



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *sco2582* SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS EN *STREPTOMYCES*  
*COELICOLOR***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**OMAR JIMÉNEZ RODRÍGUEZ**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**AÑO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** Ruth Edith Martín Fuentes

**VOCAL:**           **Profesor:** José Adelfo Escalante Lozada

**SECRETARIO:**   **Profesor:** Víctor Hugo Tierrafría Pulido

**1er. SUPLENTE:** **Profesor:** José de Jesús García Trejo

**2° SUPLENTE:**   **Profesor:** Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**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. Víctor Hugo Tierrafría Pulido**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel**

---

**SUSTENTANTE:**

**Omar Jiménez Rodríguez**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha brindado. Particularmente a la Facultad de Química, que se convirtió en mi casa durante los años que duró este camino.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su apoyo, confianza y atención hacia mí. Especialmente por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán, por su invaluable apoyo, sus enseñanzas, su paciencia, su confianza y ayuda incondicional en todos los aspectos.

Al M. en C. Víctor Hugo Tierrafría Pulido, por fungir como guía, por todo el conocimiento y excelente asesoría, sin los cuales este trabajo no podría haberse realizado

Al programa NAUTEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; a PAPIIT (IN201413), DGAPA UNAM; a CONACYT (CB 219686), México, y a la empresa ALTECSA, S.A. de C.V., quienes proporcionaron los recursos para desarrollar esta investigación.

**A ti, que estás leyendo esto ¡Gracias!**

# 1. ÍNDICE GENERAL

.....	1
1. ÍNDICE GENERAL.....	1
1.1 ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
1.2 ÍNDICE DE TABLAS .....	3
2. ABREVIATURAS .....	4
3. RESUMEN.....	5
4. INTRODUCCIÓN .....	6
4.1 Generalidades del género <i>Streptomyces</i> .....	6
4.2 Ciclo de vida del género <i>Streptomyces</i> .....	6
4.3 Cepa modelo <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	8
4.4 Producción de metabolitos secundarios en <i>S. coelicolor</i> .....	10
4.5 El producto de <i>sco2127</i> de <i>S. coelicolor</i> y su interacción con otras proteínas.....	11
4.6 El producto de expresión de <i>sco2582</i> .....	12
4.7 Proteasas.....	13
4.7.1 La peptidasa modelo de la familia M48 .....	14
4.8 La diferenciación morfológica en <i>S. coelicolor</i> está mediada por proteasas.....	15
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1 Objetivo general.....	16
6.2 Objetivos particulares.....	16
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	17
7.1 Cepas y plásmidos.....	17
7.2 Construcción de la mutante $\Delta$ <i>sco2582</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	17
7.3 Cinéticas de crecimiento de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y $\Delta$ <i>sco2582</i> .....	24
7.4 Búsqueda in silico de posibles proteínas blanco del producto de expresión del gen <i>sco2582</i> .....	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
9. CONCLUSIONES .....	41
10. BIBLIOGRAFÍA.....	41
11. ANEXOS.....	47

## 1.1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	8
Figura 2. Representación circular del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> .....	9
Figura 3. Estructura química de algunos antibióticos producidos por <i>S. coelicolor</i> A3(2) .....	10
Figura 4. Mecanismo propuesto para la maduración del factor a en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
Figura 5. Diagrama general del método de sustitución génica ( <i>PCR targeting</i> ) en <i>Streptomyces</i> mediante recombinación homóloga.....	18
Figura 6. Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar el casete de resistencia a apramicina.....	20
Figura 7. Representación del plásmido pIJ773 y restricción del casete resistencia .....	28
Figura 8. Producto de PCR del casete extendido.....	29
Figura 9. Patrón de restricción de los cósmidos StC123 y StC123 $\Delta sco2582::aac(3)IV$ usando la enzima <i>PstI</i> .....	30
Figura 10. PCR de verificación de la cepa mutante usando los oligonucleótidos 8272F y 8273R.....	31
Figura 11. Alineamientos realizados con blastn suite.....	32
Figura 12. Cinéticas de crecimiento para ambas cepas y comparación de biomasa.....	33
Figura 13. Producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina a las 72 h.....	34
Figura 14. Caracterización fenotípica en medio sólido para ambas cepas.....	35
Figura 15. Representación de la secuencia de SCO5913. ....	39
Figura 16. Mecanismo de acción propuesto para SCO2582. ....	40

## 1.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados.....	17
Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR para amplificar el casete de resistencia.....	21
Tabla 3. Condiciones para la reacción de PCR para amplificar el casete de resistencia.....	21
Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR de confirmación.....	24
Tabla 5. Condiciones para la reacción de PCR de confirmación.....	24
Tabla 6. Características cinéticas de crecimiento para las dos cepas.....	34
Tabla 7. Posibles proteínas blanco para la proteasa SCO2582 encontradas con PROSITE para el motivo STAT'A.....	37
Tabla 8. Posibles proteínas blanco para la proteasa SCO258 encontradas con PROSITE para el motivo CAAX. ....	37

## 2. ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$ : microgramo.

$\mu\text{L}$ : microlitro.

$\mu\text{M}$ : micromolar.

Acetil-CoA: acetil coenzima A.

ACT: actinorrodina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Amp: ampicilina.

Antibiótico<sup>R</sup>: resistencia a antibiótico.

Antibiótico<sup>S</sup>: sensibilidad a antibiótico.

Apra: apramicina.

ARN: ácido ribonucleico.

BLAST: Basic alignment search tool.

Cat: cloranfenicol.

CCR: Represión catabólica por carbono.

CDA: antibiótico dependiente de calcio.

Dog: 2-desoxiglucosa.

Dog<sup>R</sup>: resistente a 2-desoxiglucosa.

Dog-6-P: 2-desoxiglucosa-6-fosfato.

Glk: glucosa cinasa.

Kan: kanamicina.

M: molar.

M145: *Streptomyces coelicolor*, cepa silvestre, sin los plásmidos SCP1 ni SCP2.

mg: miligramo

mL: mililitro.

mM: milimolar.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PKS: policétido sintasa.

RED: undecilprodigiosina.

rpm: revoluciones por minuto.

SCO: *Streptomyces coelicolor*.

SCP1 y SCP2: plásmidos de *Streptomyces coelicolor*.



### 3. RESUMEN

El producto de expresión del gen *sco2582* de *Streptomyces coelicolor* fue identificado como una proteína que interacciona con la proteína SCO2127, la cual se encuentra involucrada en la sensibilidad a glucosa en el proceso de producción de antibióticos. Al analizar la secuencia de aminoácidos de SCO2582 se encontró el motivo de unión a zinc HEXXH, característico de las metalopeptidasas dependientes de zinc.

La proteína modelo de la superfamilia de peptidasas M48 es la metaloproteasa Ste24 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se sabe que esta proteasa digiere al precursor del factor  $\alpha$ , que es una feromona peptídica de la levadura, en dos sitios distintos, uno ubicado en el extremo N-terminal, y el otro en el C-terminal. De manera interesante, una secuencia idéntica a la del sitio de corte del extremo N-terminal de Ste24 se encontró en la proteína SCO5913, anotada como una serín proteasa involucrada en la inactivación del inhibidor de proteasas STI, codificado por el gen *sco0762* y, por tanto, en la progresión normal del micelio aéreo y la diferenciación de *S. coelicolor*.

Dado que muchas serín proteasas de bacterias Gram positivas presentan secuencias señal y pro-secuencias en el extremo N-terminal, en el presente estudio se propone que la proteína SCO2582 reconoce el sitio de corte de la pro-secuencia en SCO5913, participando en el procesamiento de la proteína y llevándola a una forma funcional.

Con el fin de probar esta hipótesis, se reemplazó el gen *sco2582* por un casete de resistencia a apramicina, y tanto la mutante resultante,  $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV*, como la cepa silvestre (M145) de *S. coelicolor* fueron caracterizadas. La inactivación del gen *sco2582* afectó el crecimiento y la producción de antibióticos de *S. coelicolor* en medio NMMP. La biomasa alcanzó únicamente 50%, y los antibióticos, actinorrodina y undecilprodigiosina, tan solo 0.1% y 30% de la producción de la cepa silvestre, respectivamente. Finalmente, con base en un análisis bioinformático, se concluyó que es posible que el producto de expresión del gen *sco2582* participe en el procesamiento proteolítico de la proteína SCO5913, lo cual tendría como resultado el fenotipo observado experimentalmente.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 Generalidades del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es uno de los grupos más importantes en microbiología debido a su complejo ciclo de vida, por lo cual han sido elegidos como organismos modelo para el estudio del desarrollo y evolución bacteriana (Hopwood, 2007). El grupo produce alrededor de dos terceras partes de los antibióticos de origen natural y una amplia gama de otros metabolitos secundarios, entre los que se incluyen agentes antihelmínticos, antitumorales, antifúngicos y herbicidas (Baltz, 1998; Rigali *et al.*, 2008). Estos compuestos le confieren importancia y grandes aplicaciones en áreas como la medicina, la veterinaria y la agricultura, así como en un gran número de procesos industriales (Redenbach *et al.*, 1996; Champness, 2000).

Los estreptomicetos son bacterias Gram positivas, miembros del orden de los *Actinomycetales* dentro la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Son microorganismos aerobios, formadores de spora, inmóviles y con un contenido elevado de guanina y citosina (70% G+C) en su ADN (Chater, 2006). Viven, en su mayoría, como saprófitos en el suelo, aunque también habitan una amplia gama de nichos, tanto terrestres como acuáticos (Flärdh y Buttner, 2009). Generalmente no son bacterias patógenas, sin embargo, algunas especies pueden causar enfermedades en plantas. Tal es el caso de *Streptomyces scabei*, que causa la sarna común en las papas y *Streptomyces ipomoea*, que destruye la costra del camote (Loria, *et al.*, 1997; Clark y Moyer, 1998). *Streptomyces somaliensis*, por su parte, causa actinomicetoma en humanos; una infección severa y debilitante que afecta tejidos profundos y huesos, la cual puede ser mortal si no se interviene quirúrgicamente (Kirby *et al.*, 2012).

### 4.2 Ciclo de vida del género *Streptomyces*

Al encontrarse en el suelo, los estreptomicetos crecen sobre sustratos sólidos como plantas en descomposición y restos animales (Hopwood, 2007). Cuando fueron descubiertos, el patrón de crecimiento de estos organismos llevó a los científicos a sugerir que eran hongos. No obstante, la ausencia de membrana nuclear y la presencia

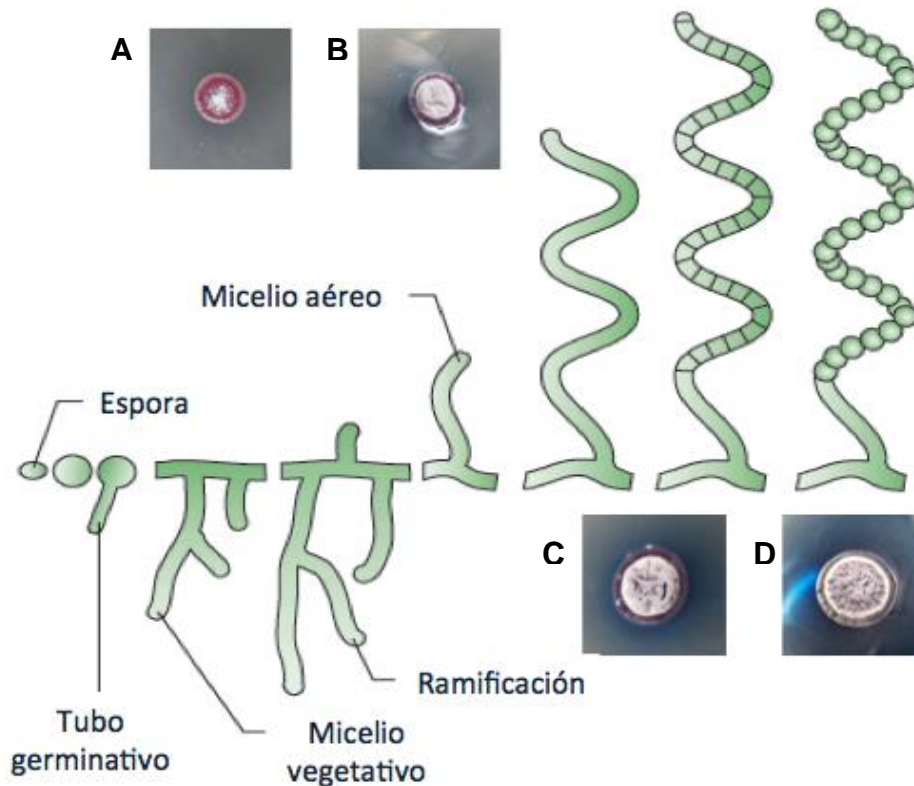
de peptidoglucano confirmó su origen procariótico (Hopwood, 1999). Las similitudes entre el desarrollo de los hongos y los estreptomicetos se deben, presumiblemente, al resultado de adaptaciones a nichos ecológicos similares (Flärdh y Buttner, 2009).

Al encontrar condiciones favorables de nutrientes, una espora de *Streptomyces* germina formando uno o dos tubos germinativos que se desarrollan para formar hifas. Estos tubos crecen por medio de extensión apical y se ramifican para formar el micelio vegetativo. Con frecuencia, el micelio vegetativo se abre paso hacia el sustrato circundante. La hifa aérea vence la tensión superficial, escapando del entorno acuoso del micelio vegetativo, y se eleva hacia el aire. Entonces, la hifa aérea comienza a formar septos, por medio de un proceso de desarrollo controlado de división celular, en largas cadenas de compartimentos de pre-esporas, los cuales desarrollan paredes gruesas, sintetizan un pigmento gris y adquieren características de esporas maduras (**Figura 1**). En comparación con las endosporas formadas por especies de *Bacillus*, las esporas de *Streptomyces* son mucho menos resistentes a condiciones adversas, aunque pueden sobrevivir por largos periodos en estado de desecación. Por lo tanto, parece que las esporas inactivas de *Streptomyces* están bien adaptadas para dispersarse por el ambiente (Flärdh y Buttner, 2009).

