



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Clonación y secuenciación del gen homólogo a
SCO2127 de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*;
un posible potenciador de la actividad de Glk.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

FABIÁN MAURICIO SÁNCHEZ CARRILLO

TUTORA

M. en B. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

2007



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Clonación y secuenciación del gen homólogo a *SCO2127* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*; un posible potenciador de la actividad de Glk.

Reconocimientos.

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán, en el laboratorio de Microbiología Industrial, a cargo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce a los sinodales que asesoraron el desarrollo de esta tesis y conformaron el jurado que evaluó el presente trabajo escrito.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel

A la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán

Al M en C. Adán Chávez Castillo.

A la M. en C. Beatriz Rodarte Murguía

Agradecimientos y Dedicatorias:

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su incansable paciencia y su respaldo en esta investigación.

A la M en B. Beatriz Ruiz Villafán por su gran corazón y por enseñarme el valor del rigor científico.

A Dra. Romina Rodríguez Sanoja por sus críticas constructivas tan útiles para la realización de esta tesis.

A la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky por brindarme sus amistad.

A la M. en C. Beatriz Rodarte Murguía por sus invaluable consejos.

A mis compañeros de laboratorio (*el Merol*) Adán, Lalo, Caty, Aurora, Tania, Yolis, Jesús, Alba, Daniel, Paola, Vale, Rickhard, Itzel, Paloma, Angie, Naya, Susie, Alonso, Alfredo, Hugo, por su compañía y respaldo incondicional.

Dedicatorias.

A mi padre a quien agradezco me enseñara que la mejor forma de enfrentar la vida es con alegría e intensidad.

A mi madre, por mantener siempre con vida la fe en mi mismo.

A Amelia por rescatarme siempre en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi abuela Manuela por darme asilo en su gran corazón y apoyarme en todo momento.

A mis tíos Laura Sánchez y Francisco Guevara por su apoyo moral e incondicional; así como a mis primos Berenice, Álvaro, Francisco, y Edgar.

A mis hermanos Oscar, Blanca Ivette y Alejandro, los quiero mucho, arriba y adelante hasta la victoria.

A Bety "*Master*" por ser mi guía y permitirme aprender de ti, pues eres una maravillosa persona.

A mi tío Manuel, por tratar de llenar a su modo el inmenso vacío que deja un padre cuando ya no esta con nosotros.

A Daniela, pues tu amor es mi mayor recompensa.

“Incorporarse a una empresa compuesta por individuos que intelectualmente no están por encima de uno es la mejor receta para el desastre... aceptad el reto de mentes que a primera vista son más brillantes que vosotros en velocidad y profundidad. Mas tarde es probable que descubráis que vuestros nuevos colegas tienen vacíos de conocimiento que podéis llenar. Entonces todos los que hay en la sala ganan.”

Watson James D. (1928-)

“Lo que más se necesita para aprender es un espíritu humilde.”

Confucio (551 -479 a.C)

“Si dudas de ti mismo, estás vencido de antemano.”

Henrik Johan Ibsen (1828 - 1906)

“La imaginación es más importante que el conocimiento”

Albert Einstein (1879-1955)

*“You can't always get what you want, but if you try sometimes you might find,
you get what you need...”*

Mick Jagger (1943 -) y Keith Richards (1943-)

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno.

Sánchez
Carrillo
Fabián Mauricio
5645-5303
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Licenciado en Biología
09711643-9

2. Datos del tutor

M. en B.
Beatriz
Ruiz
Villafán

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Romina
Rodríguez
Sanoja

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Sergio
Sánchez
Esquivel

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Adán
Chávez
Castillo

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Beatriz
Rodarte
Murguía

7. Datos del trabajo escrito.

Clonación y secuenciación del gen homólogo a *SCO2127* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*; un posible potenciador de la actividad de Glk.

65p.

2007

Índice	Página
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Modelo de Estudio.....	13
Clasificación taxonómica de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	14
Importancia del género <i>Streptomyces</i>	14
Características del género <i>Streptomyces</i>	14
MARCO TEÓRICO.....	16
Represión Catabólica por fuente de Carbono en modelos procariontes.....	17
Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).....	17
RCC en <i>E. coli</i> por control transcripcional específico.....	18
RCC en <i>E. coli</i> por reguladores globales de control transcripcional.....	19
RCC en bacterias Gram positivas de bajo contenido de GC.....	21
RCC por control transcripcional específico.....	21
RCC por reguladores globales de control transcripcional.....	22
RCC en bacterias Gram positivas de alto contenido de GC.....	23
Sistemas de transporte de carbohidratos en el género <i>Streptomyces</i>	24
El papel de la glucosa cinasa (Glk) en el fenómeno de RCC en el género <i>Streptomyces</i>	26
JUSTIFICACIÓN.....	29
OBJETIVOS.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivos Particulares.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Cepas bacterianas.....	31
Vector de clonación.....	31
Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> JM109.....	31
Preservación de células de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	32
Aislamiento de DNA genómico de <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	32
Diseño de Oligonucleótidos cebadores para ensayo de PCR.....	34
Purificación de bandas a partir del gel de agarosa.....	36
Ligación del gen homólogo a <i>SCO2127</i> y <i>glk</i> en el plásmido pGEM-T Easy.....	36
Electroporación de células <i>E. coli</i> JM109.....	38
Aislamiento del plásmido en pequeña (Miniprep) y en gran escala (Midiprep).....	39
Patrón de corte con la enzima <i>Eco</i> RI.....	40
Secuenciación.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
Ensayos de PCR para amplificar <i>SCO2127</i> en <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	43
PCR de gradiente con los oligonucleótidos <i>SAV6073Fw</i> y <i>SCOglk</i> Rev.....	44
Transformación.....	46
Secuenciación del extremo T7 y análisis por alineamiento.....	50
Análisis de la secuencia del extremo SP6.....	52
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
APENDICES.....	61
GLOSARIO.....	65

RESUMEN

Los miembros del género *Streptomyces* producen una gran variedad de metabolitos secundarios, que son de gran importancia, por sus diversas aplicaciones desde el punto de vista médico, económico, industrial, biotecnológico y científico. Sin embargo la producción de dichos metabolitos secundarios, está sujeta a un tipo de regulación negativa denominada represión catabólica por fuente de carbono (RCC). Se sabe relativamente poco sobre la forma en la que este mecanismo se lleva a cabo en este género. No obstante, existen evidencias de que la enzima glucosa cinasa (Glk) juega un papel regulatorio central en dicho fenómeno, aunque no se sabe como. Por otro lado, se ha observado que el gen *SCO2127* corriente arriba y contiguo al gen que codifica para Glk (*glk*) en *S. coelicolor*, ejerce un efecto positivo sobre la actividad de esta enzima en cepas mutantes de *S. peucetius* var. *caesius*, que presentaban una disminución en dicha actividad, restaurando además la sensibilidad a RCC, la cual estaba disminuida en estas mutantes. Sin embargo, no se sabe si un gen homólogo a *SCO2127* este presente en el genoma de esta variedad, si este fuera el caso ¿Presentaría la misma actividad que *SCO2127* de *S. coelicolor*? Con el fin de iniciar la caracterización del citado gen en *S. peucetius* var. *caesius*, el presente trabajo tuvo como objetivo en una primera fase; aislarlo, clonarlo y secuenciarlo. En los ensayos iniciales, se intento amplificar por PCR, utilizando oligos diseñados a partir de las secuencias disponibles de sus homólogos en *S. coelicolor* y *S. avermitilis*, sin conseguirlo. Debido a lo anterior se decidió amplificar en conjunto con *glk*, tomando en consideración que la secuencia de este gen en *S. peucetius* var. *caesius* se encuentra disponible, así como los oligos diseñados por nuestro grupo de trabajo para tal objetivo. Entre todas las combinaciones de cebadores empleadas, el par compuesto por *SCOglkRev* y *SAV6073Fw*, generó un producto de PCR del tamaño esperado (1500 pb). Las secuencias obtenidas se analizaron por alineamiento en el programa BLAST. Los resultados arrojaron una identidad del 92% con el gen *SAV6073* y del 82% con *SCO2127* en su extremo amino, y una identidad del 95% con el extremo carboxilo del gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*. De acuerdo con estos resultados el fragmento clonado contiene la región homóloga a *SCO2127* y *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*. Como perspectivas, se sugiere liberar el fragmento correspondiente al gen objetivo, utilizando enzimas de restricción o implementando un PCR con cebadores basados en las secuencias obtenidas; para continuar con su plena secuenciación y caracterización.

INTRODUCCIÓN.

Las industrias biotecnológicas se sustentan en el aprovechamiento de las actividades metabólicas de células provenientes de microorganismos, plantas, animales y hongos, para producir una amplia variedad de compuestos, mismos que son utilizados a su vez, por otras industrias como aquellas que producen alimentos, las farmacéuticas y de la salud (Parekh y col., 2000).

Desde el último cuarto del siglo XX, los productos microbianos han tenido un éxito aplastante en nuestra sociedad, principalmente los metabolitos secundarios, por su gran aceptación y sus diversas aplicaciones. Los productos microbianos (así como de plantas) son los agentes contra infecciones y contra cáncer más importantes hoy en día, han reducido el dolor, el sufrimiento y han revolucionado la medicina (Demain, 2006).

Entre los productos microbianos más importantes se encuentran aquellos que son resultado del metabolismo primario: aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos, entre otros; así como los que resultan del metabolismo secundario: antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, agentes para disminuir el colesterol y drogas antiparásitos (Demain, 2006).

En la naturaleza, el metabolismo de dichos productos está cuidadosamente controlado para evitar el desperdicio de energía y la acumulación de intermediarios o de enzimas que se necesitan para su biosíntesis, esta regulación está controlada finalmente por las secuencias de los nucleótidos en su DNA, que programa todas sus actividades biológicas (Parekh y col., 2000). Por esta razón, los microorganismos aislados de la naturaleza producen generalmente bajos niveles de tales metabolitos, por lo tanto la sobreproducción debe lograrse en un laboratorio, antes de llevarse a una planta piloto para su escalamiento (Demain, 2006).

Mientras que la implementación de diversos métodos para obtener mayores rendimientos de productos del metabolismo primario y enzimas extracelulares en cepas de uso industrial, ha tenido grandes avances, la producción de metabolitos secundarios no ha sido tan exitosa, debido a la compleja regulación celular que existe en los microorganismos (Parekh y col., 2000).

La ciencia y la tecnología de la manipulación para el mejoramiento de cepas microbianas, para aumentar su capacidad metabólica y su aplicación biotecnológica, se denomina “*mejoramiento de cepas*”. Dicho mejoramiento, no es nuevo, se ha utilizado por siglos en la industria de la “antigua biotecnología”; ejemplos de esto se observan en la preparación de comida y bebidas fermentadas, tales como el yogurt, el queso y el vino; donde cepas especializadas eran (y son aún hoy en día) utilizadas. Actualmente los avances en bioquímica, biología molecular, ingeniería genética, etcétera, han contribuido al establecimiento de una “nueva biotecnología” cuyas técnicas interdisciplinarias son aplicadas al “mejoramiento de cepas” (Parekh y col., 2000).

Actualmente la producción a gran escala de productos para la salud, aminoácidos, suplementos alimenticios, enzimas y antibióticos entre otros, sirven como testimonio del importante papel que representa el “*mejoramiento de cepas*”. El desarrollo exitoso de cepas mejoradas requiere de un profundo conocimiento de su fisiología, genética, regulación y control de rutas biosintéticas, entre otros factores; así como las condiciones óptimas de crecimiento dentro de los fermentadores (Parekh y col., 2000).

El método clásico para el desarrollo de cepas mejoradas ha sido la mutagénesis y la selección al azar de dichas cepas. El objetivo de dicha herramienta es maximizar la frecuencia de la mutación deseada en una población, tratando de minimizar la frecuencia de mutaciones que puedan contrarrestar el impacto positivo de la mutación deseada (Parekh y col., 2000). Sin embargo, ciertas tecnologías genéticas modernas

como la clonación y la recombinación genética, entre otras, han entrado en escena en años recientes. Por ejemplo, actualmente la biología molecular es la principal herramienta en el área de investigación de las industrias farmacéuticas (Demain, 2006). Sin duda el mejoramiento de cepas utilizadas en diversas industrias, así como el descubrimiento de nuevas aplicaciones para sus metabolitos, van de la mano con las ganancias de las compañías que implementan proyectos de investigación en esta área. No olvidemos que el profundo conocimiento del metabolismo de dichas cepas, es imperativo para generar los productos en las cantidades y formas deseadas.

La rentabilidad del metabolito en venta tiene un componente clave, “el costo por unidad de producto manufacturado”, el mejoramiento de las cepas microbianas para producción, ofrece la gran oportunidad de reducir dicho costo sin desembolsar una fuerte cantidad de capital (Parekh S., 1999).

En el 2004 el mercado farmacéutico fue valuado en 550 billones de dólares (Maggon y col., 2005) y se espera que rebase los 900 billones de dólares para el 2008 (Patwardhan y col., 2005). En el año 2002, cerca de 20,000 antibióticos fueron descubiertos, se calcula que aproximadamente el 45% son producidos por actinomicetos, de estos el 80% se origina por miembros del género *Streptomyces* (Demain, 2006). Por lo anterior, se hace evidente la importancia económica de éste género para la industria farmacéutica a nivel mundial. Entre los antibióticos producidos por este género, existen agentes antitumorales como las bleomicinas y las antraciclinas; la especie *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, por ejemplo, produce daunorrubicina (DNR) y doxorrubicina (DXR) (Fig. 1) que pertenecen al grupo de las antraciclinas (Lomovskaya, y col., 1999).

La DXR es actualmente uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados contra un amplio espectro de tipos de cáncer (Hao y Hutchinson, 2006), tales como cáncer de ovario, de pecho y sarcoma de Kaposi.

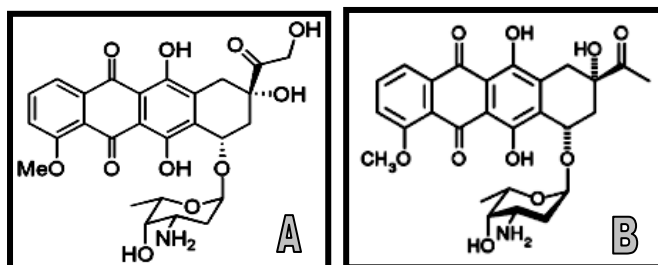


Figura 1. Modelo de los antibióticos DXR y DNR. [A] Estructura de la Doxorubicina que difiere de la daunorrubicina solo por la hidroxilación en el carbono 14. [B] Estructura de la Daunorrubicina

La mega corporación farmacéutica Schering-Plough comercializa actualmente este metabolito secundario bajo el nombre de “*Caelyx*”. En enero de 2007 la Unión Europea aprobó una nueva formulación de la DXR, en la que se recubre la sustancia activa con una capa de liposomas pegilados, esta cubierta reduce considerablemente la toxicidad cardiaca que produce la doxorubicina, ya que evita el contacto con el corazón. La cubierta de liposomas pegilados hace que la molécula sólo se "abra" en contacto con un sistema vascular anormal, esto es, en el tejido tumoral. Las ventas de este producto para Schering-Plough en el 2006 alcanzaron 127 millones de dólares en todo el mundo (http://www.sch-plough.com/schering_plough/index.jsp).

Sin embargo, a pesar de su amplio uso y de que es un precursor para la síntesis de numerosos análogos y derivados (Hutchinson. y Colombo, 1999), los bajos rendimientos y altos gastos de producción, hacen de la DXR un medicamento de muy alto costo. En México, en algunas empresas que distribuyen actualmente la doxorubicina, el costo promedio de este metabolito secundario es de 250 dólares por 50 mg, (<http://www.pharmawebglobal.com>) esto significa que 1mg de doxorubicina cuesta 2 dólares.

La compleja mezcla de metabolitos que se producen durante la fermentación de este importante anticancerígeno, hacen de su separación un procedimiento muy costoso, pues esto hace que se requieran etapas adicionales para su purificación (Stutzman-Engwall y Hutchinson, 1989). Adicionalmente se ha observado que la producción de metabolitos secundarios se relaciona con las condiciones nutricionales que limitan el crecimiento en los microorganismos productores (Santana y col., 1994). Sólo cuando la tasa de crecimiento normal de dicho microorganismo se ve disminuida, se inicia una etapa de producción de metabolitos secundarios, este comportamiento fue observado en la industria de antibióticos mucho antes de que se entendieran las causas de este fenómeno.

