



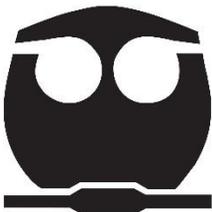
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA
POLICÉTIDO SINTASA TIPO III DE
STREPTOMYCES
THERMOCARBOXYDUS SP K155**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA
ANA PAULA FERNÁNDEZ AMEZCUA**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



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.

JURADO ASIGNADO

- Presidente:** Profesor: Marco Antonio Ortiz Jimenez
- Vocal:** Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño
- Secretario:** Profesor: Silvia Margarita Guzmán Trampe
- 1^{er} Suplente:** Profesor: Isabel del Carmen Rivero Cruz
- 2° Suplente:** Profesor: Patricia Díaz Arista

Sitio donde se desarrolló el tema:

Grupo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel. Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema: _____
M. en C. Silvia Margarita Guzmán Trampe

Supervisor técnico: _____
Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Sustentante: _____
Ana Paula Fernández Amezcua

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por haberme otorgado una beca de investigador nacional (12577) durante mi proyecto.

Este trabajo fue soportado económicamente por PAPIIT, DGAPA, UNAM (IN292216) y por el programa NAUTEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Índice

Introducción	1
Justificación	3
Objetivos	3
Marco Teórico	5
Crecimiento microbiano	5
Género <i>Streptomyces</i>	9
Ciclo de desarrollo en <i>Streptomyces</i>	10
Producción de metabolitos secundarios	13
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> K155	15
Genome Mining	16
Expresión Heteróloga	20
Plásmidos	21
Policétido Sintetas (PKSs)	23
Metodología general	33
Cepas empleadas	34
Vectores	35
Procedimiento experimental	37
1. Análisis bioinformático	37
2. Clonación de la PKSIII a <i>S. avermitilis</i> SUKA22 y <i>S. lividans</i> TK24 con pKU1021 y pIJ4123	38

2.1	Diseño de Primers	38
2.2	Amplificación de CDS 00140	39
2.3	Extracción y amplificación de plásmidos	42
2.4	Digestión	42
2.5	Ligación	45
2.6	Transformación	46
2.7	Selección y resiembra de transformantes	54
2.8.	Recolección y conteo de esporas	54
2.9	Secuenciación	55
3.	Observación morfológica de hospederos transformados	56
4.	Confirmación de la expresión de la PKSIII	57
4.1	Fermentaciones	58
4.2	Extracción de proteínas	59
4.3	SDS-PAGE	60
4.4	Transferencia a membrana	61
4.5	Western Blot	61
4.6	Teñido de Gel	61
5.	Producción de metabolitos secundarios, extracción y análisis preliminar del extracto total	62
5.1	Búsqueda del medio de producción más adecuado para la expresión de la PKSIII	62
5.2	Extracción con solventes orgánicos	63

5.3 Concentración de fases acuosas	64
5.4 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	64
6. Pruebas de antibiosis de los extractos	65
7. Análisis del hospedero y el vector más adecuados para la expresión de la PKSIII	66
Resultados y Discusión	67
1. Análisis bioinformático de CDS 00140	67
2. Clonación de la PKSIII a <i>S. avermitilis</i> SUKA22 y <i>S. lividans</i> TK24 con pKU1021 y pIJ4123	72
2.1 Diseño de Primers	72
2.2 Amplificación de CDS 00140	73
2.3 Extracción de plásmidos	74
2.4 Digestión	75
2.5 Ligación	76
2.6 Transformación	77
2.7 Recolección y conteo de esporas	93
2.8 Secuenciación	96
3. Evaluación morfológica preliminar de los hospederos transformados.	100
4. Confirmación de la expresión de la PKSIII	112
4.1 Expresión de PKSIII en <i>S. lividans</i>	114
4.2 Expresión de PKSIII en <i>S. avermitilis</i> SUKA22	116

5. Producción de metabolitos secundarios, extracción y análisis preliminar de los extractos	121
5.1 Extracción preliminar de sobrenadantes y CCF	122
5.2 Extracción de biomاسas y CCF	128
6. Pruebas de antibiosis de los extractos	138
6.1 Antibiosis preliminar para extractos de sobrenadantes y concentrados acuosos	139
6.2 Antibiosis para extractos de biomاسas	141
7. Análisis final de resultados y determinación del hospedero y el vector más adecuados para la expresión de la PKSIII	145
Conclusiones	148
Referencias	149
Anexo I: Técnicas de Biología Molecular y de búsqueda de metabolitos secundarios	160
Anexo II: Medios de cultivo	170
Anexo III: Soluciones	176
Anexo IV: Abreviaturas	181

Introducción

La búsqueda de nuevas moléculas ha sido indispensable para el desarrollo científico, médico, tecnológico, entre otras áreas. Dichas aplicaciones varían dependiendo de la estructura y actividades observadas en la molécula durante su investigación, y pueden abarcar desde actividad antitumoral hasta antibiótica contra microorganismos causantes de enfermedades, presentar funciones estructurales o alguna otra actividad de interés científico. El hallazgo de compuestos con actividad farmacológica ha implicado un avance en la atención médica de afecciones nuevas o conocidas, ofreciendo alternativas de tratamiento para las mismas. En general, el descubrimiento de moléculas, con o sin bioactividad, ha permitido ampliar la información y conocimiento de los metabolitos y su fuente de obtención, sirviendo para futuras referencias.

Dichas nuevas moléculas pueden ser encontradas en una gran diversidad de lugares, desde plantas endémicas utilizadas como remedios herbolarios hasta microorganismos encontrados en condiciones adversas.

Siguiendo este principio, se ha realizado la búsqueda de compuestos de interés en microorganismos presentes en

ubicaciones con alta adversidad, debido a que la ubicación del microorganismo sugiere que este tiene la capacidad de producción de compuestos que le confieren resistencia a las condiciones de su entorno. Estos compuestos de interés son denominados metabolitos secundarios, y son producidos en gran número por los actinomicetos, entre los cuales resalta el género *Streptomyces*, que habita mayormente en el suelo y del cual se han obtenido gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos.

En el presente trabajo se menciona el análisis de *Streptomyces thermocarboxydus* K155, microorganismo empleado como modelo de estudio para la búsqueda de metabolitos secundarios utilizando una estrategia de búsqueda de secuencias codificantes de ADN conocida como Genome Mining o minería genómica. Asimismo, se detalla la manipulación genética de la secuencia CDS 00140, encontrada en dicha cepa y correspondiente a una Policétido Sintasa Tipo III, proteína asociada a la producción de diversas moléculas con múltiples aplicaciones con fines científicos, médicos y de otros ámbitos en el género *Streptomyces*.

Justificación

Debido a la poca información conocida de las Policétido-Sintasas Tipo III bacterianas, y a su alto potencial de producción de metabolitos secundarios de interés, el análisis y expresión de una PKSIII asociada con la cepa bajo estudio *Streptomyces thermocarboxydus* K155 permitirá establecer la metodología adecuada para la futura expresión heteróloga y aislamiento de este tipo de moléculas.

Objetivos

Objetivo general

Expresar heterológamente la secuencia codificante 00140 (PKSIII) de *Streptomyces thermocarboxidus* K155 en *Streptomyces avermitilis* SUKA22 y *Streptomyces lividans* TK24 mediante el uso de un plásmido con promotor constitutivo y otro con promotor inducible, así como realizar la búsqueda preliminar del metabolito producido y su bioactividad.

Objetivos Particulares

- Buscar homología e identidad de la secuencia peptídica de la CDS 00140 mediante análisis bioinformático.
- Determinar el vector y el hospedero más adecuados para la clonación y expresión de la CDS 00140.
- Determinar si hay expresión de la Policétido Sintasa Tipo III (CDS 00140).
- Buscar las condiciones más adecuadas para la producción e identificación del metabolito producido en extracto total.
- Evaluar actividad antibiótica en los extractos obtenidos.

Marco Teórico

Crecimiento microbiano

En la actualidad, existe una alta importancia en el conocimiento de la extensa diversidad de microorganismos y su impacto sobre la sociedad; desde la simbiosis de algunas especies con la población humana (por ejemplo, en la flora microbiana normal) hasta la gran cantidad de bacterias que representan un riesgo sanitario en la comunidad [13]. El entendimiento de los microorganismos es imprescindible para un mejor desarrollo científico, por lo que es importante comprender su comportamiento.

Como se sabe, una población de microorganismos presenta una tasa de reproducción muy alta, y según la especie, puede multiplicarse incluso en un lapso de minutos a horas [13]. Esta capacidad de reproducción produce una alta variabilidad genética, ya que la transferencia del material genético presenta mutaciones que pueden ser benéficas o perjudiciales para los microorganismos. El efecto de adaptación que se presenta consiste en la supervivencia de los microorganismos con mutaciones benéficas bajo condiciones de adversidad, y la muerte de la población restante que no presenta los cambios necesarios para subsistir. Así, los microorganismos que

sobreviven a estas condiciones extremas han desarrollado mecanismos de resistencia, los cuales se conservan y se transmiten al resto de la población haciéndola más fuerte y difícil de combatir [49].

Este fenómeno representa un problema en lo correspondiente al mal uso de antibióticos, ya que ocasiona que una pequeña parte de la población desarrolle resistencia al medicamento y reincida en el padecimiento, manteniendo dicha resistencia y transmitiéndola al medio, por lo cual se hace necesario administrar medicamentos distintos para combatir una infección. Por lo mismo, es de gran importancia la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos contra microorganismos patógenos, los cuales pueden ser encontrados en otras especies microbianas, y pueden representar una mejor alternativa a los medicamentos actuales, con características deseadas como su obtención a partir de fuentes naturales en lugar de síntesis química, menor costo, mayor potencia y menor toxicidad.

En la Fig. 1 se describen las etapas de crecimiento que presenta de manera general una población microbiana [5].

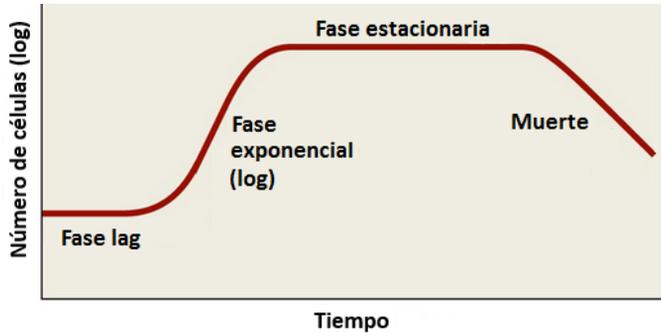


Fig. 1. Gráfica de crecimiento microbiano

El patrón de crecimiento microbiano describe el modelo de cuatro fases para microorganismos en cultivos cerrados como un matraz bafleado utilizado para siembra en medio líquido, o una caja de Petri utilizada para siembra en medio sólido.

Descripción de cada fase de crecimiento:

1. **Fase Lag:** Período de adaptación de los microorganismos al medio, por lo cual el crecimiento poblacional observado es casi nulo.
2. **Fase Exponencial o Fase Log:** Multiplicación celular y crecimiento óptimo, la tasa de crecimiento microbiano depende de la disponibilidad y cantidad de nutrientes en el medio.
3. **Fase estacionaria:** Debido al agotamiento de nutrientes, el crecimiento se ve limitado y el índice de reproducción se iguala al índice de muerte celular. El crecimiento se

mantiene constante y se induce el metabolismo secundario para mejorar las condiciones de supervivencia y competitividad en el medio, produciéndose algunos metabolitos secundarios desde finales de fase Log.

4. **Fase de muerte:** gracias a la ausencia de nutrientes o a condiciones ambientales desfavorables, se presenta la muerte celular.

En la fase estacionaria comúnmente se activa un mecanismo llamado **metabolismo secundario**, que puede ser inducido por determinadas señales como condiciones ambientales adversas, falta de nutrientes, competencia con otros microorganismos, etc., y durante el cual se redistribuye el uso de nutrientes del microorganismo, que en lugar de destinarse a la reproducción celular, se asignan al mantenimiento y supervivencia de la población, con lo cual disminuye la tasa de crecimiento y da inicio la producción de compuestos que sirven, entre otras cosas, para el mantenimiento de la función metabólica activa, protección contra otros organismos y agentes externos, u otorgan características de diferenciación, como la pigmentación. Los compuestos producidos durante esta fase (**metabolitos secundarios**) no tienen un papel directo sobre la reproducción del microorganismo, por lo cual si no son producidos, no se

impide el crecimiento del mismo pero mejora sus probabilidades de supervivencia.

Los metabolitos secundarios le otorgan una gran variedad de características y ventajas al microorganismo que los produce, y son de gran interés científico, ya que una gran parte de ellos presenta actividad de interés farmacológico, como en el caso de los antibióticos.

La producción de antibióticos es específica para determinadas especies, y es importante para la competencia con los microorganismos con los que la población entra en contacto.

Un grupo microbiano de alto interés es el género *Streptomyces* debido a que producen gran variedad de metabolitos secundarios, entre los cuales sobresalen los antibióticos.

Género *Streptomyces*

Los microorganismos del género *Streptomyces*, o estreptomicetos, son el grupo más extenso del phylum Actinobacteria, formado principalmente por bacterias de suelo.

Estas actinobacterias son Gram-positivas, generalmente no patógenas, tienen una forma filamentosa similar a los hongos y contienen una alta proporción de bases Guanina y Citocina en

su genoma lineal (alrededor del 70%). Las bases nitrogenadas que conforman el material genético se distribuyen en los pares de nucleótidos: AT y GC, los cuales se mantienen unidos entre sí mediante 2 y 3 puentes de Hidrógeno respectivamente, por lo cual, al contener una mayor cantidad de enlaces gracias a una mayor cantidad de GC, el material genético de los estreptomicetos es más estable y difícil de romper que otros ante condiciones adversas del medio, como la temperatura [6].

Ciclo de desarrollo en *Streptomyces*

El ciclo de vida de un estreptomiceto inicia a partir de la germinación de una espora.

Las esporas (del griego *sporá* = semilla) son células reproductoras que presentan una actividad metabólica suspendida, y son consideradas estructuras de resistencia debido a que toleran condiciones ambientales extremas y se desarrollan solo cuando éstas son favorables [2].

En determinadas especies, la capacidad de supervivencia de las esporas en ambientes hostiles puede aumentar gracias a los compuestos responsables del aroma y la pigmentación de la cepa, los cuales estimulan el desarrollo celular y producción de

metabolitos secundarios. Es decir: algunos metabolitos secundarios inducen la generación de otros metabolitos secundarios que ayudan a la supervivencia de la cepa [3].

Durante el ciclo de crecimiento de un estreptomiceto (ilustrado en la Fig. 2) en un medio sólido, cuando una espora encuentra condiciones favorables de temperatura, pH, nutrientes y humedad, se forma un tubo germinal y se desarrolla una hifa vegetativa o micelio vegetativo, el cual es formado por una red de filamentos ramificados y multinucleados. Posteriormente se desarrolla la hifa aérea o micelio aéreo, el cual utiliza a la hifa vegetativa como sustrato. El micelio aéreo puede contener 50 copias o más del cromosoma, y experimenta un proceso de diferenciación y septación masiva. Esta segmentación se realiza para la creación de una serie lineal de compartimentos uninucleados que posteriormente producen cadenas de esporas que son liberadas al ambiente. Las esporas liberadas inician el ciclo nuevamente, llevándose a cabo la reproducción de los estreptomicetos. [2]

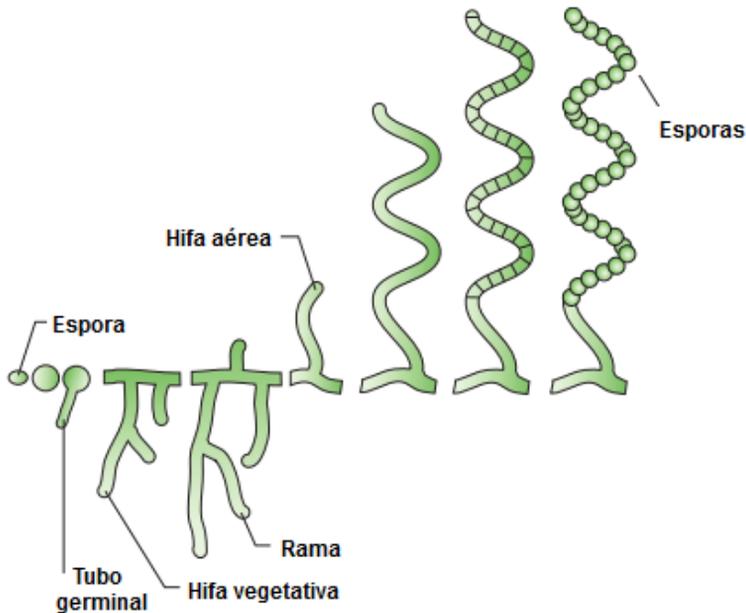


Fig. 2. Ciclo de desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido.

La diferenciación de *Streptomyces* en medio líquido presenta un proceso ligeramente distinto, ya que la mayoría de los estreptomicetos no esporulan en estas condiciones. El crecimiento en estos casos se limita a la formación de micelio vegetativo en forma de pellets, una forma de agregación bacteriana que promueve la producción de metabolitos secundarios debido a que no se efectúa la esporulación y por lo tanto el metabolismo secundario se mantiene [2].

A pesar de que algunos autores sostienen que la morfología micelial se relaciona con la producción de metabolitos

secundarios debido a que la agregación celular y formación de pellets es indispensable, existen casos reportados en los cuales el metabolismo secundario de los estreptomicetos y su diferenciación morfológica no están relacionados, como ocurre con la síntesis de Virginiamicina por *Streptomyces virginiae* [1].

Producción de metabolitos secundarios

Como ya se mencionó, *Streptomyces* es un género de alto interés científico debido a su alta producción de metabolitos secundarios que han sido utilizados con aplicaciones farmacológicas, como son los compuestos antifúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivos, inmunosupresores y principalmente antibióticos, los cuales le son de utilidad a los estreptomicetos para la competencia con otros microorganismos con los que entran en contacto, incluso del mismo género.

La historia de la producción de antibióticos por parte del género *Streptomyces* inició con el descubrimiento de la estreptotricina en 1942, seguido por la estreptomina dos años más tarde, con lo cual se intensificó la búsqueda de moléculas bioactivas en estos microorganismos. Actualmente, alrededor del 80% de los antibióticos son procedentes de los estreptomicetos [3], y algunos de ellos se listan en la Tabla 1.

Año	Especie de <i>Streptomyces</i>	Antibiótico
2006	<i>S. platensis</i>	Platensimicina
2003	<i>S. roseosporus</i>	Daptomicina
1970	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamicina
1969	<i>S. fradiae</i>	Fosfomicina
1957	<i>S. kanamiceticus</i>	Kanamicina
1956	<i>S. niveus</i>	Novobiocina
1956	<i>S. orientalis</i>	Vancomicina
1955	<i>S. garyphalus</i>	Cicloserina
1952	<i>S. lincolnensis</i>	Lincomicina
1952	<i>S. erythraea</i>	Eritromicina
1952	<i>S. virginiae</i>	Virginiamicina
1950	<i>S. aurofaciens</i>	Tetraciclina
1949	<i>S. fradiae</i>	Neomicina
1949	<i>S. venezuelae</i>	Cloranfenicol
1945	<i>S. clavuligerus</i>	Cefalosporinas
1944	<i>S. griseus</i>	Estreptomina

Tabla 1. Ejemplos de antibióticos producidos por estreptomicetos [3]

En algunos casos se presenta un efecto simbiótico en estreptomicetos asociados a plantas, en el cual el antibiótico

producido protege a la planta de agentes patógenos y el microorganismo puede desarrollarse intercelularmente en la planta. En muchas ocasiones estas plantas con propiedades antibióticas o medicinales son utilizadas como remedios herbolarios, y los microorganismos (tanto estreptomicetos como algunos otros géneros productores de antibióticos y otros metabolitos) presentes dentro de ellas se conocen como endófitos.

A pesar de que una amplia variedad de metabolitos secundarios es producida por el género *Streptomyces*, a muchos de estos aún no se les han atribuido un efecto farmacológico. Un ejemplo no medicinal muy común es la Geosmina, compuesto responsable del olor a “tierra húmeda”, liberado por la humedad ambiental, e indicativo de la presencia de esta especie.

***Streptomyces thermocarboxydus* K155 (S. K155)**

Nuevas especies han sido encontradas y estudiadas para la búsqueda de metabolitos secundarios de interés, mostrando especial atención en especies encontradas en condiciones adversas. De esta manera se tomó una muestra de suelo salitroso de Valle de Chalco, y después de una selección por pruebas para búsqueda de actividad antimicrobiana, se encontró a *Streptomyces thermocarboxydus* K155, la cual llamó la

atención debido a su actividad antibiótica observada contra microorganismos Gram-positivos y levaduras [7] (Tabla 2).

Microorganismo de prueba	Grado de inhibición
<i>Bacillus subtilis</i>	++
<i>Micrococcus luteus</i>	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++++
<i>Candida albicans</i>	++++

Tabla 2. Actividad antibiótica de *S. thermocarboxydus* K155 [7]

El potencial farmacológico de esta especie, aunado a la poca información asociada a la misma, generó el interés de encontrar las moléculas responsables de la bioactividad, por lo cual se decidió emplear minería genómica para determinar el potencial de producción de metabolitos secundarios en *S. thermocarboxydus* K155 [Guzmán-Trampe, en proceso].

Genome mining (minería genómica)

Gracias a esta estrategia bioinformática se puede realizar una predicción de genes involucrados en la síntesis de productos naturales bioactivos mediante herramientas computacionales que encuentran codones de inicio y paro de traducción para la

búsqueda de Secuencias Codificantes de ADN (CDS), es decir, fragmentos encontrados en el genoma bacteriano que codifican para una proteína productora de una molécula de interés.

Los programas bioinformáticos permiten analizar por completo el genoma de una especie realizando un alineamiento con múltiples secuencias encontradas en su base de datos para el hallazgo de modelos de Markov, que predicen la homología de las secuencias codificantes en un genoma dado con proteínas previamente reportadas.

Adicionalmente, la minería genómica revela la presencia de “clusters” dentro del genoma analizado, es decir, grupos de 2 o más genes que sintetizan proteínas que trabajan en conjunto para la creación de una molécula más compleja y con actividad metabólica.

En muchas ocasiones, una sola CDS dentro de un cluster codifica para una proteína que sintetiza la molécula base, y los genes adjuntos modifican la molécula agregando grupos funcionales, formando anillos, etc., hasta producir una molécula activa.

Mediante el análisis bioinformático se pueden estimar las proteínas producidas por los genes o CDSs encontrados e

identificar la proteína que sintetiza la molécula base de un cluster, pero no es posible predecir el producto exacto formado por un cluster desconocido, ya que su síntesis varía en función de factores como la acción de las distintas proteínas en la nueva molécula, la disponibilidad de sustratos, las condiciones ambientales, etc.

La secuencia genómica del modelo de estudio *Streptomyces thermocarboxydus* K155 se analizó por medio del programa en línea antiSMASH 3.0: Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) para la búsqueda de CDS y clusters productores de metabolitos de interés [Guzmán-Trampe, en proceso] [14].

Los clusters con potencial de producción de metabolitos secundarios encontrados dentro del genoma de *S. K155* reportados por antiSMASH se muestran en la Fig. 3.

A partir de dichos clusters sobresalió el cluster “2” por ser correspondiente a una Policétido Sintasa Tipo III (PKS III, descrita posteriormente), enzima relacionada con producción de metabolitos secundarios bioactivos y poco estudiada en bacterias. En la Fig. 3 se muestran en naranja los clusters productores de policétidos, y en otros colores se muestran clusters productores de otros metabolitos secundarios como terpenos, sideróforos y bacteriocinas.

Identified secondary metabolite clusters			
Cluster	Type	From	To
Cluster 1	Lantipeptide	72267	102585
Cluster 2	T3pks	124890	172966
Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of similarity)			
Cluster 3	Terpene	340592	364652
Cluster 4	T2pks	601922	648446
Cluster 5	T2pks	917250	973528
Cluster 6	Ectoine	1544399	1554797
Cluster 7	Siderophore	2545223	2561735
Cluster 8	Terpene	4784188	4805279
Cluster 9	Bacteriocin	5677289	5690995
Cluster 10	T1pks-Terpene	5692663	5759060
Cluster 11	Siderophore	5898933	5917934
Cluster 12	Terpene	6324749	6351985
Cluster 13	Bacteriocin	6754526	6764741
Cluster 14	Terpene	7213026	7234027

Fig. 3. Clusters encontrados en *S. K155* con antiSMASH para la producción de metabolitos secundarios.

Este cluster fue elegido como modelo de estudio y su análisis fue enfocado en la secuencia correspondiente a la PKSIII: la CDS 00140, debido a su potencial de producción de un metabolito secundario de interés.

El estudio genético de este metabolito puede realizarse mediante la investigación del cluster completo o de sus genes por separado, ya que se puede obtener información de la función

de cada gen dentro del cluster para la síntesis del metabolito. Para realizar este estudio hay múltiples herramientas, entre las cuales se encuentra la expresión homóloga (que consiste en la expresión o sobreexpresión de la secuencia dentro de la cepa silvestre) y la expresión heteróloga.

Expresión Heteróloga

Para conocer el funcionamiento de una CDS o un cluster genético es conveniente un análisis en el cual la secuencia a analizar se aísle del microorganismo en estudio, ya que así se puede conocer el producto generado por la secuencia sin interferencia de factores propios de la cepa.

Para realizar esto es necesario introducir la secuencia a analizar dentro de un hospedero con la capacidad metabólica de aceptarla y expresarla. Esta cepa receptora se denomina hospedero heterólogo, el cual debe encontrarse bien caracterizado y no debe contener naturalmente la secuencia a introducir. A la introducción de la secuencia en el hospedero se le conoce como “transformación”, proceso después del cual el hospedero adquiere la capacidad de síntesis de la proteína correspondiente a la secuencia introducida, que hipotéticamente tiene la capacidad de producción de una molécula de interés que

posteriormente puede ser detectada y caracterizada. Esto se realiza mediante la comparación entre el hospedero heterólogo sin la secuencia introducida y el hospedero transformado con dicha secuencia, realizando una comparación morfológica y química para la detección de cualquier producto producido por la CDS insertada.

Así pues, la expresión heteróloga consiste en el aislamiento y amplificación de la secuencia en cuestión, la inserción de la misma en un vector que la transporte, y la introducción del vector en el hospedero heterólogo para su expresión.

Existen diversos vectores que pueden ser utilizados para el transporte de una CDS y su introducción en los hospederos, entre los cuales se destacan los plásmidos.

Plásmidos

Un plásmido es una secuencia de ADN extracromosómico circular con replicación independiente, que contiene genes que le confieren determinadas características al microorganismo, como puede ser la resistencia a un antibiótico. Cuando se introduce un plásmido a un hospedero heterólogo, se emplea un antibiótico como marcador de resistencia debido a que se ha introducido en el vector un gen que confiere resistencia contra un antibiótico específico al cual la cepa normalmente es

sensible, por lo cual se puede saber que se ha introducido el plásmido con éxito cuando la cepa crece normalmente en presencia de dicho antibiótico.

En el plásmido, la región “promotor” permite regular la expresión del gen insertado, pudiendo expresarse continuamente o ser inducido por un compuesto determinado. Si el promotor es constitutivo, la secuencia insertada presenta una expresión constante y tanto la proteína como el metabolito son producidos por el hospedero. En contraste, si el promotor es inducible, la secuencia se expresa cuando se presenta determinada condición en el medio, por ejemplo, con la presencia de un compuesto químico determinado, un antibiótico, calor o luz.

Un plásmido puede ser integrativo en el genoma de un hospedero o puede mantenerse extracromosómico según el plásmido utilizado. Si el vector se mantiene extracromosómico, debe utilizarse un marcador de resistencia para mantener el vector bajo expresión constante, ya que si este no es necesario para el desarrollo de la cepa, el hospedero lo expulsará.

Una vez que el vector ha sido transferido al hospedero heterólogo y la secuencia introducida inicia su expresión, se realiza la síntesis de la proteína correspondiente. Dependiendo

de la proteína o el conjunto de proteínas expresadas será el metabolito producido.

Un grupo de proteínas bien caracterizadas y productoras de metabolitos secundarios de interés son las Policétido Sintetasas (PKSs).

