determinar el título de anticuerpos por ELISA.
2. Se sacrifica al ratón por dislocación cervical.
3. Asépticamente se extrae el bazo

4. Se coloca el bazo en una caja petri estéril, que contiene alrededor de 5ml de medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino y un cuadro de tela de organza estéril que servirá para disgregar el bazo.
5. El bazo se envuelve totalmente con la tela de organza y con ayuda del émbolo de una jeringa estéril se presiona el bazo lo más suavemente posible para disgregar el tejido y se resuspende con una pipeta Pasteur.
6. La suspensión resultante se coloca en un tubo de 50 ml y se lava una vez con medio RPMI-1640 sin suero, mediante centrifugación a 1200 rpm durante 10 min a 37°C.
7. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 25 ml de medio RPMI-1640.
8. Se añade suficiente medio RPMI-1640 para completar 50 ml y se centrifuga a 1200 rpm por 10 min.
9. Las células del mieloma empleadas para realizar la fusión (línea celular Ag8) deberán mantenerse en crecimiento exponencial en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino; para esto se siembran 24 h antes, colocando aproximadamente 5×10^6 células de mieloma en botellas de 75 cm² con 20 ml de medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de SFB y se incuban a 37 °C.
10. Cuando se lleva a cabo la fusión las células del mieloma se resuspenden mediante agitación suave, posteriormente, con ayuda de una pipeta de 5 ml, la suspensión se coloca en un tubo de 50 ml y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min.
11. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en medio RPMI-1640 sin suero fetal.

C3. Fusión celular

1. Se mezclan las células del bazo y las del mieloma en una relación 5:1, en un tubo de 50 ml y se centrifuga a 1200 rpm por 5 min.
2. Se elimina el sobrenadante y se disgregan suavemente las células.
3. Se agregan 0.5 ml de polietilenglicol (PEG al 42%) en un tiempo aproximado de 60 s agitando suavemente.
4. Se agregan 5 ml de medio RPMI-1640 (ver Apéndice) sin suero fetal por goteo y agitando suavemente en un lapso de 3 min; de la misma forma se adicionan 15 ml más en un lapso de 1 min y se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min.
5. Se resuspenden las células en medio RPMI-1640 con SBF al 20% adicionado con HAT. Se colocan 200 µl por pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se cultiva a 37 °C.

6. Las células se revisan diariamente para identificar si existe algún tipo de contaminación y localizar los pozos con híbridos viables o si se requiere cambiar el medio.

C4. Clonación celular

1. Se colocan 100 µl de medio RPMI-1640 con SBF al 15% en toda la fila A de una placa de cultivo de 96 pozos.
2. Se toman 100 µl de suspensión celular de aquellos híbridos que hayan sido positivos al antígeno y se colocan en la posición A1 y a partir de esta se hacen diluciones dobles seriadas hasta el final de la fila. Se dejan reposar las células durante 10 min.
3. Se cuentan al microscopio invertido las células de cada pozo y aquel pozo que contenga 30-40 células se diluye en 18 ml de medio RPMI-1640 con SBF 20%.
4. De esta suspensión celular se siembran 200 µl por pozo en las 7 filas restantes de la placa.
5. La placa se mantiene a 37 °C durante una semana. Se revisa la formación de clonas celulares y aquellos pozos donde solo se encuentre un cúmulo serán seleccionados para probarlos en ELISA y determinar si estas clonas están secretando anticuerpos específicos, si esto es positivo se procede a repetir la clonación y a expandir en cultivo o en peritoneo de ratón.

ANEXO D. ELECTRO-TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* (Zabarovsky y col., 1990).

En ésta técnica es fundamental mantener las células a baja temperatura para asegurar la eficiencia de éstas.

D1. Preparación de las células

1. Inocular al 1% un litro de medio LB (ver apéndice A.1) con un cultivo fresco crecido durante toda la noche.
2. Crecer las células a 37°C con agitación vigorosa hasta obtener una Abs_{600} de 0.5 a 0.7 (se obtienen mejores resultados cuando se crecen las células rápidamente).
3. Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm a 4°C durante 15 min.
4. Remover la mayor cantidad de medio posible y resuspender los botones en un volumen total de 1 L de agua milli Q, estéril y fría. Centrifugar igual que en el paso 3.
5. Resuspender el botón en 0.5 L de agua milli Q, estéril y fría. Centrifugar igual que en el paso 3.