La producción y liberación de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, ocurre típicamente durante la transición desde el crecimiento vegetativo hacia la esporulación o, en cultivos líquidos, durante la transición de la fase de crecimiento exponencial hacia la fase estacionaria (Hopwood, 2007). En la naturaleza, dichas moléculas ofrecen una ventaja competitiva a las cepas productoras cuando los nutrientes se vuelven escasos (Champness y Chater, 1994).

El papel de los estreptomicetos es crucial en el ambiente terrestre debido a la amplia gama de procesos metabólicos y biotransformaciones que son capaces de realizar, que incluyen la degradación de restos insolubles de otros organismos, tales como lignocelulosa y quitina, lo que convierte a los estreptomicetos en organismos centrales en el reciclaje de carbono (Bentley, *et al.* 2002). Adicionalmente, los estreptomicetos producen diversas clases de enzimas extracelulares como proteasas, celulasas, amilasas, lipasas, quitinasas y xilanasas (Morosoli *et al.*, 1986; Henderson *et*

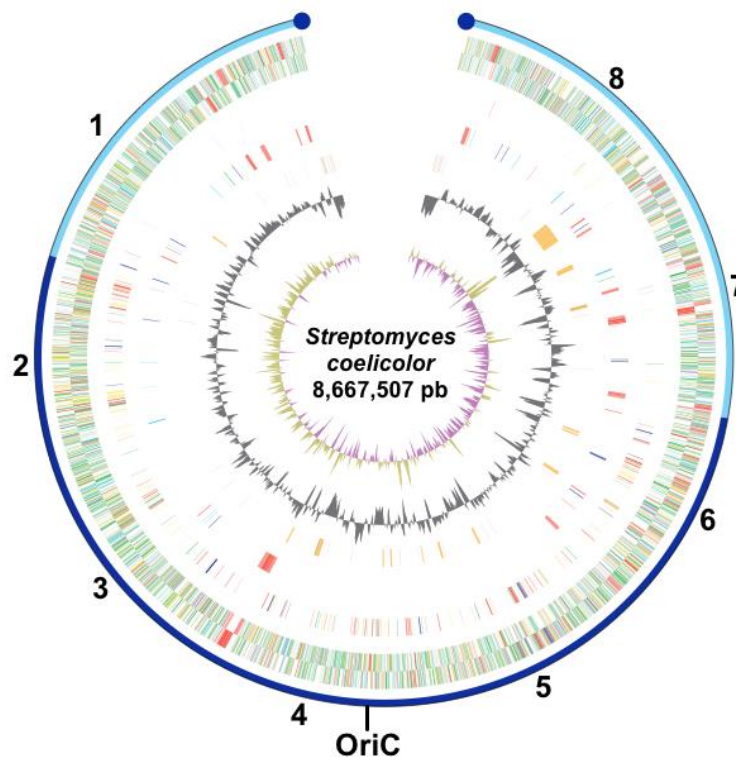
al., 1987; Long *et al*, 1987; Lange *et al.*, 1999), las cuales han encontrado numerosas aplicaciones en el sector industrial.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*** (Modificado de Flårdh y Buttner, 2009). Las fotografías muestran el fenotipo característico de la cepa silvestre M145 en medio sólido a lo largo del tiempo. Comienza como una colonia lisa (A) que posteriormente se torna blanquecina al producir micelio aéreo (B), cuando las hifas aéreas se septan, comienza la producción de esporas (C), hasta que alcanzan la madurez y la colonia se torna de color gris (D).

### 4.3 Cepa modelo *Streptomyces coelicolor*

La especie *Streptomyces coelicolor* A3(2) fue adoptada como la cepa modelo de los estreptomicetos debido a la facilidad para su análisis genético, además de su capacidad para producir al menos cinco antibióticos diferentes (Liu *et al.* 2013).



**Figura 2. Representación circular del cromosoma de *S. coelicolor*** tomado de (Bentley, *et al.* 2002). La escala exterior en Mb sigue un orden contrario a las manecillas del reloj. Se señala la región central (azul oscuro), los brazos del cromosoma (azul claro) y el origen de replicación (OriC)

El genoma de esta especie fue el primero del género en ser secuenciado. *S. coelicolor* posee un cromosoma lineal conformado por 8,667,507 pares de bases (8.7 Mb), y se han identificado 7 825 probables genes. El cromosoma se encuentra agrupado en tres regiones: la región central de 4.9 Mb, también llamada *core*, y dos brazos flanqueantes, el izquierdo de 1.5 Mb y el derecho de 2.3 Mb (Bentley *et al.*, 2002). Aproximadamente la mitad del cromosoma se encuentra en la región central y contiene genes esenciales para la supervivencia (**Figura 2**). La cepa secuenciada, *S. coelicolor* M145, es un derivado de la cepa A3(2) que carece de los dos plásmidos: SCP1 (lineal, 350 kb), SCP2 (circular, 31 kb) (Redenbach *et al.*, 1996; Kieser, 2000).

#### 4.4 Producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*

Los estreptomicetos son la fuente más abundante de antibióticos provenientes de microorganismos y normalmente producen varios antibióticos con un perfil de producción específico para cada especie. El análisis de la secuencia del genoma de *S. coelicolor* M145 ha revelado al menos 29 clústeres de genes biosintéticos para metabolitos especializados. Dentro de este grupo de clústeres se encuentran aquellos que codifican para los antibióticos actinorrodina (ACT), undecilprodigiosina (RED) y el antibiótico dependiente de calcio (CDA, Calcium Dependent Antibiotic) (Hopwood, 1988). Otro cluster descrito, es el del policétido críptico (CPK, Cryptic PolyKetide) cuyo único producto encontrado ha sido un producto amarillo denominado coelimidina P1 (Gómez-Escribano *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Entre el resto de los clústeres del metabolismo secundario se han encontrado homólogos de otras policétido sintetasas de tipo I y II, chalcona sintetisas, péptido sintetisas no ribosomales (NonRibosomal Peptide Synthetases, NRPS) y terpeno ciclasas (Bentley, *et al.* 2002).

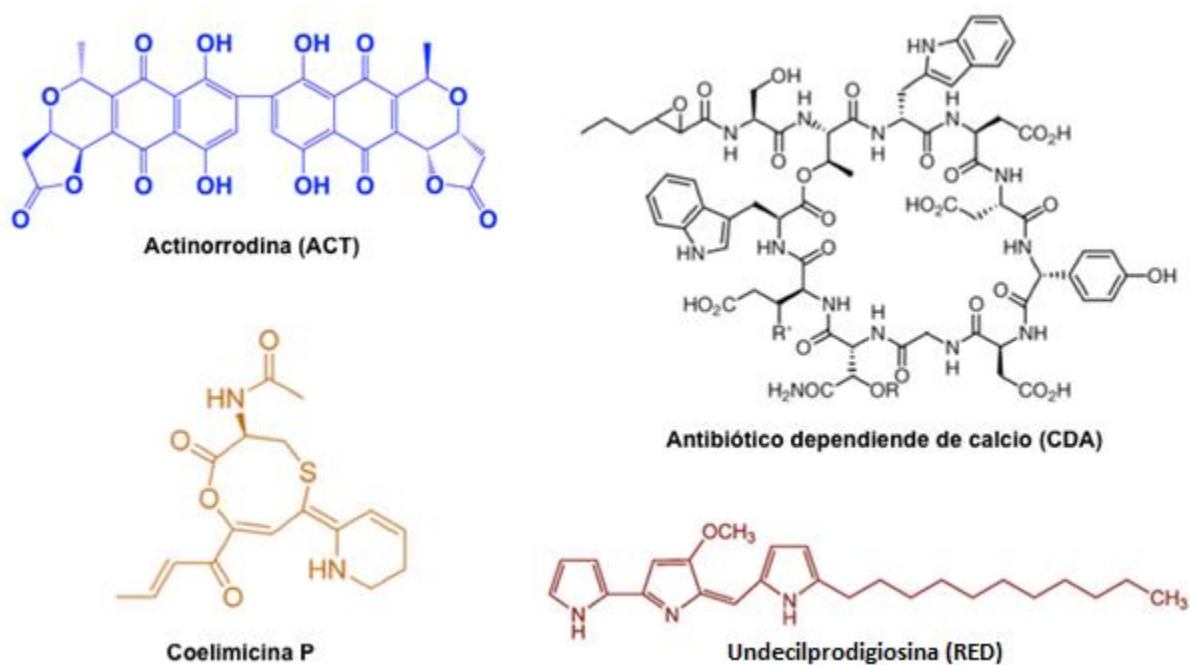


Figura 3. Estructura química de algunos antibióticos producidos por *S. coelicolor* M145

En la **Figura 3** se observan las estructuras de cuatro antibióticos producidos por *S. coelicolor* M145. La producción de dos antibióticos coloridos fácilmente cuantificables, aunado al conocimiento de que la producción de antibióticos se encuentra en estrecha conexión con el ciclo de vida del microorganismo (Liu *et al.*, 2013), hacen a la actinorrodina y la undecilprodigiosina los antibióticos seleccionados para la evaluación de la producción de metabolitos secundarios en el presente trabajo.

#### **4.5 El producto de *sco2127* de *S. coelicolor* y su interacción con otras proteínas.**

En 1982 se reportó el aislamiento de cepas de *S. coelicolor* resistentes a la inhibición de su crecimiento por un análogo de la glucosa llamado 2-desoxiglucosa (Dog). Durante el primer paso de la glucólisis, la Dog se transforma en Dog-6-P, un compuesto altamente tóxico que no puede ser metabolizado en los pasos siguientes de la vía glucolítica (Hodgson 1982). Las mutantes de *S. coelicolor* resistentes a 2-desoxiglucosa (Dog<sup>R</sup>) son incapaces de utilizar este análogo y presentan una baja o nula actividad de glucosa cinasa (Glk). Además, tanto la síntesis de agarasa como la de glicerol cinasa, en estas mutantes, son insensibles a la represión catabólica por carbono (Carbon Catabolite Repression, CCR) (Kwakman y Postma 1994; Angell *et al.*, 1992).

Estudios de complementación realizados sobre las mutantes Dog<sup>R</sup> demostraron que el gen *glkA* (*sco2126*) es capaz de restablecer la capacidad de utilizar glucosa, así como la actividad de GlkA y, parcialmente, la sensibilidad a CCR. No obstante, al transformar la cepa mutante con un fragmento de ADN que contiene a los genes *glkA* y *sco2127*, además del fenotipo mencionado, la sensibilidad a CCR se restablece hasta niveles semejantes a los de la cepa silvestre, sugiriendo que ambos genes están involucrados en el proceso de CCR (Ikeda *et al.* 1984; Angell *et al.*, 1992).

Con el fin de intentar comprender dicho fenómeno, se comenzó a estudiar al gen *sco2127*. El análisis *in silico* de la secuencia de éste, demostró que no posee motivos de unión a ADN, lo que sugería que su mecanismo de acción podía involucrar la interacción con otras proteínas. Para evaluar esto, la proteína codificada por el gen

*sco2127* fue expresada en *E. coli* y purificada. Ensayos posteriores de pull-down y far-western, identificaron la unión de SCO5113 (BldKB) y SCO2582 con SCO2127 (Chávez *et al.* 2011). BldKB, es una lipoproteína que pertenece a un transportador de tipo ABC involucrado en la formación de micelio aéreo (Shin *et al.*, 2007) y, además, es responsable de la captación del oligopéptido morfógeno Bld261, el cual funge como molécula de señalización extracelular para dar inicio a la cascada de diferenciación morfológica en *S. coelicolor* (Nodwell *et al.*, 1996).

#### 4.6 El producto de expresión de *sco2582*

De acuerdo con la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=M48>), la proteína SCO2582 está anotada como una metaloendopeptidasa putativa de membrana con función desconocida. Su secuencia de aminoácidos presenta homología (99 % de identidad) con una proteasa dependiente de zinc con función de chaperona de *Streptomyces lividans* 1326. Las proteasas pertenecientes a esta familia pueden coordinar de forma tetraédrica a un ion de zinc mediante dos histidinas localizadas dentro del motivo HEXXH. Este motivo fue encontrado dentro de la secuencia de SCO2582, el cual la identifica como parte de la superfamilia M48 de peptidasas (Jongeneel *et al.*, 1989). Al realizar un análisis de similitud, por medio de DELTA-BLAST, entre la proteína SCO2582 y otras proteínas contenidas en la base de datos PDB (Protein DataBase) las proteínas con mayor similitud son, sobre todo, peptidasas dependientes de zinc y algunas proteínas de choque térmico. Como resultado de estas observaciones, Chávez *et al.* (2011) propusieron que SCO2582 podría encargarse del procesamiento y maduración del oligopéptido morfógeno Bld261, el cual debe ser internalizado por la permeasa BldK de *S. coelicolor*.