Por otro lado, altas concentraciones de glucosa y otros carbohidratos de fácil asimilación también pueden afectar la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Escalante y col., 1999), por ejemplo, se sabe que en *S. peucetius* var. *caesius*, la síntesis de DXR, se afecta negativamente por glucosa. Sin embargo, la glucosa ha sido utilizada ampliamente como un sustrato para el crecimiento y producción fermentativa de un gran número de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Escalante y col., 1999). Este fenómeno represivo es uno más de los factores responsables de los bajos rendimientos de producción de DXR, inhibiendo además, la síntesis de una gran diversidad de enzimas catabólicas. ¿Por qué sucede esto?

Se cree que en el hábitat natural este proceso podría incrementar la adecuación de los microorganismos, ya que se favorece la optimización de los niveles de crecimiento en ambientes que proveen mezclas complejas de nutrientes (Stülke y Hillen, 1999). Esto sucede a través de un sistema de control global; al cual se le denomina represión catabólica por fuente de carbono (RCC) y es el término utilizado para describir el fenómeno general que presentan los microorganismos, cuando la presencia de una

fuelle de carbono preferencial o de mayor facilidad de absorción en el medio, puede reprimir la expresión de ciertos genes y operones, cuyos productos están involucrados con la utilización de fuentes de carbono alternativas (Stülke y Hillen, 1999). Se sabe relativamente poco acerca de cómo las bacterias del género *Streptomyces* detectan y regulan la utilización de fuentes de carbono (Stülke y Hillen, 1999).

Comprender el mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*, a través de sus genes reguladores podría llevarnos a conseguir mejores rendimientos de producción de numerosos metabolitos secundarios (Parajuli y col., 2005) incluyendo la doxorubicina. El presente trabajo se propone contribuir en cierta medida, a la comprensión del mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*, tomando como modelo de estudio a *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Modelo de Estudio.

S. peucetius var. *caesius* se caracteriza por la formación de un micelio aéreo abundante, con una coloración azul-verde a gris (tipo *caesius* = del latín *caesius*, "cielo" en consideración al color azul), y un micelio vegetativo color rojo, mucho más intenso en comparación con su cepa parental (Grein, 1987).

La cepa *S. peucetius* var. *caesius* se obtuvo a partir de las colonias sobrevivientes de *S. peucetius* tratadas con N-nitroso-N-metiluretano (Arcamone y col., 1969), en un esfuerzo por aislar cepas sobreproductoras del antibiótico DNR. No obstante, esta mutante producía DXR, una versión hidroxilada en el carbono 14 (Fig. 1) de la DNR (Grein, 1987). Se ha reportado que bajo ciertas condiciones y en un medio altamente-amortiguado la cepa 29050 de *Streptomyces peucetius* produjo cantidades significativas de DXR, lo que llevó a la caracterización los genes *dnR* y *dxR*, que codifican para DNR y DXR respectivamente (Lomovskaya y col. 1998), así como las proteínas reguladoras involucradas en dicha síntesis (Jiang y Hutchinson, 2006).

Clasificación taxonómica de *S. peucetius* var. *caesius*.

La clasificación del microorganismo *S. peucetius* var. *caesius* enclavado en el *phylum* actinobacteria queda de la siguiente manera:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Actinobacteria
Orden:	Actinomycetales
Familia:	Streptomycetaceae
Género:	<i>Streptomyces</i> Waksman & Henrici 1943
Especie:	<i>Streptomyces peucetius</i>
Subespecie	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>

Importancia del género *Streptomyces*.

Los microorganismos de este grupo tienen una gran importancia ambiental, pues contribuyen a la degradación de compuestos insolubles muy abundantes en el medio ambiente, como son la celulosa y la quitina, contribuyendo así con el ciclo del carbono. Además, son de suma importancia para nuestra sociedad, por la gran variedad de productos obtenidos de este género con aplicaciones en medicina (como ya se discutió anteriormente), agricultura, veterinaria, entre otros.

Características del género *Streptomyces*.

Es el género más extenso del *phylum* Actinobacteria, sus miembros tienen un alto contenido de GC en su genoma (60-70%). Las bacterias de este género son aerobias estrictas. La identificación y clasificación principalmente se basa en el estudio de las características morfológicas, bioquímicas, así como en la amplificación por PCR de la subunidad 16s del RNAr (Hopwood, 2000). Se encuentran predominantemente en suelos y en vegetación descompuesta (saprofíticos). Su ciclo de vida presenta una diferenciación morfológica única entre los procariontes (Fig. 2).

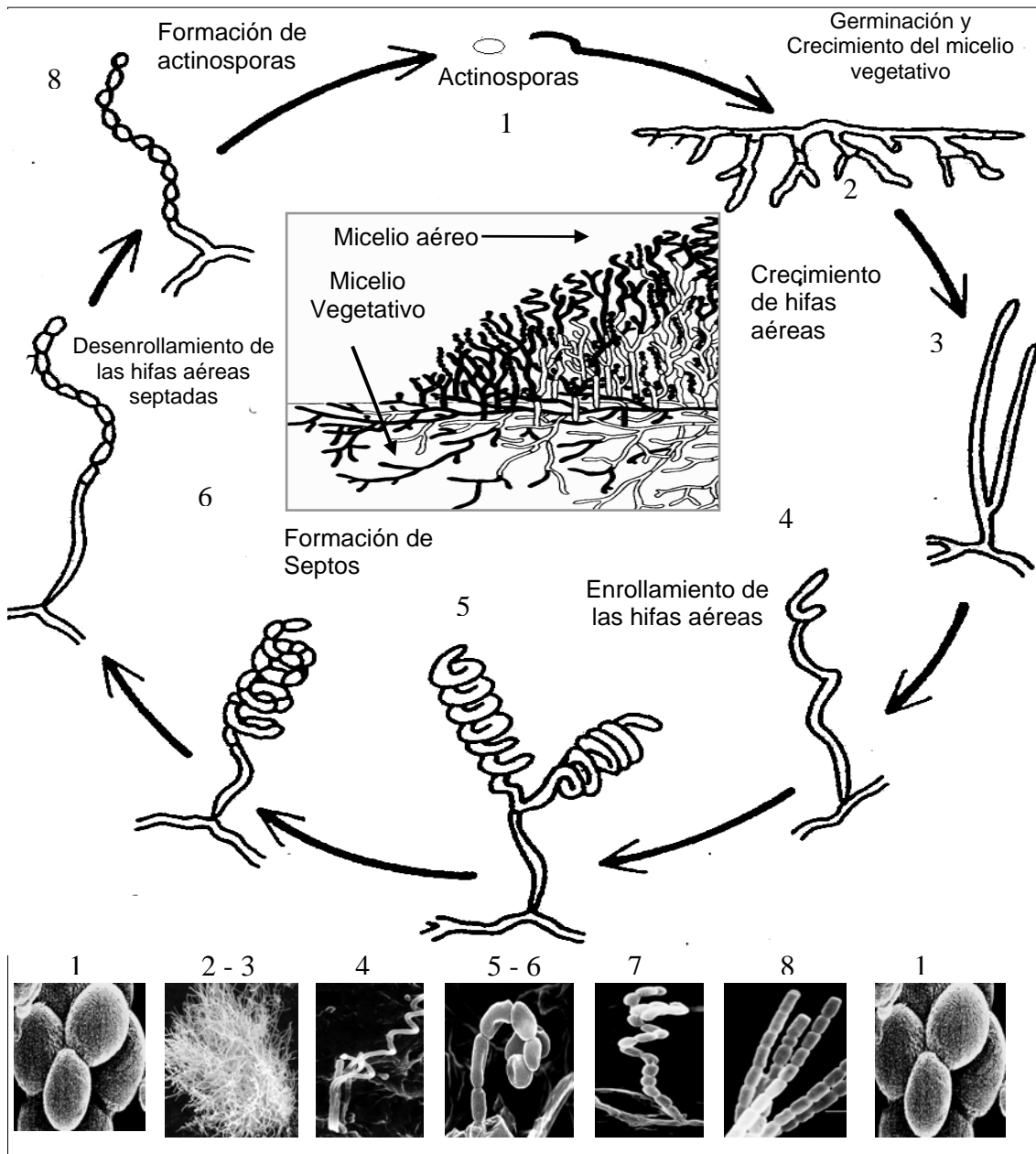


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. El ciclo comienza cuando una actinospora germina para formar hifas que crecen por extensión apical, ramificándose hasta formar un micelio vegetativo, el cual se nutre de compuestos insolubles presentes en el suelo, produciendo una variedad de enzimas extracelulares. Una vez que los nutrientes comienzan a agotarse, la diferenciación de las hifas aéreas comienza, creciendo a partir de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente las hifas aéreas comienzan a enrollarse y septarse para formar actinosporas para comenzar un nuevo ciclo (Modificado de Hopwood y col., 1987). **Nota:** a menudo se ha llamado inadecuadamente conidios a las actinosporas. Los verdaderos conidios son esporas eucariotas haploides, diseñados para la propagación de hongos ascomicetos y basidiomicetos. Las actinosporas son diferentes de las endosporas bacterianas, de las que se distinguen porque éstas se forman en el interior de la célula madre y luego se liberan. Por el contrario, en el desarrollo de las actinosporas la célula entera se convierte en una forma resistente, de gruesa pared celular (Margulis y Schwartz, 1985).

MARCO TEÓRICO.

Cuando las bacterias están expuestas a una mezcla de fuentes de carbono, estas seleccionan el sustrato que les confiere un crecimiento más eficiente y rápido (Titgemeyer y Hillen, 2002); de tal forma que, cuando se agota el primer sustrato se sintetizan enzimas para la utilización del siguiente. Para percibir dicha situación nutricional, han desarrollado mecanismos muy sofisticados, y así ajustar sus capacidades catabólicas a través de respuestas regulatorias, referidas bajo el término de “represión catabólica por fuente de carbono” (RCC). La selección de la fuente de carbono se realiza generalmente a nivel de inducción de carbohidrato específico. De esta manera, dentro de la célula la combinación de procesos de inducción y represión, aseguran una economía celular notable, ya que sólo se sintetizan las enzimas indispensables de acuerdo a las condiciones nutricionales determinadas por el medio (Madigan y col., 2000).

La definición de RCC que debe atenderse cada vez que se mencione en este trabajo, es la siguiente: *“Mecanismo regulatorio donde la presencia de una fuente de carbono fácilmente metabolizable, es capaz de inhibir la expresión y/o actividad de ciertos genes y operones, que están relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas y la producción de metabolitos secundarios”* (Brückner y Titgemeyer, 2002).

La glucosa fue el primer sustrato estudiado que ocasionaba represión catabólica, por lo que también se le llama *efecto glucosa*, aunque no es el único sustrato que produce dicho efecto. Los mecanismos que conducen al estado de represión pueden ser muy diversos entre las bacterias, dependiendo de las proteínas involucradas en el transporte de diferentes sustratos, pero la diferencia posiblemente más indicativa, sea la entrada de

los carbohidratos en forma fosforilada o desfosforilada, lo que es especialmente importante en la RCC (Brückner y Titgemeyer, 2002).

Represión Catabólica por fuente de Carbono en modelos procariontes.

En procariontes el mecanismo de RCC mejor conocido es el de *Escherichia coli*, esta bacteria presenta el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS). El PTS es un mecanismo de transporte de azúcares y regulador negativo de otros sistemas de incorporación de carbohidratos alternativos, tanto el transporte, como la fosforilación, se llevan a cabo por sus componentes (Postma y col., 1993) (Fig. 3).

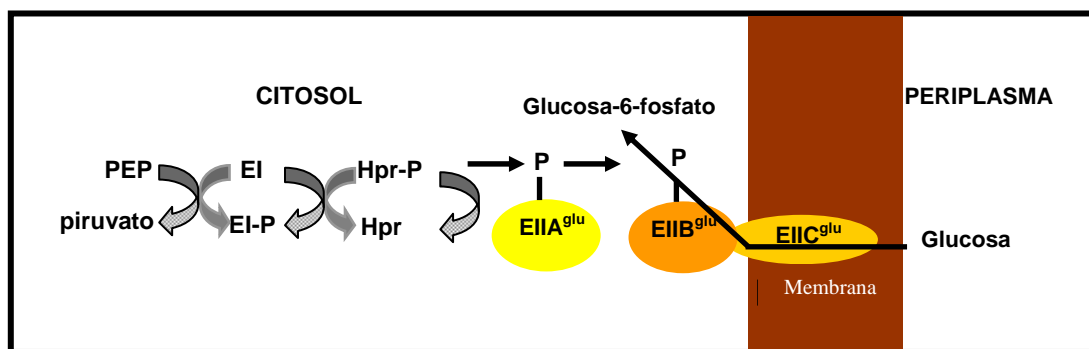


Figura 3. Cadena de transferencia del grupo fosfato en el sistema PTS. El fosfoenol piruvato (PEP) es quien dona el grupo fosfato a la enzima EI que acepta el grupo fosfato, el cual transfiere a la enzima HPr, que a su vez es donado a EIIA y por esta a EIIB hasta EIIC quien se encarga de transportar a la glucosa y entregar el grupo fosfato para convertirla en glucosa 6-fosfato. Este sistema está bien caracterizado en *E. coli* de donde se obtuvo este modelo (Modificado de Postma y col. 1993).

Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenol piruvato (PTS).

El sistema PTS consiste de permeasas carbohidrato-específicas, también conocidas como enzimas II (EII); y dos proteínas generales, la enzima I (EI) y HPr (proteína que contiene histidina transportadora de fosfato), las cuales participan en la fosforilación de todos los carbohidratos transportados a través del sistema PTS. Las permeasas

carbohidrato-específicas están compuestas por más de 4 dominios proteínicos (EIIA, B, C y D), de los cuales por lo menos uno de ellos está unido a membrana.

Por ejemplo, la glucosa permeasa de *E. coli* se compone de la proteína de membrana EIICB^{glc} y la proteína citoplásmica EIIA^{glc} (Fig. 3), que son probablemente el mejor ejemplo conocido para una permeasa compuesta de PTS. La cadena de transferencia del grupo fosfato del sistema comienza con EI y el fosfoenol piruvato (PEP), continúa vía HPr, EIIA, y EIIB hasta el azúcar, transportada por EIIC, y resulta en un azúcar fosforilado que puede ser metabolizado de inmediato (Fig.3) (Postma y col., 1993).

Por el contrario, los carbohidratos que son internalizados por una forma independiente del PTS (permeasas no-PTS) requieren de la fosforilación por cinasas antes de su metabolismo (Brückner y Titgemeyer, 2002).

RCC en *E. coli* por control transcripcional específico.

En *E. coli* la enzima EII del PTS tiene un papel central en la RCC. Por ejemplo, cuando un sustrato PTS, como la glucosa, está presente en el medio, el grupo fosfato de la proteína EIIA^{glc} es llevado a este carbohidrato entrante (Fig. 3). De tal manera que, EIIA^{glc} existe predominantemente en su forma no fosforilada, esta forma de EIIA^{glc} se une a permeasas que no son parte del sistema PTS, y que son específicas para carbohidratos como lactosa, maltosa, melibiosa y rafinosa. Como resultado, el transporte de estos azúcares es inhibido, y la formación de inductores es prevenida. Debido a la escasez de inductores intracelulares específicos, los operones respectivos permanecen poco expresados. EIIA^{glc} es parte de muchos procesos similares a este, y se cree que existen interacciones reguladoras que aún falta por conocer. Así, los niveles de EIIA^{glc} / EIIA^{glc}-P permiten a su vez, transmitir señales de control global (Stülke y col., 1998).

RCC en *E. coli* por reguladores globales de control transcripcional.

La activación de sistemas globales de control transcripcional es una de las consecuencias mejor estudiadas sobre la disponibilidad de carbohidratos. En las bacterias entéricas, durante este control, se efectúa un mecanismo de activación que utiliza la proteína activadora del catabolito (CAP) (Busby y Ebright, 1999), y donde la RCC es el resultado de la activación disminuida de promotores de genes y operones catabólicos.