6. Resuspender el botón en aproximadamente 20 ml de glicerol al 10% frío; esta solución se elabora con agua milli Q. Centrifugar como en el paso 3.
7. Resuspender en un volumen final de 1.5 ml de glicerol al 10%. La concentración de células debe ser alrededor de $1-3 \times 10^{10}$ células / ml.
8. Esta suspensión se debe guardar en alícuotas de 50 μ l a -70°C . Las células se conservarán en buen estado por al menos 6 meses en estas condiciones.

D2. Electro-transformación

9. Las células competentes guardadas a -70°C se descongelan en hielo.
10. Se mezclan 50 μ l de la suspensión de células con 1 a 2 μ l de ADN de 1.925 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (El ADN debe estar en un buffer de baja fuerza iónica como TE). Esperar de 0.5 a 1 minuto.
11. Establecer la magnitud del impulso eléctrico en el electroporador; que debe ser de 1250 V.
12. Transferir la mezcla de células con el plásmido a una cubeta de 0.1 cm (enfriada previamente) con la ayuda de una micro pipeta y quitarle las burbujas golpeando ligeramente.
13. Se coloca la cubeta en la cámara del equipo y se da el impulso eléctrico.
14. Inmediatamente después del pulso se agregan a la cubeta 950 μ l de medio SOC (ver apéndice A.2) y se resuspenden las células con una micropipeta (la adición rápida del medio SOC después del pulso eléctrico es muy importante para maximizar la recuperación de las células transformadas).
15. Transferir la suspensión de células a un tubo Eppendorf e incubar a 37°C durante 1 h (Con agitación a 225 rpm durante la incubación ya que puede ayudar a la recuperación de transformación).
16. Plaquear de 10 a 50 μ l de la suspensión de células en cajas petri con medio LB mas ampicilina (ver apéndice A.1). Para determinar la eficiencia, la cual debe ser mayor a 1×10^7 transformantes (ufc)/mg ADN cuando se tienen plásmidos íntegros.

ANEXO E. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA

E1. MINI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO (Sambrook y col., 1989)

Reactivos necesarios:

- Solución I

Reactivo	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris · Cl (pH 8.0)	25
EDTA (pH 8.0)	10

La solución I se puede preparar en volúmenes de aproximadamente 100 ml y se esteriliza durante 15 min. Se almacena a 4°C .

Esta solución debe ser abierta en campana para evitar su contaminación.

- Solución II

Solución	Concentración
NaOH	0.2N
SDS	1 %

Esta solución se prepara en el momento.

Se pueden utilizar soluciones stock: NaOH 2N y SDS 10%.

- Solución III

Solución	Volumen (ml)
Acetato de potasio 5 M	60
Ácido acético glacial	11.5
Agua	28.5

- Etanol absoluto.
- Etanol 70%
- Endoribonucleasa pancreática (RNAasa) 10mg/ml

Procedimiento:

Se parte de 5 ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfieren 1.5 ml de medio a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 10 000 rpm por 5 min a 4°C, eliminar el medio de cultivo. El botón bacteriano debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta Pasteur.
2. Resuspender las células en 100 µl de solución I fría con la ayuda de un vórtex.
3. Agregar 200 µl de solución II recién preparada. Mezclar invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurarse de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No utilizar vortex. Los tubos de mantienen en hielo.
4. Agregar 150 µl de solución III fría. Mezclar invirtiendo el tubo para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano viscoso. Mantener en hielo por 5 min.
5. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13 000 rpm por 15 min. Retirar el sobrenadante.
8. Lavar el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugar 15 min a 12 000 rpm, retirar el sobrenadante y secar el botón.
9. Disolver el botón en 10 µL de TE + RNAasa (la concentración final de la RNAasa debe ser 5 µg/ml) e incubar 30 min a 55°C.
10. De la solución resultante por este método se cargaron 3 µl en geles de agarosa

