



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTANDARIZACIÓN DEL RT-qPCR DE LOS GENES
MÚLTIPLES DE LAS ENZIMAS DEL CICLO DE LOS
ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS EN**

STREPTOMYCES COELICOLOR

TESIS

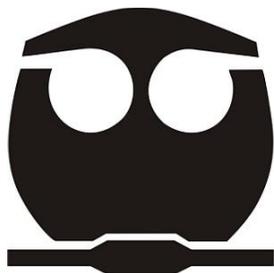
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ITZEL MARYSOL MARTÍNEZ VARGAS

TUTORA

Dra. Ma. Elena Del Carmen Flores Carrasco



Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes**

VOCAL: **Profesor: José Pedraza Chaverri**

SECRETARIO: **Profesor: Ma. Elena Del Carmen Flores Carrasco**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna**

2° SUPLENTE: **Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Elena Del Carmen Flores Carrasco

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Tóshiko Takahashi Iñiguez

SUSTENTANTE:

Itzel Marysol Martínez Vargas

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de DGAPA/PAPIIT proyecto No. IN214116.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	IV
INDICE DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	4
2 ANTECEDENTES.....	6
2.1 Metabolismo del carbono; ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)	6
2.1.1 Sistemas enzimáticos del TCA.....	9
2.2 Genes múltiples en el metabolismo del carbono en <i>Streptomyces</i>	10
2.2.1 Genes del TCA en otros microorganismos.....	11
2.2.2 Genes identificados para el TCA en <i>S.coelicolor</i>	14
2.3 RT-qPCR como técnica en biología molecular	14
2.3.1 Fundamento y variantes de la técnica.....	14
2.3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
2.3.1.2 Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)	20
2.3.1.3 Transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	23
2.3.2 Relevancia de la estandarización de la técnica	29
2.3.3 Análisis de la expresión genética como aplicación del RT-qPCR.....	33
3 JUSTIFICACIÓN	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 General	36
4.2 Particular	36
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1 Modelo de estudio	37
5.2 Diseño de oligonucleótidos.....	37
5.3 Ensayos de PCR punto final.....	37
5.4 Estandarización de las condiciones de PCR.....	39
5.5 Ensayos de RT PCR cualitativo en muestras de ARN obtenido a las 24h y 72h de crecimiento.	39
6 RESULTADOS	41

6.1	Oligonucleótidos diseñados	41
6.2	Ensayos de PCR y estandarización de las condiciones para la amplificación.	44
6.3	Ensayos de RT PCR semicuantitativo en muestras de ARN de <i>S.coelicolor</i> M145 crecido en glucosa por 24h y 72h.....	50
7	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	57
8	CONCLUSIONES.....	67
9	PERSPECTIVAS	68
10	BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE ABREVIATURAS

μg	Microgramos.
μL	Microlitro.
μM	Micromolar.
A	Adenina.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
ADP	Adenosin difosfato.
αKGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	Adenosin trifosfato.
C	Citosina.
Cbp	Cuanto baste para.
CO_2	Dióxido de carbono.
CoA-SH	Coenzima A unida a un residuo tiol.
CS	Citrato sintasa.
Ct	Ciclo umbral.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados.
dT	Dinucleótido timina.
FAD^+	Flavín adenín dinucleótido.
FADH_2	Flavín adenin dinucleótido hidrogenado.
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster.
Fw	Sentido.
G	Guanina.
G^-	Gram negativo.
G^+	Gram positivo.
GBM	Grado biología molecular.
G-C	Enlace guanina con citosina.
GTP	Guanosín trifosfato.
H_2O	Agua.
KCl	Cloruro de potasio.
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto.
KDa	Kilodaltones.
Mg^{2+}	Ión magnesio.
MgCl_2	Cloruro de magnesio.
min	Minuto.
MM	Medio mínimo.

mM	Milimolar.
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado.
ng	Nanogramos.
NTC	Control sin templado.
ORF	Secuencia codificante.
pb	Pares de base.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDH	Piruvato deshidrogenasa.
PEG	Polietilenglicol.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
-RT	Reverso transcripción negativa.
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa.
Rv	Reverse (Antisentido).
SCO	<i>Streptomyces coelicolor</i> .
seg	Segundo.
T	Tiamina.
TAE	Tris-acetato-EDTA.
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Tm	Temperatura de alineamiento.
TPP	Pirofosfato de tiamina.
U	Unidad.
UV	Ultravioleta.
V	Volts.
WT	Tipo silvestre.

RESUMEN

El estudio de *Streptomyces coelicolor* como organismo modelo de su género se ha enfocado en el metabolismo secundario que es proveedor de los compuestos con actividad biológica, entre ellos antibióticos, que han sido altamente explotados en la industria. Sin embargo, el metabolismo primario del cual se obtienen los precursores para la biosíntesis de éstos no se ha estudiado con tanto detalle, es por eso que en este trabajo nos enfocamos en la vía principal del metabolismo del carbono en microorganismos aerobios: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). *S. coelicolor*, además de su ciclo de diferenciación y tener un cromosoma lineal, posee la particularidad de tener identificados más de un gen para la mayoría de las enzimas del TCA; aspecto que en bacterias en general no se ha puesto el interés en entender, es por eso que este trabajo tiene el propósito de iniciar la investigación en el tema.

Seleccionamos 21 genes que codifican para las enzimas que participan en el ciclo TCA y con el objetivo a futuro de medir su expresión mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativo a partir de Ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en un futuro, se diseñaron oligonucleótidos y se estandarizaron las condiciones de amplificación en Ácido desoxiribonucleico (ADN) genómico para estos 21 genes como primer paso. De acuerdo a los resultados positivos se decidieron hacer ensayos de Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativo en muestras de ARN total en etapas tempranas y tardías del crecimiento de *S. coelicolor* M145 crecido en glucosa 1% con el objetivo de visualizar un patrón de expresión o incluso observar si es que éstos genes se expresan en estas condiciones. Lo que encontramos fue que, si bien la mayoría de los genes estudiados tiene cierto nivel de expresión en uno o en los dos tiempos de muestreo, no mantienen alguna proporción que nos pueda dar una idea del porqué o cómo este actinomiceto administra el hecho de tener múltiples secuencias codificantes para estas enzimas.

Este trabajo se muestra como una introducción al estudio del metabolismo primario del carbono y a su regulación en una bacteria de interés industrial, cuyo beneficio es además de académico, una inversión a la posibilidad de explotar sus cualidades para ser aprovechadas en distintas áreas del desarrollo de la humanidad.

1 INTRODUCCIÓN

Dentro del mundo microscópico y en particular en las bacterias se encuentra un género que posee características especiales que lo convierte en un interesante modelo de estudio y les confiere importancia económica: *Streptomyces*. Son bacterias que poseen un ciclo de vida complejo (van Wezel *et al.*, 2007; Chater, 2011), con un genoma lineal que es de los más grandes reportados para bacterias con 8, 677,507 pb (Bentley *et al.*, 2002) y que producen una gran variedad de antibióticos y compuestos con actividad biológica importantes para la industria farmacéutica (Berdy, 2005). Este género produce alrededor del 75% de los antibióticos obtenidos de actinobacterias (Sánchez y Demain, 2011). El microorganismo que se ha utilizado como modelo de estudio de este género bacteriano y del presente trabajo es *Streptomyces coelicolor*, cuyo genoma ya se ha descrito en el 2002 por Bentley y colaboradores.

S. coelicolor al ser un estreptomiceto que habita el suelo asimila los nutrientes provenientes de éste como la quitina, el xilano y la celulosa, los cuales, al ser degradados por enzimas excretadas por el microorganismo y llevados al interior del mismo son utilizados como fuente de carbono (Hodgson, 2000); por este motivo presenta una gran variedad de vías para catabolizar y regular el consumo de carbohidratos dentro del metabolismo primario. En organismos aeróbicos, el catabolismo se conforma por tres vías principales: la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena transportadora de electrones; dentro de estas el TCA es la vía metabólica más importante para la producción de energía y cuyos intermediarios contribuyen en la síntesis de otros compuestos, precursores del

metabolismo secundario responsable de la formación de antibióticos, por ejemplo (Nelson y Cox, 2013).

El que el metabolismo primario sienta las bases para la producción de esta variedad de metabolitos secundarios importantes y que a pesar de ello no exista un estudio amplio, en este tema, en *S. coelicolor* (Butler *et al.*, 2002), nos ha motivado a centrar nuestra investigación en esta área y en particular en el TCA; lo que nos ha llevado a estudiar la regulación y las propiedades de varias enzimas de esta ruta como la isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, obteniendo de ésta última una mutante carente del gen que la codifica (Takahashi, *et al.*, 2014; Aburto, 2015).

De la investigación del grupo y teniendo el genoma completo publicado (8, 677,507 pb) se tienen identificadas las secuencias codificantes (ORF's) de las enzimas del TCA publicadas en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés) y resultan ser más de uno para la mayoría de ellas; siendo que solo se tienen caracterizadas algunas, es de nuestro interés estudiar la expresión, regulación y actividad de la totalidad de estos genes lo que nos proporcionaría un escenario completo del funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbónicos en *S. coelicolor*.

Como primer acercamiento seleccionamos los múltiples genes de las enzimas: citrato sintasa, aconitasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinato sintasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa quedándonos con un total de 21 genes de los cuales diseñamos oligonucleótidos que nos permitieran realizar ensayos de transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa con el objetivo de medir su expresión genética posteriormente; para ello se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR punto final y se hicieron unos primeros ensayos de RT-PCR semicuantitativo (comparado con la expresión del ARN ribosomal 16S) utilizando muestras de ARN total extraído a 24 y 72 horas de crecimiento en medio mínimo con glucosa al 1% como fuente de

carbono, esperando observar su comportamiento a etapas tempranas y tardías del desarrollo.

2 ANTECEDENTES

2.1 Metabolismo del carbono; ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)

La glucólisis es la primera etapa en la oxidación de la glucosa en los microorganismos anaerobios y aerobios como *Streptomyces coelicolor* (Nelson & Cox, 2013), generándose dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa y de esta manera el piruvato se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (también llamado ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico), a través del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato en acetil-CoA (Tymoczko *et al.*, 2013).

El acetil-CoA se incorpora en el TCA participando en la condensación del mismo con el oxaloacetato a través de la enzima citrato sintasa para formar una molécula de citrato de seis carbonos, el cual se transforma en isocitrato (otra molécula de seis carbonos) en un paso posterior por acción de la enzima aconitasa. El isocitrato, una vez formado, sufre una deshidrogenación, con la formación de una molécula de Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado (NADH) y pérdida de CO₂ por acción de la enzima isocitrato deshidrogenasa formando el α -cetoglutarato, una molécula de cinco carbonos. Este último sufre pérdida de CO₂, una descarboxilación propiciada por el complejo multienzimático α -cetoglutarato deshidrogenasa generando una molécula de NADH y succinil-CoA, molécula de cuatro carbonos que es transformada posteriormente en succinato por acción de la succinil-CoA sintetasa. En esta reacción la disociación del enlace tioéster del succinil-CoA está acoplada a la fosforilación del Adenosin difosfato (ADP) para formar Adenosin trifosfato (ATP). El siguiente paso consiste en que la succinato deshidrogenasa oxida al succinato para formar fumarato y Flavin adenin dinucleótido hidrogenado (FADH₂). El fumarato es hidratado por medio de la fumarasa y se forma L-malato,

el cual como paso final es oxidado a oxaloacetato y se genera una molécula de NADH por medio de la malato deshidrogenasa. Así el oxaloacetato vuelve a reaccionar con otra molécula de acetil-CoA para iniciar otra vuelta al ciclo, cada vuelta genera energía conservada en forma de NADH, FADH₂ y ATP o GTP y se generan también dos moléculas de CO₂ por cada vuelta (Fig. 1; Nelson & Cox, 2013).

De esta manera se considera que el TCA es una serie de reacciones de oxidación-reducción divididas en dos etapas en donde la primera es la condensación de acetil-CoA con el oxaloacetato y así formar citrato, seguido de dos descarboxilaciones oxidativas que liberan CO₂ y NADH. En la segunda etapa se regenera el oxaloacetato y se forma GTP, FADH₂ y NADH (Tymoczko *et al.*, 2013).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es la ruta central del metabolismo; en este ciclo convergen vías catabólicas de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, así como vías anabólicas de aminoácidos y nucleótidos y es el principal productor de energía y poder reductor en los organismos aerobios (Nelson & Cox, 2013). El α -cetoglutarato y el oxaloacetato, por ejemplo, son precursores de los aminoácidos glutamato y aspartato respectivamente; el oxaloacetato es precursor de la glucosa y el succinil-CoA es un intermediario central en la síntesis del anillo de porfirina de los grupos hemo (Nelson & Cox, 2013). Y en el caso de *S. coelicolor*, el acetil-CoA es precursor de sus antibióticos característicos, actinorodina, undecilprodigiosina y metilenomicina (Fig. 2; Van Keulen *et al.*, 2011).

