

03021 1
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA
MODULAR DE LA SINTASA DE NIGERICINA Y SU
PROBABLE CLONACIÓN A PARTIR DE
STREPTOMYCES VIOLACEUS NRRL B-1476

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
JULIO ALBERTO CARRASCO VALLEJO

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MÉXICO, D.F.

FEBRERO

2003



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.



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza
Facultad de Medicina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Julio Alberto Carrasco Vallejo
FECHA: 27-11-03
FIRMA: [Signature]

Dr. Alejandro Cravioto Quintana
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

Por medio del presente le informamos que la tesis: "Predicción de la estructura genética modular de la sintasa de nigrecina y estrategias para su clonación a partir de Streptomyces violaceusniger NRRLB 1476" que presenta el alumno: Julio Alberto Carrasco Vallejo, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

[Signature]
Dra. Gloria Soberón Chávez

[Signature]
Dr. Rafael Carracho Carranza

[Signature]
Dr. Luis Servín González

[Signature]
Dra. María Elena Flores Carrasco

[Signature]
Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

“Predicción de la estructura genética modular de la sintasa de nigericina y su probable clonación a partir de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476”

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mi padre y a mi madre que siempre han estado conmigo apoyándome en cada paso que he dado para concluir mi carrera.

A Nayeli que me ha escuchado reír y llorar durante todos los años que llevo de conocerla.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Luis Servín González por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio.

A mi comité tutorial Dra. Gloria Soberón, Dr. Rafael Camacho, Dra. María Elena Flores y Dra. Laura Camarena por sus sugerencias y opiniones para mejorar este trabajo.

A la Dra. Laura Camarena Mejía por proporcionarme material necesario para esta investigación.

A Gabriela González Cerón por su amistad, paciencia y apoyo durante toda mi estancia en el Instituto.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo y a Verónica Noverón Barreto por su ayuda para que pudiera concluir este trabajo.

A Bernardo Franco Bárcenas por su amistad y paciencia.

A mis amigas Mariana Pérez Escobar y Yetzi Robles Bucio, gracias por escucharme, tranquilizarme, soportarme y darme sus consejos más sinceros sin importar mi estado de ánimo.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Taxonomía del Género <i>Streptomyces</i>	3
2. Hábitat	3
3. Características generales del genoma	4
4. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	4
5. Producción de metabolitos secundarios	6
6. Policétidos	6
6.1 Síntesis de Ácidos Grasos	7
6.2 Síntesis de policétidos	8
7. Sintetas de Policétidos (PKS)	9
7.1 PKS de tipo II	9
7.2 PKS de tipo I	12
7.3 Dominios enzimáticos en los módulos de las PKS de tipo I	14
a) Dominio de β -ceto sintasa (KS)	14
b) Dominio de Acil Transferasa (AT)	15
c) Dominio de proteína Acarreado de Acilo (ACP)	15
d) Dominio de Deshidratasa (DH)	16
e) Dominio de β -ceto reductasa (KR) y enoil reductasa (ER)	16
8. Tipos de Policétidos	16
8.1 Monolactonas	17
8.2 Polienos	18
8.3 Macrólidos inmunosupresores	19
9. Poliéteres	20
9.1 PKS de poliéteres	20
9.2 Estructura química de poliéteres	20
10. Nigericina	23
10.1 Estructura de nigericina	23
10.2 Intermediarios biosintéticos de nigericina	24
II. OBJETIVOS	28
1. Objetivos generales	28
2. Objetivos particulares	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Diseño de Oligos	29
2. Cepas y Plasmidos Utilizados	29
3. Medios y Condiciones de Cultivo	30

3.1	Medios para <i>E. coli</i>	30
3.2	Medios para <i>Streptomyces</i>	30
4.	Purificación de DNA Total	31
4.1	Digestiones de DNA cromosomal	32
5.	Purificación de Plásmidos e y Recuperación de DNA de geles de agarosa	33
5.1	Protocolo para Minipreps	33
5.2	Protocolo para Midipreps	34
5.3	Purificación de Fragmentos de DNA a partir de Gel de Agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP)	35
6.	PCR	36
6.1	Reacción de amplificación en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	36
6.2	Purificación del producto de PCR	36
7.	Southern Blot	37
7.1	Preparación de la sonda para Southern Blot	37
7.1	Protocolo para Southern Blot	37
a)	Gel de Agarosa	37
b)	Transferencia	38
c)	Hibridación	39
d)	Lavados	40
e)	Detección	41
8.	Secuenciación	42
8.1	Preparación del templado para secuenciar	42
9.	Análisis de la Secuencia	42
10.	Conjugación y Transformación	43
10.1	Preparación de Células Competentes de <i>E. coli</i> por SEM	43
10.2	Transformación por SEM	43
10.3	Conjugación	44
10.4	Transformación de <i>Streptomyces</i>	45
11.	Identificación de Antibiótico	46
11.1	Bioensayo para identificar nigericina en sobrenadantes de cultivo	46
11.2	Cromatografía en Capa Fina de nigericina (TLC)	46
IV.	RESULTADOS	48
1.	Predicción de la Estructura Modular de la PKS de Nigericina	48
2.	Características Generales de los Dominios Enzimáticos	48
2.1	Dominio de Proteína Acarreadora de Acilo (ACP)	49
2.2	Dominio de Ceto acil sintasa (KS)	49
2.3	Dominio de Acil Transferasa (AT)	49
2.4	Dominio de Ceto Reductasa (KR)	50
2.5	Dominio de Deshidratasa (DH)	50
2.6	Dominio de Enoil Reductasa (ER)	50

3. Estructura Modular de la PKS de Nigericina	50
3.1 Modulo de Carga	51
3.2 Módulo 1	51
3.3 Módulo 2	51
3.4 Módulo 3	51
3.5 Módulo 4	52
3.6 Módulo 5	52
3.7 Módulo 6	52
3.8 Módulo 7	52
3.9 Módulo 8	53
3.10 Módulo 9	53
3.11 Módulos 10, 11 y 12	53
3.12 Módulo 13	53
3.13 Módulo 14	54
3.14 Dominio de Tioesterasa (TE)	54
4. Formación de la Estructura Final de Nigericina	57
5. Clonación de un Fragmento de PKS Tipo I de <i>Streptomyces violaceusniger</i> NRRL B-1476	63
6. Análisis de Secuencia: Clona N-1	67
6.1 Alineamiento de la secuencia de la clona N-1 contra la secuencia de la sonda heteróloga de EryA	69
6.2 Análisis de Preferencia de Codones	75
6.3 Alineamientos contra PKS de tipo I conocidas	79
a) ORF 1	79
b) ORF 2	82
1. Linker N-terminal	82
2. Dominio de β -cetacil sintasa (KS)	84
3. Dominio de acil tranferasa (AT)	87
7. Interrupcion Cromosomal	88
7.1 Transformación	88
7.2 Electroporación	89
7.3 Conjugación	89
8. Detección de Nigericina en Sobrenadantes de Cultivo	92
8.1 Detección de actividad antibiótica mediante Bioensayo	92
8.2 Detección de nigericina mediante cromatografía en capa fina	93

V. DISCUSIÓN 96

1. Predicción de la estructura modular de la PKS de nigericina	96
2. Mecanismo para la formación de los enlaces éter en la estructura de nigericina	98
3. Análisis de la clona N-1	99

VI. CONCLUSIONES	103
1. PKS de nigericina	103
2. Clona N-1	103
3. Producción e identificación del antibiótico	104
VII. PERSPECTIVAS	105
VIII. REFERENCIAS	106

INDICE DE FIGURAS

I.	Figura 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	5
II.	Figura 2. Síntesis de ácidos grasos y policétidos	9
III.	Figura 3. Estructura de la PKS tipo II de actinorodina	11
IV.	Figura 4. PKS de 6DEB	13
V.	Figura 5. Estructura algunas monolactonas	17
VI.	Figura 6. Estructuras polienos	18
VII.	Figura 7. Estructura de macrólidos inmunosupresores	19
VIII.	Figura 8. Estructuras de poliéteres	22
IX.	Figura 9. Estructura del poliéter nigericina	24
X.	Figura 10. Intermediario epóxido propuesto para nigericina	26
XI.	Figura 11. Intermediario polieno de nigericina	27
XII.	Figura 12. PKS de nigericina	55
XIII.	Figura 13. Formación de la estructura final de nigericina	60
XIV.	Figura 14. Amplificación por PCR	66
XV.	Figura 15. Southern Blot de DNA chromosomal	66
XVI.	Figura 16. Southern Blot de clonas	68
XVII.	Figura 17. Alineamiento de la secuencia del inserto clona N-1 contra secuencia de la sonda de EryA	71
XVIII.	Figura 18. Análisis de uso de codones de la secuencia de la clona N-1	76
XIX.	Figura 19. Secuencia de Clona N1	77
XX.	Figura 20. Alineamiento de ORF1 contra dominios de ACP de diversas PKS	81

XXI.	Figura 21. Alineamiento del posible linker N-terminal del ORF2 contra linkers N-terminales de PKS de tipo I	83
XXII.	Figura 22. Alineamiento de ORF 2 contra dominios de β -ceto sintasa (KS) de diversas PKS de tipo I	85
XXIII.	Figura 23. Alineamiento de los dominios de AT de ORF2 contra otros inicios de dominios de AT de PKS de tipo I.	87
XXIV.	Figura 24. pBJ12	90
XXV.	Figura 25. Southern Blot de clonas resistentes a tioestrepton	91
XXVI.	Figura 26. Bioensayo	93
XXVII.	Figura 27. Placa de TLC revelada con vainillina	95

RESUMEN

Los policétidos son un grupo de compuestos producidos por bacterias, hongos, plantas, insectos, etc. Estos son sintetizados de manera análoga a la síntesis de ácidos grasos mediante la adición de diversas unidades extensoras, donde se varía el grado de reducción del carbono β después de cada condensación. Por esto, los policétidos presentan una gran diversidad de estructuras y de actividades biológicas. Las sintetas de policétidos (PKS) de tipo I son complejos multienzimáticos formados por varias proteínas modulares. Cada módulo contiene las actividades necesarias para determinar el tipo de unidad extensora y el grado de reducción del carbono quiral en esa adición.

La nigericina es un antibiótico poliéter producido por *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476 que posee actividad de ionóforo transportando cationes metálicos a través de membranas celulares. Este es sintetizado por una PKS de tipo I y hasta el momento se desconoce tanto la estructura de esta PKS, como los intermediarios biosintéticos y el tipo de modificaciones que se realizan para darle la estructura final a este antibiótico. Con base en un intermediario teórico en la biosíntesis de la nigericina se realizó una predicción acerca de las características generales que debía contener una PKS de tipo I para sintetizar un compuesto como la nigericina.

Esta PKS consta de un módulo de carga y catorce módulos para la extensión de la cadena policétida. En nueve de estos módulos se utiliza metilmalonil-CoA como unidad extensora y en los cinco restantes se utiliza malonil-CoA. Los dominios de ceto sintasa 5 (KS5) y ceto sintasa (KS13) realizan una condensación con epimerización, de modo que introducen un residuo de propionato con un radical L metilo en la cadena policétida. Terminado el proceso de síntesis, el ácido carboxílico que se libera de la PKS es una cadena lineal de 30 carbonos que presenta grupos cetónicos, radicales hidroxilo, dobles enlaces, carbonos completamente saturados y grupos metilo a lo largo de su estructura. Este compuesto es atacado por una epoxidasa específica y mediante una serie de ataques nucleofílicos se construye la estructura del poliéter. Estos ataques son necesarios para la formación de los anillos de tetrahidrofurano y tetrahidropirano presentes en la estructura de

nigericina. Esto sugiere que las PKS de poliéteres poseen una serie de actividades que no se encuentran en las PKS de otros policétidos.

Se clonó un fragmento de DNA de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476 que pertenece a una PKS de tipo I. Este fragmento llamado N-1 contiene dos marcos de lectura parciales que codifican para proteínas modulares de PKS de tipo I. La secuencia parcial del ORF1 reveló un dominio de proteína acarreadora de acilos, mientras que la secuencia parcial del ORF2 reveló un dominio de ceto sintasa y el inicio de un dominio de acil transferasa. Con el fin de demostrar que el fragmento clonado pertenece a la PKS de nigericina, se realizaron intentos de interrupción del ORF2 cromosomal, pero no fue posible obtener ninguna cepa con dichas características. Este se va a usar en el futuro como sonda homóloga para genes de PKS de tipo I para clonar los genes biosintéticos de nigericina a partir de una biblioteca de cósmidos. Por otro lado, se determinó que el medio MN1 fue el mejor medio para la producción de nigericina por *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476. Se adaptó un protocolo de bioensayo para identificar la presencia de actividad antibiótica en sobrenadantes de cultivo. Mediante una cromatografía en capa fina se determinó que la actividad antibiótica se debía a la presencia de nigericina en el sobrenadante.

I. INTRODUCCIÓN

1. Taxonomía del Género *Streptomyces*

Las bacterias Gram positivas poseen dos grandes ramas que se diferencian en la composición de las bases de su DNA. La rama de los actinomicetos comprende organismos con DNA rico en guanina (G) y citosina (C), mientras que la rama de *Bacillus* comprenden bacterias con DNA bajo en su contenido de G+C. Como tal, dentro de los actinomicetos el género *Streptomyces* se define mediante homologías de secuencia del RNA 16S así como mediante el contenido de lípidos y ácidos grasos de la pared celular. Algunas de las características que distinguen a este género son: 1) Forman un micelio aéreo que al madurar da origen a cadenas de varias esporas, 2) producen una gran variedad de pigmentos y productos difusibles, 3) utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono, 5) el peptidoglicano de la pared celular contiene grandes cantidades de ácido L-diaminopimélico, 6) están ampliamente distribuidos y son abundantes en el suelo y 7) tienen un contenido de G+C del 68-78% (Holt et. al., 1989).

2. Hábitat

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats terrestres y acuáticos. La mayoría son saprofitos estrictos, pero algunos pueden ser parásitos de plantas o animales. El suelo, forraje y composta parecen ser los reservorios primarios de estos organismos. La habilidad de los estreptomicetos para colonizar el suelo, que es el principal hábitat de estos organismos, se facilita al poder producir esporas a partir de hifas miceliales. Estas esporas pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo (Ensign, 1978) y son resistentes tanto a desecación como a la escasez de nutrientes (Karagouni et al., 1993).

3. Características generales del Genoma.

Hasta el momento se ha secuenciado completamente el genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) y el de *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267. En general el genoma de los *Streptomyces* mide alrededor de 8.7 Mb y es el genoma bacteriano mas grande que se ha secuenciado. Consta de un cromosoma lineal con un contenido de G+C del 70% (Wright et. al., 1992) que contiene alrededor de 7,700 marcos abiertos de lectura, seis operones de RNA ribosomal (16S-23S-5S) y de 63 a 65 RNAs de transferencia (Omura et. al. 2001, Bentley et al., 2002).

4. Ciclo de vida de *Streptomyces*

El crecimiento de las colonias de *Streptomyces* comienza con la germinación de una espora dando origen a hifas que forman un micelio vegetativo. El micelio vegetativo no se encuentra septado y sirve como sustrato para la posterior formación de micelio aéreo (Fig 1).

Conforme la colonia crece, los extremos de la misma acumulan diversos tipos de compuestos como glicógeno, lípidos y polifosfato (Chater, 1993). Al envejecer la colonia, varias células del micelio vegetativo mueren y empieza el crecimiento del micelio aéreo al mismo tiempo que comienza la producción de metabolitos secundarios (Fig 1). El crecimiento de las hifas del micelio aéreo se realiza no sólo en las puntas de éstas, sino también dentro del micelio aéreo debido a la ramificación de las hifas preexistentes (Míguez et. al., 1994).

Cuando se detiene el crecimiento del micelio aéreo se forman septos a lo largo de las hifas aéreas. Cada septo forma un compartimento unigenómico que dará origen a una espora. Para esto, cada compartimento toma una forma esférica, la pared se engrosa y en varias especies se acumula un pigmento oscuro en la pared de las esporas (Fig.1) (Chater et al., 1990; Chater, 1993).

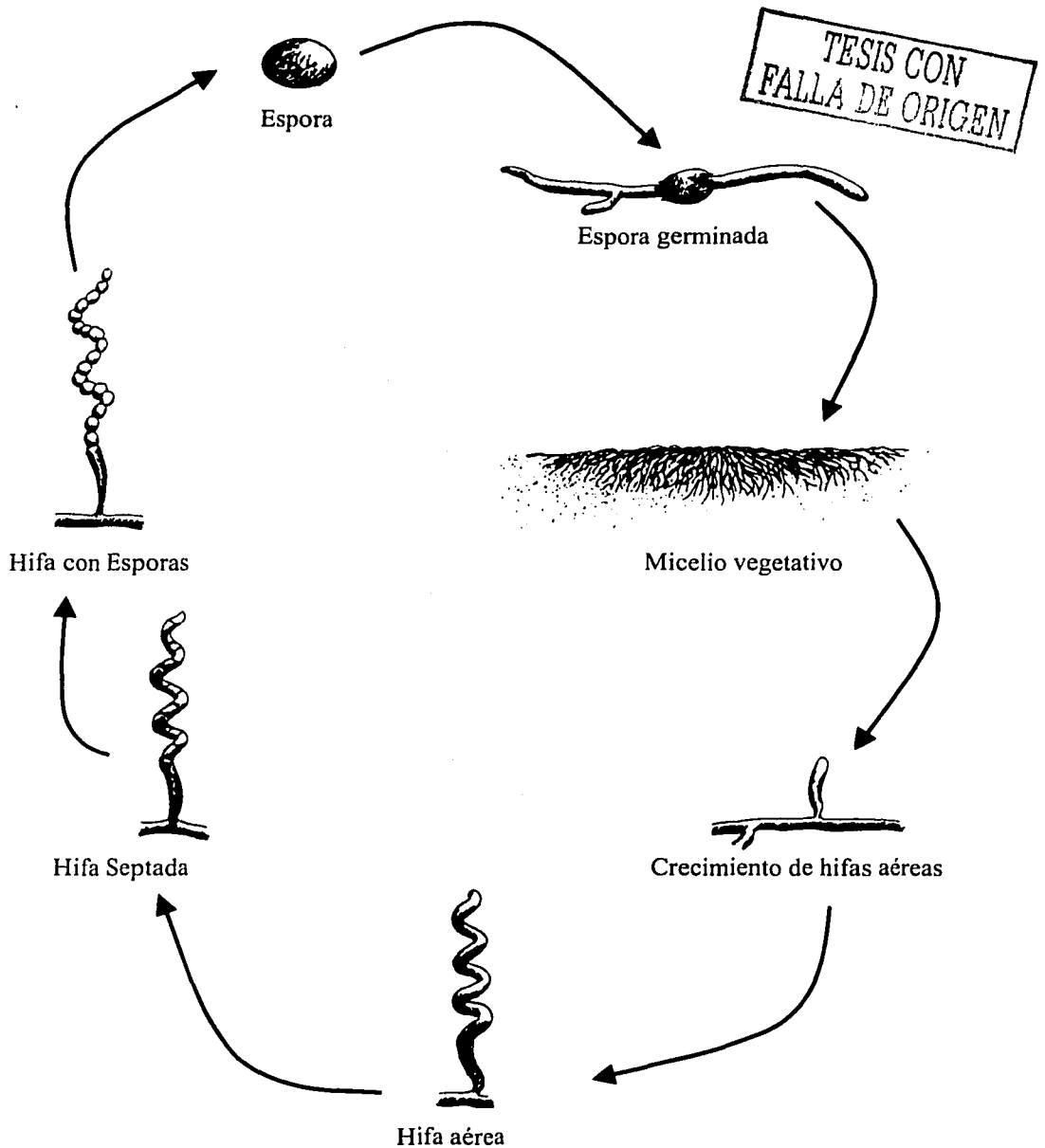


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces*. El ciclo de vida comienza con la germinación de una espóra que dará origen a un micelio vegetativo. Este servirá de sustrato para la generación de hifas aéreas que al madurar, se septan y dan origen a una cadena de esporas capaces de iniciar de nuevo todo el ciclo.

5. Producción de metabolitos secundarios.

Los *Streptomyces* durante su crecimiento pasan por una diferenciación fisiológica muy ligada a la diferenciación celular que se refleja en un cambio morfológica de la colonia. Durante esta diferenciación fisiológica, se expresan de forma simultánea los genes de esporulación y de biosíntesis de diversos metabolitos secundarios (Maplestone, et al., 1992). Estos metabolitos no son esenciales para el crecimiento y tienden a ser cepa específicos. Poseen una gran variedad de estructuras químicas y actividades biológicas. La formación de metabolitos secundarios es dirigida por grupos de genes con mecanismos de regulación que controlan tanto el tiempo como el nivel de expresión (Vining, 1992). Una de las señales reguladoras más importantes durante la diferenciación morfológica y fisiológica es el factor A. Este producto difusible es un factor autorregulador que entrelaza la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación celular. Este compuesto es un γ -butirolactona que dispara tanto la formación del micelio aéreo como la biosíntesis de streptomina en *Streptomyces griseus* (Horinouchi et al., 1992; Horinouchi et al., 1994)

6. Policétidos

El término policétido define a un grupo de compuestos producidos tanto por bacterias, como por plantas, hongos, insectos, etc. Los policétidos poseen diversas actividades biológicas, ya que pueden ser toxinas, antibacterianos, fungicidas, antitumorales, antiparasíticos, hormonas, etc (Katz et al., 1993). Estos compuestos se sintetizan de manera análoga a la síntesis de ácidos grasos mediante la condensación sucesiva de pequeñas unidades extensoras. Estas unidades pueden ser de diversos tipos tales como malonil-CoA, metil malonil-CoA, butiril-CoA, isopropil-CoA, etc (McDaniel et al., 1993, Rup et al., 2000).

6.1 Síntesis de Ácidos Grasos

La síntesis de ácidos grasos se realiza por un complejo multienzimático denominado sintasa de ácidos grasos (FAS). Existen dos tipos de sintasas de ácidos grasos diferentes. Las FAS de tipo II, que se encuentran en bacterias y plantas, están compuestas por varios polipéptidos diferentes, de modo que forman un complejo multipéptidico durante la síntesis del ácido graso. En cambio, las FAS de tipo I que se encuentran en animales, están formadas por un solo polipéptido enorme. Aparentemente las FAS de tipo I surgieron a partir de la fusión de varias proteínas individuales para formar una sola proteína multienzimática (Rock et al., 2002).

Tanto las FAS de tipo I como las de tipo II presentan diversas actividades enzimáticas para la síntesis de los ácidos grasos. Estas actividades son: proteína acarreadora de acilos (ACP), ACP- transacilasa (AT), malonil-CoA-ACP transferasa (MT), β -keto ACP sintasa (KS), β -cetoacil ACP reductasa (KR), β -hidroxiacil ACP dehidratasa (DH), enoil ACP reductasa (ER) y tioesterasa (TE) (Sherman et al., 1989) (Fig. 2).

Durante la síntesis de ácidos grasos, la cadena acilada que se va sintetizando se encuentra siempre unida a una proteína acarreadora de acilos (ACP). Para esto tanto la proteína acarreadora de acilos como la coenzima A poseen un grupo prostético de fosfopanteteína que forma un enlace tioéster con el grupo acilo. Este grupo prostético está unido mediante un enlace éster a un residuo de serina en la ACP, mientras que en la CoA se encuentra unido a AMP.

Al comienzo de la síntesis de ácidos grasos, la acil transferasa (AT) "carga" a la β ceto sintasa (KS) transfiriendo un residuo acetilo proveniente de acetil-CoA a un residuo conservado de cisteína en la KS. Esta primera unidad del ácido graso es llamada unidad de carga. Posteriormente, comienza el ciclo de elongación de la cadena acilada usando siempre malonil-CoA como unidad extensora. Entonces un grupo malonil proveniente de malonil-CoA es transferido por la malonil transferasa (MT) a la ACP para formar malonil-ACP (Rock et al., 2002; Hopwood , 1997) (Fig. 2).

En la reacción de condensación catalizada por la β -ceto sintasa (KS), el malonil-ACP se descarboxila generando un carbanión que ataca el enlace acetil-tioéster de acetil-KS para formar la primera β -cetoacil ACP. Esta reacción resulta en la adición de la primera unidad extensora de la cadena carbonada generando un enlace cetónico en el carbono β . Una vez formada la nueva cadena de acilo la actividad de ceto reductasa (KR) convierte el enlace cetónico del carbono β en un radical hidroxilo. Posteriormente la actividad de deshidratasa (DH) ataca al radical hidroxilo liberando una molécula de agua y formando un doble enlace. Por último, la actividad de enoil reductasa (ER) elimina el doble enlace saturando completamente la cadena carbonada (Fig. 2). Las dos reacciones de reducción (KR y ER) utilizan como coenzima NADP(H) (Rock et al., 2002).

En este punto, la KS añade la siguiente unidad extensora y se repite todo el ciclo para concluir la elongación de la cadena carbonada. El ciclo de síntesis da como resultado la formación de moléculas carbonadas completamente reducidas de diversos tamaños. En particular para las FAS de animales, el largo de la cadena que se sintetiza es controlado por la especificidad de la actividad de tioesterasa (TE). Esta actividad es la encargada de liberar la cadena de acilo de la sintasa de ácidos grasos cuando ésta ha alcanzado un cierto tamaño (Lin et. al., 1978)

6.2 Síntesis de policétidos

La síntesis de policétidos se realiza mediante un sistema muy parecido al de la síntesis de ácidos grasos. Aunque las reacciones enzimáticas son las mismas existen diferencias muy importantes durante este proceso. Para la síntesis de policétidos el tipo de unidades extensoras y unidades de carga es muy variado. A diferencia de las sintasas de ácidos grasos, las sintasas de policétidos pueden utilizar como unidades extensoras malonil, metilmalonil, butiril, isopropil-CoA, etc. Además, el grado de reducción después de cada condensación es muy variable, de modo que la cadena carbonada que es sintetizada puede contener ya sea grupos cetónicos, hidroxilos, dobles enlaces o bien estar completamente saturada (Khosla, 1999) (Fig. 2).

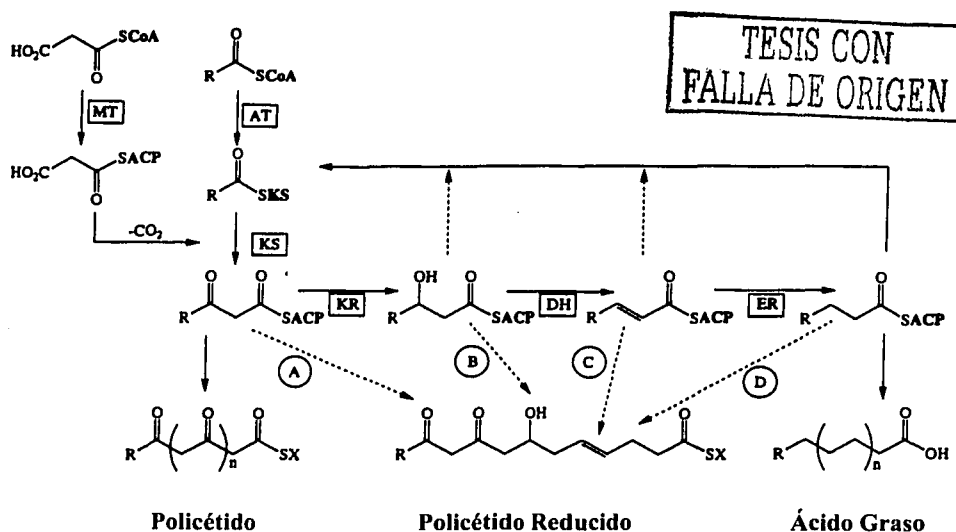


Figura 2. Síntesis de ácidos grasos y policétidos. Para la síntesis de ácidos grasos y policétidos se utilizan las mismas actividades enzimáticas que son: MT: malonil transferasa, AT: acil transferasa, KS: β-ceto sintasa, KR: ceto reductasa, DH: deshidratasa, ER: enoil reductasa. La presencia o ausencia de las actividades de KR, DH y ER determina si se sintetizará un policétido, un policétido reducido o bien un ácido graso.

7. Sintetas de Policétidos (PKS)

7.1 PKS de tipo II

Al igual que las sintetas de ácidos grasos, existen dos tipos de sintetas de policétidos (PKS), las de tipo I y las de tipo II. Las PKS de tipo II al igual que las FAS de tipo II contienen todas las actividades enzimáticas necesarias para la síntesis del policétido en polipéptidos diferentes. Los diversos genes encargados de la biosíntesis de la cadena carbonada de los policétidos de tipo II abarcan alrededor de 6 kb en el cromosoma de *Streptomyces* (Sherman, et al. 1989; Bibb, et al. 1989; Davis, 1990).

Los policétidos tipo II son compuestos aromáticos como la actinorrodina, producida por *Streptomyces coelicolor* A(3) (McDaniel et al., 1994). Para la biosíntesis de estos policétidos, se requiere de las actividades de: proteína acarreadora de acilos (ACP), β -ceto acil sintasa (KS), β -ceto acil reductasa (KR), factor de determinación de la cadena (CLF), aromatasa (ARO) y ciclasa (CYC). La actividad de CLF es típica de PKS de tipo II. El conjunto de actividades de ACP, KS y CLF se denomina como PKS mínima, ya que son las actividades mínimas que se requieren para la síntesis de la cadena policétida. Estas son utilizadas de forma iterativa durante la síntesis de la cadena carbonada, de modo que cada una de ellas se utiliza varias veces durante la síntesis de una sola molécula policétida. (Fig 3) (McDaniel et al., 1994, Alvarez et al., 1996).

Se ha demostrado que para los policétidos de tipo II, la actividad de ACP es completamente intercambiable. De modo que una ACP de un policétido puede sustituir a la ACP de otro, e inclusive puede ser sustituida por una ACP perteneciente a una FAS de tipo II (Khosla, et al., 1992; Khosla, et al., 1993).

El factor de determinación del largo de la cadena (Chain Length Factor) determina el número de adiciones de las diferentes unidades extensoras que se requieren para sintetizar la cadena policétida. Esta proteína parece provenir de una duplicación del gen que codifica para la KS, el cual posee mutaciones en el sitio activo que la hacen no funcional. Hasta el momento no se ha determinado el mecanismo por el cual el CLF determina el largo de la cadena policétida (Malpartida et al., 1986; Malpartida et al., 1987).