E2. MIDI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO (Sambrook y col., 1989)

Se utilizan las mismas soluciones que para la extracción del plásmido por mini-prep más las siguientes:

- Fenol : cloroformo 1:1
- Cloroformo : alcohol isoamílico 24:1
- Acetato de sodio 3 M pH 5.2
- Proteinasa K 10 mg/ml

Procedimiento:

Se parte de 100 ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche en a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfiere el medio de cultivo en botes para centrifuga, se centrifuga a 10 000 rpm por 10 min a 4°C para recuperar las células y se elimina el medio de cultivo. El botón bacteriano debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta Pasteur para remover el medio de cultivo remanente.
2. Resuspender muy bien el botón bacteriano libre de medio en 5ml de solución I fría con la ayuda de un vórtex.
3. Agregar 10 ml de solución II recién preparada. Mezclar invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurándose de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No usar el vórtex. Mantenga las botellas en hielo.
4. Agregar 7.5 ml de solución III fría. Mezclar invirtiendo el tubo para dispersar la solución III. Mantener en hielo por 5 min.
5. Centrifugar a 13 000 rpm 15 min. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol durante 1 h aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13 000 rpm 15 min. Retirar el sobrenadante.
8. Lavar el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugar 15 min a 13 000 rpm, retirar el sobrenadante y secar el botón.
9. Disolver el botón en 0.5 ml de TE + RNAsa e incubar 30 min a 55°C.
10. Agregar proteinasa K e incubar 30 min a 55°C.
11. Agregar 0.5 ml de fenol:cloroformo y agitar con la ayuda de un vórtex.
12. Centrifugar 5 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa (fase superior).
13. Lavar con un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico y agitar con la ayuda de un vórtex.
14. Centrifugar 5 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa (fase superior).
15. Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio.
16. Centrifugar 15 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y tirar sobrenadante.
17. Lave el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugue 15 min a 12000 rpm, retirar el sobrenadante y se resuspende el botón en 100 µl de agua estéril.

De la solución resultante se carga 1 µl en geles de agarosa.

E4. ELABORACIÓN DE COLUMNAS DE FIBRA DE VIDRIO PARA PURIFICAR ADN DE GELES DE AGAROSA.

Materiales:

- Fibra de vidrio
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Tubos Eppendorf 0.5 ml

1. Se perfora el fondo del tubo Eppendorf de 0.5 ml con una aguja.
2. Se rellena el fondo del mismo tubo con aproximadamente medio centímetro de fibra de vidrio, compactándola lo más posible.
3. Este tubo se introduce en el Eppendorf de 1.5 ml.
4. Se esterilizan las columnas.

Purificación:

1. Después de correr un gel de agarosa al 1%, se corta el fragmento de interés y se coloca dentro de la columna de vidrio.
2. Se centrifuga a 6000 rpm durante 1 minuto.
3. Se recupera el filtrado en un tubo Eppendorf limpio.
4. Se centrifuga de nuevo la columna a 6,000 rpm durante 1 minuto.
5. Se recupera el filtrado y se junta con el anterior.
6. Al filtrado total se le lleva a un volumen final de 500 μ l y se lava con fenol-cloroformo (1:1).
7. Se recupera la fase acuosa y se precipita con dos volúmenes y medio de etanol absoluto y 10% de acetato de sodio.
8. Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 min, se decanta el etanol.
9. Se lava el pellet de ADN con etanol al 70%.
10. Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 min, se decanta el etanol y se resuspende en 10 μ l de H₂O milli-Q estéril.

E5. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA (0.8%) (Sambrook y col., 1989)

Reactivos necesarios:

- Agarosa
- Bromuro de etidio 10 mg/ml
- Tampón TAE 50 X

Solución	Cantidad
Tris base	242 g
EDTA 0.5 M pH 8	100 ml
Ác. acético glacial	57.1 ml

El pH se ajusta a 8.3. El tampón se diluye hasta una concentración de 1X.