Policétido Sintetasas (PKSs)

Los policétidos son una gran familia de productos naturales encontrados en bacterias, hongos y plantas, e incluyen muchos fármacos clínicamente importantes como la tetraciclina, eritromicina y lovastatina. Los policétidos son sintetizados a partir de precursores Acil-CoA y mediante la adición de sustratos extendedores (como Malonil-CoA, Etilmalonil-CoA, Metilmalonil-CoA, etc.) por medio de las policétido sintetasas (PKSs) [8].

Todos los tipos de PKSs realizan la biosíntesis de policétidos por medio de una serie de condensaciones descarboxilativas sobre los precursores e intermediarios, pero cada tipo de PKS presenta un mecanismo y estructura distintos. A continuación se describe brevemente cada tipo.

PKS Tipo I (PKS I)

En la Fig. 4 se muestra la estructura general de las PKS I.

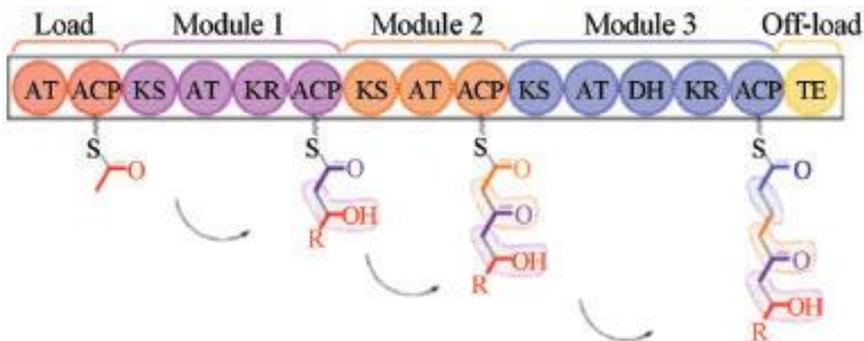


Fig. 4. Estructura y reacciones de una PKS I modular. Elongación de la cadena poliketídica por adición de sustrato en cada módulo [48]

Las PKSs tipo I son enzimas multidominio que se organizan en módulos, cada uno de los cuales cataliza una serie de reacciones no iterativas (no repetitivas) entre el Acil-CoA (sustrato iniciador) y las unidades extendedoras (Malonil-CoA, Etilmalonil-CoA, Metilmalonil-CoA, etc.) para la elongación de la cadena [48].

Estas proteínas utilizan una Proteína Acarreadora de Acilos (ACP) en cada módulo para la activación de los sustratos Acil-CoA y para continuar con la elongación del policétido intermedio [48].

En cada módulo se tienen 3 subunidades principales: la Proteína Acarreadora de Acilos (ACP), la Ceto-Sintasa (KS) y la Acil-

Aunque las PKS I se conocen por no realizar reacciones iterativas, se han reportado casos como AviM (síntesis de ácido orselínico), CalO5 (síntesis de calicheamicina) y NcsB (síntesis de neocarzinostatina), que generan policétidos aromáticos iterativamente y tienen las características estructurales para considerarse PKS Tipo I [8].

PKS Tipo II (PKS II)

A diferencia de las PKS I, las PKS II son complejos diméricos (con 2 subunidades que pueden ser iguales o distintas). Su estructura se muestra en la Fig. 6.

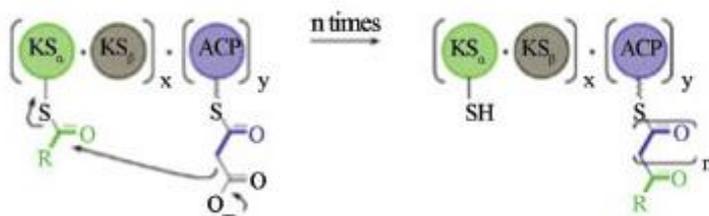


Fig.6. Estructura y reacción de una PKS Tipo II iterativa.

Elongación de la cadena en un solo dominio [48].

Estas proteínas catalizan una serie de reacciones iterativamente para la elongación de la cadena, es decir, repiten la misma reacción continuamente hasta finalizar la síntesis del policétido.

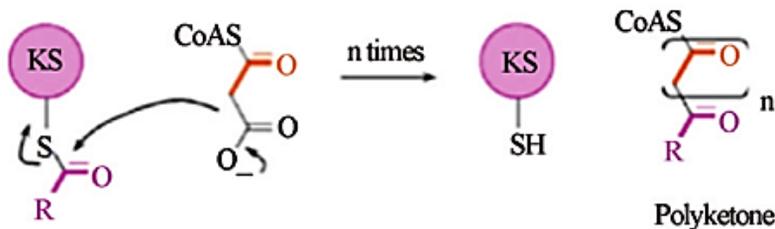


Fig. 8. Estructura y reacción de una PKS III: elongación iterativa de la cadena mediante el uso de grupos unidos a CoA como sustrato [48].

Estas enzimas se caracterizan por no hacer uso de ACP unido al sustrato iniciador, pudiendo utilizar el Acil-CoA directamente, pero existen casos reportados de proteínas que utilizan ACP unido a Acil-CoA como sustrato [9].

Anteriormente, se creía que las PKS III eran específicamente proteínas vegetales, sin embargo se ha descubierto la existencia de diversas enzimas de este tipo en microorganismos y hongos.

Hay una gran variedad de policétidos aromáticos que pueden ser sintetizados por las PKS III, como chalconas, pironas, acridonas, floriglucinoles, estilbenos, etc, lo cual es definido por factores que difieren entre diversos tipos de PKS III como la especificidad del sustrato iniciador y extendedor, el número de unidades extendedoras condensadas y las reacciones de ciclización realizadas [9]

Se ha reportado que las PKS III forman clusters con genes de síntesis de ácidos grasos para la biosíntesis de metabolitos secundarios, siendo reconocidas como el núcleo del cluster. Es decir: las PKS III generan y ciclan la cadena, y las proteínas contiguas maquillan a la molécula generada y le agregan sustituyentes [9]

A continuación se mencionan algunos ejemplos de metabolitos producidos por PKS III bacterianas y su cluster correspondiente.

- **Alquilquinona:** Gen *SrsA* en *Streptomyces griseus*, síntesis de alquilresorcinol modificado por metiltransferasas, hidroxilasas, etc.

Confiere resistencia a penicilina. Su síntesis se ilustra en la Fig. 9.

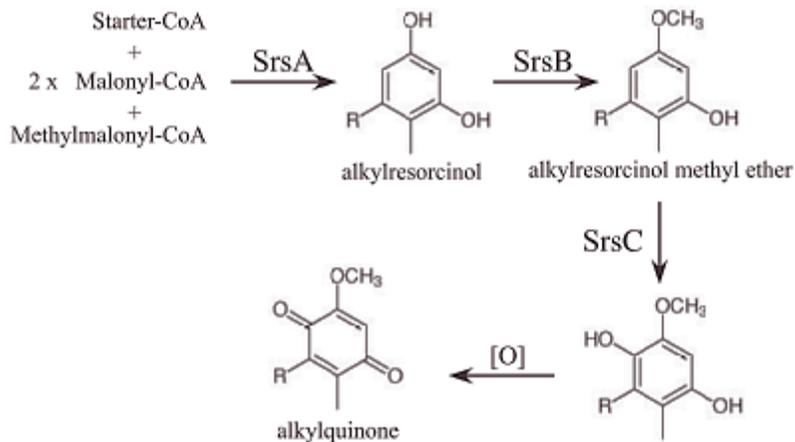


Fig. 9. Síntesis de alquilquinona por *S. griseus* [11].

- **Floroglucinol:** Gen PhID en *Pseudomonas fluorescens*. Utilizado como antiespasmódico [10] (Fig. 10).
- **Flaviolina:** En *Saccharopolyspora erythraea*. Utilizado como pigmento [10] (Fig. 10).
- **Germicidina:** Gen Gcs en *Streptomyces coelicolor*. Utilizado como regulador de la esporulación [10] (Fig. 10).

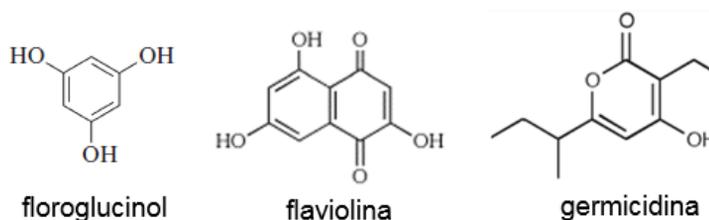


Fig.10. Estructuras de floroglucinol, flaviolina y germicidina.

La estructura de las PKS III es muy simple; estas proteínas catalizan diversas reacciones como el cebado, la extensión y la ciclización de la cadena en un solo centro catalítico [10].

En las PKS III, una sola CDS expresa toda la proteína, y dentro de la secuencia genética que las describe, una tríada catalítica es necesaria para el cebado y extensión de la cadena: Cys (Cisteína: C) – His (Histidina: H) – Asn (Asparagina: N), de la cual el sitio activo está definido por la Cisteína [10]. La estructura tridimensional de una PKSIII se muestra en la Fig. 11.

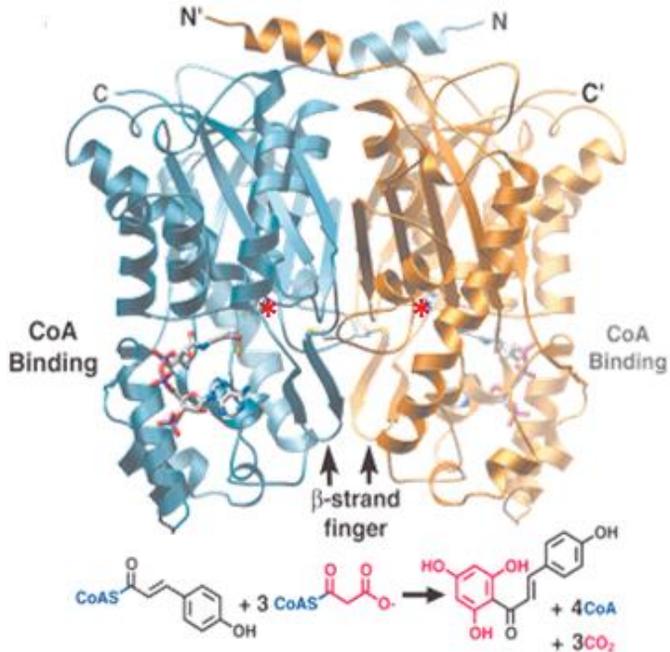


Fig.11. Estructura tridimensional de una PKS III de alfalfa. Sitio activo (Cys) marcado con * [12]

La tríada catalítica Cys-His-Asn se observa en la Fig. 12 utilizando como referencia la secuencia genética de PKS III encontradas en SrsA (relacionada con la síntesis de alquilquinona en *S. griseus*) y SCO7671 (PKSIII caracterizada en *S. coelicolor* sin caracterización de su metabolito) [11].



Fig. 12. Tríada catalítica C-H-N única para PKS III indicada con *

Incluso en la actualidad, la clasificación de las PKS III no se encuentra bien definida. Anteriormente, se conocían a las PKS III como “PKS parecidas a Chalcona-Sintasas (CHS)” debido a la similitud de sus estructuras, al igual que con las Estilbeno-Sintasas (STS). Ahora se sabe que CHS y STS son PKS III homólogas que se diferencian únicamente por la ciclización de la molécula generada, por lo cual actualmente se utiliza el término “superfamilia CHS/STS” o se les nombra indistintamente como PKS III, CHS o STS [12].

Debido a la necesidad de información referente a PKS III microbianas para su completo entendimiento, y ya que tienen una mayor diversidad tanto en mecanismo como en estructura de lo que se conoce, se puede decir que la búsqueda de estas proteínas novedosas proporciona nuevas oportunidades para el descubrimiento de nuevas moléculas y representa una actividad indispensable para el progreso de la Biología Molecular, brindando información necesaria para su clasificación y aplicación, así como nuevas perspectivas sobre la síntesis de policétidos y nuevas oportunidades para la ingeniería genética.

Metodología general

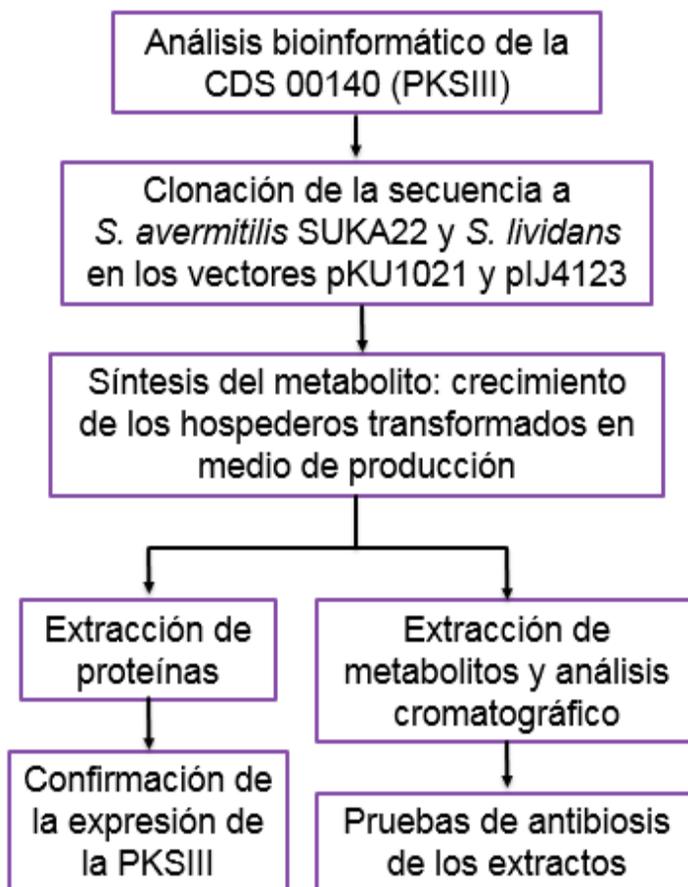


Fig. 13. Metodología general del proyecto

NOTA: Para consultar la composición de los medios de cultivo y soluciones especificados en el procedimiento experimental, consultar los anexos: II: Medios de Cultivo y III: Soluciones.

Cepas empleadas:

Hospederos Heterólogos:

- *Streptomyces lividans* TK24: Cepa bien caracterizada y capaz de producir undecilprodigiosina, pigmento rojo producido por el gen RedD, con utilidad para el uso del plásmido pIJ4123.
- *Streptomyces avermitilis* SUKA22: Cepa bien caracterizada y modificada genéticamente para impedir la producción de 22 metabolitos secundarios producidos por la cepa silvestre *S. avermitilis* WT (Wild Type).

Transformación de electrocompetentes:

- *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli* DH5 α): amplificación de ADN.
- *Escherichia coli* JM110 (*E. coli* JM110): obtención de ADN dam- / dcm-.

Pruebas de Antibiosis:

- *Micrococcus luteus* (*M. luteus*): actividad contra Gram-positivos
- *E. coli*: actividad contra Gram-negativos
- *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*): actividad contra levaduras

Vectores:

- Plásmido pKU1021:

Plásmido con un promotor constitutivo, de expresión constante, integrativo en el genoma de *Streptomyces*, con origen de replicación en *E. coli* y que permite el uso de Kanamicina (Kan) como marcador de resistencia (Fig. 14).

Plásmido donado por el Dr. Haruo Ikeda (Kitasato University, Tokyo)

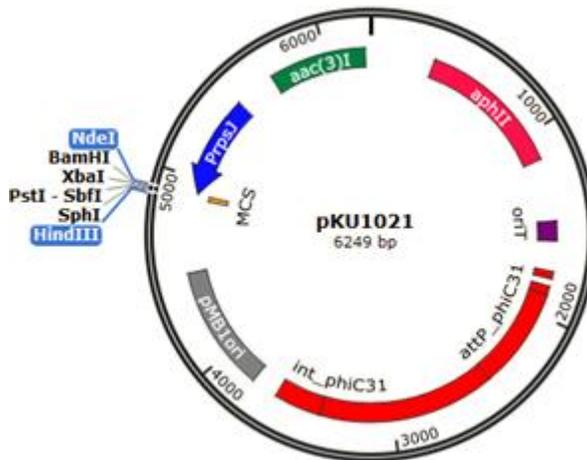


Fig. 14. Mapa circular del plásmido pKU1021, sitios de restricción en azul

- Plásmido pIJ4123:

Plásmido con el promotor TipA inducible por Tioestrepión (Thio), expresión regulable, alto número de copias, no integrativo en genoma de *Streptomyces*, con secuencia RedD que se interrumpe al introducir un inserto entre *NdeI* y *EcoRI*, produce cola de histidinas para la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad con Ni²⁺ y permite el uso de Kanamicina como marcador de resistencia. (Fig. 15).

Plásmido donado por el Dr. Luis Servín González (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

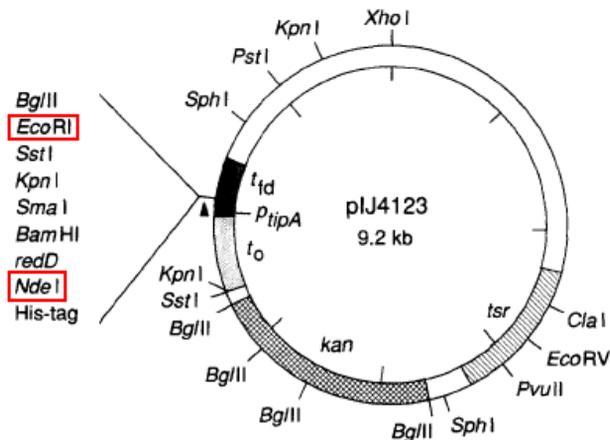


Fig. 15. Mapa circular del plásmido pIJ4123, sitios de restricción en rojo

Procedimiento experimental

1. Análisis bioinformático

La secuencia peptídica correspondiente a la CDS 00140 se analizó mediante el uso de los programas bioinformáticos:

- Pfam: Protein Families.
(<http://pfam.xfam.org/>) [15]
- BLASTp: Basic Local Alignment Search Tool.
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [16]
- Clustal Omega.
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [17], [18]
Alineamientos múltiples con secuencias peptídicas de PKSIII bacterianas presentes en *Mycobacterium tuberculosis* (NP_216176 y NP_216181) y *Streptomyces coelicolor* (NP_216181) cuyas secuencias fueron obtenidas con NCBI Protein:
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)
- ExpASy, Bioinformatics Resource Portal.
(<http://www.expasy.org/proteomics>) [44] para predicción de punto isoelectrico y peso molecular de la proteína.

2. Clonación de la PKSIII a *S. avermitilis* SUKA22 y *S. lividans* TK24 con pKU1021 y pIJ4123.

2.1. Diseño de Primers

Uso del programa bioinformático “Oligo Evaluator”, Sigma Aldrich (<http://www.oligoevaluator.com/Login.jsp>) para el análisis de los primers planteados.

- **Cloning Primers:**

Flanqueamiento exacto y amplificación de la secuencia 00140 (1087 pb). Eliminación de la secuencia regulatoria de la CDS 00140.

Cloning Primer Fwd para ambos vectores:

GCCATATGACCACCGTCGCCGCCGTGCACACC

Sitio de restricción ***NdeI*** en negritas.

Sustitución del codón de inicio de la CDS 00140 por el codón de inicio contenido en *NdeI* (ATG).

Cloning Primer Rev para pIJ4123:

GG**GAATTCT**CACCAGCGCAGCAGGACGAGTTC

Sitio de restricción ***EcoRI*** en negritas

Cloning Primer Rev para pKU1021:

GG**AAGCTT**TACCAGCGCAGCAGGACGAGTTC

Sitio de restricción ***HindIII*** en negritas

- **Check Primers:**

Amplificación de un fragmento interno de 766 pb (≈750 pb) de la secuencia 00140.

Check Primer Fwd:

CCGCACCCGCCATCTCGCCCTC

Check Primer Rev:

GGTGAGGGCGTCGTCGGGCAGG

2.2. Amplificación de CDS 00140

El ciclo de PCR empleado se ilustra en la Fig. 16.

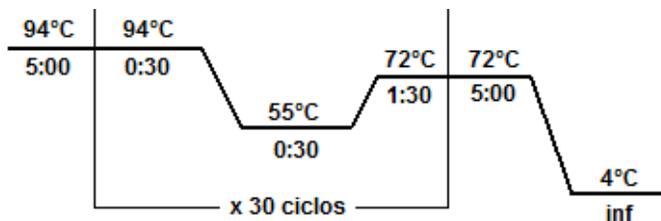


Fig. 16. Condiciones de amplificación de la secuencia 00140 de S. K155. Tiempo en minutos:segundos

Sistema utilizado: GC-RICH PCR System, Roche. Se usaron las condiciones para amplificación de fragmentos <3kb en organismos con alto contenido de GC. [20]

Mezcla de reacción de PCR (para 20 μ L)

Agua MilliQ esterilizada	6.4 μ L
Buffer (5X) GC-Rich PCR System, Roche	4 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1.2 μ L
DMSO (100%)	2 μ L
Primers (10 μ M)	2 μ L c/u
dNTPs (10 mM)	1 μ L
GC-RICH enzyme Mix GC-Rich PCR System, Roche	0.2 μ L
ADN genómico <i>S. K155</i> (50 ng/ μ L)	1.2 μ L

Control Negativo: misma mezcla de reacción sin adición de ADN genómico de *S. K155*.

El ADN genómico (ADNg) de *S. K155* se extrajo con el método descrito por Kieser, et. al. [36].

En este y todos los casos, la presencia del material genético fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando Gene Ruler 1kb DNA Ladder (0.5 μ g/ μ L) Thermo Scientific como marcador de peso molecular y 6x DNA Loading Dye Thermo Scientific como buffer de carga.

Condiciones: 90 V / 60 min. El gel fue marcado con bromuro de etidio y revelado con luz UV.

Para la identificación de la secuencia se utilizó como referencia el marcador de peso molecular Thermo Scientific 1 Kb ladder mostrado en la Fig. 17.

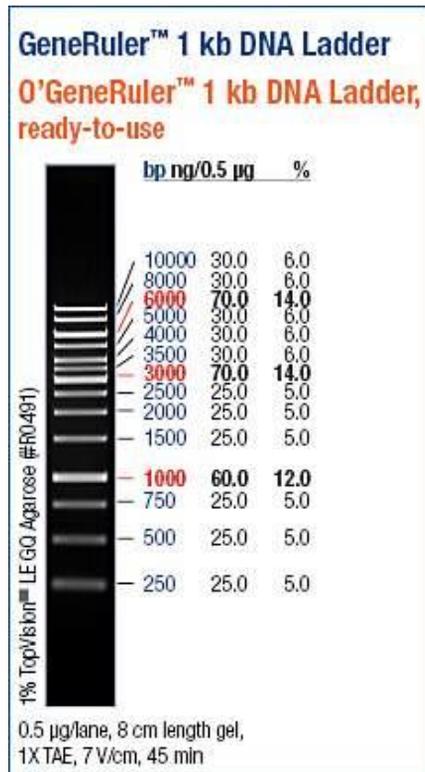


Fig. 17. Marcador de peso molecular: Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) 250-10,000 pb

La secuencia amplificada observada en el gel electroforético se purificó directamente con el kit: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega [21], [22] y se almacenó a -20°C.

2.3. Extracción y amplificación de plásmidos

- **pIJ4123**

Vector contenido en la cepa *S. lividans* 1326, que fue sembrada en medio líquido TSB + Kan 50 µg/mL (29°C / 5d / 200rpm) para la extracción del plásmido utilizando el sistema QIAGEN Plasmid Midi Kit [30] y el sistema Promega Wizard Purification System [31]. Paralelamente, la cepa *S. lividans* 1326 se sembró para esporulación masiva en agar MS + Kan 50 µg/mL (29°C / 5d), para recolección de esporas y almacenamiento a -80°C.

- **pKU1021**

Para su amplificación se introdujo en *E. coli* DH5α por electroporación (procedimiento descrito posteriormente). Extracción del plásmido por lisis alcalina; purificación con Fenol-Cloroformo y ARNasa; precipitado con Isopropanol / NaOAc; resuspendido en TE 0.1 y almacenado a -20°C.

2.4. Digestión

La secuencia purificada PKSIII y los dos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes:

- pIJ4123 y su secuencia: *NdeI/EcoRI*
- pKU1021: *NdeI/PstI/HindIII*

La CDS 00140 a introducir en pKU1021 fue digerida con *NdeI/HindIII*. Digestión adicional de pKU1021 con *PstI* para impedir religamiento del mismo.

Defosforilación: Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, Life Sciences) [32] para evitar la religación del plásmido.

En este y todos los casos en los que se realizó reacción de digestión, se utilizó ARNasa (RNase) para la purificación del material genético digerido.

Para todas las reacciones de digestión se usaron las siguientes condiciones: incubación a 37°C / 3 h e inactivación de enzimas a 65°C / 20 min.

Mezclas de reacción de digestión (para 20 µL)

Para pIJ4123 y su secuencia:

Agua MilliQ esterilizada	16 µL
NEBuffer 2.1 (10X) New England BioLabs	2 µL
ADN (50 ng/µL)	2 µL
<i>NdeI</i> / <i>EcoRI</i> (20,000 U/mL) New England BioLabs	0.2 µL c/u

Para pKU1021:

Agua MilliQ esterilizada	16 μ L
CutSmart® Buffer (10X) New England BioLabs	2 μ L
ADN (50 ng/ μ L)	2 μ L
<i>NdeI</i> (20,000 U/mL) New England BioLabs	0.3 μ L
RNAse Type IA (20mg/mL) Sigma Aldrich	0.5 μ L

Después de la digestión con *NdeI*, se realizó una digestión adicional con enzimas *PstI* y *HindIII* utilizando el doble del volumen de cada una debido a que presentan 50% de actividad en CutSmart® Buffer.

Para secuencia 00140 a introducir en pKU1021:

Agua MilliQ esterilizada	16 μ L
NEBuffer 2.1 (10X) New England BioLabs	2 μ L
ADN (50 ng/ μ L)	2 μ L
<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i> (20,000 U/mL) New England BioLabs	0.3 μ L c/u

Las especificaciones de las enzimas de restricción y Buffers utilizados se encuentran descritas por New England Biolabs [23], [24], [25], [26], [28], [29].

Posterior a la digestión se purificó el material genético para eliminación de ARN e impurezas, y se almacenó a -20°C.

2.5 Ligación

Utilizando los materiales genéticos digeridos y purificados, se manejaron 2 proporciones distintas de vector:inserto (en volumen) para la ligación de ambos plásmidos con la secuencia:

Mezclas de reacción de ligación (para 20 µL)

	<u>1:3</u>	<u>1:5</u>
Agua MilliQ esterilizada	9.5 µL	5.5 µL
Plásmido	2 µL	2 µL
Inserto (CDS 00140)	6 µL	10 µL
Ligase Buffer (10x) Promega	2 µL	2 µL
T4 DNA ligase Promega	0.5 µL	0.5 µL

Condiciones de ligación: T_{amb} / 4 h o 4°C / O.N.

Inactivación de ligasa a 65°C / 5 min

Obtención de 2 productos vector::inserto: pKU1021::PKSIII y pIJ4123::PKSIII. Se denomina PKSIII a la secuencia 00140 insertada en cada vector.

Se realizó transformación directa de los productos vector::inserto sin previa purificación ni revelado en gel de agarosa.

2.6. Transformación

La metodología de transformación de hospederos se resume en la Fig. 18.

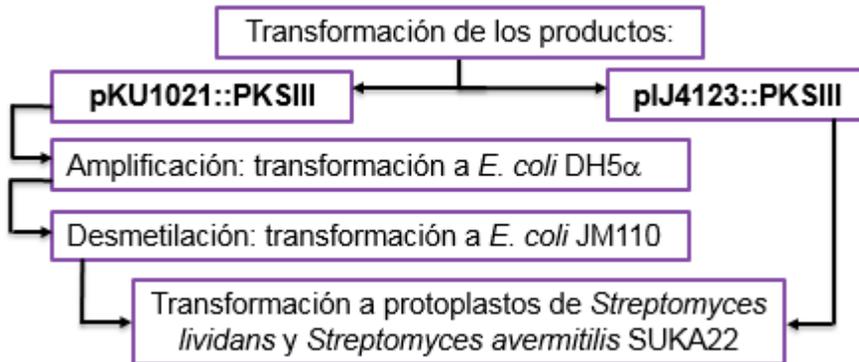


Fig. 18. Esquema general de transformación de productos vectoriales::inserto

Controles negativos: transformación de todas las cepas con los plásmidos vacíos circularizados (sin digestión previa).