Con base en procesos descritos en otros microorganismos que también utilizan proteasas para la exportación, procesamiento, modificación de la actividad y degradación proteica (Gottesman 1999), es posible presumir que SCO2582 se encargue del procesamiento y maduración de algún péptido involucrado en alguna vía de señalización extracelular



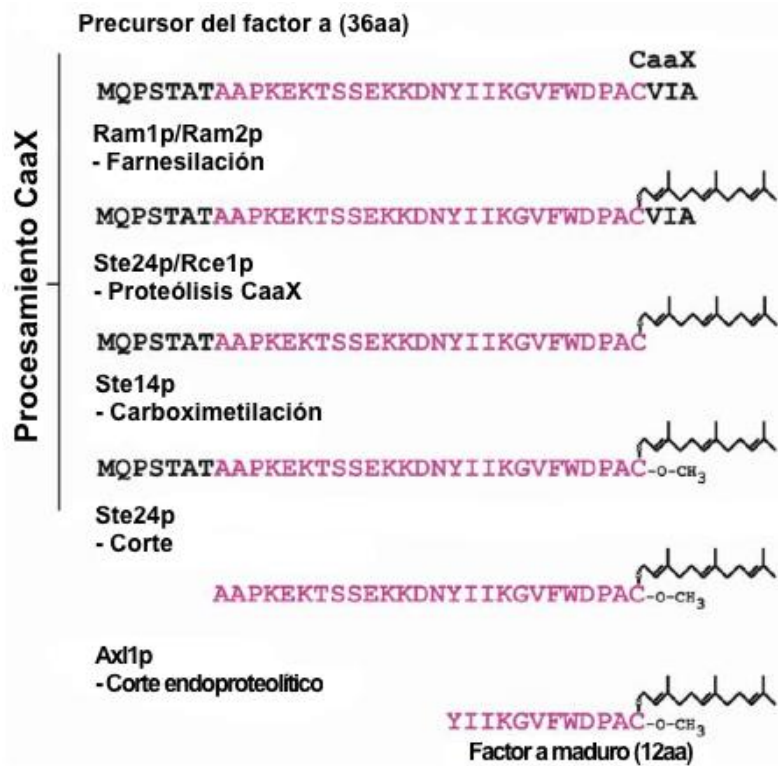
#### **4.7 Proteasas**

Las proteasas, o peptidasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, lo que conduce a la ruptura de sustratos. Se encuentran presentes en todos los organismos vivos, donde muestran una variedad de funciones fisiológicas que van desde la degradación generalizada de proteínas, hasta procesos más específicos y regulados tales como el transporte de proteínas secretoras a través de las membranas (Wandersman, 1989). Las proteasas pueden ser exopeptidasas, cuyas acciones se encuentran dirigidas hacia los extremos amino (aminoexopeptidasa) o carboxilo terminal (carboxiexopeptidasa), o endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos. A su vez, las endopeptidasas pueden dividirse en cinco grupos, dependiendo del residuo en el sitio activo o del ion que lleva a cabo a la catálisis, por ejemplo: serina, treonina, cisteína, aspártico o metaloproteasas (Webb, 1984; Ehrmann y Clausen, 2004).

Las proteasas intracelulares de procariotas son altamente específicas y se encuentran involucradas en distintos procesos biológicos, tales como la remoción de péptidos señal de proteínas recién sintetizadas, la activación de precursores inactivos, la inactivación de proteínas reguladoras, y la degradación de proteínas anormales o extrañas (Wandersman, 1989). Una amplia gama de bacterias también secreta proteasas al medio extracelular. Algunas de estas proteasas son toxinas o factores involucrados en la virulencia, mientras que otros presentan baja especificidad y degradan proteínas para producir pequeños péptidos y aminoácidos que pueden ser, eventualmente, transportados y utilizados en alguna vía metabólica. Las proteasas extracelulares son sintetizadas como precursores inactivos con un segmento de polipéptido adicional (propéptido) que se encuentra ausente en la proteína madura. Los propéptidos tienen diferentes longitudes y localizaciones dentro del precursor y, además de mantener a la proteasa en un estado inactivo, puede promover el plegamiento correcto de la proteasa, alterar su especificidad, actuar como un ancla membranal, o jugar un papel en el proceso de secreción (Wandersman, 1989; Gottesman 1999).

#### 4.7.1 La peptidasa modelo de la familia M48

La proteína Ste24p es la peptidasa modelo de la familia M48, de acuerdo con la base de datos MEROPS, y es una feromona peptídica involucrada en la fusión celular (*mating*) de las levaduras. Este proceso involucra otras dos feromonas, designadas como factores de fusión  $\alpha$  y  $\beta$ . Cada uno de estos factores es secretado por un tipo distinto de células haploides, las cuales se fusionan para dar lugar a una célula diploide. Dos de los cuatro procesamientos proteolíticos involucrados en la maduración del factor de fusión  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* pueden ser realizados por Ste24p. El primero es la eliminación de la secuencia CaaX (C: cisteína, a: aminoácido alifático, X: cualquier aminoácido) en el extremo C-terminal y, posteriormente, la proteólisis en el sitio STATA en el extremo N-terminal (**Figura 4**) (Pryor *et al.*, 2013).



**Figura 4. Mecanismo propuesto para la maduración del factor  $\alpha$  en *Saccharomyces cerevisiae*. Modificado de Pryor *et al.* (2013).**

La estructura central de Ste24p es un anillo de siete hélices transmembranales que forman una cavidad voluminosa localizada, prácticamente en su totalidad, en el interior de la membrana. Esta cavidad contiene al sitio activo y el surco de unión a sustrato, además del motivo de unión a zinc HEXXH (Pryor *et al.*, 2013).

#### **4.8 La diferenciación morfológica en *S. coelicolor* está mediada por proteasas**

Se ha propuesto que el desarrollo morfológico de los estreptomicetos está influenciado por una cascada proteolítica extracelular que contempla la inhibición de serín proteasas por distintos inhibidores de proteasas extracelulares. En *S. coelicolor*, el gen *sco0762* codifica para el inhibidor de proteasas extracelulares denominado STI (*Streptomyces* Trypsin Inhibitor). Sin embargo, el papel que representan, así como las complejas interacciones de proteasas e inhibidores de proteasa durante la diferenciación en *Streptomyces* no se han caracterizado a nivel molecular, y la conexión entre los eventos intracelulares y extracelulares no se ha logrado explicar del todo.

En otro estudio (Kim *et al.* 2008) se demostró *in vitro* la capacidad de la proteína SCO5913 para degradar a STI. Adicionalmente, se observó un incremento en la actividad inhibitoria de STI en la mutante  $\Delta$ *sco5913* de *S. coelicolor*, la cual presentó un retraso en el desarrollo morfológico y en la producción de ACT. En contraste, una cepa sobreproductora de SCO5913 mostró disminución de la actividad de STI y un desarrollo anticipado. Estas evidencias sugieren que el proceso de inactivación de STI tiene importantes consecuencias para la sincronización y la progresión del desarrollo. No obstante, estos autores advierten sobre la posibilidad de que exista al menos una proteasa más involucrada en el proceso de inactivación de STI, pues incluso en la mutante  $\Delta$ *sco5913* se observa una lenta disminución gradual de STI dando como resultado la aparición de micelio aéreo.

## 5. HIPÓTESIS

Si el producto de expresión del gen *sco2582* interviene en el procesamiento de péptidos involucrados en la producción de micelio aéreo, entonces la eliminación del gen *sco2582* afectará negativamente el desarrollo de la cepa, así como la producción de pigmentos en *S. coelicolor*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la eliminación del gen *sco2582* sobre el crecimiento y producción de pigmentos en *S. coelicolor*.

### 6.2 Objetivos particulares

- Obtener la mutante  $\Delta$ *sco2582* de *S. coelicolor*.
- Analizar la morfología de la mutante y la cepa silvestre M145 en medio sólido.
- Verificar el efecto de la eliminación del gen *sco2582* sobre los parámetros cinéticos de crecimiento y sobre la producción de los pigmentos modelo (ACT y RED) en cultivos líquidos.

## 7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 7.1 Cepas y plásmidos

En la **Tabla 1.** se indican las cepas y plásmidos utilizados durante el desarrollo del trabajo experimental.

**Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados**

Nombre	Genotipo relevante	Referencia
<b>Plásmidos</b>		
pIJ773	<i>oriT</i> (RK2), <i>aac(3)IV</i> , sitios FRT	Gust <i>et al.</i> , 2002
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101<sup>ts</sup></i>	Gust <i>et al.</i> , 2002
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4. Plásmido auxiliar en el proceso de conjugación	Paget <i>et al.</i> 1999
<b>Cósmidos</b>		
StC123	Derivado de Supercos1, <i>neo</i> , <i>bla</i> , <i>sco2582</i> . Cósmido con el gen de interés.	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
StC123 <sub>apra</sub>	Derivado de StC123, $\Delta$ <i>sco2582::aac(3)IV</i> . Cósmido con el gen interrumpido.	Este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rK</i> -, <i>mK</i> +) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	New England Biolabs
BW25113	Derivado de K12: $\Delta$ <i>araBAD</i> , $\Delta$ <i>rhaBAD</i> $\lambda$ -Red ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101<sup>ts</sup></i> . Para mutagénesis PCR dirigida	Gust <i>et al.</i> , 2002
ET12567	F-, <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i> . Cepa no metilante	Kieser <i>et al.</i> , 2000
<b><i>S. coelicolor</i></b>		
M145	SCP1-, SCP2-, protótrofo	Kieser <i>et al.</i> , 2000 Bentley <i>et al.</i> , 2002
$\Delta$ 2582	M145/ $\Delta$ <i>sco2582::aac(3)IV</i> . Cepa con el gen interrumpido.	Este trabajo
$\Delta$ 2582 <sub>comp</sub>	M145/ $\Delta$ <i>sco2582::aac(3)IV/sco2582HT</i> . Mutante $\Delta$ <i>sco2582</i> complementada con el gen <i>sco2582</i> con cola de histidinas	Este trabajo

### 7.2 Construcción de la mutante $\Delta$ *sco2582* de *S. coelicolor*

Para obtener la mutante del gen *sco2582*, se utilizó un método denominado PCR-Targeting, disponible comercialmente como REDIRECT® (**Figura 5**) (Gust *et al.*, 2002).

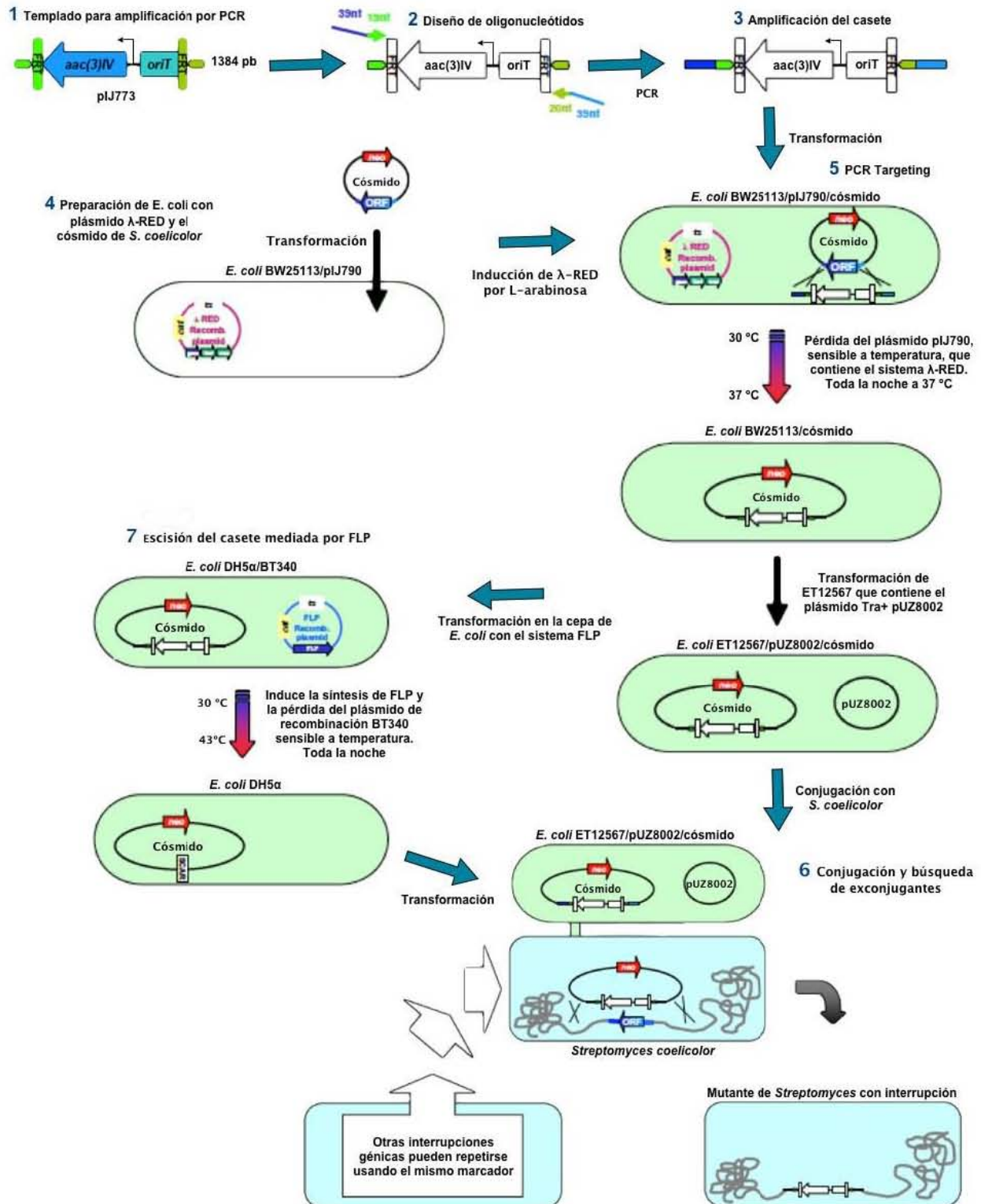


Figura 5. Diagrama general del método de sustitución génica (*PCR targeting*) en *Streptomyces* mediante recombinación homóloga (Modificado de Gust *et al.*, 2002).

Dicho método consiste, básicamente, en la recombinación homóloga que permite el intercambio del gen blanco por un casete de resistencia a antibiótico, apramicina en este caso.