Procedimiento:

1. Se disuelven 0.32 g de agarosa en 40 ml de agua destilada calentando hasta ebullición durante algunos segundos. La cantidad de gel que se prepara depende del tamaño de la cámara de electroforesis que se va a utilizar.
2. Se agregan 2 μ L de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), se mezcla y se deja solidificar el gel en la cámara con el peine que va a formar los pozos donde se cargarán la muestras.
3. Se sumerge el gel en tampón TAE 1X dentro de la cámara de electroforesis y se cargan las muestras de ADN con tampón de carga 1X.
4. Se corre el gel a 70 volts durante 1.5 h aproximadamente (hasta que el frente del colorante llegue a $\frac{3}{4}$ partes del final del gel).
5. Las bandas de ADN en el gel se observan con luz ultravioleta.

ANEXO F. LISADO DE CÉLULAS POR SONICACIÓN (Coligan y col., 1995).

F1. Sonicación de *E. coli*

Se parte de botones bacterianos obtenidos a partir de 100 ml de medio LB inoculado con las células de interés.

En esta técnica se debe cuidar mucho que las muestras permanezcan a una temperatura de 4°C por lo que es necesario mantenerlas en hielo todo el tiempo, ya que de lo contrario las proteínas pueden degradarse.

1. Resuspender el botón bacteriano en 0.6ml del tampón* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
2. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hz durante 10 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
3. Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 300 μ L de tampón* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
5. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hz durante 20 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
6. Juntar la mezcla del punto anterior con el sobrenadante recuperado en el punto 3.
7. Agregar tritón a una concentración final de 1% e inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 y ajustar a un volumen de 2 ml con tampón*.
8. Centrifugar a 8,000 rpm durante 15 min a 4°C.
9. Filtrar el sobrenadante por membrana de 0.45 μ m.

* El tampón que se empleó para este estudio fue el tampón de adsorción que se emplea en la técnica de purificación de proteínas recombinantes en columnas de níquel (ANEXO B).

F2. Sonicación de *S. coelicolor*

Se parte de botones bacterianos obtenidos a partir de 50 ml de medio NMMP inoculado con las células de interés.

1. Resuspender el botón bacteriano en un volumen del buffer PED (75 mM KH₂PO₄, pH. 7; 2 mM DTT; 1 mM EDTA) y agregar inhibidor de proteasas en una concentración 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
2. Sonicar dando 5 pulsos con una amplitud de 60 Hz durante 30 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
3. Centrifugar a 13,200 rpm durante 5 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.

ANEXO G. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) (Coligan y col., 1995).

Reactivos necesarios:

- Acrilamida 30%
- Tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- Tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- SDS 10%
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina)
- Persulfato de amonio 10% (se prepara en el momento)

- Tampón de carga para proteínas 4X

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	4 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1 ml
Glicerol	800 ml
SDS 10%	1.6 ml
2-β-mercaptoetanol	400 ml
Azul de bromofenol 0.5%(p/v)	200 ml

La concentración de este tampón debe ser 1X cuando se preparan las muestras.

- Tampón de migración 5X pH 8.3

Reactivo	Cantidad (g/l)
Tris-base 125 Mm	15
Glicina	72
SDS	5

Este tampón se diluye con agua hasta una concentración 1X para correr el gel de poliacrilamida.

➤ Soluciones para revelar los geles.

- Stock I: Azul brillante de comassie 0.2% + etanol 90%
- Stock II: Ácido acético 20%
- Fijación: 40 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + agua destilada 50 ml
- Tinción: 50 ml stock I + 50 ml stock II
- Desteñido I: Solución de fijación
- Desteñido II: 20 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + 70 ml agua

Procedimiento:

1. Ensamblar el sándwich para preparar los geles (0.75 mm de grueso) en el equipo para electroforesis según las recomendaciones del fabricante.
2. Colóquese el sándwich en el casting y se verifica con agua destilada que no haya fugas.
3. Se prepara el gel de acrilamida, el cual está constituido tanto por un gel de separación (parte inferior) como por un gel de concentración (parte superior) y presentan la siguiente composición:

Reactivo	Gel de concentración	Gel de separación **	
	4%	8 %	10%
Agua destilada	1.21 ml	2.34 ml	3.125 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.50 ml	-	-
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	-	1.875 ml	1.875 ml
Acrilamida 30%	266.5 µl	1.3 ml	2.5 ml
SDS 10%	20.0 µl	50 µl	50 µl
Persulfato de amonio 10%	11.0 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2.2 µl	10 µl	10 µl

* Cantidades necesarias para hacer un gel.