En *E. coli*, CAP activa la transcripción de mas de 100 promotores y en algunos casos está involucrada en la RCC. El proceso de activación es bien conocido, por lo menos en promotores simples dependientes de CAP, la cual necesita AMPc como efector alostérico para unirse eficientemente al DNA (Fig. 4). La regulación global por CAP responde a la cantidad de AMPc intracelular. El nivel de AMPc intracelular es ajustado por la adenilato ciclasa, cuya actividad depende de la forma fosforilada de EIIA^{glc} (EIIA^{glc}-P) (Stülke y col., 1998).

Además de controlar los genes catabólicos de carbohidratos, CAP esta involucrada directamente en la modulación de un amplio número de otros procesos celulares. También ejerce control indirectamente, a través de su influencia sobre la expresión de otros reguladores globales, o contribuyendo a la selección de factores sigma. Por esto el rol de CAP va más allá de la regulación de la utilización de azúcares.

Por otro lado, la utilización de azúcares es controlada por varios reguladores pleiotrópicos como la proteína represora/activadora Cra (mejor conocida como *FruR*) (Saier y col., 1996) y Mlc (Colland y col., 2000). Muchos genes glucolíticos, gluconeogénicos y relacionados con la glucosa son controlados por Cra, que es el

repressor del operón fructosa-PTS y un activador de la expresión de genes clave para la gluconeogénesis, ciclo de Krebs y manejo de glioxilato.

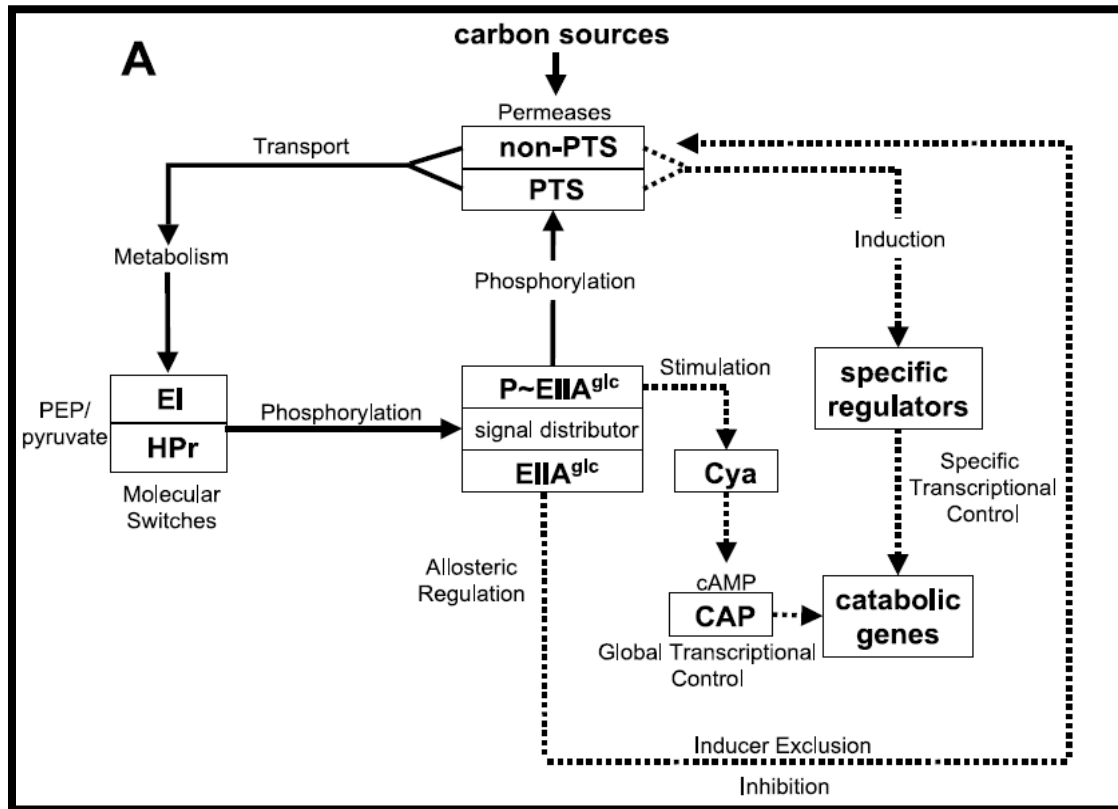


Figura 4. Modelo de represión catabólica en bacterias entéricas. La figura muestra circuitos de regulación, el estado de fosforilación de EIIA^{glc}, dispara y coordina la respuesta de regulación por carbono. Las líneas en negro indican interacciones/actividad catalítica y flujo de carbono, mientras que las líneas punteadas muestran información de rutas de control global o específico. La fuente de carbono entrante genera señales específicas cuya actividad es regulada por moduladores específicos. Los niveles de recambio de fosfoenol piruvato a piruvato que influyen vía EI y HPr, en el estado de fosforilación de la EIIA^{glc} que es el principal factor de distribución de la señalización. La forma no fosforilada de la enzima EIIA^{glc}, efectúa exclusión del inductor de permeasas no-PTS por regulación alostérica (inhibición), mientras que la forma fosforilada de la enzima en cuestión, estimula a la adenilato ciclasa, la cual dispara el control transcripcional global de CAP (obtenido de Brückner y Titgemeyer 2002).

Mlc contribuye a la regulación de *malt*, codificando el activador del regulón para maltosa, y los genes que codifican para las permeasa PTS específicas, para glucosa y manosa. Así mismo Mlc regula la expresión del operón central *ptsHlcrr*, codificante de HPr, EI y EIIA^{glc}, el cual es controlado también por Cra y CAP, éste es sin duda un buen ejemplo de una regulación multinivel (Brückner y Titgemeyer, 2002).

RCC en bacterias Gram positivas de bajo contenido de GC.

En este grupo de bacterias se presentan mecanismos diferentes para llevar a cabo la regulación por carbono. Las enzimas Hpr, HPr cinasa/fosfatasa (HPrK/P) y la enzima de control catabólico (CcpA), son las encargadas de percibir el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono (Titgemeyer y Hillen 2002).

RCC por control transcripcional específico.

La enzima HPr, esta involucrada en la exclusión por inductor. La P-Ser-HPr una forma fosforilada en la posición serina 46 por la HPr cinasa (Galinier y col., 1998 & Reizer y col. 1998), ha mostrado *in vivo* ser esencial para la represión del transporte de azúcares que no son transportadas vía PTS en *Lactobacillus lactis* (Monedero y col. 2001) y *Lactobacillus casei* (Dossonnet y col., 2000). A pesar de esto, el proceso bioquímico que lleva a cabo tal represión permanece a la espera de su descripción.

En este grupo se presentan rutas alternativas a la exclusión por inductor que se cree participan en la RCC, fenómenos como, la expulsión del inductor (Saier y col., 1996) o el control de la actividad de reguladores por fosforilación (Stülke y col., 1998). Sin embargo, la forma en la que estos mecanismos intervienen en la RCC no ha sido caracterizada (Brückner y Titgemeyer, 2002).

Otro modo de control por inducción carbohidrato específico esta documentado, éste depende de un dominio, denominado Dominio de Regulación PTS (PRD), el cual se ha encontrado en antiterminadores y activadores (Stülke y col., 1998).

Las proteínas con PRD, generalmente son intermediarios en la inducción carbohidrato-específico de operones catabólicos de azúcares PTS. La capacidad de unión a RNA o DNA de sus dominios N-terminal, está controlada por dos dominios de

regulación PRD a través de múltiples fosforilaciones mediadas por PTS en una forma muy compleja.

La mayoría, aunque no todos los reguladores que contienen PRD, requieren fosforilación mediada por la actividad P-His-HPr. Esta regulación positiva genera la oportunidad para controlar el proceso de inducción por RCC. Si se evita la fosforilación del PRD, por ejemplo por el transporte de otro sustrato PTS, la inducción no ocurre. Por esto, el resultado final de la regulación mediada por PRD es la misma que en la exclusión por inductor, es decir, la prevención de la inducción carbohidrato específica. Incluso la competencia entre permeasas-PTS y la transferencia de grupos fosfato por la forma P-Ser-HPr podría ser otra forma de gobernar jerárquicamente la utilización de azúcares (Postma y col., 1993).

RCC por reguladores globales de control transcripcional.

La proteína CcpA es de importancia global para el control transcripcional en la RCC (Henkin 1996) (Fig. 5). Un análisis del genoma de *B. subtilis* ha estimado cerca de 300 genes que son regulados por CcpA, de manera directa o indirecta (Moreno y col., 2001). Esta proteína funciona principalmente como represor de la transcripción, aunque la activación transcripcional también ha sido documentada. Este regulador necesita un co-represor, la P-Ser-HPr para unirse eficientemente a su secuencia operadora *cre* (elemento de respuesta catabólico), de este modo la actividad de CcpA responde a los niveles de P-Ser-HPr (Fig. 5). En algunos organismos, el gen *ccpA* está sujeto a autorregulación (Egeter y Brückner 1996, Mahr y col. 2000).

CcpA esta involucrada generalmente en la RCC de genes catabólicos (Fig. 5), como los que se expresan en la utilización de xilosa o histidina.

Adicionalmente se sabe que dos proteínas más, la *ccpB* (Chavaux y col., 1998) y la *ccpC* (Jurlin-Castelli y col., 2000), participan en la represión por glucosa en *B. subtilis*.

Comprender sus contribuciones en la regulación global y su conexión con CcpA es necesaria para poder comprender completamente en un futuro la RCC en este organismo. Al comparar el amplio conocimiento que se tiene de CAP, nos hace ver lo poco que se conoce acerca de los mecanismos de acción de CcpA. Por lo que se considera que hacen falta mayores investigaciones para entender cómo este importante regulador interviene en la RCC en *B. subtilis* (Brückner y Titgemeyer 2002).

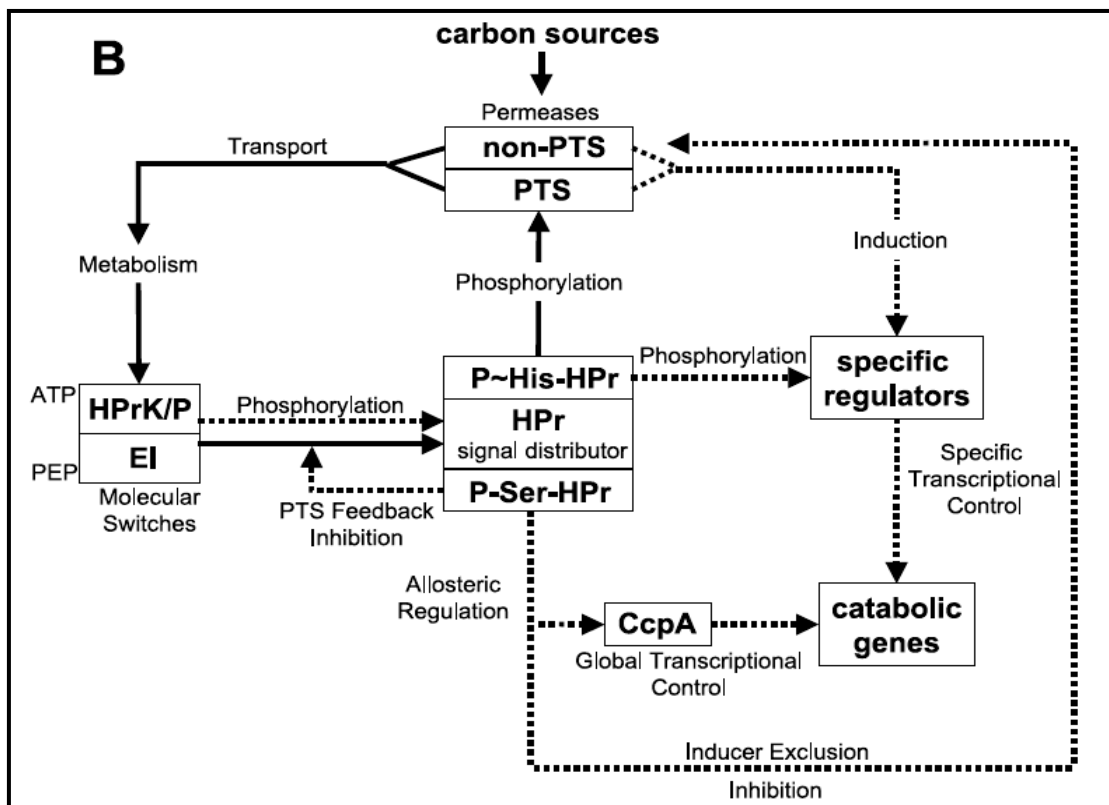


Figura 5. Modelo de represión catabólica en bacterias Gram-positivas de bajo contenido de GC. La figura muestra circuitos de regulación. Las líneas en negro indican interacciones/actividad catalítica y flujo de carbono, mientras que las líneas punteadas muestran los mecanismos. La fuente de carbono entrante genera señales cuya actividad es regulada por moduladores específicos. El proceso de inducción específica para cada carbohidrato, causado por fuentes de carbono entrantes, genera intermediarios glucolíticos que estimulan a la HPrK/P que lleva a la fosforilación de la HPr en la serina-46. Una cantidad elevada de P-Ser-HPr tiene tres consecuencias: control global de transcripción por CcpA, exclusión por el inductor de permeasas no-PTS e inhibición por retroalimentación de la fosforilación de HPr dependiente de EI, resultando en la reducción de la actividad de transporte PTS y disminución de la actividad de activadores que contienen PRD (obtenido de Brückner y Titgemeyer 2002).

RCC en bacterias Gram positivas de alto contenido de GC.

El mecanismo de RCC en bacterias Gram positivas de alto contenido de GC, en especial del género *Streptomyces*, difieren drásticamente de los mecanismos identificados en *E. coli* y otras bacterias de bajo contenido GC (Paulsen, 1996). En contraste con la importancia que representa el sistema PTS para la RCC en los modelos citados, en el género *Streptomyces* parece jugar un rol secundario para llevar a cabo la RCC (Titgemeyer y col., 2002).

En las especies *S. griseofuscus*, *S. lividans* y *S. coelicolor*, se ha reportado la presencia de un sistema PTS, que funciona para la N-acetil-glucosamina (Nothaft y col., 2003). Este sistema permite la incorporación de fructosa intracelularmente así como su fosforilación. Sin embargo, no se ha demostrado que este sistema funcione para el consumo de otras fuentes de carbono, tales como la glucosa y el manitol. No obstante, la fructosa puede ser fosforilada por una fructocinasa dependiente de ATP (Titgemeyer y col., 1995).

Así mismo, se ha reportado que la fosforilación de glucosa y de galactosa se lleva a cabo por sus respectivas cinasas (Hodgson 1982; Kendall y col., 1987), lo que implica la existencia de permeasas específicas para su transporte dentro de la célula (Guzmán y col., 2005).

Por otro lado, tampoco se han reportado fluctuaciones de AMPc debidos a cambios en fuentes de carbono (Hodgson, 1982), como se observan en *E. coli*, los cuales son importantes en la RCC para dicho modelo. En comparación con *B. subtilis* tampoco se han encontrado actividades similares de cinasa/fosfatasa (HPrK/P) en miembros del género *Streptomyces* (Paulsen, 1996).

Sistemas de transporte de carbohidratos en el género *Streptomyces*.

Bertram y colaboradores en el 2004 realizaron un análisis “*in silico*” sobre el genoma de *S. coelicolor*, este reporte predice la existencia de diversos genes para la incorporación de carbohidratos, como posibles componentes de PTS, sistemas de transporte ABC (ATP Binding Cassete), transporte facilitado y simporte.

Los sistemas ABC son utilizados para la incorporación de maltodextrinas, xilósidos, glucósidos, quitobiosa, lactosa, ribosa, entre otros. Así mismo, encontraron el transporte facilitado para la incorporación de galactosa y glicerol, así como un mecanismo simporte para la glucosa (Bertram y col., 2004). La figura 6 muestra esquemáticamente los diferentes sistemas descritos por Bertram y colaboradores (2004).