Las actividades de aromatasa y ciclasa le dan la estructura final a la cadena carbonada. La ciclasa (CYC) cataliza la formación de anillos a lo largo de la cadena policétida y una vez formados, la actividad de aromatasa (ARO) convierte estos anillos en anillos aromáticos. Después de la síntesis, la cadena carbonada sufre otras modificaciones como metilación o glicosidación para generar el compuesto activo (Sherman, 1991; Hopwood, 1997).

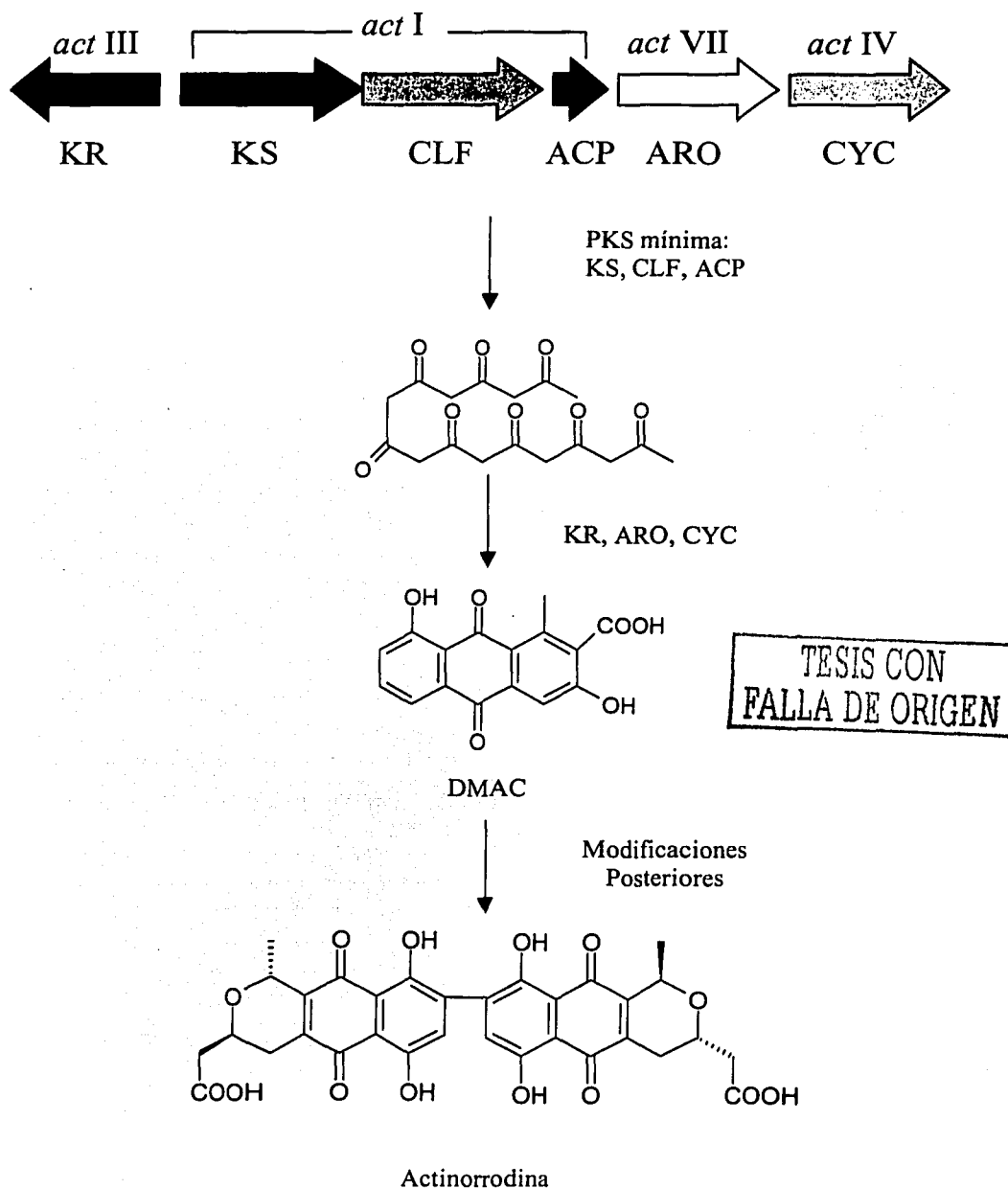


Figura 3. Estructura de la PKS tipo II de actinorrodina. La PKS mínima (KS, CLF, ACP) sintetiza la cadena policétida. KR, ARO y CYC construyen el intermediario biosintético DMAC. Mediante modificaciones posteriores a la cadena policétida se sintetiza el compuesto actinorrodina.

7.2 PKS de tipo I

Las sintasas de policétidos (PKS) de tipo I son complejos multienzimáticos que, al igual que las FAS de tipo I, presentan las actividades enzimáticas para la síntesis de la cadena policétida en un solo polipéptido. Desde 1991 se han caracterizado diversas PKS de tipo I, principalmente de policétidos macrólidos como eritromicina (Donadio et al., 1991), rapamicina (Schwecke, 1995), rifamicina (Augustus, 1998) o pikromicina (Sherman, 2000). La PKS de 6-desoxieritronolido B, el precursor de la eritromicina, fue la primera PKS de tipo I clonada y caracterizada (Donadio et al., 1991). Todas las PKS de tipo I están formadas por varias proteínas modulares. El orden de los genes que codifican para estos complejos multienzimáticos suele ser igual al orden en el que se van utilizando los módulos para sintetizar la cadena policétida. (Donadio et al., 1991; Augustus et al., 1998) (Fig. 4).

Las PKS de tipo I son enzimas modulares en las que cada módulo contiene un juego de actividades enzimáticas que determinan el tipo de unidad extensora que se adiciona, la quiralidad de residuos salientes y el grado de reducción que presenta el carbono β después de cada condensación. A diferencia de las PKS tipo II, las PKS de tipo I no son iterativas, de modo que las actividades de cada módulo se utilizan una sola vez en cada ciclo de síntesis del policétido (Khosla et al., 1999).

Estas sintasas están formadas por varias proteínas modulares donde cada una de ellas acarrea de 1 a 6 módulos. Cabe destacar el hecho de que aunque los módulos se encuentren en diversos polipéptidos, el orden en el que se utilizan es siempre el mismo. Esto refleja una organización muy detallada en cuanto al orden de síntesis de la cadena carbonada. Existen regiones en los extremos N-terminal de los polipéptidos de PKS denominadas "linkers" cuya función es ordenar las proteínas modulares de la PKS para asegurar que el orden de los módulos sea el adecuado para sintetizar siempre el mismo esqueleto carbonado (Khosla et al., 1999). La única excepción es la PKS de pikromicina y metilmicina, en la que una misma sintasa de policétido produce dos policétidos distintos (Xue, 2000).

Cada módulo posee por lo menos las actividades de KS, AT y ACP, encargadas en su conjunto de la elección y adición de una unidad extensora en la cadena carbonada. Las actividades de KR, DH y ER, que pueden o no estar presentes en los módulos, están encargadas de la reducción parcial o total del residuo cetónico que se genera después de cada condensación. De forma particular, la presencia en cada módulo de una, dos, tres o ninguna de estas actividades determina el grado de reducción que va a tener la cadena carbonada posterior a la adición de cada unidad extensora.

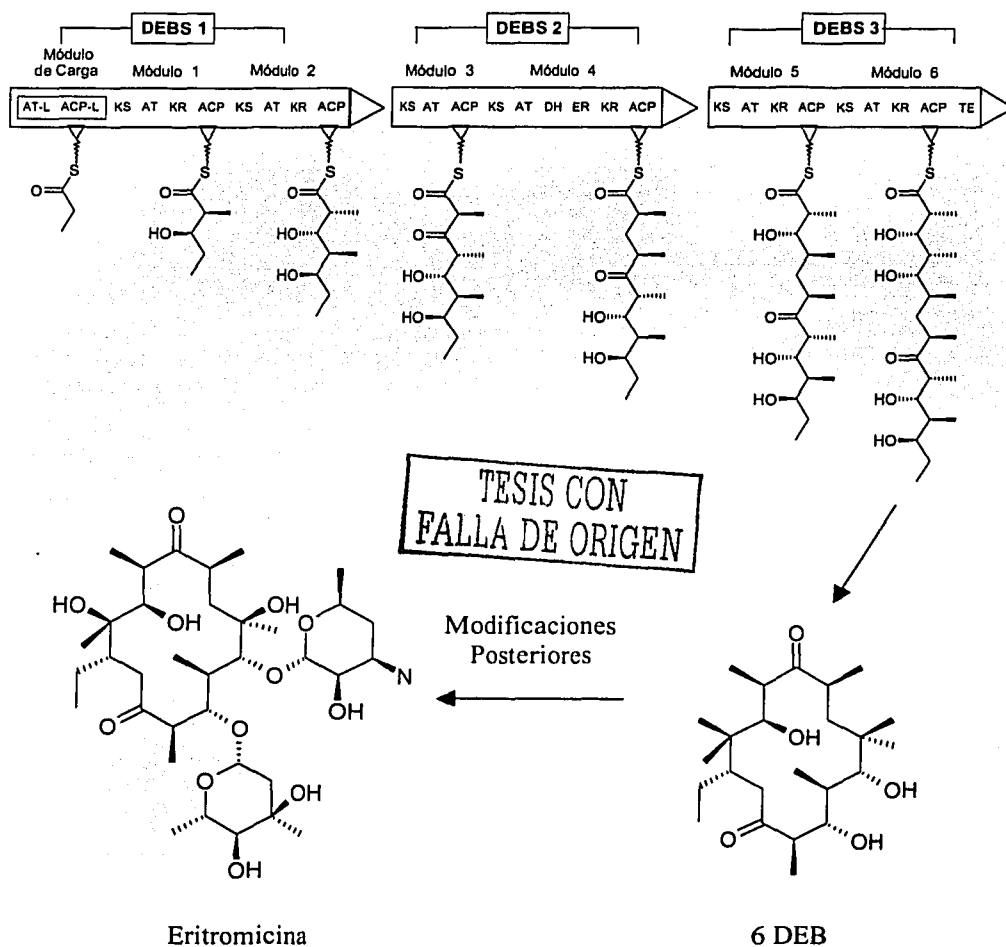


Figura 4. PKS de 6DEB. La PKS (DEBS 1, 2 y 3) sintetiza el 6-desoxieritronolido B (6DEB) precursor de eritromicina. Mediante diversas modificaciones posteriores al intermediario 6DEB se sintetiza la eritromicina.

7.3 Dominios Enzimáticos en los Módulos de las PKS de Tipo I

a) Dominio de β -ceto sintasa (KS)

El dominio de KS es el encargado de realizar la reacción de condensación de cada unidad extensora, así como de la estereoquímica del residuo que se añade a la cadena carbonada ya sintetizada. Se reportó para la PKS de eritromicina, la presencia de la secuencia altamente conservada GPXXXXXTACSS en todos los dominios de KS. Este dominio se encuentra alrededor del residuo de cisteína que participa en la formación del enlace tioéster que se crea en la cadena carbonada después de la adición de la unidad extensora (Donadio et al., 1991).

Sin importar el policétido del que se trate, la homología de los dominios de KS en diferentes módulos es muy alta. El motivo TVDTGCSSLV se encuentra altamente conservado en prácticamente todos los dominios de KS. En los módulos de carga, los dominios de KS no son funcionales debido a la sustitución del residuo de cisteína (Donadio et al., 1992; Aparicio et al., 1996).

Al usar metilmalonil-CoA como unidad extensora se añade un residuo de propionato en la cadena carbonada. Este residuo posee un radical metilo saliente que puede tener dos configuraciones: (L) y (D). Durante la condensación, si se mantiene la configuración del metilo proveniente del isómero 2(S) metil-malonil CoA se genera un radical D-metilo saliente. En cambio, si después de la condensación se da una epimerización de dicho radical D, se genera el radical L-metilo. Esto ha sido demostrado para la KS del módulo 1 de eritromicina, la cual cataliza la condensación de 2S-metil-malonil-CoA para dar origen a un radical L metilo. Sin embargo la naturaleza de esta epimerización no ha sido determinada (Weissman et al., 1997).

b) Dominio de Acil Transferasa (AT)

Los dominios de acil transferasa (AT) poseen más variabilidad de secuencia que los dominios de KS. Los dominios de AT tanto de FAS como de PKS poseen el sitio activo GHSXG y una segunda histidina invariable en todas las AT dentro de la secuencia AXH (Donadio et al., 1992; Aparicio et al., 1996).

La selección de la unidad extensora está dada por el dominio de acil transferasa (AT) presente en cada módulo de la PKS. Este dominio es el responsable de discernir entre los diversos tipos de unidades extensoras que se pueden utilizar para la elongación de la cadena policétida. Mediante alineación de secuencias de los diversos módulos de la PKS de rapamicina y avermectina, se encontró que la diferencia entre las AT radica en la presencia de motivos conservados de veinte aminoácidos (Haydock et al., 1995). Estos motivos se encuentran a once aminoácidos del sitio activo y difieren de manera significativa entre estos dos grupos de AT. Las AT de acetato poseen el consenso ETGYA-7-Q-1-A-1-FGLL, específico para esta unidad extensora, mientras que las AT de propionato, poseen el consenso RVDVV-7-M-1-S-1-AXhW, donde h representa un residuo alifático hidrofóbico y X es arginina, serina, alanina o glutamato (Donadio et al., 1991).

c) Dominio de Proteína Acarreadora de Acilos (ACP)

Las proteínas acarreadoras de acilos (ACP) poseen un brazo de fosfopanteteína al cual se le une la cadena de acilo durante la síntesis de ácidos grasos o policétidos. Dicho grupo prostético, se une a un residuo de serina en el motivo LGXDSLXXVE, presente en la mayoría de los dominios de ACP de las PKS (Donadio et al. 1991).

d) Dominio de Deshidratasa (DH)

Con base en la secuencia de la PKS de eritromicina, se determinó que los dominios de deshidratasa (DH) presentan la secuencia consenso del sitio activo HXXXGXXXP. Se ha reportado que en módulos que carecen de actividad DH, el sitio activo contiene deleciones de cinco aminoácidos que lo hacen no funcional (Donadio et. al. 1991).

e) Dominio de β -ceto reductasa (KR) y enoil reductasa (ER)

Los dominios de ceto reductasa (KR) y enoil reductasa (ER) utilizan NADP(H) como coenzima al igual que en las FAS de tipo I, de modo que no es rara la presencia de una secuencia parecida al consenso del sitio de unión de NADP(H) cercano a estos dominios. Se ha reportado que en los dominios de KR de eritromicina el motivo típico de unión a NADP(H) es GXXGXXAXXA. Particularmente en todos los dominios de ER de rapamicina, se encuentra el consenso GGVGVAATQIA que alinea con este mismo motivo de unión a NADP(H) (Donadio et. al., 1991; Weissman et al., 1997).

8. Tipos de Policétidos

Los compuestos que son sintetizados por PKS de tipo I poseen una increíble diversidad tanto en estructura como en actividades biológicas. Estos compuestos se clasifican con base en el número de carbonos y las características generales de la cadena policétida (Omura, 2002). De esta manera los policétidos se han clasificado en diversas familias de compuestos. Algunas de las más importantes son las monolactonas, los polienos, los macrólidos lactámicos inmunosupresores y los poliéteres .

8.1 Monolactonas

Las monolactonas poseen estructuras carbonadas que van desde 8 hasta 60 carbonos. Poseen un solo anillo lactámico y tienen en su mayoría actividad antibiótica (Omura, 2002). Algunos de los compuestos que pertenecen a esta familia son la eritromicina, la espinosina y la avermectina (Fig 5).

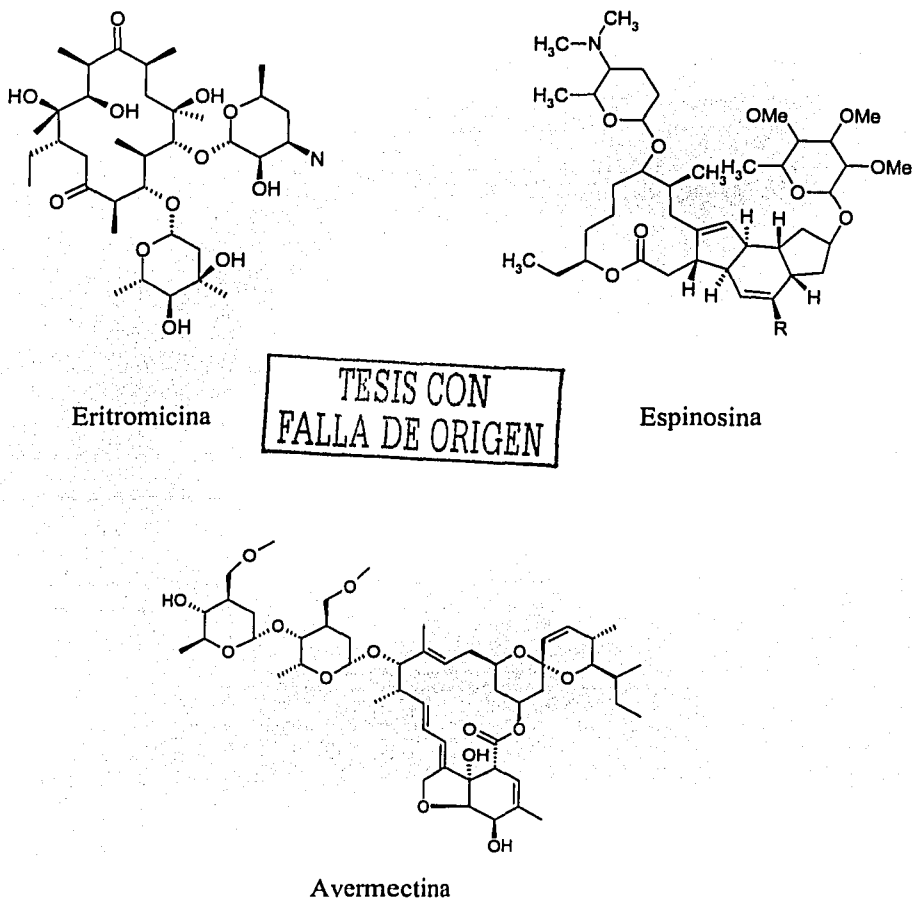
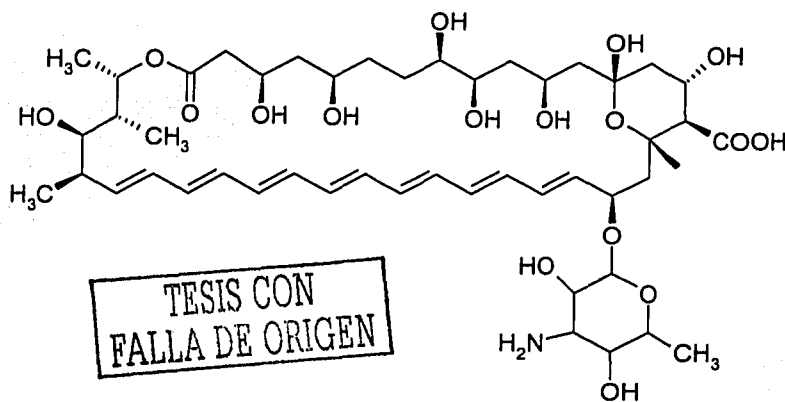


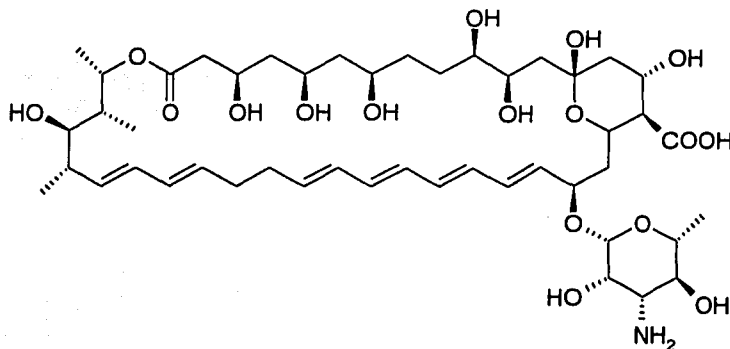
Figura 5. Estructura de algunas monolactonas. Estos policétidos poseen un solo anillo lactámico y sufren diversas modificaciones posteriores a la síntesis del esqueleto carbonado (hidroxilaciones, metilaciones, glicosilaciones) que le dan la estructura activa al compuesto.

8.2 Polienos

Los polienos constan de estructuras carbonadas de 30 a 60 miembros y poseen de 3 a 8 dobles enlaces a lo largo de la cadena carbonada (Omura, 2002). Presentan principalmente actividad de fungicidas como la amfotericina y la nistatina (Brautaset et al., 2000) (Fig 6).



Amfotericin B

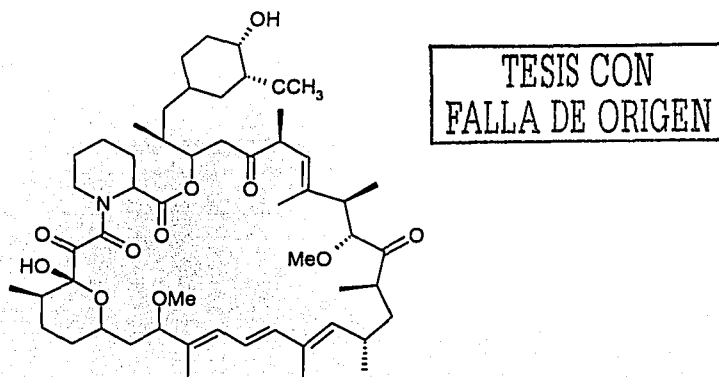


Nistatina

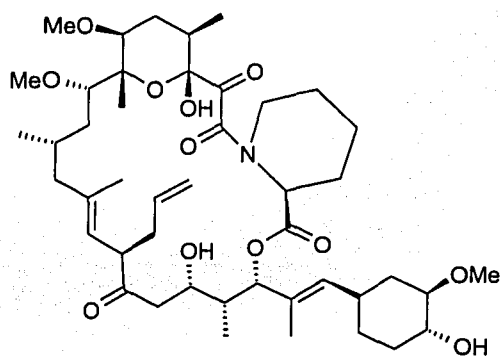
Figura 6. Estructuras de polienos. Estos policétidos poseen varios dobles enlaces y algunos azúcares que son adicionados después de la síntesis del esqueleto carbonado.

8.3 Macrólidos inmunosupresores

Dentro del grupo de macrólidos inmunosupresores se encuentran principalmente la rapamicina (Schwecke et al., 1995) y el FK506 (Wu et al., 2000). Este último es utilizado para evitar el rechazo de tejidos, posterior a cirugías de transplante de órganos (Omura, 2002) (Fig 7).



Rapamicina



FK506

Figura 7. Estructura de macrólidos inmunosupresores. Estos policétidos sufren metilaciones e hidroxilaciones posteriores a la síntesis de la cadena carbonada, a diferencia de los anteriores no sufren glicosilaciones.

9. Poliéteres

Los poliéteres son un grupo muy particular de policétidos producidos principalmente por bacterias del genero *Streptomyces*. Son utilizados como promotores de crecimiento en rumiantes y a pesar de ser potentes coccidiostáticos, debido a que presentan una alta toxicidad estos compuestos no poseen ninguna aplicación clínica en humanos (Thivend et al., 1983). Todos los poliéteres tienen la capacidad de formar complejos con cationes del Grupo IA ó IIA y transportar estos iones a través de membranas celulares. Tanto bacterias Gram positivas como diversas células animales son sensibles a estos ionóforos, los cuales inhiben el proceso de respiración en mitocondrias y promueven la entrada o salida de cationes de las células (Birch et al., 1995).

9.1 PKS de poliéteres

Tanto la estructura de las PKS de los poliéteres como las reacciones de modificación que sufre la cadena policétida después de ser sintetizada no han sido caracterizadas (Mousslim et al., 1995). La PKS del poliéter monensina es la única que ha sido clonada y posee una organización diferente a las PKS de otros policétidos. Esta consta de varios genes que codifican solamente para uno o dos módulos, poseen diferentes direccionalidades y su orden genético no corresponde con el orden en que participan para sintetizar la cadena carbonada. Además parecen poseer dos actividades de tioesterasa (TE), localizadas en dos polipéptidos diferentes. (Leadlay et al., 2001).

9.2 Estructura química de poliéteres

En lo que respecta a su estructura química, los poliéteres difieren mucho en comparación con otros policétidos de tipo I como eritromicina y rapamicina. Todos los poliéteres poseen en su estructura la presencia de varios anillos tetrahydrofurano y tetrahidropirano. Se propone que para la formación de estos anillos se requiere una cascada de reacciones que se llevan a cabo sobre un intermediario que posee radicales hidroxilo, grupos cetónicos y grupos epóxidos altamente reactivos. Esta cascada culmina con la

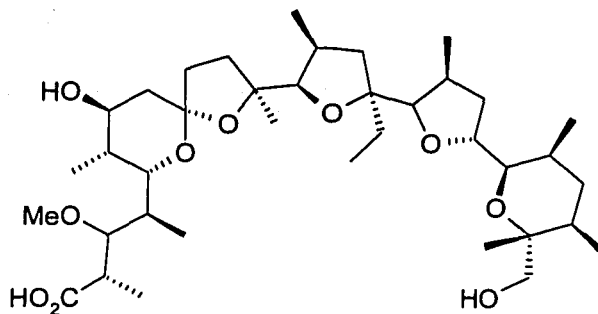
formación de la estructura final del poliéter (Cane et al., 1983). En la parte interna de la molécula, la presencia de los oxígenos de los anillos éter así como algunos radicales hidroxilo genera una superficie hidrofílica donde se anida el catión. Mientras, la otra cara de la molécula forma una superficie externa hidrofóbica capaz de asociarse con membranas celulares (Birch et al., 1995).

Los poliéteres en general, poseen una estructura química muy similar. Mediante modelos químicos se describió una estructura química absoluta en la que caben la mayoría de los poliéteres conocidos, como la monensina, ionomicina y nigericina entre otros (Cane et al., 1983). A pesar de la variedad de unidades extensoras que pueden usarse y del grado de reducción que se puede llevar a cabo, la configuración de los grupos alquilo o hidroxilo en cualquier posición dentro de las primeras unidades extensoras es constante en los poliéteres. Como las primeras 4 unidades extensoras de estos compuestos son siempre acetato, propionato, propionato y acetato (A₁,P₂,P₃,A₄), esta familia de compuestos fue denominada como poliéteres de tipo APPA (Cane, 1983).

Una vez sintetizado el policétido, es muy común que se realicen modificaciones químicas sobre la molécula carbonada. En el caso de los poliéteres, la adición de grupos metilo u otros radicales, la generación de grupos epóxido y la cascada de reacciones antes mencionada indican que existen diversas modificaciones enzimáticas posteriores a la construcción del esqueleto carbonado que no están presentes en otros policétidos. (Cane et al., 1983).

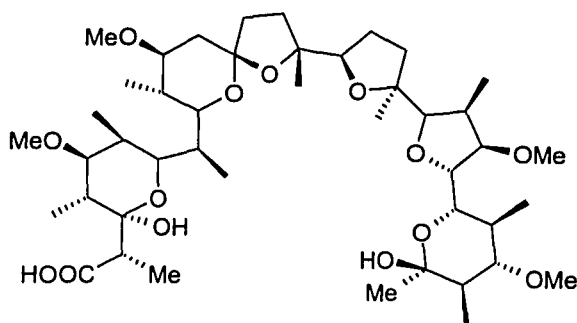
Debido al uso de estos compuestos en la industria veterinaria, se han desarrollado diferentes métodos para determinar de forma rápida y eficiente la cantidad de poliéteres en muestras de alimento o tejido. El uso de bioensayos usando *B. subtilis* ATCC 6633 como cepa sensible fue el primer método fácil para detectar la producción de poliéteres en sobrenadantes de cultivo mediante antibiograma (Kline et al., 1965). Posteriormente, el uso de vainillina como reactivo específico para detectar poliéteres ha permitido identificar estos compuestos mediante cromatografía en capa fina (TLC). Además ha sido posible cuantificar la concentración de poliéteres mediante el uso de reacciones colorimétricas. Estos métodos han sido utilizados para identificar y cuantificar la concentración de

monensina (Golab et al., 1973) y lonomicina (Brown, 1979) a partir de sobrenadantes de cultivo.



Monensina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Lonomicina A

Figura 8. Estructuras de poliéteres. Los poliéteres ionóforos poseen tanto los oxígenos de los enlaces éter como de algunos grupos hidroxilo en la misma cara de la molécula, mientras que los grupos metilo se encuentran en la superficie externa de la misma.

10. Nigericina

La nigericina es un poliéter ionóforo de 30 carbonos producido por diversas cepas de *Streptomyces* (Penka et al., 1995; Mouslim et al., 1993), entre ellas *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476. Este antibiótico ya puro es un polvo incoloro soluble en etanol y poco soluble en agua. Es estable hasta 100°C a pH 7 durante 2 horas. Es activo en contra de bacterias gram positivas, micobacterias y hongos como *Candida albicans* y *Trichoderma mentagrophytes*. En cambio presenta muy poca actividad en contra de bacterias gram negativas. La LD₅₀ de nigericina en ratones es de 2.5 mg/kg. Sin embargo debido a su alta toxicidad este antibiótico no tiene aplicación clínica (Glasby, 1992).

Se ha propuesto el uso de la cepa productora de nigericina *Streptomyces violaceusniger* YCED9 como un agente de biocontrol para combatir patógenos de diversas plantas (Chamberlain, et al., 1999). Esta cepa causa un efecto antagónico en el crecimiento de hongos patógenos de plantas en el laboratorio. Este efecto se debe a la producción de varios antibióticos, entre ellos la nigericina (Trejo-Estrada et al, 1998a). Cabe mencionar que en pruebas de invernadero *in vivo*, la nigericina es responsable de la actividad fungicida (Trejo-Estrada et. al., 1998b; Chamberlain et al., 1999).

10.1 Estructura de nigericina

La estructura de la nigericina (Birch et al., 1995; Cane et al., 1983b; Tabet et al. 1995) consta básicamente de un esqueleto de 30 carbonos con una serie de éteres cíclicos que dirigen a los diversos átomos de oxígeno a la misma cara de la molécula para que unan de forma efectiva diversos iones metálicos. La nigericina presenta tres anillos de tetrahidropirano formados por la unión tipo éter entre los carbonos 3-7, 9-13 y 25-29 y tres anillos de tetrahidrofurano formados por enlaces éteres entre los carbonos 13-16, 17-20 y 21-24 (Fig.9).