** La concentración de acrilamida en el gel de separación depende del peso molecular de las proteínas que se desea separar. Generalmente se usa una concentración de 5% para proteínas de 60 a 200 kDa, una de 10% para proteínas con peso molecular de 16 a 70 kDa y una de 15% para proteínas con peso molecular de 12 a 45 kDa

Ambos geles se preparan simultáneamente en recipientes adecuados agregando los componentes en el mismo orden en que se presentan en la tabla. Una vez que se agrega la

acrilamida se deben agitar ligeramente, después se agrega SDS quedando pendiente el persulfato de amonio y el TEMED para el momento de vaciar.

Se agrega el persulfato de amonio y el TEMED al gel de separación, se mezcla ligeramente e inmediatamente después se vacía con la ayuda de una pipeta en el sándwich del punto 1 dejando el espacio necesario para colocar el peine que va a formar los pozos sobre éste gel. Posteriormente se agrega alrededor de 1ml de agua destilada sobre el gel de separación para obtener una superficie lisa. Se deja a temperatura ambiente alrededor de 20 min para permitir la polimerización de la acrilamida. Cuando la acrilamida se ha polimerizado se observa muy ligeramente una línea que separa al gel del agua, cuando esto sucede se retira el agua que se agregó sobre el gel separación, se coloca el peine en el sándwich y se prosigue a agregar el TEMED y el persulfato de amonio al gel de concentración, se mezcla ligeramente la solución e inmediatamente después se vacía con la ayuda de una pipeta en el sándwich sobre el gel de separación rellenando los espacios que deja el peine y evitando la formación de burbujas. Se deja a temperatura ambiente para permitir la polimerización.

4. Se desmonta el sándwich del casting y se coloca en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. Se agrega tampón de migración 1X a pH 8.3 en la cámara y se retira el peine cuidadosamente.
6. Se conecta la corriente a la cámara y se pre-corre el gel a 20 mA durante 30 min aproximadamente.
7. Para preparar las muestras se diluye una porción de la proteína en solución con el tampón de carga para proteínas 1X. Calentar a 95°C durante 5 min y poner en hielo hasta que se cargue el gel. Las muestras se cargan en el gel con la ayuda de una micro pipeta después de la pre-corrída.
8. Se corre el gel a 20 mA hasta que la marca de azul de bromofenol llegue hasta el fondo del gel.
9. Se desmonta el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante para recuperar y revelar el gel.
10. Se agrega solución de fijación a la caja petri que contiene el gel hasta cubrirlo completamente durante 30 min con agitación, transcurrido el tiempo se tira la solución de fijación.
11. De la misma manera que el punto anterior, se agrega solución de tinción. Agitar durante 20 min y decantar.
12. Agregar solución de fijación una vez más e igual que en los puntos anteriores. Se agita durante 30 segundos y se elimina la solución. A partir de este punto las bandas de proteína son ligeramente visibles en el gel.
13. Se agrega solución de destinción, se agita hasta que el gel pierda su coloración azul y las bandas de proteína sean claramente visibles.

ANEXO H. WESTERN-BLOT (Coligan y col., 1995)

Reactivos y materiales necesarios:

- Tampón de Transferencia 10X

Reactivo	Cantidad (g/l)
Glicina	144
Tris base	30

- PBS 10X pH 7.4

Reactivo	Concentración (M)
NaCl	1.5
Fosfatos	1

- Metanol
- Tween 20
- Leche descremada
- Papel filtro¹
- Membrana de transferencia¹
- Fibra Scotch-Bride¹
- 2 recipientes de tamaño adecuado: para activar la membrana para realizar el sándwich