➤ TRANSFORMACIÓN DE pKU1021::PKSIII Y pKU1021 VACÍO

Para la confirmación de todas las transformaciones correspondientes a esta sección se utilizaron las siguientes técnicas, en cada paso se confirmó el material genético obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa.

- a) Confirmación por crecimiento de colonias transformadas en presencia de Kanamicina 50 µg/mL (marcador de resistencia), usando esta concentración del antibiótico en todos los casos.

b) Confirmación por PCR de colonia

Verificación de la presencia de la secuencia de PKSIII en hospederos transformados con los productos vector::inserto.

Condiciones empleadas:

Sistema Phire[®] Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific) [33], utilizando dos Check primers diseñados para la amplificación de un fragmento interno de la secuencia (≈ 750 pb, ver el punto 2.1: Diseño de Primers en esta sección).

El ciclo de PCR empleado se ilustra en la Fig. 19.

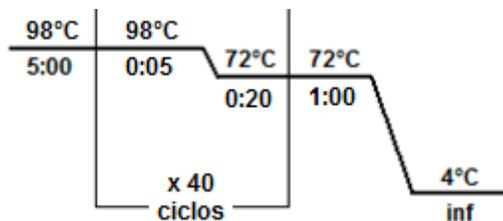


Fig. 19. Condiciones de amplificación de fragmento interno de la secuencia 00140 para PCR colonia. Tiempo en min:seg

Una muestra de una colonia aislada se disolvió en 15 μ L de Dilution Buffer (Phire[®] Plant Direct PCR Kit, Thermo Scientific) para ser usado como ADN templado [33].

Mezcla de reacción de PCR (para 10 µL)

Agua MilliQ esterilizada	2.9 µL
Buffer (2X) Phire® Plant Direct PCR Kit, Thermo Scientific	5 µL
DMSO (100%)	0.4 µL
Check primers (10 µM)	0.5 µL c/u
Phire Hot Start II DNA Polymerase Thermo Scientific	0.2 µL
ADN templado	0.5 µL

Control positivo: ADN genómico de *S. K155*

Control negativo: plásmido vacío extraído de cepas transformadas.

c) Confirmación por extracción de plásmidos y digestión
(únicamente para cepas de *E. coli*)

En todos los procedimientos de extracción de pKU1021 vacío y pKU1021::PKSIII a partir de cepas de *E. coli* se realizó siembra de colonias aisladas con palillo en 5 mL de medio LB + Kan (Incubación 37°C / 24 h / 200rpm) y posteriormente, extracción del producto amplificado mediante lisis alcalina; purificación con Fenol-Cloroformo y ARNasa; precipitado con Isopropanol / NaOAc; resuspensión en TE 0.1 y almacenamiento a -20°C.

Digestión de pKU1021::PKSIII con *NdeI* / *HindIII* para la obtención de dos fragmentos: pKU1021 (6.2kb) y PKSIII (1.1 kb). Reacción de acuerdo al punto 2.4 de esta metodología.

Controles Positivos:

- Plásmidos vacíos digeridos.
- Secuencia de PKSIII digerida.

Controles negativos:

- Productos vector::inserto sin digerir.
- Digestión de plásmidos vacíos extraídos de los hospederos (pIJ4123 en estreptomicetos y pKU1021 para cepas de *E. coli*).
- Muestras de digestión sin adición de ADN.

d) Confirmación por extracción de ADN genómico y amplificación (únicamente para hospederos heterólogos)

Extracción de ADN genómico de las cepas transformadas por medio del método descrito por el Dr. Ikeda (Anexo I).

A partir del ADN genómico se realizó una amplificación por PCR utilizando Check primers y Cloning primers de acuerdo a las condiciones descritas en el punto 2.2.

Transformación de pKU1021::PKSIII y pKU1021 vacío en cepas de *E. coli*:

i. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y JM110 a partir de un preinóculo de 5 mL LB incubado a 37°C / O.N. y realizando un inóculo de 400 mL LB + 1% preinóculo (Incubación a 37°C hasta O.D. $_{600} = 0.4$ a 0.7). Almacenadas a -80°C.

ii. Transformación por electroporación a *E. coli* DH5 α :

En todos los procedimientos de electroporación se emplearon las condiciones: 1250 V / 5 miliseg, permitiendo la transformación en medio SOC a 37°C / 2h y posterior siembra en agar LA + Kan (para selección de colonias transformadas), con incubación a 37°C / O.N.

Extracción de material genético para la siguiente transformación.

iii. Transformación por electroporación a *E. coli* JM110:

Electroporación, crecimiento y extracción de los vectores de acuerdo a las condiciones previamente descritas.

Transformación de pKU1021::PKSIII y pKU1021 vacío en *S. lividans* TK24 y *S. avermitilis* SUKA22:

A partir de pKU1021::PKSIII y pKU1021 vacío extraídos de *E. coli* JM110 se hizo transformación a protoplastos de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces avermitilis* SUKA22 mediada por PEG:

iv. Transformación a *Streptomyces lividans*:

La preparación de protoplastos y su transformación (realizada con procedimiento estándar) se hicieron según los procedimientos descritos por Kieser, et al. [27]

Condiciones de preparación de protoplastos: siembra en YEME (medio líquido) a 30°C / 36h / 200 rpm. Lisis con lisozima 1mg/mL: 30°C / 15 min. Resuspensión de protoplastos en Buffer P y almacenamiento a -80°C.

Condiciones de transformación de protoplastos: Cajas de agar R2YE deshidratadas 2h. Se utilizó Buffer T en lugar de Buffer P + 25% PEG1000. Siembra de protoplastos y Overlay con 2.5 mL de Soft Nutrient Agar (SNA) a 45°C.

Pre-siembra: cajas boca arriba a 30°C / 14-20h. Overlay utilizando Kanamicina en 2.5 mL de SNA a 45°C.

Siembra: 30°C / 48 h o hasta observar colonias, manteniendo las cajas boca arriba las primeras 24 h y boca abajo el tiempo posterior de incubación.

v. Transformación a *Streptomyces avermitilis* SUKA22:

La metodología utilizada fue estandarizada por Haruo Ikeda (Kitasato University, Japan) [34], [35] (procedimiento detallado de la preparación y transformación de protoplastos en el Anexo I). Las condiciones descritas para la preparación y transformación de protoplastos son únicamente para la cepa SUKA22 de *S. avermitilis*.

➤ **TRANSFORMACIÓN DE pIJ4123::PKSIII Y pIJ4123 VACÍO**

Para la confirmación de todas las transformaciones correspondientes a esta sección se utilizaron las siguientes técnicas.

- a) Confirmación por crecimiento de colonias transformadas en presencia de Kanamicina

- b) Confirmación por PCR de colonia con Check Primers de la misma manera que para la verificación de la transformación de pKU1021.

c) Confirmación por extracción de plásmidos y digestión

Condiciones de siembra:

Preinóculo: 10 μ L de esporas en 50 mL de medio TSB + Kan en matraz bafleado de 250 mL (30°C / 48h / 200 rpm)

Inóculo: 0.5 mL de preinóculo en 50 mL YEME (para *S. lividans*) o YMS⁺⁺ (para *S. avermitilis* SUKA22).

Incubación: 30°C / 5d / 200 rpm

Extracción de plásmidos por lisis alcalina.

Digestión de los productos pIJ4123::PKSIII con las enzimas de restricción *NdeI* / *EcoRI*.

Reacción de acuerdo al punto 2.4 de esta metodología, utilizando los mismos controles descritos para la transformación de pKU1021::PKSIII en cepas de *E. coli*.

Transformación de pIJ4123::PKSIII y pIJ4123 vacío en *S. lividans* TK24 y *S. avermitilis* SUKA22:

Ambas proporciones de ligación (1:3 y 1:5) del producto pIJ4123::PKSIII se transformaron directamente sin previa purificación sobre los protoplastos de ambos hospederos heterólogos como se describió en los procedimientos descritos previamente para ambas cepas, además de la transformación del plásmido vacío. Las condiciones de preparación y transformación de protoplastos fueron las mismas.

2.7. Selección y resiembra de transformantes

A partir de las colonias aisladas observadas en las cajas de transformación se tomó una porción de cada colonia aislada con palillo y se sembró en el medio de esporulación correspondiente: MS para *S. lividans* y YMS para *S. avermitilis* SUKA22.

La siembra fue en forma de parches para la recolección de aproximadamente 10 colonias por cada hospedero heterólogo.

Adición de Kan a todos los medios.

Incubación: 30°C / 5-7 días o hasta esporulación.

Resiembra: siembra masiva con hisopo en los mismos medios de esporulación para inducción de esporulación masiva y recolección de esporas. Incubación: 30°C / 5-7d.

2.8. Recolección y conteo de esporas

Durante la recolección de esporas, estas se filtraron dos veces en trampas de algodón a partir de las cajas sembradas para esporulación masiva. Recolección de esporas en 1 mL de glicerol 20% y almacenamiento a -80°C.

La determinación de la concentración de esporas recolectadas fue por medio de la siembra de diluciones de las mismas en agar MS (para *S. lividans*) y en agar YMS⁺⁺ (para *S. avermitilis* SUKA22).

Condiciones utilizadas:

Diluciones sembradas:

10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} por triplicado.

Incubación: 30°C / 5d.

Se realizó el conteo de las cajas que presentaron crecimiento de 25 a 250 colonias por caja, obteniendo el promedio para determinar la concentración de esporas de cada cepa (UFC/mL).

A partir de esta información se estandarizó el número de esporas para todas las muestras recolectadas.

2.9 Secuenciación

Verificación de la integridad de la CDS 00140 transformada en ambos hospederos heterólogos con productos vector::inserto mediante la extracción de la secuencia y su secuenciación.

Condiciones de incubación:

Medio vegetativo (TSB): 30°C / 48 h / 200rpm

Medio de producción (YEME): 30°C / 5d / 200 rpm.

- Hospederos transformados con pIJ4123 (no integrativo)
Extracción de plásmido por lisis alcalina a partir de un cultivo de 50 mL adicionado con Kan (50 µg/mL) y Thio (25 µg/mL).
Resuspensión en agua libre de nucleasas.

- Hospederos transformados con pKU1021 (integrativo)

Extracción de ADN genómico a partir de un cultivo de 50 mL siguiendo la metodología descrita en el Anexo I y resuspendiendo en agua libre de nucleasas.

Amplificación de la CDS 00140 por PCR con Cloning Primers como se describe en esta sección (Fig. 19). Se confirmó la presencia del material genético por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y revelado con luz UV, y posteriormente fueron enviadas a Laragen Inc, Sequencing and Genotyping (<http://www.laragen.com/>), para su análisis y secuenciación. A partir de las secuencias generadas, se realizó un alineamiento con la CDS 00140 teórica empleando Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [18] para la evaluación de la conservación del inserto.

3. Observación morfológica de hospederos transformados

Evaluación visual para la detección preliminar de diferencias en crecimiento, pigmentación, esporulación y morfología celular entre cepas con vectores vacíos y con productos vector::inserto.

Siembra en medio sólido

Siembra de esporas distribuidas homogéneamente en medio sólido para esporulación masiva (agar MS para *S. lividans* y agar YMS⁺⁺ para *S. avermitilis* SUKA22) a partir de una sola colonia aislada correspondiente a cada cepa. Incubación: 30°C / 5-7d.

Siembra en medio líquido

Preinóculo: Siembra de 10 μL de los stocks de las esporas estandarizadas en medio TSB + Kan como medio vegetativo.

Incubación: 30°C / 48 h / 200 rpm.

Resiembra del 1% de preinóculo en medio YEME como medio de producción, adicionando Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Thio (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las muestras de las cepas transformadas con pIJ4123.

Incubación: 30°C / 5-7 d / 200 rpm.

Se realizó tinción de Gram a un volumen fijo del inóculo (10 μL).

4. Confirmación de la expresión de la PKSIII

Se empleó Western Blot como inmunoensayo para la detección de proteínas en *S. lividans* y *S. avermitilis* SUKA22 con pIJ4123 vacío y pIJ4123::PKSIII [marcaje de la proteína expresada con Tallo de Histidinas (His-Tag)].

Los procedimientos de extracción de proteínas, SDS-PAGE, transferencia de proteínas, Western Blot y revelado de gel se describen en el Anexo I.

Las condiciones empleadas para las muestras analizadas se describen a continuación.

4.1 Fermentaciones

Uso de TSB como medio vegetativo y los medios de producción YEME y M. Sintético de la siguiente manera:

- Preinóculo: 10 μ L esporas estandarizadas en 50 mL TSB + Kan (50 μ g/mL). Incubación 30°C / 48h / 200rpm
- Inóculo: 1% preinóculo en 50 mL M. Sintético / YEME + Kan (50 μ g/mL). Incubación de acuerdo a la cepa, descripción a continuación.

Uso de distintos tiempos de inducción con Tioestrepón según la cepa:

- *S. lividans*

Adición de Tioestrepón al medio de producción al momento de la siembra de preinóculo según lo reportado para *S. lividans* [41]. Todas las muestras se incubaron a 30°C / 200 rpm. Las condiciones de siembra e incubación se muestran en la Tabla 3.

<i>S. lividans</i>	Tiempo de inducción	Tiempo total de incubación
+ pIJ4123 vacío	sin adición de Thio	48 h
+ pIJ4123::PKSIII	sin inducción	48 h
+ pIJ4123::PKSIII	24 h	24 h
+ pIJ4123::PKSIII	48 h	48 h

Tabla 3. Condiciones de incubación para ensayo de Western Blot en *S. lividans*. Tiempos indicados para inóculos en medios de producción

Se realizaron duplicados para cada siembra, considerando que se realizaron las 4 combinaciones descritas para cada uno de los dos medios de producción empleados.

❖ *S. avermitilis* SUKA22

Adición de Tioestrepón a las 48h de crecimiento. De la misma manera, las muestras se incubaron a 30°C / 200 rpm. Condiciones de siembra e incubación en la Tabla 4.

<i>S. avermitilis</i> SUKA22	Tiempo de inducción	Tiempo de incubación
+ pIJ4123 vacío	sin adición de Thio	4 d
+ pIJ4123::PKSIII	sin inducción	4 d
+ pIJ4123::PKSIII	48 h	4 d
+ pIJ4123::PKSIII	120 h (5d)	7 d

Tabla 4. Condiciones de incubación para ensayo de Western Blot en *S. avermitilis* SUKA22. Tiempos indicados para inóculos en medios de producción

Igualmente, cada siembra se realizó por duplicado y las 4 combinaciones se emplearon para cada medio de producción.

4.2 Extracción de proteínas

El procedimiento fue realizado sin modificaciones al método descrito en el Anexo I.

Las proteínas extraídas se almacenaron a 4°C por menos de 24h para proseguir con la electroforesis por SDS-PAGE.

4.3 SDS-PAGE

Se realizó la linearización de proteínas y electroforesis por SDS-PAGE [42], empleando gel de acrilamida al 14% para la electroforesis.

Condiciones empleadas: 70 V / 6-8 h.

Control positivo: Diterpeno-sintasa con peso de 35 kDa en geles desnaturizantes SDS-PAGE proporcionada por la Dra. Sara Centeno (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) [43].

El marcador de peso molecular (MPM) empleado se muestra en la Fig. 20.

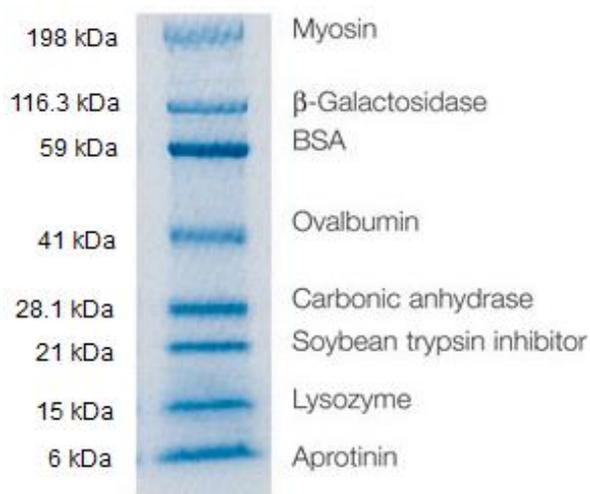


Fig. 20. Marcador de peso molecular: Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BioRad), 6-198 kDa.

4.4 Transferencia a membrana

En la transferencia de las proteínas se empleó una membrana “Immobilon-P” (0.45 μ m, PVDF) para la adsorción de las proteínas en el gel de SDS-PAGE.

Condiciones de transferencia: 60 V / 90 min

4.5 Western Blot

Condiciones empleadas:

Anticuerpos Anti-His: Mouse monoclonal 6x His tag antibody 3H2201 (GeneTex)

Anticuerpos Anti-Mouse: Goat Anti-mouse IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate G21060 (Life Technologies)

Solución de revelado: BCIP/NBT Substrate Solution (PerkinElmer Life Sciences, Inc)

Para las muestras correspondientes a *S. lividans*, se utilizaron anticuerpos Anti-His y Anti-Mouse con concentración de 1:5000, mientras que para las muestras correspondientes a *S. avermitilis* SUKA22, se usaron con concentración de 1:2000.

4.6 Teñido de Gel

Visualización de todas las proteínas producidas por las cepas bajo estudio con tinción del gel de SDS-PAGE con azul de Coomassie sin modificaciones de la metodología descrita en el Anexo I.

5. Producción de metabolitos secundarios, extracción y análisis preliminar del extracto total

A partir de los hospederos heterólogos transformados se realizaron fermentaciones y extracciones para la búsqueda de metabolitos secundarios.

5.1 Búsqueda del medio de producción más adecuado para la expresión de la PKSIII

Evaluación de dos medios vegetativos para la siembra de preinóculos y 4 medios de producción para siembra de inóculos, según se describe en la Fig. 21.

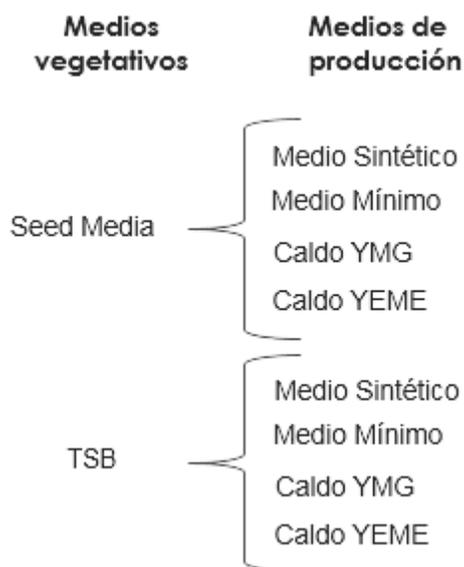


Fig. 21. Medios de cultivo evaluados para la expresión de PKSIII

Condiciones de incubación:

Medios vegetativos: 30°C / 48 h / 200 rpm

Adición de Kan (50 µg/mL) como marcador de resistencia.

Medios de producción: 30°C / 5-7d / 200 rpm

A cepas con pIJ4123, adición de Kan (50 µg/mL) y Tioestreptón (25 µg/mL) para la inducción de pIJ4123::PKSIII en ambas cepas, adicionando el antibiótico en el medio de producción al momento de la siembra en caso de *S. lividans* [41] y después de 48 h de incubación en el caso de *S. avermitilis* SUKA22 (durante fase estacionaria).

Uso de controles negativos: *S. lividans* y *S. avermitilis* SUKA22 WT (cepas sin transformar) en los medios mencionados + Kan.

5.2 Extracción con solventes orgánicos

Separación de biomasas y sobrenadantes por centrifugación a 8,000 rpm / 10 min. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada sobrenadante para la búsqueda de metabolitos en las fases acuosas, descrita posteriormente (punto 5.3).

Extracción de sobrenadantes: Cada sobrenadante (40 mL) se dividió en 2 para realizar la extracción utilizando 2 solventes distintos: EtOAc y CH₂Cl₂ (20 mL x 2 para cada solvente). Posteriormente, los extractos se concentraron a sequedad.

Extracción de biomásas: Las biomásas se extrajeron únicamente con EtOAc (30 mL), para lo cual se dejaron en agitación con dicho solvente por 2 horas. Nuevamente, los extractos se concentraron a sequedad.

Los extractos secos obtenidos se almacenaron a 4°C para después ser resuspendidos en 400 mL MeOH y emplearse para los análisis de búsqueda de metabolitos y actividad antibiótica.

5.3 Concentración de fases acuosas

Las alícuotas de los sobrenadantes fueron concentradas aproximadamente a 200 μ L para búsqueda de metabolitos secundarios polares (no solubles en los extractos orgánicos).

Controles negativos: Medios de producción (Medio Sintético, Mínimo, YEME y YMG) sin inocular, concentrados a 200 μ L aproximadamente.

Todas las fases acuosas concentradas fueron procesadas de la misma manera que los extractos orgánicos resuspendidos en MeOH para las pruebas de búsqueda de metabolitos.

5.4 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El análisis cromatográfico realizado consistió en el uso de la técnica de cromatografía en capa fina para los extractos orgánicos correspondientes a la extracción de sobrenadantes y

biomasas. Se cargaron 10-20 gotas pequeñas correspondientes a cada muestra en placas de Sílica Gel, y se emplearon 3 fases móviles para la detección de los metabolitos utilizando diferentes grados de polaridad:

- 98:2 CH₂Cl₂:MeOH
- 95:5 CH₂Cl₂:MeOH
- 9:1 CH₂Cl₂:MeOH

Como controles negativos se utilizaron: MeOH limpio y los concentrados de medios sin siembra.

Para el revelado de las placas se emplearon los reactivos: Fast Blue y Folin-Ciocalteu [46], [47].

6. Pruebas de antibiosis de los extractos

Mediante el método de Kirby-Bauer, se realizaron ensayos de antibiosis para *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando los extractos orgánicos resuspendidos en MeOH y los concentrados de fases acuosas.

Controles positivos: Kanamicina (50 µg/mL), Ampicilina (Amp, 100 µg/mL) y Tioestreptón (50 µg/mL).

Controles negativos:

- Para fases acuosas: medios sin inocular concentrados;
- Para extractos orgánicos: MeOH.

Prueba de Bioautografía

Adicionalmente se realizó prueba de bioautografía para los extractos con actividad antibiótica positiva utilizando el microorganismo en cuestión y una placa de CCF con el extracto eluído en la fase móvil más adecuada.

Condiciones: Vaciado de 15 mL NA + 1% de la cepa sobre la placa cromatográfica eluída con la fase móvil más adecuada.
Incubación: 37°C / 24h.

Control positivo: antibiótico con actividad antibiótica observada contra la cepa a evaluar (Kan/Amp/Thio).

7. Análisis del hospedero y el vector más adecuados para la expresión de la PKSIII

A partir de los resultados obtenidos en el proyecto, se determinó el mejor hospedero heterólogo y el mejor vector para la expresión heteróloga de la CDS 00140 de *S. thermocarboxydus* K155.

Resultados y Discusión

1. Análisis Bioinformático de CDS 00140

El cluster correspondiente a la CDS 00140 (cluster 2 en la Fig. 3) en el genoma de *S. K155* fue analizado con antiSMASH [14] para la obtención de información de los genes contenidos en el mismo, encontrando homología con clusters reportados en *Streptomyces*:

- *Streptomyces gancidicus* BKS 13-15: 89% de los genes mostraron similitud.
- *Streptomyces griseorubens* sp. JSD-1: 44% de los genes mostraron similitud.

El cluster predicho por este programa incluyó 48 genes, entre los cuales se encontraron genes biosintéticos, regulatorios y relacionados con el transporte; sin embargo, debido a que el programa asigna una alta cantidad de genes al cluster automáticamente realizando una sobreestimación, manualmente se acotó el contexto del cluster a 5 genes principales descritos en la Fig. 22.

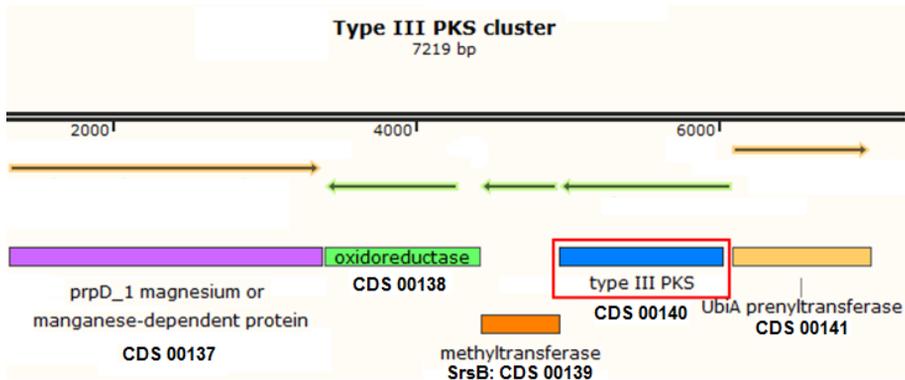


Fig. 22. Contexto genómico de la secuencia de interés (PKSIII)

Con el análisis de este cluster, se detectó la secuencia 00140 (CDS 00140), región genética identificada como la productora de una Policétido Sintasa Tipo III, la cual se identificó como la correspondiente al gen central del cluster, cuyo producto es modificado por los genes contiguos para la generación de un metabolito secundario desconocido. Por lo tanto, el interés en la secuencia 00140 radicó en su potencial de producción de una molécula central que conlleve a la producción de un metabolito secundario.

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la CDS 00140 fue analizada por herramientas de búsqueda que utilizaron colecciones de familias para realizar alineamientos múltiples con una amplia cantidad de secuencias presentes en sus bases de datos. Este análisis se orientó en la detección de secuencias homólogas para la confirmación de la proteína expresada por

dicha secuencia como PKSIII y en la búsqueda de la tríada catalítica Cys-His-Asn única para PKSIII.

En la Fig. 23 se muestra la secuencia peptídica con la predicción del peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (PI) teóricos de la proteína:



Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

10	20	30	40	50	60
MTTVAAVHTA	LPPHRYPQDR	LTEPIGDLCL	GPGADRALLR	RLHASAGVRT	RHLALPIERY
70	80	90	100	110	120
AELRDFRESN	EAWLTAGLDL	AERALTTALT	QAGLAPADV	LLVCASITGV	AAPSLDARLA
130	140	150	160	170	180
GRIGLRPDVK	RLPVFGLGCV	AGAAGLARVH	DYLRGHPGGT	AVLLTVELCS	LTLQKGDSSR
190	200	210	220	230	240
ANLVAGALFG	DGAAALVARA	APTGTGTGPE	GPAGPVVVAT	RSHLHPGTEH	LLGWDVGGGG
250	260	270	280	290	300
FRVVIDADV	ALVRRELGDH	VREFLAGHGL	DTRDIGAWVC	HPGGPKVLDA	VTDALALPDD
310	320	330	340	350	
ALTPSRRSLA	AVGNLSSASV	LHILQGFEA	HRPDPGTWGL	VLAMGPGFCT	ELVLLRW

SEQUENCE 357 AA,

Theoretical pI/Mw: 6.26 / 37123.51

Fig. 23. Secuencia peptídica con PI y PM calculados por ExpPASy [44]

Se predijo una secuencia de 357 aminoácidos que conforman una proteína con peso molecular esperado de 37.1 kDa.

De acuerdo con los alineamientos múltiples de la secuencia peptídica 00140 realizados con las bases de datos Pfam (Fig. 24) y BLASTp (Fig. 25), se encontró homología con estilbeno

sintasas (PKSIII) correspondientes a *Streptomyces* y con dominios C-terminal y N-terminal de chalcona y estilbena sintasas (PKSIII).

- **Pfam** [15]



Fig. 24. Secuencias peptídicas homólogas a la CDS 00140 encontradas por Pfam.

- **BLASTp** [16]



Fig. 25. Secuencias peptídicas homólogas a CDS 00140 encontradas por BLASTp.