Además de estos anillos, la nigericina posee diversos tipos de radicales a largo de la molécula. Posee un grupo carboxilo en el carbono 1, un enlace éter en el carbono 11, un grupo hidroxilo en el carbono 29, un grupo metilo hidroxilado en el carbono 28 y diversos

radicales metilo distribuidos a lo largo de la molécula situados en los carbonos 2, 4, 12, 14, 16, 20, 22, 26 y 29 (Fig. 9).

La combinación entre la posición de los oxígenos que forman el enlace éter de los anillos en la cara interna de la molécula y los varios metilos en la superficie externa le brindan a la nigericina su actividad de ionóforo capaz de transportar cationes metálicos a través de las membranas celulares.

10.2 Intermediarios biosintéticos de nigericina

Debido a que la vía biosintética de los poliéteres no ha sido descrita, no se conoce alguno de los intermediarios participantes en la formación de este tipo de compuestos (Mousslim et al., 1995). Se ha propuesto la existencia de un intermediario carbonado teórico en la biosíntesis de varios poliéteres. Estos intermediarios se sitúan en un paso posterior a la síntesis total de la cadena carbonada y previo a la generación de los ciclos que le dan la conformación final a los poliéteres (Cane et al., 1983b)

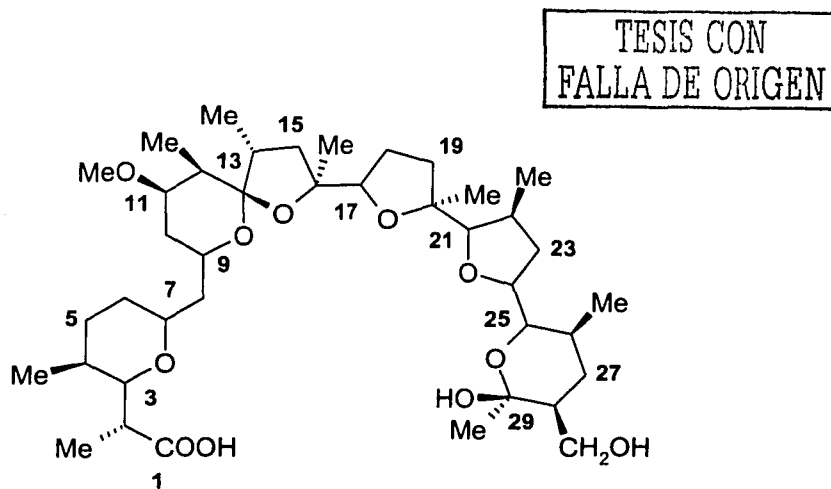


Figura 9. Estructura del poliéter nigericina. Consta de una cadena de 30 carbonos, con un grupo carboxilo, seis enlaces éter que forman tres anillos de tetrahidrofurano y tres anillos de tetrahydropirano, nueve grupos metilo en la cara externa de la molécula, un grupo éter metílico y dos grupos hidroxilo salientes.

El intermediario teórico para la formación de la nigericina, posee las mismas características que los intermediarios propuestos para otros poliéteres de tipo $A_1P_2P_3A_4$ como la monensina o lonomicina (Cane et al., 1983). Las primeras cuatro unidades extensoras que dan origen a los últimos anillos en el antibiótico son siempre acetato, propionato, propionato y acetato. Al comparar la estructura de estos compuestos entre sí, resulta evidente la presencia de una homología estereoquímica entre ellos. A pesar de los posibles radicales y las posibles combinaciones de acetato, propionato y butirato, la configuración de los grupos alquilo y los oxígenos sustituyentes en cualquier posición es constante en todos los poliéteres tipo APPA (Cane et al., 1983). El intermediario teórico consta de una cadena policétida del mismo número de carbonos que la nigericina, posee los radicales metilo del poliéter conocido pero contiene diversos grupos hidroxilo ausentes en la estructura final del compuesto. Además posee una serie de enlaces epóxido a lo largo de la molécula que participan en la formación de los anillos de tetrahidrofurano y tetrahidropirano que le dan su estructura final a la nigericina (Fig. 10).

El modelo más aceptado para la formación de los anillos de los poliéteres requiere de la generación de un intermediario epoxidado. La presencia de los grupos epóxido generaría una serie de ataques químicos del oxígeno del epóxido sobre los grupos hidroxilo y radicales cetónicos presentes en la misma molécula. Estas reacciones culminan con la formación de los anillos de tetrahidrofurano y tetrahidropirano que le dan su estructura final al poliéter.

Para la formación de los grupos epóxido es necesario que se lleve a cabo el ataque de una molécula de O_2 sobre algunos de los dobles enlaces presentes en una molécula carbonada. Esto resulta en la generación de un grupo epóxido en el sitio donde antes había un doble enlace. De modo que el intermediario anterior al compuesto epoxidado tendría un doble enlace en el mismo sitio donde se encuentran los grupos epóxido. En el caso de la nigericina, la generación de enlaces epóxido se realizaría sobre un polieno en el cual los dobles enlaces estarían situados entre los carbonos 2-3, 16-17, 20-21 y 24-25 (Fig 11).

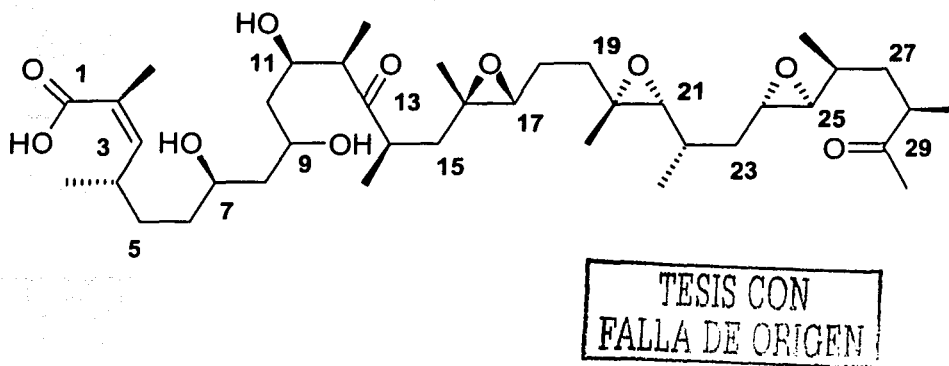


Figura 10. Intermediario epóxido propuesto para nigericina. Consta de una cadena lineal de 30 carbonos con un grupo carboxilo, un doble enlace (carbonos 2-3), tres grupos hidroxilo salientes (carbonos 7, 9 y 11), dos grupos cetónicos (carbonos 13 y 29), tres enlaces epóxido (carbonos 16-17, 20-21 y 24-25) y 10 grupos metilo (carbonos 2, 4, 12, 14, 16, 20, 22, 26 y 28).

La participación de O_2 durante la biosíntesis de policétidos se ha demostrado para diversos poliéteres como maduramicina (Tsou et al., 1984), tetronasina (Demetriadou et al., 1985), narasina (Spavold et al., 1986) y algunos macrólidos como la eritromicina (Cane et al., 1981) o avermectina (Cane et al., 1983). Para la monensina se sabe que los oxígenos 5, 6 y 10 presentes en la estructura final de la molécula provienen de oxígeno molecular (Cane et al., 1981). Asimismo dentro del grupo de genes biosintéticos del poliéter monensina, existe un gene que puede tener actividad de epoxidasa (Leadlay et al., 2001).

Aunque el modelo de formación de poliéteres a partir de un polieno es posible químicamente y explica de forma consistente la formación de estos anillos, hasta el momento no ha sido posible aislar ninguno de los probables intermediarios en la síntesis de los poliéteres (Birch et. al., 1995).

La estructura carbonada del intermediario polieno de nigericina es un ácido carboxílico lineal de 30 carbonos. Posee cuatro dobles enlaces situados entre los carbonos 2-3, 16-1, 20-21 y 24-25 respectivamente, tres grupos hidroxilo en los carbonos 7, 9 y 11 y dos grupos cetónicos en los carbonos 13 y 29. Por último posee un total de 9 radicales

metilo a lo largo de todo el esqueleto carbonado. Estos están situados en los carbonos 2, 4, 12, 14, 16, 20, 22, 26 y 28. Es importante destacar que a excepción de los metilos en los carbonos 4 y 22 que poseen una configuración L, el resto de los radicales metilo posee configuración D. Este compuesto sería el esqueleto carbonado que, mediante una serie de reacciones posteriores a su síntesis, va a dar origen a la molécula conocida de nigericina.

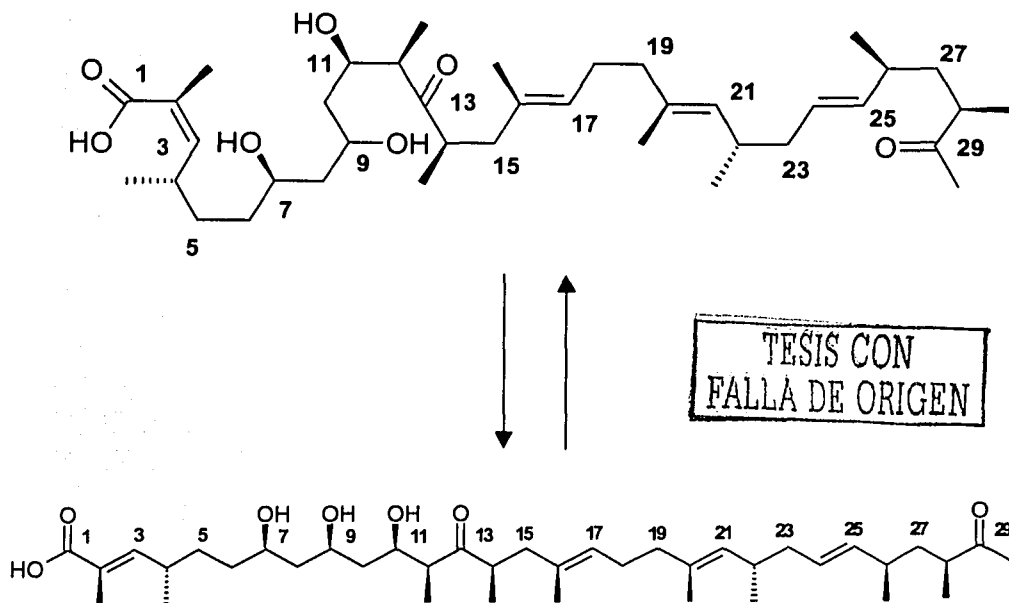


Figura 11. Intermediario polieno de nigericina. Este intermediario teórico podría estar cambiando constantemente de conformación dentro de la célula, de un ácido carboxílico lineal a un compuesto más compacto.

II. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

Predecir las características generales de la PKS de nigericina a partir de un intermediario teórico.

Iniciar la clonación del grupo de genes biosintéticos de nigericina de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476.

Identificar de manera rápida y específica la presencia de nigericina en sobrenadantes de cultivo de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476.

2. Objetivos particulares

Clonar un fragmento de DNA de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B 1476 que pueda ser usado como sonda homóloga de sintasas de policétidos de tipo I para realizar un tamizaje en una biblioteca de cósmidos.

Determinar las mejores condiciones de cultivo para la producción de nigericina por *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476.

Montar un bioensayo y cromatografía en capa fina para identificar específicamente la presencia de nigericina en sobrenadantes de cultivo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño De Oligos

Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR son: EryAF (GCACATCACCTCGACCAC) y EryAR (GCGACACCATCACGGAGAAC), fueron diseñados de forma automática con el Wisconsin Package Versión 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. Los oligos para secuenciar J09F1 (AGGTTTCGCGGCCTGGG), J09R1 (GGCTTCCTCGACCTCGGC), J09F2 (TGGAGCCCAGCCATAGCG), J09R2 (ACCACCGACCTGCGCG) J09R3 (CTCAAGCGGGCCACCA) y J09R4 (GGCGTCACCGTCATGTCCA) fueron diseñados de forma manual.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Cepas y Plasmidos Utilizados

Streptomyces violaceusniger NRRL B 1476 fue donada por el Dr. David P. Laveda, de Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 N. University Street Peoria, Illinois 61604. *Streptomyces violaceusniger* YCED9 fue donada por el Dr. Sergio Trejo Estrada. *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Microbianos del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *E. coli* GM272 fue proporcionada por *E. coli* Genetic Stock Center.

El plásmido pRK2013 fue donado por el Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, del Centro de Investigaciones Sobre Fijación de Nitrogeno, UNAM. El plásmido pRK415 fue donado por la Dra. Laura Camarena Mejía, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

3. Medios y Condiciones De Cultivo

3.1 Medios para *E. coli*:

Para *E. coli* se usaron los siguientes medios y fueron incubados a 37°C a menos que se especifique lo contrario.

YT2X: Bactotripton 1.6 %, Extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, se ajusta a pH 7.2 y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

LB: Bactotripton 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, se ajusta a pH 7.0. En caso de ser LB sólido, se agrega 1.5% de Select Agar, Gibco BRL. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min.

3.2 Medios para *Streptomyces*

Para *Streptomyces* se usaron los siguientes medios y la incubación fue a 29°C.

M2: Glucosa 10g, Extracto de carne 1g, Casaminoácidos 4g, Extracto de Levadura 1g, se ajusta a pH 7.2 y se afora a 1lt. .

MN1: K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂-6H₂O 10.12g, Almidón 10.0g, Casaminoácidos 0.1g, elementos traza 2.0ml, extracto de levadura 5.0 gr, Tris base 3.0 gr, ajustar a pH 7.2. y se afora con agua destilada a 1 lt. Se coloca en alícuotas de 100 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

MS: Mannitol soya flour medium. Agar 20g, manitol 20g, harina de soya de tienda naturista 20gr, agua de la llave 1L. Disolver el manitol y la harina de soya en agua hasta que hierva. Hacer alícuotas de 100 ml con 2g de agar cada una de ellas. Autoclavear a 105°C durante 10min.

R2: Sacarosa 103gr, K_2SO_4 0.25gr, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Glucosa 10gr, Casaminoacidos 0.1gr, aforar a 80ml con agua desionizada. Colocar en alícuotas de 80 ml con 2.2 g de Bacto-Agar y se autoclave a $121^\circ C$ durante 15 min. Para preparar las cajas, se funde una alícuota y se añade KH_2PO_4 (0.5%) 1 ml, $CaCl_2 \cdot H_2O$ (3.68%) 8 ml, L-prolina (20%) 1.5 ml, Tris-Cl pH 7.2 (3%) 10 ml, Trazas R5 0.2 ml, NaOH 1N 0.2ml , Extracto de levadura (10%) 5 ml.

R5: K_2SO_4 0.25g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.12g, Glucosa 10.0gr, Casaminoacidos 0.1gr, elementos traza 2.0ml, extracto de levadura 5.0 gr, Tris base 3.0 gr, ajustar a pH 7.2 y se afora con agua destilada a 1 lt. Se coloca en alícuotas de 100 ml con 1.5gr de agar y se autoclave a $121^\circ C$ durante 15 min. Antes de usarse, se funde una alícuota y se complementa con KH_2PO_4 (0.5%) 1ml, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M) 0.4ml, L-prolina (20%) 1.5 ml, NaOH (1N) 0.2 ml, $CuSO_4$ (2mM) 0.2 ml.

SB almidón: Almidón 10 g, Extracto de carne 2 g, Extracto de levadura 2 g, bactotripton 2g, $FeSO_4$ 0.01 g, se ajusta a pH 7.2 y se afora a 1 litro con agua destilada. Se autoclave a $121^\circ C$ durante 15 min.

YEME: Yeast extract-malt extract medium. Extracto de levadura 3 g, Bactotripton 5 g, Extracto de malta 3 g, Glucosa 10 g, Sacarosa 340 g, se afora a 1L con agua destilada. Después de autoclavar adicionar 2.5 ml/Litro de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.5M. Para preparar protoplastos complementar con 25ml/Litro de glicina al 20%.

4. Purificación de DNA Total

Inocular un tubo con 3 ml de medio YT2X - glucosa 1% con 20-50 μl de esporas. Una vez que haya crecido se homogeneiza y se inocula un matraz con 30 ml de YT2X-glucosa 1% complementado con 1.75 ml de glicina al 10%. Se incuba a $29^\circ C$ de 36 a 48 horas hasta que el cultivo este bien crecido.

1. Centrifugar 7 min a 7500 rpm. Eliminar el sobrenadantes y resuspender el micelio en 3 ml de solución de lisozima (2.5 mg/ml) en Buffer TE 25mM.

2. Incubar a 37°C hasta que el micelio este bien lisado.
3. Añadir 4 ml de solución de Kirby 2X y agitar vigorosamente 1 min.
4. Añadir 8 ml de fenol-cloroformo 1:1, agitar 1 min y centrifugar 10 min a 10,000 rpm.
5. Transferir la fase acuosa muy viscosa a un tubo limpio acarreado la menor cantidad de interfase posible.
6. Añadir 3 ml de fenol-cloroformo 1:1, agitar 1 min y centrifugar 10 min a 10,000 rpm.
7. Repetir las extracciones con fenol-cloroformo hasta que la interfase se vea limpia. Hacer por lo menos 6 extracciones con fenol-cloroformo.
8. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 1/10 de volumen de acetato de Sodio 3 M y un volumen de isopropanol.
9. Recolectar el DNA utilizando una varilla de vidrio (spooling).
10. Una vez que este seco, Resuspender el DNA en un volumen adecuado de buffer TE pH 8 y agregar RNAsa a una concentración final de 40µg/ml e incubar 1 hora a 37°C.
11. Una vez que el DNA este bien resuspendido añadir un volumen de fenol-cloroformo, agitar y centrifugar como en el paso 6.
12. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir la extracción con fenol-cloroformo hasta que la interfase se vea limpia.
13. Precipitar como en el paso 8 y extraer por spooling.

Resuspender en un volumen máximo de 1 ml de TE.

4.1 Digestiones de DNA cromosomal

Para los experimentos de Southern Blot, se cargó en cada carril de un gel de agarosa al 0.8% 5µg de DNA cromosomal previamente digerido con las enzimas BamHI, SstI, MluI, PstI y SmaI (Gibco BRL) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

5. Purificación de Plásmidos y Recuperación de DNA de geles de agarosa

5.1 Protocolo para Minipreps

Se inoculó un tubo con 3ml de YT2X con una colonia de *E. coli* y se crece hasta saturación.

1. Obtener el paquete de células o micelio por centrifugación a 7500rpm por 10min.
2. Resuspender el paquete de células o el micelio en 100 μ l de Tris 25mM, EDTA 25mM pH= 8. En el caso de *Streptomyces* el TE 25mM debe contener lisozima (2mg/ml).
3. Para *E. coli* incubar 5 minutos en hielo. Para *Streptomyces* al menos media hora a 37°C o hasta que el micelio esté visiblemente lisado (debe ponerse translúcido y viscoso).
4. Añadir 200 μ l de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las minipreps de *Streptomyces*; en caso de que no se mezcle bien agitar unos 10 segundos aproximadamente en vórtex con los tubos invertidos (¡cuidado no se abran las tapas!). Incubar 10 minutos en hielo.
5. Añadir al tubo 150 μ l de acetato de potasio 3 M pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
6. Añadir al tubo 400 μ l de fenol\cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos a 14000 rpm..
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1ml de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur alargada acoplada a una línea de vacío, usando un matraz kitasato como trampa. Es necesario dar un segundo pulso en la microcentrífuga para eliminar todo el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 50 μ l de TE (Tris 10mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Añadir 150 μ l de acetato de sodio 4 M pH 6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C.

10. Centrifugar 10 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ l de isopropanol. Precipitar 10 minutos en hielo.
11. Centrifugar 10 minutos a 12000rpm. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ l de TE, añadir 5 μ l de acetato de sodio 3M pH=6 y 125 μ l de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
12. Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet y resuspenderlo en 25 μ l de TE.

5.2 Protocolo para Midipreps

Se inocula 30 ml de YT2X contenidos en un matraz de 125 ml y se crece a 37°C toda la noche.

1. Resuspender el paquete de células o el micelio en 1ml de Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH 8. En el caso de *Streptomyces* el TE 25mM debe contener lisozima 2mg/ml.
2. Para *E. coli* incubar 5 minutos en hielo. Para *Streptomyces* al menos media hora a 37°C o hasta que el micelio esté visiblemente lisado (debe ponerse translúcido y viscoso).
3. Añadir 2 ml de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las midipreps de *Streptomyces*; en caso de que no se mezcle bien agitar unos 10 segundos aproximadamente en vórtex con los tubos invertidos (¡cuidado no se abran las tapas!). Incubar 10 minutos en hielo.
4. Añadir al tubo 1.5 ml de acetato de potasio 3 M pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
5. Añadir al tubo 4 ml de fenol\cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos en la microfuga.
6. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 10 ml de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur alargada acoplada a una línea de vacío, usando un matraz kitasato como

trampa. Es necesario dar un segundo pulso en la microcentrifuga para eliminar todo el sobrenadante.

8. Resuspender el pellet en 500 μ l de TE (Tris 10mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Añadir 1.5 ml de acetato de sodio 4 M pH 6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C .
9. Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 2 ml de isopropanol. Precipitar 10 minutos en hielo.
10. Centrifugar 10 minutos. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 450 μ l de TE, añadir 50 μ l de acetato de sodio 3 M pH 6 y 1.25 ml de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
11. Centrifugar 10 minutos en la microfuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar el pellet y resuspenderlo en 250 μ l de TE.

5.3 Purificación de Fragmentos de DNA a partir de Gel de Agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP)

1. Preparar un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.6 o 0.8%.
2. Se pesa la agarosa y se disuelve en 1X TBE caliente.
3. Se vacía la agarosa en una charola para geles y se deja solidificar a 4°C durante 30 min.
4. Se cargan las muestras en el gel y se deja correr a 14 mA (miliamperes) toda la noche.
5. Al día siguiente se tiñe con bromuro de etidio y se cortan las bandas deseadas procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada.
6. Poner a fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a $65-70^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Calcular el volumen de la agarosa fundida y añadir 1/10 del volumen de NaCl 5 M. Mezclar bien y dejar otros 5 minutos en el baño.
7. Saturar fenol con NaCl de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf mezclar 100 μ l de NaCl 5M, 400 μ l de agua y 500 μ l de fenol. Centrifugar 1 minuto y retirar la fase acuosa. Colocar el fenol a 37°C .
8. Colocar la agarosa fundida 5 minutos a 37°C .

9. Añadir al tubo con la agarosa 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 segundos. Trabajar lo más rápido posible para evitar que la agarosa se gelifique.
10. Centrifugar 5 minutos en la microfuga, y pasar la fase acuosa a un tubo limpio.
11. Añadir al fenol 45 μ l de TE o agua y 5 μ l de NaCl 5M. Agitar en vórtex.
12. Centrifugar 2 minutos y mezclar la fase acuosa con la anterior.
13. Añadir 1 volumen de fenol\cloroformo a la fase acuosa, agitar 5 segundos en vórtex y centrifugar 2 min.
14. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el paso anterior, pero solamente con cloroformo.
15. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio. Añadir 10 μ g de tRNA (siempre y cuando el DNA no vaya a ser usado posteriormente para ser tratado con fosfatasa alcalina o con cinasa). Mantener a -20°C durante al menos 2 horas.
16. Centrifugar el DNA durante 10 minutos a 14,000 rpm. Sacar todo el alcohol con una punta amarilla. Tener mucho cuidado en no tirar el pellet, que normalmente es muy pequeño y tiende a despegarse de las paredes del tubo.
17. Secar el pellet.
18. Resuspender en un volumen adecuado de TE.

6. PCR

6.1 Reacción de PCR

Para la reacción de PCR se usó como templado DNA total de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 usando los oligos EryAF (GCACATCACCTCGACCAC) y EryAR (GCGACACCATCACGGAGAAC). Se utilizó para la reacción el PCR SuperMix de Gibco BRL de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

6.2 Purificación del producto de PCR

El producto de PCR se purificó mediante el kit Concert Rapid PCR Purification System, (Gibco BRL) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

7. SOUTHERN BLOT

7.1 Preparación de la sonda para Southern Blot

El producto de PCR se marcó con nucleótidos biotinilados utilizando el kit Bioprime DNA Labelling System de Gibco BRL, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

1. Desnaturalizar 100 ng DNA disueltos en 20 μ l de agua. Se calienta 5 minutos en agua hirviendo, e inmediatamente se coloca en hielo.
2. Se adiciona 5 μ l de una solución 10X de dNTP, 20 μ l Random Primer Solution, y H₂O a un volumen de 49 μ l.
3. Se mezclan perfectamente.
4. Adicionar 1 μ l de fragmento Klenow y se incuban a 37°C por 1hr.
5. Agregar 5 μ l de Stop Buffer.
6. Se prepara una columna de Sephadex G-50 en buffer TNE.
7. A la reacción de marcaje, se le agregan 20 μ l de azul dextran.
8. Se pasa la reacción con colorante por la columna y se recupera la fracción de azul dextran..
9. El DNA biotinilado que se va a usar como sonda eluye junto con el azul dextran.

Buffer TNE: Tris HCl pH8 10mM, Na₂EDTA 1mM, Azida de Sodio 0.01%.

7.2 Protocolo para Southern Blot

a) Gel de Agarosa

Los experimentos tipo Southern Blot se realizaron en geles de agarosa al 0.8%.

1. Para un gel de agarosa de 0.8% se pesan 0.8 g de agarosa por cada 100 ml de TBE 1X.
2. Se vacía la agarosa en una botella limpia y se adicionan 100 ml de TBE 1X.
3. Se calienta hasta que se disuelva completamente la agarosa.
4. Se vacía la solución en una charola para geles y se espera a que gelifique completamente a temperatura ambiente.
5. Una vez gelificado, se cargan las muestras que se van a correr en el gel y se corren a 70 amperes hasta que el colorante azul de bromofenol llegue al borde inferior del gel.
6. Se tiñen los geles en una solución de bromuro de etidio, se les toma una foto y se procede con el protocolo de transferencia para Southern Blot.

b) Transferencia

1. Lavar el gel en 5 volúmenes de HCl 0.25 M hasta que el colorante se vea amarillo (no mas de 15 minutos). Es importante que el gel este bien cubierto con la solución.
2. Inmediatamente poner el gel en 5 volúmenes de 1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH por 20 minutos para desnaturalizar el DNA.
3. Repetir el paso 2 con solución fresca.
4. Neutralizar en 5 volúmenes de 1.0 M Tris 1.5 M NaCl pHn 7.5 durante 20 minutos.
5. Repetir el paso 4 con solución fresca.
6. Cortar un pedazo de membrana de nylon del tamaño del gel. Humedecerla en agua desionizada y colocarla en solución 10X SSC 15 minutos antes de usarla.

7. En una plataforma de plástico o vidrio mas grande que el gel, se coloca el papel filtro Whatman 3M saturado con 10X SSC.
8. Colocar sobre el gel un pedazo de papel filtro del tamaño del gel humedecido en 10X SSC. Asegurarse de que no hay burbujas de aire atrapadas entre el papel y el gel. Se invierte y se coloca sobre la plataforma del paso 7 de manera que la parte inferior del gel quede expuesta sin papel filtro.
9. Poner la membrana de nylon del paso 6 sobre el gel. Es muy importante que no queden burbujas de aire entre la membrana y el gel.
10. Poner un pedazo de papel filtro seco sobre la membrana de nylon.
11. Colocar una serie de papeles absorbentes sobre el papel filtro y una pesa sobre estas.
12. Dejar la transferencia toda la noche.
13. Al día siguiente, remover la membrana de nylon y lavarla en 5X SSC por 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Poner la membrana en un papel filtro y hornearla a 70-80°C de 1-2 horas.

c) Hibridación

15. Poner la membrana en una bolsa de hibridación nueva.
16. Añadir 100 μ l de solución de prehibridación por cm^2 de membrana.
17. Colocar en un Eppendorf 20 μ l de DNA de timo a 10 μ g/ml de solución de hibridación. Hervir el tubo de DNA de timo 10 minutos y colocarlo en la solución de prehibridación.
18. Poner la solución del paso 17 en la bolsa de hibridación, sellarla e incubarla de 2-4 h a 70°C. La temperatura de incubación varia según el grado de severidad que se requiera.
19. Separar 100 μ l de solución de hibridación por cada cm^2 de membrana.
20. Colocar en un Eppendorf 20 μ l de DNA de timo a 10 μ g/ml por ml de solución de hibridación. Hervir el tubo de DNA de timo 10 minutos y colocarlo en la solución de hibridación.

21. En un Eppendorf colocar 50ng de sonda por ml de solución de hibridación del paso anterior. Hervir la sonda 10 minutos, enfriar en hielo y añadirla a la solución de hibridación.
22. Remover la solución de prehibridación de la bolsa y añadir la mezcla del paso anterior. Sellar la bolsa e incubar toda la noche de 37-70°C según la severidad deseada.

Para condiciones de alta severidad, lavar la membrana por 30 min con solución 2X SSC 0.5% de SDS a 55°C, por 5 min con 1X SSC 1% de SDS a 50°C y 5 min con 2X SSC. Para condiciones de baja severidad lavar la membrana por 30 min con 2X SSC a 65°C y 20 min con 1X SSC a 65°C.

d) Lavados

23. Remover la membrana de nylon de la bolsa de hibridación y colocarla en un contenedor de plástico.
24. Lavar la membrana por 1 min con 1ml/cm³ de TBS-Tween 20.
25. Humedecer la membrana en TBS-Tween 20.
26. Pasar las membranas a un contenedor nuevo, poner 0.75 ml/cm² de solución de bloqueo precalentada a 65°C. Incubar a 65°C 1hr con agitación.
27. Centrifugar el conjugado SA-AP20 por 30min a 4°C.
28. Tomar 7 µl del conjugado por cada 100 cm² de membrana. No tomar los pellets. Diluir el conjugado 1:1000 en TBS-Tween 20.
29. Sacar la membrana de la solución de bloqueo. En un recipiente limpio, colocar la membrana y añadir el conjugado diluido.
30. Incubar 10 min a temperatura ambiente en agitación lenta asegurándose que se cubra completamente la membrana.
31. Remover la membrana y lavar una vez con 1ml/cm² de TBS-Tween20 por 15 a temperatura ambiente. Repetir el lavado con solución nueva durante 1 h.
32. Lavar la membrana con 1ml/cm² de buffer de lavado en agitación lenta durante 1 h.

e) Detección

Para detectar el la sonda biotinilada e utilizó el kit Chemiluminiscent Nucleic Acid Detection System de Gibco BRL según las especificaciones del fabricante.