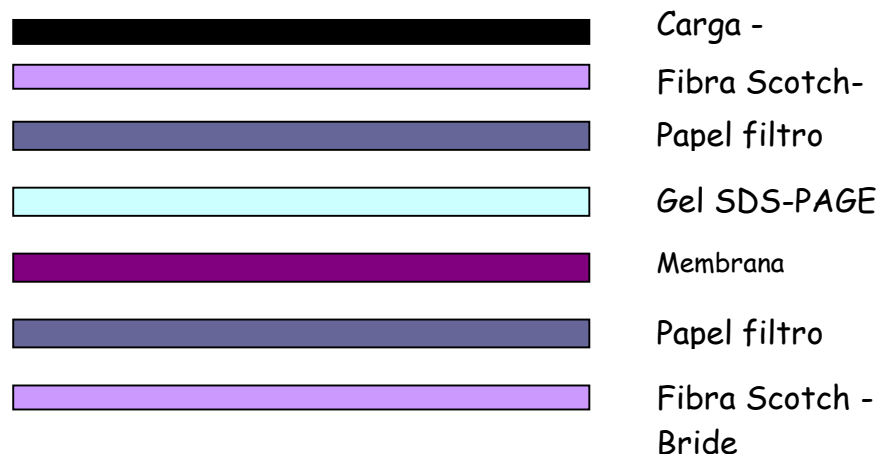
¹ Deben ser del mismo tamaño que el equipo para transferir.

Transferencia

1. Se corren las proteínas que se desean transferir en un gel SDS-PAGE.
2. Una vez que se ha corrido el gel de poliacrilamida se prepara el tampón de transferencia de la siguiente forma:

Tampón de transferencia 10X 100 ml
Metanol 100 ml
Llevar a 1 L con agua destilada

3. En un recipiente se agrega una pequeña cantidad del tampón de transferencia, se coloca el equipo para hacer el sándwich con la parte negra (carga -) hacia abajo (adentro del recipiente).
4. Se realiza el sándwich de la siguiente forma:



Antes de realizar el sandwich se activa la membrana sumergiéndola en metanol y los demás componentes se humedecen con tampón de transferencia del punto 2. El sándwich se realiza dentro de un recipiente que contenga tampón de transferencia para evitar que se seque cualquier componente.

Se eliminan las burbujas de aire que puedan existir entre el gel SDS-PAGE y la membrana, desplazando suavemente sobre la membrana una pipeta pasteur.

Se cierra el sándwich y se monta en la cámara que contiene la cantidad de tampón de transferencia necesaria para cubrir el sándwich (la parte negra del sándwich debe coincidir con la parte negra de la cámara). Se siguen las indicaciones del fabricante.

5. Se conecta la cámara y se realiza la transferencia a 90 V durante 1-1.5 h. Se debe evitar que aumente la temperatura, porque la transferencia sería ineficiente. La transferencia se puede realizar en el cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.

6. Se desmonta el equipo, se retira la membrana y se deja secar sobre papel filtro. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 h. aprox. ó a 37°C durante 1 h.

Reconocimiento con anti-his

1. Se sumerge la membrana en metanol.

2. Se numeran los pozos con lápiz y en el caso de que no se tenga un marcador de PM con tallo de histidinas, se debe recortar la región donde se encuentre el marcador para ser revelada con azul de bromofenol o técnica similar.

3. Se agrega el anticuerpo monoclonal de ratón que detecta el tallo de histidinas (anti-his₆, Roche) en una concentración de 0.4 µg/ml en el siguiente tampón:

Tampón PBS	1X
Tween 20	0.05%
Leche descremada	3%

4. La membrana se coloca en un recipiente adecuado al tamaño de la membrana, se agrega una cantidad suficiente del tampón anterior que contienen el anticuerpo de tal forma que cubra muy bien la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 1h con agitación ligera. Posteriormente se lava la membrana con PBS 1X tres veces.

5. Se agrega el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (α -anti-His, Perkin Elmer) en una concentración 1:5000 de la misma forma que el primero y se incuba durante 1 h con las mismas condiciones. Se lava 3 veces con PBS 1X.