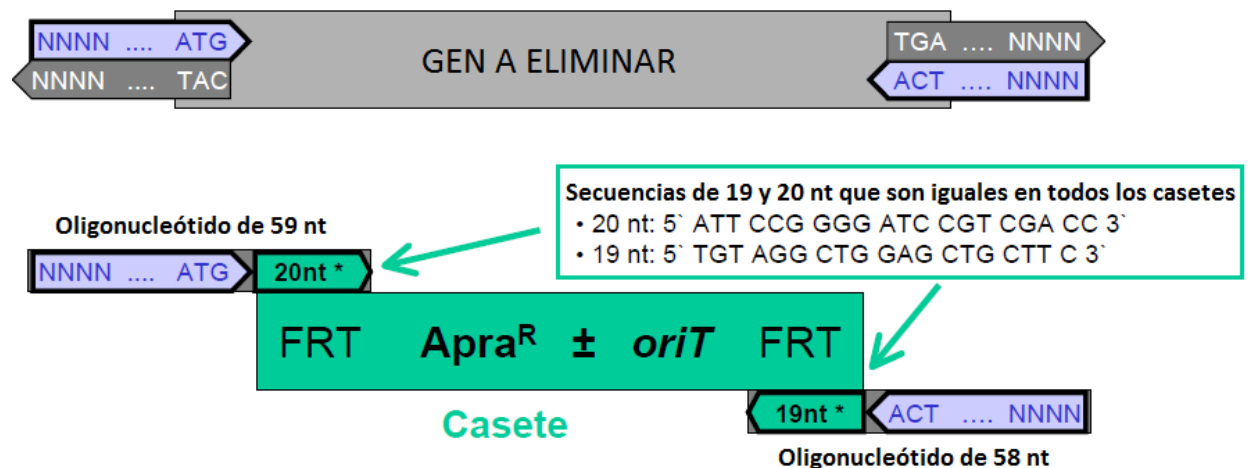
Para este fin, se requieren secuencias homólogas flanqueantes al gen que se desea eliminar. Estas secuencias se obtuvieron del cósmido StC123 de *S. coelicolor*, el cual forma parte de la biblioteca de cósmidos de esta especie (Redenbach *et al.*, 1996), y contiene el gen *sco2582*. También requiere de un casete de resistencia a apramicina [*aac(3)IV*], para seleccionar las clonas con el gen eliminado, y el diseño de un par de oligonucleótidos que permitan obtener al casete de resistencia extendido. Esto se lleva a cabo por medio de secuencias homólogas que promuevan el primer evento de recombinación, entre el casete extendido y el cósmido silvestre, en la cepa *E. coli*. BW25113/pIJ790. El plásmido pIJ790 permite dicho evento de recombinación, pues contiene los genes del sistema  $\lambda$ -RED (*gam*, *bet*, *exo*), además de un gen de resistencia a cloranfenicol y un inicio de replicación termosensible; motivo por el que debe ser incubada a 29 °C. Una vez obtenido el cósmido mutado, es necesario introducirlo en la cepa *E. coli*. ET12567/pUZ8002. Esta cepa, al presentar deficiencias en algunos sistemas de metilación, permite evitar el potente sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor*, que degrada ADN metilado al reconocerlo como exógeno. Además, el plásmido auxiliar pUZ8002 permite llevar a cabo la conjugación intergenética con *Streptomyces*.

- **Obtención del casete de resistencia**

El plásmido pIJ773 se extrajo mediante lisis alcalina de una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , seleccionada por su resistencia a ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Posteriormente, se digirió con *Hind*III y *Eco*RI. El producto liberado corresponde con el casete que contiene el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV*, un *oriT* (RK2), y los sitios FRT (Flippase Recognition Target).

- **Diseño de oligonucleótidos y obtención del casete extendido de resistencia a apramicina**

Los oligonucleótidos se diseñaron con el fin de presentar una región homóloga al cósmido StC123 de *S. coelicolor*, que contiene al gen *sco2582*, y otra región homóloga al casete de resistencia a apramicina (**Figura 6**). Los extremos 5' (58 o 59 nt) de ambos oligonucleótidos son complementarios con las regiones río arriba y río abajo de *sco2582*, mientras que las regiones 3' (19 o 20 nt) lo son con los extremos del casete de resistencia. Estos oligonucleótidos permiten la obtención del casete extendido que permitirá realizar la recombinación homóloga.



**Figura 6. Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar el casete de resistencia a apramicina. Modificado de Gust *et al.*, 2002.**

- **Amplificación del casete de resistencia a apramicina**

En las **Tablas 2 y 3** se muestran las condiciones de amplificación utilizadas para obtener el casete de resistencia a apramicina por medio de PCR.



**Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR para amplificar el casete de resistencia.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	22.8 µL	-
Buffer (10x) Expand High Fidelity PCR System, Roche	5 µL	1 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL	1.5 mM
dNTP (10 mM) Set, Invitrogen	1 µL	0.2 mM
Sc2582_FWD (10 µM)	5 µL	1 µM
Sc2582_REV (10 µM)	5 µL	1 µM
DMSO (100%)	2.5 µL	5%
Templado de ADN plasmídico, pIJ773 (20 ng/µL)	5 µL	100 ng
ADN Polimerasa (3.5 U/µL) Expand High Fidelity	0.7 µL	2.5 U
<b>Total</b>	<b>50 µL</b>	<b>-</b>

**Tabla 3. Condiciones para la reacción de PCR para amplificar el casete de resistencia.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
	<i>10 ciclos</i>	
Desnaturalización	94 °C	45 s
Alineamiento	<b>50 °C</b>	45 s
Extensión	72 °C	90 s
	<i>15 ciclos</i>	
Desnaturalización	94 °C	45 s
Alineamiento	<b>55 °C</b>	45 s
Extensión	72 °C	90 s
Extensión final	72 °C	5 min

El casete extendido fue purificado de banda por medio del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

- **Transformación del cósmido StC123 en *E. coli* BW25113/pIJ790**

El cósmido StC123 (kan<sup>R</sup>) fue transformado en células electrocompetentes de *E. coli* BW25113/pIJ790. El plásmido pIJ790 (cat<sup>R</sup>) contiene un origen de replicación sensible a temperatura (activo a 30°C), además de los genes que codifican para la maquinaria de recombinación del bacteriófago λ (*gam*, *beta* y *exo*).

- **Transformación del casete extendido en *E. coli* BW25113/pIJ790/StC123**

Las transformantes donde ocurrió el reemplazo exhibieron resistencia a cloranfenicol y kanamicina. Se cultivaron células de *E. coli* BW25113/pIJ790/StC123 en medio SOB con ampicilina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) y 10 mM de L-arabinosa, a 29 °C, para preparar células electrocompetentes. En ellas se introdujo el casete extendido, por medio de electroporación, con el propósito de reemplazar el gen *sco2582* de StC123 por el marcador de resistencia a apramicina *aac(3)IV*. La incubación se realizó a 37 °C para favorecer la pérdida del plásmido pIJ790, y se seleccionaron en medio LB con ampi (100 µg/mL), kan (50 µg/mL), apra (50 µg/mL). De esta forma se obtuvo una cepa con el fenotipo ampi<sup>R</sup>, kan<sup>R</sup> y apra<sup>R</sup>, las cuales contenían al cósmido mutado StC123  $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV*.

- **Transformación del cósmido mutado en *E. coli* ET12567/pUZ8002**

Se verificó la identidad del cósmido StC123  $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV* por medio de un ensayo de restricción con la enzima *Pst*I y posteriormente fue transformado en células electrocompetentes de la cepa no metilante *E. coli* ET12567/pUZ8002 (apra 50 µg/mL, kan 50 µg/mL, cat 25 µg/mL). Este paso es esencial debido al sistema de restricción de *Streptomyces* que degrada material genético metilado por *dam-13*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdS*. Además, el plásmido pUZ8002, un derivado de RK2, puede suministrar las funciones de transferencia a plásmidos que contengan *oriT*, sin embargo, no es transferido él mismo de manera eficiente debido a una mutación en su propio *oriT*.

- **Conjugación intergenética**

En este proceso participa tanto la cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002/StC123  $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV*, como la receptora, *S. coelicolor* M145. Las esporas de *Streptomyces* son sometidas a un choque térmico de 50 °C por 10 minutos para estimular la germinación y, una vez frías, son mezcladas con la suspensión de *E. coli* para que ambas cepas entren en contacto. La mezcla es centrifugada y resuspendida

en 100  $\mu$ L de agua. Posteriormente, se realizan diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  en un volumen final de 1000  $\mu$ L. Finalmente, cada dilución se extiende en una placa de agar MS +  $MgCl_2$  10 mM, sin antibióticos (anexo), y son incubadas a 29 °C de 16 a 20 horas.

Una vez transcurrido dicho tiempo, se realiza un *overlay*, que consiste en extender, sobre cada placa, 1 mL de agua que contiene una concentración de 25  $\mu$ g/mL de ácido nalidíxico, para eliminar selectivamente a *E. coli* y 50  $\mu$ g/mL de apramicina para seleccionar las exconjugantes. La incubación se mantiene a 29 °C de cinco a siete días más. Las colonias exconjugantes se sembraron en medio NA + apramicina (50  $\mu$ g/mL) con y sin kanamicina (50  $\mu$ g/mL) (anexo) con el fin de confirmar el fenotipo buscado *apra*<sup>R</sup> *kan*<sup>S</sup>. Aquellas colonias con sensibilidad a kanamicina se estiraron en MS + apramicina (50  $\mu$ g/mL) para confirmar la resistencia y promover la esporulación. Finalmente, se realizó una PCR de colonia con Thermo Scientific® Phire® Plant Direct PCR Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor.

▪ **Confirmación de la mutante  $\Delta$ sco2582 de *S. coelicolor***

Se obtuvo el ADN genómico de la cepa mutante por medio de FastDNA® SPIN Kit for Soil DNA Extraction y se realizó nuevamente una PCR con las mismas condiciones de la PCR de colonia (Phire®), y con la cepa silvestre como control. El amplicón obtenido para la cepa mutante en la PCR de confirmación fue purificado de banda por medio de kit (Promega) y secuenciado (Laragen, Inc) con el oligonucleótido StC123iFWD8272 para corroborar su identidad.

Las **Tablas 4 y 5** muestran la mezcla y las condiciones de reacción de PCR, respectivamente.

**Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR de confirmación.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	6.2 $\mu$ L	-
2x Phire Plant PCR Buffer (Contiene dNTP y MgCl <sub>2</sub> ),	10 $\mu$ L	1 x
StC123iFWD8272 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
StC123iREV8273 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
DMSO (100%)	1 $\mu$ L	5%
Templado de ADN genómico	*	
Phire® Hot Start II DNA Polimerase, Thermo Scientific	0.3 $\mu$ L	-
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	<b>-</b>

\*Volumen de cada templado utilizado en la reacción.

<b>Control</b>	<b>*Volumen</b>	<b>Tamaño del amplicón</b>
Positivo (PCR de colonia Phire)	0.5 $\mu$ L	1733 pb
Silvestre (ADN genómico M145)	0.25 $\mu$ L	1567 pb
<b>Mutante</b> (ADN genómico de $\Delta$ sco2582::aac(3)/V)	1.0 $\mu$ L	<b>1733 pb</b>

**Tabla 5. Condiciones para la reacción de PCR de confirmación.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	98 °C	5 min
	<i>10 ciclos</i>	
Desnaturalización	98 °C	1 s
Alineamiento	65.8 °C	5 s
Extensión	72 °C	30 s
Extensión final	72 °C	1 min

### 7.3 Cinéticas de crecimiento de las cepas *S. coelicolor* M145 y $\Delta$ sco2582

- **Obtención de stocks de esporas**

Una vez confirmada la mutación, se propagaron las cepas en placas de MS sin antibiótico, y con apramicina (50  $\mu$ g/mL), para la cepa silvestre y mutante, respectivamente, hasta observar un césped de esporas (entre siete y 10 días). Pasado ese tiempo, se realizó la cosecha y una titulación de esporas viables. A partir de los

stocks titulados, se tomaron alícuotas con aproximadamente  $200 \times 10^6$  esporas y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Preinóculos**

Para iniciar los cultivos de cada cepa (silvestre y mutante), se inoculó una alícuota con  $200 \times 10^6$  esporas en un matraz de 250 mL, con baffle bajo, en un volumen de 50 mL de medio NMMP (anexo). Para evitar la interferencia de asimilación de fuentes de carbono que puede deberse a los componentes de los medios complejos, y se suplementaron con fructosa 27.75 mM, se cultivaron a  $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm y se realizó una cinética para identificar la fase exponencial de cada cultivo.

- **Caracterización fenotípica en medio sólido**

Para asegurar que las cepas se encontraban en el mismo estado de crecimiento, este experimento se realizó a partir de preinóculos tomados a la mitad de la fase exponencial de cada uno. Para lo cual, los cultivos crecidos se centrifugaron a  $14\ 000 \times g$ , se lavaron dos veces con una solución de NaCl 0.85 % fría, y el botón resultante se resuspendió en 5 mL de la misma solución, y se mantuvo en hielo. Los medios sólidos utilizados fueron MS, NA, YM, R2YE, R5, MM y NMMP (anexo). Exceptuando los medios MS y NA, todos se suplementaron con glucosa y fructosa (27.75 mM de cada uno). Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensión (una por cada cepa) sobre una placa de agar procurando que se encontraran a una distancia que les permitiera crecer sin interferir la una con la otra. La incubación se realizó a  $29\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se tomaron fotografías cada 24 h por 13 días.

- **Cinéticas de crecimiento**

Las cinéticas se realizaron en matraces de 250 mL, con baffle bajo, en un volumen de 50 mL de medio NMMP, suplementados con glucosa y fructosa (27.75 mM de cada uno). Se iniciaron a partir de los preinóculos a la mitad de la fase exponencial. Un

mililitro de la suspensión fue adicionado a cada matraz y se tomaron muestras a las 0, 16, 24, 48 y 72 horas. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada una de las cepas.