Finalmente, se encontró la tríada catalítica Cys-His-Asn (C-H-N) [10], [11], [12], realizando alineamientos múltiples con secuencias peptídicas de PKSIII bacterianas presentes en *Mycobacterium tuberculosis* (NP_216176 y NP_216181) y *Streptomyces coelicolor* (NP_216181) (Fig. 26).

- **Clustal Omega** [17], [18]

The image shows a screenshot of the Clustal Omega multiple sequence alignment tool. The title 'Clustal Omega' is in a teal box, with the subtitle 'multiple sequence alignment' below it. There are three alignment blocks. Each block starts with a red-bordered box containing 'K155 CDS00140'. The first block shows the alignment of the Cys-His-Asn triad (residues 155-157) for three sequences: M. tuberculosis chalcone synthase 216176, M. tuberculosis chalcone synthase 216181, and S. coelicolor PKSIII 631710. The residues are: Cys (V), His (F), and Asn (G). The second block shows the alignment of the Cys-His-Asn triad (residues 155-157) for the same three sequences. The residues are: Cys (V), His (W), and Asn (V). The third block shows the alignment of the Cys-His-Asn triad (residues 155-157) for the same three sequences. The residues are: Cys (V), His (E), and Asn (I).

```

K155 CDS00140                ...VFGLGCVAGAAGL...
M.tuberculosis chalcone synthase 216176 ...LFGLGCVAGAAGV...
M.tuberculosis chalcone synthase 216181 ...LFGLGCVAGAAGV...
S.coelicolor PKSIII 631710         ...LFGLGCVAGAAGL...

K155 CDS00140                ...IGAWVCHPGGPK...
M.tuberculosis chalcone synthase 216176 ...VGAWVTHPGGPK...
M.tuberculosis chalcone synthase 216181 ...IGAWVSHPGGPK...
S.coelicolor PKSIII 631710         ...IGTWICHPGGPR...

K155 CDS00140                ...LAAVGLLSSA...
M.tuberculosis chalcone synthase 216176 ...LGEIGLLSSA...
M.tuberculosis chalcone synthase 216181 ...LGEIGLLSSA...
S.coelicolor PKSIII 631710         ...LAAVGMSSV...
  
```

Fig. 26. Tríada catalítica en PKSIII bacterianas usando Clustal Omega

Así, de acuerdo al análisis bioinformático realizado a la secuencia peptídica correspondiente a la CDS 00140, se confirmó que la proteína generada por dicha secuencia equivale a una Policétido Sintasa Tipo III, ya que presentó alta homología con secuencias reportadas para estas proteínas, y se identificó la tríada catalítica C-H-N única para PKSIII.

Adicionalmente, ya que la secuencia peptídica presenta un peso teórico de 37.1 kDa, y, como se mencionó previamente, las PKSIII presentan estructura homodimérica, es posible que el producto de la CDS 00140 presente dimerización para la producción de una proteína resultante de 74.2 kDa; sin embargo, esto debe ser confirmado con electroforesis de proteínas nativas a partir de una extracción protéica de los hospederos heterólogos, y ya que este no forma parte de los objetivos para el proyecto, basta decir que la secuencia expresada produce una secuencia peptídica teórica de 37.1 kDa.

2. Clonación de la PKSIII a *S. avermitilis* SUKA22 y *S. lividans* TK24 con pKU1021 y pIJ4123

2.1. Diseño de Primers

El diseño de los “Cloning Primers” (punto 2.1 de la metodología) permitió el flanqueamiento exacto de la secuencia 00140, y el uso de *NdeI* como enzima de restricción en el Cloning Primer Fwd permitió la sustitución del codón de inicio de la CDS 00140 por el codón de inicio contenido en *NdeI* (ATG), con lo que se eliminaron las secuencias regulatorias de la misma y su expresión se reguló únicamente por los vectores.

Se diseñaron adicionalmente los “Check Primers” con motivo de la amplificación de un fragmento interno de la secuencia (de 750

pb) para la confirmación de la presencia de la CDS 00140 en los hospederos una vez que estos fueron transformados.

En los resultados generados por el programa Oligo Evaluator (Sigma Aldrich) no se predijeron estructuras secundarias producidas durante la amplificación por PCR para los primers diseñados. Dichos primers presentaron alto contenido de GC y una alta temperatura de alineamiento (T_m) en todos los casos, la cual se mantuvo alrededor de los 82°C con una diferencia entre primers menor a 5°C , por lo que fue necesario emplear DMSO para mejorar la eficiencia de la reacción de PCR.

2.2. Amplificación de CDS 00140

A pesar de tener una elevada T_m , el ciclo de PCR empleado con $T_m = 55^\circ\text{C}$ generó una buena amplificación del fragmento de ≈ 1100 pb (Fig.27):

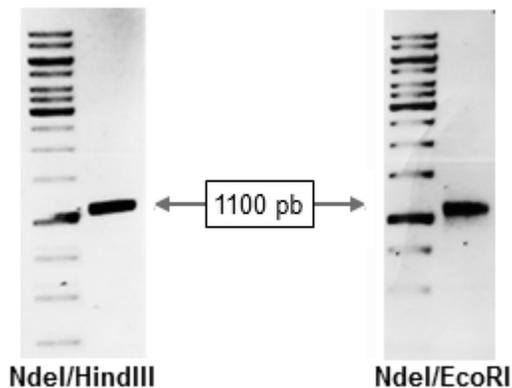


Fig. 27. Geles electroforéticos de secuencia 00140 (PKSIII) amplificada y purificada

2.3. Extracción de plásmidos

Los plásmidos amplificados, extraídos y purificados fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los vectores purificados fueron adecuados, como se muestra en la Fig. 28, presentando varias bandas debido al nivel de enrollamiento del plásmido, siendo visibles las conformaciones: superenrollada (o circular covalentemente cerrada: CCC), enrollada y circular relajada, mostrando un mayor avance en el gel a menor enrollamiento debido a que la forma afecta la velocidad de migración, pero manteniendo el mismo peso molecular en todos los casos.

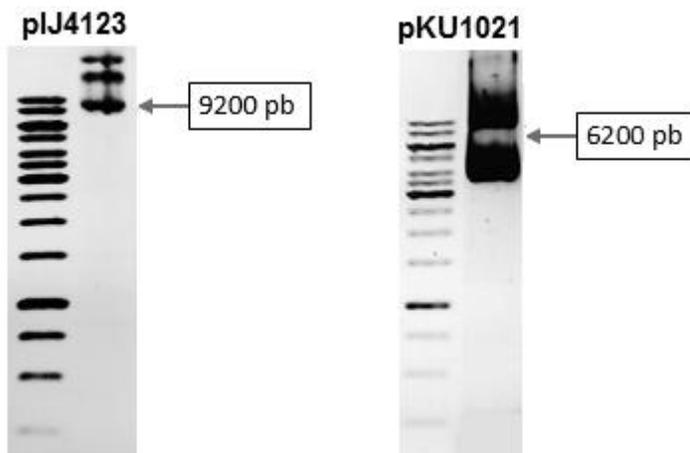


Fig. 28. Plásmidos pIJ4123 y pKU1021 amplificados y extraídos de *S. lividans* 1326 y *E. coli* DH5 α respectivamente

2.4 Digestión

Se confirmó la presencia del ADN digerido (ambos vectores y sus secuencias correspondientes) mediante electroforesis en gel de agarosa considerando que los plásmidos se linearizan al digerirse observándose ligeramente más abajo que los plásmidos circularizados debido a su conformación abierta, obteniendo las bandas presentadas en la Fig. 29.

En las bandas de la secuencia 00140 no se observó un cambio de peso molecular debido a que solo se perdieron 10 pares de bases en el proceso de digestión, por lo que la electroforesis se realizó para la verificación de la presencia adecuada del material genético en la muestra.

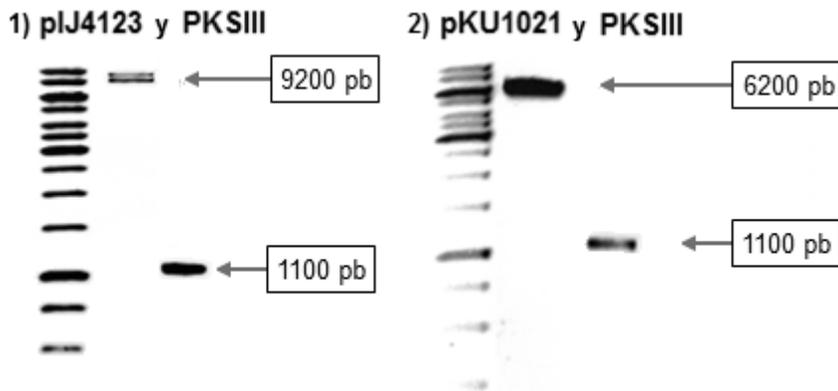


Fig. 29. Plásmidos pIJ4123 (1) y pKU1021 (2) y secuencias de PKSIII digeridos y purificados

Cabe mencionar que el vector pKU1021 presentó religación posterior cuando fue digerido solamente con *NdeI* / *HindIII*, incluso cuando se realizó defosforilación posterior, por lo que este se digirió con el sitio de restricción adicional *PstI*. Este sitio se encuentra entre *NdeI* y *HindIII*, por lo que la digestión produce un fragmento genético grande con *NdeI* y *HindIII* digeridos en los extremos (6,213 pb) y dos fragmentos pequeños (12 y 24 pb) con una menor probabilidad de religación (Fig. 30).



Fig. 30. Digestión de pKU1021 con *NdeI*, *PstI* y *HindIII*

Una vez digerido con *NdeI*/*PstI*/*HindIII*, pKU1021 se linearizó adecuadamente presentando la conformación observada en la Fig. 29 (2), la cual no presentó religación durante el procedimiento de ligación, permitiendo la inserción de la secuencia 00140 al plásmido.

2.5 Ligación

A partir de la ligación se obtuvieron los productos vector::inserto:

pKU1021::PKSIII	7,336 pb
pIJ4123::PKSIII	10,274 pb

En el caso de pIJ4123, al haber introducido una secuencia entre *NdeI* y *EcoRI* (sitios de restricción empleados), se interrumpió la expresión de RedD, perdiendo la capacidad de producción de undecilprodigiosina y por lo tanto la pigmentación roja en el caso de *S. lividans*, que contiene este gen.

Los productos vector::inserto ligados no fueron confirmados con electroforesis en gel de agarosa previo a la transformación para evitar la pérdida de material genético, por lo que se realizó la transformación directamente con la mezcla de ligación de ambas proporciones vector::inserto (1:3 y 1:5) sobre las cepas a transformar. Después de la transformación se realizó una extracción de material genético para la confirmación de la ligación correcta de los productos y su presencia en los hospederos.

2.6 Transformación

La introducción de los productos vector::inserto en los hospederos heterólogos se realizó mediante dos metodologías distintas debido a que el plásmido pIJ4123 no permite la replicación en *E. coli* y pKU1021 sí. Por lo mismo, fue posible el uso de *E. coli* para amplificación y desmetilación de pKU1021 vacío y con inserto, lo cual no fue posible para el vector pIJ4123. Asimismo, la confirmación de la transformación de ambos

vectores fue distinta debido a que pKU1021 es integrativo en el genoma de *Streptomyces* y pIJ4123 no lo es.

Las colonias seleccionadas (las que presentaron el mejor crecimiento observado) de todos los hospederos y cepas transformadas presentaron resistencia a Kanamicina, lo cual puede ser atribuido a la expresión del gen *aph(3')II* presente en los vectores introducidos a los mismos; sin embargo, esto no es suficiente para asegurar que la transformación se realizó de manera exitosa, ya que es posible que se hayan seleccionado colonias que hayan desarrollado resistencia a este antibiótico de manera espontánea por alguna mutación genética que impidiera la unión de la Kan al ribosoma bacteriano. Así, la confirmación de la presencia del inserto PKSIII en los hospederos consistió en la amplificación de fragmentos presentes en las secuencias insertadas por medio de PCR de colonia, directamente desde la selección de colonias, tanto para cepas de *E. coli* como para los estreptomicetos transformados.

Sin embargo, la secuencia de PKSIII pudo haberse introducido en los hospederos, pero sin estar dentro de su vector (lo cual implicaría que no se exprese en los mismos y por lo tanto no se produzca la PKSIII ni sus metabolitos), por lo cual, para confirmar que la secuencia se insertó adecuadamente en su vector, se extrajeron los vectores y se realizaron digestiones con

las enzimas de restricción correspondientes. En el caso de pKU1021, la transformación adecuada en ambos hospederos heterólogos se confirmó mediante la extracción de su ADN genómico y amplificación por PCR utilizando Check primers (amplificación de un fragmento de 766 pb) y Cloning primers (amplificación de la secuencia completa: 1087 pb). Se muestran posteriormente las bandas amplificadas en cada caso.

➤ **Transformación de pKU1021::PKSIII y pKU1021 solo**

Para la amplificación del producto pKU1021::PKSIII y del plásmido pKU1021 vacío se utilizó a *E. coli* DH5 α , una cepa no patógena modificada genéticamente para permitir una alta eficiencia de transformación, utilizada para clonación en el laboratorio [19].

Debido a que esta cepa produjo material genético metilado, se decidió emplear a *E. coli* JM110 dam-/dcm- (cepa modificada genéticamente para la generación de ADN desmetilado que puede ser reconocido por *Streptomyces* [19]), previo a la transformación de pKU1021 y pKU1021::PKSIII en los hospederos.

En todos los casos, los controles negativos correspondientes a la ausencia de amplificación fueron adecuados debido a que no se observó ninguna banda en los geles.

- Transformación a *E. coli* DH5 α :

El resultado de PCR de colonia utilizando los Check primers para la amplificación de un fragmento interno de la secuencia (≈ 750 pb) en la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con pKU1021::PKSIII, mostrado en la Fig. 31, confirmó la presencia de la secuencia PKSIII dentro de esta cepa.

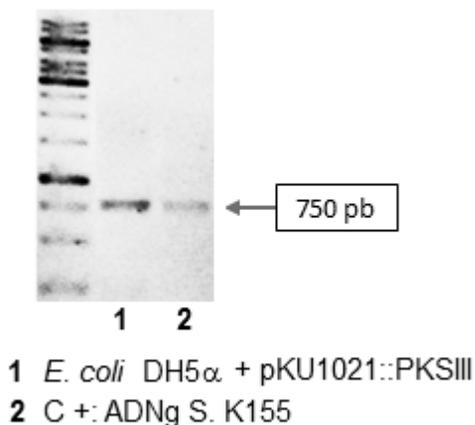


Fig. 31. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *E. coli* DH5 α con pKU1021::PKSIII

Los plásmidos extraídos de *E. coli* DH5 α se muestran en la Fig. 32, donde se observaron nuevamente varias bandas en un corrimiento largo debido al nivel de enrollamiento del plásmido.

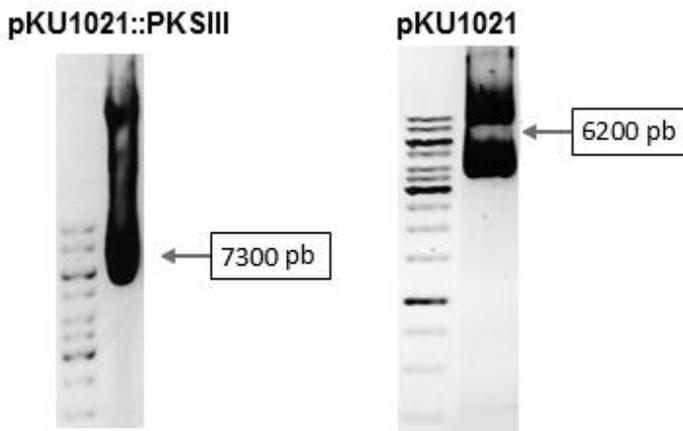


Fig. 32. Plásmidos pKU1021::PKSIII y pKU1021 extraídos de *E. coli* DH5 α .

A partir de los productos observados en la Fig. 32 se realizó digestión con *NdeI* / *HindIII*, a partir de la cual el producto pKU1021::PKSIII (7.3 kb) generó los dos fragmentos linearizados: pKU1021 (6.2kb) y PKSIII (1.1 kb), tal como se muestra en la Fig. 33.

Con este resultado se confirmó la transformación exitosa de pKU1021 vacío y con inserto en *E. coli* DH5 α , así como la ligación adecuada de la CDS 00140 en el vector pKU1021.

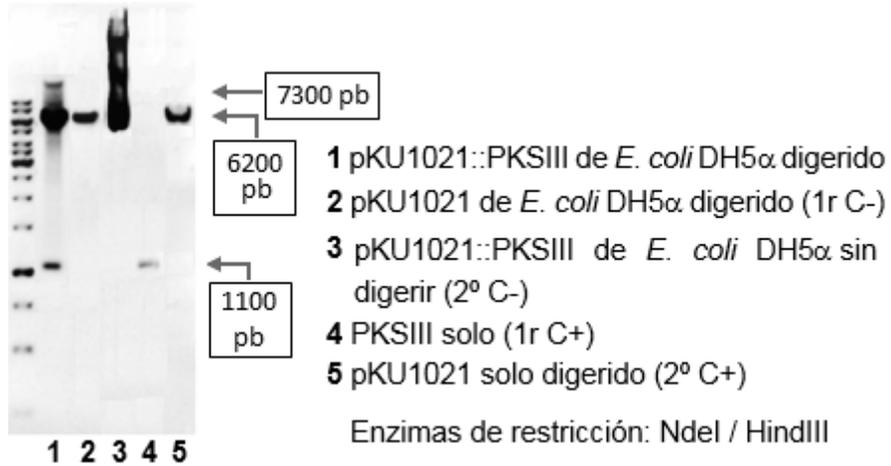


Fig. 33. Digestión de pKU1021::PKSIII de *E. coli* DH5 α con *Nde*I/*Hind*III

- Transformación a *E. coli* JM110:

El resultado de PCR de colonia usando Check primers para *E. coli* JM110 con pKU1021::PKSIII confirmó la presencia de la PKSIII dentro de la cepa transformada (Fig. 34).

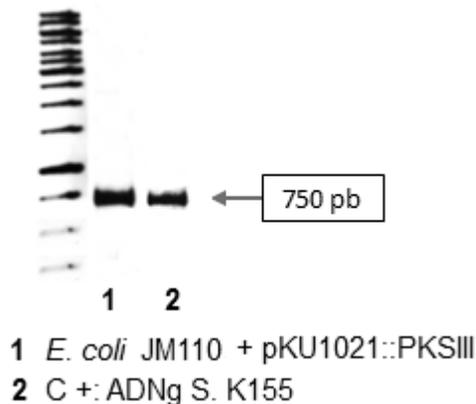


Fig. 34. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *E. coli* JM110 con pKU1021::PKSIII

Los vectores fueron extraídos de *E. coli* JM110, obteniendo el resultado mostrado en la Fig. 35.

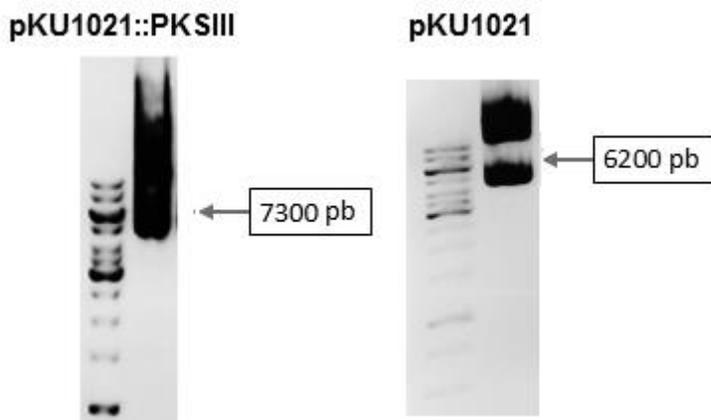


Fig. 35. pKU1021::PKSIII y pKU1021 extraídos de *E. coli* JM110

A partir de los productos observados en la Fig. 35 se realizó nuevamente la digestión con *NdeI* / *HindIII*, con la cual se obtuvieron los dos fragmentos linearizados: pKU1021 (6.2kb) y PKSIII (1.1 kb), tal como se muestra en la Fig. 36, confirmando la transformación exitosa de pKU1021 vacío y con inserto en *E. coli* JM110, así como la ligación adecuada de la CDS 00140 en el vector pKU1021.

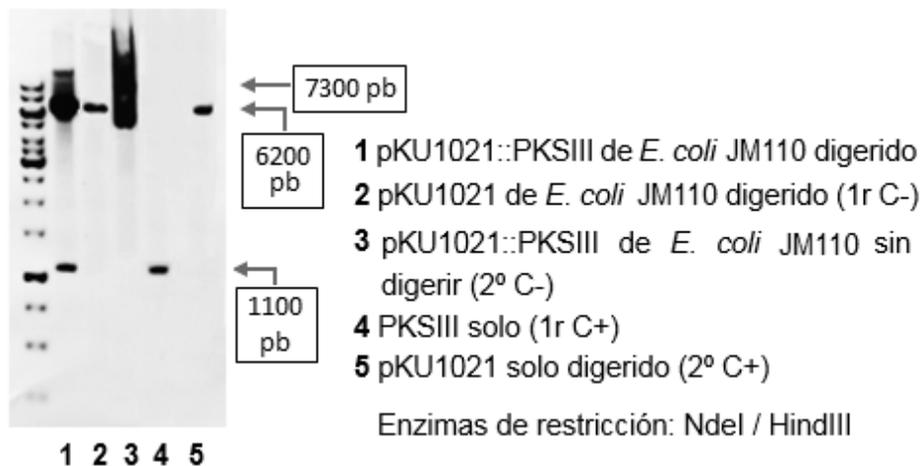


Fig. 36. Digestión correspondiente a pKU1021::PKSIII de *E. coli* JM110

Ambas cepas de *E. coli* fueron transformadas adecuadamente, tanto con pKU1021::PKSIII como con pKU1021 vacío, permitiendo el uso de estos productos para su introducción en hospederos heterólogos, en los cuales se integraron al genoma.

- Transformación a *S. lividans*:

Para la transformación de protoplastos de este hospedero se utilizó Buffer T en lugar de Buffer P + 25% PEG1000 debido a que se reporta mayor eficiencia de transformación para el Buffer T [27].

Se realizó PCR de colonia con Check primers directamente a las colonias obtenidas después de la transformación de

protoplastos, confirmándose la presencia de la CDS 00140 en *S. lividans* por medio de la amplificación del fragmento interno de ≈ 750 pb observado en la Fig. 37.

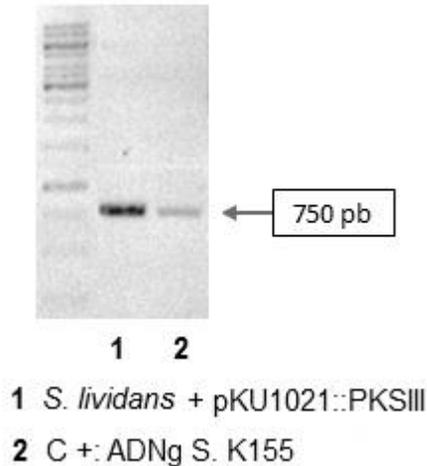


Fig. 37. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *S. lividans* con pKU1021::PKSIII

La confirmación de la transformación exitosa para pKU1021 en ambos hospederos heterólogos se realizó mediante la extracción de su ADN genómico y amplificación del mismo por PCR utilizando tanto Check primers (amplificación de ≈ 750 pb) como Cloning primers (Amplificación de la secuencia completa: ≈ 1100 pb). Así, fue confirmada la transformación exitosa de *S. lividans* con pKU1021::PKSIII con la amplificación de los fragmentos esperados (Fig. 38).

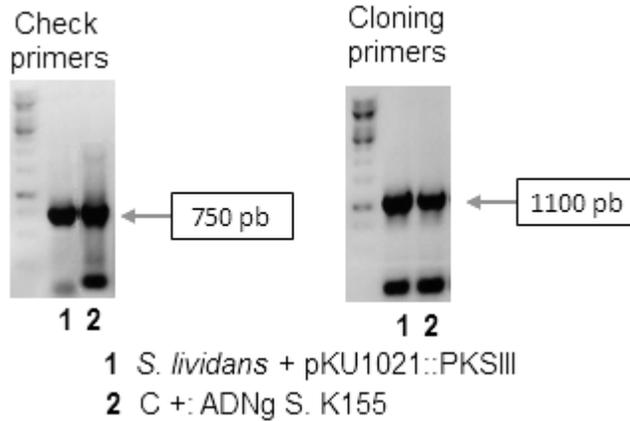


Fig. 38. Amplificación de fragmentos de PKSIII por PCR con ambos pares de primers en *S. lividans* con pKU1021::PKSIII.

- Transformación a *S. avermitilis* SUKA22:

Después de la transformación de protoplastos, por medio de PCR de colonia se observó la amplificación de fragmentos de ≈ 750 pb que revelan la presencia de la secuencia de la PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22, tal como se muestra en la Fig. 39.

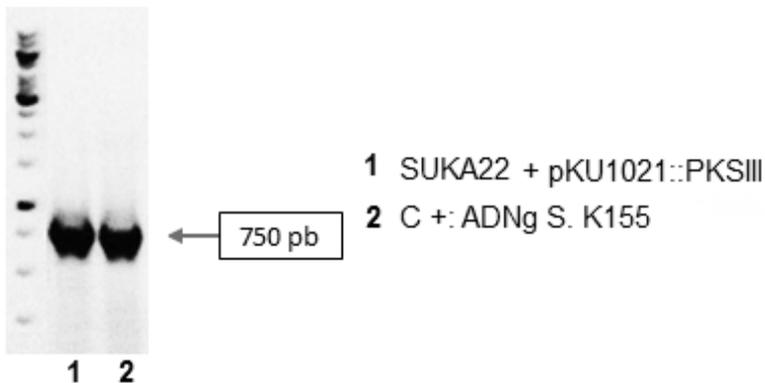


Fig. 39. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *S. avermitilis* SUKA22 con pKU1021::PKSIII

Una vez extraído el ADNg de este hospedero, se realizó PCR con Check primers y Cloning primers, amplificándose los fragmentos genéticos esperados (Fig. 40), y confirmándose la transformación exitosa de pKU1021::PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22.

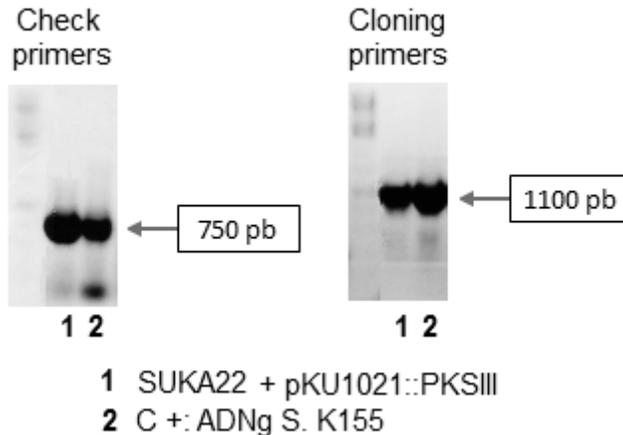


Fig. 40. Amplificación de fragmentos de PKSIII por PCR con ambos pares de primers a *S. avermitilis* SUKA22 con pKU1021::PKSIII

Con estos resultados se asegura que se introdujo exitosamente el producto pKU1021::PKSIII en todas las cepas transformadas.

Cabe mencionar que no se extrajo ADN genómico de hospederos transformados con pKU1021 vacío debido a que su presencia solo se confirmó por resistencia a Kanamicina, ya que no se diseñaron primers para la amplificación de un

fragmento interno del vector, y no se confirmó la presencia de este vector por medio de otro método.

➤ **Transformación de pIJ4123::PKSIII y pIJ4123 solo**

El plásmido pIJ4123, por no ser integrativo en el genoma de *Streptomyces*, pudo ser extraído de los hospederos heterólogos para la confirmación de la transformación exitosa.

- Transformación a *S. lividans*:

Después de la obtención de colonias a partir de la transformación de esta cepa con pIJ4123, se realizó PCR de colonia con Check primers y se confirmó la presencia de la secuencia PKSIII dentro de las mismas como se observa en la Fig. 41.