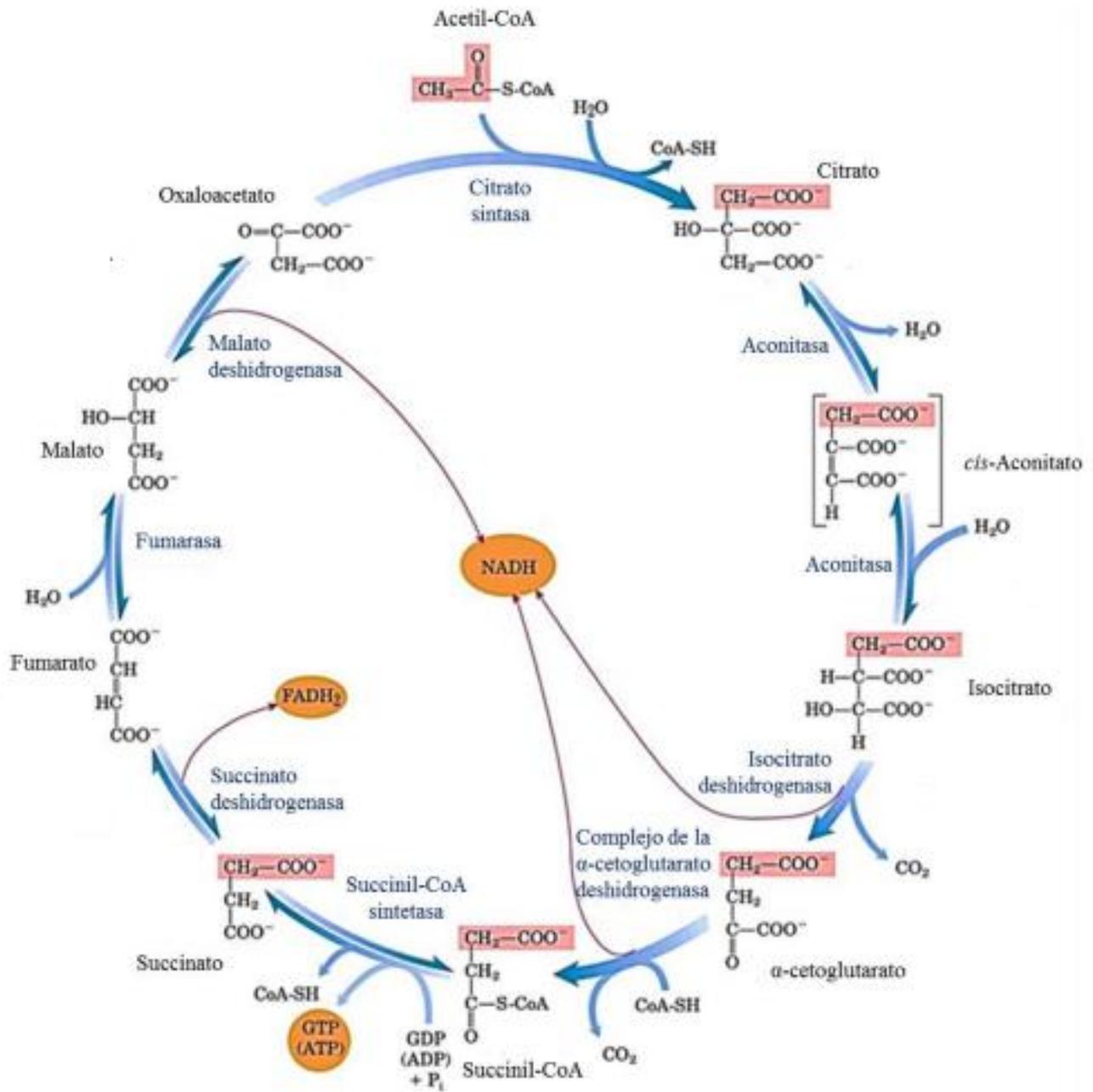


Figura 1. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Modificado de Nelson y Cox (2013).

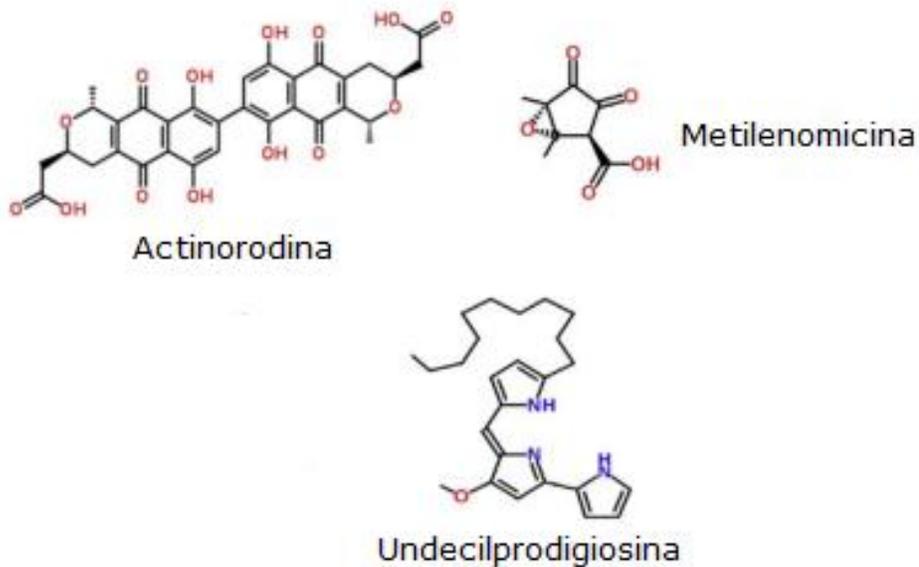


Figura 2. Estructura química de los antibióticos característicos sintetizados por *S. coelicolor*A3(2). Modificado de van Keulen y Dyson (2014).

2.1.1 Sistemas enzimáticos del TCA

El TCA es un ciclo que consta de ocho enzimas, de las cuales cuatro están conformadas por más de una subunidad. La primera de ellas es, la citrato sintasa (CS), enzima que cataliza la condensación del acetyl-CoA y el oxaloacetato en citrato. Esta enzima contiene subunidades dependiendo del tipo de CS. Están descritos dos tipos de CS, la tipo I que es la más común y se conforma por un homodímero y la poseen eucariontes, arqueas y bacterias G⁺(Gram positivo); el tamaño de sus subunidades va de 60-100 kDa (Chen *et al.*, 2011. Weitzman, 2003). El tipo II que se encuentra en algas y en bacterias G⁻(Gram negativo) se conforma de un homohexámero (trímero de dímeros) y tiene un tamaño de 240-280 kDa (Van Ooyen *et al.*, 2011). Se tiene registro de que la CS de *Corynebacterium glutamicum* no forma homodímeros ú homohexámeros si no que está formada por un homotetrámero (Bond *et al.*, 2005).

La segunda enzima, a la cual se le puede denominar complejo enzimático, ya que consta de tres proteínas y cinco coenzimas o grupos prostéticos es la α -cetoglutarato deshidrogenasa que como recordaremos, cataliza la reacción de α -cetoglutarato a succinil-CoA generando CO_2 y NADH. Las tres proteínas que la conforman están denominadas componentes E1, E2 y E3. La primera de ellas es una α -cetoglutarato deshidrogenasa como tal (E1), la segunda es una dihidrolipoil transsuccinilasa (E2) con tres dominios de unión: un lipoiloamino terminal, un dominio de unión a E1 y a E3 y un dominio de unión a succinil transferasa y la tercera es una dihidrolipoil deshidrogenasa (E3). Estas tres enzimas actúan a su vez con cinco coenzimas: tiamina pirofosfato (TPP), flavin adenin dinucleótido (FAD^+), coenzima A con residuo de sulfuro (CoA-SH), nicotin adenin dinucleótido (NAD^+) y lipoato (Nelson & Cox, 2013).

La tercera enzima con subunidades es la succinil-CoA sintetasa la cual a partir de succinil-CoA y ADP forma succinato y una molécula de ATP; esta enzima se conforma de dos subunidades α y β , la primera contiene el extremo P-His (residuo fosfato-histidina necesario para formar el intermediario fosfohistidil enzima) y el sitio de unión para CoA, la segunda tiene especificidad para ADP (Nelson & Cox, 2013).

La última enzima del ciclo que trabaja como sistema enzimático es la succinato deshidrogenasa, un flavoproteína que forma fumarato y una molécula de FADH_2 a partir de succinato; contiene tres centros de hierro-azufre y una molécula de FAD^+ unida a su estructura. Una característica importante es que el malonato inhibe esta reacción deteniendo por completo el ciclo (Nelson & Cox, 2013).

2.2 Genes múltiples en el metabolismo del carbono en *Streptomyces*

Existen diversos estudios que revelan que los genomas de diferentes especies de *Streptomyces* tienen un gran número de genes involucrados en el metabolismo del carbono (Van Keulen *et al.*, 2011), y más que eso, en los genomas de estos

microorganismos y otros actinomicetos existen múltiples copias de genes que codifican productos homólogos o similares.

En bacterias, los genes que codifican para el metabolismo primario están agrupados en operones lo que significa que su expresión está coordinada por un mismo promotor, sin embargo, en *Streptomyces* los genes del metabolismo primario están dispersos en todo el genoma sin seguir un orden específico y muchos de ellos sin estar siquiera agrupados en operones (Siebring,2010), por ello es complejo entender como es coordinada la expresión genética del metabolismo de carbono en este género (Van Keulen *et al.*, 2011).

A pesar de esto existe una extensa sintenia en los genes del metabolismo de carbono de *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*, en los cuales se pueden detectar más de un gen para las diferentes enzimas de las vías centrales del carbono (Siebring, 2010) como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como se muestra en la Tabla 1.

2.2.1 Genes del TCA en otros microorganismos

A pesar de ser la vía principal del metabolismo del carbono, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no se desarrolla de la misma manera en todos los microorganismos. Se han descrito principalmente variaciones en las reacciones que forman succinato a partir de α -cetoglutarato.

Tabla 1. Número de copias de los genes registrados para el TCA en genomas de *S. coelicolor* (SCO), *S. avermitilis* (SAV) y *S. griseus* (SGR). Modificado de Van Keulen *et al.*, 2011 con datos del KEGG.

<i>Enzima</i>	<i>Nombre completo</i>	<i>SCO^a</i>	<i>SAV^a</i>	<i>SGR^a</i>
Genes del TCA				
CS	Citrato sintasa	4	4	4
Aco	Aconitasa	1	1	1
Idh	Isocitrato deshidrogenasa	1	1	1
α -Kgdh	α -Cetoglutarato deshidrogenasa	2*	2*	2*
Suc	Succinil CoA-Sintetasa	2*	2*	1*
Sdh	Succinato deshidrogenasa	2*	2*	2*
Fum	Fumarasa	2	2	2
Mdh	Malato deshidrogenasa	1	1	1

^aNúmero de genes probables registrados. *Número de complejos registrados.

En *Helicobacter pylori*, por ejemplo, se ha descrito que esta reacción que canónicamente la realizan las enzimas α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa, en esta especie la realizan las enzimas α -cetoglutarato:ferrodoxinaóxidoreductasa y una succinil-CoA:acetoacetyl-CoAtransferasa (Corthésy-Theulaz *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1998). De igual manera en *Mycobacterium tuberculosis* se ha descrito que la α -cetoglutarato descarboxilasa genera semialdehído succínico y posteriormente una deshidrogenasa produce succinato (Tian *et al.*, 2005). Otra diferencia entre microorganismos es que en *H. pylori* y en *Corynebacterium glutamicum* existe una enzima denominada malato:quinonaóxido reductasa que cataliza la oxidación de L-malato a oxaloacetato (Kather *et al.*, 2000; Molenaar *et al.*, 2000).

Por tanto se podría sospechar que la expresión de los genes que codifican para las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos no es constitutiva ni coordinada. En *Escherichia coli* por ejemplo, las enzimas del TCA se reprimen total o parcialmente en condiciones anaeróbicas, y las enzimas citrato sintasa, succinato deshidrogenasa

y α -cetoglutarato deshidrogenasa están sujetas a represión catabólica por glucosa (Nimmo, 1987).