#### ▪ **Determinación de biomasa por el método de peso seco**

Para realizar la determinación, se usaron discos de papel filtro Whatman® Grade 1 (55 mm diámetro) llevados a peso constante, 65 °C por 48 horas. Posteriormente, se tomaron muestras de 5 mL del cultivo a las 0, 16, 24, 48 y 72 horas y se filtraron al vacío con el sistema Millipore® sobre los discos de papel. La biomasa obtenida es secada y pesada en las mismas condiciones.

#### ▪ **Determinación de metabolitos secundarios**

##### **Actinorrodina**

1. Tomar 1000 µL de cultivo total y adicionar 500 µL de KOH 3 N.
2. Incubar en agitación constante toda la noche.
3. Centrifugar a 10 000 x g por tres minutos.
4. Recuperar el sobrenadante en un tubo de vidrio limpio y seco.
5. Realizar las diluciones pertinentes, con KOH 3 N, si fuese necesario.
6. Medir absorbancia a  $\lambda = 640 \text{ nm}$

El coeficiente de extinción molar es  $\epsilon_{640\text{nm}} = 25320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Bystrykh *et al.*, 1996)

##### **Undecilprodigiosina**

1. Tomar 1000 µL de cultivo total.
2. Centrifugar a 10 000 x g por tres minutos.
3. Descartar sobrenadante.
4. Adicionar 1000 µL de metanol ácido (pH 2, HCl) al botón de micelio obtenido.

5. Incubar en agitación constante toda la noche.
6. Centrifugar a 10 000 x g por tres minutos.
7. Recuperar el sobrenadante en un tubo de vidrio limpio y seco.
8. Realizar las diluciones pertinentes, con metanol ácido, si fuese necesario.
9. Medir absorbancia a  $\lambda = 530 \text{ nm}$

El coeficiente de extinción molar es  $\epsilon_{530\text{nm}} = 100500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Hobbs *et al.*, 1990)

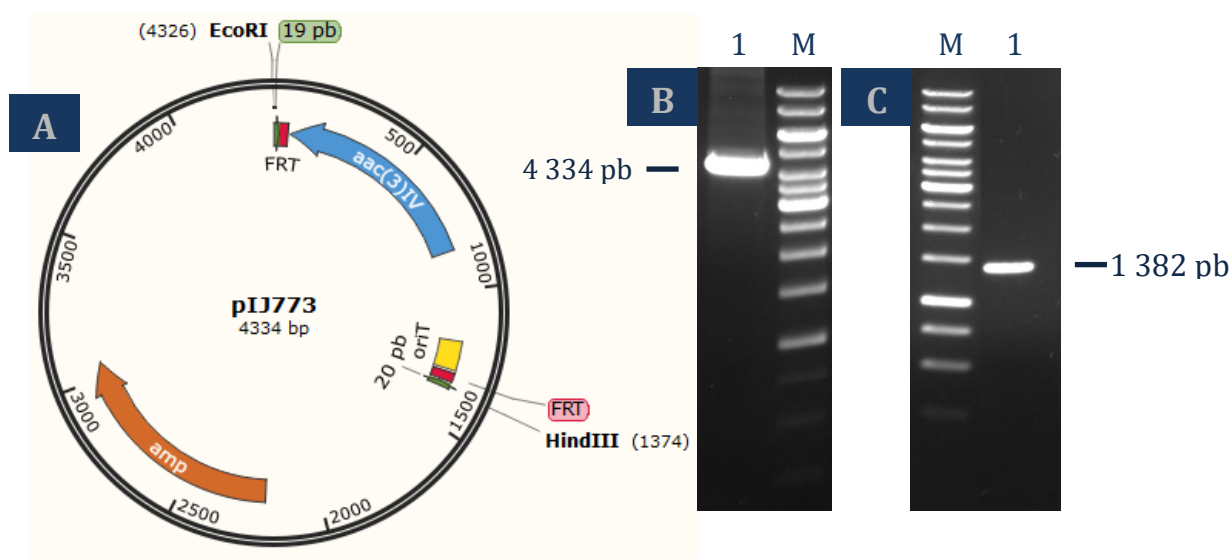
#### **7.4 Búsqueda *in silico* de posibles proteínas blanco del producto de expresión del gen *sco2582***

Se realizó una búsqueda bioinformática por medio de la base de datos de dominios de proteínas, familias y sitios funcionales PROSITE (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>). Esta aplicación se alimenta con la secuencia del motivo de interés, y éste se enfrenta contra una base de datos de secuencias de proteínas, en este caso las de *Streptomyces coelicolor* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Los posibles candidatos fueron objeto de análisis por medio de diferentes bases de datos (<http://biocyc.org/>, <http://merops.sanger.ac.uk/>, <http://www.genome.jp/kegg/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://pfam.xfam.org/>, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención del casete de resistencia

El plásmido pIJ773 se extrajo de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El casete de resistencia a apramicina fue aislado a partir de la digestión con *Hind*III y *Eco*RI (**Figura 7. A**), y se obtuvo un fragmento de 1382 pb que contiene al gen de resistencia a apramicina y el *oriT*, esencial para la conjugación intergenética (**Figura 7. C**). Dicho fragmento se utilizó como ADN molde para la amplificación del casete de resistencia por PCR.



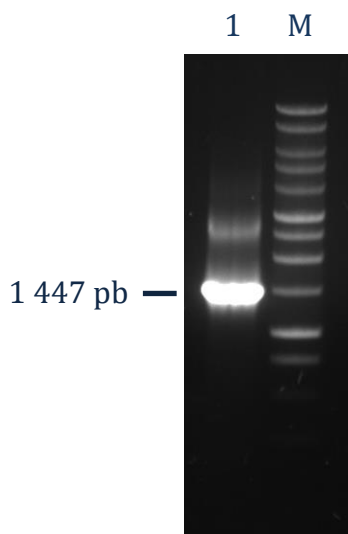
**Figura 7. Representación del plásmido pIJ773 y restricción del casete de resistencia. A.** Mapa del plásmido pIJ773 que presenta al gen de resistencia a apramicina y el *oriT*. **B.** Vector pIJ773 linearizado con *Hind*III. Carril 1: pIJ773 linearizado con *Hind*III. **C.** Casete de resistencia. Carril 1: casete de resistencia a apramicina digerido con *Hind*III y *Eco*RI. M: marcador de peso molecular 1 Kb (Thermo Scientific).

### Amplificación del casete de resistencia

El casete obtenido se utilizó como templado para la PCR, usando los oligonucleótidos Sc2582\_FWD y Sc2582\_REV, con el fin de obtener el casete extendido necesario para la recombinación homóloga en el cósmido StC123. Después de la PCR, se obtuvo una banda de 1447 pb (**Figura 8**). El producto se purificó mediante el kit de Promega. Por



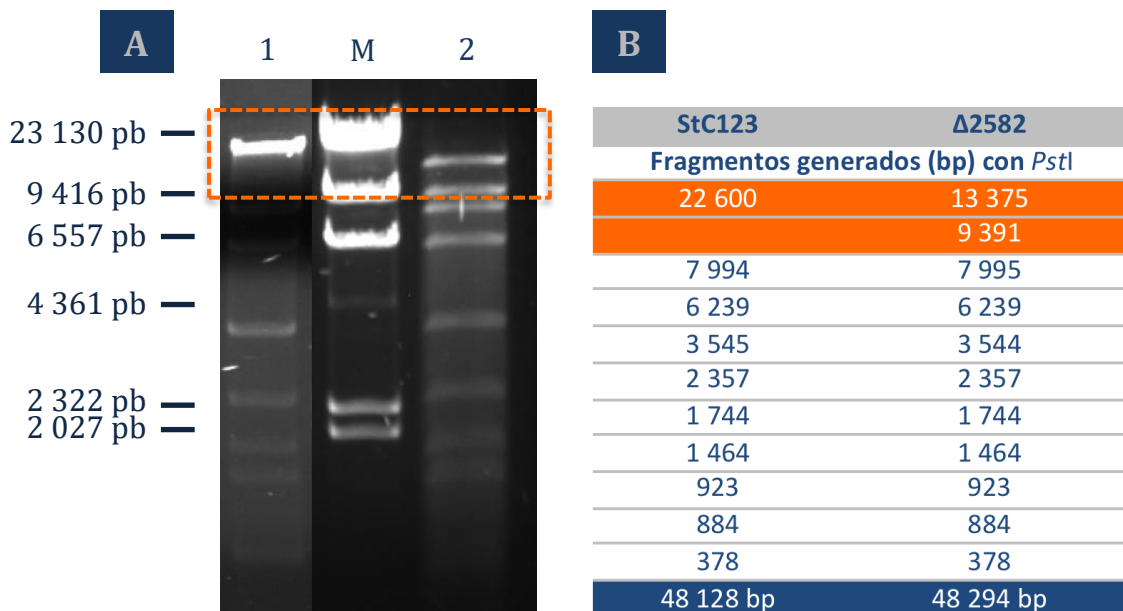
otro lado, después de transformar el cósmido en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 se seleccionaron las candidatas de la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/StC123 que exhibieron el fenotipo *cat*<sup>R</sup> y *kan*<sup>R</sup>. Se eligió una de las candidatas y se transformó con el casete extendido. Se le permitió crecer en medio suplementado con L-arabinosa, con el fin de inducir la expresión del sistema  $\lambda$  RED, necesario para llevar a cabo la recombinación homóloga. Posteriormente se seleccionaron las colonias de *E. coli* con el fenotipo *apra*<sup>R</sup>, *cat*<sup>R</sup> y *kan*<sup>R</sup>, las cuales contenían al cósmido mutado StC123  $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV*



**Figura 8. Producto de PCR del casete extendido.** Gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: Producto de PCR del casete de apramicina extendido con las regiones homólogas añadidas por los oligonucleótidos. M. Marcador de peso molecular 1 Kb (Thermo Scientific)

### **Verificación del reemplazo del gen *sco2582* en el cósmido StC123.**

Con el fin de verificar el reemplazo del gen *sco2582* en el cósmido StC123 se extrajo el cósmido mutagenizado y se sometió a un ensayo de restricción. El patrón de restricción se comparó contra uno generado *in silico* (**Figura 9. B**) por medio del programa Serial Cloner, así como contra el patrón obtenido para el cósmido silvestre. Puede notarse cómo desaparece la banda de 22600 pb correspondiente al cósmido Stc123 y aparecen dos nuevas bandas, una de 13375 pb y otra de 9391 pb, que corresponden con el cósmido mutagenizado (**Figura 9A**).



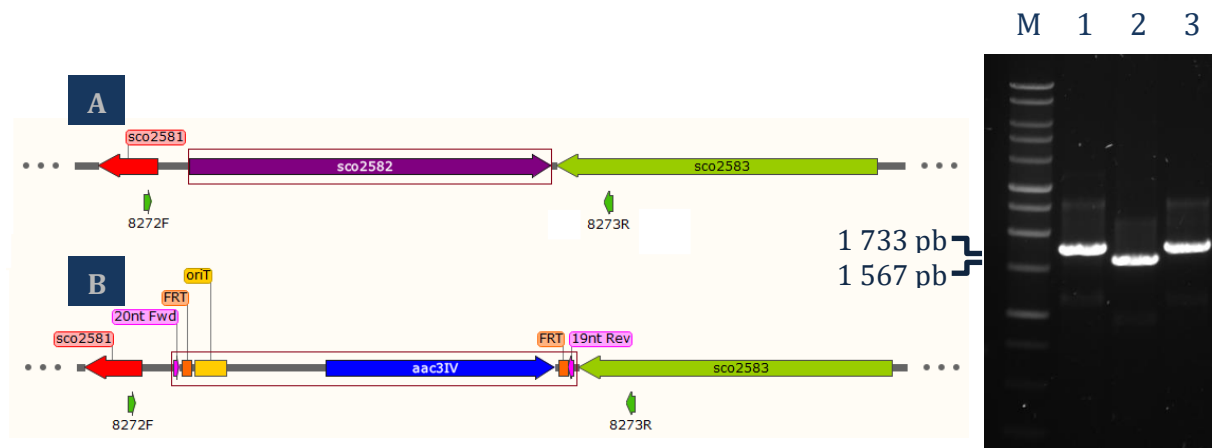
**Figura 9. Patrón de restricción de los cósmidos StC123 y StC123  $\Delta sco2582::aac(3)IV$  usando la enzima *Pst*I. A. Carril 1 Cósmido silvestre. Carril 2. Cósmido mutagenizado M. Marcador de peso molecular *Lambda* DNA/HindIII (Thermo Scientific). B. Comparación de los patrones esperados para las restricciones, generados en el programa Serial Cloner.**

### Conjugación intergenética

Una vez verificada la identidad de StC123  $\Delta sco2582::aac(3)IV$ , este cósmido fue transformado en la cepa no metilante *E. coli* ET12567/pUZ8002 con la finalidad de evitar el sistema de restricción de *Streptomyces*, además de aprovechar las funciones de transferencia dadas por el plásmido pUZ8002. Si la conjugación y recombinación son exitosas, es decir, que el cósmido StC123  $\Delta sco2582::aac(3)IV$  ha realizado el proceso de doble recombinación homóloga con el genoma de *S. coelicolor*, se esperan colonias con el fenotipo  $apra^R kan^S$ , dado que el cósmido mutagenizado presenta el fenotipo  $kan^S$ , sin embargo, se pierde una vez llevada a cabo la recombinación. Como resultado de la conjugación se obtuvieron 60 candidatas, sin embargo, al seleccionarlas por medio de su resistencia a antibiótico, sólo dos de ellas fueron positivas. Además, se realizó una PCR de colonia con Thermo Scientific® Phire® Plant Direct PCR Kit, y se obtuvo la banda esperada de 1426 pb para la cepa mutante.