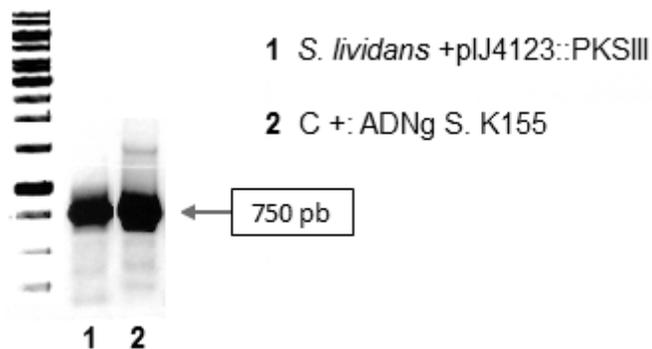


Fig. 41. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *S. lividans* con pIJ4123::PKSIII

Se realizó extracción de pIJ4123 vacío y del producto pIJ4123::PKSIII a partir de las colonias seleccionadas, obteniendo los productos mostrados en la Fig. 42.

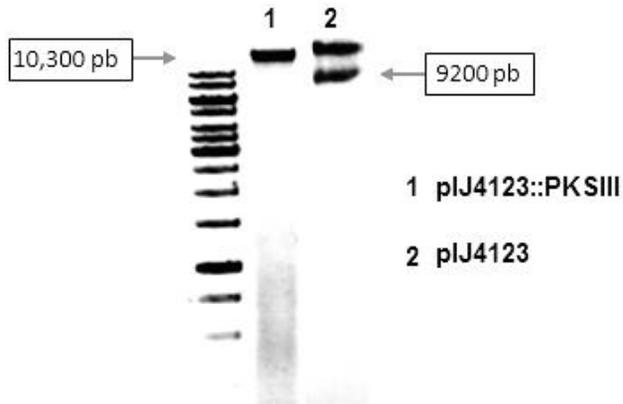


Fig. 42. pIJ4123::PKSIII y pIJ4123 vacío extraídos de *S. lividans*

A partir de los plásmidos extraídos (fig. 42) se realizó digestión con *NdeI* / *EcoRI* para la obtención de dos fragmentos: pIJ4123 (9.2kb) y PKSIII (1.1 kb), con lo cual se confirmó la transformación exitosa de pIJ4123::PKSIII en *S. lividans*, así como la ligación adecuada de la CDS 00140 con el vector pIJ4123, tal como se muestra en la Fig. 43.

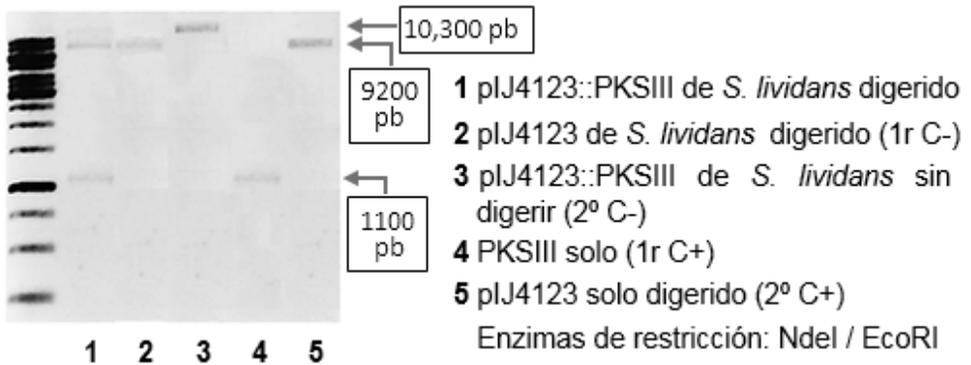


Fig. 43. Digestión correspondiente a pIJ4123::PKSIII de *S. lividans*

▪ Transformación a *S. avermitilis* SUKA22:

A partir del PCR de colonia usando Check primers realizado a este hospedero se amplificó un fragmento de ≈ 750 pb (Fig. 44) y se confirmó la presencia de la secuencia PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22.

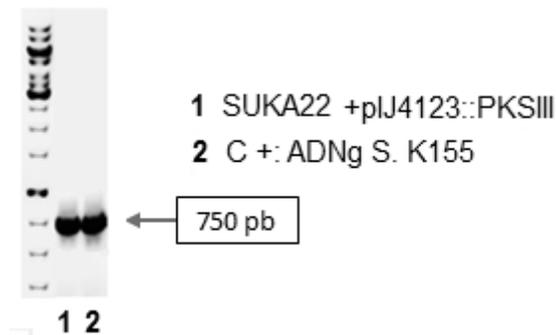


Fig. 44. Amplificación de fragmento interno de PKSIII por PCR de colonia a *S. avermitilis* SUKA22 con pIJ4123::PKSIII

Se realizó la extracción de pIJ4123::PKSIII y pIJ4123 vacío a partir de las colonias seleccionadas, obteniendo el siguiente resultado:

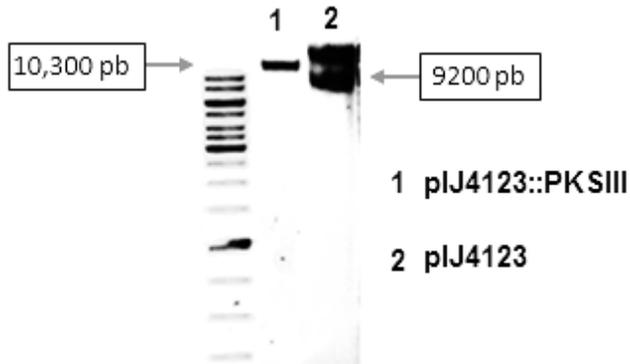


Fig. 45. pIJ4123::PKSIII y pIJ4123 vacío extraídos de *S. avermitilis* SUKA22

A partir de los plásmidos observados en la Fig. 45 se realizó digestión con *NdeI* / *EcoRI*, y gracias a la amplificación de los fragmentos esperados: pIJ4123 (9.2 kb) y PKSIII (1 kb) observados en la Fig. 46, se comprobó que la transformación de pIJ4123::PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22 fue adecuada.

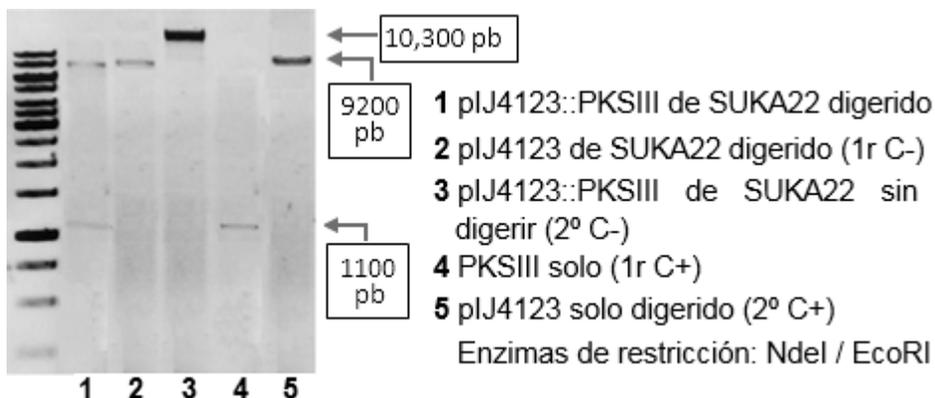


Fig. 46. Digestión correspondiente a pIJ4123::PKSIII de *S. avermitilis* SUKA22

Con los resultados obtenidos se comprobó que la transformación directa de pIJ4123::PKSIII sobre protoplastos de ambos hospederos heterólogos fue exitosa; de la misma manera, se confirmó que tanto los plásmidos vacíos como los dos productos vector::inserto se insertaron adecuadamente dentro de ambos hospederos heterólogos.

Además, en todos los casos se confirmó la ligación correcta de la CDS 00140 con el vector pIJ4123 mediante la digestión con las enzimas de restricción *NdeI/EcoRI*, generando buenos resultados para ambos hospederos heterólogos.

Adicionalmente, tanto los plásmidos vacíos como los productos vector::inserto extraídos de los hospederos se observaron en

buena concentración y pureza, ya que las bandas observadas fueron gruesas y de color intenso.

Cabe mencionar que después del proceso de transformación para todos los hospederos se observó una buena cantidad de colonias utilizando ambas proporciones de ligación de los productos vector::inserto (1:3 y 1:5), es decir, la eficiencia de transformación fue buena con cualquiera de las proporciones utilizadas, obteniendo colonias aisladas en ambos casos.

Los hospederos heterólogos finales transformados fueron los siguientes:

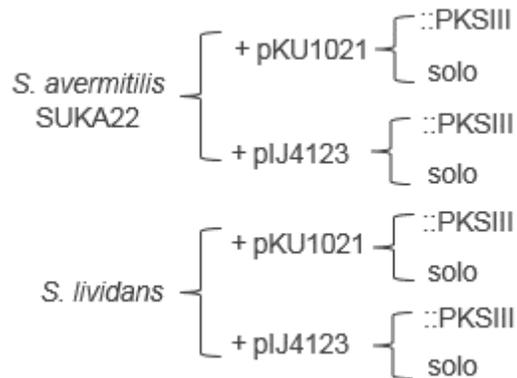


Fig. 47. Esquema de hospederos heterólogos transformados

2.7 Recolección y conteo de esporas

Previo a la recolección de esporas, las cajas sembradas se utilizaron para la evaluación morfológica preliminar de los hospederos en medio sólido, reportada más adelante (punto 3 de esta sección).

Las esporas recolectadas se filtraron en trampas de algodón dos veces en lugar de una debido a la falta de retención del micelio que se presentó al utilizar solo una.

La determinación de la concentración de esporas se realizó para establecer un número estandarizado de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a sembrar posteriormente en medios vegetativos.

Los resultados del conteo realizado se muestran en la Tabla 5.

<i>S. lividans</i>	No. Esporas (UFC/ μ L)
+ pKU1021 vacío	1.5×10^6
+ pKU1021::PKSIII	1.0×10^7
+ pIJ4123 vacío	6.5×10^3
+ pIJ4123::PKSIII	1.0×10^5

<i>S. avermitilis</i> SUKA22	No. Esporas (UFC/ μ L)
+ pKU1021 vacío	9.0×10^6
+ pKU1021::PKSIII	4.0×10^7
+ pIJ4123 vacío	4.8×10^5
+ pIJ4123::PKSIII	7.3×10^4

Tabla 5. Concentraciones de stocks de esporas de ambos hospederos heterólogos transformados con ambos vectores.

A partir de las concentraciones calculadas para las esporas de los hospederos heterólogos se realizaron los siguientes cálculos:

Unificación de la cantidad de esporas para siembra en medios vegetativos:

Se tomó como referencia la concentración de *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII por tener la segunda concentración más baja de esporas (7.3×10^4 UFC/ μ L), y se igualaron las demás concentraciones a esta:

S. avermitilis SUKA22 + pIJ4123::PKSIII

Siembra de 10 μ L:

$$\left(7.3 \times 10^4 \text{ UFC} / \mu\text{L}\right) (10 \mu\text{L}) = 7.3 \times 10^5 \text{ UFC}$$

Todos los volúmenes se ajustaron para siembra de 7.3×10^5 UFC en medios vegetativos, calculando las diluciones necesarias y los volúmenes a sembrar.

La concentración de esporas recolectadas se mantuvo alrededor del orden de 1×10^5 a 1×10^7 UFC/ μ L, pero se observó más baja para *S. lividans* + pIJ4123 vacío (6.5×10^3 UFC/ μ L), y más alta para *S. lividans* + pKU1021::PKSIII (1×10^7 UFC/ μ L) y *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII (4×10^7 UFC/ μ L). A pesar de que aparentemente la presencia de pKU1021::PKSIII mejora la esporulación de las cepas, con esta información no se puede atribuir la diferencia de esporulación a la presencia de la

CDS 00140 debido a que no se cuenta con datos suficientes, además de que en algunos casos se observó mayor esporulación y en otros menor esporulación, siendo que en ambos casos las diferencias no fueron significativas. Para poder concluir sobre el efecto de la secuencia o el vector sobre la concentración de esporas es necesario realizar el conteo de las mismas a partir de varias colonias por cada cepa transformada (Fig. 47) comparando la esporulación contra las cepas WT, y debido a que únicamente se realizó esta determinación a partir de una colonia por cada cepa sin conteo de esporas de hospederos sin transformar, no se puede hacer conclusiones al respecto. Sin embargo, se observó preliminarmente que la integración de la CDS 00140 no presenta un efecto significativo sobre la esporulación de los hospederos transformados, y las diferencias observadas pudieran ser atribuidas a factores experimentales como el uso de distintos medios de esporulación o el procedimiento de recolección de esporas.

2.8 Secuenciación

Las CDS 00140 extraídas y amplificadas de los hospederos heterólogos transformados con productos vector::inserto se obtuvieron en buena concentración y pureza, tal como se muestra en la Fig. 48.

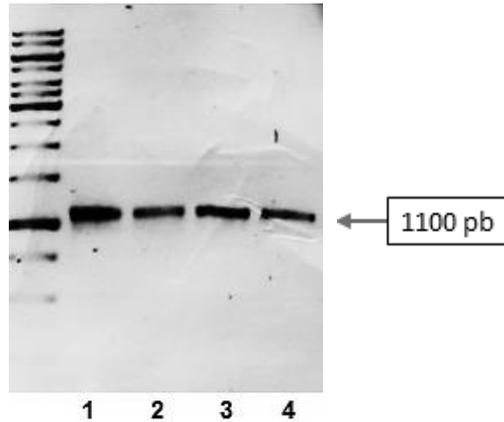


Fig. 48. Secuencias 00140 extraídas de hospederos transformados:
 1. CDS 00140 de *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII
 2. CDS 00140 de *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII
 3. CDS 00140 de *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII
 4. CDS 00140 de *S. lividans* + pKU1021::PKSIII

A partir de la secuenciación realizada por Laragen Inc. (<http://www.laragen.com>) se generaron dos resultados: una lectura de la secuencia Fwd y otra lectura Rev, las cuales fueron fusionadas para la obtención de una sola secuencia. Las secuencias fueron reportadas con sus cromatogramas correspondientes, gracias a los cuales se pudo determinar la identidad de algunas bases no identificadas.

La secuencia resultante para cada muestra fue alineada con la CDS 00140 teórica (con los primers correspondientes al plásmido insertado en la muestra) mediante el uso de Clustal Omega [18] (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), con lo

cual se verificó la conservación de las secuencias una vez que fueron expresadas por los hospederos.

Cabe mencionar que la secuenciación no es capaz de leer las bases iniciales y finales de las secuencias, observándose una serie de bases no reconocidas en los extremos, por lo que estos fragmentos no se tomaron en cuenta para la determinación de la conservación de la secuencia en los hospederos. Para hacer la confirmación completa de que la secuencia se encuentra en marco de lectura (identificación del codón de inicio y de paro) y poder hacer la verificación de la conservación de toda la secuencia, se tendrían que diseñar primers que amplifiquen por fuera de la secuencia, es decir, fragmentos de cada plásmido que se encuentren alrededor de la secuencia aproximadamente a 50 pb de distancia para que las regiones que no se lean durante la secuenciación sean del plásmido correspondiente y se pueda leer por completo la secuencia PKSIII.

Se determinaron los siguientes porcentajes de homología para las secuencias nucleotídicas con respecto a la CDS 00140 teórica:

- *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII: 99.6%
- *S. lividans* + pKU1021::PKSIII: 97.2 %
- *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII: 97.9%
- *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII: 96.7%

Ya que en todos los casos se obtuvieron valores mayores al 96%, se puede decir que la secuencia se encontró bien conservada en todos los hospederos. Además, se realizó la traducción de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos para la obtención de secuencias peptídicas, a partir de las cuales se realizó otro alineamiento utilizando como referencia a la secuencia peptídica de la CDS 00140.

Homología encontrada para secuencias peptídicas:

- Hospederos transformados con pKU1021::PKSIII: 100% de homología con CDS 00140.
- Hospederos transformados con pIJ4123::PKSIII: 99.7%, cambio de un aminoácido: Alanina (A) por Valina (V).

En la evaluación del cambio de aminoácido en las secuencias de las cepas transformadas con pIJ4123, se observó que hubo un cambio de nucleótido que causó la producción de Valina (GTC) en lugar de Alanina (GCC) para ambos hospederos, con lo cual se infirió que este cambio de base se realizó durante la amplificación por PCR de la secuencia a introducir en pIJ4123; error que probablemente se debe a la ADN polimerasa. Cabe mencionar que este cambio de aminoácido no alteró la tríada catalítica de la secuencia (C-H-N), y tampoco afectó la expresión de la proteína ni la producción del metabolito secundario correspondiente a la misma, lo cual se confirmó con Western Blot

y análisis cromatográfico de los extractos, ensayos discutidos posteriormente.

3. Evaluación morfológica preliminar de los hospederos heterólogos transformados

Para determinar si la expresión de la PKSIII tiene un efecto sobre el crecimiento y morfología de los hospederos es necesario realizar una evaluación cuantitativa a diversas colonias de cada cepa transformada. Para este trabajo la evaluación fue cualitativa y se realizó únicamente a una colonia por cada cepa. Esta evaluación consistió en la observación del crecimiento tanto en medio sólido como en medio líquido para la búsqueda de diferencias morfológicas que pudieran ser atribuibles a la expresión de la PKSIII, considerando la pigmentación, crecimiento y morfología celular de las cepas como criterios morfológicos.

Crecimiento en medio sólido

La evaluación en medio sólido se realizó a partir de las cajas sembradas para la recolección de esporas de cada hospedero, por lo que la discusión de la esporulación en esta sección se realizó en función de la pigmentación del mismo, sin considerar las diferencias entre la concentración de esporas, lo cual fue discutido previamente.

- *Streptomyces lividans*

- + pKU1021:

La morfología observada para *S. lividans* transformada con pKU1021 se observó igual entre el vector vacío y el producto vector::inserto, tal como se observa en la fig. 49.

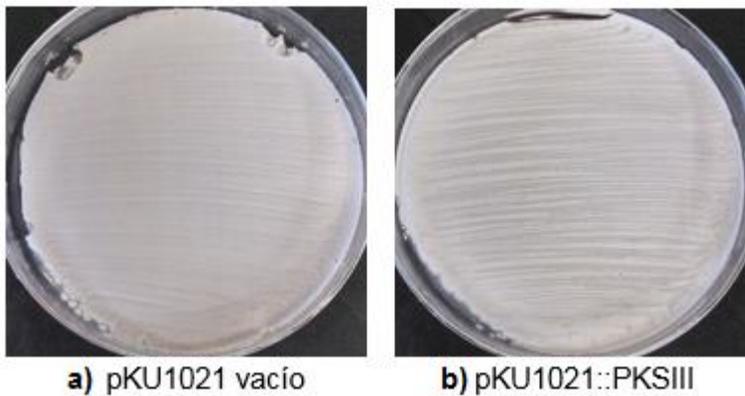


Fig. 49. Esporulaci3n de *S. lividans* transformada con el vector pKU1021 en agar MS + Kan

- + pIJ4123:

Se observ3 pigmentaci3n roja en el caso de *S. lividans* transformada con pIJ4123 vac3o que no se observ3 con el producto pIJ4123::PKSIII (Fig. 50).

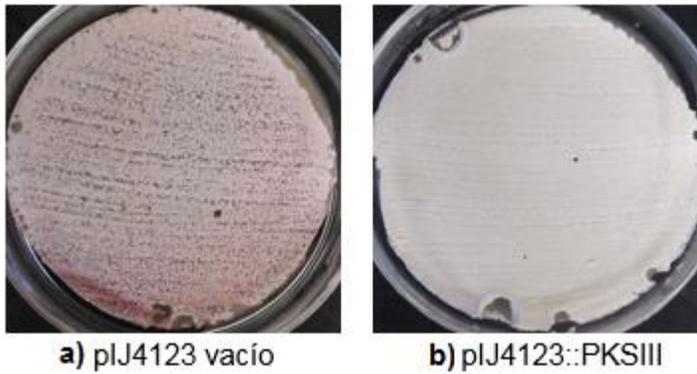


Fig. 50. Esporulaci3n de *S. lividans* transformada con el vector pIJ4123 en agar MS + Kan

Esta diferencia no es atribuible a la expresi3n de la PKSIII debido a que el pl3smido pIJ4123 vaci3 expres3 a RedD, produciendo undecilprodigiosina y generando coloraci3n roja al medio, la cual fue interrumpida por la presencia del inserto al eliminar RedD del vector; por lo tanto, esta diferencia de coloraci3n 3nicamente confirma que la secuencia de la PKSIII se encontr3 insertada adecuadamente en su vector.

- *Streptomyces avermitilis* SUKA22
 - + pKU1021

La morfología observada para *S. avermitilis* SUKA22 transformada con pKU1021 se observó igual entre el vector vacío y el producto vector::inserto (Fig. 51).

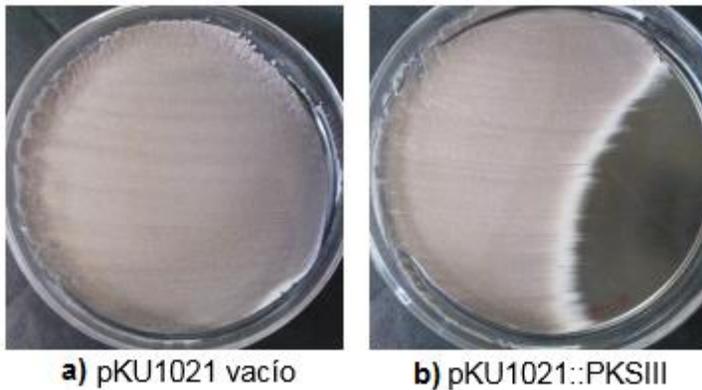


Fig. 51. Esporulaci3n de *S. avermitilis* SUKA22 transformada con el vector pKU1021 en agar YMS⁺⁺ + Kan

- + pIJ4123

Nuevamente, la morfologí a observada en *S. avermitilis* SUKA22 transformada con pIJ4123 se observ3 igual entre el vector vací o y el producto vector::inserto, tal como se muestra en la Fig. 52.

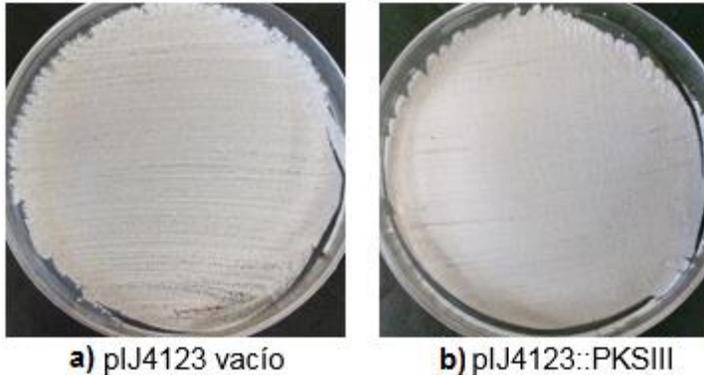


Fig. 52. Esporulaci3n de *S. avermitilis* SUKA22 transformada con el vector pIJ4123 en agar YMS⁺⁺ + Kan

Ya que para el crecimiento de los hospederos en medio de esporulaci3n no se observaron diferencias morfol3gicas entre las cepas transformadas con vectores vacíos y las transformadas con productos vector::inserto, se determin3 que la secuencia de la PKSIII insertada no caus3 un efecto morfol3gico observable sobre los hospederos en medio s3lido.

Crecimiento en medio l3quido

Se unific3 la concentraci3n de esporas para siembra en medios vegetativos con motivo de poder realizar determinaciones semicuantitativas de los ensayos realizados a partir de los extractos obtenidos de las fermentaciones en medios de producci3n, y as3 poder evaluar el efecto de la presencia de la

CDS 00140 sobre el crecimiento de una cantidad estandarizada de esporas de cada cepa.

Para observar el crecimiento de cada cepa y detectar las diferencias causadas por la presencia de la PKSIII a nivel microscópico, se realizó tinción de Gram, observando en todos los casos actinomicetos Gram-positivos, sin contaminación del medio con otros microorganismos.

Se muestran los resultados de las tinciones de Gram realizadas a los hospederos a partir de 10 μ L del medio líquido, junto con la descripción de su crecimiento y sus características macroscópicas.

- *Streptomyces lividans*.
 - + pKU1021:

Observación al microscopio:

Para la cepa transformada con el vector vacío, se observó formación de agregados grandes, con buena concentración, tamaño y forma; mientras que en *S. lividans* con pKU1021::PKSIII, los estreptomicetos Gram + se observaron en baja cantidad, disgregados y cortos, como se muestra en la Fig. 53.

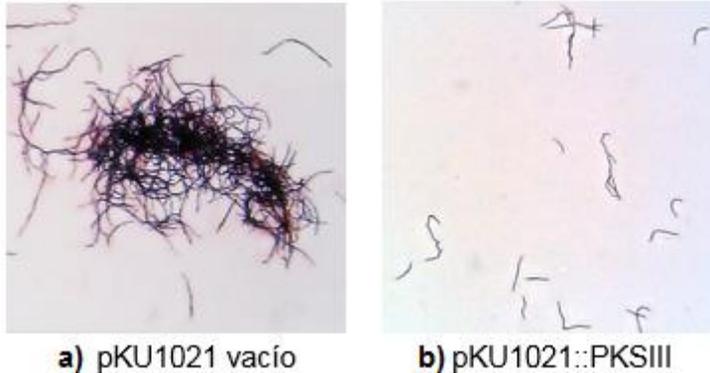


Fig. 53. Tinción de Gram para *S. lividans* + pKU1021

Crecimiento del cultivo:

- pKU1021 vacío: Biomasa con coloración roja y medio color rojizo-marrón claro.
- pKU1021::PKSIII: Biomasa con coloración rosada ligera, medio sin cambio de color (amarillo inicial).

Macroscópicamente no se observaron diferencias significativas para las muestras de *S. lividans* con pKU1021. En cambio, se presentaron diferencias en el crecimiento celular, ya que el vector vacío permitió el crecimiento de células saludables, largas, formando agregados grandes y en alta cantidad; en cambio, con la presencia del inserto PKSIII se disminuyó el crecimiento de los estreptomicetos, tanto en número como en tamaño y forma, observándose cortos y delgados, en baja cantidad y sin formar agregados (Fig. 53). Sin embargo, para establecer una relación

hipotética entre la presencia de la PKSIII y su efecto sobre el crecimiento es necesaria una comparación con las demás cepas transformadas, lo cual se discute más adelante.

➤ + pIJ4123:

Observación al microscopio:

Con el vector pIJ4123 vacío, se observó la formación de agregados medianos, además de observarse esporas; mientras que con el producto pIJ4123::PKSIII, el micelio presentó formación de agregados más pequeños. En ambos casos, el micelio se observó en buena concentración, forma y tamaño (Fig. 54).

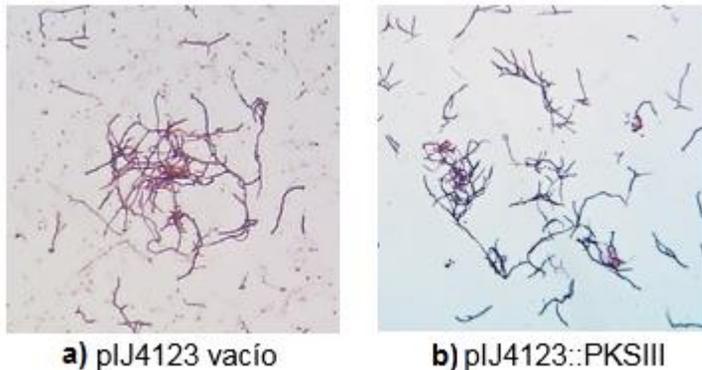


Fig. 54. Tinción de Gram para *S. lividans* + pIJ4123

Crecimiento del cultivo:

- pIJ4123 vacío: Biomasa con coloración roja muy intensa, al igual que el medio.

- pIJ4123::PKSIII: Biomasa con coloración blanca, medio sin cambio de color (amarillo inicial).

No se observaron diferencias significativas debidas a la presencia de la PKSIII en el hospedero, siendo que el crecimiento en ambos casos se mantuvo en buena concentración y con buena morfología, observándose agregados ligeramente más pequeños con la presencia de la PKSIII, y presencia de esporulación en medio líquido en el caso de la inserción del vector vacío (Fig. 54).