Se ha descrito además por medio de un análisis computacional de los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis*, el índice de adaptación de codones como un estimador numérico de los niveles de expresión génica, a los genes altamente expresados se les denominó PHX (Wu *et al.*, 2005). Los resultados demostraron que todos los genes del TCA fueron PHX en ambas bacterias, diferente a lo descrito en *Bacillus subtilis*, *Hemophilus influenzae* y *Synechocystis* en los cuales ningún gen del TCA es PHX (Karlin *et al.*, 2001). Esta diferencia puede deberse a que los *Streptomyces* dependen del TCA como fuente principal de precursores para el metabolismo primario y secundario (Mendoza, 2008).

Por otro lado al realizar análisis de microarreglos se logró identificar la expresión de varios genes (*sdhCDAB*, *sucB*, *sucC*, *acnB*, *fumC* y *mdh*) en *E. coli* que codifican para las enzimas del TCA: succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, aconitasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, y se encontró que están corregulados negativamente con la producción de acetato que se da al crecer a *E. coli* en condiciones aeróbicas en presencia de glucosa como fuente de carbono, ya que el flujo de carbono en el TCA es muy bajo y secreta acetato al medio como producto de degradación de glucosa por la glucólisis (Veit *et al.*, 2007). También se ha descrito en *C. glutamicum* una expresión mayor de los genes *gltA* (citrato sintasa), *acn* (aconitasa), *sdhCAB* (succinato deshidrogenasa) y *fum* (fumarasa) al crecer al microorganismo en acetato que en glucosa (Bott, 2007).

Por otro lado, *Saccharopolyspora erythraea* tiene tres genes que codifican para citrato sintasa: *gltA-2*, *cit A* y *cit A4*, de tipo I la primera y de tipo II las restantes, las cuales están reguladas de diferente manera dependiendo de las condiciones de cultivo (Cheng *et al.*, 2014). *B. subtilis* también posee dos isoformas de citrato sintasa codificadas por *citZ* y *citA* (Jin y Sonenshein, 1994).

2.2.2 Genes identificados para el TCA en *S.coelicolor*

En *S. coelicolor* se obtuvieron mutantes deletadas de los genes *citA* (SCO2736) y *acoA* (SCO5999) que codifican para la citrato sintasa y la aconitasa, respectivamente (Viollier *et al.*, 2001a). Los genes para las subunidades E3 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (SCO2180 *pdhL*, SCO4919 *lpd* y SCO0884 *lpd*) se han identificado en el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y se trata de las mismas subunidades en la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Del mismo modo el SCO2181 (SucB) que codifica para la subunidad E2 se identificó para el complejo de la PDH, sin embargo, es un homólogo en α -KGDH (Thomas *et al.*, 2012), y en el laboratorio de la Dra. Flores se ha medido la actividad y la expresión del SCO5281 como subunidad E1 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Rodríguez, 2016).

Para la succinato sintetasa se tienen identificados dos genes: SCO4808 (*sucC*) y SCO4809 (*sucD*) que codifican para la cadena β y α , respectivamente (Thomas *et al.*, 2012). Para la succinato deshidrogenasa se tienen identificados el SCO4855 y el SCO0922 en el proteoma reportado por Thomas y colaboradores en 2012, y el SCO5106 al medir su expresión *in silico* (Herbig, 2014).

Por otra parte, el gen *fumC* se identificó en *E. coli* para fumarasa (Tseng *et al.*, 2001) y presenta ontología con *S. coelicolor* y se ha identificado en el SCO5042.

2.3 RT-qPCR como técnica en biología molecular

2.3.1 Fundamento y variantes de la técnica

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica en biología molecular bastante popular debido a su adaptabilidad y aplicabilidad desde su invención en la década de los 80's por KaryMullis, un bioquímico que trabajaba para la compañía Cetus®; el laboratorio en el que trabajaba se especializaba en la síntesis de cadenas cortas de ADN llamados

oligonucleótidos, por lo cual, Mullis les encontró un nuevo uso que demandara su producción al inventar un método para identificar una secuencia específica de ADN en una solución que contenga miles de secuencias más de ADN y después amplificarlas exponencialmente en un proceso que tomaría solo algunas horas (Bagasray Hansen, 1997).



Figura 3. Kary Mullis (1944-) premio Nobel de química en 1993 por su invención de la reacción en cadena de la polimerasa.

Antes de este descubrimiento la única estrategia posible para aislar un gen era el clonado molecular; es decir la introducción de fragmentos de ADN en plásmidos (Cortazar *et al.*, 2004). Hoy en día puede ocuparse para la detección de agentes etiológicos, genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios hasta estudios de expresión del gen. La PCR continúa siendo un método revolucionario, constituyéndose en la mejor técnica desarrollada por biólogos moleculares cuyo impacto aún continúa haciéndose notar (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR, también llamados amplicones son analizados en

geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al*, 2013).

Esencialmente la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean, para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Cortazar *et al.*, 2004).

Existen variantes de la técnica dependiendo del origen de la muestra, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). La RT-PCR tiene la capacidad de evaluar la reacción en tiempo real, los datos son registrados a lo largo del proceso y no al final como una reacción de PCR común, determina el punto en el tiempo del proceso cuando se detecta la primera amplificación de un producto de PCR y los productos que se generan hasta el final de cada reacción. De esta manera es posible cuantificar los productos de RT-PCR y es denominado entonces RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR; Tamay de Dios *et al*, 2013).

2.3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR en general está basada en la relación cuantitativa entre la cantidad de secuencia blanco al inicio de la reacción y la cantidad de secuencia blanco amplificada en cada ciclo; esta correlación sigue una tendencia exponencial que proporciona una idea certera de duplicación suponiendo una eficiencia de 100% (Biassoni y Raso, 2014).

Es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice que se separará

en un primer paso de desnaturalización (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La PCR es un proceso en el cual se toma una muestra de material biológico que contenga ADN (o ARN); la muestra puede provenir de casi cualquier fuente como un cultivo bacteriano, un folículo capilar, tejido humano o incluso un resto fósil; esta muestra debe ser purificada para quedarse con una muestra de ácidos nucleicos lo más pura posible para después someterla a reacción con una enzima polimerasa termoestable, distintos componentes que favorezcan la reacción y aprovechar su función natural de sintetizar cadenas complementarias de ADN en dirección 5' a 3' a partir de cadenas simples de ácidos nucleicos (Bagasra y Hansen, 1997).

Es importante también mencionar que la etapa exponencial en la cual se sintetizan los nuevos fragmentos está limitada a cierto número de ciclos y de tiempo programados en el termociclador. Si hablamos de un sistema clásico, esta condición puede ocasionar la depleción de concentración de reactivos o la actividad enzimática por la acumulación de productos en el tiempo (Biassoni y Raso, 2014).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima polimerasa, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora y H_2O (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR (Fig. 4):

- Desnaturalización
- Hibridación
- Extensión

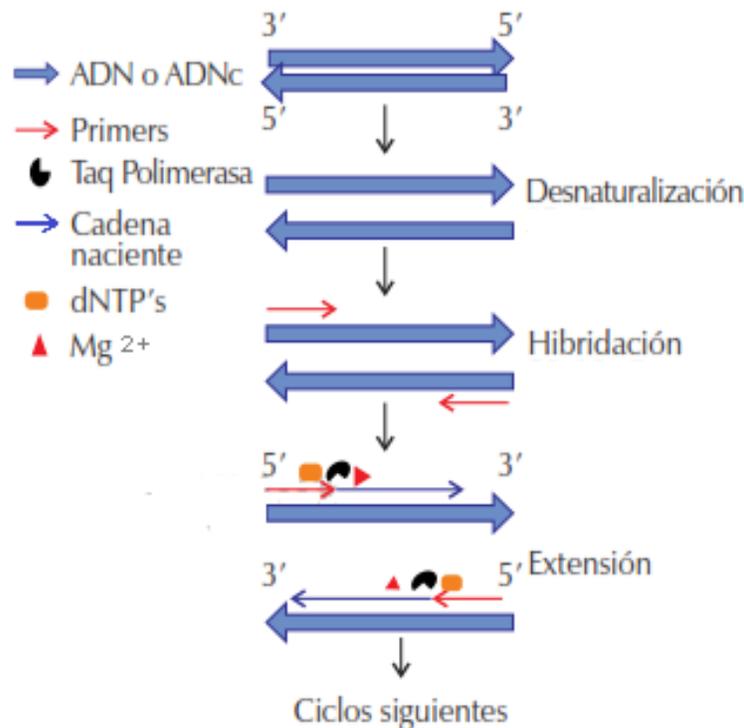


Figura 4. Diagrama de una reacción en cadena de la polimerasa. Modificado de Tamay de Dios *et al*, 2013.

Uno de los elementos más importantes en la reacción son los oligonucleótidos o primers pues son la clave para que la enzima polimerasa inicie la síntesis; se emplean dos oligonucleótidos, cada uno complementario a la cadena opuesta, es decir uno en dirección sentido (*Forward*, 5'-3') y otro en dirección antisentido (*Reverse*, 3'-5') complementario; están contruidos con la secuencia de bases que inicia y termina el gen de interés y tienen una extensión de 15 a 20 pares de bases y la cantidad de guaninas y citosinas (G-C) no debe ser más del 55% de la secuencia y no debe existir complementariedad entre ellos. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando así pequeños amplicones referidos como dímeros de primers, reduciendo la cantidad de oligonucleótidos disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Tamay de Dios, 2013; Bolívar *et al.*, 2014).

Así, las tres fases de la PCR representadas gráficamente se observan como cuatro: desnaturalización, línea basal; alineamiento o hibridación e inicio de la extensión, etapa exponencial; final de la extensión, comportamiento lineal; y mantenimiento, meseta. La línea basal es un paso muy corto en donde la amplificación es casi inexistente e indetectable, en esta etapa la doble cadena de templado se desenrolla (desnaturaliza) para promover la unión de la enzima polimerasa, se desarrolla a una temperatura de aproximadamente 95°C durante 20 a 30 segundos en un PCR típico pues el tiempo depende de la cantidad de G-C del templado; durante la fase exponencial es cuando la cinética de la reacción favorece la duplicación de los fragmentos, en esta etapa los oligonucleótidos se alinean al extremo 3' de la secuencia de templado correspondiente. Esta etapa se realiza a la temperatura de fusión (T_m) o de hibridación correspondiente a cada par de oligonucleótidos que está entre 50-60°C aproximadamente y comienza la extensión donde la enzima polimerasa comienza a producir nuevos productos agregando dNTPs complementarios y se lleva a cabo a la temperatura óptima a la que trabaja la enzima que puede ser de 68°C a 72°C; la fase linear se caracteriza por un desaceleramiento de la amplificación de productos por la desactivación de la polimerasa; finalmente en la meseta la reacción ha terminado y no hay acumulación de productos (Biaassoni y Raso, 2014; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La PCR tradicional detecta los productos de reacción en la última fase por lo que también es llamada *PCR punto final*. Es de importancia mencionar que cada reacción alcanza la meseta en distintos periodos de tiempo y se caracteriza por tener diferente cinética de reacción dependiendo del tipo de enzima polimerasa que se utilice y del programa de temperaturas que se programe en el termociclador. Para determinar la eficiencia de la PCR, los amplicones se someten a una electroforesis en gel de agarosa que consiste en la separación de moléculas a través de una matriz que se hace pasar por un campo eléctrico, así los productos se separan de acuerdo a su tamaño y su carga eléctrica (Tamay de Dios *et al.*, 2013). En el caso del ADN el grupo fosfato les proporciona carga negativa, por lo que

migran al polo positivo en la electroforesis. En el gel de agarosa se agrega además bromuro de etidio que se intercala en la doble cadena del ADN y cuando es excitado con la luz UV emite una señal que permite que se visualicen los productos en forma de bandas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)

Cuando la muestra de donde se parte para el análisis es ARN se requiere de un paso extra para el análisis de un gen de interés. Ya que el ARN es de una sola cadena y es sensible a la temperatura se lleva a cabo una transcripción reversa (RT por sus siglas en inglés) antes de hacer una amplificación por PCR (Cortazar *et al.*, 2004).