## Verificación de la mutante *S. coelicolor* $\Delta$ *sco2582::aac(3)IV*

Aquellas candidatas resultantes con el fenotipo *apra*<sup>R</sup> *kan*<sup>S</sup>, y positivas en la PCR de colonia, fueron sujetas a una segunda PCR para confirmar el reemplazo. Para este fin se obtuvo el ADN genómico de la cepa mutante y se realizó nuevamente una PCR con las mismas condiciones de la PCR de colonia (Phire<sup>®</sup>), y con la cepa silvestre como control negativo. Los oligonucleótidos 8272F y 8273R permiten la amplificación de un fragmento de 1567 nt si se trata de la cepa silvestre (M145), y de 1733 nt para el caso de la mutante ( $\Delta$ *sco2582*). El gen *sco2582* tiene un tamaño de 1209 nt, a diferencia del casete de resistencia a apramicina, que comprende 1369 nt. Esta diferencia de 160 nt es apreciable en el gel (**Figura 10**), por lo que el resultado de la PCR permite verificar que la mutación se llevó a cabo.



**Figura 10. PCR de verificación de la cepa mutante usando los oligonucleótidos 8272F y 8273R.** Gel de agarosa al 0.8 %. En A se observa una representación del contexto genético del gen *sco2582* (recuadro) en la cepa silvestre. En B se observa la misma región después del reemplazo del gen por el casete de resistencia (recuadro). En el gel se observan las siguientes bandas: Carril 1. PCR sobre ADN genómico de la cepa  $\Delta$ *sco2582*; Carril 2. PCR sobre ADN genómico de la cepa M145; Carril 3. PCR de colonia (Phire Plant<sup>®</sup>) de la cepa  $\Delta$ *sco2582*; M. Marcador de peso molecular 1 Kb.

## Secuenciación del producto de PCR para verificar la mutante $\Delta$ sco2582::aac(3)IV

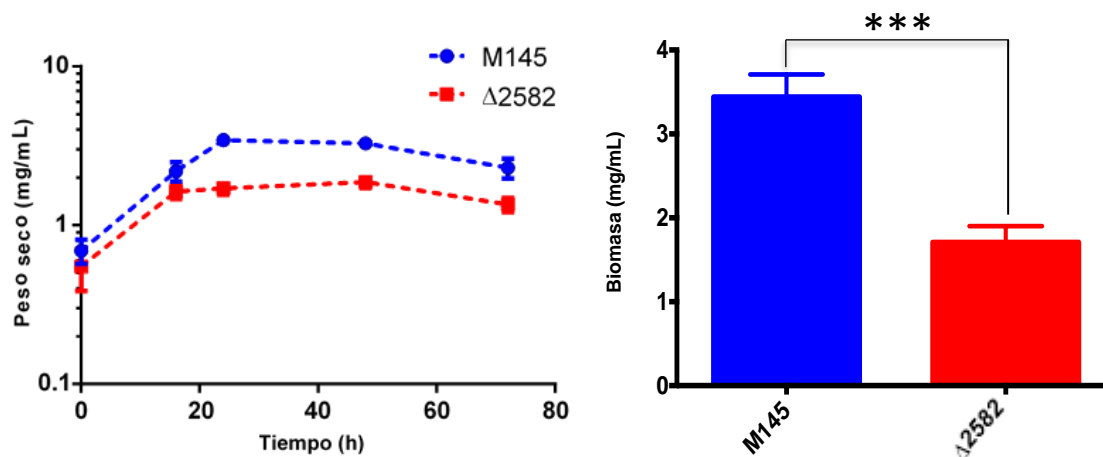
El producto de PCR obtenido para la cepa mutante (**Figura 10. Carril 1**) fue purificado de banda por medio de kit (Promega) y secuenciado (Laragen, Inc) para corroborar su identidad. En la **Figura 11** se puede observar que la secuencia recibida de Laragen, Inc. presenta un 93 % de cobertura y una identidad del 98 % con respecto a la secuencia de la mutante, previamente generada *in silico* utilizando el programa Serial Cloner (**Figura 11A**). El hecho de no presentar un 100 % de identidad puede deberse a la misma reacción de secuenciación, pues la calidad en las regiones inicial y final suele ser baja. Además, al alinearla con la secuencia silvestre, sólo existe homología en la región previa al ATG del gen sco2582 (**Figura 11B**), ya que después de éste comienza la secuencia del casete de resistencia. Con esta evidencia se confirma que el gen *aac(3)IV* se insertó en el genoma de *S. coelicolor* en lugar del gen *sco2582*.

A		Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
		1435 bits(777)	0.0	828/849(98%)	17/849(2%)	Plus/Plus
Query	55	CCTAGGCTGGGCCC	GGCTCGGGGGGCGCAAAGGACCGCACAAGGGTTCGCAAAGACCGTA	114		
Sbjct	6	CCTAGG-TGGG-CCGGCTCGGGGGGCGCAAAGGACCGCACAAGGGTTCGCAAAGACCGTA	63			
Query	115	CGTACGTCCAGGTCACACCTACGCGCATGGGGGAAGAG	ATGATTCCGGGGATCCGTCGAC	174		
Sbjct	64	CGTACGTCCAGGTCACACCTACGCGCATGGGGGAAGAGATGATTCCGGGGATCCGTCGAC	123			
Query	175	CTGCAGTTCGAAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTTCGAAAGTTC	CCGCCAGCCT	234		
Sbjct	124	CTGCAGTTCGAAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTTCGAAAGTTC	CCGCCAGCCT	183		
Query	235	CGCAGAGCAGGATTC	CCCGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAAGGAA	294		
Sbjct	184	CGCAGAGCAGGATTC	CCCGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAAGGAA	243		
B		Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
		174 bits(94)	4e-48	99/101(98%)	2/101(1%)	Plus/Plus
Query	83	CCTAGGCTGGGCCC	GGCTCGGGGGGCGCAAAGGACCGCACAAGGGTTCGCAAAGACCGTA	142		
Sbjct	6	CCTAGG-TGGG-CCGGCTCGGGGGGCGCAAAGGACCGCACAAGGGTTCGCAAAGACCGTA	63			
Query	143	CGTACGTCCAGGTCACACCTACGCGCATGGGGGAAGAG	ATG	183		
Sbjct	64	CGTACGTCCAGGTCACACCTACGCGCATGGGGGAAGAGATG	104			

**Figura 11. Alineamientos realizados con blastn suite. A.** Se muestra un fragmento de la secuencia de la cepa mutante, generada *in silico* (Query), contra la secuencia de la cepa mutante recibida de Laragen, Inc. (Sbjct). **B.** Se muestra un fragmento de la secuencia de la cepa silvestre (Query) contra la secuencia de la cepa mutante recibida de Laragen, Inc. (Sbjct). En ambos casos se indica el ATG del gen *sco2582* en un recuadro.

## Caracterización de la mutante $\Delta sco2582::aac(3)IV$

Se realizaron preinóculos en medio NMMP, para evitar la interferencia de asimilación de fuentes de carbono que puede deberse a los componentes de los medios complejos, y se suplementaron con glucosa y fructosa 27.75 mM. Se realizó una cinética a 29 °C y 200 rpm, por triplicado, con el objeto de caracterizar la fase exponencial de cada una de las cepas, así como evaluar el crecimiento y la biomasa alcanzada por cada una. En la **Figura 12** se pueden observar las cinéticas de crecimiento para ambas cepas, así como una comparación de la biomasa máxima alcanzada para cada una. El resumen del análisis estadístico de estos datos puede verse en la **Tabla 6**. De acuerdo con los resultados, puede afirmarse que no existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre los valores de velocidad de crecimiento entre ambas cepas, es decir, las cepas crecen a la misma velocidad. Sin embargo, no alcanzan la misma biomasa máxima, esto se confirma al verificar la diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre los valores para ambas cepas, apreciándose una reducción de aproximadamente 50 % entre la biomasa de la cepa silvestre respecto a la mutante. El valor de la mitad de la fase exponencial se calculó para tomar los cultivos en el mismo punto de crecimiento en el experimento de comparación fenotípica en medio sólido.



**Figura 12. Cinéticas de crecimiento para ambas cepas y comparación de biomasa.** **Izquierda.** Se muestran las cinéticas de crecimiento en medio NMMP, determinadas por peso seco, con el promedio y desviación estándar, para las cepas silvestre (azul) y mutante (rojo). **Derecha.** Se compara la biomasa máxima alcanzada por ambas cepas.

**Tabla 6. Características cinéticas de crecimiento para las dos cepas.**

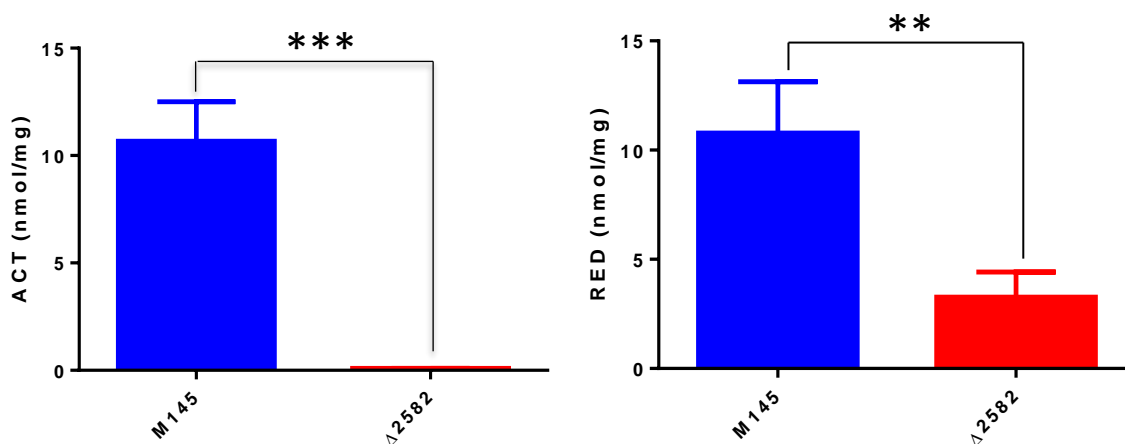
Cepa	Velocidad de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	Mitad de la fase exponencial (h)	Biomasa máxima (mg/mL)
<b>M145</b>	0.0684 ± 0.0089	28	3.440 ± 0.269
<b>Δsco2582</b>	0.0757 ± 0.0266 <sup>a</sup>	20	1.707 ± 0.194 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sin diferencia significativa respecto a la cepa silvestre (Prueba *t* para dos muestras desapareadas. *p* < 0.01)

<sup>b</sup> Diferencia significativa respecto a la cepa silvestre (Prueba *t* para dos muestras desapareadas. *p* < 0.01)

## Cuantificación de pigmentos

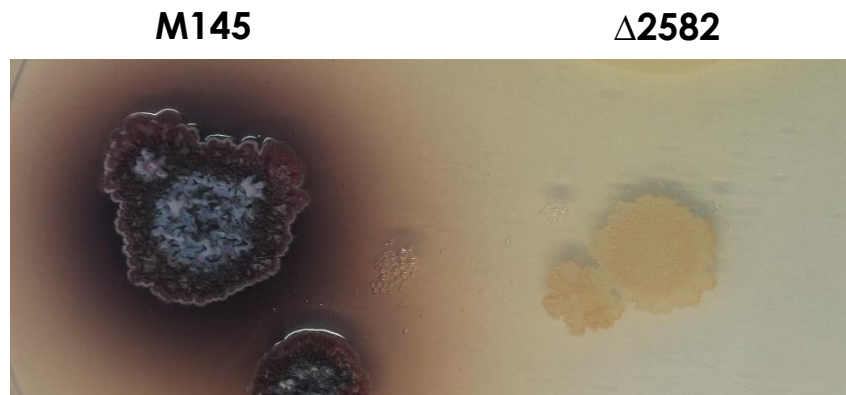
Además del crecimiento, también se evaluó la producción de antibióticos coloridos al punto final de la cinética, es decir, a las 72 h de crecimiento. Respecto a la cepa M145, la mutante Δ2582 mostró una disminución de 99.9 % para la producción de actinorrodina, y de 69.6 % para undecilprodigiosina (**Figura 13**), en ambos casos existe diferencia significativa (Prueba *t* para dos muestras desapareadas. *p* < 0.01), es decir, la eliminación del gen *sco2582* da como resultado una disminución drástica en la producción de antibióticos en la cepa.



**Figura 13. Producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina a las 72 h.** **Izquierda.** Se observa que la producción de actinorrodina se abate prácticamente por completo en la cepa mutante, al conservar únicamente el 0.1 %, respecto a la cepa M145. **Derecha.** La producción de undecilprodigiosina sólo llega a aproximadamente el 30 % en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre.

## Fenotipo en medio sólido

Para asegurar que las cepas se encontraban en el mismo estado de crecimiento, se utilizaron preinóculos de ambas cepas y se tomó el micelio a las 28 y 20 horas, para la cepa silvestre y mutante, respectivamente, tiempo correspondiente con la mitad de la fase exponencial para cada cepa. Una vez lavado el micelio, se colocaron gotas de 10  $\mu$ L de cada suspensión (una por cada cepa) sobre una placa de agar y se incubaron a 29 °C. El medio donde se observó la mayor diferencia fenotípica al punto final (13 días) fue el medio NMMP (**Figura 14**) en el cual se puede apreciar cómo la cepa silvestre presenta producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, pigmentos que confieren la coloración marrón a la colonia; a diferencia de la cepa mutante, en la que no existe presencia de pigmentos difusibles. Además, la colonia de la cepa M145 parece presentar esporulación, al observarse un césped grisáceo en la superficie, lo cual tampoco puede verse en la colonia de la cepa  $\Delta$ sco2582.



**Figura 14. Caracterización fenotípica de ambas cepas en medio NMMP sólido.** Puede apreciarse la afectación a nivel de producción de pigmentos en la cepa mutante ( $\Delta$ sco2582) respecto a la cepa silvestre (M145).