33. Remover la membrana del buffer de lavado y colocarla en un recipiente limpio.
34. Tomar 0.01ml/cm² de membrana del agente de detección y vaciarlo sobre la membrana de manera que se cubra completamente.
35. Pasar la membrana a una bolsa de hibridación nueva y sellarla perfectamente.
36. Incubarla 37°C durante 1 h en la oscuridad.
37. Exponer la membrana a una placa fotográfica durante 15 min.

SDS 10%: Se disuelven 20 gramos de SDS en agua caliente. Una vez disuelto se aforar a 200ml y se esteriliza a 105°C durante 15 min.

50X Denhardt: Ficoll 1%, Polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%, aforar con agua a 100 ml.

20X SSC: NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3M, ajustar a pH 7 y aforar a 1000ml. Esterilizar por filtración mediante un filtro milipore de 0.45µm.

TBS-Tween 20: Tris base 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05% v/v. Se disuelve lo anterior en agua desionizada, se ajusta a pH 7.5 y se afora a 1 litro. Se esteriliza por filtración mediante un filtro milipore de 0.45µm.

Solución de prehibridación: 3X SSC, 4X solución de Denhardt y 100µg/ml de DNA de Timo

Solución de hibridación: 3X SSC, 4X solución de Denhardt, 100µg/ml de DNA de Timo y sonda correspondiente al tamaño de la membrana.

Solución de bloqueo: Se disuelven 3g de BSA en 100ml de TBS-Tween 20.

Buffer de lavado: Tris base 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂-6H₂O 50mM, ajusta a pH 9.5 y se afora a 1 lt con agua.

DNA de Timo de Ternera: resuspender 13mg de DNA en 10 ml de H₂O. Una vez resuspendido se sonicó hasta que el DNA quede en fragmentos menores a 500pb. Se extrae 3 veces con fenol cloroformo y se precipita con un décimo del volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol. Se resuspenden a una concentración de 10mg/ml.

8. Secuenciación

La reacción de secuenciación se llevo a cabo de forma automática en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

8.1 Preparación del templado para secuenciar

Se inocula un matraz con 30ml de YT2X con una colonia de *E. coli* y se crece a 37°C toda la noche. Al día siguiente se purifico usando el kit Concert High Purity Plasmid Midiprep System de Gibco BRL, según las especificaciones del fabricante.

9. Análisis de la Secuencia

El análisis de preferencia de uso de codones se llevó a cabo con el programa "Codon Preference" que forma parte de la utiliería del programa Wisconsin Package Versión 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. El análisis tipo BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) se realizó desde el servidor del NCBI (National Center

for Biotechnology Information) (Altschul et. al. 1997). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa DNAMAN Versión 3.0, Lynnon Biosoft.

10. Conjugación y Transformación

10.1 Preparación de Células Competentes de *E. coli* por SEM

1. Se toman de 10 a 12 colonias de *E. coli* para inocular un tubo con 3 ml de YT2X con 30µl de sales (MgCl 1M MgSO₄ 1M) y se deja toda la noche a 37°C.
2. Se toman 100µl del inoculo y se ponen un matraz con 30 ml de YT2X con 300µl de sales.
3. Incubar a temperatura ambiente en agitación hasta que llegue a una D.O.₆₀₀ de 0.6.
4. Colocar el cultivo en hielo durante 10 minutos.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 9.6 ml de buffer TB enfriado en hielo y se incuban 10 minutos en hielo.
7. Centrifugar como en el paso 5. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 2.4 ml de TB.
8. Añadir DMSO hasta una concentración final de 7%. Incubar 10 minutos en hielo.
9. Se ponen alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf previamente enfriados en hielo.
10. Congelar inmediatamente sumergiendolas en hielo seco con etanol.
11. Almacenar congeladas a -70°C.

10.2 Transformación por SEM

1. Descongelar una alícuota de células competentes en hielo.
2. Agregar de 1-5 µl de la solución del plásmido y se incuban en hielo durante 10 minutos.
3. Se le da un choque calórico sin agitación a 42°C durante 30 segundos y se colocan en hielo.

4. Se agregan 0.8 ml de YT2X y se incuban a 37°C con agitación rápida durante 1 hora.
5. Centrifugar 3 minutos a 3000rpm.
6. Resuspender en 200 µl de YT2X y plaquear en cajas con LB con el antibiótico adecuado.

10.3 Conjugación

1. Preparar células competentes de *E. coli* GM272/pRK2013.
2. Transformar las células competentes con el derivado del vector pRK415.
3. Inocular una colonia en 3ml de YT2X con los antibióticos adecuados y crecerla toda la noche a 37°C en agitación.
4. Diluir el cultivo 1:100 en YT2X nuevo con los antibióticos adecuados y crecer a 37°C hasta que llegue a una D. O.₆₀₀ de 0.4-0.6.
5. Lavar las células dos veces con un volumen igual de YT2X y resuspender en 1 ml de LB.
6. Mientras se lavan las células de *E. coli*, añadir para conjugación aproximadamente 10⁸ esporas de *Streptomyces* en 500µl de YT2X, dar un choque térmico a 50°C por 10 min y enfriar a temperatura ambiente. Si se usan fragmentos miceliarios para conjugación, cosechar a partir de un cultivo de 3 o 4 días. Agitar bien y usar 0.5 ml de fragmentos miceliarios para cada conjugación.
7. Añadir 500µl de células de *E. coli* a 500µl de esporas o fragmentos miceliarios. Mezclar bien y centrifugar durante a 3 min a 3000 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100µl de YT2X.
8. Plaquear en MS sólido e incubar a 30°C de 16 a 20hrs.
9. Vaciar sobre las placas 1ml de agua con 0.5mg de ácido nalidíxico y la concentración adecuada del antibiótico para seleccionar *Streptomyces*. Continuar la incubación a 30°C.
10. Tomar las colonias exconjugantes y pasarlas a un medio selectivo conteniendo ácido nalidíxico a 25µg/ml.

10.4 Transformación de *Streptomyces*

1. Crecer las esporas en 25ml de YEME suplementado con $MgCl_2$ 1M (0.125ml) y glicina al 10% (1.25ml) durante 36 horas a 29°C con agitación.
2. Lavar el micelio con sacarosa al 10.3%. Centrifugar 5 min a 3500 rpm. eliminar el sobrenadante y resuspender en 25ml de sacarosa al 10.3%.
3. Distribuir en 5 tubos y centrifugar como en el paso anterior, eliminar el sobrenadante y congelar el micelio a -20°C.
4. Suplementar el buffer P y dejar reposar 30 min. Tomar 5ml de éste y disolver 5mg de lisozima. Filtrar el buffer P y después los 5 ml de lisozima.
5. Descongelar el micelio y agregarle el filtrado de lisozima, mezclar e incubar a 30°C por 1 hora agitando suavemente cada 15 min.
6. Tomar una muestra para ver al microscopio y asegurarse que se hayan formado los protoplastos.
7. Filtrar los protoplastos por un filtro para esporas, en ese mismo filtro agregar 5ml de buffer P y pasarlos a un tubo de vidrio para protoplastos. Centrifugar 12 min a 3500 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante completamente y resuspender el pellet. Agregar la mitad de la ligación o 5µl de plásmido purificado e inmediatamente después agregar 0.6ml de PEG (disuelto en 1.5ml de buffer P) con una pipeta Pasteur mezclando 4 o 5 veces. Agregarle 5 ml de buffer P y centrifugar 12 min a 3500 r.p.m.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender con los nudillos para luego agregarle 0.3ml de buffer P.
10. Hacer las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .
11. Poner 0.1 ml de la dilución en cada caja de R2 suplementado y 2.5 ml de agar suave. Cubrir completamente la superficie, dejar gelificar e incubar a 30°C entre 18 y 20 hrs.
12. Agregar el antibiótico correspondiente e incubar nuevamente a 30°C por 1 semana hasta que las colonias esporulen.
13. Hacer sectores a partir de colonias aisladas en cajas de R5 suplementado con el antibiótico adecuado, incubar a 30°C hasta que esporule para hacer minipreps.

Buffer P: Sacarosa 51.5gr, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.01 gr, K_2SO_4 0.125gr, aforar a 400ml, distribuir en alícuotas de 40ml y autoclavar a $121^\circ C$ durante 15 min. Antes de usar suplementar con Trazas R5 0.1ml, KH_2PO_4 (0.5%) 0.5ml, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%) 5ml y Tris Cl (3%) 5ml.

11. Identificación del Antibiótico

11.1 Bioensayo para identificar nigericina en sobrenadantes de cultivo

1. Inocular 3ml de YT2X sin glucosa con $20\mu l$ de esporas de *S. violaceusniger* NRRL B-1476.
2. Crecer el inóculo 3-4 días a $28^\circ C$ en agitación.
3. Homogenizar el cultivo anterior para inocular un matraz con 100ml de medio MN1. Crecer de 5 a 7 días a $28^\circ C$ en agitación.
4. Crecer una colonia de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en 3 ml de YT2X toda la noche.
5. Al día siguiente se toma 0.1 ml del preinóculo y se crece en 3 ml de YT2X hasta una $D.O_{600}$ 0.6.
6. Toman .5 ml del cultivo anterior para inocular 100ml de LB-Agar precalentado a $40^\circ C$ y se vacía en cajas de petri.
7. Se toman $20\mu l$ de sobrenadante del cultivo de *Streptomyces* y se colocan en discos de papel filtro estériles.
8. Una vez secas las cajas se colocan los discos de papel filtro y se incuban a $30^\circ C$ toda la noche.

11.2 Cromatografía en Capa Fina de nigericina (TLC)

1. Se toman 5 ml de sobrenadante de cultivo y se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min.
2. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 2ml de acetato de etilo. Se agita durante 1 min y se centrifuga como en el paso anterior.

3. Tomar la fase orgánica y pasarla a un tubo limpio. Secar con aire hasta que el acetato de etilo se haya evaporado completamente.
4. Añadir 1 ml de metanol y secar con aire como en el paso anterior.
5. Resuspender el precipitado blanco en 10-15µl de isopropanol.
6. Cargar la placa de TLC con la muestra del paso anterior.
7. Correr la placa usando como solvente de separación hexano-isopropanol 2:8.
8. Una vez que termine de correr, rociar la placa de TLC con el reactivo de vainillina.
9. Hornear la placa durante 5 min a 100°C.

Reactivo de Vainillina: Se disuelven 0.3 gr de vainillina en 5ml de metanol absoluto. Adicionar 50 µl de H₂SO₄ concentrado y se afora a 10ml con metanol absoluto. Se mezcla bien y se guarda en un frasco ámbar. Este reactivo se prepara justo antes de revelar la placa y se tiene que prepara nuevo todos los días.

IV. RESULTADOS

1. Predicción de la Estructura Modular de la PKS de Nigericina

Con base en la estructura del intermediario polieno de nigericina y la forma en que son sintetizados los policétidos de tipo I (Khosla, et al., (1999), es posible realizar una predicción de las características generales de la PKS que sintetizaría este compuesto. Dentro de estas características se encuentran el número y tipo de unidades extensoras necesarias para la construcción de este antibiótico, así como las actividades enzimáticas participantes tanto en la condensación de las unidades extensoras como en la reducción de los enlaces cetónicos en cada uno de los módulos. El conocimiento de la estructura modular de esta PKS de tipo I será de gran ayuda durante el proceso de clonación de la misma.

Para generar una estructura como la nigericina se requiere una PKS de 14 módulos sin contar el dominio de carga. En promedio, cada módulo estaría codificado en 5 kb de DNA, por lo tanto la región de DNA que codifica para una PKS de este tamaño tendría un tamaño de alrededor de 70 – 80kb. Las unidades extensoras que utilizaría esta PKS son malonil y metil malonil-CoA para generar residuos de acetato y propionato, respectivamente, en la cadena carbonada.

2. Características Generales de los Dominios Enzimáticos

Las PKS de tipo I son enzimas modulares donde cada módulo posee las actividades enzimáticas necesarias para determinar tanto el tipo de unidad extensora que se va a usar en cada paso de síntesis como el grado de reducción que va a sufrir el carbono β en cada condensación. Los módulos necesarios para sintetizar un compuesto como la nigericina deberían poseer por lo menos las actividades de proteína acarreadora de acilos (ACP), β -ceto sintasa (KS) y acil transferasa (AT). Los dominios de cetoreductasa (KR), dehidratasa (DH) y enoil reductasa (ER) pueden o no estar presentes dependiendo del grado de reducción que vaya a sufrir el carbono β en ese módulo.

2.1 Dominio de Proteína Acarreadora de Acilo (ACP)

Las proteínas acarreadoras de acilos (ACP) poseen un brazo de panteteína al cual se une la cadena de acilo durante la síntesis de ácidos grasos o policétidos. Dicho radical, se une a un residuo de serina en el motivo LGXDSLXXVE, presente en la mayoría de las ACP (Donadio et. al., 1991). Debido a que en todos los módulos es indispensable el dominio de ACP, en todos los módulos estaría presente el motivo típico de unión a fosfopanteteína ya reportado.

2.2 Dominio Ceto acil sintasa (KS)

En todos los módulos de la PKS de nigericina se espera un dominio de KS antes que el dominio de ACP. Como la función del dominio de KS es adicionar la unidad extensora en cada módulo mediante una reacción de condensación, se espera encontrar la secuencia consenso del sitio activo TVDTGCSSLV en cada uno de estos dominios. Asimismo, estos dominios presentarían una homología muy alta entre ellos y contra otros dominios de KS de otras PKS de tipo I.

2.3 Dominio de Acil Transferasa (AT)

La PKS de nigericina usaría malonil CoA como unidad extensora en los módulos 3, 6, 10, 11, 12 y 14. Por lo tanto es de esperarse que los módulos antes mencionados contengan un dominio que alinee con el consenso para AT específicas para malonil-CoA. Los módulos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 13 y 14 presentan metil malonil-CoA como unidad extensora para la PKS de nigericina. Por lo tanto se espera que la AT de estos módulos contenga una secuencia que alinee con el consenso del motivo específico para metil malonil-CoA.

2.4 Dominio de Ceto Reductasa (KR)

En la PKS de nigericina se espera encontrar actividad de KR en todos los módulos exceptuando los módulos 1 y 9. En estos módulos el enlace cetónico del carbono 2 no sufre ningún tipo de reducción. Se ha reportado que en los dominios de KR se encuentra presente el motivo típico de unión a NADP(H) GXXGXXAXXA (Donadio et. al., 1991). Debido a esto, se esperaría la presencia de este motivo en los módulos que presentan esta actividad.

2.5 Dominio de Deshidratasa (DH)

Todos los módulos de la PKS de nigericina, exceptuando los módulos 1, 9, 10, 11 y 12, presentarían actividad de DH. Es de esperarse que la secuencia consenso del sitio activo HXXXGXXXP este presente en la PKS en casi todos los módulos. Se ha reportado que en módulos que carecen de actividad DH el sitio activo contiene deleciones de 5 aminoácidos (Donadio et. al., 1991). De modo que los módulos que carecen de actividad de DH en la PKS de nigericina se espera una deleción o el cambio de algún residuo crítico en la secuencia consenso del sitio activo.

2.6 Dominio de Enoil Reductasa (ER)

Esta actividad estaría presente en los módulos 2, 4, 6, 8 y 13 de la PKS de nigericina. Por tanto se espera encontrar en los módulos antes mencionados una secuencia de unión a NADP(H). La falta del dominio de ER activo en los módulos 3, 5, 7 y 14 determina la generación del doble enlace entre los carbonos 6-7, 10-11, 14-15 y 28-29 respectivamente.

3. Estructura Modular de la PKS de Nigericina

3.1 Módulo de carga

Los primeros 4 adiciones en la cadena carbonada de nigericina son acetato, propionato, propionato y acetato. Estas forman la estructura típica $A_1P_2P_3A_4$ ya descrita para los poliésteres. Como el residuo que va a dar inicio a la cadena policétida de nigericina es un residuo de acetato, se espera que el dominio de carga de esta PKS tenga selectividad por malonil-CoA. Con base en esto, la AT del dominio de carga o AT0 se esperaría que tuviera algún motivo parecido al consenso ya reportado para las AT de malonil-CoA (Haydock et al., 1995) (Fig 13).

3.2 Módulo 1

La adición de la primera unidad de extensión como tal se da por la condensación de metil malonil-CoA en el módulo 1. Dicha condensación sin epimerización genera un residuo de propionato en la cadena carbonada con un radical D-metilo saliente. El residuo cetónico proveniente del dominio de carga se conserva en la estructura final de nigericina. Esto indica que en el modulo 1 las actividades de KR, DH y ER no son activas, de modo que el enlace cetónico no presenta ningún tipo de reducción (Fig 12).

3.3 Módulo 2

La segunda unidad extensora es metil malonil-CoA, en esta adición se genera un segundo residuo de propionato en la cadena carbonada con un radical D-metilo saliente al igual que en el módulo 1. Debido a que el residuo cetónico del carbono 4 se encuentra completamente reducido las actividades de KR, DH y ER se encuentran activas en este módulo (Fig 12).

3.4 Módulo 3

Con la adición de la tercera unidad extensora de malonil-CoA, al igual que en dominio de carga se introduce un residuo de acetato en la cadena carbonada. En este caso,

se genera un doble enlace en la cadena que se va sintetizando. Esto indica que en este módulo las actividades de KR y DH son activas. Estas son responsables de la reducción del radical ceto a un radical hidroxilo (KR) y la reducción de dicho hidroxilo para formar el doble enlace (DH). La actividad de ER no se encuentra presente en este módulo (Fig 12).

3.4 Módulo 4

La cuarta unidad extensora es metil malonil-CoA. A partir de ésta se adiciona un residuo de propionato en esta posición. La KS4 realiza la primera condensación con epimerización de modo que encontramos un radical L-metilo saliente en el carbono α . El residuo cetónico del carbono β se encuentra completamente reducido. Por lo tanto, las actividades de KR, DH y ER se encuentran activas en este módulo (Fig 12).

3.6 Módulo 5

La quinta unidad extensora es metil malonil-CoA, generando un residuo de propionato en la cadena carbonada. La KS5 realiza una condensación sin epimerización dejando un radical D-metilo saliente en el carbono α . En este módulo las actividades de KR y DH son funcionales, lo que genera un doble enlace entre los carbonos α y β . Así mismo, al igual que en el módulo 3 este módulo no presenta actividad de ER (Fig 12).

3.7 Módulo 6

La sexta unidad extensora es malonil-CoA, la cual genera un residuo de acetato al incorporarse en la cadena policétida. En este módulo, las actividades de KR, DH y ER se encuentran activas, lo que genera una reducción total del residuo cetónico del carbono β (Fig 12).

3.8 Módulo 7

La séptima unidad extensora es metil malonil-CoA. La KS7 adiciona un residuo de propionato y con un radical D metilo saliente en la cadena carbonada. Asimismo, se genera

un doble enlace entre los carbonos α y β lo que indica que solo las actividades de KR y DH están presentes en este módulo (Fig 12).

3.9 Módulo 8

La octava unidad extensora es metilmalonil-CoA incorporando un residuo de propionato en la siguiente posición. La condensación se realiza sin epimerización generando un radical D metilo saliente. Como el residuo cetónico del carbono β se encuentra totalmente reducido, esto indica la presencia de actividades de KR, DH y ER en este módulo (Fig 12).

3.10 Módulo 9

La novena unidad extensora es metil malonil-CoA, donde la KS9 adiciona un residuo de propionato en la cadena carbonada. Como en el módulo anterior, la condensación se da sin epimerización generando el radical D metilo saliente. En este caso, el carbono β presenta un residuo cetónico. Esto nos indica que en este módulo no hay actividades de KR, DH y ER presentes (Fig 12).

3.11 Módulos 10, 11 y 12

Las tres siguientes unidades extensoras son malonil-CoA. Esto genera la adición de 3 residuos de acetato seguidos en la cadena carbonada. Se observa la presencia de radicales hidroxilo en el carbono β después de cada condensación. Esto indica que los módulos 10, 11 y 12 presentan las mismas actividades enzimáticas. Por un lado poseen la misma selectividad por la unidad extensora y poseen solo la actividad de KR, la cual causa la reducción del grupo cetónico después de cada adición para convertirlo en un grupo hidroxilo (Fig 12).

3.12 Módulo 13

La siguiente unidad extensora es metil malonil-CoA. La KS13 adiciona un residuo de propionato en la cadena carbonada y al igual que en el módulo 4, la KS 13 realiza una

condensación con epimerización, produciendo un radical L-metilo saliente en el carbono α . Como el carbono β se encuentra completamente reducido, las actividades presentes en este módulo son KR, DH y ER (Fig 12).

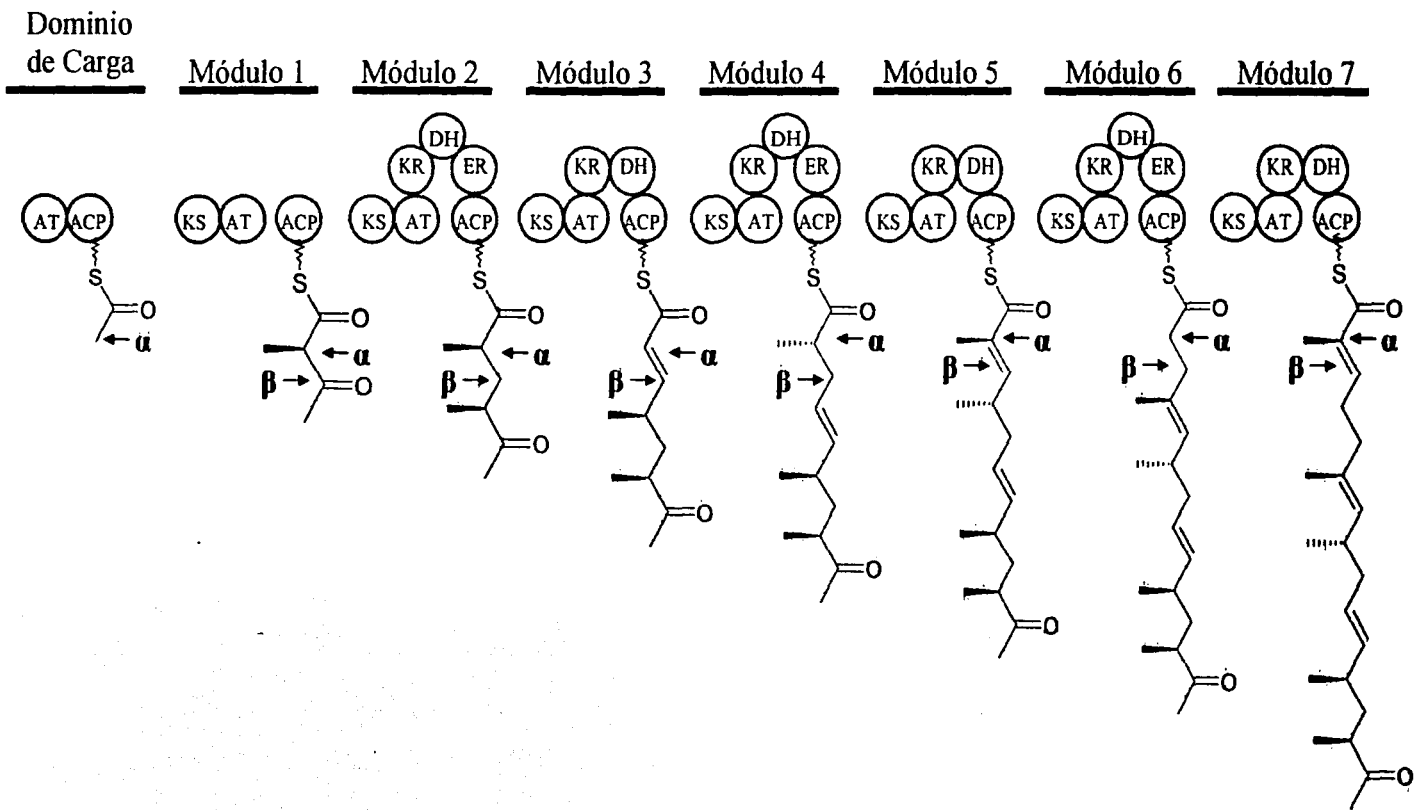
3.13 Módulo 14

Este es el último módulo de la PKS de nigericina. En este módulo, la unidad extensora es metil malonil CoA donde la KS14 adiciona un residuo de propionato en la última reacción de elongación de la cadena. La KS14 realiza una condensación sin epimerización generando un radical D metilo saliente en el carbono 2. Así mismo, la presencia de un doble enlace entre el carbono α y β nos indica que están presentes las actividades de KR y DH en este módulo (Fig 12).

3.14 Dominio de Tioesterasa (TE)

Después del módulo 14 se espera la presencia de un dominio de TE cuya función sea liberar la cadena carbonada de la PKS (Fig. 12) para que se lleven a cabo diversas modificaciones químicas que le van a dar la estructura final al antibiótico (Fig 14). Para la síntesis de algunos macrólidos como la picromicina y metimicina algunas PKS de tipo I poseen dos actividades de TE (Xue et.al., 2000). Una de ellas se encuentra codificada justo después del dominio de ACP del último módulo en el mismo polipéptido y otra está codificada en un polipéptido diferente. En la gran mayoría de las PKS de tipo I ya caracterizadas la actividad de tioesterasa (TE) se encuentra codificada justo después del dominio de ACP del último módulo en el mismo polipéptido. En el caso de la PKS de monensina, la actividad de TE parece estar codificada en dos genes diferentes a los que codifican para las proteínas modulares de la PKS (Leadlay et al., 2001).

Con base en la estructura de la nigericina, es imposible predecir si la actividad de SE TE encuentra codificada en el mismo polipéptido modular de la PKS o bien en uno o varios polipéptidos diferentes. Aun así, su presencia es indispensable para liberar la molécula carbonada de la PKS.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. PKS de nigericina. Violeta: Grupo adicionado por el módulo de carga. Rojo: Grado de reducción que sufre el carbono β en cada módulo. Azul: Propionato adicionado después de la condensación donde se origina un nuevo carbono α . Verde: Acetato adicionado después de la condensación donde se origina un nuevo carbono α .

Módulo 8

Módulo 9

Módulo 10

Módulo 11

Módulo 12

Módulo 13

Módulo 14

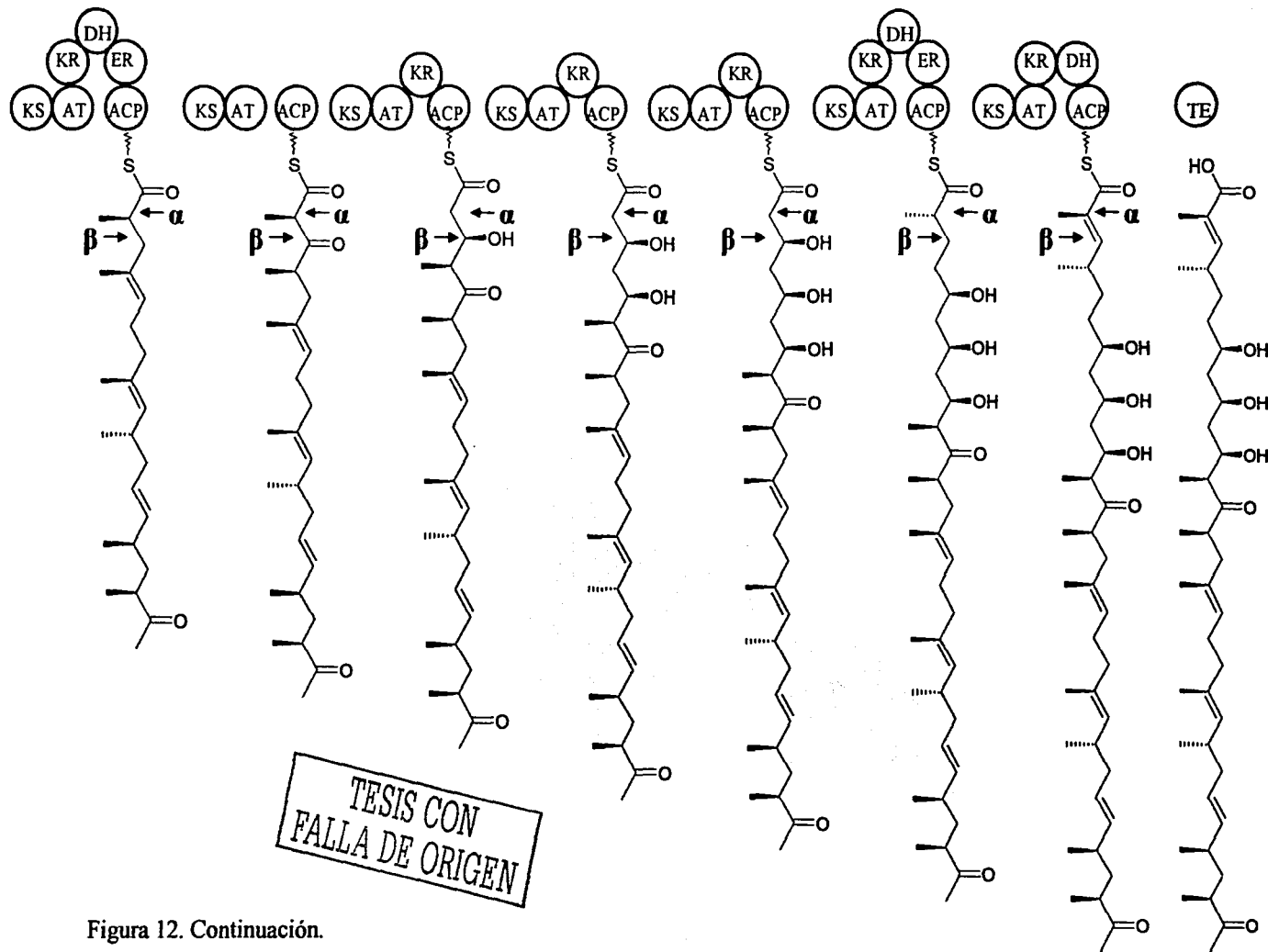


Figura 12. Continuación.