Esta técnica es popularmente usada para analizar expresión genética y puede realizarse esencialmente de dos maneras: un método involucra incluir el paso de la transcripción reversa dentro del mismo tubo de reacción que el PCR (RT-PCR de un solo paso); el segundo método requiere crear ADN complementario (ADNc) primero para después usarlo como templado para la PCR (RT-PCR de dos pasos) (Wacker y Godard, 2005). Además de qué método utilizar, se debe elegir si comenzar de una muestra de ARN total, ARN mensajero purificado por una selección de ARN mensajeros con cola de poli A, o ARN de alguna otra fuente como ARN viral o ARN ribosomal y en cualquiera de las tres se debe iniciar eliminando lo más que se pueda el ADN genómico pues podría ocasionar un falso positivo (Fig. 5; Bagasra y Hansen., 1997).

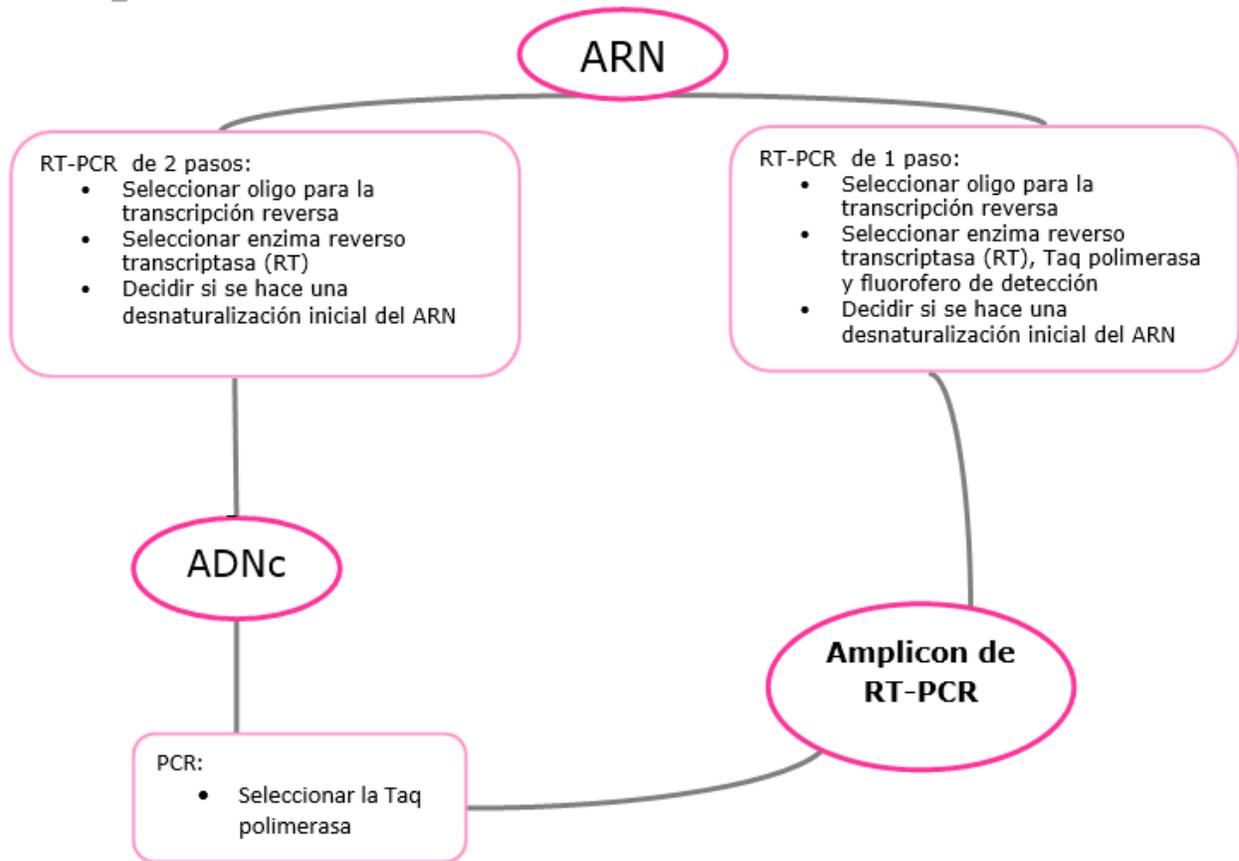


Figura 5. Esquema de decisiones para una RT-PCR de uno y dos pasos

Otra elección por hacer es el oligonucleótido a elegir, pues como en el PCR *punto final*, la señal clave de inicio de la formación de cadenas del DNA es la hibridación de los primers y en este caso al tener como templado cadenas de ARN se requiere que tengan ciertas características y además pueden ser primers para diferentes análisis: (a) un oligo(dT), para usar este tipo de primer hay que recordar que los ARNm de una sola cadena tienen un extremo de poli A, es decir una secuencia de adeninas en el extremo 3' final del ARN, por lo que un oligo (dT) se unirá a este extremo, propiciando que se transcriban los fragmentos de ARNm solamente; (b) un oligonucleótido de secuencia aleatoria (*random primer*) que como lo dice su nombre, son secuencias cortas con bases al azar que generalmente tienen solamente 6 pares de bases (pb) de longitud y se utilizan para amplificar genes que se encuentran muy distribuidos en el ARN; o un oligonucleótido con la secuencia

específica para hibridar con el gen de interés y es comúnmente el oligonucleótido antisentido que se utilizará para la PCR (Manual del RETRO script® Kit). La elección de componentes dependerá del propósito del análisis y/o las posibilidades del laboratorio.

Para cualquier caso los pasos de la transcripción reversa son: Un paso previo de desnaturalización del ARN para eliminar la estructura secundaria del ARN y evitar las horquillas, seguido de la unión del oligonucleótido a la secuencia de ARN específico; posteriormente la reverso transcriptasa cataliza la extensión del oligonucleótido incorporando nucleótidos complementarios formando una cadena de ADNc; el último paso de la transcripción reversa es la desactivación de la enzima a 92°C, misma temperatura que también separa el RNA sobrante del ADNc formado por medio de la actividad de ribonucleasa H que también tiene la enzima (Cortazar *et al.*, 2004). Es importante mencionar que todas las enzimas reverso transcriptasas tienen al menos tres actividades: transcripción reversa, actividad de ADN polimerasa y actividad de ribonucleasa H específica (Bagasra y Hansen, 1997).

En esta técnica se aprovecha el hecho de que algunos microorganismos llamados retrovirus contienen una enzima llamada reverso transcriptasa que puede sintetizar cadenas de ADN a partir de ARN. Esta enzima fue aislada y clonada de varios retrovirus para poder utilizarla en procedimientos en el laboratorio, y dependiendo del microorganismo del que se aisló serán las condiciones de reacción de la misma (Bagasra y Hansen, 1997).

Una vez obtenido el ADNc se puede realizar una dilución o tomar directamente un volumen determinado y usarlo como templado para una PCR punto final. En el caso de utilizar una metodología de un solo paso, directamente se procede a realizar una amplificación de ADNc usando las enzimas y el termociclador adecuados, y de la misma manera hacer correr los amplicones en un gel de agarosa por electroforesis (Manual del RETROscript® Kit).

2.3.1.3 Transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El objetivo de la PCR cuantitativa, o tiempo real es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante reporteros fluorescentes en la reacción; el fundamento es el mismo de la PCR punto final solo que la forma en que se detectan y analizan los productos es diferente. La detección de los productos sucede en cada ciclo de la reacción. Además, que si se usa ADN genómico como templado se denomina qPCR (PCR cuantitativo, por sus siglas en inglés), si por el contrario utilizamos muestras de ARN de principio para obtener primero ADNc y usarlo como templado para una PCR entonces nos referimos a una RT-qPCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Esta técnica fue desarrollada por la necesidad de cuantificar las diferencias de expresión del ARNm al tener pequeñas cantidades de muestra disponibles. Los primeros que sentaron las bases para esta técnica fueron Higuchi y colaboradores en 1992, quienes videograbaron en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR bajo luz UV (Higuchi *et al.*, 1992). Actualmente la detección y cuantificación de los productos es a través de un compuesto reportero fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción; esto mediante el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección en tiempo real (Cortazar *et al.*, 2004). Los oligonucleótidos para esta técnica deben estar diseñados para garantizar una alta especificidad y que generen amplicones de entre 150-200 pb, pues si son más grandes la eficiencia de la reacción se ve comprometida (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Las técnicas de detección pueden ser específicas o no específicas. Los segundos se basan en el uso de moléculas intercalantes en el ADN de doble cadena que al ser oxidados generan una señal fluorescente como el SYBR green™ que es el reactivo más usado (Fig. 6); la desventaja de esta molécula es que se une a cualquier doble cadena de oligonucleótidos incluyendo dímeros de primers. Para evitar la

imprecisión de las mediciones debido a este fenómeno se realizan curvas estándar de concentración conocida de templado y las denominadas *curvas melting* o *curvas de disociación* con el objetivo de evaluar si se formó un producto único o si se formaron dímeros de primer (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Cortazar *et al.*, 2004).

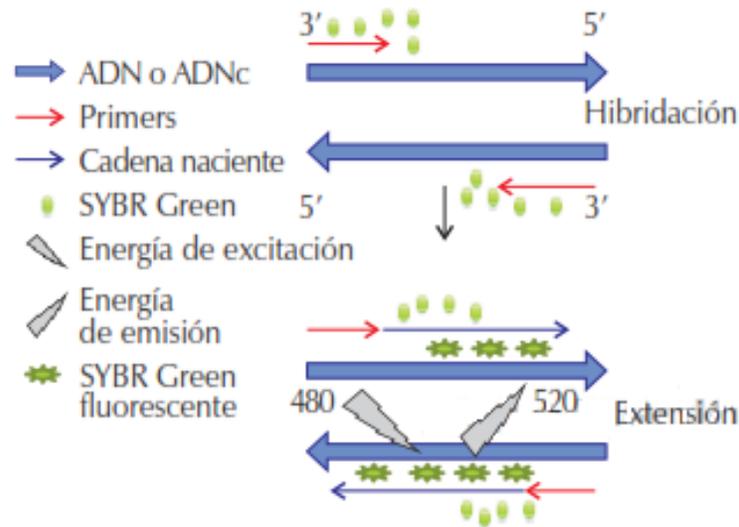


Figura 6. Diagrama de una reacción en cadena de la polimerasa usando SYBR Green™ como método de detección, la molécula es excitada a una longitud de onda de 480 nm, y emite la señal a 520 nm. Modificado de Tamay de Dios *et al.*, 2013.

Los métodos específicos tienen como fundamento el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET por sus siglas en inglés) que consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o *quencher*; de esta manera existen dos técnicas: sondas hidrolizadas o sondas de hibridación (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Las sondas basadas en hidrólisis consisten en que el reportero y el *quencher* se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride con su secuencia blanco, pues cuando la polimerasa comienza su actividad exonucleasa 5'-3' propicia que se rompa esta unión y la señal de fluorescencia sea emitida; es decir que mientras no haya unión de la sonda con su blanco no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia, un ejemplo es el sistema de sondas TaqMan™ (Fig. 7; Cortazar *et al.*, 2004).

En las sondas de hibridación, el reportero y el *quencher*, ambos fluorescentes, están unidos cada uno a una sonda que al hibridar cada una con su secuencia blanco el reportero es excitado y la señal es transferida al *quencher* generando una fluorescencia mayor, un ejemplo es el sistema de Molecular Beacons™ (Fig. 8; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

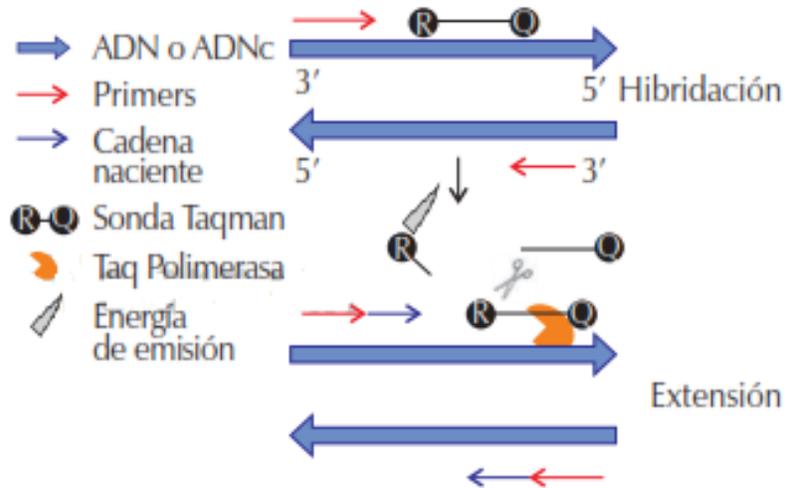


Figura 7. Diagrama de una reacción en cadena de la polimerasa usando sondas TaqMan™ como método de detección, un método específico que utiliza el principio de FRET. Modificado de Tamay de Dios *et al.*, 2013.