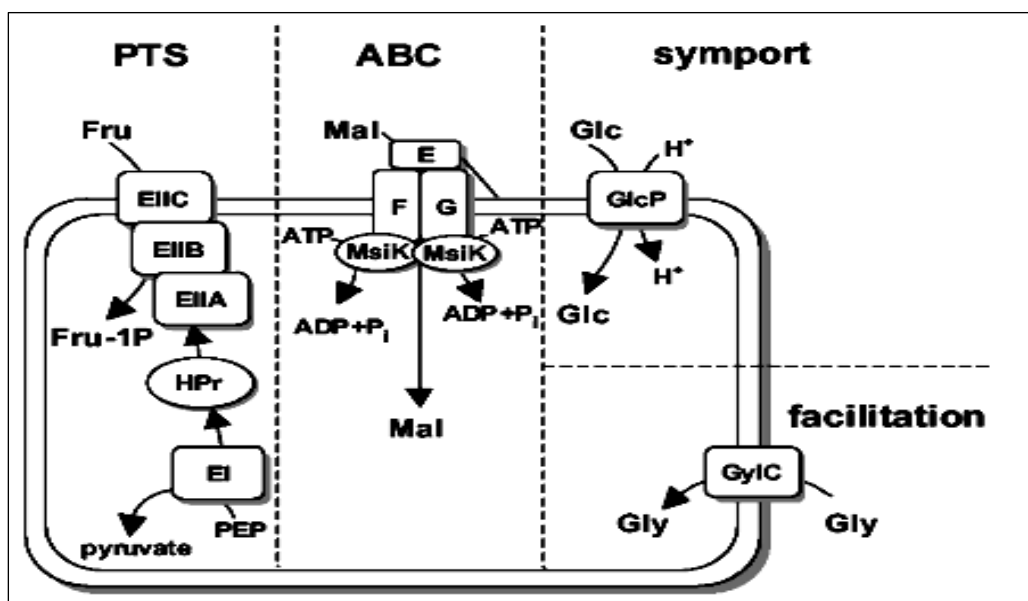


Figura 6. Sistemas de transporte de carbohidratos en *S. coelicolor*. Se muestra al sistema PTS, con sus componentes transportando fructosa (Fru) y fosforilando a fructosa-1fosfato. El sistema ABC se muestra transportando maltosa (Mal). Así mismo se observa el transporte de glicerol (Gly) por difusión facilitada y a la glucosa (Glc) transportándose por medio de un sistema de simporte acoplado a protones (Obtenido de: Bertram y col., 2004).

Recientemente se ha reportado un transportador de glucosa en *S. coelicolor* (Wezel y col., 2005) codificado por *glcP* e inducido por D-glucosa. En este estudio se describe a GlcP como el principal transportador de glucosa en *S. coelicolor*. Este sistema se codifica por dos genes; *glcP1* y *glcP2* que codifican para proteínas simportadoras dependientes de protones (Wezel y col, 2005).

En el 2007 Wezel y colaboradores, reportaron que la actividad catalítica de la glucosa cinasa (Glc) en *S. coelicolor*, se modula en una forma dependiente de la fuente de carbono, y que tanto la actividad como su localización celular correlaciona muy bien con la actividad que muestra GlcP. Lo anterior sugiere que ambos componentes generan un complejo Glc-GlcP activo, tipo permeasa, y que este complejo es necesario para el transporte de glucosa intracelular en dicho microorganismo (Wezel y col., 2007).

El papel de la glucosa cinasa (Glc) en el fenómeno de RCC en el género *Streptomyces*.

Existen numerosos estudios que sugieren que la Glc juega un papel central en la represión catabólica (Kwakman y Postma, 1989).

En 1982, David Hodgson reportó que la glucosa generaba represión catabólica sobre diferentes clases de carbohidratos tales como arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa y glicerol en *S. coelicolor*. Así mismo, observó que mutantes aisladas a partir de este modelo denominadas Dog^R , resistentes a un análogo tóxico de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (DOG), presentaban una disminución en la sensibilidad a dicha represión y una reducción en la actividad de Glc. Adicionalmente se observó que estas mutantes tenían dificultades para crecer en glucosa solamente, aunque el transporte de este carbohidrato no estaba afectado (Hodgson, 1982).

Por otro lado, con el objetivo de determinar si el efecto de la Glc sobre la RCC se debe a la catálisis o a otra actividad reguladora adicional, se llevó a cabo la expresión de

la Glk de *Zymomonas mobilis* en una mutante *glk*⁻ de *S. coelicolor*. Sin embargo, la Glk de *Z. mobilis* no fue capaz de restaurar la RCC, aunque si restauró la capacidad de utilizar glucosa y la actividad de Glk (Angell y col., 1994).

La secuencia del gen *glk* ha revelado que su producto, es un miembro de la familia ROK (Represor Orf Kinases), estas son proteínas reguladoras que se unen a DNA, aunque, Glk carece de dominios de unión hélice-vuelta-hélice en su extensión amino-terminal (característica de la familia ROK), que la posibilitarían para unirse a DNA (Angell y col., 1992 y 1994).

Angell y colaboradores (1994) demostraron la existencia de una segunda Glk a la cual denominan GlkII, esta segunda cinasa se encuentra inactiva en células normales, además su expresión puede ser inducida en mutantes *glk*⁻, crecidas en glucosa por periodos prolongados (Angell y col., 1994).

En otro estudio, mutantes Dog^R de *S. coelicolor*, fueron complementadas con un fragmento de 2.9 kb en el que fue localizado el gen *glk*, dichas mutantes recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, la sensibilidad a 2-DOG, y la represión por glucosa para la utilización de glicerol (Ikeda y col., 1984).

En 1992 Susan Angell y colaboradores, realizaron un análisis del fragmento de 2.9 kb que contenía el gen *glk*, se demostró que dicho fragmento contenía dos marcos de lectura abierta completos (ORF por su siglas en inglés) el ORF2 y ORF3, los cuales podían codificar para proteínas de 20.1 kDa y 33.1kDa respectivamente. El ORF3, podía transcribirse desde su propio promotor, y también desde un promotor que inicia la transcripción corriente arriba del ORF2. Así mismo, el producto del ORF3 mostró actividad de glucosa cinasa.

Se sugieren que el ORF2 codifica para una proteína que está involucrada en el metabolismo de la glucosa, o en su transporte (Angell y col., 1992).

Actualmente ORF2 y ORF3 son referidos en las bases de datos disponibles del genoma de *S. coelicolor* como locus (gen) *SCO2127* y *SCO2126* (*glk*) respectivamente.

Guzmán y colaboradores (2005) verificaron la presencia de genes homólogos a *SCO2127* y *glk* en el genoma de *S. peucetius* var. *caesius* a través de un Southern blot usando como sondas los genes en cuestión de *S. coelicolor*. Los resultados mostraron que dichos genes se encuentran adyacentes en el genoma de *S. peucetius* var. *caesius*, como sucede en los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* (Guzmán y col. 2005).

Así mismo, utilizaron los genes *SCO2127* y *SCO2126* para transformar tres mutantes *Dog^R* de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resistentes a RCC (Tabla 1).

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa [%]	Actividad de Glk [%]	Sensibilidad a RCC
Original		100	100	S
<i>Dog^R</i>		51	15	R
SDR-1	<i>glk</i>	49	95	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	108	115	S
SDR-3	<i>SCO2127+glk</i>	113	331	S

Tabla 1. Fenotipos de cepas mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* transformadas con los genes *glk* y *SCO2127* de *S. coelicolor*. Se muestra en porcentaje el transporte de glucosa, la actividad de Glk, y la sensibilidad a RCC de las tres mutantes *Dog^R* transformadas de *S. peucetius* var. *caesius*, comparadas con la cepa original y una mutante *Dog^R*. La cepa SDR-1, transformada con un plásmido multicopia que contenía el gen de *glk* presenta un transporte de glucosa casi igual al de la mutante *Dog^R*, aunque la actividad de Glk es prácticamente la misma que la cepa original, y presenta una recuperación de la sensibilidad a represión catabólica. La cepa SDR-2 (transformada con *SCO2127*), presenta un sorprendente valor de 108% en el transporte de glucosa, y un 115% en la actividad de Glk, además de presentar una fuerte sensibilidad a RCC. En la cepa SDR-3 transformada con ambos genes se obtuvo más del doble de actividad de Glk un 331% en comparación con la cepa original y el transporte de glucosa es prácticamente el mismo que en el de SDR-2. Además de recuperar de forma notable la sensibilidad a RCC (Modificada de Guzmán y col. 2005).

Estos datos sugieren que el producto del gen *SCO2127* tiene un efecto positivo sobre la actividad de Glk y el transporte de glucosa (Guzmán y col., 2005). Esto es sorprendente, por el hecho de que no parece que la secuencia de *SCO2127* codifique para una proteína transportadora de glucosa u otra Glk (Angell y col., 1992).

Se cree que las mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* pueden estar afectadas a nivel de *SCO2127* y que el producto de este gen podría ser una proteína reguladora a nivel transcripcional. Esto se refleja en el incremento de los niveles de mRNA observado en las mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* transformadas con el gen *SCO2127* (Guzmán y col., 2005).

JUSTIFICACIÓN.

Comprender el mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*, a través de sus genes reguladores, podría llevarnos a conseguir mejores rendimientos de producción de numerosos metabolitos secundarios de gran importancia (como la DXR, entre muchos otros). Existen evidencias de que la enzima glucosa cinasa (Glc) juega un papel regulatorio central en dicho fenómeno, aunque no se sabe el mecanismo preciso de acción.

Por otro lado, se ha observado que el gen *SCO2127* corriente arriba y contiguo al gen que codifica para Glc (*glk*) de *S. coelicolor*, ejerce un efecto positivo sobre la actividad de Glc y el transporte de la glucosa en mutantes *Dog^R* de *S. peucetius* var. *caesius* que presentaban en su fenotipo, una disminución en la actividad de dicha enzima, restaurando además la sensibilidad a RCC.

. Una mejor caracterización de este gen clave, del cual sólo se han observado sus efectos pleiotrópicos, podría conducirnos a comprender su relación con *glk* y posiblemente, su papel en la RCC.

El presente trabajo se propone contribuir en cierta medida, a la comprensión del mecanismo de RCC en el género *Streptomyces*, iniciando la caracterización del gen homólogo a *SCO2127* de *S. peucetius* var. *caesius*, ocupándonos en una primera fase de su aislamiento, clonación y secuenciación.

.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Identificar y clonar el gen homólogo a *SCO2127* de *S. peucetius* var. *caesius*

Objetivos Particulares.

1. Establecer las condiciones óptimas de amplificación por PCR del gen homólogo *SCO2127* de *S. peucetius* var. *caesius*.
2. Clonarlo en un vector para productos de PCR y obtener la secuencia del gen.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *S. peuceitius* var. *caesius*; depositada y mantenida en la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con la clave BM-B-368; y *E. coli* JM109 conservada en 10% de glicerol a -70°C (Promega).

Vector de clonación.

El sistema pGEM T- Easy Vector (Promega), diseñado para clonación de productos de PCR, fue el plásmido utilizado en este trabajo como vector de clonación, el mapa del plásmido se encuentra en el apéndice 4.

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* JM109.

Dos matraces con 500 mL de medio LB se inocularon en proporción 1/100 (cultivo/volumen de medio), con un cultivo de *E. coli* JM109, crecido durante toda la noche. Las células se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta tener una absorbancia a 600 nm entre 0.5 y 0.7. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se conservó en hielo entre 15-30 min, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min, en un rotor previamente enfriado. Se removió el sobrenadante completamente y se resuspendieron los botones en un volumen final de 1 L de agua MiliQ fría. El paso anterior se repitió dos veces, sólo que en la primera ocasión, el botón fue resuspendido en 0.5 L de agua miliQ fría y en la segunda ocasión, en 20 mL de glicerol al 10% frío. Esta suspensión se centrifugó bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue removido y el botón resuspendido en

un volumen final de 2-3 mL de glicerol al 10%. De la suspensión anterior se prepararon alícuotas de 50 µL y se conservaron a -70°C.

Preservación de células de *S. peucetius* var. *caesius*.

De la cepa por preservar, se inocularon 200 µL en medio YMG con glicerol al 10% (40 mL) y el cultivo se incubó durante 48 h a 30°C y agitación de 200 rpm. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con solución salina isotónica (SSI) y resuspendidas en 10 mL de esta solución. Del cultivo anterior, se utilizó 1 mL para inocular 40 mL de medio YMG contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El cultivo fue incubado a 30°C con agitación de 200 rpm durante 48 h. De nuevo, las células fueron recuperadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, lavadas dos veces con SSI y resuspendidas en 6 mL de SSI adicionales y 4 mL de glicerol 100%. Se hacen alícuotas de 1 mL y se congelan a -70°C.

Aislamiento de DNA genómico de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Se preparó un preinóculo, adicionando 500 µL de cepa en glicerol de *S. peucetius* var. *caesius* en un matraz de 125 mL con 25 mL de TSB y 3 perlas de vidrio. Dicho matraz se incubó a 29°C con agitación de 180 rpm durante 48 h, se recuperó el microorganismo por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min en una centrífuga Beckman J2-MC y un rotor JA20. El micelio se lavó dos veces con 15 mL de SSI y se resuspendió en 6 mL de la misma solución. Posteriormente, dos matraces con 50 mL de TSB mas glicina al 0.5% fueron inoculados con 3 mL de la suspensión anterior e incubados a 29°C con agitación de 180 rpm durante 48 h. El micelio fue recuperado bajo las mismas condiciones, lavado dos veces con 25 mL de sacarosa al 10.3% y resuspendido en 25 mL de buffer P (Apéndice 1) suplementado con 2 mg/mL de

lisozima. Se incubó a 37°C hasta la formación de protoplastos, los cuales fueron recuperados por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min y resuspendidos en 50 mL de buffer P. Nuevamente los protoplastos fueron recuperados bajo las condiciones anteriores y resuspendidos en 10 mL de sacarosa 10.3% adicionada con 200 µl de EDTA 0.5 M. La suspensión anterior se distribuye por igual en dos partes y se le adiciona a cada una 1 mL de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20%. Se agitó suavemente por inversión del tubo y de inmediato se realizó una extracción con fenol saturado con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-álcool isoamílico (24:1). A la fase acuosa se le añadió un volumen de isopropanol cuidando de mantener las 2 fases y se recuperó el DNA con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. El DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril grado Milli-Q y se trató con RNAsa a una concentración final de 50 µg/mL durante 1h a 50°C, al finalizar este tiempo, se añadió pronasa a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 37°C durante 1 h. Al final de la incubación se agregaron SDS y NaCl a una concentración final de 0.4% y 100 mM respectivamente. Posteriormente y con el fin de limpiar el DNA de las enzimas anteriores, se volvió a realizar una extracción con un volumen de fenol saturado con TE, otra con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-álcool isoamílico (24:1). Posteriormente el DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto. El DNA se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min y el botón se vuelve a lavar con etanol al 70% (v/v) y se deja secar perfectamente para eliminar completamente los residuos del mismo. Finalmente, el DNA se disolvió en un volumen mínimo de agua estéril desionizada y se determinó su pureza y concentración mediante la relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando un biofotómetro (Eppendorf). El estado del DNA fue corroborado mediante

electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% según los protocolos estándar usando TAE 1X como amortiguador de corrida (Sambrook y col., 2001).

Diseño de oligonucleótidos cebadores para ensayo de PCR.

Examinando las secuencias de los genes *SCO2127* (576 pb) y su homólogo *SAV6073* (516 pb) en los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* respectivamente; se diseñaron oligonucleótidos con diferentes características resumidas en la Tabla 2.

Especie de Origen	Nombre de primer	Secuencia	Gen de origen	Longitud	GC %	Tm °C
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCO2126Rev</i>	GAA CCC GAC CCG ATC ATG TGA	<i>SCO2126</i>	21	51	59.2
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCOgkK Rev</i>	GTCGCTCGAGGATCCTCACATGATC GGGTCGGGTTTC	<i>SCO2126</i>	36	61	86.4
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCOgkFw</i>	ACCATCGGGCTCGACATCGG	<i>SCO2126</i>	20	65	58
<i>S. avermitilis</i>	<i>SAV6073Fw</i>	ATG AGC GAA GAG CGC CCC ACG TCC GA	<i>SAV6073</i>	26	65	83.3
<i>S. avermitilis</i>	<i>SAV6073Rev</i>	CGGGGGAACACATCGACTTGGACTG A	<i>SAV6073</i>	26	50	63
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCO2127Rev</i>	GAGCCCGCTAAGGGCAACCGTACC CGAGGCAGGACTCATGTAGGCTGGA GCTGGCTTC	<i>SCO2127</i>	59	64	75.4
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCO2127Fw</i>	AACGTCGTAAGGACGAACCGTAGTC AGGAGTCCGTCATGATTCCGGGATC CGTCGACC	<i>SCO2127</i>	59	57	92.4

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados como “cebadores”. En la columna “Especies de origen” se indican los microorganismos de los cuales se obtuvieron las secuencias para el diseño de los oligonucleótidos. La columna “Longitud” se refiere al número de nucleótidos que componen al oligo. Se muestran la temperatura de alineamiento, el contenido en porcentaje de guanina-citosina, así como la secuencia de los oligos usados para la amplificación por PCR del gen homólogo a *SCO2127*.