4. Formación de la Estructura Final de Nigericina

Una vez que la actividad de TE haya liberado el policétido lineal de la PKS de nigericina, éste será sustrato de diversas modificaciones químicas que formaran los anillos de tetrahydrofurano y tetrahydropirano presentes en la estructura final del políeter.

Dentro de la PKS la cadena carbonada se encuentra inmersa en un ambiente protegido del medio celular. Cuando es liberado de la PKS por la acción de la TE es probable que esta molécula carbonada cambie su conformación lineal (Fig. 13a) a una estructura mucho más estable dentro del medio celular. Esta nueva conformación del polieno sería sustrato de una isomerasa específica que atacaría uno de los cuatro dobles enlaces presentes en la cadena carbonada. La isomerización del doble enlace en trans, de los carbonos 2-3 a su conformación en cis, generaría un intermediario polieno que daría pie a la generación del intermediario epoxidado de nigericina. Esta reacción de isomerización se llevaría a cabo por una enzima codificada en un gen dentro del mismo grupo de genes de biosíntesis que la PKS de nigericina (Fig. 13b).

Para formar este compuesto epoxidado se requiere la actividad de una epoxidasa que en presencia de O_2 , atacaría los dobles enlaces del polieno para convertirlos en grupos epóxido. Es muy probable que esta enzima esté codificada dentro del mismo grupo de genes biosintéticos, tal como se ha reportado para el políeter monensina (Leadlay et. al., 2001). Una característica interesante de esta reacción es que la formación de los enlaces epóxido ocurre en puntos específicos de la molécula. Aunque el polieno de nigericina posee cuatro dobles enlaces solamente serían epoxidados tres de ellos. Estos están localizados al final de la molécula entre los carbonos 16-17, 20-21 y 24-25, es muy importante recalcar el hecho de que no ocurre epoxidación en el doble enlace localizado entre los carbonos 2 y 3 (Fig 13c y d).

Una vez formado el intermediario epoxidado comenzarían una serie de reacciones químicas que dan origen a la formación de los seis anillos presentes en la molécula de nigericina. El primero de ellos, es un anillo de tetrahydropirano que se formaría mediante un ataque nucleofílico del hidroxilo presente en el carbono 7 contra el doble enlace entre los

carbonos 2-3. Este ataque daría como resultado un enlace éter entre los carbonos 3 y 7 formando el primer anillo de tetrahidropirano (Fig 13e)

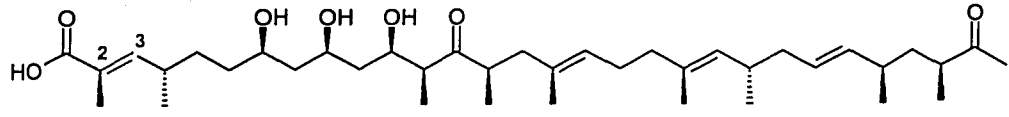
El segundo anillo de tetrahidropirano se forma mediante un mecanismo similar al anterior. El hidroxilo presente en el carbono 9 realiza un ataque nucleofílico contra el carbono 13 que posee un residuo cetónico (Fig. 13e). Este ataque resulta por un lado en la síntesis de un enlace éter entre el carbono 9 y el carbono 13, que forman el segundo anillo de tetrahidropirano y generan un radical hidroxilo saliente en el carbono 13. La presencia de un grupo hidroxilo en esta posición es indispensable para la formación de los últimos anillos de nigericina.

La síntesis de los siguientes 3 anillos se realiza mediante una reacción en cadena previamente reportada para la monensina (Leadlay et. al., 2001). Esta reacción comienza con un ataque nucleofílico del oxígeno presente en el enlace epóxido de los carbonos 20-21 contra el grupo epóxido presente en los carbonos 24-25. Este ataque resulta por un lado, en la formación de un carbanión en el carbono 20 y en otro ataque nucleofílico por parte del oxígeno del grupo epóxido de los carbonos 24 y 25 contra el grupo cetónico presente en el carbono 29 (Fig. 13f). Como resultado final se genera un carbanión en el carbono 20, el primer anillo de tetrahidrofurano mediante un enlace éter entre los carbonos 21-24, el último anillo de tetrahidropirano mediante un enlace éter entre los carbonos 25-29 y la un grupo hidroxilo en el carbono 29 (Fig. 13g).

La formación de los últimos dos anillos de tetrahidrofurano se realiza mediante un ataque nucleofílico del oxígeno del grupo epóxido restante contra el carbanión en la posición 20 (Fig. 13g). Este ataque resulta en la síntesis de un enlace éter entre los carbonos 17 y 20 que forma un anillo de tetrahidrofurano y la generación de un segundo carbanión en el carbono 16. El metilo del carbono 20 cambia su quiralidad como resultado del ataque nucleofílico desplazándose a la parte posterior de la molécula (Fig. 13h). Para la formación del último anillo de tetrahidrofurano, el carbanión del carbono 20 sufre un ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo del carbono 13 generando un enlace éter entre los carbonos 13 y 16 (Fig. 13h).

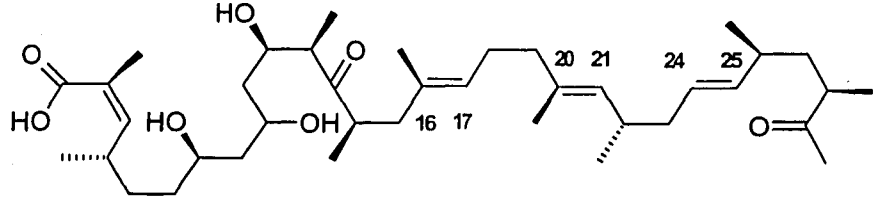
Una vez formados todos los anillos éter sobre la estructura carbonada, se realizan dos últimas modificaciones químicas. La primera de ellas es una metilación sobre el grupo hidroxilo unido al carbono 11. La metilación de este hidroxilo da como resultado un enlace éter en esta posición (Fig 13i). Esta reacción es muy posible que se lleve a cabo por una metil transferasa específica que se encuentre dentro del cluster de biosíntesis de este antibiótico. El compuesto que se genera es el antibiótico conocido como grisorixina (Fig. 13j). Este parece ser el último precursor para la biosíntesis de nigericina (Mouslim et al., 1995).

La última modificación que se lleva a cabo es una hidroxilación sobre el grupo metilo unido al carbono 29 del antibiótico grisorixina. Esta hidroxilación sería realizada por una enzima específica, que también puede estar codificada dentro del cluster de biosíntesis de nigericina. La presencia de este hidroxilo es la única diferencia entre la grisorixina y la nigericina (Fig. 13k).



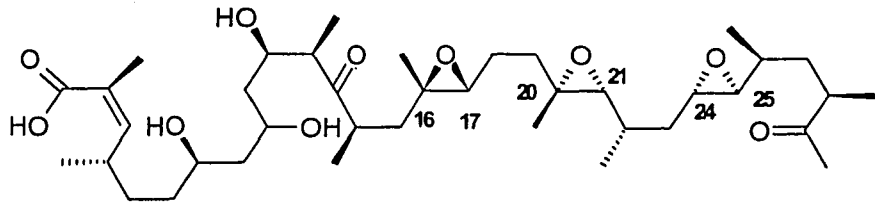
a) Policétido lineal

Cambio conformacional
Isomerización de doble enlace



b) Policétido sustrato de epoxidasa

Epoxidación

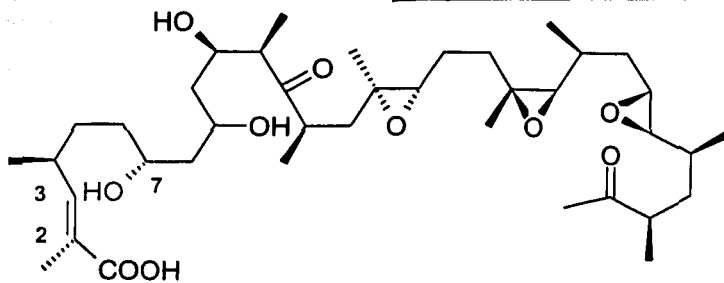


c) Intermediario epoxidado de nigericina

Cambio conformacional

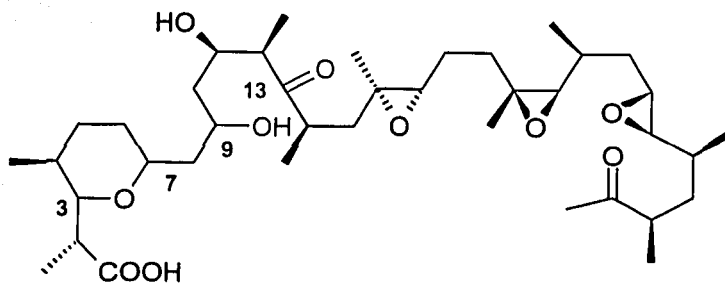
Figura 13. Formación de la estructura final de nigericina. Rojo: número de los carbonos y grupos participantes en una modificación química. Azul: número de los carbonos y grupos resultantes de la modificación química.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



d) Intermediario epoxidado de nigericina

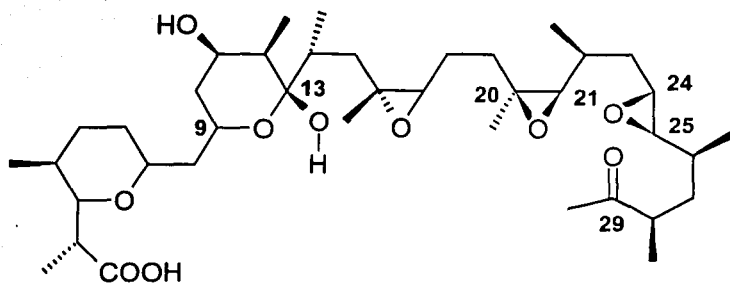
Ataque nucleofílico:
Hidroxilo sobre doble enlace



e) Primer anillo de tetrahidropirano

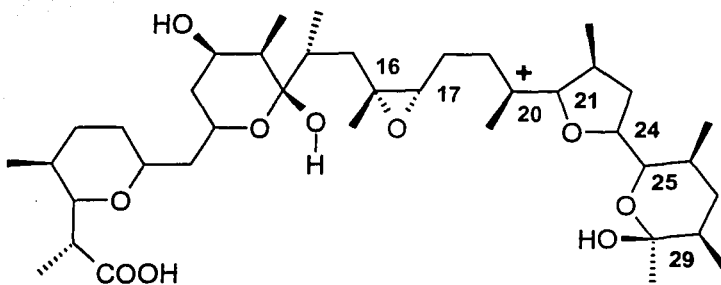
Ataque nucleofílico:
Hidroxilo sobre grupo cetónico

Figura 13. Continuación



f) Segundo anillo de tetrahidropirano

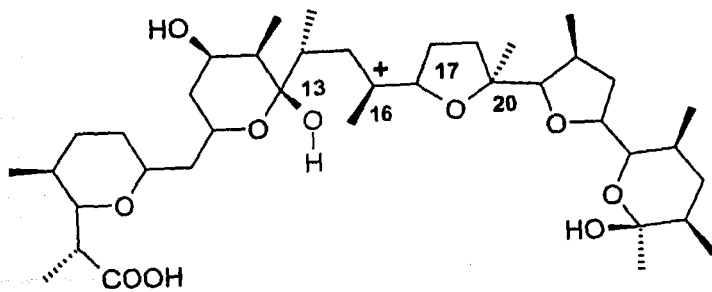
Ataque nucleofílico:
Epóxido sobre epóxido
Epóxido sobre grupo cetónico



g) Tercer anillo de tetrahidropirano
Primer anillo de tetrahydrofurano

Ataque nucleofílico:
Epóxido sobre carbanión

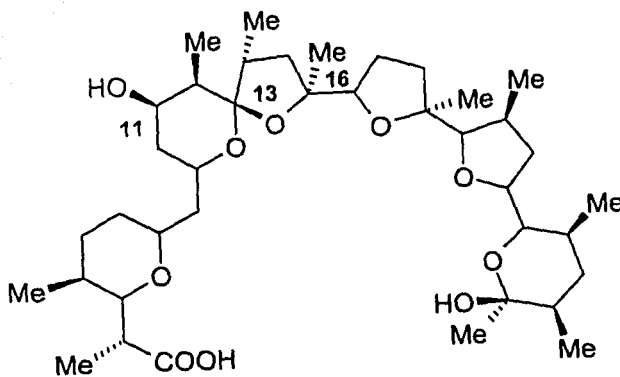
Figura 13. Continuación.



h) Segundo anillo de tetrahidrofurano

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

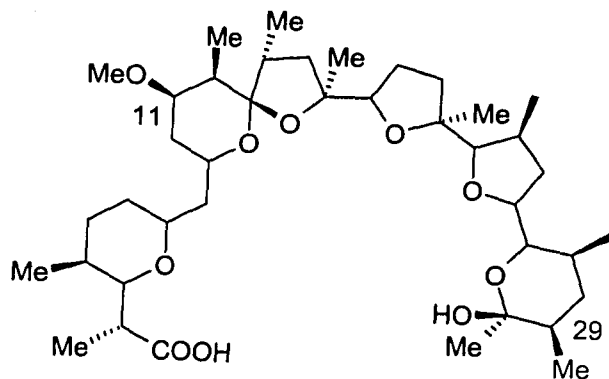
Ataque nucleofílico
Hidroxilo sobre carbanión



i) Metilación

Metilación
Metilación sobre el grupo hidroxilo

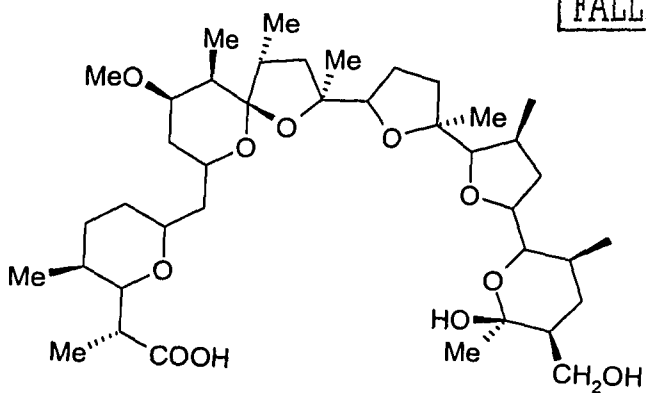
Figura 13. Continuación



j) Grisorixina

Hidroxilación
Hidroxilación del radical Metilo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



k) NIGERICINA

Figura 13. Continuación

5. Clonación de un Fragmento De PKS Tipo I De *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476

Debido al gran tamaño de las PKS de tipo I, la estrategia usual para la clonación de estos genes se basa en la construcción de una biblioteca de cósmidos en *E. coli* a partir de DNA cromosomal de *Streptomyces*. Para buscar colonias en estas bibliotecas que contengan genes de PKS de tipo I se ha reportado en la literatura el uso de un fragmento SmaI-SmaI de 2kb del gen DEBS3 de *Saccharopolyspora erythraea* como sonda heteróloga. (Stassi, 1997; Kinashi, 2000).

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 2.2 kb que contiene la región del gen DEBS3 que ha sido usada como sonda heteróloga en diversos trabajos. Para esta reacción se utilizó como templado DNA total de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 (Fig 14). Este fragmento fue purificado y digerido con las enzimas de restricción ApaI, NotI y SmaI para determinar por restricción que fuera el fragmento deseado. Al comprobar que el patrón de restricción era el esperado se marcó para ser utilizado como sonda para experimentos tipo Southern Blot (ver Materiales y Métodos). Esta sonda heteróloga se utilizó para buscar un fragmento de DNA que pueda usarse como sonda homóloga de PKS de tipo I en *S. violaceusniger* NRRL B-1476

Para los experimentos de Southern Blot se extrajo DNA total tanto de *S. violaceusniger* NRRL B1476 como de la cepa productora de nigericina *S. violaceusniger* YCED9 y se digirió con las enzimas BamHI, MluI, PstI y SstI. Como control de hibridación se cargó 1ng del PCR utilizado como sonda y como control positivo DNA total de *S. erythraea* NRRL 2338 digerido con SmaI.

El primer experimento se realizó en condiciones de baja severidad buscando secuencias de alrededor de 50% de homología con la sonda de PKS. Como se puede observar, se obtuvieron diversas bandas que dan señal con la sonda (Fig. 15a). Muchas de las bandas intensas que aparecen bajo estas condiciones de hibridación probablemente corresponden tanto a genes de PKS como a genes de FAS. Esto se debe al alto grado de

homología que existe entre los genes de PKS con los genes de FAS, y entre los mismos módulos de PKS (Donadio et al., 1991). En condiciones de baja severidad no fue posible identificar bandas que correspondan específicamente a genes de PKS.

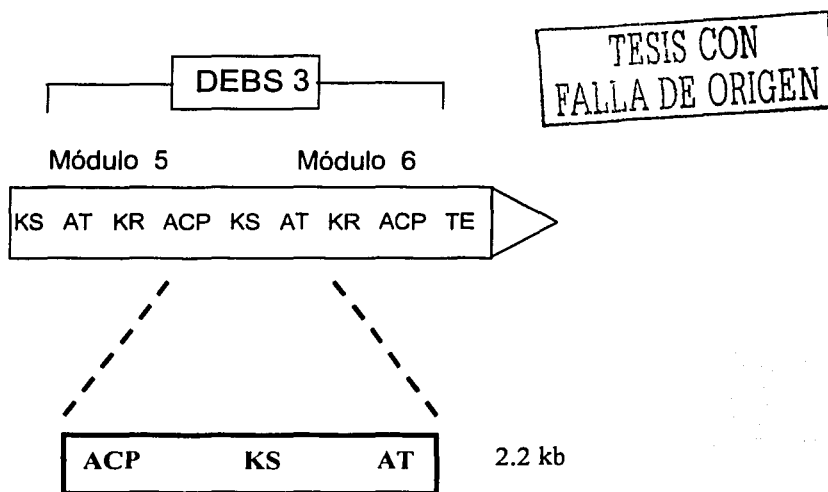


Figura 14. Esquema del fragmento de DNA utilizado como sonda heteróloga. Usando como templado DNA cromosomal de *S. erythraea* NRRL 2338 se amplificó por PCR un fragmento de 2.2 kb del gen DEBS3 que codifica las actividades de ACP5, KS6 y AT6 del la proteína DEBS3 de la PKS de tipo I de eritromicina. Negro: templado para el PCR. Azul: Fragmento amplificado de 2.2 kb.

Bajo condiciones de alta severidad, buscando secuencias con mas de 80% de homología con la sonda se identificaron un número mucho menor de bandas. No se identificaron bandas en las digestiones de DNA cromosomal de *Streptomyces violaceusniger* YCED9. Por el contrario, en las digestiones de DNA cromosomal de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B1476 se identificaron de 2 a 4 bandas en cada digestión. Particularmente, la digestión con BamHI presenta claramente dos bandas de aproximadamente 2.7 kb y 5.5 kb. Estas dos bandas presentan una señal más fuerte que las bandas encontradas en las digestiones con MluI, PstI y SstI. Tanto el control positivo como el control de hibridación muestran una señal de hibridación muy fuerte. La digestión de

el control de hibridación muestran una señal de hibridación muy fuerte. La digestión de DNA cromosomal de *S. erythrea* digerido con *Sma*I presenta un patrón de 7 bandas muy intensas. Estas bandas pertenecen a los módulos de la PKS de eritromicina que ya han sido caracterizados (Donadio et. al., 1991) (Fig 15b).

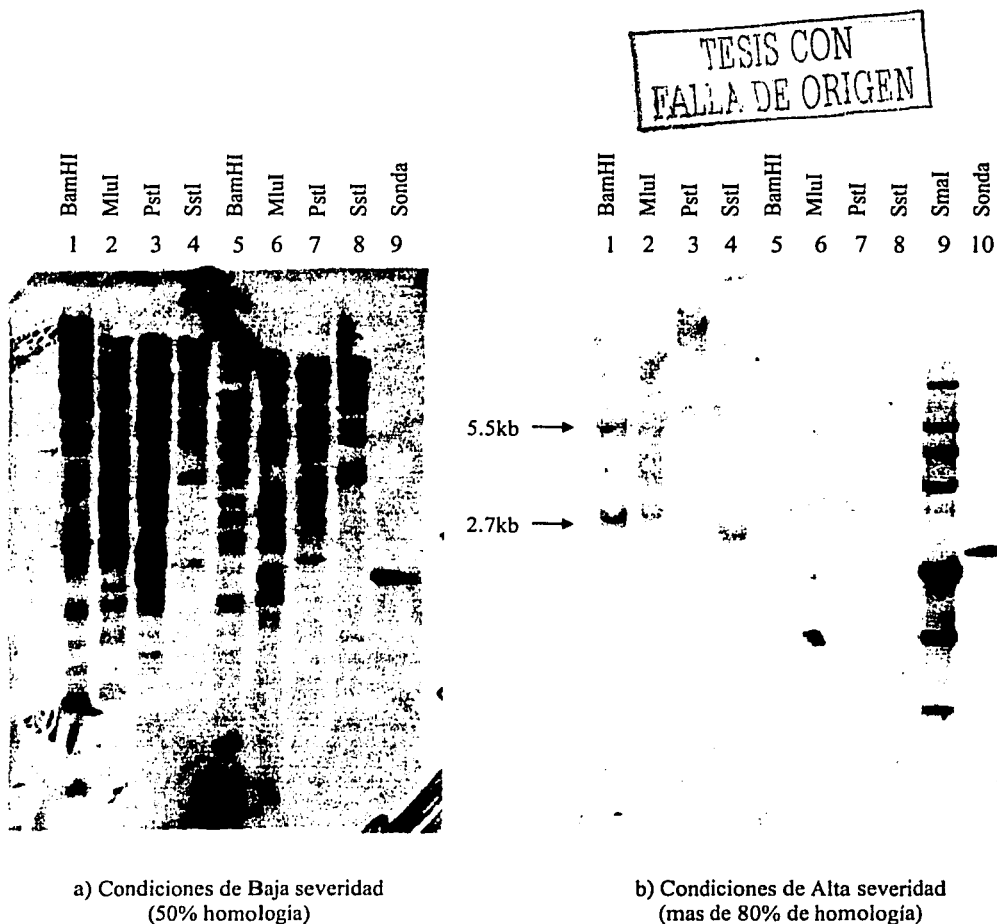


Figura 15. Southern Blot de DNA cromosomal. a) Condiciones de baja severidad (50% homología), b) Condiciones de Alta severidad (mas de 80% de homología). Panel (a) y (b) carriles 1-4: digestión de DNA total de *S. violaceusniger* NRRL B1476 con las enzimas BamHI, MluI, PstI y SstI respectivamente. Panel a) y b) carriles 4-8: digestión de DNA total de *S. violaceusniger* YCED9 con las enzimas BamHi, MluI, PstI y SstI. Carril 9b control positivo: DNA total de *S. erythraea* NRRL 2338 digerido con la enzima *Sma*I. Carril 9a y 10b control de hibridación: 1ng de sonda sin marcar. La posición y el tamaño de las bandas se indica con las flechas.

Se eligió la banda de 2.7 kb de la digestión con BamHI para intentar clonarla. A partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se purificaron bandas de 2 a 3 kb de una digestión con BamHI de DNA cromosomal de *S. violaceusniger* NRRL B1476. Estos fragmentos se clonaron en el vector de *E. coli* pUC18 y mediante hibridación en colonia usando la sonda heteróloga de PKS se aislaron doce probables colonias positivas. Se hicieron minipreps de estas clonas y se digirió el plásmido purificado con las enzimas EcoRI-HindIII para liberar el inserto. En un Southern Blot a partir de estas digestiones, se identificó que la clona no. 2 contenía un inserto que daba señal mucho más fuerte con la sonda heteróloga de PKS que el resto de los insertos (Fig 16). Esta clona fue denominada Clona N-1 y este inserto fue secuenciado para determinar mediante análisis posteriores si podría ser usado como sonda homóloga para genes de PKS tipo I de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476.

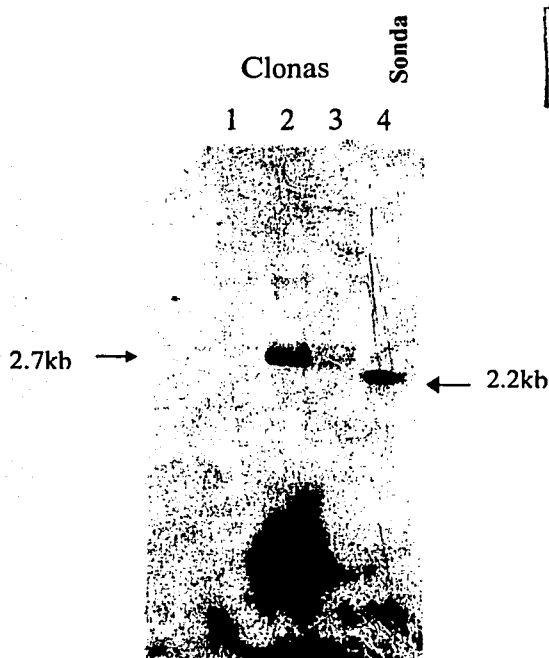


Figura 16. Southern Blot de clonas. Southern Blot bajo condiciones de alta severidad de 3 posibles clonas positivas obtenidas a partir de hibridación en colonia. Carril 1-3: Plásmido obtenido de 3 clonas positivas digerido con las enzimas EcoRI- HindIII. Carril 4 control de hibridación: Ing de sonda sin marcar. La posición y el tamaño de las bandas se indica con las flechas.

6. Análisis de Secuencia: Clona N-1

El inserto de la Clona N-1 fue secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para las primeras reacciones de secuencia se utilizaron los oligonucleótidos M13 Forward y M13 Reverse para secuenciar en las dos direcciones el inserto de la Clona N-1. Conforme fue requerido se diseñaron los oligonucleótidos específicos pBJ09R1, pBJ09R2, pBJ09R4, pBJ09F1 y pBJ09F2 para completar la secuenciación del inserto de la clona N-1. Este inserto no fue secuenciado completamente en las dos cadenas. Todas las secuencias parciales fueron alineadas usando los programas DNAMAN Versión 3.0 de Lynnon Biosoft y el paquete Wisconsin Package Versión 10.1, Genetics Computer Group (GCG).

El fragmento N-1 mide un total de 2654 pares de bases (Fig 19) y fue analizado de forma teórica para determinar si contiene genes de PKS de tipo I de *Streptomyces*. El análisis teórico se realizó de tres maneras, primero mediante un alineamiento de secuencia de la clona N-1 contra la secuencia de la sonda heteróloga del gen DEBS3; segundo, mediante el análisis de uso de codones usando el programa Codon Preference del paquete, Genetics Computer Group (GCG) desde el servidor del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y por último mediante búsquedas tipo BLAST y alineamientos contra dominios de proteínas modulares de PKS de tipo I ya caracterizadas.

6.1 Alineamiento de la secuencia de la clona N-1 contra la secuencia de la sonda heteróloga de *EryA*

La secuencia de la Clona N-1 y la de la sonda heteróloga del gen *eryA* se alinearon y se observan dos grandes regiones de homología separadas por una región donde no hay identidad. La primera región de homología consta de 407 nucleótidos y comienza en el nucleótido 120 de N-1 y en el nucleótido 1 de *eryA*. Luego se encuentra una zona de 345 nucleótidos donde no hay homología entre N-1 y *eryA*. La segunda región de homología mide 1814 nucleótidos y abarca el resto de las dos secuencias (Fig 17).

La secuencia de la sonda heteróloga de *eryA* codifica para un fragmento del dominio de ACP5, el dominio de KS6 y parte del dominio de AT6 del gen DEBS3. La primera región de homología entre *eryA* y N-1 abarca todo el dominio de ACP5 de DEBS3, por lo que es probable que esta región en la clona N1 codifique para un dominio de ACP de *S. violaceusniger*. La segunda zona de homología alinea contra la secuencia del dominio de KS6 y AT6 del gen DEBS3. Por lo tanto, es muy probable que el resto de la secuencia de N-1 codifique para los mismos dominios (Fig 17).

La región de N-1 que no presenta homología con la secuencia de *eryA* mide 310 nucleótidos y se encuentra entre las zonas que codifican para la ACP5 y KS6 del gen DEBS3. A excepción de los módulos terminales donde el dominio de ACP6 precede un dominio de TE, en el carboxilo terminal de las proteínas de PKS, el último dominio funcional suele ser el de ACP. Este último es seguido por un dominio de KS que se encuentra en el amino terminal de la siguiente proteína modular de PKS. Con base en esto es posible que la región de N-1 que no presenta homología contra la secuencia *eryA* se trate de una región intergénica entre dos proteínas de PKS de tipo I (Fig 17).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Clona N-1	GGATCCCTCGACACCTCCGATGTGACCCGCATCTCGCGCG	40
EryA sonda	0
Clona N-1	GTGGCTTCGGGGCGCTCGGACAGGACGAGGGCTGGCGCT	80
EryA sonda	0
Clona N-1	GTTCGACGCGGGCCACCCTGCCCGAGGCCGTCTGGTA	120
EryA sondaACATTC	7
Clona N-1	CAGATCGGTTACACAGGAGGCTCCGCGCACACCG	160
EryA sonda	ACCTGACACAGTCAACGTCCGTTCGTTGTAA	47
Clona N-1	CCCCGCGCTTCCCGCGCTCCCGGCTCTCTCG	200
EryA sonda	TGATCCAGCGTTTCGTCGACCTTACGCCCG	87
Clona N-1	CACCCCGTACGCCGTCGCCGAAACCGGACCTTC	240
EryA sonda	GCAAGGGCCGTCTTTCAGAGATGACCTCCGGG	127
Clona N-1	CGTCTGTGCCGATCCCGCGGGCTCTCCGACCC	280
EryA sonda	GAACCCGACAGAGGAGGAGGCCCGGCTCCACG	167
Clona N-1	CGCTTTCGCGCTCTCGACCCGACCGGAGCGCGGT	320
EryA sonda	CGCTTTCGCGCTCTCGACCCGAGAGCGCGGCT	207
Clona N-1	GCTGGAGGTCGTCGGCGGCACTTTCGCGCTCTCG	360
EryA sonda	CGCCCACTGATCCCGCGGCTTCGCGCTCTCG	247
Clona N-1	CACCCACCCCGACACCGTGAAGCCCGCGCGTTCC	400
EryA sonda	CACCGGAGGACCCCGATCCCGGAAACCGCTTCC	287
Clona N-1	TGACCTCGGCTTGGACTCGCTCACCGGCTGATTCGC	440
EryA sonda	CGGACTCGGCTTGGACTCGCTCACCGGCTGATTCGC	327
Clona N-1	CAACCGAATGGGCGCCCGGCGCTCCCGCTGCCTC	480
EryA sonda	GAACCGGCTCCCGGCTGACCGCGCTCCCGGGAAGCCCG	367
Clona N-1	ACCCTGATTTTGGATACCGGAGGCCAAGCCCTCGGG	520
EryA sonda	ACCGTCTTTTGGATACCGGAGCATCAGCGCTCGGG	407
Clona N-1	GGTATGCGCGAGGAGCTGGGTCTGGACGGCGGGCCGAC	560
EryA sonda	ACC.....	410
Clona N-1	ACCAGCCCGTACACGGGAGCTCGACCAGCTCGAGCGAT	600
EryA sonda	410
Clona N-1	CCTCGCCACGATCGCCCGGACGACATCGAGCGCCCGGC	640
EryA sonda	410
Clona N-1	ATCACCACCCGCTCGCGACCTTTGTGAAAGTGAATG	680
EryA sonda	410

Figura 17. Alineamiento de la secuencia del inserto de la Clona N-1 contra secuencia de la sonda de EryA. A la derecha se muestra el número de los nucleótidos de cada una de estas secuencias. Negro:residuos idénticos entre ellas.