Los resultados de caracterización en medio sólido corresponden con aquellos de la caracterización en medio líquido, y son comparables, dado que las diferencias fueron observadas en el mismo medio mínimo (NMMP). En ambos casos se abatió la producción de actinorrodina, y se redujo de manera importante la de undecilprodigiosina.

## **Búsqueda *in silico* de posibles proteínas blanco del producto de expresión del gen *sco2582***

Con el fin de explicar los resultados obtenidos experimentalmente y basados en la poca información que existe sobre el gen *sco2582*, se desarrolló una búsqueda *in silico* de posibles proteínas blanco de la proteína SCO2582. En primer lugar, se realizó un alineamiento en BLAST para buscar proteínas homólogas, y en Pfam para buscar dominios o familias de proteínas a las que pudiera pertenecer la secuencia en cuestión. La secuencia de aminoácidos del producto de expresión de *sco2582* presentó homología (99 % de identidad) con una proteasa dependiente de zinc con función de chaperona de *Streptomyces lividans* 1326. La proteína SCO2582 está compuesta por 402 aminoácidos y, de acuerdo con la base de datos MEROPS, está reportada como una metaloendopeptidasa putativa de membrana con función desconocida. Por otro lado, con Pfam, se encontró un dominio característico de la familia de peptidasas M48 entre los residuos 75 y 272. Además, es sabido que las proteasas pertenecientes a esta familia contienen el motivo HEXXH (Jongeneel *et al.*, 1989), el cual fue encontrado dentro de la secuencia de SCO2582. Estas evidencias permiten identificar a SCO2582 como parte de dicha superfamilia de peptidasas.

La proteína modelo de la familia M48 de peptidasas es la proteasa Ste24p, una metaloproteasa dependiente de zinc que cataliza dos pasos proteolíticos para la maduración del factor a, el cual es una feromona peptídica involucrada en ciclo sexual de *S. cerevisiae*. La primera proteólisis implica la eliminación de la secuencia CAAX en el extremo C-terminal y, posteriormente, un corte en el sitio STATA en el extremo N-terminal. El motivo CAAX está implicado en la modificación postraduccional al adicionar cadenas de isoprenoides a las proteínas que presentan la secuencia con el objetivo de modular su función. La C corresponde con residuos de cisteína en el extremo C-terminal, la A con residuos alifáticos y la X con cualquier residuo de aminoácido (Pryor *et al.*, 2013). No obstante, no se conoce más sobre el sitio de corte en el extremo N-terminal.

Tomando este mecanismo como modelo, ambos sitios fueron buscados dentro de todas las proteínas presentes en *S. coelicolor*, por medio de la herramienta PROSITE,



con el fin de identificar posibles blancos de SCO2582. Así, se encontraron 13 candidatos para el motivo STATA (**Tabla 7**) y ocho para el motivo CAAX (**Tabla 8**). Sin embargo, se decidió eliminar del análisis todas aquellas proteínas de las que no existiera anotación, tal es el caso de una proteína hipotética en el listado del motivo CAAX (SCO3657) y tres en el del motivo STATA (SCO2260, SCO2260 y SCO5947).

**Tabla 7. Posibles proteínas blanco para la proteasa SCO258 encontradas con PROSITE para el motivo STATA.**

StrepDB	NCBI Ref Seq	Anotación	Longitud (aa)	STATA
SCO0315	NP_624642.1	Probable descarboxilasa	452	167 - 171:
SCO0599	NP_624911.1	Regulador de sig8 (SCO0600 Factor sigma sig8 de la RNA polimerasa)	309	2 - 6:
SCO0608	NP_624920.1	Regulador ScbR-like de unión a $\gamma$ -butirolactona (SlbR) en <i>S. coelicolor</i>	292	134 - 138:
SCO0766	NP_625069.1	$\beta$ -galactosidasa	1028	444 - 448:
SCO0927	NP_625225.1	Regulador transcripcional de la familia LysR	278	257 - 261:
SCO2260	NP_626508.1	Proteína hipotética	265	2 - 6:
SCO3347	NP_627556.1	Proteína hipotética	285	26 - 30:
SCO4265	NP_628437.1	Proteína integral de membrana	503	394 - 398:
<b>SCO5913</b>	<b>NP_630031.1</b>	<b>Serín-proteasa (inhibe a STI)</b>	<b>411</b>	<b>108 - 112:</b>
SCO5947	NP_630064.1	Proteína hipotética	465	386 - 390:
SCO6362	NP_630454.1	Sensor de dos componentes	429	174 - 178:
SCO6784	NP_630856.1	Proteína reguladora	223	9 - 13:
SCO6041	NP_733684.1	Protoporfirinógeno oxidasa	494	97 - 101:

**Tabla 8. Posibles proteínas blanco para la proteasa SCO2582 encontradas con PROSITE para el motivo CAAX.**

StrepDB	NCBI RefSeq	Anotación	Secuencia corte CAAX
SCO1188	NP_625478.1	Proteína secretada (putativa) de unión a celulosa.	CVAP
SCO1465	NP_625746.1	Proteína secretada (putativa).	CGAV
SCO2064	NP_626324.1	Cadena alfa de la ADN polimerasa III.	CLAG
SCO2215	NP_626466.1	Sensor cinasa de un sistema de dos componentes.	CVLS
SCO3657	NP_627851.1	Proteína hipotética.	CGAP
SCO5206	NP_629353.1	Represor sensible a peróxido de hidrógeno.	CAAA
SCO7225	NP_631281.1	Quitinasa secretada.	CAAA
SCO7279	NP_631335.1	Posible proteína de unión a ADN.	CLAA

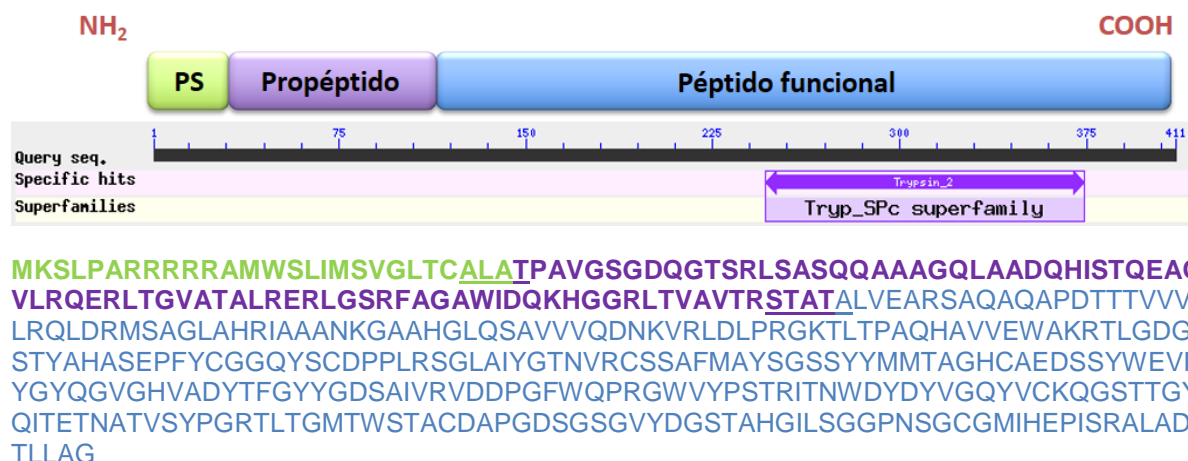
Llamó la atención la secuencia de SCO5913, reconocida como una serín-proteasa extracelular, dado que se encuentra asociada con la inactivación del inhibidor de

proteasas extracelulares (STI), lo cual conlleva a una afectación en progreso del desarrollo colonial (Kim *et al.*, 2006).

Se sabe que las proteasas extracelulares producidas por bacterias Gram-positivas son generadas inicialmente como precursores que contienen una extensión en el extremo amino terminal denominado péptido señal, el cual es removido durante la exportación y maduración de la proteína, y presentan un pro-péptido localizado entre el péptido señal y la proteína madura, es decir, se consideran pre-pro-proteínas (Wandersman, 1989). Por este motivo, se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas, tales como Phobius (Käll *et al.*, 2004), SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) y PSORTb v. 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010), con el fin de buscar péptidos señal dentro de la secuencia de SCO5913. Los resultados indican que existe un péptido señal en la secuencia, y se encuentra entre los aminoácidos 1 y 27 (**Figura 15**).

Normalmente, los péptidos señal juegan un papel crucial en la translocación del precursor a través de la membrana citoplásmica bacteriana, y el pro-péptido parece estar involucrado en el correcto procesamiento y plegamiento (Shimoi *et al.*, 1992). Además, se ha considerado que el procesamiento de las pro-proteasas para generar proteínas maduras se lleva a cabo por medio de un proceso de autoproteólisis, como en el caso de la metaloproteasa neutral Npr de *Streptomyces cacaoi* (Chang and Lee, 1992). Sin embargo, la proteasa SCO5913 tiene una baja similitud con otras proteasas de *Streptomyces* (Kelemen and Buttner, 1998; Kim *et al.*, 2006). Por tal motivo, y al haber encontrado un posible sitio de proteólisis dentro de la secuencia, se propone que la proteína SCO5913 presenta un péptido señal, y una pro-secuencia delimitada por el sitio de corte STATA, tal como se muestra en la (**Figura 15, parte superior**) y que SCO2582, presumiblemente, corta en dicho sitio.

El presunto sitio de corte de SCO2582 sobre SCO5913 se encuentra en el sitio STATA, justo después de la segunda treonina para dejar el péptido maduro libre y que ejerza su función proteolítica sobre STI (**Figura 15, parte inferior**). Cabe resaltar, que la capacidad de la proteína SCO5913 para degradar a STI ha sido demostrada *in vitro*, y se ha sugerido que el proceso de inactivación de STI tiene consecuencias importantes para la sincronización y la progresión del desarrollo (Kim *et al.*, 2008).



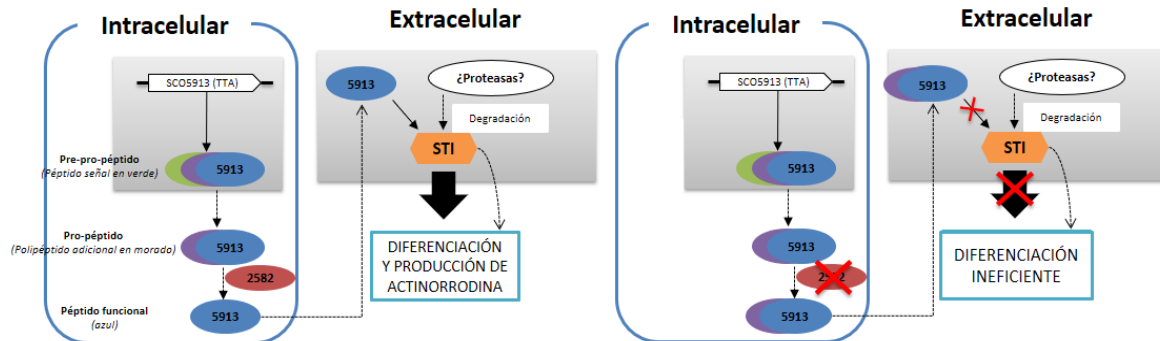
**Figura 15. Representación de la secuencia de SCO5913.** En la parte superior se aprecia un esquema que muestra la región del péptido señal (PS; verde), el propéptido (PP; morado) y el péptido funcional (PF; azul). En la parte inferior se observa la secuencia de la proteína con el mismo código de colores, los posibles sitios de corte aparecen subrayados (ALAT y STATA).

### Posible mecanismo de acción de SCO2582

En este estudio se propone un mecanismo en el que SCO2582 se encuentra involucrada en la maduración de la proteína SCO5913, la cual se produce como una pre-pro-proteasa, por lo que debe ser madurada en dos eventos. El primero es la eliminación del péptido señal, y el segundo podría ser la proteólisis llevada a cabo por SCO2582 (**Figura 16**).

En un reporte previo, SCO5913 fue identificada como sustrato del sistema exportación denominado *Twin arginine translocation* (Tat) (Schaerlaekens *et al.*, 2004), lo cual permite asociar la escisión del péptido señal con las peptidasas señal de tipo I, pues se sabe que sus sustratos son proteínas exportadas al compartimento extracelular por medio de dicho sistema (Paetzel *et al.*, 2002). Así, una vez que el péptido señal es eliminado, SCO2582 podría participar en la proteólisis del pro-péptido para liberar a SCO5913 madura y que ésta pueda degradar a STI, lo cual tendría como consecuencia que las colonias desarrollaran el micelio aéreo de forma eficiente. Por otro lado, en el caso de la mutante que no tiene a SCO2582, la acción de SCO5913 se vería abatida, por lo que STI no sería degradado de manera eficiente, con la consecuente eliminación de la cascada proteolítica, en detrimento tanto de la

diferenciación morfológica como de la producción de ACT. Esto concuerda, fenotípicamente, con los resultados obtenidos para la cepa  $\Delta sco2582$ , en la que tanto el crecimiento, la producción de ACT y la diferenciación morfológica se encuentran sumamente afectados.



**Figura 16. Mecanismo de acción propuesto para SCO2582.** Se aprecia del lado izquierdo la cepa con SCO2582 funcional. El pre-pro-péptido es procesado para generar un pro-péptido. Éste es madurado, presuntamente, por SCO2582 en la membrana, y permite que SCO5913 activo ejerza su función proteolítica sobre STI, logrando que la diferenciación morfológica y producción de ACT sean eficientes. Del lado derecho, se observa la representación de la cepa  $\Delta sco2582$ , en la cual el pro-péptido, presumiblemente, no es madurado por SCO2582, lo cual le impide ejercer su actividad sobre STI, provocando que tanto la diferenciación morfológica como la producción de ACT sean ineficientes.