La estrategia inicial para la amplificación por PCR de nuestro gen *diana*, consideraba utilizar como templado, el DNA genómico de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, aplicando las condiciones de amplificación para el gen *SCO2127* reportadas (Guzmán y col. 2005). Las condiciones de amplificación para dicho gen fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y treinta ciclos que comprenden: 1 min a 94°C para la

desnaturalización, 1 min a 58.3°C para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización y por último, 5 min a 72°C, para la extensión final.

El gen homólogo a *SCO2127* en conjunto con *glk* fueron amplificados mediante PCR en un termociclador de gradiente Corbett Research Palm-Cycler™ y usando DNA genómico de *S. peucetius* var. *caesius* como templado. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min y veinticinco ciclos que comprenden: 1 min a 94°C para la desnaturalización, 1 min a un gradiente de temperaturas desde 65°C hasta 72°C para el alineamiento, 1 min a 72°C para la polimerización y por último, 5 min a 72°C, para la extensión final (Fig. 7). Se probaron los diferentes oligos mostrados en la Tabla 3 para la obtención de productos de amplificación.

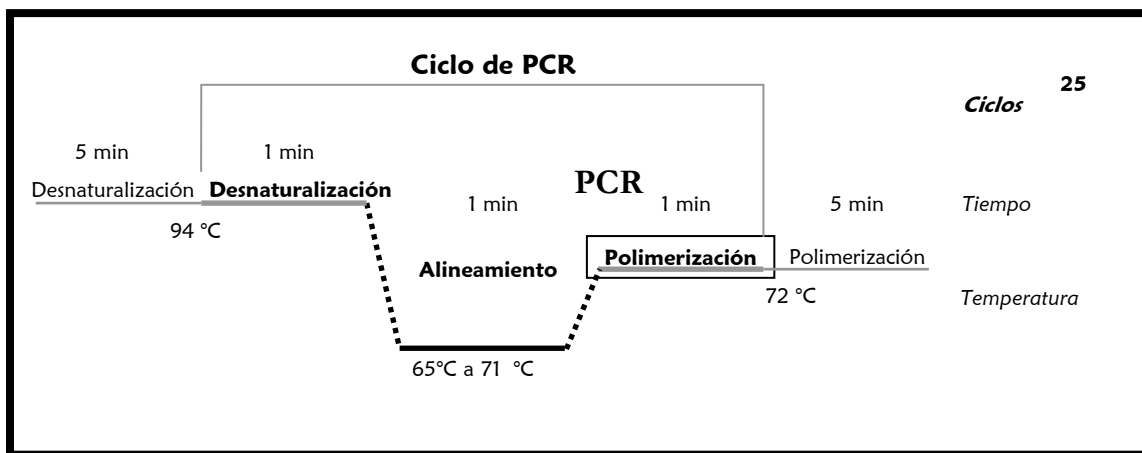


Figura 7. Esquema de temperaturas aplicadas al sistema para PCR. En esta figura se describen las temperaturas a las cuales se expusieron las reacciones con cada par de oligos, siendo para cada caso un gradiente de temperaturas de alineamiento, tal y como se muestra en la línea del centro titulada "Alineamiento".

Una vez estandarizada la mejor temperatura de alineamiento, se realizó un PCR aplicando dicha temperatura, con la finalidad de obtener mayor cantidad de producto de amplificación. El sistema de reacción consistió en: dNTP's 0.2 µM, amortiguador 10X para AmpliTaq de Applied Biosystems, DMSO 5% ó 10%, MgCl₂ 1 mM, 2 mM ó 3

mM; 250 ng de DNA genómico, oligonucleótidos 0.4 $\mu\text{mol/mL}$ de cada uno, 0.4 unidades de *Taq*polimerasa de Applied Biosystems y agua grado Milli-Q para completar un volumen final de 50 μL .

Purificación de bandas a partir del gel de agarosa.

Una vez terminada la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó una electroforesis en gel con la muestra resultante, con el fin de visualizar y purificar el producto de PCR. Para ello se cortó la banda de interés de un gel de agarosa al 0.8%, y se colocó en columnas de fibra de vidrio, éstas se centrifugan 1 min a 3 000 rpm por dos veces, el filtrado se recolecta y se extrae dos veces con fenol-cloroformo (1:1), y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA recuperado se precipita de la fase acuosa agregando 1/10 de volumen de NaCl 1 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto, se deja precipitar 20 min y se centrifuga 30 min a 13 000 rpm. El botón de DNA se lava con EtOH 70%, se deja secar perfectamente y se resuspende en 10 μL de agua.

Ligación del gen homólogo a *SCO2127* y *glk* al plásmido pGEM-T Easy

El DNA recuperado del gel de agarosa fue clonado en el pGEM-T Easy Vector (Promega) con el fin de obtener mayor cantidad de DNA y poder secuenciarlo empleando los cebadores del fago M13 (Fig. 8), que flanquean al sitio múltiple de clonación (polilinker) donde se encuentra insertado el gen. El pGEM-T Easy Vector es un plásmido de alto número de copias utilizado para clonar productos de PCR.

El sitio de inserción del fragmento de DNA está flanqueado por una timina que aparee con la adenina que la *Taq*DNA polimerasa normalmente añade al fragmento amplificado. El vector contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina

además de un sitio múltiple de clonación formado por sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción, las cuales al corte, permiten liberar al inserto.

El sitio múltiple de clonación se encuentra flanqueado por los promotores T7 y SP6, dentro del gen *lacZ* aunque, como ya se mencionó, también contiene sitios para secuenciación con los oligos del fago M13. La inactivación del gen *lacZ*, causada por la inserción de un fragmento, permite identificar las clonas recombinantes mediante el color que desarrollan en placas adicionadas con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactósido) e IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido).

Para ligar el producto de PCR al plásmido se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla 3. Una vez mezclados los componentes de la reacción de ligación, ésta se incubó toda la noche a 4°C. Con 1 μ L de la mezcla de ligación se transformaron por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* JM109.

Reactivos	Reacción estándar (μ L)
Amortiguador de ligación 2x, para T4 DNA ligasa (Promega)	5
pGEM-T Easy vector (50 ng)	1
Producto de PCR	1
DNA ligasa de T4	1
Agua desionizada	2
Volumen final	10

Tabla 3: Mezcla de reacción para ligación con pGEM-T Easy. Se muestran los componentes de la reacción para insertar el producto de PCR en el plásmido mencionado. En la columna denominada “Reactivos” se muestra los componentes de la mezcla de ligación y en la columna “Reacción estándar” se indica la cantidad en microlitros (μ L) que se agregaron para dicha reacción.

Electroporación de células *E. coli* JM109.

Se colocaron 2 μ L de la reacción de ligación mas 50 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 en una celda fría de 0.1 mm. La celda se colocó en la ranura del electroporador y se le dió una descarga de 1250 V, inmediatamente después se le

adicionó medio SOC (1mL), las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 h a 200 rpm. Posteriormente, de la suspensión celular se plaquearon, 1, 5 y 10 µL de las células de *E. coli* JM109 electrotransformadas, se sembraron en cajas con agar y medio LB suplementado con ampicilina (Amp) (100 µg/mL), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactósido) 20 µg/mL e IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) 10 mM y se incubaron a 29°C durante 16 h. Las clonas positivas (color blanco) fueron seleccionadas y resembradas en el mismo medio; de aquí, por lo menos 20 clonas fueron elegidas al azar para extraerles el plásmido.

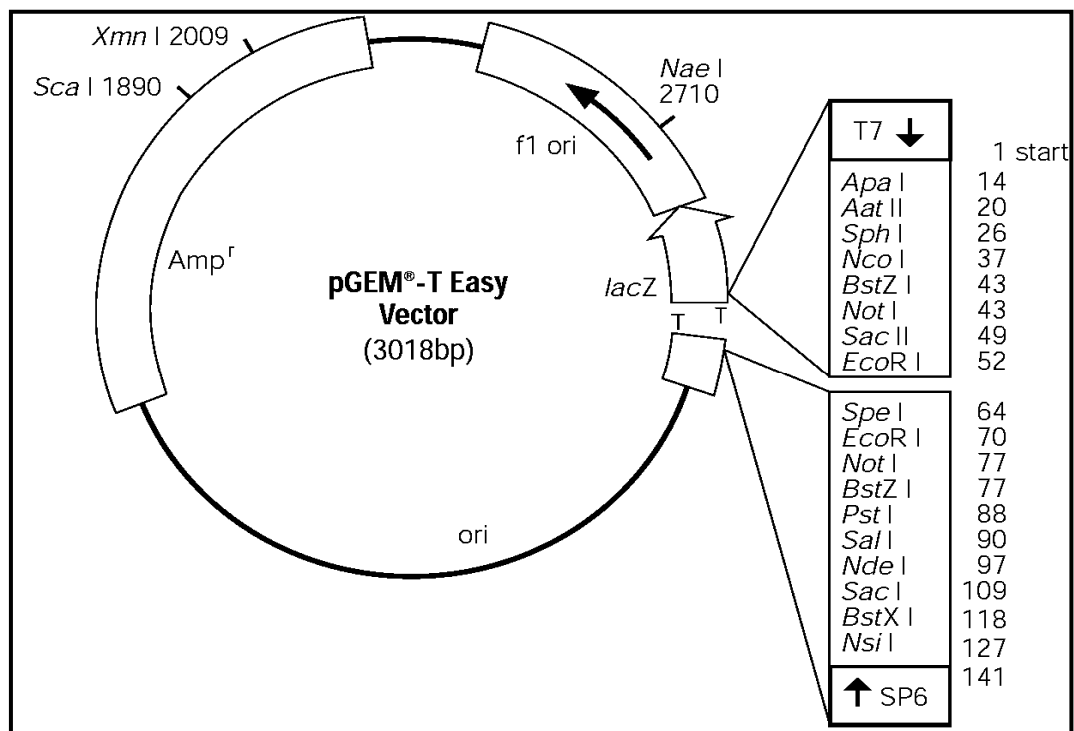


Figura 8. Mapa del plásmido pGEM-Easy. Se muestra el sitio de clonación múltiple y los lugares de alineamiento de los cebadores para secuenciación T7 y SP6.

Aislamiento del plásmido en pequeña (Miniprep) y en gran escala (Midiprep).

Para comprobar la presencia del gen amplificado dentro del plásmido pGEM-T-Easy Vector, se aisló al plásmido recombinante en pequeña escala y se realizó un análisis por

restricción. Para ello las colonias fueron inoculadas en 3 mL de medio LB con Amp 100 µg/mL e incubadas a 37°C con agitación de 180 rpm por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se recuperaron por centrifugación a 4°C, 13 000 rpm por 10 min, se resuspendieron en 200 µL de solución A (Apéndice 1) fría (4°C), se agregaron 400 µL de la solución B (Apéndice 1) preparada en fresco y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se adicionaron 300 µL de solución C (Apéndice 1) fría se agitó y se centrifugó a 13 000 rpm a 4°C por 20 min. Al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de isopropanol y el DNA se dejó precipitar durante 25 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 min (4°C), el botón obtenido se lavó con 300 µL de EtOH al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, el DNA se secó y resuspendió en 20 µL de agua, para después ser incubado por 1 h a 40°C con RNAsa a una concentración de 50 µg/mL y posteriormente a 37°C con proteinasa K, 25 µg/mL a partir de un stock de 100 µg/mL. Después de la incubación, se lavó 1 vez con un volumen de fenol-cloroformo y 2 veces con cloroformo: alcohol isoamílico.

Análisis de restricción por patrón de corte con la enzima *Eco* RI

El análisis de restricción de los plásmidos se realizó con la enzima *Eco* RI (Invitrogen); ya que como se muestra en la figura 8, esta enzima permite la liberación del fragmento, el cual no tiene sitios de restricción para dicha enzima. Una vez que se obtuvo la colonia que contiene al plásmido recombinante, se escaló la técnica anterior a un volumen de 100 mL de medio de cultivo (Midiprep). Después de la incubación con RNAsa, se añadió proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml y se incubó durante 1h a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1) y dos más con cloroformo-alcohol isoamílico (1:1). El DNA se precipitó agregando a la fase acuosa 1/10 vol. NaCl 5 M y 1 vol. de isopropanol, se incubó a temperatura

ambiente 25 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos, posteriormente el DNA fue lavado con 500 μ L de EtOH al 70% y se centrifugó 10 minutos a 13 000 rpm. Al eliminar el sobrenadante el botón se secó perfectamente para ser resuspendido en 50 μ L de agua y nuevamente se realizó el análisis de restricción.

Secuenciación.

El fragmento de DNA clonado en el plásmido pGEM-T-Easy se secuenció en los laboratorios Laragen (USA) en ambas direcciones ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$) por el método de didesoxiterminación de la cadena, usando como *primers* T7 y SP6 que flanquean el sitio múltiple de clonación de este plásmido. El análisis de la secuencia obtenida, se realizó con ayuda del software de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos, disponible en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Ensayos de PCR para amplificar *SCO2127* en *S. peuceitius* var. *caesius*.

Debido a que no se encontró una base de datos disponible del genoma de *S. peuceitius* var. *caesius*, sobre la cual se pudiera basar el diseño de los cebadores para la clonación por PCR del gen homólogo a *SCO2127* de esta variedad, se optó por usar bases de datos de especies del mismo género cuyos genomas se encuentran completamente secuenciados y disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos considerando la similitud entre los genes *SCO2127* de *S. coelicolor* y *SAV6073* de *S. avermitilis*. Aplicando las condiciones de amplificación reportadas para el gen *SCO2127* de *S. coelicolor* (Guzmán y col., 2005), y usando como molde DNA genómico de *S. peuceitius* var. *caesius*, no se obtuvo ningún producto de PCR (datos no mostrados). A pesar de realizar múltiples intentos, modificando las proporciones de reactivos y las temperaturas del termociclador en la reacción, no se obtuvo un producto específico. Esto puede atribuirse a una baja similitud entre la secuencia del gen homólogo a *SCO2127* en el genoma de *S. peuceitius* var. *caesius* y los oligos diseñados (Tabla 4).

Por esto, se decidió aplicar otra estrategia para amplificar el gen objetivo. Se realizaron ensayos de PCR con oligonucleótidos cuyo diseño se basó en la secuencia de bases del gen *SAV6073* de *S. avermitilis* (Tabla 4), diversas combinaciones se implementaron entre estos oligos para obtener un producto de PCR con un tamaño entre 500 a 570 pb. Sin embargo, en los diversos ensayos hechos usando diferentes condiciones de reacción y pares de oligos, no se logró producir una banda con el tamaño esperado (Tabla 4). Lo anterior podría atribuirse a que los oligos basados en *SAV6073*

también tenían baja similitud con el gen objetivo. Por esta razón, en nuevos intentos, se optó por clonar los genes *glk* y el homólogo a *SCO2127* de manera conjunta.

Especie de origen	Primers	Condiciones [Desnaturalización/Alineamiento/Polimerización]	DNA Templado	fragmento Amplificado (pb)
<i>S. avermitilis</i>	SAV6073Fw-SAV6073Rev	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	---
<i>S. coelicolor</i>	SCO2127Fw-SCO2127Rev	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	---
<i>S. avermitilis</i> y <i>S. coelicolor</i>	SAV6073Fw-SCOglkRev	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	1500
<i>S. avermitilis</i> y <i>S. coelicolor</i>	SAV6073Rev- SCOglkFw	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	---
<i>S. coelicolor</i>	SAV6073Fw- SCO2127Rev	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	---
<i>S. coelicolor</i> y <i>S. avermitilis</i>	SCO2127Fw-SAV6073Rev	[94°/65° a 70°/72]	<i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	---
<i>S. coelicolor</i>	<i>glkA</i> <i>S. coelicolor</i> TitFw-TitRev	[94°/52°/68]	<i>S. coelicolor</i>	950

Tabla 4. Resultados de amplificación por pares de oligos. En la columna “especie de origen” se muestra a las especies de donde se obtuvieron los primers. En la columna de “Primers” se muestra el nombre de los oligos utilizados por pares. En la columna “condiciones” se muestran las temperaturas utilizadas en los ciclos de los ensayos por PCR. En la columna “DNA templado” se indica el origen del DNA que se utilizó en el ensayo de PCR. En la columna titulada “Fragmento amplificado” se muestra tamaño en pares de bases (pb) de la banda obtenida (de ser así) para cada par de cebadores, cabe señalar que el guión en esta columna no significa necesariamente que no hubo amplificación en absoluto, sino que era inespecífica o de un tamaño inesperado. El control positivo que se observa en la parte más baja de la primera columna, se realizó usando DNA de *Streptomyces coelicolor* como templado.