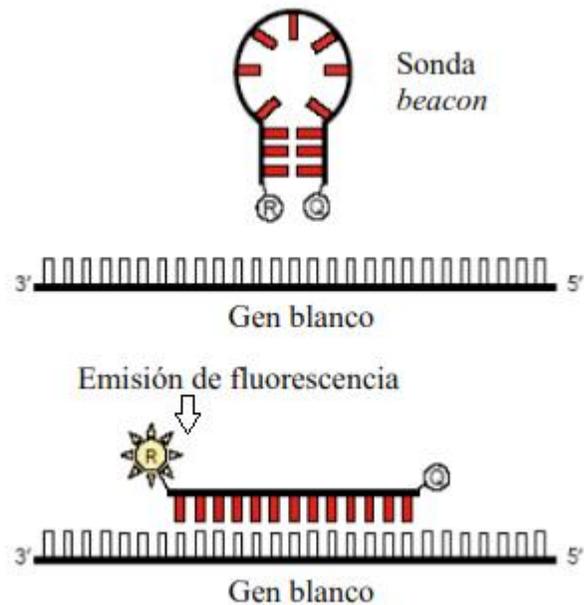


Figura 8. Diagrama del método de detección con Molecular Beacons™ el cual tiene una estructura tallo-asa que al hibridar provoca la separación del receptor y de *Iquencher* resultando una emisión de fluorescencia. Modificado de Mocellín *et al.*, 2003.

Así en cualquiera de los métodos antes descritos el aumento de fluorescencia se relaciona directamente con el número de copias de la molécula que está siendo amplificada, presentes inicialmente en la reacción; a menos número de copias presentes inicialmente, menor el número de ciclos necesarios para detectar fluorescencia (Greif, 2007). Fue en 1997 cuando surgieron los primeros equipos de PCR cuantitativo producidos por Applied Biosystems® y desde entonces se han lanzado varios sistemas de detección por diferentes empresas siendo uno de los más comunes el sistema RotorGeneQ™ producido por Qiagen®, y en estos equipos se requiere básicamente que se pueda excitar la molécula fluorescente, capturar la señal de emisión del mismo y con eso realizar un análisis cuantitativo generando una serie de gráficas que muestran el progreso de la reacción (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Las reacciones son caracterizadas en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta después de un número fijo de ciclos, cuanto más alto es el número de copias blanco, más pronto se observa el

aumento significativo en la fluorescencia. Una gráfica de amplificación presenta la señal de fluorescencia en el eje de las abscisas contra el número de ciclos en las ordenadas; en los primeros ciclos lo que se observa es una señal de fluorescencia basal (línea de fondo) y conforme aumentan los ciclos (Fig. 9), esta señal de fluorescencia aumenta, es decir se empieza a acumular el producto amplificado y se adquieren los datos cuando la amplificación está en la fase exponencial (Greif, 2007). Se identifica el número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto a la línea basal o ruido de fondo; este ciclo es el umbral, denominado Ct (*Thresholdcycle*), el cual, es inversamente proporcional al número de copias del ADN blanco, es decir a mayor concentración de templado, menor Ct (Cortazar *et al.*, 2004).

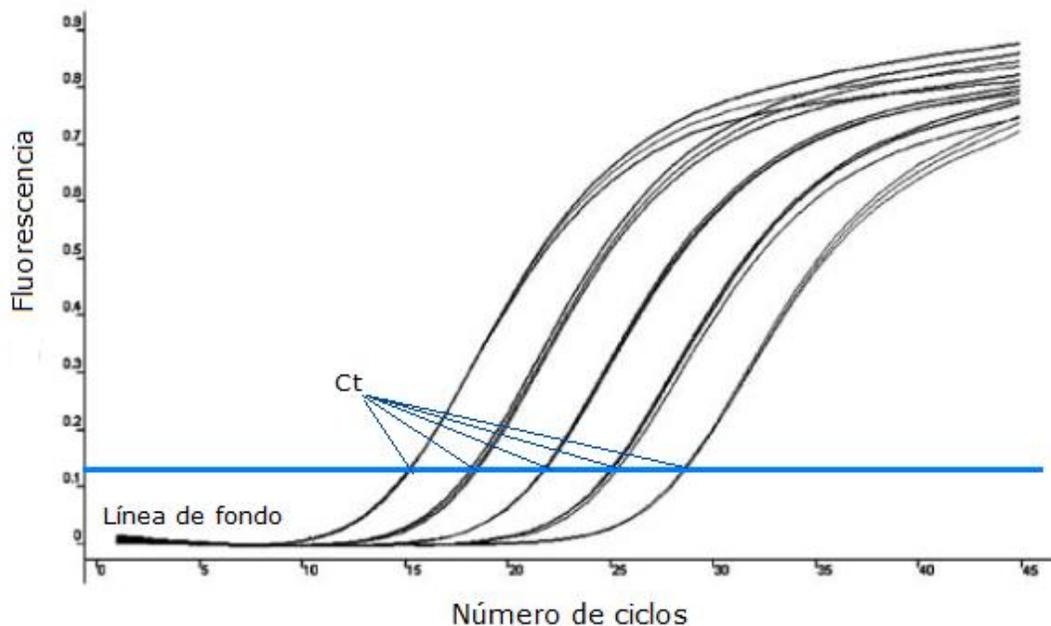


Figura 9. Gráfica de amplificación de una RT-PCR cuantitativa en escala logarítmica. Modificado de Wacker *et al.*, 2005.

Con esto es posible elegir el tipo de cuantificación que se usará: la absoluta o la relativa; la cuantificación absoluta requiere de la construcción de una curva

estándar a partir de concentraciones conocidas del blanco que se va a amplificar (Fig. 10), se aprovecha la relación entre el ciclo umbral y la concentración del molde presente en las muestras o los estándares. Estas curvas estándar son bastante reproducibles sin embargo hay que asegurarse de la calidad de los estándares que utilizamos; el rango de estándares que se establecen en la curva puede llegar hasta nueve órdenes de magnitud (Greif, 2007).

Cuando hablamos de cuantificación relativa comúnmente se utiliza para estudiar los cambios en la expresión genética entre diferentes muestras y el resultado se expresa relativo a un gen constitutivo o un control interno.

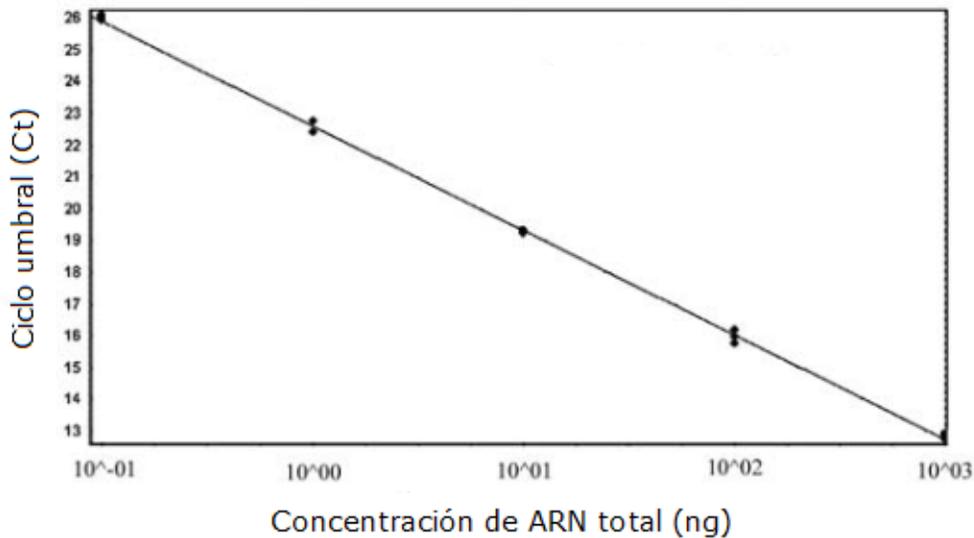


Figura 10. Gráfica de una curva estándar en escala lineal utilizando diluciones seriadas de ARN total para una cuantificación absoluta. Modificado de Wacker *et al.*, 2005.

Adicional a esto, los equipos de RT-qPCR muestran gráficas llamadas curvas de desnaturalización o curvas *melting* (Fig. 11) que se pueden realizar cuando se utilizan agentes intercalantes; se realizan al final de la reacción y se desarrollan aumentando la temperatura gradualmente, de esta manera los productos que se encuentran hibridados y con una intensidad de fluorescencia alta comienzan a

desnaturalizarse provocando que el agente intercalante se separen de su blanco provocando una disminución de la señal de fluorescencia; cuando hay un punto de inflexión en la curva, corresponde al punto de desnaturalización o temperatura de melting (T_m); el objetivo de esta curva es distinguir la presencia de dímeros de primer o productos inespecíficos (Greif, 2007).

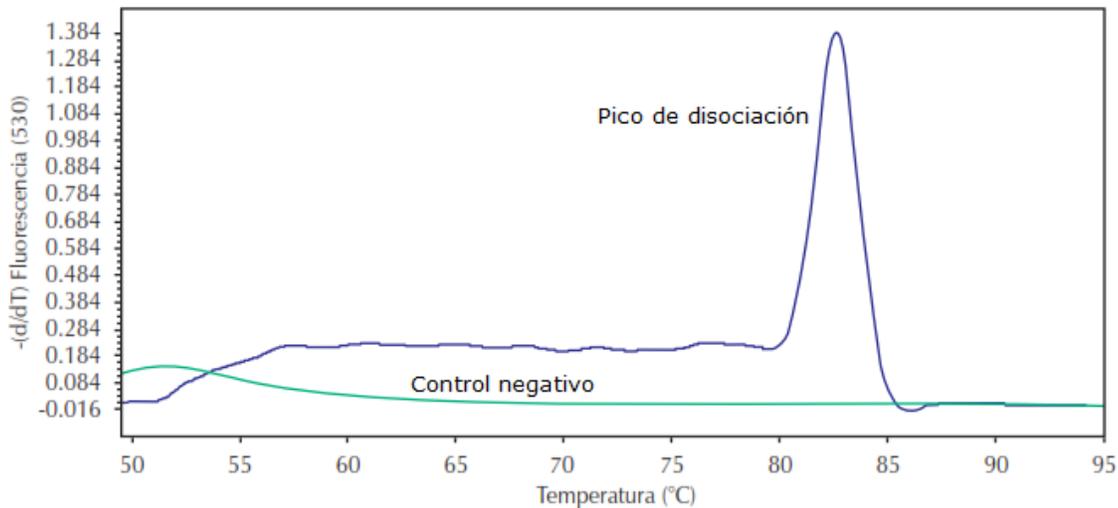


Figura 11. Grafica de disociación de un amplicón de RT-qPCR usando la derivada negativa de la señal de fluorescencia. El amplicón muestra un punto de inflexión en la T_m del producto a diferencia del control negativo cuyo comportamiento es constante. Modificado de Tamay de Dios *et al.*, 2013.

2.3.2 Relevancia de la estandarización de la técnica

El principio de cuantificación mediante la técnica de RT-qPCR parece muy simple: mientras más copias de templado tenemos, menor número de ciclos de PCR serán necesarios para alcanzar el nivel umbral. Pero en la práctica, la relación entre el número de copias del templado y el C_t no es tan sencilla. En primera instancia, lograr cuantificaciones reproducibles a partir de templados que se encuentran poco abundantes en una mezcla compleja de ácidos nucleicos constituye muchas veces una tarea problemática (efecto Monte Carlo, Karrer *et al.*, 1995). En segundo lugar, se debe tomar en cuenta que las muestras biológicas pueden tener inhibidores de las enzimas y en tercer lugar es necesario aplicar una estrategia de normalización

que permita controlar la cantidad de templado inicial, pues al partir de muestras de ARN que son más sensibles se debe asegurar la calidad e integridad de las muestras; las variaciones en la eficiencia y las diferencias entre muestras también son factores de importancia.

Como se describió anteriormente, las curvas *melting* sirven para comprobar que lo que se ha amplificado sea un producto único y así la cuantificación sea confiable, esto quiere decir que los oligonucleótidos deben hibridar en su gran mayoría con sólo un segmento del genoma, por lo que deben estar cuidadosamente diseñados y una manera de asegurarse de esto es realizar un PCR *punto final* a manera de estandarización pues además, el amplicón generado en esta primera optimización se utilizará para elaborar las curvas estándar si lo que se decide es realizar una cuantificación absoluta. Así la optimización del PCR punto final para poder hacer un RT-qPCR cobra importancia (Raymaekers *et al.*, 2009).