Cabe mencionar que nuevamente la ausencia de pigmentación de *S. lividans* transformada con el producto pIJ4123::PKSIII y la pigmentación intensa observada en *S. lividans* con el vector vacío, tanto en medio líquido como en medio sólido, confirman la interrupción de RedD y por lo tanto la ligación adecuada de la CDS 00140 a pIJ4123.

- *Streptomyces avermitilis* SUKA22.

- + pKU1021:

Observación al microscopio:

Para la cepa con el vector vacío se observaron estreptomicetos formando agregados en alta cantidad, con buen tamaño y forma; para la cepa con el producto pKU1021::PKSIII, los estreptomicetos observados formaron agregados más pequeños, y en menor cantidad, pero sin

observar diferencias significativas en forma y tamaño, de acuerdo con la Fig. 55.

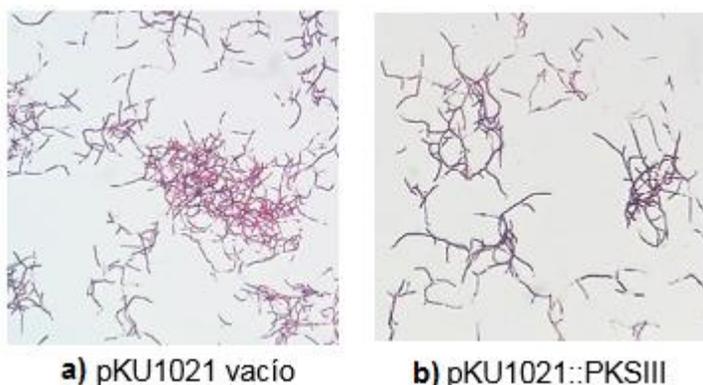


Fig. 55. Tinción de Gram para *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021

Crecimiento del cultivo:

En ambos casos se observó la biomasa blanca y el medio sin cambio de color (amarillo inicial).

La presencia del vector pKU1021, tanto vacío como con el inserto PKSIII, permitió el crecimiento de células con morfología saludable (Fig. 55); la diferencia observada fue que los estreptomicetos con el vector vacío crecieron en mayor cantidad y formaron agregados grandes, los cuales se observaron más pequeños en los estreptomicetos con el producto pKU1021::PKSIII, además de haber crecido en menor cantidad, pero ninguna de estas diferencias es

suficiente para atribuir un cambio morfológico a la presencia de la CDS 00140.

➤ + pIJ4123:

El crecimiento de este hospedero se vio afectado por la adición de Tioestreptón al momento de la siembra en medio de producción, por lo cual este no se adicionó sino hasta llegar a fase estacionaria, es decir, a las 48 h de incubación.

Observación al microscopio:

Los estreptomicetos transformados con el plásmido pIJ4123 vacío formaron agregados pequeños y en cantidad media, con buena forma y tamaño; en cambio, los transformados con pIJ4123::PKSIII fueron cortos y pequeños, formando agregados en baja cantidad, como se muestra en la Fig.56.

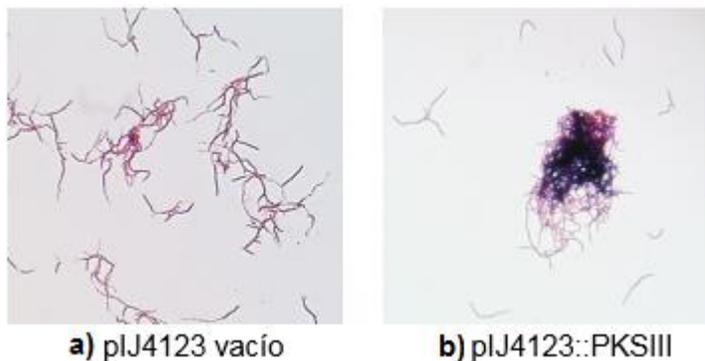


Fig. 56. Tinción de Gram para *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123

Crecimiento del cultivo:

En ambos casos se observó biomasa blanca y medio sin cambio de color (amarillo inicial), con bajo crecimiento inicial (primeras 24-48 h de crecimiento).

Como se muestra en la Fig. 56, el vector pJ4123 (vacío y con inserto) pareció afectar el crecimiento del hospedero. El crecimiento deficiente se observó macroscópicamente desde la siembra en medio vegetativo, por lo cual no se relacionó el bajo crecimiento con la presencia de Tioestreptón en el medio de producción.

De todos los resultados obtenidos en esta sección se puede decir que se presentaron diferencias muy variables, presentando ligeras variaciones en algunos casos y diferencias marcadas en otros, además de ser un comportamiento distinto para cada hospedero. Por lo tanto, se deduce que la alteración del crecimiento de los hospederos se pudo producir por la presencia de la secuencia de PKSIII, por el vector insertado, por el hospedero evaluado, o incluso por la variabilidad del método, pero no se puede atribuir un efecto de alteración de crecimiento únicamente a la presencia de la PKSIII.

Adicionalmente, debido a que en los objetivos del proyecto no se contempló la determinación exacta del efecto de la PKSIII y de los vectores sobre la morfología y crecimiento de los hospederos

transformados, no se realizaron ensayos más precisos (como cinéticas de crecimiento). Por lo tanto, con los resultados obtenidos se observó que la CDS 00140 parece no generar una alteración del crecimiento, pigmentación ni de la morfología celular de los hospederos.

4. Confirmación de la expresión de la PKSIII

La técnica de Western Blot empleada consistió en el marcaje del tallo de histidinas (6x-His) en la PKSIII expresada por el vector pIJ4123 en ambos hospederos con anticuerpos Anti-His (anticuerpos de ratón para reconocimiento de proteínas marcadas con el tallo 6x-His); posteriormente, se realizó el marcaje con Anti-Mouse, anticuerpos IgG secundarios (de cabra) para unión a inmunoglobulinas de ratón, ligados a fosfatasa alcalina. Finalmente, la detección de la proteína se realizó con la adición de sustrato BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato y nitroazul de tetrazolio) para la formación de un precipitado oscuro por acción de la fosfatasa alcalina presente en Anti-Mouse, sobre el sustrato.

Para el SDS-PAGE, se empleó como control positivo una diterpeno-sintasa que igualmente contiene tallo de Histidinas y que al estar desnaturalizada presenta un peso de 35 kDa, semejante al esperado para la PKSIII (37.1 kDa según el análisis

bioinformático generado por ExPASy [44], detallado en el punto 1 de esta sección).

La expresión de la PKSIII se evaluó en dos medios de producción, utilizando el medio YEME debido a que fue reportado su uso para producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces lividans* [37], [38], [40], además de haber sido reportado que su alto contenido en sacarosa presenta un efecto inductor, debido a alta osmolaridad del medio, sobre el promotor pTipA presente en pIJ4123 [41]. Se eligió también el Medio Sintético para realizar la evaluación de la expresión de la PKSIII por estar reportado para producción de geosmina y otros metabolitos secundarios en *S. avermitilis* WT, SUKA17 y 22 [39], [34], [35], y para evaluar su expresión en condiciones de nutrientes limitados e inducción única por Tioestreptón.

En ambos casos se utilizó medio TSB como medio vegetativo, ya que la preparación rápida del mismo facilitó la siembra de los hospederos y permitió la detección rápida de contaminantes en el cultivo debido a que es un medio transparente.

Cabe mencionar que en el caso de *S. avermitilis* SUKA22, se hizo una adición de Tioestreptón a las 48h de crecimiento en medio de producción debido a la alta sensibilidad observada de este hospedero a dicho antibiótico.

Inducción de pIJ4123 con Tioestreptón (Thio)

Se han reportado diversas concentraciones de Thio utilizadas para inducción del promotor TipA en *S. lividans*, determinándose que la inducción es posible desde 0.5 µg/mL en baja cantidad [37] y encontrándose mayor inducción desde 16.65 µg/mL hasta 50 µg/mL [37], [41]. Por lo tanto, se utilizó una concentración de 25 µg/mL para la inducción de pIJ4123::PKSIII en ambas cepas, adicionando el antibiótico en el medio de producción al momento de la siembra en caso de *S. lividans* [41] y después de 48 h de incubación en el caso de *S. avermitilis* SUKA22 (aproximadamente durante la fase estacionaria del estreptomiceto) debido a que se observó alta sensibilidad al antibiótico y ausencia de crecimiento al haber sido adicionado al momento de la siembra.

A continuación se muestran los resultados para el ensayo de Western Blot.

4.1 Expresión de PKSIII en *S. lividans*

En la membrana revelada se puede apreciar la presencia de una proteína presente en la zona del peso esperado (37.1 kDa), tal como se muestra en la Fig. 57.

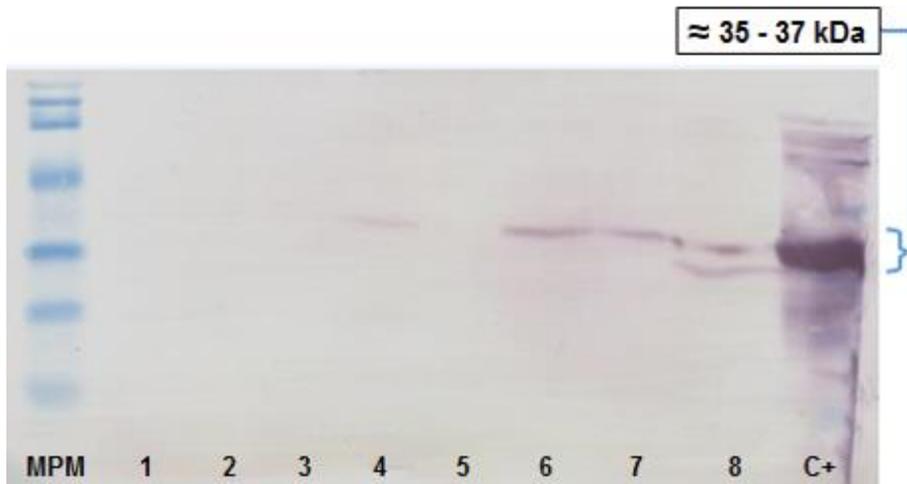


Fig. 57. Membrana de Western Blot para *S. lividans* + pIJ4123.

1. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. Sintético
2. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. Sintético
3. pIJ4123::PKSIII, inducción 24 h, M. Sintético
4. pIJ4123::PKSIII, inducción 48 h, M. Sintético
5. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. YEME
6. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. YEME
7. pIJ4123::PKSIII, inducción 24 h, M. YEME
8. pIJ4123::PKSIII, inducción 48 h, M. YEME

Se realizó la evaluación de la expresión de la proteína utilizando una inducción de 24 y 48 h debido a que este tiempo ha sido reportado para la inducción de pTipA en *S. lividans* [37], [41].

Crecimiento de muestras previo a extracción: consistente con el punto 3 (crecimiento de *S. lividans* en medio líquido): El cultivo con el vector vacío pIJ4123 presentó pigmentación roja de

biomasa y sobrenadante, mientras que las cepas con el producto pIJ4123::PKSIII no presentaron coloración (biomasa blanca y sobrenadante amarillo), sin observarse diferencias morfológicas en las cepas con diferentes tiempos de inducción.

El gel SDS-PAGE revelado con azul de Coomassie correspondiente a este resultado no se reporta debido a que se perdió durante el procedimiento experimental.

En la membrana correspondiente a *S. lividans* (Fig. 57) se puede observar que el control positivo se agregó en muy alta concentración, por lo que se observa barrido e invadiendo el carril no. 8. En dicho carril se observan dos bandas reveladas, una de las cuales se asocia con el control positivo y la otra con la PKSIII; adicionalmente se puede inferir que en este carril y en los carriles contiguos, las bandas son correspondientes a la PKSIII revelada y no al control positivo barrido debido a que se observan únicamente en los carriles correspondientes a las cepas transformadas con pIJ4123::PKSIII pero no en los carriles de las cepas con vectores vacíos. Por lo tanto, con este resultado se confirmó la expresión de la PKSIII en *S. lividans*.

4.2 Expresión de PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22

Al igual que para *S. lividans*, en la membrana revelada para *S. avermitilis* SUKA22 se observó la presencia de una proteína de

≈37.1 kDa correspondiente a la PKSIII en los carriles correspondientes a las cepas transformadas con pIJ4123::PKSIII pero no con el vector vacío (Fig. 58). En este caso, el control positivo se observó en buena concentración y sin haber invadido los carriles contiguos.

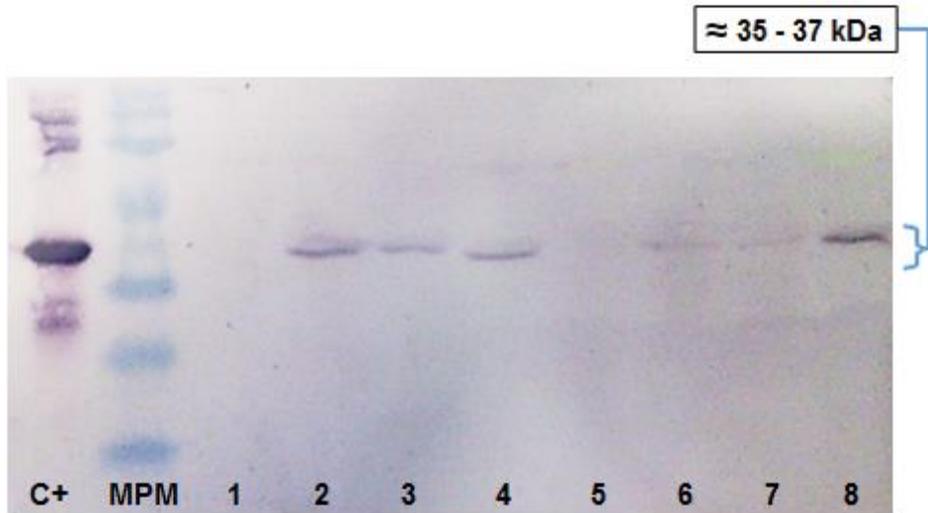


Fig. 58. Membrana de Western Blot para *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123. Muestras:

1. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. YEME
2. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. YEME
3. pIJ4123::PKSIII, inducción 2 d, M. YEME
4. pIJ4123::PKSIII, inducción 5 d, M. YEME
5. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. Sintético
6. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. Sintético
7. pIJ4123::PKSIII, inducción 2 d, M. Sintético
8. pIJ4123::PKSIII, inducción 5 d, M. Sintético

El gel de SDS-PAGE revelado con azul de Coomassie correspondiente a la membrana mostrada en la Fig. 58 reveló diversas bandas en el peso esperado de 37 kDa para todas las muestras, es decir, proteínas del mismo peso que el hospedero produce de manera natural, por lo que no se distingue la PKSIII en este gel sino únicamente en la membrana correspondiente al Western Blot. En contraste, se pudieron apreciar bandas de ≈ 15 kDa presentes en las muestras con inducción pero no en las que no fueron adicionadas con Tioestreptón, pudiendo atribuirse a la formación de un producto proteico debido a la acción de este antibiótico. Esto se puede apreciar en la Fig. 59.

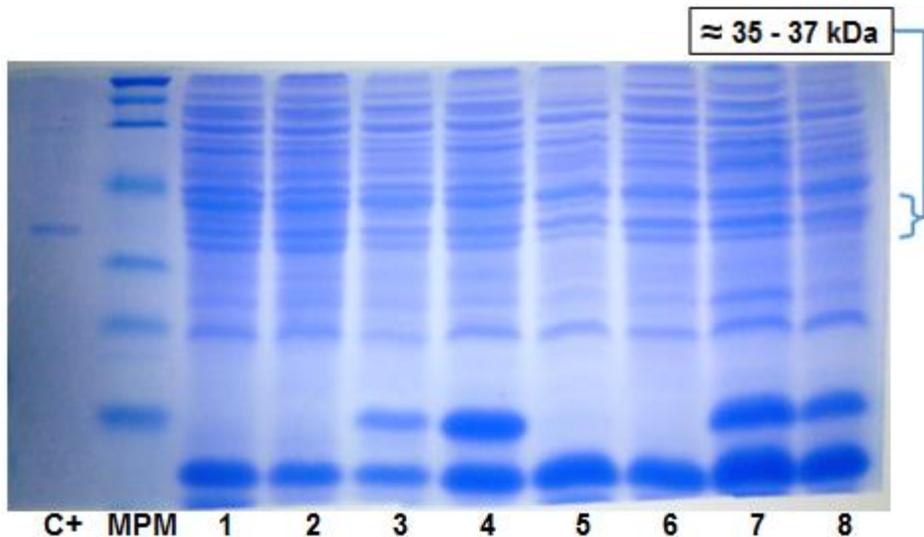


Fig. 59. Gel SDS-PAGE para *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123.

Muestras:

1. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. YEME
2. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. YEME
3. pIJ4123::PKSIII, inducción 2 d, M. YEME
4. pIJ4123::PKSIII, inducción 5 d, M. YEME
5. pIJ4123 vacío, sin Thio, M. Sintético
6. pIJ4123::PKSIII, sin inducción, M. Sintético
7. pIJ4123::PKSIII, inducción 2 d, M. Sintético
8. pIJ4123::PKSIII, inducción 5 d, M. Sintético

Crecimiento de muestras previo a extracción: Consistente con el punto 3 (crecimiento de *S. lividans* en medio líquido): Los cultivos con el vector vacío pIJ4123 y con el producto pIJ4123::PKSIII no presentaron pigmentación (biomasa blanca y sobrenadante amarillo), sin observarse diferencias morfológicas en el crecimiento de las cepas con diferentes tiempos de inducción.

Para la detección de la PKSIII en *S. avermitilis* SUKA22 se eligió aumentar el número de días de inducción para evaluar el grado de inducción observado a un mayor tiempo después de la adición de Tioestreptón en esta cepa, pero se conservó una inducción de 2 días para observar la expresión a este tiempo para ambos hospederos heterólogos. La expresión de la PKSIII fue mayor a los 5 días de inducción únicamente en el caso del crecimiento en medio Sintético, y para medio YEME se observó buena expresión en cualquier tiempo de inducción.

Adicionalmente, se ajustó la cantidad empleada del control positivo y se cambió de carril a antes del marcador de peso molecular para evitar que el mismo contaminara las muestras analizadas. También se aumentó la concentración de los anticuerpos adicionados (a 1:2000) para permitir una mejor observación de las bandas reveladas.

De las membranas de Western Blot para ambos hospederos se puede apreciar, comparando los carriles correspondientes a la expresión en medio Sintético con los expresados en medio YEME, que la PKSIII se expresó en mayor grado al ser producida en medio YEME que en medio Sintético, además de haberse expresado la proteína en alta cantidad aún en ausencia de Tioestreptón, lo cual indica que posiblemente la osmolaridad causada por la alta concentración de sacarosa pueda tener un papel inductor sobre la expresión de pIJ4123::PKSIII; sin embargo esta suposición no fue comprobada con otras pruebas.

Así, se confirmó la expresión exitosa de la CDS 00140 insertada en ambos hospederos heterólogos con el vector pIJ4123, produciendo una Policétido Sintasa Tipo III del peso esperado (≈ 37.1 kDa).

5. Producción de metabolitos secundarios, extracción y análisis preliminar de los extractos

Para todos los hospederos, se evaluaron diversos medios de cultivo para la determinación del más adecuado para la expresión de la PKSIII y la producción de su metabolito.

Elección de medios de producción:

Como ya se mencionó previamente (para la confirmación de la expresión de la PKSIII), se eligieron los medios YEME y M. Sintético debido a que su uso ha sido reportado para producción de metabolitos secundarios en ambos hospederos [34], [35], [37], [38], [40].

También se eligió el Medio Mínimo debido a que el uso del mismo se reporta para fermentaciones de diversas especies de la serie SUKA de la cepa *S. avermitilis* [34], [35].

Adicionalmente, se utilizó el medio YMG debido a su composición semejante al medio YEME pero sin el alto contenido de sacarosa.

Para la siembra de las fermentaciones se emplearon como controles negativos: *S. lividans* y *S. avermitilis* SUKA22 WT (cepas sin transformar) en los medios mencionados + Kan para

confirmar la actividad antibiótica del marcador de resistencia contra las cepas silvestres. Adicionalmente, para la siembra de hospederos con pIJ4123, se adicionó Kan al medio de producción debido a que la ausencia del marcador de resistencia produce la expulsión del plásmido, a diferencia del vector integrativo pKU1021.

5.1 Extracción preliminar de sobrenadantes y CCF

Se extrajeron con EtOAc las siguientes cepas transformadas con pKU1021 para evaluar la expresión con el vector integrativo (Tabla 6).

Se eligieron solo algunas cepas transformadas crecidas en los medios vegetativos y de producción a evaluar para realizar una elución preliminar en CCF, y con esta poder determinar los medios más adecuados para realizar las fermentaciones de todos los hospederos. Se realizaron inicialmente extracciones de sobrenadantes, ya que se decidió analizar la posibilidad de que el metabolito producido por la PKSIII se encontrara extracelularmente.

	Hospedero	Vector	Medio vegetativo	Medio de producción
1	<i>S. lividans</i>	pKU1021 vacío	TSB	YEME
2	<i>S. lividans</i>	pKU1021 vacío	Seed media	M. Mínimo
3	<i>S. lividans</i>	pKU1021::PKSIII	Seed media	YEME
4	<i>S. lividans</i>	pKU1021::PKSIII	Seed media	M. Mínimo
5	<i>S. lividans</i>	pKU1021::PKSIII	Seed media	M. Sintético
6	SUKA22	pKU1021::PKSIII	TSB	YEME
7	SUKA22	pKU1021::PKSIII	TSB	M. Mínimo
8	SUKA22	pKU1021::PKSIII	TSB	M. Sintético
9	SUKA22	pKU1021::PKSIII	TSB	YMG

Tabla 6. Extracción preliminar con EtOAc para búsqueda de metabolitos correspondientes a la PKSIII en sobrenadantes

A partir de las placas correspondientes a las muestras mencionadas en la Tabla 6 (elución con fase móvil de 98:2 CH₂Cl₂:MeOH), reveladas con luz UV a longitudes de onda (λ) de 254 y 365 nm, no se observaron bandas en los carriles correspondientes a las muestras con el producto pKU1021::PKSIII que no se observaron en las muestras con el vector pKU1021 vacío, es decir, no hubo bandas que sugirieran la presencia de un metabolito secundario producido por la PKSIII en los extractos orgánicos de sobrenadantes, tal como se muestra en la Fig. 60

En ningún caso se observaron bandas en los carriles correspondientes al control negativo (MeOH).

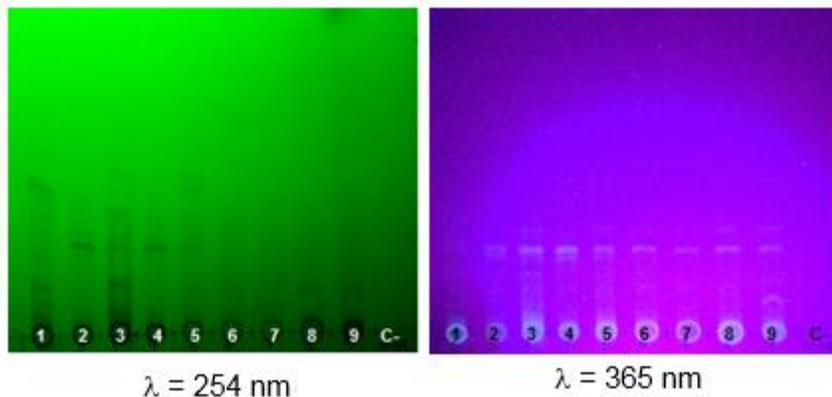


Fig. 60. CCF para extractos de sobrenadantes extraídos con EtOAc:

1. *S. lividans* + pKU1021 vacío, TSB, YEME
2. *S. lividans* + pKU1021 vacío, Seed Media, M. Mínimo
3. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII, Seed Media, YEME
4. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII, Seed Media, M. Mínimo
5. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII, Seed Media, M. Sintético
6. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, YEME
7. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, M. Mínimo
8. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, M. Sintético
9. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, YMG

Para la elución de los concentrados de fases acuosas y búsqueda de metabolitos empleando un solvente orgánico distinto, se extrajeron con CH_2Cl_2 las siguientes muestras de sobrenadantes de cultivos de *S. lividans* + pKU1021 utilizando en todos los casos Seed Media como medio vegetativo. Se compararon los extractos orgánicos con sus fases acuosas concentradas (se indican las fases acuosas de cada muestra como “aq”). Las muestras evaluadas se describen en la Tabla 7.

Muestra	Vector	Medio de producción
1 aq	pKU1021::PKSIII	YEME
1	pKU1021::PKSIII	YEME
1.2 aq	pKU1021 vacío	YEME
1.2	pKU1021 vacío	YEME
2 aq	pKU1021::PKSIII	M. Mínimo
2	pKU1021::PKSIII	M. Mínimo
2.2 aq	pKU1021 vacío	M. Mínimo
2.2	pKU1021 vacío	M. Mínimo
3 aq	pKU1021::PKSIII	M. Sintético
3	pKU1021::PKSIII	M. Sintético
3.2 aq	pKU1021 vacío	M. Sintético
3.2	pKU1021 vacío	M. Sintético

Tabla 7. Extracción preliminar con CH₂Cl₂ de muestras de *S. lividans* para búsqueda de metabolitos en sobrenadantes

Para la elución de las muestras correspondientes a la Tabla 7 se utilizó una fase móvil de 9:1 (CH₂Cl₂:MeOH).

Las placas cromatográficas correspondientes a las muestras mencionadas en la Tabla 7, reveladas con $\lambda = 254$ nm, no mostraron diferencias significativas entre los extractos obtenidos que fueran relacionables con la expresión de la PKSIII, ya que todas las bandas se observaron iguales tanto para muestras con el vector pKU1021 vacío como con pKU1021::PKSIII (Fig. 61).

Al igual que con el análisis cromatográfico anterior, en ningún caso se observaron bandas en los carriles correspondientes al control negativo (MeOH).

No se muestra el resultado correspondiente a $\lambda = 365$ nm debido a que no hubieron bandas observables a esta longitud de onda.

Como la elución de los concentrados acuosos de los sobrenadantes no reveló bandas, se determinó que los concentrados acuosos de las muestras no presentaron metabolitos en ninguna cepa, lo cual sugiere que el metabolito deseado, de ser producido, no es de alta polaridad debido a que no es hidrosoluble, y que, al no encontrarse en fase orgánica ni en fase acuosa, no se encuentra en el sobrenadante.

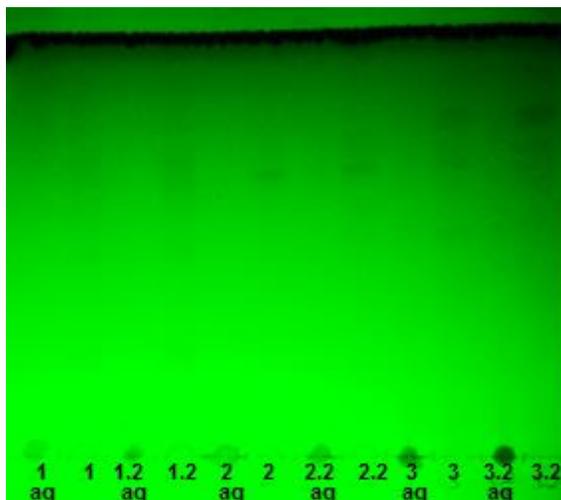


Fig. 61. Extractos de sobrenadantes de *S. lividans* extraídos con CH_2Cl_2 y concentrados de las fases acuosas (aq). $\lambda = 254$ nm

1 & 1aq: pKU1021::PKSIII, YEME

1.2 & 1.2aq: pKU1021 vacío, YEME

- 2 & 2aq: pKU1021::PKSIII, M. Mínimo
- 2.2 & 2.2aq: pKU1021 vacío, M. Mínimo
- 3 & 3aq: pKU1021::PKSIII, M. Sintético
- 3.2 & 3.2aq: pKU1021 vacío, M. Sintético

El revelado de las placas preliminares con H_2SO_4 no mostró diferencias en comparación a lo observado en el revelado con luz UV y por complicaciones de su manejo, presentó mucha contaminación, por lo que no se reporta.

No se muestran placas con la fase móvil 95:5 debido a que el corrimiento no permitió la observación adecuada de las bandas. La fase móvil que mostró la mejor distribución de las bandas eluidas, posibilitando la detección de los metabolitos extraídos con mayor facilidad, fue de 98:2 (CH_2Cl_2 :MeOH), por lo cual esta fue elegida para la elución de extractos posteriores.