Clona N-1	AAACGAAAGTGCTACGGACAGCACCGCAGAAGACCGTGA	720
EryA sonda	410
Clona N-1	ATCCAGTCCGGCAGGGCAGACGAGATCTTCGATCTCCTCG	760
EryA sonda	410
Clona N-1	ACGACGAGCTCGGGCTCTCCTGACCTGCTCGACAAGAGCT	800
EryA sonda	410
Clona N-1	CATCGACTCACCTCAGCACCGGGGACGGCGTAATGGCG	840
EryA sonda	410
Clona N-1	ACGGCGAACGAAGAGAAGTACCTCGCTACTATTCACAGGGG	880
EryA sondaCTACTATTCGAGGGGC	425
Clona N-1	CTACACCTGACCTGCGCACTCGGGG.....CTGGCT	914
EryA sonda	TTGTGGGTCAGCAGAGCTCTAATTAAGCCCCGGCTCTCT	465
Clona N-1	GGGGAGGTCGAGGACCGCTAGCTGAGGCTATGCTGCTAT	954
EryA sonda	GGGGAGGTCGCAAGGATCTCCGCTACCTGCTGGGATC	505
Clona N-1	TTGTCGGATGACTTGGCTTATGCTGGGCTGGTTCAGACTT	994
EryA sonda	TTCTGGATGCTTGGCTTATGCTGGGCTGGTTCAGACTT	545
Clona N-1	CTGAGGAACTGCTGGACTGCTGCTCTCTGCTGCTTACCT	1034
EryA sonda	CTGCTGAGCTTGGGATTTATGCTTGGCTGGGAGAGAGCT	585
Clona N-1	GCTCCATCCCTACCTGCACTAAGGCTGGCTGGCTACCTGAC	1074
EryA sonda	CTGTGAGGATGCTGCTGCTGCTGGCTGGCTGCTGCTGCT	625
Clona N-1	CTCTCTCTTGGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1114
EryA sonda	CTCTCTCTTGGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	665
Clona N-1	AGGTCACCGCTGGGATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1154
EryA sonda	AGTCGGACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	705
Clona N-1	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1194
EryA sonda	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	745
Clona N-1	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1234
EryA sonda	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	785
Clona N-1	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1274
EryA sonda	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	825
Clona N-1	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1314
EryA sonda	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	865
Clona N-1	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	1354
EryA sonda	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	902

Figura 17. Continuación.

Clona N-1	TTCAGGCGTTTTCGGTAAAGGCGAGTTCGGTTCATCC	1394
EryA sonda	GATAGGCGTAAATGGCTACAGGCGAATATTCGAGGTTGT	942
Clona N-1	CTCCGGGCGCTTCGGCTAACCTTCCTCTTCGGGCGAATCG	1434
EryA sonda	GTCGGGCGCGGTTCGGCTACGTGCTGGGCTTCGAACTCC	982
Clona N-1	CCCTTACCATCCAAATGGCTTCCTTCCTTCCTCCCTGGCTC	1474
EryA sonda	CCGCTACGGTGGACACGGGCTTCTTGGTGGTGGTTCGGT	1022
Clona N-1	CCCTGACTTCCTCGCGCAAGTTCCTTCGCGGCTCGGAGT	1514
EryA sonda	CCCTTCCATTCGGCTGTGTGGTCTTTCCTGTGAGCTTACT	1062
Clona N-1	TTCGGTGCCTTCGGGCGCTTCCTTCATCTTCATCTCAC	1554
EryA sonda	CGGTTCCTGGTGGCGGCTTCTTCTGTGGTGGTGGTGGG	1102
Clona N-1	CCGECAC...TTTACCGGAGTTAGTTC...TACCGGCGACTTC	1591
EryA sonda	CCGAGGTTTTCACCGGAGTTTCCTTCCTTCGCGGCGCTTC	1142
Clona N-1	TGCGCGAGGCGCTTCCTTCAATCTCTTGGGCTTCCTCCCGA	1631
EryA sonda	TCCTTCAGGCGGCTTCCTCAAGGCTTCTTCCTTCCTTCGAGG	1182
Clona N-1	CCGACCTTCCTGGCGGCGGCGGCG...GCGATTCCTG	1665
EryA sonda	CGGCTTTCCTTTCCTTCGAGGCGCTTCGCGGTTCCTTCCTTC	1222
Clona N-1	GAGGCGCTTCCTGGAGCGGCTTCGAAACCTTCATCTTCCTA	1705
EryA sonda	CAGCGGTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1262
Clona N-1	TGCTCTCTTCCTGGCGGCGGAGCTTCATCAAGGAGGAGGCG	1745
EryA sonda	TCCGGCTGTTCCTGGCGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1302
Clona N-1	CAGGAGGCGGCTTCGAGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1785
EryA sonda	GAGGAGGCGGCTTCGAGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1342
Clona N-1	CCGCTCATCCCGGCGGCGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1825
EryA sonda	CCGCTCATCCCGGCGGCGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1382
Clona N-1	CCTGGCGGATTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1865
EryA sonda	GCTGGCGGATTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1422
Clona N-1	CACCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1905
EryA sonda	GCGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1462
Clona N-1	ATGTAAGCGCGCAACTAATTCGAGGACGACGCTTCATGCT	1945
EryA sonda	ACTTAAAGCAAGTCGGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1502
Clona N-1	TGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1985
EryA sonda	TGGCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCT	1542
Clona N-1	GCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	2025
EryA sonda	CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTC	1582

Figura 17. Continuación

Clona N-1	CGGAAAGGCTTCCTTGGGACCTTCACAGTTCACAG	2065
EryA sonda	AAAGGAGCCTTGGTGGGCTATGTATTCGCGGAGAG	1622
Clona N-1	CCACACCAACGTCACCTTGGGAGGCTCCCTTCGCT	2105
EryA sonda	GGTGGGCTGATGGAATGCTTCTGCTTGGAAAT	1662
Clona N-1	GCTGACCAAGGAGCGGGCTTGGCGACAGGCGGCC.	2144
EryA sonda	TGCCGAGTCCCTAACCCGTGGCTCCGGGAGCGCGG	1702
Clona N-1	..GGGAGGCGCTGCTCTGTTTGCATCAGGCGCA	2182
EryA sonda	GTGGGAGGAGTGTGTGGGCTTGGGGTGGAGGAG	1742
Clona N-1	CCAAAGGCAACCATCTGAGCAAGCGGAGGAG	2222
EryA sonda	CGAAGGCAAGTGATATCCCGAGCCTGAGAGCGA	1782
Clona N-1	FAGGGCGAAGCCGGAAGAGTGTGACGCCCCCT	2262
EryA sonda	CC.....CTCTCGGAACCGGACGGGTGGG	1810
Clona N-1	CAAGCCCGCAACGGGCTCCCTGTGGACCGTGGC	2302
EryA sonda	CTGTGGCGGTGGAAGTCTGTCGGTACTGCTGG	1850
Clona N-1	CAAGGCGGCTTGGGCTCGGCTCAGGCGGAAAT	2342
EryA sonda	CCAGGAGGAGAGGCTTGGCAAGGAGCGGCTCT	1890
Clona N-1	CCGCGCAC.....TGGAGGACACCCCAACCTGC	2374
EryA sonda	CGAGTGGCAGTGGACGATGGTTGGTTGACATG	1930
Clona N-1	CCCTACCTGACTGGGTTCTGGTGGCAAGGAGGEC	2414
EryA sonda	CTTCCGCTCTGCAACCGAAGGCAGATGCTCT	1969
Clona N-1	CCCTTCGAGCAACCGGCTGATGTCCCGCGAAGG	2454
EryA sonda	CTTGGCGGTTGTTCAGGAGCAAGAACGCTTGG	2008
Clona N-1	CAAGGCGTATCGGCTCTTAC.....CACTGTTC	2488
EryA sonda	CGCAGTTCGGGCTTGGGAGGGGCTTGGGCTCG	2048
Clona N-1	CCAGGAGCTTCGAGGCGGCTGTAGGAAAGTTCGC	2528
EryA sonda	CTCCACCAAGGAAGCCCTCCCGCGGCTGTTTT	2088
Clona N-1	GAGGGCAAGGTGGGCTTCTGTTCACCGGAGGGTAC	2568
EryA sonda	CGT.....TTTCCAGGTCAGGCTCTCACTG	2116
Clona N-1	CACCGCTGGGATGGCGGTGAGCTTATGAGCTTATC	2608
EryA sonda	GAGGCATGCCCCGCTTGTCTCTGCTCCCTTTCG	2156
Clona N-1	GGTTCGCGGAGGCTCTGAGGCTGTGTGGAGCT	2648
EryA sonda	CCAACTCGATCCCAATGCAATCGGTTGTGGAGCT	2196
Clona N-1	CAATCC	2654
EryA sonda	CCCGGGTTCTCGGCCTCCGAAGTCTGGAGCAGCGTCCG	2236
EryA sonda	GACGCGCGTCTGGAGCGGGTCCGACGCTGACAGCCGG	2276

Figura 17. Continuación

6.2 Análisis de Preferencia de Codones

El análisis de preferencia de codones se realizó utilizando el programa “Codon Preference”, del paquete GCG. Este es un programa de búsqueda de marcos abiertos de lectura que trata de reconocer secuencias codificadoras para proteínas con base en la similitud de su uso de codones con respecto a la tabla de uso de codones de un organismo determinado o bien por el contenido de G+C en la tercera posición de cada codón. Por lo tanto, este análisis nos permite predecir la existencia de posibles regiones codificadoras, el posible marco de lectura en el que se encuentren y la existencia de posibles cambios de fase en dichas regiones codificadoras en una secuencia de DNA.

Con este programa se realizó un análisis de preferencia de codones sobre la secuencia N-1 utilizando la tabla de uso de codones reportada para *Streptomyces coelicolor* A3(2) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Se encontraron en el primer marco de lectura dos regiones con un contenido de GC bastante uniforme separadas por una región de 151 pb donde el contenido de GC baja abruptamente. En la primera región (ORF1), la caída en el contenido de GC correlaciona con la presencia de un codón de término, mientras que el aumento del contenido de GC al inicio de la segunda región correlaciona con un posible codón de inicio (ORF2). Como el contenido de GC en la tercera posición en estas dos regiones es bastante uniforme, es muy probable que se traten de dos regiones codificadoras. A diferencia del primer marco de lectura, en el segundo y tercer marco de lectura no se encontró ninguna posible región codificadora (Fig 18).

La secuencia de la clona N-1 consta de tres regiones. El primer marco abierto de lectura parcial (ORF 1) consta de 681pb y codifica para los 226 residuos correspondientes al C-terminal de una proteína. Le sigue una región intergénica de 151 pb que contiene un posible sitio de unión a ribosomas (AAGAG) a 8 pb río arriba del posible codón de inicio (ATG) de otro marco de lectura (Roberts, 1985). El segundo marco abierto de lectura parcial (ORF 2) consta de los 1822 nucleótidos restantes y codifica para 606 residuos del N-terminal de una segunda proteína (Fig 19).

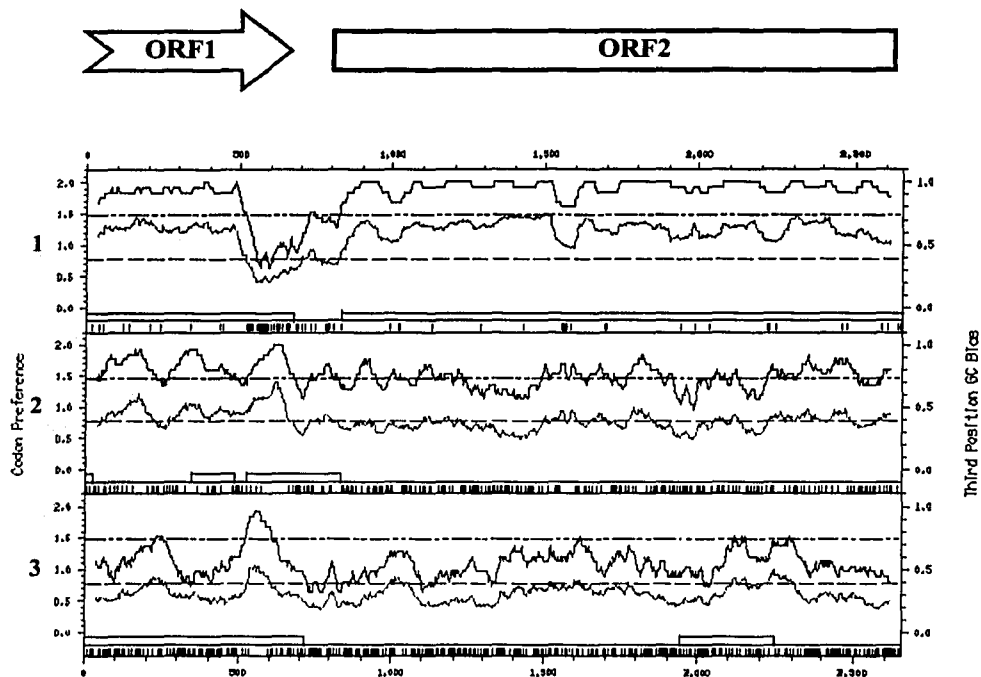


Figura 18. Análisis de uso de codones del inserto de la clona N-1. Se muestra el resultado del análisis en cada marco de lectura (1, 2 y 3 respectivamente) usando una ventana de 20 tripletes. Azul: contenido promedio de G+C en la tercera posición de los codones. Rojo: uso de codones más frecuentes en regiones codificadoras con respecto a la tabla de uso de codones de *Streptomyces coelicolor* A3(2). Las líneas horizontales punteadas azules y rojas marcan el mínimo estadísticamente significativo de los análisis de contenido de G+C y uso de codones respectivamente. Líneas negras: posición de posibles codones de inicio a lo largo de la secuencia. Rectángulos negros: posibles regiones codificadoras. Naranja: posición de la secuencia parcial del ORF1. Verde: posición de la secuencia parcial del ORF2.


```

1      GGATCCCTCGACACCTCCGATGTGACCCGCATCTCGCGCGTGGCTTCGCGGGCTCGGA
1      G S L D T S D V T R I S R G G F A A L G

61     CAGGACGAGGGCCTGGCGCTGTTCGACGCGGGCGGGCACCCCTGCCCGAGGCCGTGCTGGTA
21     Q D E G L A L F D A A G T L P E A V L V

121    CCGATCCGCGTCGACACGGGAGCGCTGCGCGGCCAGGCCCGCGGGCTGCGCCGCGG
41     P I R V D T G A L R G Q A A A G L L P P

181    CTGCTGCGGGCCTGGTCCGCACCCCGTACGGCGCTCCGCCGACACCGGGCCACCTCC
61     L L R G L V R T P V R R S A D T G A T S

241    GGTGTCGTGGCCGACTCGGGCGGGCTCGCTCGCGACCCGGCTCTCCGGCTCTCGGAG
81     G V V A D S G A G S L A T R L S G L S E

301    GCGAACCGGACCGCGAGCTGCTGGAGTCTGTCGGCCATGTGGCGGCCGTCTCTCGG
101    A E R D R E L L E V V R G H V A A V L G

361    CACGCCACCCCGGACGACTGGACGCCCGCGGGCTTCCTCGACCTCGGCTTCGACTCG
121    H A T P D D V D A G R G F L D L G F D S

421    CTCACCCCGTGGATCTGCGCAACCGACTGGGGCGCGCGGGCTGCGCCCTCGCCGTC
141    L T A V D L R N R L G A A A G L R L P V
                                     ▲

481    ACGTGATCTTCGACTACCCGACGCCACCGCGCTCGCCGGTATGCGCGAGGAGTGGG
161    T L I F D Y P T P T A L A G Y A R G A G

541    TCTGGACGGCGGGCGGACACCCAGCCCGTACACGCGGAGCTCGACCAGCTCGAGGCGAT
181    S G R R R G R T P A R T R G A R P A R G D

601    CCTGCCACGATCGCCCCGGACGACATCGAGCGCCCCGGCATCACCAACCCGCTCGCGGA
201    P R H D R P G R H R A P R H H H P P A R

661    CCTCTGTGGAAGTGAATGAAACGAAAGTCTACGGACAGCACCGCAGAAGACCGTGAA
221    P L V E V E *

721    ATCCAGTCCCGACGGCAGACGAGATCTTCGATCTCCTCGACGACGAGCTCGGGCTCTCC

                                     RBS
781    TGACCTGCTCGACAAGAGCTCATCGACTCACCTCAGCACCGGGGACGGCGTAATGGCG
1      FM A

841    ACGGGAAACGAAGAGAAGTACCTCGACTACCTCAAGCGGGCCACCAACCGACCTGCGCGAG
3      T A N E E K Y L D Y L K R A T T D L R E

901    GCGCGGGCGGGCTGCGCGAGGTCGAGGAGCGCGAGCAGGAGCCCATCGCCATCGTGGCG
23     A R R R L R E V E E R E Q E P I A I V A

                                     SetI
961    ATGAGTGGCGCTACCCCGGGGGTACGCACTCCGGAGGAATGTGGAGCTCGTCCGC
43     M S C R Y P G G V S T P E E L W E L V A

1021   CGTGGCGGTGACGCGGCCACGCCGTACCCACCAACCGCGGCTGGGCCACCGACGTCCTC
63     R G G D A A T P Y P T N R G W A T D V L

1081   TTCGACCCGGACCCGGACAGCGCCAGGAGCGGTACGTCACGAGGGCGGATTCCTGCAC
83     F E P D P D S G Q E P Y V H E G G F L H

1141   GACGCGGCGACTTCGACCCGGCGTCTTCGGGATCTGCGCGCGGAGGCGCTGGCGATG
103    D A A D F D P A F F G I S P R E A L A M

1201   GACCCGACGACGCGCTGCTGCTGGAGACCTCGTGGGAGGCGTTCGAGCGCGGGGCATC
123    D P Q Q R L L L E T S W E A F E R A G I

```

Figura 19. Secuencia del inserto de la Clona NI. Negritas: Sitio de union a ribosomas (RBS). Rojo: Dominio de proteina acarreadora de Acilo (ACP), (▲) sitio de unión del grupo prostético de fosfopanteteina. Verde: Linker N-terminal de PKS de tipo I. Azul: Dominio de β-cetoacil sintasa (KS), (◆) cisteina catalítica. Naranja: Dominio de acil transferasa (AT).

1261 GACCCGACCACGCTCCAGGGCAGCCAGACCGGTGTTCGCGGGCGTGATGTACCAGGAC
143 D P T T L Q G S Q T G V F A G V M Y H D

1321 TACGCCTCCCCGCTGTTCCTCCGCGCCGAGGACGTGAGGGCTTCCTCGGCAACGGCAGC
163 Y A S R L F S A P E D V E G F L G N G S

1381 TCCGGCTCCATCGCCTCCGGCCGCTGCCTACACCTTCGGCTGGAGGGACCGGCCGTC
183 S G S I A S G R V A Y T F G L E G P A V

1441 ACCATCGACACGGCCTGCTCCTCCTCCTGGTGCCTGCACCTTCGCCGCGAGGCGCTG
203 T I D T A C S S S L V A L H F A A Q A L

1501 CGCCCGCGGGAGTGTCTGCTGGCCCTGGCCGCGGGCGTACCGTTCATGTCCACCCGCA
223 R R R E C S L A L A G G V T V M S T P A

1561 CTTCACCGAGTTCAGCCGACGGCGGACTCGCGGGCAGCGCCGCTGCAAGTCTCTCGG
243 L H R V Q P Q R G L A A D G R C K S F A

1621 GCCGCGCGCAGCGCACCGGCTGGGGCAGGGCGCGGGCATGCTGGAGCGGCTGTCCGAC
263 A A A D G T G W G E G A G M L E R L S D

1681 GCGCGGAAGAACGCCATCCGGTACTGGCCGTGTCGCGGCGAGCCATCAACCAGGAC
283 A R K N G H P V L A V V R G S A I N Q D

1741 GGCGCCAGCAGCGGGCTGACCGCGCCCAACGGCCCTCGCAGCAGCGGCTCATCCGCCAG
303 G A S S G L T A P N G P S Q Q R V I R Q

1801 GCCCTGGCCGCGCCCGGCTCGCCCCGGGCAGATCGACGTGGTTCGAGGCCACGGCACG
323 A L A A A R L A P G Q I D V V E A H G T

1861 GGCACCAGCTCGCGCACCCCATCGAGGCGCAGGCCCTGCTCGCCACGTACGGGCGCAAC
343 G T T L G D P I E A Q A L L A T Y G R N

1921 CACAGCGAGGACCAGCCGCTATGGCTGGGCTCCATCAAGTCCAACATCGGGCACACCCAG
363 H S E D Q P L W L G S I K S N I G H T Q

1981 GCCGCGCCGGTGTGCGGGGCATCAAGATGGTTCATGGCGATGCGCCACGGGGTGCTT
383 A A A G V A G I I K M V M A M R H G V L

2041 CCGCGGACCTCCACGTGACCCAGCCACCCCAACGTGACTGGTTCGCGGGCGCCGCTC
403 P R T L H V D Q P T P N V D W S A G A V

2101 TCGTGTGACCGAGGGGGCGGGCTGGCCCGACACCGGCAGCCGCGCCGGCCGGGTC
423 S L L T E G R A W P D T G Q P R R A A V

2161 TCCTCGTTCGGCATCAGCGGCACCAACGCGCACACCATCCTGGAGCAGGCGCCGGAGCCG
443 S S F G I S G T N A H T I L E Q A P E P

2221 AGGAGGGCGGAAGCCGGAAGACGGGTGACGACGCCCCCGCGAGCCCCCGCCACCCGG
463 R R A E A A K T A D D A P A E P R A T A

2281 CTGCGCTGTGGACCGTGGCCGCAAGACCGCTCCGCGTGGCGCCAGCCCGCGAAC
483 L P L W T V A A K S R S A L R A Q A A N

2341 CTGCGCGCCACCTCGAGGCCACCCGAACGCGCCTCACCGAGTGGCTTCTCGCTG
503 L R A H L E A H P E L R L T D V G F S L

2401 GCCACCGCGGGCGCCCTTCGAGCACCGGGCGGCGATCGTCCGCGACGACCGCGAGGGC
523 A T G R A A F E H R A A I V A D D R E G

2461 CTGATACGGCCCTCGACGCACTGTCCCGGAGGAGCCCGCACCGGCTGGTCGAGGGC
543 L I R A L D A L S R E E P A T G L V E G

2521 AAGGTGCGAGCGGCAAGGTGGCGTTCCTGTTCACGGGGCAGGGAGCCAGCGGCTGGG
563 K V A S G K

2581 ATGGGGCGTGAGCTGTACGACGCCTATCCGGTGTTCGCGGAGGCGCTGGACCGGCTGTG
583

2641 GCGGAGCTGGATCC
603

Figura 19. Continuación.

6.3 Alineamientos contra PKS de tipo I conocidas

El análisis tipo BLAST nos permite, entre otras cosas, encontrar proteínas ya caracterizadas que tengan identidad o similitud de secuencia con una proteína problema. También es posible buscar dominios conservados de proteínas que se encuentren en la base de datos del NCBI. Estos dos análisis nos indican acerca de la posible función que pueda tener una proteína.

Al realizar un BLAST utilizando la secuencia traducida tanto del ORF1 como del ORF2 (BLASTP) se encontró que estas secuencias presentan un alto grado de identidad con varias proteínas de PKS de tipo I. Para realizar un alineamiento más detallado se tomaron, de las cincuenta secuencias de PKS más parecidas que se obtuvieron en el BLAST, una secuencia representativa de algunas de las familias de policétidos más importantes.

a) ORF 1

La secuencia parcial traducida del ORF1 consta de 226 residuos de aminoácidos y presenta una gran similitud con el dominio de proteína acarreadora de acilos (ACP) de diversas PKS. Entre las más representativas se encuentran el dominio de ACP3 de la proteína NysC de la PKS del polieno nistatina, el dominio de ACP8 de la proteína rifD de la PKS del policétido rifamicina, el dominio de ACP3 de la PKS del macrólido lactámico FK506 y por último el dominio ACP4 del gen DEBS2 de la PKS de eritromicina.

La secuencia del ORF 1 presenta una identidad del 53.79% contra los dominos NysC ACP3, rifD ACP8, FK506 ACP3 y DEBS2 ACP4. Es evidente la presencia de algunos residuos de aspartato (D), glicina (G), leucina (L) y alanina (A) altamente conservados entre todas estas secuencias. La mayoría de los residuos conservados se encuentran en una región de 50 residuos que va de la alanina 116 hasta la alanina 172 del ORF 1. Esta región comprende el motivo de unión de fosfopanteteína GFDSL, donde la serina 140 del ORF 1 actúa como el sitio de unión de este grupo prostético. Este motivo de

unión del grupo prostético de fosfopanteteína se encuentra conservado en todas las secuencias exceptuando en la ACP4 del gen DEBS2. Esta posee la secuencia GLDSL como motivo de unión del grupo prostético (Bevitt et al., 1992) (Fig. 20).

Como la ACP del ORF1 y ACP8 de rifD se encuentran en el extremo carboxilo terminal es posible que los últimos 30 residuos constituyan un “linker” C-terminal (Gokhale et al., 1999). Por el contrario, el resto de los dominios de ACP que se usaron para el alineamiento preceden al dominio de KS del siguiente módulo dentro de la misma proteína. Los últimos residuos que se presentan en este alineamiento para ORF1 y rifD ACP8 constituyen el linker C-terminal y para Nys AC3, FK506 ACP3 y DEBS2 ACP4 constituyen una región intermodular dentro de las proteínas modulares de PKS. Por esto no es extraño observar una disminución en la identidad de estas secuencias en los últimos 20 residuos del extremo carboxilo terminal del ORF 1.

ORF 1	GSLDTSVTRISRGFAALGQDEGLALFDAAAGTLPEAVLV	40
NysC ACP3	SSLSDDLVERIARSNPPLTLEQGTALFDAAALAGPAALA	40
rifD ACP8	..LGGTQARMSRGVVRPITAEEGMALFDALGAQPALLV	38
FK506 ACP3	GRLAATLTRIARGNIPMTAEQGLELFDAAALHSDRAALV	40
DEBS2 ACP4	...GAVLDGYLRERLRLSLSADRAMRTUERVLAAGPVVSA	37
ORF 1	PIRVDTGALRGQAAAGLLPPLLRLGLVVRTPVRRSDDTGATS	80
NysC ACP3	PVRLQLPVLRTQ...GDIAPLLRGLIRTPVRRTEAQSQT	77
rifD ACP8	PVKLLREVRAG...GAVPHLLRGLVVRAG.RRQQAASTV	74
FK506 ACP3	PVRLQLAAVAAS...DOVPPILRDLV..PNARRA.....	70
DEBS2 ACP4	VADVQNPVLSSEGF AATRPTALFAELAGRGGQAEPEPDSGP	77
ORF 1	GVVADSGAGSLATRLSGLSEAEERDRELEVRGHVFAVLE	120
NysC ACP3ADGLAQRLAGLDAARREALLELVRTQITQVLE	110
rifD ACP8DNQLLGRLAGLGAPEQEALVVDLVRGOVAVLE	107
FK506 ACP3APTAARDMLELWRTSALVLE	91
DEBS2 ACP4	.T.G.E.PA...ORLAGLSPDEQENLLELWANAVEVLE	110
ORF 1	HATPDDVDAGRGFLDLRFDELTAVDLENRLGAAALRLRFV	160
NysC ACP3	HADATEVETGRQFQDLRFDELTAVELFNALNTATGLRLFA	150
rifD ACP8	HAGPDAVRADTAFKDAFDELTSVDLENRLRESTGLKLFPA	147
FK506 ACP3	HRDAHAVEPTRAFKEVDFELTGVELENRLADATGLTLFA	131
DEBS2 ACP4	HESAAEINVRRAFSELELDELNAMALEKRLSASTGLRLFA	150
ORF 1	TLVFDYFTPTALEGYARGAGSGRRGR..TPARTRGARPAR	198
NysC ACP3	TMVFDYFTPHALDELRLDELL.GTEAESTTAVVPVTRTAG	189
rifD ACP8	TLAFDYFTPLVLERHLRDELGAGDDALSVVHARLEDVEAL	187
FK506 ACP3	TLVFDYFTAQALSAHL.DELA.G..ARTATRRRTPAPARR	167
DEBS2 ACP4	SLVFDYFTVTALAOHLRRLVVGDAQ..AAVRVVGAADES	188
ORF 1	GDPRHDRPGRHRAPRHHHPARPLVEVE	226
NysC ACP3	TD...DPIVIVGMACRYPGGIASPEDLWRL	216
rifD ACP8	LGGLRLDESTKTGLTLRLQGLVARCNGVN	216
FK506 ACP3	HD...EPLAIVGMACRLPGGV	185
DEBS2 ACP4	EPIAIVGIGCRFPGGIGSPEQLWRVLAE	216

Figura 20. Alineamiento de ORF1 contra dominios de ACP de diversas PKS de tipo I. Se alinearon las secuencias de: ORF1, NysC ACP3, rifD ACP8, FK506 ACP3 y DEBS2 ACP 4. A la derecha se muestra el número de los residuos de aminoácidos de cada una de estas secuencias. Rojo: Motivo del sitio de unión del grupo prostético de fosfopanteteina. Negro: 100% de homología. Rosa: 80% de homología. Azul: 60% de homología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) ORF 2

1. Linker N-terminal

Se ha reportado en proteínas de PKS la presencia de linkers N-terminales que juegan un papel muy importante en el ordenamiento de los módulos para la síntesis de las cadenas policétidas (Gokhale et al., 1999). En el caso de ORF2, la presencia de una secuencia parecida a los linkers N-terminales reportados para otras PKS sería de gran importancia para determinar que estos genes codifican para una PKS de tipo I. De haber una secuencia linker N-terminal en la secuencia de ORF2, ésta se encontraría dentro de los primeros 30 residuos de la proteína. Para esto se tomaron los primeros 30 residuos de la proteína ORF2 y se realizó un alineamiento contra la secuencia de los linkers N-terminales de varias PKS. Se utilizó la secuencia de linkers N-terminales de los módulos 3 y 5 de eritromicina, módulos 5 y 11 de rapamicina, módulos 4, 7, 8 y 9 de rifamicina y módulos 3, 5 y 8 de spinosad. La función del linker N-terminal de eritromicina, rapamicina y rifampicina ha sido demostrada tanto teórica como experimentalmente (Gokhale et al., 1999).