Se decidió realizar la amplificación de *glk* y *SCO2127* debido a que en nuestro grupo de trabajo ya se ha clonado por PCR el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*. Además, el gen *SCO2127* está localizado corriente arriba y contiguo a *glk*, lo cual sucede también en los genomas de *S. avermitilis* y de *S. peucetius* var. *caesius* (Guzmán y col., 2005), se usó el mismo cebador 3’ que ya se sabe que amplifica para el gen *glk* de *S. peucetius*

var. *caesius* con los cebadores 5' de los genes *SAV6073* y *SCO2127*. De este modo se esperaba un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb.

La combinación entre los oligos *SAV6073Fw* y *SCOglk Rev* (Tabla 4) produjeron una banda de aproximadamente 1500 pb como se esperaba, ya que el gen *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* contiene 914 pb y el gen *SAV6073* contiene 516 pb lo que en suma resulta en 1430 pb.

El sistema de reacción que contenía a los oligos *SAV6073Fw-SCOglkRev* fue seleccionado para estandarizar sus condiciones óptimas de amplificación, ya que era el único que generaba un producto con el tamaño esperado. Con el fin de determinar las condiciones óptimas de amplificación del gen homólogo a *SCO2127* de *S. peucetius* var. *caesius*, se decidió hacer un PCR de gradiente ya que este método nos permite encontrar las temperaturas óptimas de alineamiento para la obtención de productos de síntesis específicos.

PCR de gradiente con los oligonucleótidos *SAV6073Fw* y *SCOglk Rev*

En la figura 9 se muestra el resultado del PCR de gradiente con los oligos *SAV6073Fw-SCOglkRev* utilizando temperaturas de alineamiento que van desde los 68°C a los 72°C.

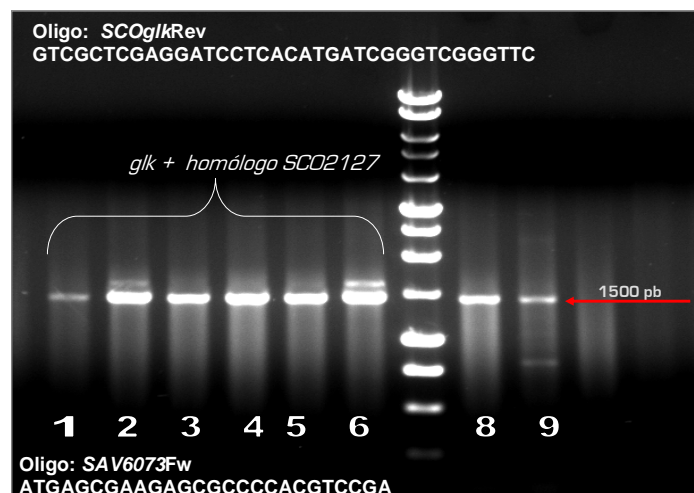


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % donde se corrieron los productos obtenidos en el PCR de gradiente. Carriles 1: 68.8°C. 2: 69.1°C, 3: 69.5°C, 4: 70.2°C, 5: 70.9°C, 6: 71.2°C, 7: 71.6°C, 8: 71.6°C, 9: 72°C.

Las temperaturas de alineamiento 69.5°C, 70.2°C y 70.9°C (carriles 3, 4 y 5 respectivamente) se consideraron como las más adecuadas para efectuar posteriores reacciones PCR con los oligos *SCOglkRev* y *SAV6073Fw* por la especificidad mostrada. El siguiente paso fue implementar un ensayo de PCR, aumentando la cantidad de reactivos proporcionalmente para obtener más producto y así optimizar la eficiencia de la ligación con nuestro plásmido. La temperatura de alineamiento elegida para esta reacción fue de 70.2°C, la banda obtenida con un peso de 1500 pb se cortó del gel de agarosa y se purificó.

La banda purificada se ligó en el vector de clonación para productos de PCR, pGEM-T Easy.

Transformación.

Una vez obtenida la construcción p GEM-T Easy unido al producto de PCR de 1500 pb, se procedió a transformar por electroporación en *E. coli* JM109. Una vez obtenidas las transformantes con el vector de clonación, se realizó una selección de unidades formadoras de colonias (UFC) blancas las cuales contenían la construcción. Dichas UFC se resembraron manteniendo la presión de selección con ampicilina y se aisló el DNA plasmídico, por lisis alcalina, de estas colonias para confirmar la presencia del inserto. Se aisló el plásmido de al menos 20 UFC blancas, tomadas al azar. Para verificar que el plásmido aislado estaba en buenas condiciones, se realizó una electroforesis en gel de los productos de *miniprep*, algunos de los cuales se muestran en la figura 10. Posteriormente, se realizó un análisis de restricción de dichos plásmidos con la enzima *Eco* RI, lo que permite la liberación del inserto (ver mapa de plásmido en metodología, figura 8).

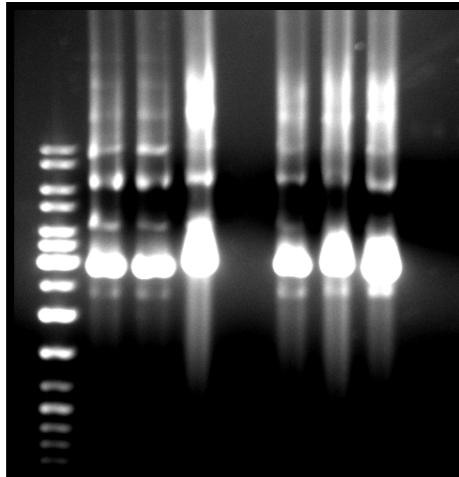


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos aislados. Carriles 1 al 7 plásmidos aislados sin digerir.

En la figura 11 se pueden observar las digestiones parciales de los plásmidos obtenidos de 20 UFC, el peso molecular de las bandas muestra que se liberan 2 fragmentos, cuyos pesos son 3000 pb que corresponde al peso del plásmido pGEM-T Easy y 1500 pb que corresponde al tamaño del inserto, lo que indica, que nuestras transformantes contenían el producto de PCR.

En por lo menos un 95% de éstas se encontraba el plásmido. Cabe destacar que las digestiones se muestran parciales.

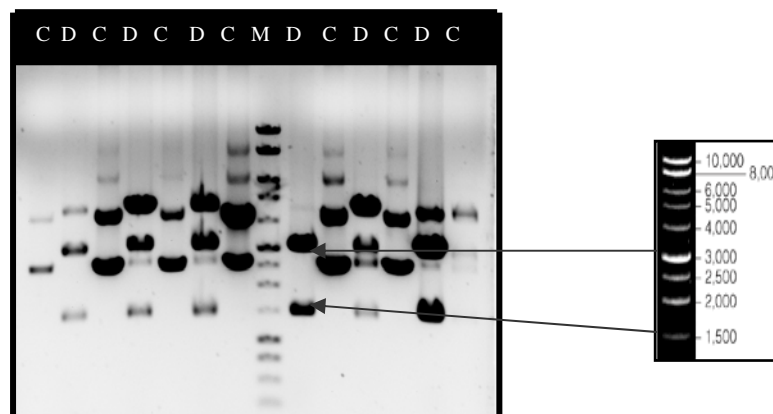


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con los plásmidos cortados con la enzima *EcoRI*. Se pueden observar algunas de las digestiones de los plásmidos y las bandas liberadas en los carriles se representan con una C a los plásmidos sin tratamiento enzimático y con la letra D los digeridos con *EcoRI*. Las flechas indican el peso correspondiente en pb, de acuerdo con el marcador.

Se seleccionaron al azar dos de las colonias que contenían el plásmido, las cuales eran candidatas para enviar sus plásmidos a secuenciar, por lo que se les realizó un ensayo de PCR con los oligos *SAV6073Fw-SCOglkRev*. El producto de PCR de este experimento de comprobación se corrió en un gel de agarosa como se muestra en la figura 12.

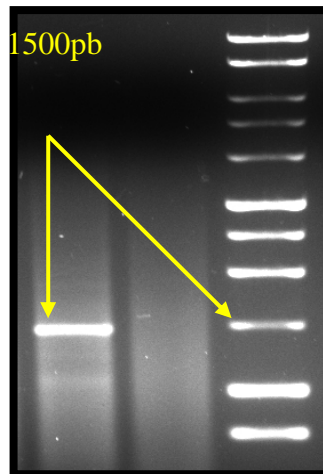


Figura 12. Electroforesis del producto de PCR obtenido a partir del plásmido aislado de la colonia con pGEMT Easy + inserto. Este PCR se realizó con el DNA del plásmido que enviado a secuenciar.

Se obtuvo un fragmento de amplificación de 1500 pb como se esperaba en una de las colonias, de este modo se procedió a la secuenciación de dicho plásmido.

Secuenciación del extremo T7 y análisis por alineamiento.

La secuencia del fragmento clonado obtenida a partir del extremo T7 del plásmido pGEM-T Easy (apéndice 4), mostró tener un tamaño de 319 nucleótidos (Fig. 13).

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa BLAST, disponible en la página de Internet del Centro de Información Biotecnológica (NCBI), y la información de las bases de datos de los sitios oficiales de *S. avermitilis*, *S. coelicolor* o del propio NCBI.

CGAGTCGCATGCTCCGGCGCCATGGCGGGCCGGGAATTGATTATGAGCGAAGA
 GCGCCCCACGTCCGACGATGAACGCGGAGGGGTGGAAGAGAGAGGCCAGGTCCGC
 GAGACCGGCCCGCCAGCGGGCCAGCTCGCGGTACGAGTCCACCGCGACCGGG
 TCCCCCTGCCGCGGGCCATCGAGATGTGCTTGCCCTCGATGCCGTCCGGCGTGCC
 GTCACCCAGTGAGAGCAGGATGTCCGCGTTCTCCGGGGTCCGTTGGCCCGCTGCT
 TCGCGTACCGGACGAGCGTGCGACCGGTGCGTATTGTTCCAGCAGCCCTGGGAA
 CCGCAGCCGCACAGCAGTTTTTTTTGAACCATTGGATGTGCCCATCTCGGCTT

Figura 13. Secuencia obtenida a partir del sitio de secuenciación T7 del plásmido pGEM-T Easy. En azul se muestran las bases que corresponden al plásmido en su extremo T7, y en rojo subrayado el oligo SAV6073Fw. Esta secuencia contenía 319 pb, sólo se empleó las bases en negro para los análisis por alineamiento.

En la tabla 5 se puede ver que la secuencia mostró un 95% de identidad con el gen de la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*, seguida de un 84% con la glucosa cinasa de *S. coelicolor* y un 84% con la glucosa cinasa de *S. lividans*. Como se esperaba, la similitud con el gen de la *glk* de la misma especie tiene el porcentaje de identidad más alto. Esto confirma que el extremo T7 del fragmento secuenciado, contiene a la glucosa cinasa perteneciente a *S. peucetius* var. *caesius*.

	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY651851.1	<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i> glucose kinase (<i>glk</i>) gene, complete cds	501	501	99%	6e-139	95%
X65932.1	<i>S.coelicolor glk</i> gene for glucose kinase	279	279	87%	3e-72	84%
AL939111.1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 8/29	279	279	87%	3e-72	84%
AF228048.1	<i>Streptomyces lividans</i> glucose kinase GlkA (<i>glkA</i>) gene, complete cds	279	279	87%	3e-72	84%
X98363.1	Cloning vector pIJ2581 <i>glkA</i> gene for glucose kinase and <i>tsr</i> gene for thiostrepton resistance protein	279	279	87%	3e-72	84%

Tabla 5. Resultado del alineamiento de la secuencia del extremo T7 usando la base de datos del NCBI. En primer lugar se puede observar que la similitud máxima se obtuvo con el gen de la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*.

Es de hacer notar que el fragmento de secuencia obtenido a partir del extremo T7 es semejante a *glk* sin lugar a dudas, sin embargo no aparece el oligo *SCOglkRev*, en cambio aparece el oligo *SAV6073Fw*, que no muestra similitud con el gen de *glk* de nuestro modelo. No se ha encontrado explicación alguna, solo queda especular sobre lo que pudo haber sucedido, para que la amplificación se haya llevado a cabo.

Es probable que el oligo *SAV6073Fw* hibridara con una región parcialmente similar, y que esta similitud se haya debido a la formación de estructuras secundarias, anclándose así dentro del gen de *glk* o sirviendo como cebador en ambos sentidos, esto explicaría que se encuentre en ambos extremos.

En el cuadro 1 se puede observar que existe una fuerte similitud en la secuencia de bases entre el fragmento secuenciado y la glucosa cinasa de *S. peucetius* var. *caesius*. Esta similitud comienza desde el nucleótido 1 (correspondiente al nucleótido 772 para la *glk* de *S. peucetius* var. *caesius*) hasta el nucleótido 280 (493 para la secuencia de *glk*) de la secuencia obtenida en el extremo T7 del plásmido. Esto significa que se tiene parcialmente el gen de *glk* dentro de nuestro fragmento. En letras rojas se observa sobre la secuencia del gen de *glk* que la secuencia obtenida corresponde casi a la parte final de dicho gen, además se marcó con azul las bases que correlacionan con el oligo *SAV6073Fw*.

```

gb|AY651851.1| Streptomyces peucetius subsp. caesius glucose
kinase (glk) gene,
complete cds Length=954,Score=501 bits(271),Expect = 6e-
139Identities = 301/316 (95%), Gaps = 0/316 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 CGATGAACGCGGAGGGGTCTGAAGAGAGAGGCCAGGTCTGGCGAGACCGGCCCGCCAGC 60
|||||
Sbjct 772 CGATGAACGCGGAGGGGTCTGAAGAGAGAGGCCAGGTCTGGCGAGACCGGCCCGCCAGC 713
Query 61 GGGCCAGCTCGCGGTACGAGTCCACCGCGACCGGGTCCCCCTGCCGCGCGGCCATCGAGA 120
|||||
Sbjct 712 GGGCCAGCTCGCGGTACGAGTCCACCGCGACCGGGTCCCCCTGCCGCGCGGCCATCGAGA 653
Query 121 TGTGCTTGCCTCGATGCCGTCTGGCGGTGCCGTACCCAGTGAGAGCAGGATGTCCGCGT 180
|||||
Sbjct 652 TGTGCTTGCCTCGATGCCGTCTGGCGGTGCCGTACCCAGTGAGAGCAGGATGTCCGCGT 593
Query 181 TCTCCGGGTCGCGTTGGCCCGCTGCTTCGCGTACCGGACGAGCGTGCAGCCGGTGT 240
|||||
Sbjct 592 TCTCCGGGTCGCGTTGGCCCGCTGCTTCGCGTACCGGACGAGCGCGCGACCGGACCGT 533
Query 241 ATGTTCCAGCAGCCCTGGGAACCCGAGCCGCACAGCAGtttttttGAACCATTCGGA 300
|||||
Sbjct 532 ACTGCTCCAGCAGCCCTGGGAACCCGAGCCGCACAGCAGCCCCGCGAACCATCCGGA 473
Query 301 TGTGCCCATCTCGGC 316
|||||
Sbjct 472 TGTGCCCGAACTCGGC 457
gene /gene="glk"
CDS /note="Glk"
/product="glucose kinase"
/protein_id="AAT72898.1"
1 atgggactca ccatcggcgt cgacatcggc ggcacgaaga tcgcgccggg ggtggctgac
61 gaggaaggca acatcctctc gaccttcaag gtgccgactc cgaccacgcc gcaggcgatc
121 gtggacgcca tcgccggcgc cgtcaggggt gccagggcgc ggcacgagat cgtcggcgtg
181 ggcacggtg ccgccggata cgtcaaccgg cagcgctcca cggctatctt cgcgccgaac
241 atcgactggc ggcaggagcc tctcaaggaa gaggtcgagg cccgggtggg cctgccggtc
301 gtggctgaga acgacgcgaa cgcggctgcc tggggcgagt acaagttcgg cgcgggcaag
361 ggccaccgca acgtcatctg catcacgctg ggtacgggcc tggcgggcgg catcatcatc
421 ggcaacaagc tgcgcgcggg gcaactcggg gtcgccgccc agttcgggca catccggatg
481 gttccggacg ggtgctgtg cggtcgggt tcccagggtc gctgggagca gtacgcgtcc
541 ggtcgcgcgc tcgtcgggta cgcgaagcag cgggccaacg cgaccccgga gaacgcggac
601 atcctgctct cactgggtga cggcagccc gacggcatcg agggcaagca catctcgatg
661 gccgcgcggc agggggaccg ggtcgcgggt gactcgtacc gcgagctggc ccgctggggc
721 ggggcccggc tcgccgacct ggctctctc ttcgaccctc ccgcttcat cgtcggcggg
781 gggctctcgg acgaggggga gttggtcctc gaccgatcc gcaagtcgta caagcggtag
841 ctggctcggg ggaactggcg tcccgtcgcc gacgtgatcg ctgcccggct gggcaacgac
901 gcgggcctgg taggagcggc cgacctggct cgagagcccg acccgatcat gtga

```

Cuadro 1. Alineamiento de la secuencia obtenida a partir del sitio promotor T7 del plásmido. En rojo se observa la secuencia que alinea con el gen *glk*. El oligo *SAV6073Fw* no se tomó en cuenta para este alineamiento. Las bases marcadas en azul muestran las diferencias entre ambas secuencias. “*Query*” corresponde a la secuencia obtenida a partir del promotor T7, “*Subject*” corresponde al gen *glk* (obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Análisis de la secuencia del extremo SP6.