Para ello experimentalmente se debe empezar con las condiciones que se hayan descrito para los oligonucleótidos que se estén utilizando; preparar los reactivos de la reacción adecuadamente, se debe hacer una mezcla de PCR lo más homogénea posible; ejecutar un programa de temperaturas y ciclos de acuerdo a la polimerasa que se esté utilizando incluyendo la temperatura de alineamiento teórica y dependiendo del resultado modificar los factores empezando por los de mayor a menor influencia en la reacción (Espinosa, 2007).

a) *El diseño de los oligonucleótidos y su concentración en la reacción*

Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo. La concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0.1-0.5 μM ; deben carecer de estructuras secundarias y de complementariedad entre sí; tener una T_m similar o no diferir de más de 5 grados (Bolívar *et al.*, 2014). Se debe tomar en cuenta el objetivo de la amplificación pues si se diseñan oligonucleótidos para una posterior clonación, estos deben flanquear la totalidad de la secuencia codificante e incluso su región promotora, si se diseñan para una cuantificación de la expresión de un gen, como el RT-qPCR la longitud del fragmento a amplificar es de 150-200

pb. Mientras el fragmento a amplificar sea más corto, mayor será la eficiencia de la amplificación y mientras mayor sea la concentración de los oligonucleótidos, la eficiencia aumentará también, sin embargo, si la cantidad de oligonucleótidos disponibles está en exceso se corre el riesgo de formar dímeros de primers o que sean inhibidores de la reacción (Ausubel *et al.*, 2003). Para el diseño de los oligonucleótidos existen variedad de programas computacionales que detectan la secuencia de bases que cumplan con los requisitos necesarios y así garantizar la eficiencia de la reacción en cuanto a oligonucleótidos se refiera.

b) Enzima polimerasa

La cantidad y el tipo de enzima que se utilice brindan los parámetros por los cuales se debe comenzar a estandarizar la técnica para un análisis cuantitativo. Se encuentran variedad de enzimas termoestables aisladas de microorganismos termófilos cuya temperatura óptima de catálisis donde pueden llegar a incorporar hasta 100 nucleótidos por segundo es entre 68-72°C dependiendo de la naturaleza de cada una y en la actualidad son versiones recombinantes de las silvestres o incluso mejoradas por ingeniería genética (Bolívar *et al.*, 2014).

c) La temperatura de alineamiento (T_m)

Recordemos que se trata de la temperatura a la cual los oligonucleótidos hibridan con la secuencia blanco; si la temperatura es muy baja se obtendrán productos menos específicos pues los oligonucleótidos hibridarán con otras secuencias, así mientras se va aumentando la temperatura la especificidad será directamente proporcional hasta llegar a la temperatura óptima; una vez rebasada dicha temperatura la amplificación será nula pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios blanco será muy inestable y la enzima no podrá sintetizar los fragmentos (Espinosa,2007). La T_m teórica para los oligonucleótidos no siempre es la óptima para la reacción ya que también los iones y otras sustancias presentes en la reacción pueden influir en la forma en que se unen los oligonucleótidos. Por ello la mejor forma de encontrar la temperatura óptima es experimentalmente lo que puede significar un gasto de tiempo importante, sin embargo, en la actualidad existen equipos capaces de hacer gradientes de temperaturas en los pasos de la

reacción, lo que facilita el encontrar la T_m óptima que permita amplificar un solo producto de manera abundante (Ausubel *et al.*, 2003).

d) Iones divalentes, monovalentes y potenciadores

La reacción de PCR al ser de tipo enzimático requiere de cofactores, los cuales son iones divalentes como Mg^{2+} en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) en una concentración que oscila entre 0.5-2.5 mM. Entre los iones monovalentes, el más empleado es el potasio (K) en forma de cloruro de potasio (KCl); estos cofactores son de suma importancia y deben estar en la concentración adecuada, existen en el mercado enzimas polimerasas que se venden con su solución tampón (buffer) que ya contiene la concentración de iones óptima para el funcionamiento de la enzima, sin embargo, no es en todos los casos por lo que la concentración debe optimizarse para cada ensayo. Concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que en exceso se producen amplificaciones inespecíficas (Espinosa, 2007). El uso de adyuvantes también es significativo en la reacción pues aumentarán la especificidad y fidelidad, entre los más empleados están el dimetilsulfóxido (DMSO) para disminuir las estructuras secundarias del ADN, tensoactivos como el Tween 20 o el Tritón X-100 que estabilizan la enzima y el polietilenglicol (PEG), el glicerol, la formamida y la seroalbúmina bovina (Bolívar *et al.*, 2014). Adicionalmente se ha descrito la utilidad de ciertos disolventes como la betaína que pueden actuar como agentes desestabilizantes reduciendo la temperatura de fusión de secuencias ricas en G-C y aumentando la resistencia de la enzima polimerasa a la desnaturalización (Cha y Thilly, 1993). La concentración y volumen de estos potenciadores se debe determinar experimentalmente.

e) Templado

Si hablamos de una PCR, el templado debe ser ADN o ADNc; en cualquiera de los casos contendrá la región del gen que se quiere amplificar. La concentración requerida en la reacción puede llegar a ser de 1ng aunque la concentración más común es de 100 ng; se debe tener cuidado que el método de extracción utilizado no haya dejado contaminantes que pudieran inhibir la reacción como algún tipo de detergente, fenol o cloroformo así como también asegurarse que el ADN no esté

degradado, para esto ya existen en el mercado sistemas especializados incluso por especie que extraen ADN con la garantía de que tendrá una buena calidad (Ausubel *et al.*, 2003).

El templado también puede ser ARN total o ARN mensajero, dependiendo de su tratamiento previo, y tendrá que pasar por una transcripción reversa para obtener ADNc y poder ejecutar la RT-qPCR (Bolívar *et al.*, 2014). Para ello cobra importancia cuantificar el ARN extraído para poder comparar muestras y analizar con ello la expresión genética; existen diferentes métodos de cuantificación de ácidos nucleicos que tienen como fundamento la espectrometría, análisis de microfluídos, geles de electroforesis capilar o detección mediante tinción fluorescente (Bustin *et al.*, 2009). Otro aspecto importante es eliminar la contaminación de ADN genómico en las muestras pues podría generar falsos positivos, para ello se sugiere tratar las muestras con DNAsa; de igual manera se debe comprobar la calidad y la integridad de las muestras pues se debe recordar que el ARN es muy sensible a degradación en el ambiente por la gran cantidad y la resistencia que tienen las RNAsas naturalmente (Doma y Parker, 2007), y por lo tanto esto puede ocasionar que no se realice una cuantificación y análisis confiable y eficiente.

2.3.3 Análisis de la expresión genética como aplicación del RT-qPCR

Es bien sabido que el ADN sirve de base de datos primordial de información genética para cualquier organismo y de la misma manera el ARN sirve de transcripto de trabajo de la información y es por las secuencias de ARN que las proteínas pueden ser sintetizadas en los ribosomas; las moléculas de ARN son más pequeñas que las de ADN, se mueven libremente en la célula y tienden a ser degradadas (Bagasra y Hansen, 1997), se sintetizan en diferentes etapas del ciclo de vida de un organismo y son diferentes en cantidad e identidad dependiendo de las necesidades de la célula.

Hoy en día la transcripción reversa acoplada a PCR cuantitativo es el método más popular para comparar niveles de expresión genética en muestras biológicas (Hellemans y Vandesompele, 2014), pues se puede tomar una muestra de ARN en cualquier etapa del crecimiento de un organismo y sabiendo la cantidad de ARN del que se parte y posteriormente cuantificar la amplificación de cierto gen, indirectamente se está determinando la cantidad de ARNm que está siendo expresada en dicha etapa del crecimiento (Bustin *et al.*, 2009); es por eso que el RT-qPCR es considerado el método de excelencia para la medición precisa, sensible y rápida de la expresión genética. Para obtener resultados significativos y confiables se deben considerar factores críticos que afectan la técnica: La adquisición, manipulación y almacenamiento de las muestras, la extracción y purificación del ARN, el paso de la transcripción reversa, la reacción de PCR cuantitativa en sí y el análisis de datos correcto (Raymaekers *et al.*, 2009). Para ello se debe incluir en cada experimento de RT-qPCR tres controles que permitan garantizar la validez del ensayo: un control sin añadir la transcriptasa reversa al coctel de reacción (-RT) con el objetivo de detectar contaminación con ADN genómico en la muestra templado de ARN; un control sin templado (NTC) que nos permitirá detectar alguna contaminación por los reactivos utilizados o la formación de dímeros de primers; y por último, un control positivo que contendrá ADN genómico del modelo de estudio en lugar de ARN (Bustin *et al.*, 2009).

En cuanto al análisis de datos finales se puede optar por la cuantificación absoluta, utilizando una curva estándar del mismo gen, o la cuantificación relativa que utiliza un gen de referencia, y en este caso los datos se expresan como una proporción de la expresión del gen de referencia o bien pueden ser analizados por un modelo matemático como el denominado $2^{-\Delta\Delta Cq}$ que supone que la eficiencia de amplificación de los genes de referencia y los genes blanco son similares y cercanas a 100% (Livak y Schmittgen, 2001), o en el caso de que se sepa que las eficiencias de amplificación son diferentes está el método de Pfaffl (2001).

3 JUSTIFICACIÓN

El interés de la humanidad por mejorar sus condiciones de vida hace que tome de la naturaleza los recursos necesarios que su intelecto le permite modificar y explotar a manera de mejora; un ejemplo son los medicamentos y en específico los antibióticos; aislados de microorganismos que los utilizan como defensa natural y que en la actualidad están presentes en nuestras vidas en distintas formas farmacéuticas. Todo este avance no podría ser posible sin la investigación científica básica del metabolismo de las especies, es por eso que remontarse al origen de las aplicaciones biotecnológicas no es sino esencial.

Uno de los géneros que más nos ha aportado en este sentido es el de *Streptomyces*, pues además de antibióticos produce variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica y muchos de éstos provienen de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sin embargo el conocimiento de las características y la regulación de sus enzimas es muy escasa.

En el laboratorio de la Dra. Flores ya se han caracterizado la regulación y la actividad de alguno de los genes de las enzimas isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa en *Streptomyces coelicolor*; sin embargo quedan sin estudiar las demás enzimas que se ha descrito que tienen más de un solo gen codificante. Por ello el interés de este trabajo es iniciar con los parámetros de estudio de la expresión, regulación y actividad de estas enzimas estandarizando como primer paso las condiciones para aplicar la técnica RT-qPCR utilizada para en la cuantificación de la expresión genética.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Estandarizar las condiciones de amplificación por PCR punto final para los múltiples genes que codifican para las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos en *Streptomyces coelicolor*M145 para posteriormente realizar el RT-qPCR.

4.2 Particular

- Diseñar los oligonucleótidos de acuerdo a lo reportado por Green y Sambrook (2012).
- Evaluar diferentes temperaturas de alineamiento, concentración de ADN y concentración de oligonucleótidos en cada gen y obtener las condiciones óptimas de amplificación por PCR.
- Realizar ensayos semicuantitativos de expresión de los genes a través de RT-PCR en muestras de ARN de 24 h y 72 h de crecimiento en glucosa al 1% tomando como referencia al gen que codifica para ARNr16S.
- Realizar un análisis semicuantitativo de la expresión por RT-PCR de los genes del TCA de *S. coelicolor* a las 24 h y 72 h de crecimiento en medio mínimo con glucosa al 1%.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Modelo de estudio

Se utilizó el microorganismo *Streptomycescoelicolor*M145.

5.2 Diseño de oligonucleótidos

Con base en la secuencia del genoma completo de *S. coelicolor*M145descrito en 2002(Bentley *et al.*, 2002) y utilizando la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) se identificaron las secuencias codificantes de los genes a estudiar. De este modo y con ayuda del programa DNAMAN® y Primer 3® (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que cumplieran con las siguientes características:

- Una secuencia de entre 18 y 20 nucleótidos.
- Un porcentaje de guaninas y citocinas de entre 55% y 60%.
- Que su secuencia no propiciara alineamiento entre los oligonucleótidos sentido y el antisentido.
- Que se obtuviera con ellos un fragmento de amplificación de 150-200 pb.
- Que las temperaturas de alineamiento fueran entre 60°C y 64°C y que entre cada par fueran muy cercanas.