## 9. CONCLUSIONES

- La interrupción del gen *sco2582* afecta negativamente el crecimiento de *S. coelicolor* M145, tanto en medio líquido como en sólido, con glucosa y fructosa (27.75 mM de cada uno) como fuentes de carbono.
- En la cepa  $\Delta$ *sco2582* disminuye significativamente la producción de pigmentos modelo (ACT y RED) al punto final de las cinéticas realizadas.
- Es posible que el producto de expresión del gen *sco2582* participe en el procesamiento proteolítico de la proteína SCO5913, pues la cepa  $\Delta$ *sco2582* presenta afectaciones en el fenotipo que pueden asociarse al sistema de STI.

## PERSPECTIVAS

- Comprobar la actividad proteolítica de SCO2582 sobre SCO5913 por medio de la interacción *in vitro* de ambas proteínas.
- Obtener la cepa *scar* (reemplazo del gen por una cicatriz de 81 nucleótidos) para evaluar el fenotipo de la cepa sin el gen de resistencia a antibiótico.
- Observar el micelio aéreo, por medio de microscopía electrónica, para verificar si existen cambios morfológicos entre ambas cepas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Angell S, Schwarz E, Bibb MJ. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* **6**(19):2833-44.
- Baltz, RH. (1998). Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* **6**, 76–83.
- Bao K, Cohen SN. (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* **15**, 1518–1527.

- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Nature*. **417**, 141–147.
- Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**(8):2238-44.
- Champness WC. (2000). Prokaryotic development, p. 11-31. En Y. V. Brun and L. J. Skimkets (ed.), *Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Chang PC, Lee YH. (1992). Extracellular autoprocessing of a metalloprotease from *Streptomyces cacaoi*. *J. Biol. Chem.* **267**(6):3952-8.
- Chater KF. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:667-73.
- Chater KF. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361**, 761-768.
- Chávez A, Forero A, Sánchez M, Rodríguez-Sanoja R, Mendoza-Hernández G, Servín-Gonzalez L, Sánchez B, García-Huante Y, Rocha D, Langley E, Ruiz B, Sánchez S. (2011). Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**(3):799-806.
- Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HA. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* **14**(7):313-9.
- Claessen D, Stokroos I, Deelstra HJ, Penninga NA, Bormann C, Salas JA, Dijkhuizen L, Wösten HA. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol. Microbiol.* **53**(2):433-43.
- Clark CA, Moyer JW. (1988). Compendium of sweet potato diseases. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minn.
- Ehrmann M and Clausen T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 709-724.

- Flärdh K, Buttner MJ. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 36-49.
- Fujimura-Kamada K, Nouvet FJ, Michaelis S. (1997). A novel membrane-associated metalloprotease, Ste24p, is required for the first step of NH<sub>2</sub>-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J. Cell. Biol* **136**(2):271-85
- Gomez-Escribano JP, Song L, Fox DJ, Yeo V, Bibb MJ, Challis GL. (2012). Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the *cpk* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chem. Sci.*, **3** 2716-2720.
- Gottesman S. (1999). Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**,142–147
- Gottesman S. (2003). Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**:565-87
- Henderson G, Krygsman P, Liu CJ, Davey CC, Malek LT. (1987). Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3778–3784.
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 272–277
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Flett F and Oliver SG. (1990). Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2291-2296.
- Hodgson DA. (1982). Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2417–2430.
- Hopwood DA. (1988). Towards an understanding of geneswitching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **235**: 121-138.
- Hopwood DA. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* **145**, 2183 – 2202.
- Hopwood DA. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press.

- Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ, Chater KF. (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196**(3):501-7.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M and Omura S (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531.
- Jongeneel CV, Bouvier J & Bairoch A (1989). A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* **242**, 211–214.
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.*, **338**(5):1027-1036.
- Kim DW, Chater KF, Lee KJ, and Hesketh A. (2005). Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187**:2957–2966.
- Kim DW, Hesketh A, Kim ES, Song JY, Lee DH, Kim IS, Chater KF, Lee KJ. (2008). Complex extracellular interactions of proteases and a protease inhibitor influence multicellular development of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **70** 1180-93.
- Kim DW, Kang SG, Kim IS, Lee BK, Rho YT, Lee KJ. (2006). Proteases and protease inhibitors produced in streptomycetes and their roles in morphological differentiation. *J. Microbiol. Biotechnol* **16**: 5–14.
- Kirby R, Sangal V, Tucker NP, Zakrzewska-Czerwinska J, Wierzbicka K, Herron PR *et al.* (2012). Draft genome sequence of the human pathogen *Streptomyces somaliensis*, a significant cause of actinomycetoma. *J. Bacteriol.* **194**, 3544-3545.
- Kwakman JH, Postma PW. (1994). Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **176**(9):2694-8.
- Large KP, Mirjalili N, Osborne M *et al.* (1999). Lipase activity in streptomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 569-575.
- Lee EJ, Cho YH, Kim HS, Ahn BE, Roe JH. (2004). Regulation of  $\sigma^B$  by an anti- and anti-anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress. *J Bacteriol.* **186**:8490–8498.



- Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(1):112-43.
- Long CM, Virolle MJ, Chang SY, Chang S, Bibb MJ. (1987). Alpha-amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases. *J. Bacteriol.* **169**(12), 5745 - 5754.
- Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR. (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* **81**, 836-846.
- Lu S, Kroos L (1994) Overproducing the *Bacillus subtilis* mother cell sigma factor precursor, Pro-sigma K, uncouples sigma K-dependent gene expression from dependence on intercompartmental communication. *J Bacteriol.* **176**(13):3936-43.
- Morosoli R, Bertrand JL, Mondou F, Shareck F, Kluepfel D. (1986). Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. *J. Biochem.* **239**, 587 - 592.
- Nodwell JR, McGovern K, Losick R. (1996). An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **22**(5):881-93.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, **8**:785-786.
- Pryor EE Jr, Horanyi PS, Clark KM, Fedoriw N, Connelly SM, Koszelak-Rosenblum M, Zhu G, Malkowski MG, Wiener MC, Dumont ME. (2013) Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p. *Science.* **339**(6127):1600-4.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapate D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**(1), 77 - 96.
- Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* **9**, 670–675.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sánchez S, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Ávalos M, Guzmán-Trampe S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E, Ruiz B. (2010) Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* **63**(8), 442-459.
- Schaerlaekens K, Van Mellaert L, Lammertyn E, Geukens N, Anné J. (2004). The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. *Microbiology* **50**(Pt 1):21-31.
- Seipke RF, Patrick E, Hutchings MI. (2014) Regulation of antimycin biosynthesis by the orphan ECF RNA Polymerase sigma factor  $\sigma^{\text{AntA}}$ . *PeerJ* **2**, e253.
- Shimoi H, Iimura Y, Obata T, Tadenuma M. (1992). Molecular structure of *Rarobacter faecitabidus* protease I. A yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity. *J. Biol. Chem.* **267**(35):25189-95.
- Shin SK, Park HS, Kwon HJ, Yoon HJ, Suh JW. (2007). Genetic characterization of two S-Adenosylmethionine-induced ABC transporters reveals their roles in modulations of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor* M145. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(11):1818-1825.
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.
- Viollier PH, Weihofen A, Folcher M, Thompson CJ. (2003). Post-transcriptional regulation of the *Streptomyces coelicolor* stress responsive sigma factor, SigH, involves translational control, proteolytic processing, and an anti-sigma factor homolog. *J. Mol. Biol.* **325**(4):637-49.
- Wandersman C. (1989) Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* **3**:1825–1831.
- Webb EG, (1984) Enzyme Nomenclature. New York: Academic Press.
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes, *Bioinformatics* **26**(13):1608-1615

## 11. ANEXOS

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB, a menos de que se mencione un medio distinto, suplementado con el antibiótico correspondiente a 37 °C, o a 29 °C en el caso de las cepas con el plásmido termosensible, y en agitación a 200 rpm.

Para las cepas de *S. coelicolor* se utilizó el medio NMMP, para los cultivos líquidos, a 29 °C y agitación a 200 rpm. Para el caso de los cultivos sólidos se utilizaron los medios NA, MS, YM, R5, R2YE, MM y NMMP

Todas las cepas fueron almacenadas a -70 °C, en glicerol, al 50 % para las cepas de *E. coli*, y al 10 % para las cepas de *Streptomyces*.

### Medios de cultivo

#### **LB (Lysogeny broth)**

Difco Bacto Triptona	10 g
Difco Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1000 mL

#### **2xYT (Yeast Extract Tryptone)**

Difco Bacto Triptona	16 g
Difco Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1000 mL

Sambrook *et al.*, (1989)

#### **YENB (Yeast Extract-Nutrient Broth)**

Difco Extracto de levadura	7.5 g
Caldo nutritivo	8.0 g
Agua destilada	1000 mL

#### **MS (Manitol Soya Agar)**

Harina de soya	20 g
Manitol	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Hobbs *et al.*, (1989)

**NA (Difco Agar Nutritivo)**

---

Difco agar nutritivo	23 g
Agua destilada	1000 mL

---

**YM (Yeast Extract-Malt Extract)**

---

Difco Extracto de levadura	4.0 g
Difco Extracto de malta	10 g
Agua destilada	1000 mL

---

\*Para YMG: con glucosa 555.5 mM

**NMMP (Medio mínimo líquido modificado)**

---

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g
Difco casaminoácidos	5.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6 g
Solución de elementos traza	1.0 mL
Agua destilada	800 mL

**Al momento de usarse**

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.1 M) pH 6.8	150 mL
Fuente de carbono	50 mL
Inóculo de esporas	Denso

---

Hodgson (1982)

**Solución de elementos traza para NMMP**

---

ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> anhidro*	1.0 g
Agua destilada	1000 mL

---

\* 1.32 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

**MM (Medio mínimo)**

---

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agua destilada	950 mL

Ajustar a pH 7.0

**Al momento de usarse**

---

Fuente de carbono	50 mL
-------------------	-------

---

Se utilizó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 gL<sup>-1</sup>) como fuente de nitrógeno para prevenir la confusión causada por la utilización de la asparagina como fuente de carbono.

### **Medio R5 modificado (sin sacarosa)**

K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12 g
Glucosa (55.5 mM)	10 g
Difco casaminoácidos	0.1 g
Extracto de levadura	5 g
MOPS	21 g
Solución de elementos traza	2 mL
Agar	22 g
Agua destilada	1000 mL
Ajustar a pH 6.8 con KOH 3M	

### **Solución de elementos traza para R5**

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	10 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10 mg
Agua destilada	1000 mL

### **Medio R2YE**

Sacarosa	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.12 g
Glucosa (55.5 mM)	
Difco casaminoácidos	0.1 g
Extracto de levadura	5 g
MOPS	21 g
Solución de elementos traza	2 mL
Agar	22 g
Agua destilada	1000 mL
Ajustar a pH 6.8 con KOH 3M	

(Okanishi *et al.*, 1974; Hopwood y Wright, 1978)

### **Medio SOB**

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> anhidro	2.4 g
KCl	186 mg
Agua destilada	1000 mL
Ajustar a pH 7.0 con NaOH	

Para preparar el medio **SOC (SOB + glucosa)**, adicionar una solución de glucosa filtrada para dar una concentración final de 20 mM.

### **Protocolo para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli***

1. Picar con un palillo una colonia de la cepa e inocular en 3 - 5 mL de medio YENB en un tubo de 16 x 150 mm e incubar a 37 °C y 200 rpm toda la noche.
2. Inocular 50 mL de medio YENB contenido en un matraz bafleado de 500 mL con 250-50 µL del cultivo saturado e incubar a 37 °C y 200 rpm.
3. Preparar las centrífugas a 4 °C. Así como las camisas de la centrífuga, el agua, el glicerol al 10 % y todos los tubos requeridos.
4. Las células pueden ser cosechadas entre 0.5-0.6 OD<sub>600</sub> nm. Antes de cosecharlas, colocar el cultivo en hielo por 10 min. Pasar a tubos cónicos de 50 mL y centrifugar a 6 800 x g / 10 min / 4 °C. Decantar para eliminar el medio.
5. Lavar el pellet con 5 mL de agua fría, centrifugar como en el paso anterior y decantar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 5 mL de agua fría y pasar a microtubos de 1.5 mL, centrifugar a 6 800 x g / 3 min / 4 °C, y eliminar el sobrenadante con punta.
7. Realizar un lavado con 500 µL de glicerol al 10 % frío, centrifugar a 6 800 x g / 3 min / 4 °C, y eliminar el sobrenadante con punta.
8. Resuspender cada pellet formado con 30 µL de glicerol al 10 % frío para llegar a un volumen final de 50 µL de suspensión de células competentes.
9. Coloca en hielo seco hasta que se congelen y almacenar a -70 °C.

### **Precipitación de ADN con fenol/cloroformo (1:1)**

1. Si la reacción es menor a 100 µL, completar hasta dicho volumen con agua.
2. Agregar 500 µL (o un volumen) de fenol-cloroformo y dar vórtex 1 min.
3. **CENTRIFUGAR:** 14 000 x g / 10 min / 4 °C.
4. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio y
5. *Repetir desde el paso dos hasta no observar interfase.*
6. **PRECIPITACIÓN:** agregar 0.1 volúmenes de CH<sub>3</sub>COONa 3 M y un volumen de isopropanol; o 0.1 volúmenes de NaCl 1 M y 2.3-2.5 volúmenes de EtOH absoluto.

7. Mezclar por inversión e incubar 30 minutos a temperatura ambiente (en el caso del isopropanol), o a 4 °C (si se utiliza EtOH).

#### 8. **CENTRIFUGAR**

9. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µL de agua ultrapura.

#### 10. **PRECIPITACIÓN**

11. Lavar el pellet con 500 µL de EtOH 70 % y CENTRIFUGAR.

12. Desechar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente o en speed vac.

13. Resuspender el ADN en el volumen deseado.