Revelado

1. El segundo anticuerpo (α -anti-his) se encuentra acoplado a una fosfatasa alcalina, lo que permite que se lleve a cabo una reacción colorida cuando se agrega su sustrato, que identifica el complejo de los anticuerpos con el tallo de histidinas. Así, es necesario agregar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) en una concentración de 0.21 g/L con nitroazul de tetrazolio (NBT) en una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/tampón Tris (solución: sustrato BCIP/NBT lista para usar, Perkin Elmer) de tal forma que cubra la membrana por completo para que se lleve a cabo la formación del color.

ANEXO I. PESO SECO (Escalante y col., 1999)

1. Secar los papeles filtro wathman No.1 a 60°C durante 12 h
2. Pesar y registrar el peso (peso inicial)
3. Centrifugar 25 ml de cultivo a 7000 rpm por 15 min
4. Descartar el sobrenadante y agregar 30 ml de solución salina isotónica (0.85% NaCl)
5. Centrifugar como en 3
6. Filtrar con el papel filtro.
7. Dejar secar los papeles filtro con la muestra a 60°C durante 48 h
8. Transcurrido ese tiempo, pesar los papeles filtro y registrar el peso (peso final)
9. Determinar la biomasa por diferencia de peso

ANEXO J. DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES POR LA TÉCNICA DE FENOL-SULFURICO (Dische y col., 1958)

En tubos bien limpios sumergidos en baño de hielo (hielo con agua), agregar 0.5 ml de muestra, 0.5 ml de fenol 5% w/v y 2.5 ml de H₂SO₄. Agite cuidadosamente en vórtex. Llevar los tubos a baño maría hirviendo durante 15 min. Enfriar en el baño de hielo. Leer las muestras a 490 nm (el color es estable por 24 h).

Realizar una curva patrón Límites del método (de 5 – 50 μ g/ml y el blanco).

ANEXO K. MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS

K1. Mapa del vector pGEM-T

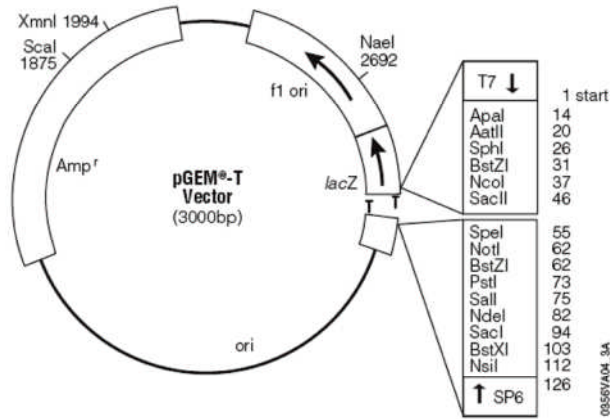


Figura 1. Mapa del plásmido pGEM-T utilizado para clonar el producto de PCR.

K2. Mapa del vector pIJ8660

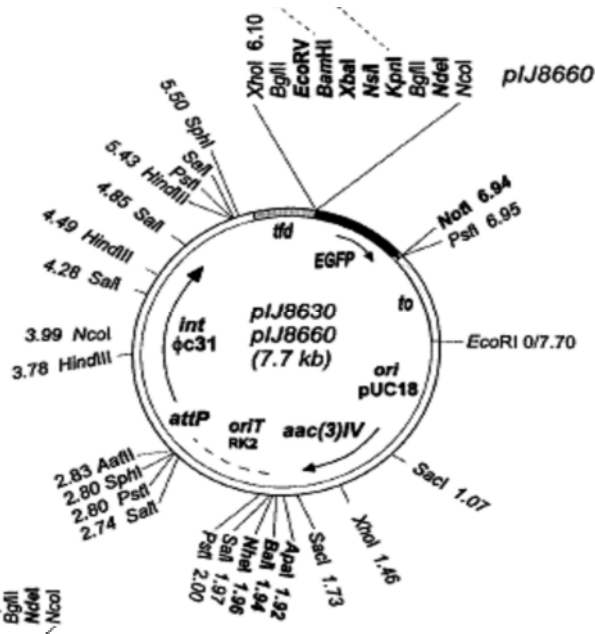


Figura 2. Mapa del plásmido pIJ8660 utilizado para medir la expresión de sco2127 utilizando como gen reportero a la EGFP.