A partir de los resultados de CCF para extractos de sobrenadantes no se pudo elegir un medio vegetativo ni de producción debido a que no se observaron diferencias significativas entre los extractos obtenidos que indicaran un medio de cultivo que produjera mejores resultados.

Por lo tanto, con los resultados observados, tanto para los extractos orgánicos como para los concentrados acuosos analizados en esta sección, se puede decir que no se

encontraron metabolitos secundarios extracelulares producidos por la expresión de la PKSIII.

5.2 Extracción de biomasas y CCF

Para la extracción de biomasas, se sembraron las cepas únicamente en TSB como medio vegetativo y en medio YEME como medio de producción debido que estos fueron los medios que produjeron los mejores resultados en toda la experimentación previa, de la cual se confirmó la mayor expresión de la PKSIII para ambos hospederos heterólogos.

Para todas las siembras donde estuviera presente pIJ4123, se adicionó Thio (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) después de 48 h de crecimiento en medio de producción, y se permitió una inducción de 2 días después de su adición antes de realizar la extracción. Estas condiciones de siembra fueron estandarizadas para poder comparar la producción de metabolitos producidos por la PKSIII entre hospederos y vectores sin el efecto del medio.

La extracción de biomasas se realizó únicamente con EtOAc debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las extracciones con este solvente y CH_2Cl_2 , considerando también que la polaridad de ambos disolventes es muy similar (polaridad media). Adicionalmente, el EtOAc permitió un mejor

manejo por ser de menor volatilidad y menor riesgo a la salud que el CH_2Cl_2 [50], [51].

Una vez obtenidos los extractos, estos se analizaron empleando las condiciones determinadas en la CCF preliminar.

Inicialmente se corrieron dos placas, una para las muestras 1-4 (*S. avermitilis* SUKA22) y otra para las muestras 5-8 (*S. lividans*), cargando 10 gotas de cada muestra en cada carril, eluyendo el MeOH usado para la resuspensión de los extractos como control negativo.

Los resultados de la CCF obtenidos al revelar con luz UV usando $\lambda = 365$ nm no mostraron bandas, por lo que estos no fueron reportados.

En contraste, los resultados cromatográficos obtenidos correspondientes a $\lambda = 254$ nm revelaron la presencia de un metabolito mayoritario producido únicamente por los hospederos transformados con los productos vector::inserto y no fueron encontradas en las muestras de los hospederos transformados con los vectores vacíos, por lo cual se infiere que este metabolito se relacionó con la expresión de la PKSIII en los hospederos, lo cual se puede observar en la Fig. 62.

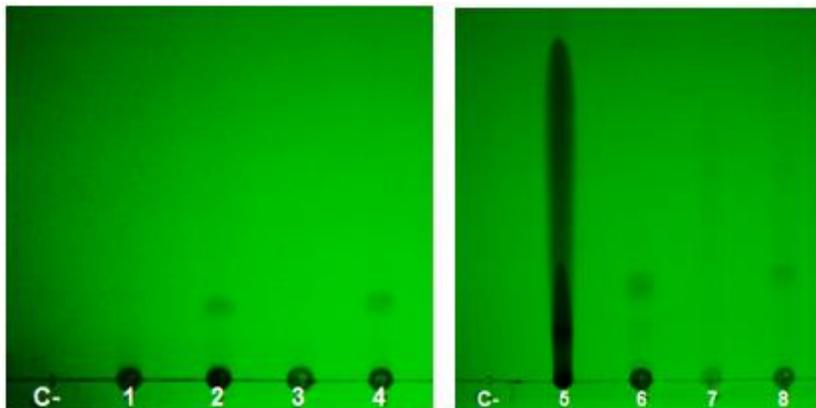


Fig. 62. CCF para extractos de biomasas. $\lambda = 254 \text{ nm}$

C- : MeOH

1. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123 vacío
2. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII
3. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021 vacío
4. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII
5. *S. lividans* + pIJ4123 vacío
6. *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII
7. *S. lividans* + pKU1021 vacío
8. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII

Las cromatoplasmas mostradas en la Fig. 62 fueron reveladas con reactivo Fast Blue [47], cuyo resultado reveló bandas en los carriles de extractos de hospederos transformados con productos vector::inserto (carriles 2, 4, 6 y 8) que no se encontraron en los carriles de extractos de hospederos transformados con vectores vacíos (1, 3, 5 y 7), obteniendo valores de R_f semejantes para dichas bandas, tal como se muestra en la Fig. 63.

El reactivo Fast Blue es utilizado para la detección de fenoles y polifenoles, revelando la presencia de compuestos fenólicos en las cromatoplasmas obtenidas, los cuales se observan teñidos de color morado intenso [47].

Se perciben muy tenuemente un par de bandas adicionales en las muestras 4 y 6 (a y c respectivamente), además de otro par de bandas en 6 y 8 (e) que no se revelaron para los hospederos con vectores vacíos. Dichas bandas se discuten más adelante.

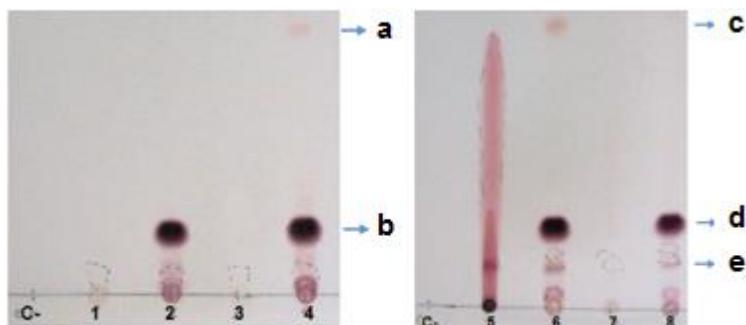


Fig. 63. Extractos de biomazas revelados con Fast Blue. Muestras:

C- : MeOH puro

- | | |
|---|---------------|
| 1. <i>S. avermitilis</i> SUKA22 + pIJ4123 vacío | |
| 2. <i>S. avermitilis</i> SUKA22 + pIJ4123::PKSIII | a) Rf = 0.488 |
| 3. <i>S. avermitilis</i> SUKA22 + pKU1021 vacío | b) Rf = 0.133 |
| 4. <i>S. avermitilis</i> SUKA22 + pKU1021::PKSIII | c) Rf = 0.617 |
| 5. <i>S. lividans</i> + pIJ4123 vacío | d) Rf = 0.191 |
| 6. <i>S. lividans</i> + pIJ4123::PKSIII | e) Rf = 0.085 |
| 7. <i>S. lividans</i> + pKU1021 vacío | |
| 8. <i>S. lividans</i> + pKU1021::PKSIII | |

Ya que se observaron resultados positivos para el análisis de los extractos de las biomásas, se realizó la evaluación de rendimientos correspondientes a los extractos totales en función del peso obtenido de los extractos totales para cada cepa. El hospedero *S. avermitilis* SUKA22 presentó mayor producción de extracto total, siendo en todos los casos mayor a 10 mg para 50 mL de cultivo, mientras que todas las muestras de *S. lividans* produjeron menos de 8 mg para 50 mL de cultivo, como se muestra en la Tabla 8.

Hospedero	Plásmido	Peso del extracto (mg)
<i>S. avermitilis</i> SUKA22	pIJ4123 vacío	10.6
	pIJ4123::PKSIII	12.5
	pKU1021 vacío	12.9
	pKU1021::PKSIII	13.3
<i>S. lividans</i>	pIJ4123 vacío	7.7
	pIJ4123::PKSIII	7.2
	pKU1021 vacío	4
	pKU1021::PKSIII	5.9

Tabla 8. Extractos orgánicos totales para biomásas de ambos hospederos heterólogos con ambos vectores.

Sin embargo, estas diferencias no son suficientes para determinar una mayor expresión debida a un vector específico, ya que para *S. avermitilis* SUKA22 se observa mayor rendimiento con el plásmido pKU1021, y para *S. lividans* se observa mayor para pIJ4123.

Adicionalmente, los rendimientos no pueden relacionarse con la producción única del metabolito de interés, ya que los extractos presentaron una mezcla de metabolitos además del metabolito de interés.

Con respecto a los análisis cromatográficos, debido a que las bandas no fueron detectables adecuadamente en $\lambda = 365$ nm, y con el objeto de observar el mismo Rf para todas las muestras empleando como revelador el reactivo de Folin-Ciocalteu [46], se corrió una sola placa con las 8 muestras, cargando en esta ocasión 20 gotas de cada extracto en cada carril.

Ya que el control negativo (MeOH) fue adecuado y no reveló bandas en luz UV ni con el reactivo Fast Blue, este no se eluyó en la repetición de la placa de CCF.

Los resultados correspondientes a la segunda cromatoplaqueta eluída muestran, al igual que para la elución anterior, la presencia de los metabolitos secundarios relacionados a la expresión de la PKSIII en los carriles correspondientes a los hospederos transformados con productos vector::inserto, sin estar presentes en las muestras de los vectores vacíos (Fig. 64).

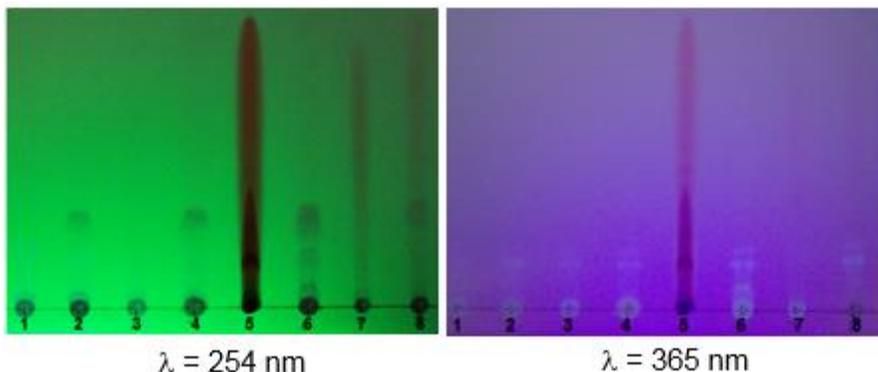


Fig. 64. Segunda elución de extractos de biomazas.

1. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123 vacío
2. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII
3. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021 vacío
4. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII
5. *S. lividans* + pIJ4123 vacío
6. *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII
7. *S. lividans* + pKU1021 vacío
8. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII

Las bandas correspondientes al metabolito relacionado con la expresión de la PKSIII no fueron observables a $\lambda = 365$ nm, detectándose únicamente con $\lambda = 254$ nm.

La cromatoplatea revelada con reactivo de Folin-Ciocalteu evidenció la presencia de los productos asociados con la PKSIII, siendo estos teñidos de color naranja y azul intenso, como se muestra en la Fig. 65.

El reactivo empleado es usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y otros compuestos reductores mediante la inhibición de la oxidación del reactivo [46], por lo que se afirma

que se reveló la presencia de compuestos fenólicos presentes en las cepas transformadas con los productos vector::inserto. Se observaron las bandas secundarias mencionadas previamente en mayor concentración, lo cual permitió el reconocimiento de bandas correspondientes a la expresión de la PKSIII.

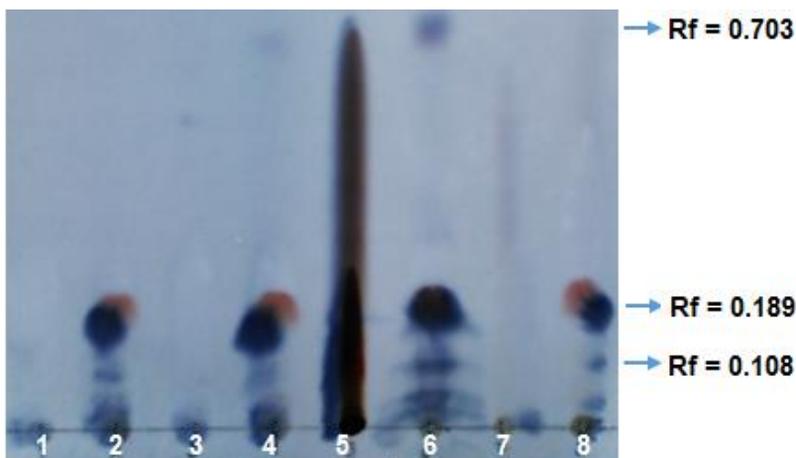


Fig. 65. Segunda elución de extractos de biomazas revelados con reactivo de Folin-Ciocalteu

1. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123 vacío
2. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII
3. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021 vacío
4. *S. avermitilis* SUKA22 + pKU1021::PKSIII
5. *S. lividans* + pIJ4123 vacío
6. *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII
7. *S. lividans* + pKU1021 vacío
8. *S. lividans* + pKU1021::PKSIII

Cabe mencionar que las cromatoplacas se revelaron con estos reactivos en lugar de utilizar H_2SO_4 debido al difícil manejo del último, su inespecificidad y su tendencia a presentar manchas

contaminantes en las placas reveladas; mientras que el uso de los reactivos Fast Blue y de Folin-Ciocalteu, siendo reveladores más específicos, permitieron confirmar la identidad del metabolito como un compuesto fenólico.

A pesar de que se desconoce la estructura probable de este compuesto, se pudo identificar la presencia de al menos un núcleo fenólico consistente de un anillo aromático de seis carbonos y al menos un sustituyente "OH" en su estructura.

En todos los ensayos realizados, además de las bandas en mayor concentración se observaron bandas minoritarias reveladas únicamente en hospederos con productos vector::inserto por los reactivos mencionados:

- Se observan bandas de intensidad media en todas las muestras con inserto, presentes en un Rf de 0.08 a 0.10, las cuales posiblemente corresponden a moléculas similares al metabolito principal, que pudieran ser producidas por mecanismos secundarios alternos, degradación del metabolito, o presencia de isómeros y/o productos secundarios de las reacciones catalizadas por la PKSIII. Estas bandas solo fueron detectadas con Fast Blue y reactivo de Folin-Ciocalteu, y no fueron reveladas por luz UV, ya que a pesar de que se observaron bandas a ambas longitudes de

onda con el mismo Rf, estas también se observaron en muestras con vectores vacíos, por lo que no se asocian con metabolitos relacionados a la expresión de la PKSIII.

- En menor proporción, se observaron dos bandas muy tenues para las muestras 4 y 6: *S. avermitilis* SUKA22 con pKU1021::PKSIII y *S. lividans* con pIJ4123::PKSIII respectivamente, no observables bajo luz UV y encontrándose en un Rf de 0.45 a 0.70. Estas bandas fueron diferentes en intensidad y forma, además de que la producida por *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII se observa ligeramente más polar que la producida por SUKA22 + pKU1021::PKSIII; adicionalmente, estas bandas no se pueden relacionar al uso de un vector en particular ni con la expresión de un hospedero específico, por lo que se asocian con productos de degradación o compuestos intermediarios producidos al haber expresado la PKSIII.

Sin embargo, el interés principal se deposita únicamente en el compuesto mayoritario, observable con luz UV únicamente a $\lambda = 254$ nm, presente en un Rf entre 0.13 y 0.20 e identificado como un policétido fenólico producido directamente por la PKSIII, ya que fue revelado tanto con reactivo Fast Blue como con reactivo de Folin-Ciocalteu.

Además de los metabolitos producidos por la PKSIII, se pueden observar las bandas correspondientes a la producción de undecilprodigiosina en *S. lividans*; en alta cantidad al sobreexpresarse por RedD en pIJ4123 vacío, en muy baja cantidad para *S.lividans* con pKU1021 vacío y con inserto, y ausente en *S. lividans* + pKU1021::PKSIII, que interrumpe la expresión de RedD. Con esto, una vez más, se confirma la inserción adecuada de la secuencia 00140 en el vector pIJ4123.

Los resultados obtenidos fueron semicuantitativos debido a que se estandarizó la cantidad de esporas adicionadas a cada medio, se siguió la misma metodología para cada muestra durante las fermentaciones realizadas, y se llevó a cabo el mismo tratamiento a cada muestra.

6. Pruebas de antibiosis de los extractos

Mediante el ensayo de Kirby-Bauer se realizaron pruebas de antibiosis para la búsqueda de actividad antibiótica en los extractos obtenidos de sobrenadantes, biomasas y concentrados de fases acuosas contra *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

6.1 Antibiosis preliminar para extractos de sobrenadantes y concentrados acuosos

Resultado:

Los controles positivos mostraron los siguientes halos de inhibición de crecimiento:

Kan 50 $\mu\text{g/mL}$: 0.2 cm para *E. coli* (Gram -)

Amp 100 $\mu\text{g/mL}$: 1.1 cm para *M. luteus* (Gram +)

Thio 50 $\mu\text{g/mL}$: 0.7 cm para *M. luteus* (Gram +)

Para la determinación de actividad antibiótica en los extractos orgánicos obtenidos con EtOAc a partir de los sobrenadantes no se observó ningún halo de inhibición de crecimiento.

Muestras analizadas:

S. lividans + pKU1021 vacío, TSB, YEME

S. lividans + pKU1021 vacío, Seed Media, M. Mínimo

S. lividans + pKU1021::PKSIII, Seed Media, YEME

S. lividans + pKU1021::PKSIII, Seed Media, M. Mínimo

S. lividans + pKU1021::PKSIII, Seed Media, M. Sintético

S. avermitilis SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, YEME

S. avermitilis SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, M. Mínimo

S. avermitilis SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, M. Sintético

S. avermitilis SUKA22 + pKU1021::PKSIII, TSB, YMG

Para la prueba de antibiosis para concentrados de fases acuosas en ningún caso se observó un halo indicativo de actividad antibiótica, y para la mayoría de los casos, en lugar de observarse inhibición de crecimiento se observó un aumento de desarrollo bacteriano. Esto se puede apreciar en la Tabla 9.

Se indica con “X” la ausencia de actividad antibiótica, y con “C”, halos de aumento de crecimiento (en grado de crecimiento: +, ++, ó +++). Se abrevia a *S. avermitilis* SUKA22 como SUKA22, y *S. lividans* como *S.liv*; y en el caso de los vectores, pKU1021 como pKU y pIJ4123 como pIJ.

Muestra	Descripción		Cepa bajo prueba	
			<i>Micrococcus luteus</i> (G+)	<i>Escherichia coli</i> (G-)
Controles negativos	M. YEME concentrado		C +++	C +++
	M. YMG concentrado		X	X
	M. Sintético concentrado		C ++	C ++
	M. Mínimo concentrado		C +	C +
1 aq	<i>S. liv</i> + pKU vacío	(YEME)	C +++	C +++
2 aq	<i>S. liv</i> + pKU vacío	(M. Mín)	C +	C +
3 aq	<i>S. liv</i> + pKU::PKSIII	(YEME)	C +++	C +++
4 aq	<i>S. liv</i> + pKU::PKSIII	(M. Mín)	C +	C +
5 aq	<i>S. liv</i> + pKU::PKSIII	(M. Sint)	C ++	C ++
6 aq	SUKA22 + pKU::PKSIII	(YEME)	C +++	C +++
7 aq	SUKA22 + pKU::PKSIII	(M. Mín)	X	X
8 aq	SUKA22 + pKU::PKSIII	(M. Sint)	C ++	C ++
9 aq	SUKA22 + pKU::PKSIII	(YMG)	X	X

Tabla 9. Actividad antibiótica para concentrados de fases acuosas de sobrenadantes

En este caso se utilizaron como controles negativos los concentrados de los medios de cultivo sin inocular.

Los halos de crecimiento observados fueron independientes del hospedero, vector o presencia de la secuencia de la PKSIII, y se observaron iguales para las muestras que utilizaron los mismos medios de cultivo, incluyendo los controles negativos correspondientes con el medio de producción. Adicionalmente, los halos de crecimiento más grandes observados corresponden al medio YEME, el cual contiene una alta concentración de sacarosa; en contraste, los medios con nutrientes limitados no presentaron ninguna alteración del crecimiento de los microorganismos evaluados. Por lo tanto, este comportamiento se atribuyó a que los nutrientes de los medios de cultivo quedaron concentrados y fueron utilizados por los microorganismos de prueba, concluyendo que el aumento de crecimiento bacteriano observado no se relacionó con la expresión de la PKSIII.

6.2 Antibiosis para extractos de biomasa

Las muestras analizadas fueron las correspondientes a las descritas en el punto 5.2 de esta sección (extracción de biomasa y CCF), que como ya fue confirmado, presentaron al policétido fenólico producido por la PKSIII en las muestras

correspondientes a los hospederos transformados con productos vector::inserto.

Los resultados correspondientes a este análisis de bioactividad mostraron actividad antibiótica de cuatro muestras contra *M. luteus*, tal como se observa en la Tabla 10.

Muestra		Cepa bajo prueba		
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Controles positivos	Kan 50 µg/mL	X	H = 0.2 cm	X
	Amp 100 µg/mL	H = 1.2 cm	X	X
	Thio 50 µg/mL	H = 0.5 cm	X	X
Control negativo	MeOH	X	X	X
1	SUKA22 + pIJ4123 vacío	H = 0.2 cm	X	X
2	SUKA22 + pIJ4123::PKSIII	H = 0.5 cm	X	X
3	<i>S. lividans</i> + pIJ4123 vacío	H = 0.3 cm	X	X
4	<i>S. lividans</i> + pIJ4123::PKSIII	H = 0.5 cm	X	X
5	SUKA22 + pKU1021 vacío	X	X	X
6	SUKA22 + pKU1021::PKSIII	X	X	X
7	SUKA22 + pKU1021 vacío	X	X	X
8	SUKA22 + pKU1021::PKSIII	X	X	X

Tabla 10. Actividad antibiótica para extractos de biomosas.

Los halos de inhibición de crecimiento correspondientes a las muestras 1-4 contra *M. luteus* se pueden observar en la Fig. 66.



Fig. 66. Actividad antibiótica observada contra *M. luteus*.

Estos halos de inhibición se observaron muy parecidos al producido por el Tioestreptón (no fotografiado), además de que solo se observaron en *M. luteus* (cepa sensible al Thio) para las muestras correspondientes a los extractos obtenidos de biomásas de cepas adicionadas con este antibiótico para la inducción de pIJ4123, tanto vacío como con inserto.

Adicionalmente, se señala que este antibiótico, al igual que las muestras mencionadas, únicamente presentó inhibición de crecimiento en *M. luteus*, sin presentar actividad antibiótica contra *E. coli* ni *S. cerevisiae*.

Para la confirmación de la actividad antibiótica de las muestras 1-4 se realizó una prueba de bioautografía como se describe en el punto 6 de la metodología, a partir de una placa de CCF eluída usando una fase móvil de 98:2 (CH_2Cl_2 :MeOH). Esta prueba

permitió observar la elución del Thio como control y así poder comparar la actividad antibiótica de éste con la producida por los extractos contra *M. luteus*.

Control positivo: Tioestreptón 50 µg/mL, 10 gotas.

La actividad antibiótica observada para las muestras 1-4 en la prueba de bioautografía se observa de la misma manera que para el Tioestreptón, ya que se observan los mismos halos inhibitorios alrededor de la misma zona de elución sobre la placa, como se muestra en la Fig. 67, lo cual concuerda con los resultados correspondientes a la prueba previa de antibiosis (Fig. 66).



Fig. 67. Resultado de Bioautografía contra *M. luteus*.

Extractos de biomásas de las cepas:

1. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123 vacío
2. *S. avermitilis* SUKA22 + pIJ4123::PKSIII
3. *S. lividans* + pIJ4123 vacío
4. *S. lividans* + pIJ4123::PKSIII

Con esto se confirmó que la actividad antibiótica observada fue un resultado falso positivo, y que los extractos de los hospederos heterólogos transformados no presentaron actividad antibiótica relacionable al policétido fenólico producido por la PKSIII, sino se atribuye a la extracción de Tioestreptón adicionado a los hospederos transformados con el vector pIJ4123.

Sin embargo, es posible que el policétido fenólico presente una actividad de interés distinta a la antibiótica, como puede ser antioxidante, pero debido a que la evaluación de la actividad de este metabolito se dirigió a la búsqueda de actividad antibiótica en este proyecto, no se realizaron ensayos adicionales para la determinación de su función en los hospederos o sus posibles aplicaciones.

7. Análisis final de resultados y determinación del hospedero y el vector más adecuados para la expresión de la PKSIII.

Por medio de la experimentación efectuada se logró la expresión de la PKSIII (CDS 00140) en *S. avermitilis* SUKA22 y *S. lividans* TK24, produciendo un metabolito que pudo ser identificado

mediante CCF, y el cual se sugiere corresponde a un policétido fenólico (de acuerdo con las cromatoplasmas reveladas con los reactivos: Fast Blue y Folin-Ciocalteu) relacionado con la expresión de dicha proteína. Se cree que este compuesto corresponde posiblemente a un precursor de un metabolito secundario bioactivo, ya que no presentó actividad antibiótica ni pareció tener un efecto sobre el crecimiento, esporulación o pigmentación de las cepas. Por lo mismo, se concluyó que la expresión heteróloga de todo el cluster correspondiente a la PKSIII (mostrado anteriormente en la Fig. 22), dará como resultado el metabolito secundario final, para el cual se esperaría observar alguna actividad biológica como ha sido reportado para otros clusters relacionados con PKSIII [10], [12], [40].

Por otra parte, aunque se demostró que los dos vectores empleados fueron eficientes para la síntesis del policétido, el uso del vector inducible pIJ4123 permitió la confirmación de la expresión de la PKSIII incluso sin adicionar Thio como inductor (al utilizar a YEME como medio de producción), y ya que su empleo hizo más sencillo el procedimiento experimental en comparación con el vector constitutivo pKU1021 (debido a su expresión directa en hospederos heterólogos y a la producción de undecilprodigiosina en *S. lividans* por la expresión de RedD), se puede concluir que fue el plásmido más eficiente para este proyecto.

A partir de los resultados del análisis cromatográfico de los extractos de biomasas, se determinó que la expresión de la PKSIII en cualquiera de los hospederos utilizando cualquiera de los plásmidos fue muy similar, ya que en todos los casos se observa la presencia de las bandas correspondientes al policétido fenólico en placas de CCF.

Debido a que preliminarmente se obtuvo un mayor rendimiento del extracto total para *S. avermitilis* SUKA22, se sugiere que en caso de requerir una mayor concentración de extracto total, o si se buscara un hospedero que presente un “fondo limpio” para facilitar la identificación de metabolitos secundarios, se recomendaría emplear a *S. avermitilis* SUKA22. Sin embargo, el uso de *S. lividans* fue de mayor utilidad durante el proyecto, ya que gracias al uso del vector pIJ4123, permitió la rápida confirmación de la inserción adecuada de la secuencia en el vector por la ausencia de pigmentación roja en la cepa causada por la interrupción de RedD tanto en medio líquido como en medio sólido.

Conclusiones

Se expresó heterológamente la CDS 00140 (PKSIII) de *S. thermocarboxydus* K155 en *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces avermitilis* SUKA22, y se determinó que el hospedero heterólogo y el vector más adecuados para el proyecto fueron *S. lividans* y pIJ4123 debido a su fácil manejo.

Se encontró que la PKSIII parece sintetizar un policétido fenólico intracelular que no mostró actividad antibiótica ni efecto sobre el crecimiento, morfología celular, pigmentación o esporulación de los hospederos.

Se observó que la expresión de la PKSIII al emplear como vector a pIJ4123 se induce en medio YEME sin necesidad de agregar inductor.

Referencias

- [1] A. Manteca and J. Sanchez, "Streptomyces developmental cycle and secondary metabolite production," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 9, pp. 560–566, 2010.
- [2] K. Flårdh and M. J. Buttner, "Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 36–49, 2009.
- [3] R. E. de Lima Procópio, I. R. da Silva, M. K. Martins, J. L. de Azevedo, and J. M. de Araújo, "Antibiotics produced by Streptomyces," *Brazilian J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 5, pp. 466–471, 2012.
- [4] A. Manteca, R. Alvarez, N. Salazar, P. Yague, and J. Sanchez, "Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of Streptomyces coelicolor," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 12, pp. 3877–3886, 2008.
- [5] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. Van't Riet, "Modeling of the bacterial growth curve," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1875–1881, 1990.