5.3 Ensayos de PCR punto final

De acuerdo a la temperatura de alineamiento (T_m)descritas por el fabricante se decidió realizar los conjuntos de amplificación mostrados en la Tabla 2:

Tabla 2. Lista de genes agrupados según su T_m teórica.

Temperatura de alineamiento	Genes
58°C	SCO4388/SCO0884/ SCO2180/ SCO4919
60°C	SCO6586/ SCO4855/ SCO5106/ SCO7109/ SCO1286/ SCO2181
61°C	SCO4594/ SCO4595/ SCO4808/ SCO4809/ SCO0922/ SCO5999/ SCO2736/ SCO5832/ SCO7123
62°C	SCO5042/ SCO5831

Se realizaron mezclas de reacción en un volumen de 20 µL usando la enzima polimerasa DreamTaq™Green PCR Master Mix (2X) en las concentraciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de reacción utilizada en los ensayos de PCR punto final.

Reactivo	Concentración final
DreamTaq™Green PCR Master Mix (2X)	1X
Oligo sentido	0.5 µM
Oligo antisentido	0.5 µM
ADN <i>S. coelicolor</i> WT	100 ng
DMSO	1 µL
H₂O Grado Biología Molecular (GBM)	Cbp 20 µL

Y se programó el termociclador BioRad modelo T100® con el esquema de temperaturas mostrado en la Tabla 4.

Tabla 4. Programa de temperaturas y ciclos utilizados en los ensayos de PCR punto final.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg	30
Alineamiento	58°C - 62°C	30 seg	30
Extensión	72°C	1 min	30
Extensión final	72 °C	5 min	1
Mantenimiento	4 °C	∞	1

5.4 Estandarización de las condiciones de PCR

Una vez realizadas las amplificaciones de los genes, los amplicones se corrieron en una electroforesis en gel de 1% de agarosa/amortiguador TAE a 100 volts y de acuerdo a los resultados obtenidos en intensidad y especificidad de banda hubo genes a los cuales se les tuvo que modificar las condiciones de temperatura de alineamiento y concentración de oligonucleótidos.

Para modificar la temperatura de alineamiento se realizó una curva de temperatura de 58°C a 65°C de cada gen que resultara inespecífico, y para modificar la concentración de oligonucleótidos se incrementó de 0.5µM a 1.0µM a cada gen que resultara con baja intensidad de banda.

5.5 Ensayos de RT PCR cualitativo en muestras de ARN obtenido a las 24h y 72h de crecimiento.

Utilizando muestras de ARN extraído de *S. coelicolor* crecido en medio mínimo con glucosa al 1% a las 24 y 72 horas se procedió a obtener ADN complementario de la secuencia específica de cada gen a estudiar y con ello realizar la PCR punto final. Se utilizó la secuencia de la subunidad 16S del ARN ribosomal del mismo microorganismo como control interno.

La reacción de RT se inició con una desnaturalización del ARN con el objetivo de destruir la estructura secundaria y evitar horquillas, utilizando la mezcla de reacción presentada en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción utilizada en los ensayos de desnaturalización inicial de la RT-PCR.

COMPONENTE	CONC. FINAL
RNA total	25 ng
Oligo antisentido	0.0125 µg
H₂O GBM	Cbp 15 µL

Se incubó por 5 minutos a 70°C, posteriormente a la misma mezcla de reacción se le añadieron los componentes mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción utilizada en los ensayos de RT-PCR.

COMPONENTE	CONC. FINAL
Buffer RT	1X
dNTPs	10 mM
M-MLV RT (Promega®)	200 U
Agua GBM	Cbp 25 µL

Se incubó por 60 minutos a 42°C y posteriormente 10 minutos a 92°C para inactivar a la enzima retrotranscriptasa.

Posteriormente, se utilizaron 2µL del ADN complementario obtenido para realizar las reacciones de PCR punto final de acuerdo a las temperaturas de alineamiento y concentración de los componentes anteriormente estandarizados para cada gen descritos en el inciso 4. Se realizaron controles negativos de PCR sin transcriptasa reversa para descartar contaminación con ADN genómico y controles positivos de PCR utilizando DNA genómico como templado amplificando el gen que usamos de referencia (subunidad 16S del ARN ribosomal). Los amplicones resultantes se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en amortiguador TAE 1X a 100 Volts en una cámara horizontal marca Hoefer®.

6 RESULTADOS

6.1 Oligonucleótidos diseñados

Los oligonucleótidos diseñados, seleccionados y fabricados por Invitrogen® que se utilizaron este trabajo se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes del TCA de *Streptomyces coelicolor* M145.

SCO	GEN	SECUENCIA	%GC	T _m	Tamaño del amplicón
		(5'-3')			
2736 Fw	Citrato sintasa 1	ACC TTC TAC CAG GAC AGC CAC	57	61°C	162 pb
2736 Rv		GTC ATG CGC AGG AAG TTC TC	55	61°C	
5831 Fw	Citrato sintasa 2	CTC CTCGTC GAC CAC GAT CT	60	63°C	165 pb
5831 Rv		GAG AAC CTC CAGCAG CAT CC	60	62°C	
5832 Fw	Citrato sintasa 3	CGA ACT GCA CAC CAA CGT C	58	61°C	155 pb
5832 Rv		GAC GGA TGA TCT TGG AGT CG	55	61°C	
4388 Fw	Citrato sintasa 4	ATG AAC GCC TCC ACC TTC	56	59°C	190 pb
4388 Rv		GTC GAG GGT CTT CTT GAC G	58	58°C	
5999 Fw	Aconitasa	ACT TCA ACA GCT ACG GCT CG	55	61°C	179 pb
5999 Rv		CTC GAT GTA GTT GCG GGA GG	60	63°C	
1268 Fw	α KGDH-1 E2	ACC ATC GCC TAC CTC TTC G	58	60°C	263 pb

1268 Rv		TGC CGT TTG GAC AGT TGG	56	62°C	
2181 Fw	α KGDH-1 E2	CGT CAC CCG TCT GAT GAA G	58	60°C	175 pb
2181 Rv		GTC GAA GTA GGT GAT GGT CCC	57	61°C	
7123 Fw	α KGDH-1 E2	TCA AGA AGG CGC TGT TGG	56	61°C	199 pb
7123 Rv		TCG TTG ATC CGA GCG TTG	56	62°C	
0884 Fw	α KGDH-1 E3	ACG AGA TCC TCT TCG CCA	56	59°C	183pb
0884 Rv		GTA CTT GCC CTG ATG GGT G	58	59°C	
2180 Fw	α KGDH-1 E3	CTC CCG CAA GAT CAC CTA C	58	58°C	174 pb
2180 Rv		AGG AGA TGA TCCGGT TGC	56	59°C	
4919 Fw	α KGDH-1 E3	CGG CTT CGT CAA GAT CTT C	53	59°C	153 pb
4919 Rv		TAC ACG GTG AAG GCG TTG	56	59°C	
4594 Fw	α KGDH-2	CCT CAA GGA CAA ACA GCAGG	55	61°C	157 pb
4594 Rv		GAT GTC TGC TTC GTT GTC CG	55	62°C	
4595 Fw	α KGDH-2 Subunidad β	CGA GCT GTC GAA GCA CAA G	58	61°C	153 pb
4595 Rv		ATC GTC TCC GAC TTG AGC G	58	62°C	

4808 Fw	Succinil-CoA sintetasa C1 Subunidad β	AAG TCA TCG ACA CGC CTG AG	55	61°C	197 pb
4808 Rv		CAT CAC CTT GTG GAC CGT G	58	61°C	
4809 Fw	Succinil-CoA sintetasa Subunidad α	CCG GAG AAG TTC ACC AAG G	58	61°C	200 pb
4809 Rv		ATG ATG CCG ACG TTG GAC	56	61°C	
6586 Fw	Succinil-CoA sintetasa Subunidad α -2	ATC CCG ACA CCG AAC TGA	56	60°C	210pb
6586 Rv		ACT CCA GCG CCT CCTTCTT	58	61°C	
0922 Fw	Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S	AAC CAC CTG AAC GTC CTG C	58	61°C	174 pb
0922 Rv		CCA CTC CTT GTT CAT GCT GG	55	62°C	
4855 Fw	Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S-2	GAC CAA GTG CAT CCT GTG C	58	60°C	194 pb
4855 Rv		AGTTGA AGG TCG TACGGCAG	55	60°C	
5106 Fw	Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S-3	CCA CGA GAA CAA ACC C	58	60°C	201pb
5106 Rv		TTG TCC GTG ATC CTG ATG C	53	61°C	
7109 Fw	Succinato deshidrogenasa Subunidad de flavoproteína	TGA TCG AAC TCC TCG TCT ACG	52	60°C	193 pb
7109 Rv		TGC TCG GTC ATG GTG TTG	56	60°C	
5042 Fw	Fumarasa Clase II	GTC CTC GAT CCA CAT CGC C	63	64°C	178 pb

5042 Rv		GTA ACC GCC GAA CTC CTG G	63	63°C	
r09 Rv	ARNr 16S	GAT CTC CGT TCG GGT TGA GG	60	64°C	177pb
r09 Fw		TTG CAT GTG TTA AGC ACG CC	60	63°C	

6.2 Ensayos de PCR y estandarización de las condiciones para la amplificación.

Tomando en cuenta las temperaturas de alineamiento descritas por el fabricante (Invitrogen®) se decidió realizar la amplificación de los fragmentos correspondientes a cada uno de los genes seleccionados por PCR punto final agrupando aquellos que tenían una temperatura similar en la misma corrida. Iniciamos con un grupo de genes que alineaban a 58°C. Los resultados se presentan en la Figura 12.

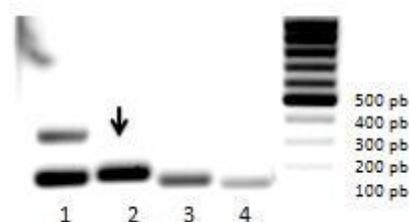


Figura 12. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO0848 (carril 1), SCO4388 (carril 2), SCO2180 (carril 3) y SCO4919 (carril 4) en agarosa 1% y buffer TAE a 100 V por 60 min.

Como se puede observar solamente amplificó una banda del SCO4388, que además de ser única y del tamaño esperado tenía una buena intensidad.

Ya que el SCO0848 resultó con una banda inespecífica, se realizó una curva de temperaturas en la cual la temperatura que presentó una única banda con una buena intensidad fue a 65°C, la cual se tomó como la temperatura óptima de amplificación para ese gen. Los productos de amplificación obtenidos en la curva de temperatura se muestran en la Figura 13.

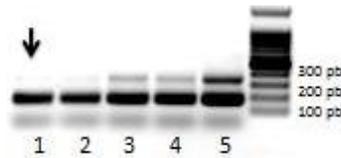


Figura 13. Separación de los amplicones obtenidos del SCO0848 por PCR punto final en curva de temperatura de alineamiento a 65°C (Carril 1), 64.5°C (Carril 2), 63.6°C (Carril 3), 62.3°C (Carril 4) y 60.7°C (Carril 5) en agarosa 1% en buffer TAE a 100V por 60 min.

Para los SCO2180 y SCO4919 (Fig. 12) que tenían una intensidad baja de amplificación se intentó aumentar a 60°C la temperatura de alineamiento para mejorar la amplificación. Este incremento en la temperatura resultó favorable para el SCO2180, sin embargo, para el SCO4919 no fue suficiente (Fig.14A). Así que se probó aumentar la concentración de oligonucleótidos a 1µM para el SCO4919, aún sin resultados favorables (Fig. 14B), por lo que se decidió volver a utilizar la concentración 0.5µM de oligonucleótidos y hacer una curva de temperatura resultando en 58°C la temperatura óptima de alineamiento para el SCO4919 (Fig. 14C).