La secuencia resultante a partir del extremo SP6 tiene un tamaño de 277 nucleótidos.

```

TTGACTCCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTC
ACTAGTGATTATGAGCGAAGAGCGCCCCACGTCCGAAGCAGGGGAGGACGCGCTCG
GACCGGTGCACGACGGCACGGCGCGTGAGAGCACGACGCGCGGCAGTACGGAGCGC
GGCAGCACTGTGCGCGACGAGGAGCGTGACGAGGTCCGGGCGACCGACGACGACGC
CTGGGCGCAGGCGTGCGCCGAGGACCTGGCGGCGGAGCAGGCCCGCCGCGTGTCCC
AGCACTTCCCGCCGCCCTGCTCGGCCGCCGAGGAAGTCTCAAACCTCGTCGACGTCG
TCGCTGACACGCTGTTCTTTACTGTAGTCTTCTTTTTCTTCTTTTTCTTTCTTTTT
TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTT
    
```

Figura 14. Secuencia obtenida del extremo SP6 del plásmido. Mostrándose en azul las letras que corresponden al plásmido pGEM- T Easy, en letras rojas y subrayadas se presenta la secuencia que corresponde al cebador denominado SAV6073Fw y en negro la secuencia correspondiente al fragmento producto de PCR clonado. Cabe señalar que se realizaron los análisis de secuencia con las letras de las bases en color negro únicamente, correspondientes al producto de PCR, sin incluir el oligo cebador. La secuencia contenía un total de 277 pb de longitud.

El alineamiento de la secuencia correspondiente desde el extremo SP6 sin incluir al oligonucleótido cebador, ni la secuencia SP6 del plásmido, muestra que tiene una semejanza del 92% con la región del genoma de *S. avermitilis* que corresponde al locus SAV6073.

	Descripción	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
BA000030.3	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 genomic DNA, complete genome	<u>150</u>	318	51%	2e-33	92%
X65932.1	<i>S.coelicolor glk</i> gene for glucose kinase	<u>149</u>	149	43%	8e-33	82%
AL939111.1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 8/29	<u>149</u>	190	43%	8e-33	82%

Tabla 6. Resultados del alineamiento de la secuencia del extremo SP6. Hay una mayor similitud con el fragmento del genoma de *S. avermitilis* que corresponde al gen SAV6073.

En el cuadro 2 se observa que existe una gran similitud entre la secuencia obtenida del extremo SP6 y el gen *SAV6073* desde la base número 120 (7310472 del genoma de *S. avermitilis*) hasta el número de base 249 (correspondiente a el número de base 7310601 de *SAV6073*). Es claro que sólo una parte del gen se parece a la secuencia obtenida de nuestro producto de PCR, se debe tomar en cuenta que este gen pertenece a *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. A pesar de esto, la información que nos da sobre la región secuenciada, nos indica que falta más de la mitad de nuestro gen diana por secuenciar, pero esto es sin duda un buen indicativo de que el gen homólogo a *SCO2127* de nuestro modelo, se encuentra dentro del fragmento de 1500 pares de bases que se obtuvo por PCR.

Chakrabarti y col. (2001) mencionan que a pesar de las amplias aplicaciones de la técnica de PCR ésta se encuentra llena de dificultades. En muchos casos, el procedimiento estándar falla en producir amplificación significativa o simplemente no hay amplificadas. Así mismo Spiess y col. (2004) mencionan problemas en amplificaciones de PCR debidas al alto contenido de GC de la secuencia objetivo, lo que muchas veces conduce a un bajo rendimiento y especificidad de los productos. Para aumentar la especificidad se utilizaron potenciadores (enhancers) de PCR como formamida, detergentes no-iónicos y el comúnmente utilizado dimetil sulfóxido (DMSO). En nuestro caso usamos como potenciador al DMSO y aún así no se obtuvo amplificación más que con los oligos *SAV6073Fw/SCOgIkRv*. Cabe mencionar que para cada par de oligos hay que consumir mucho tiempo en el establecimiento de condiciones para la obtención de un amplificado y que probablemente haya faltado verificar el efecto de otros agentes potenciadores (*enhancers*) para la amplificación del gen homólogo a *SCO2127*.

Features in this part of subject sequence:

[hypothetical protein](#)

Score = 99.6 bits (50), Expect = 5e-18
Identities = 110/130 (84%), Gaps = 0/130 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 120      CCGACGACGACGCCTGGGCGCAGGCGTGCGCCGAGGACCTGGCGCGGAGCAGGCCCGCC 179
             ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7310472  CCGACGGCGACGCCTGGGCCAAGGCCTGCGCCGAGGATCTCGCCGCCGAGAAGGCCCGCC 7310531

Query 180      GCCGTGCCAGCACTTCCCGCCGCCCTGCTCGGCCGCCGAGGAACTGCTCAAACCTCGTCG 239
             ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 7310532  GCCCGCGCCAGTACGGCGCACAGCCCGGCTCGGCCGCCGAGGAACTGCGCAAGCTCGTCG 7310591

Query 240      ACGTCGTCGC   249
             ||| ||| |||
Sbjct 7310592  ACGCCGTCGC   7310601
```

All the annotated genes identified are available from following
urls.

<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp>
<http://www.bio.nite.go.jp>.

```
FEATURES             Location/Qualifiers
    source             1..516
                       /organism="Streptomyces avermitilis MA-4680"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="MA-4680"
                       /db_xref="taxon:227882"
                       /note="This strain is also named as strain:
ATCC 31267,
                       NCIMB 12804 or NRRL 8165."
    gene               1..516
                       /locus_tag="SAV6073"
    CDS                1..516
                       /locus_tag="SAV6073"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=11
                       /product="hypothetical protein"
                       /protein_id="BAC73784.1"
                       /db_xref="GI:29609735"
                       /translation="MSEERPTSDAAQEDAADETRVPVPGRAESSARGSAADGDWAKAC
AEDLAAEKARRRAQYGAQPGSAAEELRKLVDVAEKL SGLQSP LIDAATSGTAQQMVS
QVVRQAKAVVEPVIERNPVDFDHLAAAGSELLAAYRSAVEAQEKRW TARDHDPHRGG
DQGPGEHIDL D"
```