Los primeros 30 residuos del ORF2 presentan una identidad de 42.31% con las secuencias linker N-terminal de las PKS mencionadas anteriormente. Todas estas secuencias poseen las mismas características ya reportadas para linkers N-terminales de PKS de tipo I. Presentan un residuo de leucina altamente conservado y por lo menos uno de los residuos de glutamato (E), lisina (K) y tirosina (Y) respectivamente, en las mismas posiciones con respecto a la leucina conservada. Además poseen residuos conservados de alanina (A), glutamato (E), lisina (K) y arginina (R). Con base en lo anterior es muy probable que los 30 residuos del N-terminal de ORF2 posean la actividad de linker de PKS de tipo I (Fig. 21).

ORF2 N-ter	...MATANEEKYLDYKRRATDDLREARRLREVEEREQ	35
M3eryVTDSEKVAEYKRRATLDLRAARQRIRES	30
M5ery	MSGDNGMTEKLRRYKRTVTELDVSTARLREVEHRAG	38
M5rapMREDQLLDARXSVKENARLRKANTSLRAAMD	32
M11rapMPEQKVVVEYRWATAELHTTRAKLEALAAANT	33
M4rifMSAPNEQIVDARASLKENVRLQENSALAAAAA	34
M7rif	...VSASVYKVVVEARXKSLEEVGTLKKRNROLADAAG	34
M8rifMADEGQLRKYKRAIADARDARTLREVEEQAR	33
M9rifMATDEKLLKYKRVTAELHSLRKQGARHAD	30
M3spnMSNEEKLRVRRALVDLHQARERLHEAESGER	33
M5spn	.MEITMANEEKLFGYKQVTADLHQTRQRLLAAESRQ	37
M8spnMANEEKLRVYKRVVVELEEAEHLRHELERQEH	33

Figura 21. Alineamiento de posibles linkers N-terminal del ORF2 contra linkers N-terminales de PKS de tipo I. Alineamiento del posible linker N-terminal de la proteína 2 contra linkers N-terminales de los módulos 3 y 5 de eritromicina, módulo 5 de rapamicina, módulo 11 de rapamicina, módulos 4, 7, 8 y 9 de rifamicina y módulos 3, 5 y 8 de espinosad. A la derecha se muestra el número de los residuos de aminoácidos de cada una de estas secuencias. Negro: 100% de homología. Rosa: 75% de homología. Azul: 50% de homología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Dominio de β -cetoacil sintasa (KS)

La traducción de la secuencia parcial de ORF2 consta de 606 residuos de aminoácidos y de acuerdo con los resultados del análisis de BLAST presenta homología con diferentes dominios de KS y AT de diversas PKS de tipo I. Entre las más representativas se encuentran el dominio de KS4 del la proteína *aves2* de la PKS de avermectina, el dominio de KS7 de la proteína *NysC* de la PKS de nistatina, el dominio de KS1 de la proteína *rifD* de la PKS de rifamicina y por último con el dominio KS2 del gen *DEBS2* de la PKS de eritromicina.

El alineamiento de la secuencia del ORF2 presenta un 63.02% de identidad con los dominios de las KS antes mencionados. Se observa de forma evidente la presencia de un gran número de residuos altamente conservados a lo largo de todas las secuencias. Estos residuos se agrupan principalmente en dos zonas con respecto a la secuencia del ORF2, una a partir del residuo 37 hasta el residuo 456 y otra a partir del residuo 566 hasta el 597. Estas se encuentran separadas por una región donde no hay homología entre estas secuencias.

La primera de estas regiones consta de 419 residuos y abarca gran parte de la secuencia parcial del ORF2. Los dominios de KS presentan en su mayoría el motivo TVDTGCSSSLV alrededor la cisteína catalítica (Aparicio et al., 1996). En la secuencia del ORF2 encontramos el motivo TIDTACSSSLVA a partir del residuo 203 hasta el 214, donde la cisteína catalítica se encuentra en la posición 208. Para la KS del gen *DEBS2* que usamos para este alineamiento se definió el dominio de KS hasta el residuo de prolina 457 (Bevitt et al., 1992). Por lo anterior, definimos como dominio de KS la región que abarca del residuo de prolina 37 hasta el residuo de glutamato 456 de la secuencia parcial del ORF2, este residuo se encuentra a dos aminoácidos de distancia del límite del dominio de KS previamente definido para la KS del gen *DEBS2* (Fig. 22).

La segunda región consta de los últimos 31 residuos del ORF2. Debido a que en las proteínas modulares de PKS, los dominios de KS preceden a los dominios de AT, es posible que estos últimos residuos formen parte del inicio de un dominio de AT.

ORF 2	MATANEKYLDYLKRATTDLREARRRLREVEEREQ	40
aves2 KS4	DYPTPMALCQFLRAAIVGADTGTTRRLPLTAVPADE	40
NysC KS7AAVAVADDF	12
rifD KS1AAAEF	9
DEBS2 KS2MTDSEKVAEYLRRATLDLRAARQRIRELESD	35
ORF 2	VANSYHYFEGWSTPEELMELVARVGDAAATPYITN	60
aves2 KS4	VGMAHYFEDERTVDDLQOVVSGHDAIGGFTIN	60
NysC KS7	VGMAHYFEGWASDDLRVLVTDVDAVSPFTIN	52
rifD KS1	VMAHYFEGWHSPEDLRVLVADADAVTEFFAD	49
DEBS2 KS2	VSMARLREGWNTPQRLMELLREGETLSGFTD	75
ORF 2	VLDFEPIISGQEPVHEVGFHDLADFPAFFEISPREAL	120
aves2 KS4	TLVNPFIHHGTSYTRSGLFYDEGNFIPDFEISPREAL	120
NysC KS7	SLYHPFIHLGTSYTRSGLHEAGEFIPGFFIEMPREAL	92
rifD KS1	RLYHEFIHEGTTYVRHEAFLDDAAGFIAAFFEISNEAL	89
DEBS2 KS2	RLHHPFINPGTSEVVDKGLDDAAGFIAEFFEISPREAA	115
ORF 2	AMIPDFLLLETSMEAFERAGIDFTTQCSQVWFAVVMY	160
aves2 KS4	AMIPDFLLLETSMEAFERAGIDFTTQCSQVWFAVVMY	160
NysC KS7	ATPSDFLLLETSMEAFERAGIDVSLRERSTVWFAVVMY	132
rifD KS1	AMIPDFLLLETSMEAFERAGIDFTTQCSQVWFAVVMY	129
DEBS2 KS2	AMIPDFLLLETSMEAFERAGIDFTTQCSQVWFAVVMY	155
ORF 2	HDVWAS.RL.FSAPEDVEFLGNSSGSIASGQVAVTTFLE	198
aves2 KS4	HDVWAAARFPT..APAGFEVYLGHSAGSIASGQVAVTTFLE	198
NysC KS7	SDVWAS.ML...ASPEFEVFGQSSPBLASGQVAVTTFLE	168
rifD KS1	HDVWASRMH..RAAGV.EGFRLTGASVLSGQVAVTTFVE	166
DEBS2 KS2	FGVGEDTAAEDV...EYYSVTWVAPAVASGSIASGQVAVTTFLE	192
ORF 2	GFAVTVDTACSSSLVALHMLAQAALRRRECSELMALAGVTVVM	238
aves2 KS4	GFALTVDTACSSSLVALHMLAQAALRRRECSELMALAGVTVVM	238
NysC KS7	GFAVTVDTACSSSLVALHMLAQAALRRRECSELMALAGVTVVM	208
rifD KS1	GFAVTVDTACSSSLVALHMLAQAALRRRECSELMALAGVTVVM	206
DEBS2 KS2	GFISVDTACSSSLVALHMLAQAALRRRECSELMALAGVTVVM	232
ORF 2	STPVALHRVQP..VGLAALDGECHSFAAAADFTVCEVAGM.	276
aves2 KS4	STPAGVVEFSR..VGLAVVDRCHAFSFAAAADFTVCEVVGML	278
NysC KS7	STPAVTVDFAR..VGLSPDRCHAFADAADFTVCEVVGVL	248
rifD KS1	GVVETVVEFSR..VGLAPDGECHAFADCAADFTVCEVGVLL	246
DEBS2 KS2	ATPGVTVDFSR..HALAALDGHSHAFGACADFTVCEVTVLV	272
ORF 2	.LLERLSDARKNHHPVLAWVPSAVINCDGASNLTAIPNHS	315
aves2 KS4	LVERLEDARRLHHRILAVVPSAVINCDGASNLTAIPNHS	318
NysC KS7	VLERCSDAVRNHHEILAVVPSAVINCDGASNLTAIPNHS	288
rifD KS1	LVERLSEMQRRSHQVLAWVPSAVINCDGASNLTAIPNHS	286
DEBS2 KS2	LLERLSEARRRNHHEVLAWVPSAVINCDGASNLTAIPNHS	312

Figura 22. Alineamiento de ORF 2 contra dominios de β -ceto sintasa (KS) de diversas PKS de tipo I. Se alinearon las secuencias de: ORF2, aves2 KS4, NysC KS7, rifD KS1 y DEBS2 KS4. A la derecha se muestra el número de los residuos de aminoácidos de cada una de estas secuencias. Rojo: Motivo del sitio catalítico de KS. Negro: 100% de homología. Rosa: 80% de homología. Azul: 60% de homología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ORF 2	IQFVIRQALAAARLAPGQIVVWEAHTGTTLDGPIEQAL	355
aves2 KS4	IQFVIRLALANADLTPADVVAWEAHTGTTLDGPIEQAL	358
NysC KS7	IQFVIRQALASGGLTAGDVVWEAHTGTTLDGPIEQAL	328
rifD KS1	IQFVIRKALAAAGLSTSDVVAWEAHTGTTLDGPIEQAL	326
DEBS2 KS2	IRFVIRQALESCGLEPGDVVAWEAHTGTTLDGPIEQAL	352
ORF 2	LATYGRNHSEDCFLDGGRIEHIHTTAAAQWAVIEMM	395
aves2 KS4	LATYQDRPGNEFLDGGEMENIHTTAAAQWGVIVEMM	398
NysC KS7	LATYGRDRPERFLLDGGVEMHHTTAAAQWAVIEMM	368
rifD KS1	LATYQQRNRETFLDGGVEMHHTTAAAQWAVIEMM	364
DEBS2 KS2	LDTYGRDRDADRFLDGGVEMHHTTAAAQWVTELLVVL	392
ORF 2	AMFHEVLRFTLHWDCITPNVDMWAAVSLTEGRAMP.DT	434
aves2 KS4	ALFHEVLRFTLHWDEPSPHVDWAAVQLTETVPPGGE	438
NysC KS7	AMFHEVVVFTLHWDAFSSHVDWAAVQLLSEQAAMP.ET	407
rifD KS1	AMFHEVLRFTLHWDRFSSYVDWAAVQLLSEQAAMP.SN	403
DEBS2 KS2	ALFHEVLRFTLHWDEPSPHVDWAAVQLLSEQAAMP.RG	431
ORF 2	GQPFPAWESFQGISGTHAHTILEQAPEPRRAEAAKTADD.	473
aves2 KS4	GRLEFAGWESFQVSGTHAHVILEEAPAHNIPSDTPADDAP	478
NysC KS7	GRVPEFAGWESFQGISGTHAHVILERPEAARRPVMETNTVE.	446
rifD KS1	GHPPEFAGWESFQGISGTHAHVILEEVAAPITTPQPEPA..	440
DEBS2 KS2	ERTPEFAGWESFQGISGTHAHVILERPEAARRPVMETNTVE.	470
ORF 2APAEPRTALP	484
aves2 KS4	GEAAADDVPGEAAGDDAGTGGEATGPAAGSPGVVWVUL..V	516
NysC KS7PSTVP.....	451
rifD KS1EFLVPVLSAR	451
DEBS2 KS2	PVPLVVSARSTAALRAQAAQIAELL.....	495
ORF 2	LUTVAAKRSRALSRAQAANLRAHLEAHPELRLTDVGFSLAT	524
aves2 KS4	.SAKSQPALRAQAALHAHLTDHPGLDLADVGYTLAHARA	555
NysC KS7	.VVLGKTPALRAQAALSSIERPELRLVDVGMSSLVT	490
rifD KS1	TAAGLRGQAGRLAFLGDRDTRVVPDAAYALATRAQLDH	491
DEBS2 KS2ERPDAALAGVGLGLAT	511
ORF 2	GRAAFEHRAIVADDREGLIRALDALSREEPATGL.VEAK	563
aves2 KS4	VFDHRATLAAADRDTFLQALQALAAAGEPHPAVIHSSAPAG	595
NysC KS7	GRSTFEHRAVVLAADRADAARALSATAADEADAAA.ATER	529
rifD KS1	RAVVLASDRALQCADLAAFGSGVV.....TET	518
DEBS2 KS2	TRARHEHRAVVVASTREEAVRGLREIAAGAATADAVVEV	551
ORF 2	..VA...SGKVAFITTEGSRRLGREGRELYDAYVVFVFAEA	597
aves2 KS4	..TGTGEAAGKTAFCSTETTRPMAHGLYHTHPVFVFAEA	633
NysC KS7	..VG...AGRHAVLFSGTCARLNGRELYERFVVFVFAEA	563
rifD KS1	..PV...DGKLVLFTEGSRWALNGRELAETFPVVFVFAEA	552
DEBS2 KS2	TEVD.G...RNVVFLFTEGSRWALNGRELYERFVVFVFAEA	587

Figura 22. Continuación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Dominio de acil transferasa (AT)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las proteínas de PKS de tipo I, después del dominio de KS se encuentra invariablemente en todos los módulos un dominio de AT. En el caso del ORF2, en el residuo 456 terminaría el dominio de KS y comenzaría el dominio de AT.

Solamente se tienen 37 residuos del dominio de AT ORF 2. Estos fueron los residuos que se tomaron para realizar el análisis de BLAST y al igual que para el dominio de KS se tomaron para el alineamiento una secuencia de AT representativa de algunas familias de policétidos. Estas secuencias fueron el dominio de AT4 de la PKS del polieno amphotericina B, el dominio de AT12 de la proteína NysI de la PKS de nistatina, el dominio de AT9 de la proteína rife de la PKS de rifamicina y por último con el dominio AT3 del gen DEBS2 de la PKS de eritromicina.

El inicio del dominio de AT del ORF2 presenta una identidad del 76.32% contra los inicios de los dominios de AT equivalentes de PKS ya caracterizadas. La identidad en esta región fue muy alta. No es posible determinar con esta secuencia parcial la especificidad de este dominio de AT buscando los motivos típicos para la elección de la unidad extensora (Fig 23).

ORF2 AT	VAF ¹ LF ² FT ³ Q ⁴ GG ⁵ RL ⁶ GH ⁷ RELYDAY ⁸ VVFA ⁹ EALDAVCAEL	37
Amphc AT4	.AFL ¹ FS ² QGG ³ RL ⁴ GH ⁵ RELYGRV ⁶ VV ⁷ FTEALDAVLAVL	36
nysI AT12	TAFL ¹ FT ² QGG ³ RL ⁴ GH ⁵ RELH ⁶ DRY ⁷ VV ⁸ FADALDEVLARL	37
rife AT9	VVYV ¹ FP ² QGG ³ RL ⁴ GH ⁵ RELYDRY ⁶ VV ⁷ FATA ⁸ FDEACEQL	37
DEBS2 AT3	VVFL ¹ FP ² QGG ³ RL ⁴ GH ⁵ CAELLSS ⁶ SVV ⁷ FAGKIRACDESM	37

Figura 23. Alineamiento del inicio de los dominios de AT de ORF2 contra otros inicios de dominios de AT. Se alinearon las secuencias de: ORF2 AT, Amphc AT4, nysI AT12, rife AT9 y DEBS2 AT3. A la derecha se muestra el número de los residuos de aminoácidos de cada una de estas secuencias. Negro: 100% de homología. Rosa: 80% de homología. Azul: 60% de homología.

7. Interrupcion Cromosomal

En *Streptomyces*, no es extraño que una cepa produzca más de un compuesto activo. Inclusive se han reportado cepas que producen más de un solo policétido de tipo I (Xue et al., 2000; Stassi et al., 1997). Como no se sabe el número de compuestos activos producidos por *Streptomyces violaceusniger* NRRL B 1476 es necesario determinar que el fragmento de PKS clonado pertenece a la PKS de nigericina.

Se decidió llevar a cabo una interrupción cromosomal utilizando parte de la secuencia de la Clona N-1 como zona de homología para recombinación, de acuerdo a nuestra hipótesis se esperaba interrumpir el gen de PKS generando una cepa mutante deficiente en la producción de nigericina. Para esto, era necesario introducir esta construcción en *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476.

7.1 Transformación

Streptomyces violaceusniger NRRL B-1476 resultó ser recalcitrante a los protocolos de transformación habituales en *Streptomyces*. El protocolo de transformación más común en *Streptomyces* mediante la generación de protoplastos y transformación con PEG 1000 (Bibb et al., 1978) presentó varias dificultades. La primera fue encontrar condiciones adecuadas para la formación de protoplastos. Utilizando medio TSB en lugar de YEME, fue posible la formación de protoplastos de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B1476. Como *S. violaceusniger* NRRL B 1476 presenta cierta sensibilidad frente a la sacarosa, fue necesario modificar los medios habituales para la regeneración de protoplastos. Desafortunadamente, tanto en R2 como en R2 modificado la regeneración de protoplastos de *S. violaceusniger* NRRL B1476 fue muy deficiente. Como éste es un paso determinante para un proceso de transformación exitoso en *Streptomyces*, decidimos intentar otro método para introducir DNA a esta cepa.

7.2 Electroporación

Los protocolos de transformación mediante electroporación han resultado exitosos en algunas cepas de *Streptomyces* (Mazy-Servais et al, 1997, Tyurin M et al.,1995). Con base en esto intentamos un protocolo de transformación por electroporación utilizado en *Streptomyces rimosus* (Pigac et al., 1995). Después de preparar el micelio competente para electroporación, se transformó utilizando 1µg de plásmido pIJ486 superenrollado, el cual se sabe que se replica en diversas cepas de *Streptomyces* y confiere resistencia a tioestrepton (Ward et al., 1986). No hubo colonias resistentes después de la selección con el antibiótico.

7.3 Conjugación

Por otro lado, la transferencia de plásmidos de *E. coli* a *Streptomyces* mediante conjugación se ha utilizado para introducir vectores no replicativos que se integran en el cromosoma de *Streptomyces* mediante recombinación sitio específica o bien inserto dirigida. Estos vectores contienen el *oriT* de el plásmido RP4 perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP y requieren que las funciones de transferencia para el plásmido sean proporcionadas por la cepa donadora de *E. coli* (Flett et al., 1997).

Existen diversas ventajas usando el proceso de conjugación a partir de *E. coli* para introducir DNA en *Streptomyces* y otros actinomicetos: 1) es un proceso simple y no depende de los procesos de formación y regeneración de protoplastos, 2) las barreras de restricción pueden evitarse o reducirse mediante la transferencia de concatémeros de plásmido de cadena sencilla, 3) existen toda una variedad de vectores con *oriT* que permiten integración cromosomal sitio específica o dirigida, 4) como estos vectores se replican en *E. coli*, la manipulación de los mismos resulta relativamente fácil (Hopwood et al 2000).

Se utilizó como cepa donadora *E. coli* GM272/pRK2013 la cual es deficiente en metilación de DNA y contiene el plásmido pRK2013, un derivado del plásmido RP4 capaz

de proporcionar a plásmidos con *oriT* las funciones necesarias para su transferencia (Figurski et al., 1979). Usando el plásmido transferible pRK415 (Keen et. al., 1988) se contruyó el plásmido pBJ12. Este contiene un fragmento SstI-EcoRI de aproximadamente 2 kb de la clona N-1 como zona de homología para recombinación que es completamente interno al ORF2 y el gen de resistencia a tioestrepton para seleccionar en *Streptomyces* (Fig.24).

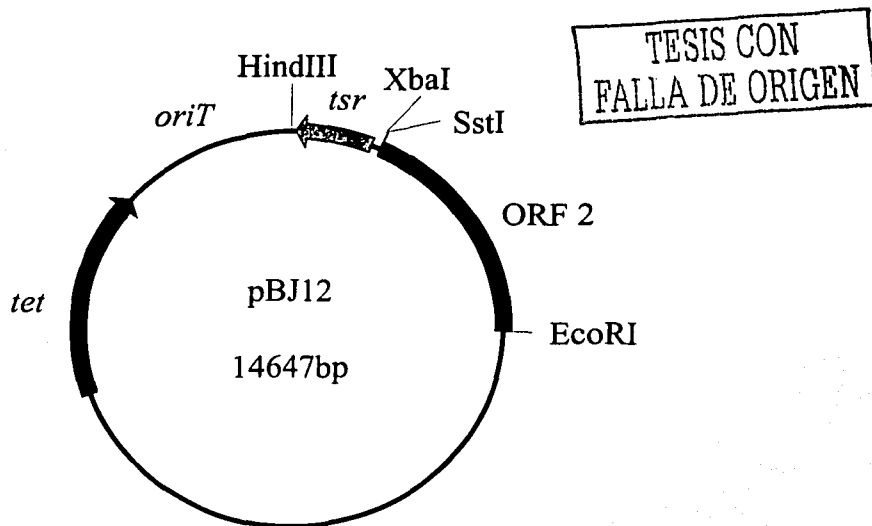
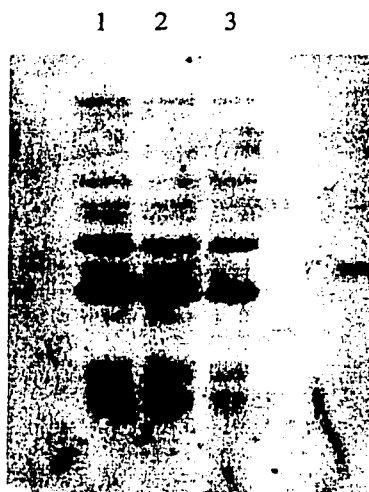


Figura 24. pBJ12. Plásmido derivado del pRK415 con un origen de transferencia (*oriT*). Azul: fragmento de 1.650 kb SstI-EcoRI interno al ORF2 como zona de homología para recombinación. Rojo: gen de resistencia a tetraciclina (*tet*). Verde: gen de resistencia a tioestrepton (*tsr*) para seleccionar en *Streptomyces*.

Se realizaron diversos experimentos de conjugación entre *E. coli* GM272/pRK2013/pBJ12 x *Streptomyces violaceusniger* NRRL B1476. En todos los experimentos se obtuvieron diversas colonias de *Streptomyces* resistentes a la selección por el antibiótico. Estas se pasaron a medio MS sólido con 5µg/ml de tioestrepton para

seleccionar colonias resistentes verdaderas al antibiótico. Se extrajo DNA total de estas clonas y se realizaron experimentos de tipo Southern Blot para corroborar la integración del plásmido suicida en el cromosoma. En todos los casos el resultado fue el mismo. No se dió la integración del plásmido pBJ12 en *Streptomyces*. Todas las colonias resultantes de los eventos de conjugación fueron mutantes espontáneas resistentes al antibiótico (Fig. 25).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 25. Southern Blot de clonas resistentes a tioestrepton. Carril 1 y 2: Digestiones con la enzima *Sma*I de DNA total de clonas resistentes a tioestrepton de *S. violaceusniger* obtenidas de los experimentos de conjugación. Carril 3 (WT): control positivo, digestión con la enzima *Sma*I de DNA total de la cepa silvestre de *S. violaceusniger* NRRL B-1476. Se utilizó como sonda el inserto de 2.7kb de la clona N-1.

8. Detección de Nigericina en Sobrenadantes de Cultivo

8.1 Detección de actividad antibiótica mediante Bioensayo

En caso de obtener la mutante deseada, era indispensable encontrar un método fácil y rápido para determinar la producción de nigericina tanto en la cepa mutante como en la cepa silvestre productora de nigericina. Para *S. violaceusniger* YCED9 se ha reportado un bioensayo para medir la producción de nigericina y otros antibióticos en sobrenadantes de cultivo usando la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como cepa indicadora (Trejo-Estrada S, et. al. 1998a).

La producción de antibióticos en *Streptomyces* varía dependiendo de la cepa y de las condiciones del medio de cultivo. Por ello, era indispensable encontrar las mejores condiciones para la producción de nigericina por *S. violaceusniger* NRRL B1476. Utilizando el bioensayo descrito para *S. violaceusniger* YCED9 se midió de manera cualitativa la producción de actividad antibiótica por *S. violaceusniger* NRRL B1476 en diferentes condiciones de cultivo. Se utilizaron diferentes medios como YT2X, R5, SB-almidón y M2. Tanto el SB almidón como el M2 han sido reportados como medios específicos para la producción de nigericina por *S. violaceusniger* YCED9 y *S. hygroscopicus* NRRL B 1865 respectivamente (Trejo-Estrada et al., 1998; Tabet et al., 1995). En ninguno de los medios antes mencionados se observó un aumento significativo en la producción de nigericina por *S. violaceusniger* NRRL B-1476.

Para *S. violaceusniger* YCED9, el uso de almidón como fuente de carbono en vez de glucosa causó un aumento significativo en la producción de nigericina (Trejo-Estrada, S. et al 1998). Por lo tanto, se realizaron algunas modificaciones al medio de esporulación R5 para *Streptomyces*. Se conservó la receta base del medio R5, usando almidón como fuente de carbono en vez de glucosa y no fue complementado como en el protocolo original (ver Materiales y Métodos) (Hopwood et al., 2000). En este nuevo medio, nombrado MN1 se obtuvo la mejor producción de actividad antibiótica de *S. violaceusniger* NRRL B-1476 (Fig 26).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

YT2X

R5

MN1

M2

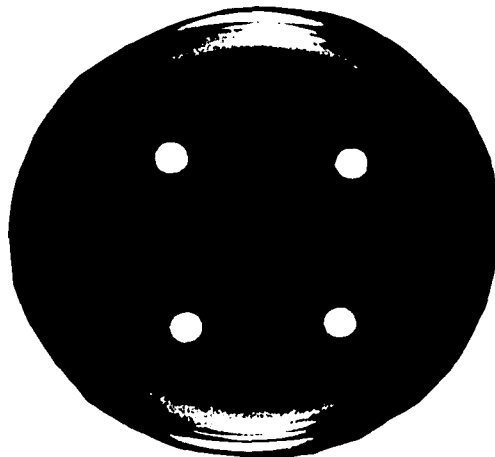


Figura 26. Bioensayo. Se colocó en cada disco sobrenadante de cultivo ($20\mu\text{l}$) de *S. violaceusniger* NRRL B-1476 crecido en los medios YT2X, R5, MN1 y M2. La presencia de un halo de inhibición de crecimiento de la cepa sensible de *Bacillus subtilis* 6633 indica la presencia de actividad antibiótica bajo esas condiciones de crecimiento.

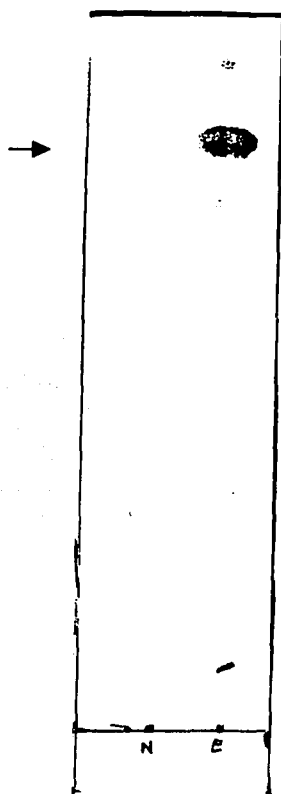
8.2 Detección de nigericina mediante cromatografía en capa fina

Para determinar que la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se debía a la producción de nigericina y no a la presencia de algún otro compuesto con actividad antibiótica presente en el sobrenadante. Se esperaba que el aumento en la actividad antibiótica corelacionara con un aumento en la concentración de nigericina usando MN1 como medio de cultivo. Para esto se requería de un ensayo específico para detectar nigericina sin importar la presencia de otros compuestos activos.

De un cultivo de 7 días de *S. violaceusniger* NRRL B1476 en medio MN1, se realizó una extracción orgánica a partir de 5 ml de sobrenadante (ver Materiales y Métodos). Dicha extracción se corrió junto con un estándar de nigericina (Sigma Aldrich)

en una placa de cromatografía en capa fina utilizando como solvente de corrida hexano:isopropanol 2:8 (Trejo-Estrada et. al., 1998a). La placa fue revelada con el reactivo de vainillina justo después de terminar la corrida. El reactivo de vainillina reacciona específicamente con los poliéteres generando un color rojo intenso en la presencia de estos compuestos (Golab et al., 1973; Brown, 1979).