- [6] P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii, "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 564–574, 2006.
- [7] Avalos, Mariana, "Caracterización Polifásica de una cepa de *Streptomyces* aislada de una región del Valle de Chalco", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, pp. 53-88, 2010.
- [8] B. Shen, "Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 285–295, 2003.
- [9] Y. Katsuyama and Y. Ohnishi, "Type III polyketide synthases in microorganisms", *Methods in Enzymology* 1st ed., vol. 515. Elsevier Inc., 2012.
- [10] D. Yu, F. Xu, J. Zeng, and J. Zhan, "Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 4, pp. 285–295, 2012.
- [11] M. Funabashi, N. Funa, and S. Horinouchi, "Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 20, pp. 13983–13991, 2008.

- [12] M. B. Austin and J. P. Noel, "The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 20, no. 1, pp. 79–110, 2003.
- [13] J. Chow, S. M. Lee, Y. Shuan, A. Khosravi and S. K. Mazmanian, "Host-Bacterial Symbiosis in Health and Disease" *Advanced Immunology, Elsevier Inc*, Vol. 107, pp. 243-274, 2010.
- [14] T. Weber, K. Blin, S. Duddela, D. Krug, H. U. Kim, R. Brucoleri, S. Y. Lee, M. a. Fischbach, R. Muller, W. Wohlleben, R. Breitling, E. Takano, and M. H. Medema, "antiSMASH 3.0--a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. May, pp. 1–7, 2015.
- [15] A. Bateman, E. Birney, R. Durbin, S. R. Eddy, K. L. Howe, E. L. Sonnhammer, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. L. Sonnhammer, "The Pfam protein families database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 276–280, 2002.
- [16] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, and T. L. Madden, "NCBI BLAST: a better web interface.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. Web Server issue, pp. 5–9, 2008.

- [17] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson, "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3497–3500, 2003.
- [18] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 539, 2011.
- [19] R. G. Taylor, D. C. Walker, and R. R. McInnes, "E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing" *Nucleic Acids Research*, vol. 21, no. 7, pp. 1677–1678, 1993
- [20] Roche Applied Science, Boletín técnico para el uso del sistema "GC-Rich PCR System", 2008. Enlace en línea: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/12140306001bul.pdf>.
Visitado por última vez el 19 de abril de 2016
- [21] Promega, Boletín técnico para el uso del kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System", 2010. Enlace en línea: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/pr>

[otocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20clean-up%20system%20protocol.pdf](#)

Visitado por última vez el 19 de abril de 2016

- [22] Wizard ® SV Gel and PCR Clean-Up System Quick Protocol, Promega, 2009. Enlace en línea: <https://worldwide.promega.com/~-/media/files/resources/pr otcards/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20clean-up%20system%20quick%20protocol.pdf> Visitado por

última vez el 19 de abril de 2016

- [23] New England BioLabs, *NdeI* Restriction Enzyme Data Sheet. Enlace en línea:

<https://www.neb.com/products/r0111-NdeI?device=pdf>

Visitado por última vez el 19 de abril de 2016

- [24] New England BioLabs, *EcoRI* Restriction Enzyme Data Sheet. Enlace en línea:

<https://www.neb.com/products/r0101-EcoRI?device=pdf>

Visitado por última vez el 19 de abril de 2016

- [25] New England BioLabs, *HindIII* Restriction Enzyme Data Sheet. Enlace en línea:

<https://www.neb.com/products/r0104-HindIII?device=pdf>

Visitado por última vez el 19 de abril de 2016

- [26] New England BioLabs, NEBuffer 2.1 Data Sheet. Enlace en línea: <https://www.neb.com/products/b7202-nebuffer-2-1?device=pdf> Visitado por última vez el 19 de abril de 2016
- [27] T. Kieser, M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, D.A. Hopwood. "Practical Streptomyces Genetics" 1ª Edición, The John Innes Foundation, Norwich Research Park, pp. 56-58, 232-235, 240 Inglaterra, 2000
- [28] New England BioLabs, *Pst*I Restriction Enzyme Data Sheet. Enlace en línea: <https://www.neb.com/products/r0140-PstI?device=pdf> Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.
- [29] New England BioLabs, CutSmart® Buffer Data Sheet. Enlace en línea: <https://www.neb.com/products/b7204-cutsmart-buffer?device=pdf> Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.
- [30] QIAGEN Plasmid Purification Handbook for Mini, Midi, Maxi and Giga Kits. Purification of ultrapure, transfection-grade plasmid DNA. Enlace en línea: <https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=46205595-0440-459e-9d93-50eb02e5707e&lang=en> Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.

- [31] Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Quick Protocol, Promega, 2009. Enlace en línea: <https://www.neb.com/products/b7204-cutsmart-buffer?device=pdf> Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.
- [32] FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase Data Sheet, Fermentas, Life Sciences, Thermo Fisher Scientific. Enlace en línea: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MANO012878_FastAP_Thermo_Alkaline_Phosphatase_ef0654_UG.pdf Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.
- [33] Phire® Plant Direct PCR Kit Protocol, Finnzymes, Thermo Fisher Scientific. Enlace en línea: http://faculty.washington.edu/toby/PHIRE_plant_direct_pcr_kit_manual.pdf Visitado por última vez el 21 de abril de 2016.
- [34] M. Komatsu, T. Uchiyama, S. Omura, D. E. Cane, and H. Ikeda, "Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 6, pp. 2646–51, 2010.

- [35] M. Komatsu, K. Komatsu, H. Koiwai, Y. Yamada, I. Kozone, M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi, S. Omura, K. Shin-ya, D. E. Cane, and H. Ikeda, "Engineered *Streptomyces avermitilis* Host for Heterologous Expression of Biosynthetic Gene Cluster for Secondary Metabolites," *ACS Synth. Biol.*, p. 130117145935004, 2013.
- [36] T. Kieser, M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, D.A. Hopwood. "Practical *Streptomyces* Genetics" 1^a Edición, The John Innes Foundation, Norwich Research Park, pp.161-171, Inglaterra, 2000.
- [37] T. Murakami, T. G. Holt, and C. J. Thompson, "Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*," *J. Bacteriol.*, vol. 171, no. 3, pp. 1459–66, 1989.
- [38] M. Shepherd, M. Kharel, M. Bosserman, and J. Rohr. "Laboratory maintenance of *Streptomyces* species," *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter: Unit-10E.1 doi: 10.1002/9780471729259.mc10e01s18, pp. 1–10, 2010.
- [39] D. E. Cane, X. He, S. Kobayashi, S. Omura, and H. Ikeda, "Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase.," *J. Antibiot.*

(Tokyo)., vol. 59, no. 8, pp. 471–479, 2006.

- [40] A. Thanapipatsiri, J. Claesen, J.-P. Gomez-Escribano, M. Bibb, and A. Thamchaipenet, “A *Streptomyces coelicolor* host for the heterologous expression of Type III polyketide synthase genes,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 1, p. 145, 2015.
- [41] N. Ali, P. R. Herron, M. C. Evans, and P. J. Dyson, “Osmotic regulation of the *Streptomyces lividans* thiostrepton-inducible promoter, *ptipA*,” *Microbiology*, vol. 148, no. 2, pp. 381–390, 2002.
- [42] J. Sambrook and M.R. Green. “Molecular Cloning, A Laboratory Manual” 4th edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Vol. 3, pp. 1481-1637, USA, 2012.
- [43] H. Serrano-Posada, S. Centeno-Leija, S. Rojas-Trejo, V. Stojanoff, R. Rodríguez-Sanoja, E. Rudiño-Piñera, and S. Sánchez, “Crystallization and X-ray diffraction analysis of a putative bacterial class I labdane-related diterpene synthase,” *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 71, pp. 1194–1199, 2015
- [44] B. A. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., “Protein Identification and

- Analysis Tools on the ExPASy Server,” *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, pp. 571–607, 2005
- [45] B. Gust, T. Kieser, and K. Chater, “PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2),” *John Innes Cent.*, vol. 3, no. 2, pp. 1–39, 2002.
- [46] KG. Krebs, D. Heusser, and H. Wimmer, “Spray Reagents”. In: E. Stahl, “Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook”, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp. 854-909, 1969.
- [47] F. Tluscik, A. Kozubek, W. Mejbaum-Katzenellenbogen, “Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains” VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, vol. 44, No.4, pp. 645-651, 1975
- [48] E. S. Gomes, V. Schuch, and E. G. de Macedo Lemos, “Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics.,” *Braz. J. Microbiol.*, vol. 44, no. 4, pp. 1007–1034, 2013
- [49] D. I. Andersson and B. R. Levin, “The biological cost of antibiotic resistance,” *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 2, pp. 489–493, 1999

[50] Material Safety Data Sheet for Methylene Chloride, Science Lab. Enlace en línea:

<https://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926060>,
visitado por última vez el 4 de octubre de 2016.

[51] Material Safety Data Sheet for Ethyl Acetate, Science Lab. Enlace en línea:

<https://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927165>,
visitado por última vez el 4 de octubre de 2016.

Anexo I

Técnicas de Biología Molecular y de búsqueda de metabolitos secundarios

Extracción de ADN genómico

1. A partir de un cultivo de 5 mL, centrifugación 5,000 rpm / 10min descartando sobrenadante.
2. Lavado del pellet 2 veces con 2 mL sacarosa 0.3 M usando la misma centrifugación.
3. Resuspensión de micelio en 0.5 mL Buffer L + lisozima 20 mg/mL
4. Incubación 37°C/1h
5. Centrifugación 7,000 rpm / 10 min descartando sobrenadante.
6. Adición de 1 mL sacarosa (0.3 M) y homogeneizado
7. Agregar:
 - * 20 µL EDTA pH 8.0 (500 mM)
 - * 400 µL SDS (10 %)
 - * 1 mL NaCl (5M)
8. Incubación 4°C / 30 min
9. Centrifugación 10,000 / 20 min recuperando sobrenadante
10. Adición de 1 volumen de Isopropanol frío permitiendo la precipitación de ADN genómico por 5 minutos
11. Tomar ADN con palillo y transferir a tubo Eppendorf 1.5 mL para lavado con 1 mL EtOH 70 %

12. Centrifugación 15,000 / 5 min y secado del pellet a T_{amb}
13. Resuspensión en TE 0.1 y almacenamiento a -20°C

Preparación de protoplastos de *S. avermitilis* SUKA22

1. 40 μL suspensión densa de esporas (5×10^8 UFC/mL) se inocula a 50 mL medio YEME (con 15% sacarosa) con adición de MgCl_2 5mM y glicina 0.5% en matraz liso de 500 mL. Incubación a 30°C / 48h / 180 rpm.
2. Centrifugación a 3,000 rpm / 10 min y descartar SN
3. Lavado con 25 mL de solución P10 y repetición de la misma centrifugación descartando SN
4. Suspensión del micelio en 20 mL P10 + lisozima (1mg/mL)
5. Incubación a 37°C / 5 min
6. Incubación a 30°C / 15-40 min mezclando cada 5 min
7. Adición de 20 mL de solución P20 mezclando con pipeteo ligero
8. Filtrado de la solución por filtro de algodón para eliminación del micelio no digerido
9. Centrifugación a 3,000 rpm / 10 min y descartar SN para recolección de los protoplastos sedimentados
10. 1^o lavado en 20 mL P20 con la misma centrifugación
11. 2^o lavado en 20 mL P20 con la misma centrifugación
12. Resuspensión de protoplastos en 2-4 mL P20 + DMSO 7%
13. Almacenamiento de alícuotas de 50 μL a -80°C

Viabilidad y eficiencia de transformación constante durante al menos 5 años.

Transformación de protoplastos de *S. avermitilis* SUKA22 mediada por PEG

1. Transferencia de protoplastos deshielados (50 μ L) al fondo de un tubo Eppendorf limpio.
2. Adición de < 10 μ L de ADN no metilado a transformar en la pared del tubo limpio.
3. Golpe del tubo por la base para bajar el ADN a los protoplastos y adición inmediata de 0.5 mL de la solución de PEG 25% (Anexo III) mezclando ligeramente.
4. Reposo 1 min / T_{amb}.
5. Adición de 450 μ L de solución P20 mezclando con pipeteo ligero.
6. Siembra de 0.01 – 0.1 mL de la suspensión a una caja con agar RM14-15 deshidratado previamente 2 horas, esparciendo los protoplastos con 2.5 mL de RM14-15 Soft Agar a 45°C.
7. Incubación a 30°C / 16-24 h boca arriba.
8. Overlay: antes de 24 h de la primera incubación (paso 7), adición de 2.5 mL de RM14-15 Soft Agar + Kan (50 μ g/mL: concentración final en caja) como marcador de resistencia.

9. Incubación a 30°C / 5-7 días o hasta observar colonias. Las primeras 24h de esta incubación se colocaron las cajas sembradas boca arriba, y el tiempo restante, boca abajo.

Extracción de proteínas de *Streptomyces*

1. A partir de los inóculos de las cepas en medios de producción de metabolitos, incubados como se indica en el punto 18.1 de la metodología, se realizó una centrifugación a 8,000 xg / 10 min, descartando el sobrenadante.
2. Lavado con un volumen del volumen inicial con PBS 1x 2 veces descartando sobrenadante.
3. Resuspensión del pellet en 1-5 mL de Buffer de Lisis (Buffer Tris 50 mM pH 7.5 + lisozima 20 mg/mL) según el tamaño del pellet, usando el menor volumen posible.
4. Transferencia de 1.5 mL de cada muestra resuspendida en Buffer de lisis a tubos Falcon 15 mL.
5. Adición de 500 mL de inhibidor de proteasas 4x en PBS para concentración final de 1x.
6. Ajuste de tubos en hielo compactado con EtOH y NaCl.
7. Sonicación de cada muestra. Condiciones: pulsos de 5 seg, amplitud = 60 kHz, tiempo = 60 seg, limpiando entre cada muestra y repitiendo la sonicación por 4 rondas o hasta observarse el micelio lisado y la solución homogénea.

8. Adición de una cucharilla de arenilla de perlas de vidrio y 0.1 volúmenes de CHAPS.
9. Vortex 1 min y descanso 1 min 3 veces.
10. Reposo 5 min.
11. Transferencia de muestra sin asiento de perlas de vidrio a tubo falcon 15 mL limpio.
12. Centrifugación 17,000 xg / 10 min y recuperación del sobrenadante.
13. Almacenamiento de alícuotas de 600 μ L en tubos Eppendorf 1.5 mL a 4°C, considerando la desnaturalización de las proteínas presentes en las muestras.

SDS-PAGE

(Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

Linearización de proteínas (desnaturalización)

1. Alícuotas de 15 μ L de las proteínas extraídas con el protocolo anterior se depositaron en tubos Eppendorf 600 μ L
2. Colocación de los tubos en flotador de foami preparando baño maría.

3. Adición de 5 μ L de Buffer de Carga 4x para SDS-PAGE (con β -mercaptoetanol para ruptura de puentes disulfuro) para concentración final de 1x.
4. Calentamiento a baño maría 10 min e inmediato enfriamiento en hielo / 2 min para carga inmediata de 10 μ L de cada muestra en gel de acrilamida.

Preparación de gel de acrilamida y montaje del equipo:

- i. Montado de placas de vidrio correspondientes a 1 mm espesor en la base lavando perfectamente los vidrios.
- ii. Preparación de persulfato de amonio (APS) 10% el mismo día de uso.
- iii. Preparación de gel separador (diferenciador):

En un tubo Falcon de 50 mL, mezclar, según la concentración de acrilamida deseada:

	Stock	8 % acrilamida		10 % acrilamida		12 % acrilamida		14 % acrilamida		16 % acrilamida	
		1 gel	2 geles	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles
H2O		3.69	4.61	3.15	3.94	2.62	3.28	2.09	2.61	1.55	1.94
Acrilamida	30%	2.13	2.67	2.67	3.33	3.2	4	3.73	4.67	4.27	5.33
Tris pH 8.8	2.5 M	2	2.5	2	2.5	2	2.5	2	2.5	2	2.5
SDS	10%	0.08	0.1	0.08	0.1	0.08	0.1	0.08	0.1	0.08	0.1
APS	10%	0.1	0.13	0.1	0.13	0.1	0.13	0.1	0.13	0.1	0.13
Total (mL)		8	10	8	10	8	10	8	10	8	10

- iv. Adición de 5 μL de Tetrametilendiamina (TEMED) al final, e inmediatamente, vaciado de la mezcla en las placas hasta 1-2 cm bajo el borde.
- v. Permitir la solidificación al menos 15 min
- vi. Preparación del gel concentrador:
- vii. En un tubo Falcon 15 mL, mezclar (para cualquier concentración de acrilamida empleada):

	Stock	mL
H ₂ O		2.5
Acrilamida	30%	0.533
Tris pH 6.8	2.5 M	1
SDS	10%	0.04
APS	10%	0.04
Total (mL)		4.113

- viii. Igualmente, adición de 5 μL de TEMED al final y de manera inmediata, mezcla y vaciado de la solución sobre el gel separador ya solidificado.
- ix. Colocación de peines correspondientes a 1 mm de grosor del gel de acrilamida.
- x. Solidificación al menos 15 min.
- xi. Desmonte de las placas de la base y ajuste del gel en el soporte y cámara electroforética para SDS-PAGE.
- xii. Llenado de la cámara con Buffer de Corrida 1x

5. Una vez preparadas las muestras (punto 4), carga de 10 μL de cada muestra y del marcador de peso molecular en el gel depositando cada muestra con cuidado para evitar el paso de la misma a otro carril.
6. Corrida a 60 V / 6-8 h o hasta observar la línea roja salir del vidrio.

Una vez terminado el SDS-PAGE, las placas con gel de acrilamida se pueden almacenar a 4°C / O.N. y continuar con la electrotransferencia el día siguiente.

Transferencia de proteínas de gel a membrana

Al terminar el SDS-PAGE, la placa con el gel se puede almacenar a 4°C / O.N. en papel aluminio para continuar el día siguiente, o puede continuarse inmediatamente con la transferencia de las proteínas a la membrana.

1. Corte de un pedazo de membrana de transferencia "Immobilon-P" (0.45 μm , PVDF) correspondiente a la medida del gel electroforético.
2. Remojo de la membrana en MeOH limpio / 10 min
3. Separado de vidrios para obtención del gel y corte del mismo para retirar la zona del gel concentrador y la zona de corrida azul-morada.

4. Montado del equipo colocando el gel sobre un papel filtro humedecido con Buffer de transferencia 1x, colocando encima la membrana y luego otro papel filtro, verificando la ausencia de burbujas. El gel debe colocarse sobre la superficie correspondiente a la carga negativa (negra).
5. Vaciado de Buffer de Transferencia 1x en la cámara cubriendo completamente la membrana.
6. Transferencia a 4°C: 60 V / 90 min.

Western Blot

1. Primer marcaje de la membrana:
Solución de Anti-His 1:5000: en TBS 1x + Tween 20 (0.05%)
+ leche descremada 3%
Agitación en Rocker con 15° y velocidad de 15 / 60 min.
2. Lavado de la membrana 3 veces con 25 mL TBS 1x
3. Segundo marcaje de la membrana:
4. Solución de Anti-Mouse 1:5000: en TBS 1x + Tween 20 (0.05%) + leche descremada 3%
Agitación en Rocker con 15° y velocidad de 15 / 60 min.
5. Lavado de la membrana 3 veces con 25 mL TBS 1x
6. Adición homogénea de 1-2mL de solución reveladora: BCIP/NBT Substrate Solution (PerkinElmer Life Sciences).
7. Revelado 10 min en la oscuridad

Teñido de gel con Azul de Coomasie

El gel de SDS-PAGE puede ser teñido después de la transferencia de proteínas a la membrana del siguiente modo:

1. Cubrimiento de gel con azul de Coomasie
2. Agitación en Rocker con 15° y velocidad de 15 / 60 min.
3. Vaciado del azul de coomasie y adición de la primera solución de desteñido “Destaining Solution I”.
4. Agitación en Rocker con 15° y velocidad de 15 / 60 min.
5. Vaciado de la Destaining Sol. I y adición de la segunda solución de desteñido “Destaining Solution II”.
6. Agitación en Rocker con 15° y velocidad de 15 / 60 min
7. Repetición de pasos 5 y 6 hasta observarse las bandas correspondientes a las proteínas de las muestras y observarse el gel transparente.

Anexo II

Medios de cultivo

Todos los medios indicados deben ser esterilizados en autoclave (121°C / 20 min) a menos que se especifique lo contrario.

- **LB** (Lysogeny Broth)

Extracto de levadura (YE)	5 g/L
NaCl	10 g/L
Bacto-Triptona	10 g/L

- **NA** (Nutrient Agar)

Nutrient Broth	8 g/L
Agar	15 g/L

- **RM14-15 y RM14-15Soft Agar**

Agua destilada	870 mL
Sacarosa	150 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂ *6H ₂ O	10.12 g/L
Glucosa	10 g/L
Casaminoácidos	0.1 g/L
L-Prolina	3.0 g/L
Extracto de levadura	2.0 g/L (continúa...)

Solución elementos traza 2.0 mL/L

Agar de avena 3.0 g/L

Agar:

Para RM14-15: 20 g/L

Para RM14-15 Soft Agar: 5.0 g/L

-----Autoclavar 121°C / 20 min-----

Agregar las soluciones estériles:

KH₂PO₄ (0.5%) 10.0 mL/L

CaCl₂*2H₂O (3.68% a pH 6.5) 80.0 mL/L

MES 0.25 M 40.0 mL/L

- **Medio Mínimo**

(NH₄)₂SO₄ 2 g/L

MgSO₄*7H₂O 0.6 g/L

Sol. elementos traza sin YE 1 mL/L

Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 20 mL/L

Glucosa 10 g/L

Extracto de levadura 1 g/L

- **Medio Sintético**

MgSO ₄ *7H ₂ O	100 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
FeSO ₄ *7H ₂ O	50 mg/L
ZnSO ₄ *7H ₂ O	50 mg/L
MnSO ₄ *4H ₂ O	50 mg/L
CaCO ₃	5 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
Glucosa	60 g/L
<u>Ajuste a pH 7.0</u>	

- **Medio SOC**

Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
MgSO ₄	4.8 g/L
Glucosa	3.6 g/L
NaCl	0.5 g/L
KCl	0.186 g/L
<u>Ajuste a pH 7.0 con NaOH</u>	

- **MS Agar**

Manitol	20 g/L
Harina de soya	20 g/L
Agar	20 g/L

Se esteriliza dos veces en autoclave: 115°C / 15 min

- **R2YE**

Preparar en alícuotas de 100 mL en matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Agua destilada	800 mL/L
Sacarosa	103 g/L
K ₂ SO ₄	0.25 g/L
MgCl ₂ *6H ₂ O	10.21 g/L
Glucosa	10 g/L
Casaminoácidos	0.1 g/L
Agar	27.5 g/L

Luego de autoclavar, agregar a 80 mL en órden:

1. KH₂PO₄ 0.5% 1 mL
2. CaCl₂ 3.68% 8 mL
3. L-prolina 20% 1.5 mL
4. Buffer TES 5.73% 10 mL
5. Solución de elem. traza 0.2 mL
6. NaOH 1N 0.5 mL

- **Seed Media**

Glucosa	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Harina de soya	15 g/L
<u>Ajuste a pH 7.5</u>	

- **Soft Nutrient Agar**

Caldo nutritivo	8 g/L
(Pluripeptona: 5g/L, extracto de carne: 3 g/L)	
Agar	5 g/L
<u>Ajuste a pH 7.2</u>	

- **YEME**

Extracto de levadura	3.0 g/L
Extracto de malta	3.0 g/L
Peptona	5.0 g/L
Glucosa	10 g/L
Sacarosa	150 g/L

- **YMG**

Extracto de levadura	4 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Glucosa	4 g/L

- **YMS**

Extracto de levadura	4 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Almidón soluble	4 g/L
Agar	20 g/L

Ajuste a pH 7.4 con KOH 2N

Para YMS⁺⁺

Después de Al medio anterior agregar:

MgCl₂: 10 mM

Ca(NO₃)₂: 8 mM

MgCl₂*6H₂O 2.03 g/L

Solución de elementos traza 2.0 mL/L

Ajuste a pH 6.5 con KOH 2N

Después de autoclavar, agregar:

KH₂PO₄ 0.5% 10 mL/L

CaCl₂*2H₂O 3.68% 100 mL/L

MES 0.25 M 100 mL/L

- **Buffer P20**

Misma composición que el Buffer P10 pero en lugar de agregar 103 g/L de sacarosa, se agregan 200 g/L.

- **Buffer T**

Solución 1:

- Agua destilada 75 mL

- Sacarosa 10.3% 25 mL

- Solución de elementos traza 0.2 mL

- K₂SO₄ 2.5% 1 mL

Solución 2:

A 9.3 mL de la Solución 1 agregar:

- CaCl₂ 5M 0.2 mL

- Buffer Tris-ácido maleico 0.5 mL

Al momento de utilizar, agregar:

Solución 2 3 partes por volumen (75%)
PEG 1000 1 parte en peso (25%)
Todas las soluciones utilizadas deben ser estériles

- **Buffer TES 5.73%**

TES 5.73 g/100mL

Ajuste a pH 7.2

- **Buffer Tris-maleato**

Buffer Tris 1M ajustado a pH 8.0 con ácido maleico.

- **MES 0.25 M**

(PM=195.24 g/mol)

Ajuste a pH 6.5

- **Solución de elementos traza**

ZnCl₂ 40 mg/L

FeCl₃*6H₂O 200 mg/L

CuCl₂*2H₂O 10 mg/L

MnCl₂*4H₂O 10 mg/L

Na₂B₄O₇*10H₂O 10 mg/L

(NH₄)₆Mo₇O₂₄*4 H₂O 10 mg/L

Extracto de levadura 10% 5 mL/L (continúa...)

Una vez esterilizado, almacenamiento en frasco ámbar o envuelto con papel aluminio.

- **Solución de PEG 25%** para transformación de protoplastos de *S. avermitilis* SUKA22:

PEG 1000 25.0 g

Sacarosa 2.5 g

Llevar a 100 mL con agua desionizada

Ajuste a pH 9.0 con NaOH 50 mM

Clarificación de la solución con filtro 0.45 µm

-----Esterilizado en autoclave 121°C/25min-----

A 1.0 mL de la solución clarificada se le agrega, antes de la transformación de protoplastos:

KH₂PO₄ 0.5%: 10µL

CaCl₂ 5M: 20 µL

Buffer Tris-Maleato 1M: 50 µL

- **Solución P10**

Agua destilada 800 mL/L

Sacarosa 103 g/L

K₂SO₄ 0.25 g/L

MgCl₂*6H₂O 2.03 g/L

Solución elementos traza: 2.0 mL/L (continúa...)

Ajuste a pH 6.5 KOH 2N

-----Autoclavar 121°C / 20 min-----

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	10.0 mL/L
CaCl ₂ *2H ₂ O (3.68%)	100.0 mL/L
MES 0.25 M	100.0 mL/L

- **Solución P20**

Misma composición que la solución P10, aumentando la concentración de sacarosa de 103 g/L a 200 g/L

- **TE**

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Ajuste a pH 8.0

- **TE 0.1 (1/10)**

TE 10% en agua milliQ

Anexo IV

Abreviaturas

aa: aminoácidos

ACP: Proteína Acarreadora de Acilos (Acyl Carrier Protein)

ADNg: ADN genómico

AntiSMASH: Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell

AT: Acil-Transferasa

APS: Persulfato de amonio (Ammonium Persulfate)

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CDS: Secuencia Codificante de ADN (Codifying DNA Sequence)

d: días de incubación

h: horas de incubación

His-Tag: Cola o tallo de histidinas (Histidine Tag)

Kan: Kanamicina

kb: kilo pares de bases (1kb = 1000 pb)

KS: Ceto-Sintasa (Keto-Synthase)

λ : longitud de onda

mL: mililitros

μ L: microlitros

O.N.: Overnight. Incubación durante la noche

O.D.₆₀₀: Optical Density 600. Densidad óptica a $\lambda=600$ nm

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PEG: Polietilenglicol

PKS: Policétido-Sintasa (Polyketide Synthase)

PM: Peso Molecular (MW)

rpm: rotaciones por minuto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

sp: especie concreta del género indicado

SN: sobrenadante

T_{amb}: Temperatura ambiente

Thio: Tioestreptón

T_m: Temperatura de alineamiento

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

WT: Especie silvestre (Wild Type)