```
ORIGIN
1 atgagcgaag agcgcccccac gtcgacgccc gctcaggagg acgcgccgca cgagacgcgg
61 gttccccccg gccgagcggga gtcgagcgct cgcgggagcg cagccgacgg cgacgcctgg
121 gccaaaggcct gcgcccagga tctcgcgccc gagaaggccc gccgcccgcg ccagtacggc
181 gcacagcccg gctcggccgc cgaggaactg cgcaagctcg tcgacgccgt cgccgagaag
241 ctgtccgggc tccagtcgcc gctgatcgac gcggccacct ccgggacggc ccagcagatg
301 gtcagccagg tgggtcgaca ggccaaggcc gtcgtcgagc ccgcatcgca gcgcaatccg
361 gacgtcttcg accatctggc cgcggccggc tccgagctgc tcgccccta ccgctccgcc
421 gtggaggccc aggagaagcg ctggacggcc cgggaccacg acccccgcca ccggggcggg
481 gaccaggggc cgggggaaca catcgacttg gactga
```

Cuadro 2. Resultados del alineamiento de la secuencia SP6 del inserto. En este cuadro se pueden ver en primer lugar, las bases del fragmento secuenciado del extremo SP6 que se alinean al gen SAV6073, además el nombre del locus con el cual se asemeja y la traducción así como la secuencia del gen en cuestión. (obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

De acuerdo con estos resultados el fragmento clonado de 1500 pb contiene la región homóloga a *SCO2127* y *glk*. Este resultado nos permitirá, en posteriores experimentos, obtener la secuencia completa del gen homólogo a *SCO2127* de *S. peucetius* var. *caesius*.

El gen homólogo a *SCO2127* en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* resultó más parecido a *SAV6073*, ya que el oligonucleótido que logró alinearse a la región objetivo estaba basado en este último, como también se observa en la comparación por alineamiento usando el BLAST. Esto es congruente con lo representado en un árbol filogenético basado en las secuencias de la subunidad 16S del RNA ribosomal, de las especies del género (Apéndice 2). En este árbol se observa una mayor cercanía de parentesco entre las especies *Streptomyces peucetius* y *S. avermitilis* que con *S. coelicolor* (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/tree2.html>).

CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados el fragmento clonado en nuestro vector con un tamaño de 1500 pb contiene las regiones objetivo (*SCO2127* y *glk*) lo cual en posteriores secuenciaciones nos permitirá obtener la secuencia completa del gen homólogo a *SCO2127* en *S. peucetius* var. *caesius*.

PERSPECTIVAS:

- ❖ Liberar el fragmento correspondiente al gen objetivo, utilizando enzimas de restricción o implementando un PCR con cebadores basados en las secuencias obtenidas; para continuar con su plena secuenciación y caracterización.
- ❖ Identificar el producto génico del homólogo *SCO2127* y su participación en la RCC en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.
- ❖ Conocer el efecto de la delección de los genes *SCO2127* y/o *glkA* en *S. peucetius* var. *caesius* sobre: la RCC, la incorporación de glucosa y la actividad de glucosa cinasa.
- ❖ Determinar si las mutantes Dog^R de *S. peucetius* var. *caesius* están afectadas a nivel del gen homólogo a *SCO2127*.

BIBLIOGRAFÍA:

Angell S., Lewis C.G., Buttner M.J. y Bibb M.J. (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244: 135–143.

Angell S., Schwartz E., y Bibb M.J. (1992) The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A(3): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6:2833-2844.

Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C. y Spalla C. (1969) Adriamicyn, 14-Hidroxydaunomicin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. and Bioen.* Vol. XI 1101-1110.

Arias P., Fernández-Moreno M., y Malpartida F. (1999) Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A(3) as a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* Nov. p. 6958-6968.*

Brock, Madigan T.M., Martinko M.J. y Parker J. (2000) Regulación de la expresión génica. En *Biología de los microorganismos*. p. 227-247 Editado por Prentice Hall INC. 8^{va} edición.

Brückner R. y Titgemeyer F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:141-148.

Busby S., y Ebright R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293, 199-213.

Colland F., Barth M., Hengge-Aronis R. y Kolb A. (2000) σ Factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. *EMBO J.* 19, 3028-3037.

Chakrabarti R. y Schutt E.C. (2001) The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nuc. Ac. Res.* Vol. 29, No.11, 2377-2381.

Demain A. L. (2006) From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:486-495

Demain A. L. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52: 455-463.

Dossonnet V., Monedero V., Zagorec M., Galinier A., Pérez-Martínez G. y Deutscher J. (2000) Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-Ser-HPr phosphatase from *Lactoba-cillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J. Bacteriol.* 182: 2582-2590.

Egeter O. and Brückner R. (1996) Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* 21, 739-749.

Escalante L., Ramos I., Imriskova I., Langley E. y S. Sánchez (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 52: 572-578.

Galinier A., Kravanja M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kil-hoher, M.C., Deutscher, J. and Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1823-1828.

Grein A., (1987) Antitumor Anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press Inc. Milan, Italy Vol. 32. 204-215

Guzmán S., Carmona A., Escalante L., Imriskova I., López R., Sanoja-Rodriguez R., Ruiz B., Servín-González L., Sánchez S., y Langley E. (2005) Pleiotropic effect of the *SCO2127* gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiol.* 151:1717-1723.

Guzmán S., Ramos I., Moreno E., Ruiz B., Rríguez-Sanoja R., Escalante L., Langley E., Sánchez S. (2005) Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 69: 200-206.

Henkin T.M. (1996) The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.

Stülke J. y Hillen W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:195-201.

Hodgson, D.A. (1982) Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its perturbation in mutants resistant to 2-desoxiglucose. *J. of Gen. Microbiol.*, 128:2417-2430.

Hopwood D.A., (1988) Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis sporulation and antibiotic production. *R. Soc. Lond. B* 235: 121-138.

Hopwood D.A., Kieser T., Bibb J. M., Buttner M.J., Chater F.K. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics I. The John Innes Foundation. Impreso en Crowes, Norwich, England. pp 17-23.

Horinouchi S. (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(2): 283-299.

Ikeda H., Seno., E.T., Bruton., C.J. y Chater K.F. (1984) Genetic mapping, cloning and physiological aspects of glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.

Jiang H. y Hutchinson C.R. (2006) Feedback regulation of doxorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Res. Microbiol.* 157:666–674

Kwakman J.H.J.M. y Postma P.W. (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176-9: 2694-2698.

Lomovskaya N., Otten L.S., Doi-Katayama Y., Fostein L., Liu X., Takatsu T., Inventi-Solari A., Filippini S., Torti F., Colombo A.L. y Hutchinson C.R. (1999) Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J. Bacteriol.* 181-1: 305-308.

Maggon K. (2005) Best-selling human medicines 2002-2004. *DDT.* 10-11:739-742.

Mahr K., Hillen W. y Titgemeyer, F. (2000) Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 277-283.

Mahr K., Wezel v. G.P., Svensson C., Kregel U. Bibb.M.J. y Titgemeyer F. (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A(3): large-scale purification and biochemical analysis. *Antoine van Leewenhoek* 78:253-261.

Margulis L., y Schwartz K. V. (1985) Cinco Reinos: guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra. Editorial Labor. Barcelona. Pp.60-61.

Monedero V., Kuipers O.P., Jamet E. y Deutscher J. (2001) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 183: 3391-3398.

Moreno M.S., Schneider B.L., Maile R.R., Weyler W. y Saier M.H. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* 39: 1366-1381.

Nothaft H., Dresel D., Willimek A., Mahr K., Niederweis M., y Titgemeyer F. (2003) The phosphotransferase System of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185-23:7019-7023.

Otten S.L., Ferguson J. y Hutchinson C.R. (1994) Regulation of daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by the *dnrR₂* locus. *J. Bacteriol.* 177:1216-1224.

Parajuli N., Viet H.T., Ishida K., Tong H.T., Lee H.C., Liou K. y Sohng J.K. (2005) Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC27952. *Res. Microbiol.* 156: 707-712.

Parekh s., Vinci V.A., Strobel R.J. (2000) Improvement of microbial strain and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 287-301.

Paulsen T.I. (1996) Carbon metabolism and its regulation in *Streptomyces* and other high GC Gram-positive bacteria. 14th Forum in Microbiology Regulation of carbon metabolism in bacteria 1996. 535-541.

Patwardhan B., Warude D., Pushpangadan P. y Bhatt N. (2005) Ayurveda and traditional Chinese Medicine: A comparative Overview. *eCAM* .2-4:465-473.

Postma P.W., Lengeler J.W. y Jacobson G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57-3: 543-594.

Ramos I., Guzmán S., Escalante L., Imriskova I., Sanoja-Rodriguez R. Sánchez S. y Langley E. (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 155:267-274.

Reizer J., Hoischen C., Titgemeyer F., Rivolta C., Rabus R., Stülke J., Karamata D., Saier M.H.J. y Hillen W. (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* 27: 1157-1169.

Romeo T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding mRNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* 29: 1321-1330.

Saier M.H. Jr., Chauvaux S., Cook G.M., Deutscher J., Paulsen I.T., Reizer J. y Ye J.J. (1996) Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 142:217-230.

Sambrook J., Russell D. (2000) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Santana, C., Segura, D. y Sánchez, S. (1994) Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Lat.-Amer. Microbiol.* 36:139-158.

Spiess A., Mueller N. y Ivell R. (2004) Trehalose Is a Potent PCR Enhancer: Lowering of DNA Meeting Temperature and Thermal Stabilization of *Taq* Polymerase by the Disaccharide Trehalose. *Technical Briefs*. 1256-1259

Stülke J. y Hillen W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 2:195-201.

Stuntman-Enwall K. J. y Hutchinson C.R. (1989) Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3135-3139.

Titgemeyer F. y Hillen W. (2002) Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Anton van Leeuwenhoek.* 82:59-71

Wezel v. G.P., Mahr K., König M., Traag A. B., Schmitt-Pimentel F.E., Willimek A. y Titgemeyer F.(2005). GlcP constitutes the major glucosa uptake system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microboil.* 55-2: 624-636.

Wezel v. G.P., König M., Mahr K., Nothhaft H., Thomae A.W., Bibb M., Titgemeyer F.(2007) A new piece of an old jigsaw: Glucose kinase is activated posttranslationally in glucose transport-dependet manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Microbiol. And Biotechnol.* 17-12: 67-74

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>

<http://streptomyces.org.uk/>

APENDICES

Apéndice 1

Medios de cultivo y soluciones.

Medio Luria Bertani

	g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	7.5
pH	7.0

Medio YMG

	g/L
Extracto de levadura	4.0
Extracto de malta	10.0
Glucosa	4.0
pH	7.2

Buffer P

	g/L
Sacarosa	1.0300
Sulfato de potasio	0.0025
MgCl	0.0202
mL de elementos traza	0.0200 mL

Solución de elementos traza	g/L
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ × 7H ₂ O	1.0
MnCl ₂ × 4H ₂ O	1.0
CaCl ₂ anhidro	1.0

Soluciones para el Aislamiento de plásmido

Solución A

	Concentración
Glucosa	50mM
Tris-HCl	25mM
EDTA pH 8 estéril	10mM

Solución B

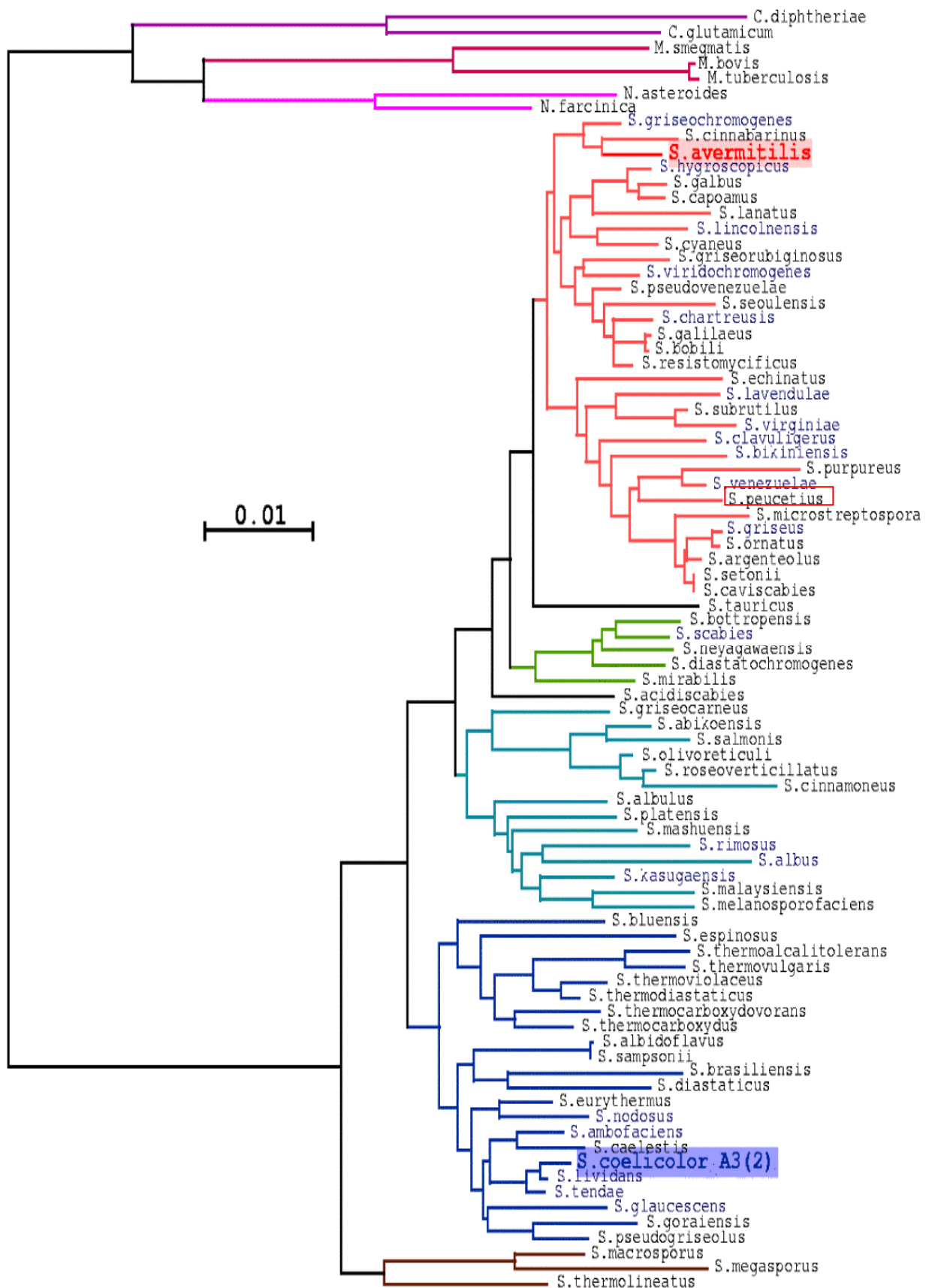
	Concentración
NaOH	0.2 M
SDS	1%

Solución C

Acetato de potasio pH 4.8

Apéndice 2

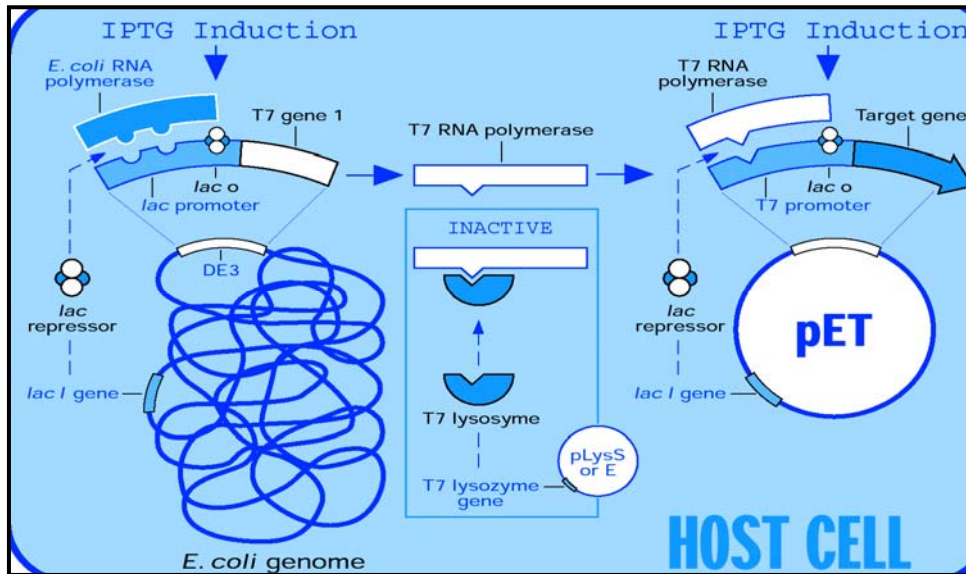
Árbol Filogenético del género *Streptomyces* basado en la subunidad 16S de rRNA.



Apéndice 3

Plásmido pGEM-T Easy y la complementación alfa.

El pGEM-T Easy Vector es un plásmido tipo pUC, contiene un segmento derivado del operón de la lactosa de *E. coli*. Este segmento codifica para el represor, el promotor, el operador y los primeros 146 aminoácidos del gen *lacZ* (péptido alfa). La síntesis de ese fragmento de β -galactosidasa puede ser inducido por IPTG. Estos plásmidos contienen sitios de clonaje múltiples o polilinker, éste no modifica los marcos de lectura y proporciona un lugar para la introducción de un número pequeño de aminoácidos en la parte amino-terminal del péptido alfa sin cambiar sus propiedades.



El plásmido pGEM-T Easy dentro de una cepa *E. coli* apropiada (como DH5 α) podrá realizar la α -complementación, pues el segmento de 146 aa que posee, se expresará y la sección restante de la enzima β -galactosidasa se sintetiza por la bacteria complementando dicha enzima que ahora será activa. De este modo, en presencia del inductor gratuito IPTG, la enzima hidroliza el sustrato artificial X-GAL que conduce a que la bacteria adquiere una coloración azul.

Cuando se introduce un fragmento de DNA las 2 secciones de la β -galactosidasa son inactivadas. Cuando se transforman bacterias con un vector tipo pUC se puede identificar a las bacterias transformadas con el plásmido que ligó al fragmento de DNA de interés, ya que presentan una coloración blanca, aquellas que tengan un color azul no tendrán plásmidos con el producto de PCR o DNA de interés en su interior. Este es un método sencillo que permite identificar las colonias con plásmidos recombinantes.

Electroporación de células competentes de *E. coli* JM109

Se colocaron 2 μ L de la reacción de ligación más 50 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 en una celda fría de 0.1 mm. La celda se colocó en la ranura del electroporador y se le dió una descarga de 1250 V, inmediatamente después se le adicionó medio LB más glucosa al 1% (1mL), las células transformadas se incubaron a 37°C por 1 h a 200 rpm. Posteriormente, de la suspensión celular se plaquearon, 1, 5 y 10 μ L en medio LB y se incubaron a 29°C por 16 h.

Apéndice 4

Mapa del plásmido pGEM-T Easy Vector y secuencia de su polilinker.

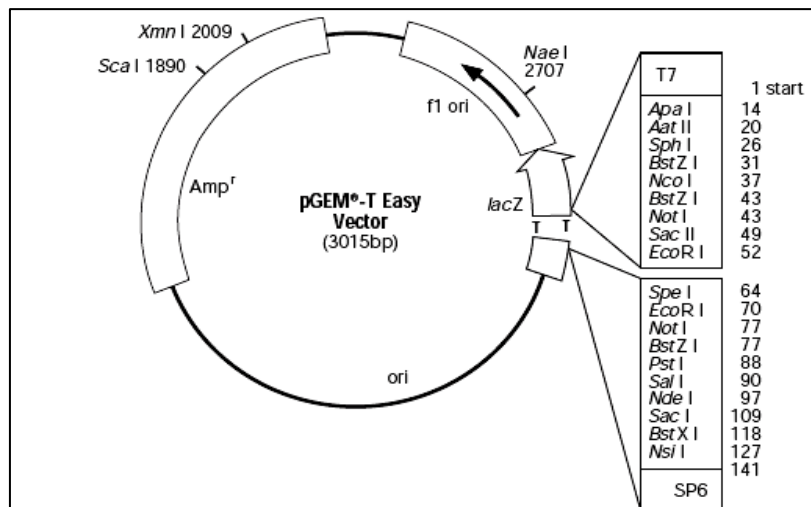
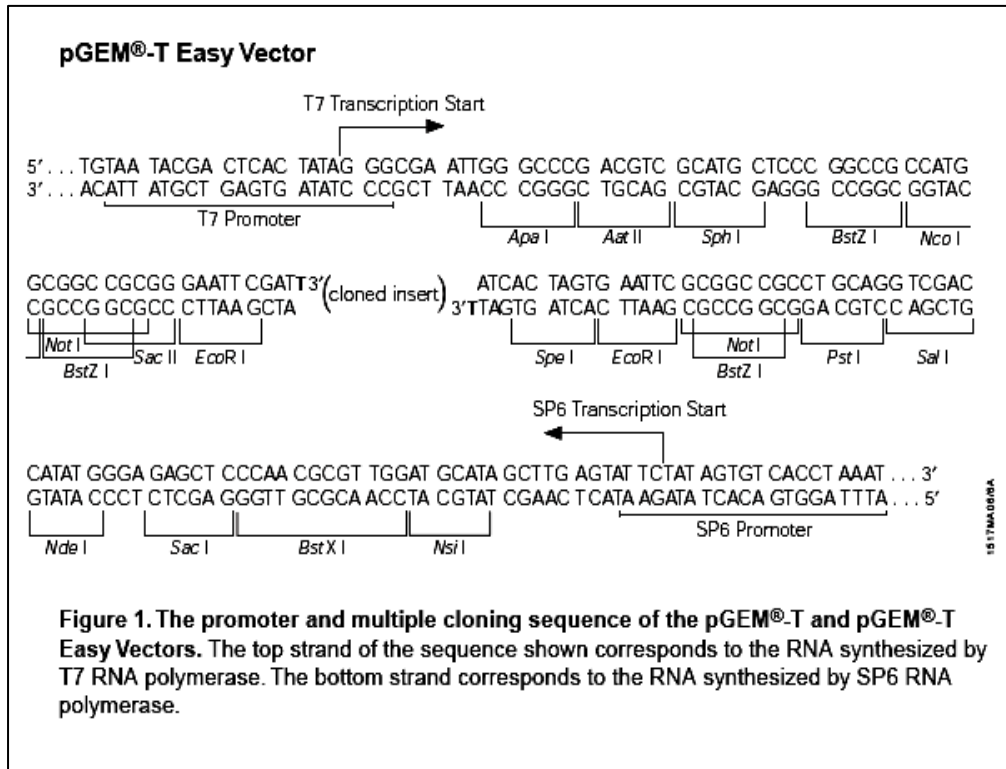


Figure 3. pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β -lactamase coding region	1337–2197
phage <i>f1</i> region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Glosario

Clúster: Grupo de genes que se transcriben a la vez relacionados funcionalmente

Biosíntesis: es un proceso donde se producen compuestos químicos desde reactivos simplificados. A diferencia de la síntesis química, la biosíntesis ocurre dentro de organismos vivos y es generalmente catalizada por enzimas. Este proceso es una parte vital del metabolismo.

Electroporación: Técnica por la cual se crean poros transitorios en las células o en los protoplastos mediante cortas descargas eléctricas que permiten la entrada de ADN. Se la emplea para la transformación genética.

Enhancer: Vocablo inglés para "elemento potenciador". Ver elemento potenciador.

Metabolismo secundario: Suma de los procesos no esenciales para las funciones metabólicas básicas de la célula. Estos procesos están asociados a ciertas ventajas adaptativas, como los mecanismos de defensa (antibióticos, toxinas, etc.).

Plásmido: Porción de ADN circular que puede mantenerse como elemento extracromosomal en bacterias u otras células. Lleva pocos genes y no es indispensable para el crecimiento y supervivencia de la célula hospedadora. Los plásmidos pueden transferirse de un organismo a otro, por eso se usan en ingeniería genética como vectores de clonado y

Pleiotropía: Efecto de un gen particular o mutación sobre aspectos fenotípicos aparentemente no relacionados.

Primer (o cebador): Vocablo inglés para iniciador o cebador.

Promotor: En biología molecular, secuencia específica de ADN a la cual se le une la enzima ARN polimerasa para comenzar la transcripción de un gen.

Expresión génica: Proceso por el cual la información codificada en un gen se transcribe a un ARN ribosomal, de transferencia o mensajero. La información contenida en los ARN mensajeros luego se traduce a proteínas.

Antibiótico: Sustancias que evitan o retrasan el crecimiento de los microorganismos. Se los emplea en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y como agentes de selección en procesos de transformación genética.

Adecuación: En biología evolutiva, la **adecuación** se define como el éxito de una entidad (por ejemplo, una especie) en reproducirse.