Al revelar la placa, se observó la presencia de dos bandas de color rojo que corren al mismo nivel en los dos carriles. El primer carril corresponde al estándar de nigericina (10 μ g) y el segundo corresponde a una extracción orgánica a partir de 5 ml de sobrenadante de cultivo. En este segundo carril observamos una banda muy notoria que corre al mismo nivel que el estándar de nigericina y una segunda banda que corre más abajo que el control de nigericina, la cual también reacciona con el reactivo de vainillina. Esta banda es mucho menos abundante, por lo tanto puede tratarse de algún producto alterno o intermediario de la vía biosintética de nigericina. (Fig 27). Se realizó un autobiograma con una placa de TLC como la que se muestra en la figura 27, se observó una inhibición del crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 alrededor de la banda de nigericina (datos no mostrados). De modo que la inhibición del crecimiento se debe por lo menos en parte a la presencia de nigericina en sobrenadantes de cultivo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 27. Placa de TLC revelada con vainillina. Carril N: $10\mu\text{g}$ de estándar de nigericina (Sigma-Aldrich) marcado con una flecha. Carril E: extracción orgánica a partir de 5 ml de sobrenadante de cultivo de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476 en medio MN1. Se utilizó hexano-isopropanol 8:2 como solvente de corrida.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye la primera parte de la identificación y clonación de los genes que codifican para la biosíntesis del antibiótico poliéter nigericina, producido por *Streptomyces violsceanus* NRRL B-1476. Para dicha clonación es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes. En primer lugar, los genes que codifican la biosíntesis de un determinado antibiótico en *Streptomyces* no se encuentran dispersos en el cromosoma, sino que se encuentran localizados en grupos o “clusters” de genes contiguos que llegan a abarcar varias decenas de kilobases en el cromosoma. En segundo lugar es importante tener en cuenta que los policétidos de tipo I son sintetizados por PKS modulares en las que hay una correlación entre el número de módulos y el número de condensaciones que ocurren en la cadena carbonada del compuesto. En la mayoría de los casos (aunque no en todos) existe además una correspondencia entre el ordenamiento lineal de la codificación de los módulos a nivel genético y el orden en que son utilizados en la síntesis del antibiótico; además, normalmente los “clusters” poseen genes que efectúan modificaciones posteriores a la cadena carbonada, así como genes reguladores y de resistencia. Por último, un factor importante a considerar es que la presencia de “clusters” de genes que codifican PKS de tipo I es muy común en *Streptomyces*, por lo que no es raro que una sola cepa posea varios de estos agrupamientos de genes, y de ahí la importancia de contar con una predicción sobre las características que debe tener el grupo de genes que codifican la PKS que se pretende estudiar, ya que éste es importante para contribuir a su identificación.

1. Predicción de la estructura modular de la PKS de nigericina

La nigericina pertenece al grupo de los poliéteres, que son un tipo de policétidos muy particulares, por lo que es necesario tener en cuenta estas particularidades para predecir la estructura genética de la PKS. La gran mayoría de los poliéteres utiliza únicamente malonil-CoA y metilmalonil-CoA como unidades extensoras, adicionando residuos de acetato y propionato, respectivamente, en la cadena carbonada (Birch et al., 1995). La nigericina pertenece al grupo de poliéteres denominado APPA, los cuales poseen acetato, propionato, propionato y acetato como las primeras adiciones para la síntesis de la

cadena carbonada. Esto está muy relacionado a la formación de los anillos en la molécula de estos poliéteres, ya que todos los compuestos de este grupo poseen los últimos dos anillos de tetrahydrofurano y el último anillo de tetrahydropirano en su estructura final (Cane et al., 1983b).

Conociendo la estructura del intermediario polieno para la biosíntesis de nigericina, fue posible predecir el número y tipo de los módulos de la PKS necesarios para sintetizar este compuesto. Esta PKS estaría conformada por un total de catorce módulos además de un dominio de carga. Se utilizarían un total de nueve unidades de metilmalonil-CoA y cinco unidades de malonil-CoA como unidades extensoras. En dos de los módulos que adicionan propionato, la KS realizaría una condensación con epimerización introduciendo un radical L-metilo saliente en la cadena carbonada. Una vez sintetizado este compuesto, se requiere de una epoxidasa que actúe sobre tres de los cuatro dobles enlaces existentes en el polieno, de modo que es probable que esta enzima esté codificada dentro del mismo grupo de genes. Sobre este intermediario epóxido mediante varias reacciones químicas se generarían los enlaces éter que forman los tres anillos de tetrahydrofurano y tres anillos de tetrahydropirano en la cadena carbonada.

Si bien es posible predecir el número y tipo de módulos de la PKS y las reacciones que se llevarían a cabo sobre el carbono β en cada uno de ellos, no es posible predecir con exactitud el número de módulos por polipéptido, y por lo tanto el número de genes que codifican la PKS de nigericina. Lo anterior se debe a que el número de módulos contenidos en cada polipéptido de las PKS puede variar. A la fecha han sido descritos genes en los que se codifican desde uno hasta seis módulos (Donadio et al., 1991; Xue et al., 2000). En algunos casos es posible identificar al último módulo, pues la actividad de TE está contenida en el C-terminal de la última proteína modular, pero en otros casos esta actividad está codificada en uno o varios genes individuales. Cabe destacar que los genes de PKS de monensina (el único poliéter cuyos genes han sido descritos) difieren de los genes de PKS de macrólidos y otros policétidos. En este caso se observó que era común la presencia de genes que codifican polipéptidos con solamente uno o dos módulos cada uno. Adicionalmente en este caso los genes no tienen todos la misma orientación y están entremezclados con genes que no codifican módulos de PKS, por ejemplo genes

reguladores y genes para otras enzimas involucradas en la síntesis de monensina (Leadlay et al., 2001). Por lo tanto es posible especular que en el caso de los genes de la PKS de nigericina se podría presentar la misma situación, es decir, que no haya una correlación directa entre el orden genético y el orden modular, tal y como ocurre en las PKS de algunos macrólidos.

2. Mecanismo para la formación de los enlaces éter en la estructura de nigericina

Para la formación de los enlaces éter a lo largo de la molécula de los poliéteres se ha propuesto la formación de un intermediario epoxidado a partir de un precursor polieno que es sintetizado por la PKS. Estudios bioquímicos han propuesto al posible intermediario epoxidado teórico de la nigericina (Cane et al., 1983b). Hemos utilizado la estructura de este intermediario epoxidado para deducir la estructura del compuesto previo al ataque de una epoxidasa, y que correspondería al esqueleto carbonado sintetizado por la PKS. Este compuesto teórico carece además de otras modificaciones necesarias para la estructura final del antibiótico.

La estructura teórica (Fig 12) muestra que la PKS de nigericina debe introducir cuatro dobles enlaces en la cadena carbonada. Uno de éstos (entre los carbonos 2 y 3) muestra una posición *cis*, a diferencia de los otros tres, por lo que en algún momento debe ser isomerizado, ya que las PKS de tipo I introducen estos enlaces con una configuración *trans* (Augustus et al., 1998; Donadio et al., 1991; Schwecke et al., 1995; Wu et al., 2000, Xue et al., 2000). Para la síntesis de la monensina, el único poliéter cuyos genes han sido clonados, existe un intermediario polieno que posee tres dobles enlaces, de los cuales dos están en *cis* y uno en *trans*. Entre los genes de la biosíntesis de monensina, se encontraron dos genes que parecen codificar para enzimas con actividad de isomerasa capaces de realizar la transición de dobles enlaces en *trans* a dobles enlaces en *cis* (Leadlay et al., 2001). Por lo tanto, podemos predecir que en el grupo de genes que codifican para la PKS de nigericina debe haber alguno que codifique la enzima responsable de la isomerización.

La estructura teórica del precursor polieno de la nigericina nos sugiere que los dobles enlaces entre los carbonos 16-17, 20-21 y 24-25 son convertidos en grupos epóxido,

los cuales debido a su alta reactividad desencadenan una serie de reacciones químicas para formar los anillos de tetrahidrofurano y tetrahidropirano presentes en la estructura final (Cane et al., 1983b). Esta posibilidad se sustenta en el hecho de que tres de los oxígenos que forman los enlaces éter en la monensina provienen de O_2 y que adicionalmente ha sido reportada la secuencia de un gen para una proteína que muestra homología con epoxidasas dentro del grupo de genes de biosíntesis de este antibiótico (Leadlay et al., 2001). Además, con base en este modelo es posible explicar la formación de los enlaces éter en prácticamente todos los poliéteres del grupo APPA. Ya que se ha determinado la participación de O_2 en la formación de los enlaces éter y la existencia de una epoxidasa para el poliéter monensina, es posible predecir que se encontrará también un gen homólogo dentro del grupo de genes que codifican la PKS de nigericina. Esto es importante pues la presencia de estas epoxidasas parece ser exclusiva para la síntesis de poliéteres, ya que no se han reportado en “clusters” de genes para otros policétidos.

Por último se requieren dos modificaciones posteriores a la formación de los anillos. La primera es la metilación de un hidroxilo para generar el antibiótico grisorixina. La última modificación es una hidroxilación específica sobre la grisorixina para dar origen a la nigericina. Esta es la única diferencia química entre los dos antibióticos. Tanto la reacción de metilación como de hidroxilación sería catalizada por una enzima que muy probablemente se encuentre codificada dentro del mismo grupo de genes biosintéticos de la PKS. Al igual que para varios macrólidos se esperaría encontrar cerca de los genes de PKS, algunos genes que codifiquen para genes reguladores o de resistencia. Hasta el momento no se han reportado genes de resistencia para poliéteres. Se determinó en cepas productoras de nigericina la existencia de una actividad modificadora que disminuía la actividad antibiótica de la misma. No se identificó el tipo de modificación, el gen o el producto difusible responsable de esta modificación (Moncheva et al, 1994).

3. Análisis de la clona N-1.

La elevada similitud entre los genes de *Streptomyces* que codifican diferentes PKS ha sido empleada para su identificación y clonación mediante el uso de sondas heterólogas. Con el fin de iniciar el trabajo de identificación y clonación de los genes de la PKS de

nigericina se escogió una sonda proveniente del gen *eryA3*. Se escogió este fragmento del gen *eryA3* debido a que ha sido utilizado con éxito en diversos trabajos para clonar genes de PKS en varias cepas de *Streptomyces*. Además, este fragmento contiene los dominios enzimáticos AT, KS y ACP, que deben estar presentes en todos los módulos de PKS. Esto garantiza que la sonda posea homología con todos los módulos de una PKS de tipo I sin importar la presencia o ausencia de las actividades enzimáticas encargadas de reducir el grupo cetónico (KR, DH, ER). En teoría, se pudo haber utilizado como sonda cualquier fragmento de un gen de PKS de tipo I de *Streptomyces*. Con el fin de validar el empleo de la sonda de *eryA3* se decidió hibridarla con DNA total de dos cepas de *Streptomyces* productoras de nigericina: la cepa tipo *S. violaceusniger* NRRL B-1476 y la cepa YCED9 (Trejo-Estrada et al., 1998a). En condiciones de baja severidad se observó un gran número de bandas (Fig. 15), de las cuales es probable que no todas pertenezcan a genes de PKS de tipo I. En cambio bajo condiciones de alta severidad observamos un menor número de bandas y una menor intensidad de hibridación en las mismas. Esta hibridación en condiciones de alta severidad fue particularmente evidente en algunas bandas en el caso de la cepa NRRL B-1476, lo cual habla de la gran conservación que hay en las secuencias codificadoras de PKS de *Streptomyces*, y se eligió un fragmento BamHI de 2.7kb para estudiar su secuencia. El método de clonación mediante un minibanco de insertos nos permitió clonarlo fácilmente en un plásmido y a esta clona la llamamos N-1.

La secuencia de la clona N-1 reveló que el inserto tiene 2,654 pb, y que posee dos marcos abiertos de lectura separados por una región de 151pb. Ambos ORFs están incompletos. El ORF 1 codifica para el extremo C-terminal de un polipéptido, en el que se localiza un dominio de ACP que presenta el motivo típico de unión del brazo de fosfopanteteína, donde el residuo Ser140 actúa como el sitio de unión de este grupo prostético. El ORF2 corresponde al extremo N-terminal de un polipéptido que presenta en los primeros 30 residuos una secuencia tipo linker N-terminal de PKS de tipo I y posteriormente codifica para dos dominios, uno de KS y otro de AT. El posible dominio de KS abarca la gran mayoría del ORF2 y posee el motivo típico de KS, donde la Cys140 es el residuo catalítico. El posible dominio de AT está incompleto, y consta de los últimos 31 residuos de la secuencia parcial del ORF2. Entre los dominios KS y AT existe una región que no presenta homología con secuencias de otras PKS de tipo I. Es posible que esta

región marque el final de un domino y el inicio de otro dentro de las proteínas modulares de las PKS (Bevitt et al., 1992).

Aunque este fragmento parece codificar parte de una PKS de tipo I, no es posible determinar mediante un análisis de secuencia si pertenece al grupo de genes que codifican la PKS de nigericina o a alguna otra PKS presente en esta cepa. Por ello se intentó realizar una interrupción cromosomal para generar una cepa mutante, y determinar si ésta era capaz de sintetizar nigericina. Para este fin era necesario contar con la metodología para determinar la presencia de nigericina en sobrenadantes de cultivo, la cual se logró montar con éxito. Por otro lado se utilizó un fragmento interno al ORF2 de la clona N-1 como región de homología para recombinación, lo que ocasionaría la integración del plásmido suicida y la interrupción del ORF2. Sin embargo no fue posible obtener la cepa mutante, a pesar de haber intentado introducir DNA a la cepa de *S. violaceusniger* NRRL B-1476 por transformación, electroporación y conjugación.

La imposibilidad de transformar a esta cepa puede radicar en diversos factores. Como esta cepa presenta sensibilidad a la sacarosa no fue posible el uso de protocolos habituales de transformación en *Streptomyces*, que implican la formación y regeneración de protoplastos (Bibb et al., 1978). Por un lado, fue difícil encontrar las condiciones adecuadas para la obtención eficiente de protoplastos en esta cepa, y por otro lado, una vez que se lograron obtener, el proceso de regeneración del micelio a partir de éstos fue muy deficiente lo que contribuyó a la ausencia de colonias transformantes.

La electroporación no es ampliamente utilizada en *Streptomyces*; sin embargo sí han sido descritos algunos casos en los que ha funcionado (Mazy-Servais et al., 1997; Tyurin et al., 1995; Pigac et al., 1995). Por lo tanto se hicieron algunos intentos de electroporación, los cuales tampoco funcionaron.

Por otro lado, el uso de los protocolos de conjugación para introducir DNA a esta cepa tampoco fue exitoso. Una posibilidad es que la cepa deficiente en metilación de *E. coli* que nosotros utilizamos (GM272) sea una donadora ineficiente en conjugación, en particular con *Streptomyces*. Inclusive uno de los varios protocolos de conjugación que ha

resultado exitoso en diversas cepas de *Streptomyces* no dio resultados positivos para *S. violaceusniger* NRRL B-1476, a pesar de hacer varios intentos.

Por lo tanto, parece ser que *S. violaceusniger* NRRL B-1476 es particularmente refractaria a los diferentes métodos empleados para introducir DNA. Esto pudiera deberse a que esta cepa posee una fuerte actividad nucleolítica hacia el DNA externo, o bien a una baja capacidad de recombinación.

VI. CONCLUSIONES

1. PKS de nigericina

La PKS de nigericina debe estar compuesta de un dominio de carga y 14 módulos para la adición de unidades extensoras. Todos los módulos contienen por lo menos las actividades de KS, AT y ACP. Los módulos 1 y 9 no realizan ninguna reducción sobre el enlace cetónico del carbono β . Los módulos 10, 11 y 12 poseen la actividad de KR que reduce el enlace cetónico dejando un grupo hidroxilo en la cadena carbonada. Los módulos 3, 5, 7 y 14 poseen las actividades de KR y DH reduciendo el enlace cetónico hasta formar un doble enlace. Por último, los módulos 2, 4, 6, 8 y 13 contienen las actividades de KR, DH y ER saturando completamente la cadena acilada. La KS4 y KS13 realiza una reacción de condensación con epimerización dejando un radical L-metilo saliente en la cadena policétida.

Esta PKS construye un policétido lineal tipo polieno de 30 carbonos a partir de nueve unidades extensoras de metil-malonil-CoA y seis unidades de malonil-CoA. Posterior a la síntesis del policétido, este es atacado por una epoxidasa específica que convierte al polieno en un intermediario epoxidado. Debido a una serie de ataques nucleofílicos se genera la estructura del polieter activo y sufre una metilación sitio específica para culminar la biosíntesis de este antibiótico.

2. Clona N-1

Se clonó un fragmento de DNA que contiene dos marcos abiertos de lectura parciales perteneciente a dos genes de PKS de tipo I de *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476. Este fragmento se utilizará como sonda homóloga para realizar un tamizado en una biblioteca de cósmidos para encontrar todos los genes que codifiquen para la PKS de nigericina en esta cepa de *Streptomyces*.

3. Producción e identificación del antibiótico

En el medio MN1 se obtuvo la mejor producción de nigericina para *Streptomyces violaceusniger* NRRL B-1476. Se montaron los protocolos de bioensayo y cromatografía en capa fina para identificar de forma rápida, fácil y específica la presencia de nigericina en sobrenadantes de cultivo.

VII. PERSPECTIVAS

La intención del presente trabajo fue la de iniciar los trabajos de clonación del “cluster” de genes que codifica la biosíntesis del antibiótico poliéter nigericina. La etapa inicial consistió en predecir las características más importantes que deben tener dichos genes, validar la sonda y, de ser posible, clonar un fragmento perteneciente al “cluster” que sirviera como ancla para caminar a ambos lados del cromosoma y tener el gen completo. Dado que esta última parte no ha sido posible, lo que haremos para clonar todo el “cluster” de genes de biosíntesis de nigericina será construir una biblioteca de cósmidos a partir de DNA total de *S. violaceusniger* NRRL B-1476. Esta biblioteca se va a tamizar utilizando como sondas tanto al inserto de la clona N-1 como a la sonda *eryA*, con el fin de maximizar la probabilidad de encontrar genes de PKS de tipo I. Además, sería de gran ayuda poder utilizar como sonda la secuencia de una epoxidasa, de modo que se realice una búsqueda más específica sobre genes de PKS que codifiquen específicamente para poliéteres. En el caso de que el tamizado de la biblioteca muestre que hay más de un “cluster” que codifique PKS de tipo I en esta cepa, será de suma importancia la correlación de los genes con la predicción teórica de la estructura modular de la PKS. Adicionalmente se continuarán intentando otros procedimientos para lograr la interrupción de genes en esta cepa, con el fin de demostrar de forma experimental que los genes clonados correspondan a los de biosíntesis de nigericina.

El estudio de las PKS de tipo I de poliéteres ayudará a entender tanto su estructura como la participación de otras actividades enzimáticas que no están presentes en otros policétidos de tipo I.

VIII. REFERENCIAS

1. Altschul, Stephen F., Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
2. Aparicio, J.F., Molinar I, Schewecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J & Leadlay P.F., (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
3. Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E & Martin JF. (1999) The Biosynthetic Gene Cluster for the 26-Membered Ring Polyene Macrolide Pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J Biol. Chem.* 274: 10133-10139.
4. Augustus PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Muller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR & Floss H.G., (1998) Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem Biol.* 5: 69-79.
5. Alvarez MA, Fu H, Khosla C, Hopwood DA & Bailey JE (1996) Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides: Properties of the whiE Aromatase\Cyclase. *Nature Biotech.* 14: 335-338.
6. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thompson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'neil S, Rabinowitch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J and Hopwood DA. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature.* 417: 141-147.
7. Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF & Leadlay PF. (1992) 6-Deoxyerythronolide –B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*, Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *Eur. J. Biochem.* 204: 39-49.
8. Bibb MJ., Ward JM & Hopwood D.A., (1978) Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature.* Vol. 274, 398-400.
9. Bibb MJ, Biró S, Motamedi H, Collins JF & Hutchinson CR (1989) Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* *tcml* genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* 8:2727-2736.

10. Birch AW & Robinson J.A. (1995) Polyethers. *Biotechnology*. 28: 443-476.
11. Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strom AR, Valla A & Zotchev SB (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7:395-403.
12. Brown R.L., (1979) Determination of lonomycin by reaction with vanillin. *J.AOAC.* 62:266-268.
13. Campelo AB & Gil JA. (2002) The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology*. 148: 51-59.
14. Cane DE, Halser H & Liang TC (1981) Polyether biosynthesis. Origin of the oxygen atoms of monensin A. *J. Am.. Chem.Soc.* 103: 5962-5965.
15. Cane DE, Liang TC, Hasler H. (1981) Macrolide biosynthesis. Origin of the oxygen atoms in the erythromycins. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 5960-5962
16. Cane DE, Liang TC, Kaplan L, Nallin MK, Schulman MD, Hensens OD, Douglas AW & Albers-Schoenberg G. (1983a) Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the avermectins. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4110-4112.
17. Cane DE, Celmer WD & Westley JW. (1983b) Unified Stereochemical Model of Polyether Antibiotic Structure and Biogenesis. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 3594-3600.
18. Chamberlain, K. & Crawford, D. L., (1999) In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Micro. Biotech.* 23: 641-646.
19. Chater KF & Wilde LC (1976) Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease Sall. *J. Bacteriol.* 128: 323-334.
20. Chater KF. (1990) Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Micro.* 4: 1679-1691.
21. Chater KF. (1993) Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 685-713.
22. Davis NK & Chater KF (1990) Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Micro.* 4: 1679-1691.
23. Ditta, G, Schmidhauser T, Yakobson E, Lu P, Liang XW, Finlay DR, Guiney & Helinski DR. (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid.* 13: 149-153.

24. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ & Katz L. (1991) Modular Organization of Genes Required for Complex Polyketide Biosynthesis. *Science*. 252: 675-679.
25. Donadio S. & Katz L. (1992) Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *Gene*. 111:51-60.
26. Ensign JC (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 185-219.
27. Figurski DH & Helinski DR. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *PNAS*. 76: 1648-1652.
28. Flett F, Mersinias V & Smith CP. (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS. Microbiol. Lett.* 155, 223-229.
29. Gokhale RS, Tsuji SY, Cane DE & Khosla C (1999) Dissecting and Exploiting Intermodular Communication in Polyketide Synthases. *Science*. 284: 482-485.
30. Golab, T & Scroggs R.E., (1973) Colorimetric method for Monensin. *J. AOAC*. 56: 171-173.
31. Glasy JS (1992) *Encyclopedia of Antibiotics*. 3rd Edition. John Wiley & Sons.
32. Haydock SF., Aparicio J.F., (1995) Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases. *FEBS Letters*. 374: 246-248.
33. Holt JG, (ed) (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 4: 2451-2469.
34. Horinouchi S. & Beppu T. (1992) Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene*. 115:167-172.
35. Horinouchi S & Beppu T. (1994) A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Micro.* 12: 859-864.
36. Hopwood D.A., Bibb MJ, (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation Norwich.
37. Hopwood DA (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem. Reviews* 97: 2465-2497.

38. Karagouni AD, Vionis AP, Baker PW, Wellington EMH (1993) The effect of soil moisture content on spore germination, mycelium development and survival of a seeded streptomycete in soil. *Microbiol. Releases*. 2: 47-51.
39. Katz L & Donadio S. (1993) Polyketide Synthesis: Prospects for Hybrid Antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 875-91
40. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D & Trollinger D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*. 70:191-197.
41. Khosla C, Gokhale RS, Jacobsen JR & Cane DE (1991). Tolerance and Specificity of Polyketide Synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 68:219-253.
42. Khosla C, Ebert-Khosla S & Hopwood DA (1992) Targeted gene replacements in a *Streptomyces* polyketide synthase gene cluster: role for the acyl carrier protein. *Mol. Micro.* 6:3237-3239.
43. Khosla C, McDaniel R, Ebert-Khosla S, Torres R, Sherman DH, Bibb MJ & Hopwood DA (1993) Genetic Construction and Functional Analysis of Hybrid Polyketide Synthases Containing Heterologous Acyl Carrier Proteins. *J. Bact.* 2197-2204.
44. Khosla C., Jacobsen J.R., (1999) Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 219-253.
45. Kline RM & Golab T. (1965) A simple technique in developing thin-layer bioautographs. *J. Chromatogr.* 18: 409-411.
46. Leadlay PF, Staunton J, Oliynyk M, Bisang C, Cortés J, Frost E, Hughes-Thomas ZA, Jones MA, Kendrew SG, Lester JB, Long PF, McArthur HAI, McCormick EL, Oliynyk Z, Stark CBW & Wilkinson CJ. (2001) Engineering of complex polyketide biosynthesis-insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster. *J Ind Microbiol and Biotech.* 27: 360-367.
47. Lin CY & Smith S. (1978) Properties of thioesterase component obtained by limited trypsinization of fatty-acid synthase multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 253: 1954-1963.
48. Malpartida F & Hopwood DA (1986) Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen Genet.* 205: 66
49. Malpartida F, Hallam SE, Kieser HM, Motamedi H, Hutchinson CR, Butler MJ, Sugden DA, Warren M, McKillip C, Bailey C, Humphreys GO & Hopwood DA. (1987) Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes. *Nature*. 325:818.

50. Maplestone RA, Stone MJ & Williams DH. (1992) The evolution role of secondary metabolites-a review. *Gene*. 115:151-157.
51. Mazy-Servais C & Dusart J (1997) Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 135-138.
52. McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA & Khosla C. (1993) Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides. *Science*. 262: 1546-1550.
53. Mc Daniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA & Khosla Chaitan (1994) Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides: actVII and actIV Genes Encode Aromatase and Cyclase Enzymes Respectively. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 10855-10859.
54. Miguelez EM, Garcia MAR, Hardisson C & Manzanal MB (1994) Autoradiographic Study of Hyphal Growth during Aerial Mycelium Development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bact.* 176: 2105-2107.
55. Moncheva PA, Christova KR & Ivanova IV. (1995) Resistance to the polyether ionophore antibiotic pandavir (nigericina) in two producing strains of *Streptomyces*. *J. Antibiotics*. 48:811-814.
56. Mouslim J, Cuer A. & David L. (1993) Epigrisorixin, a new polyether carboxylic antibiotic. *J. Antibiotics*. 46:201-203.
57. Mouslim J, Cuer A, David L & Tabet JC. (1995) Biosynthetic Study on the Polyether Carboxylic Antibiotic, Nigericin Production and Biohydroxylation of Grisorixin by Nigericin-producing *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. *J. Antibiotics*. 48:1011-1014.
58. Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahahi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y & Hattori M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS*. 98:12215-12220.
59. Omura S. (2002) Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, and Practice. Second Edition. Academic Press.
60. Pigac J. & Schrempf H. (1995) A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 352-356.
61. Roberts AN, Hudson GS & Brenner S. (1985) An erythromycin-resistance gene from an erythromycin-producing strain of *Arthrobacter* sp. *Gene*. 35: 259-270.
62. Rock CO & Jackowski S. (2002) Forty Years of Bacterial Fatty Acid Synthesis. *Biochem and Biophysical Research Communications*. 292: 1155-1166.

63. Rup L, Kumari R, Kaur H, Khanna R, Dhingra N & Tuteja D. (2000) Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type I PKS. Trends in Biotechnology. June, Vol. 18, 264-274.
64. Schwecke T, Aparicio JF, Molnar I, König A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynik m, Cafferey P, Cortes J, lester JB, Bohn GA, Staunton J & Leadlay PF (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. PNAS. 92: 7839-7843.
65. Sherman DH, Malpartida F, Bibb MJ, Kieser HM, Bibb MJ & Hopwood DA (1989) Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22. EMBO J. 9: 2717-2725.
66. Sherman DH, Bibb MJ, Simpson TJ, Johnson D, Malpartida F, Fernandez-Moreno M, Martínez Eduardo, Hutchinson CR & Hopwood DA (1991) Molecular Genetic Analysis Reveals a Putative Bifunctional Polyketide Cyclase/Dehydrase Gene from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces violaceoruber*, and a Cyclase/O-methyltransferase from *Streptomyces glaucescens*. Tetrahedron. 47: 6029-6043.
67. Spavold Z, Robinson JA & Turner DL (1986) Biosynthesis of the polyether antibiotic narasin: origins of the oxygen atoms and the mechanism of ring formation. Tetrahedron Lett. 27: 3299-3302.
68. Stassi D. & Katz L., (1997) A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. Gene. 203: 1-9.
69. Suwa M, Sugino H, Sasaoka A, Mori E, Fujii S, Shinkawa H, Nimi O & Kinashi H. Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. Gene. 246: 123-131.
70. Tabet, JC & David L. (1995) Biosynthetic Study on the polyether Carboxylic antibiotic, Nigericin production and biohydroxylation of grisorixin by nigericin-producing strain *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B 1865. J. Antibiotics. 48: 1011-1014.
71. Thivend P. & Jouany JP. (1983) Effect of lasalocid sodium on rumen fermentation and digestion in sheep. Reprod. Nutr. Dev. 23:817-828.
72. Trejo-Estrada, S., Crawford, D.L., (1998a) Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. J. Ind. Micro. Biotech. 21: 81-90.
73. Trejo-Estrada, S., Crawford, D.L., (1998b) In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. World Journal of Microbiol. Biotech. 14: 865-872.

74. Tsou HR, Rajan S, Mowery PC, Bullock MW & Stockton GW.(1984) Natural abundance two dimensional double quantum ^{13}C NMR spectroscopy of maduramicin, a polyether ionophore antibiotic and coccidiostat. *J antibiot.* 37: 1651-1663.
75. Tyurin M. & Livshits V. (1995) Electrotransformation of germinating spores of *Streptomyces* spp. *Biotech. Techniques.* 9: 737-740.
76. Vining LC. (1992) Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity – a review. *Gene.* 115:135-140.
77. Ward JM. & Bibb MJ (1986) Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene form Tn5 as indicator. *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-478.
78. Weissman K.J & Leadlay P.F., (1997) The Molecular Basis of Celmer's Rules: The Stereochemistry of the Condensation Step in Chain Extension on the Erythromycin Polyketide Synthase. *Biochemistry.* 36: 13849-13855.
79. Wisconsin Package Versión 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
80. Wright F & Bibb MJ (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113: 55-65.
81. Wu K., Chung L., Revill WP., Katz L. & Reeves CD. (2000) The FK506 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene.* 252: 81-90.
82. Xue Y, Wilson D. & Sherman D. (2000) Genetic architecture of the polyketide synthases for methymycin and pikromycin series macrolides. *Gene.* 245: 203-211.
83. Xue Y. & Sherman DH. (2000) Alternative modular polyketide synthase expression controls macrolactone structure. *Nature.* 403: 571-575.