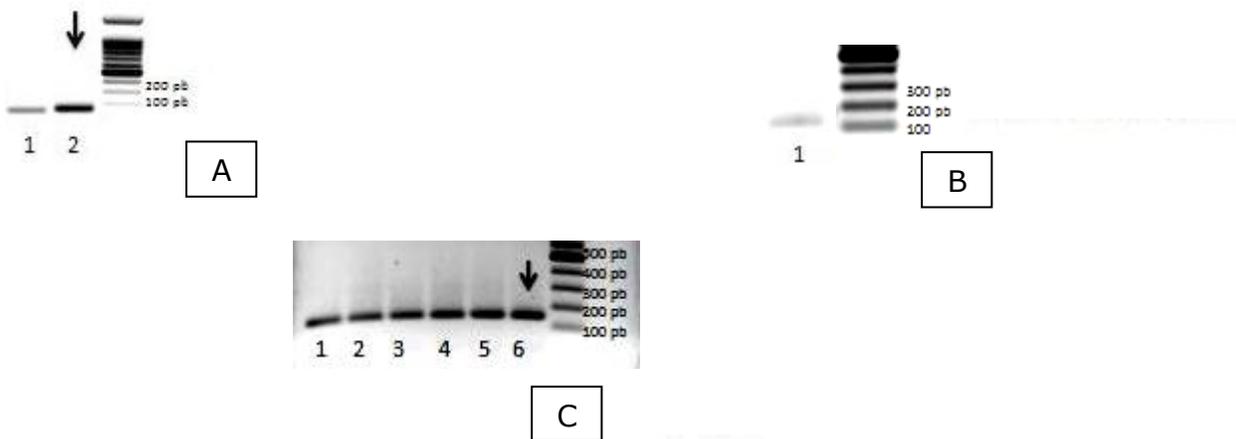


Figura 14. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO4919 (Carril 1) y SCO2180 (Carril 2) a 60°C como temperatura de alineamiento (A). Separación del amplicón del SCO4919 (Carril 1) utilizando 1 μ M de oligonucleótidos en la mezcla de reacción (B). Panel C) Separación de los amplicones del SCO4919 obtenidos durante la curva de temperatura de 62°C (Carril 1), 61.6°C (Carril 2), 61°C (Carril 3), 60.1°C (Carril 4), 58.9°C (Carril 5) y 58°C (Carril 6) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

El siguiente conjunto de amplificación tuvo una temperatura de alineamiento de 60°C. Los resultados se presentan en la Figura 15.

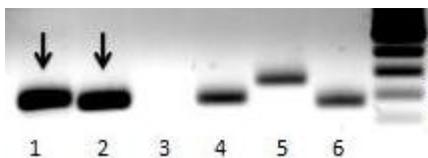


Figura 15. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO6586 (Carril 1), SCO4865 (Carril 2), SCO5106 (Carril 3), SCO7109 (Carril 4), SCO1268 (Carril 5), SCO2181 (Carril 6) en agarosa 1% en buffer TAE a 100V por 60 min.

Los genes que presentaron una amplificación óptima fueron el SCO6586 y el SCO4855 (marcados con una flecha en la Fig. 15). El SCO5106 no amplificó por lo que se decidió diseñar otro par de oligonucleótidos para este gen. Para los genes SCO7109, SCO1268 y SCO2181 se intentó mejorar la intensidad de la banda aumentando la concentración de oligonucleótidos a 1 μ M, y se encontró que sólo el

SCO7109 mejoró su intensidad (Fig.16A), por lo tanto, para los genes SCO1268 (Fig. 16B) y SCO2181 (Fig.16C) se corrieron curvas de temperatura en donde la temperatura optima de amplificación fue 61°C y 62°C respectivamente.

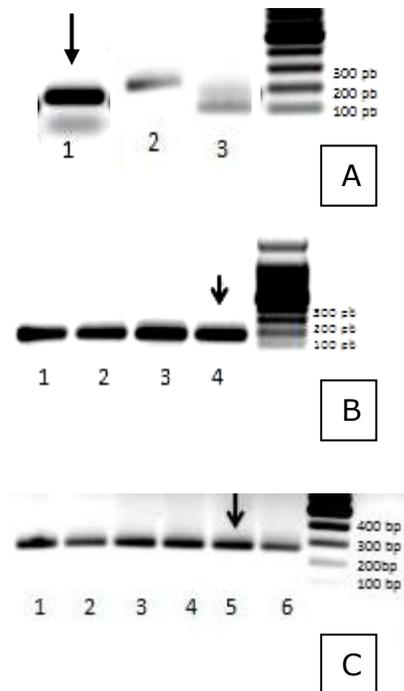


Figura 16. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO7109 (Carril 1), SCO1268 (Carril 2) y SCO2181 (Carril 3) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min (A). Amplicones del SCO2181 en curva de temperatura de 65°C (Carril 1), 64.5°C (Carril 2), 63.6°C (Carril 3) y 62°C (Carril 4) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min (B). Amplicones del SCO1268 en curva de temperatura de 65°C (Carril 1), 64.5°C (Carril 2), 63.6°C (Carril 3), 62.3°C (Carril 4), 61°C (Carril 5) y 58°C (Carril 6) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min (C).

Como siguiente paso se amplificaron los genes cuyos oligonucleótidos tenían una temperatura de alineamiento de 61°C. Los resultados se muestran en la Figura 17.

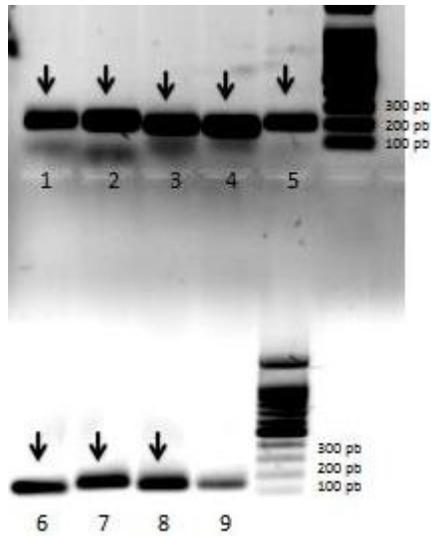


Figura 17. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO7123 (Carril 1), SCO4808 (Carril 2), SCO5999 (Carril 3), SCO2736 (Carril 4), SCO4809 (Carril 5), SCO4595 (Carril 6), SCO0922 (Carril 7), SCO4594 (Carril 8) y SCO5832 (Carril 9) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

De este ensayo el único gen que tuvo inconveniente fue el SCO5832 pues presentó una intensidad de banda menor, por lo que se amplificó nuevamente incrementando la concentración de los oligonucleótidos a $1\mu\text{M}$ consiguiendo que mejorara la intensidad de la banda (Fig. 18).



Figura 18. Separación del amplicón obtenido por PCR punto final del SCO5832 con $1\mu\text{M}$ de oligonucleótidos en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

El último conjunto de amplificación tenía una temperatura de alineamiento a 62°C e incluía los genes SCO5831 y SCO5042 (Fig. 19A); se encontró solamente este último amplificaba de manera óptima por lo que se hizo una curva de temperatura

para el SCO5831 y resultó amplificar en una sola banda a 65°C como se presenta en la Figura 19B.

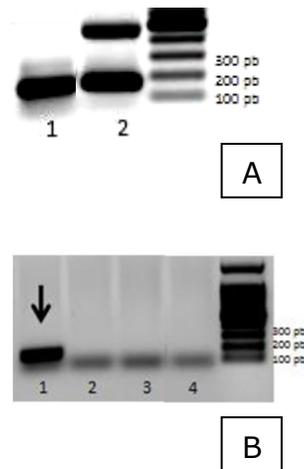


Figura 19. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final de los SCO5042 (Carril 1) y SCO5831 (Carril 2) en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min (A). Separación de amplicones del SCO5831 en curva de temperatura de 65°C (Carril 1), 64.5°C (Carril 2), 63.6°C (Carril 3), 62.3°C

Con los nuevos oligonucleótidos diseñados para el SCO5106 (5' ACG TCG GCT TCA ACT ACA CC 3' y 3' CCT CTT GTT TGG GCG GAA 5') se realizó una curva de temperatura. Se encontró que, en un rango de 58°C a 65°C, amplificó de manera óptima en todas las temperaturas como se observa en la Figura 20, de esta manera por cuestiones de organización se le asignó 62°C como su temperatura óptima.

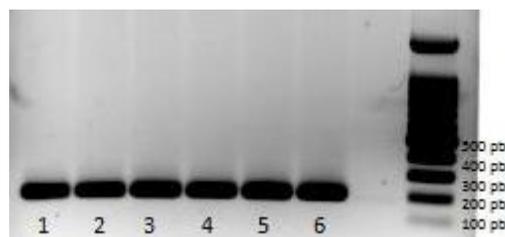


Figura 20. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final del SCO5106 en curva de temperatura de 65°C (Carril 1), 64.5°C (Carril 2), 63.6°C (Carril 3), 62.3°C (Carril 4), 60.7°C (Carril 5) y 58.5°C (Carril 6) como Tm en agarosa 1% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

Por lo tanto, las condiciones de amplificación de los genes fueron estandarizadas teniendo los grupos de amplificación y condiciones que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de amplificación por PCR punto final para los genes codificantes de enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos de *S. coelicolor* M145.

Temperatura de alineamiento	Genes
58°C	SCO4388/ SCO4919
60°C	SCO6586/ SCO4855/ SCO7109*/ SCO2180
61°C	SCO4594/ SCO4595/ SCO4808/ SCO4809/ SCO0922/ SCO5999/ SCO2736/ SCO5832*/ SCO7123/ SCO1268
62°C	SCO5042/ SCO2181/SCO5106
65°C	SCO0848/ SCO5831

- 0.5 µM de oligonucleótidos
- 100 ng de DNA
- 4 mM de MgCl₂ en Master Mix
- 1 µL de DMSO

*1 µM de oligonucleótidos

6.3 Ensayos de RT PCR semicuantitativo en muestras de ARN de *S.coelicolor* M145 crecido en glucosa por 24h y 72h.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación por PCR punto final se decidió realizar las reacciones de retro transcripción con ARN total extraído de *S. coelicolor* a 24 y 72 horas de crecimiento en medio mínimo con glucosa al 1% como fuente de carbono. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de PCR punto final para cada uno de los genes, las cuales se dividieron de acuerdo a la temperatura de alineamiento empezando por las de 58°C. Los resultados se presentan en la Fig. 21.

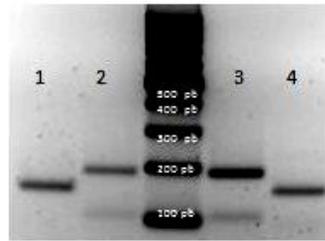


Figura 21. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR a partir de ARN de *S. coelicolor*M145 de los SCO4919 a 24 h (Carril 1) y 72 h (Carril 4), y SCO4388 a 24 h (Carril 2) y 72 h (Carril 3) en agarosa 2.5% a 100 V por 60 min.

El siguiente conjunto de amplificación se realizó con una T_m de 60°C, en donde también se amplificó el control de ARNr 16S (como primer ensayo de amplificación del control) se presenta en la Fig.22.



Figura 22. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR de los SCO6586 (Carril 1), SCO4855 (Carril 2), SCO7109 (Carril 3), SCO2180 (Carril 4) y SCOr09 (Carril 5) a partir de ARN de *S. coelicolor*M145 de 24h (A) y 72h (B) de crecimiento en agarosa 2.5% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

Era importante correr controles negativos con toda la mezcla de reacción, pero sin la retro-transcriptasa para comprobar que las muestras no estuvieran contaminadas con ADN genómico. Estos controles se realizaron en muestras de 24 y 72 horas y fueron corridas junto con los genes que amplificaban a 61°C como se presenta en la Figura 23.



Figura 23. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR de los controles negativos -RT (Carril 1), SCO4808 (Carril 2), SCO4809 (Carril 3), SCO5999 (Carril 4), SCO7123 (Carril 5), SCOr09 (Carril 6) a partir de muestras de ARN de *S. coelicolor*M145 de 24 h (A) y 72 h (B) de crecimiento en agarosa 2.5% en buffer TAE a 100 V por 60 min.

De esta manera se continuó con los demás genes agrupados por su temperatura de alineamiento en el PCR, 61°C (Fig. 24), 62°C (Fig. 25) y 65°C (Fig.26) y se corrieron controles positivos de amplificación usando ADN genómico y amplificando el SCOr09 que codifica para el ARNr 16S, el cual usamos como gen de referencia (Fig. 27).



Figura 24. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR de los SCOr09 (Carril 1), SCO2736 (Carril 2), SCO0922 (Carril 3), SCO5832 (Carril 4), SCO4594 (Carril 5), SCO4595 (Carril 6) y SCO1268 (Carril 7) de muestras de ARN de *S. coelicolor*M145 a 24 h (A) y 72 h (B) de crecimiento en agarosa 2.5% en buffer TAE a 100 V por 60 min.



Figura 25. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR de los SCO2181 (Carril 1), SCO5106 (Carril 2) y SCO5042 (Carril 3) a partir de muestras de ARN de *S. coelicolor* M145 a 24h (A) y 72h (B) de crecimiento en agarosa 2.5% en buffer TAE a 100 V por 60 min.



Figura 26. Separación de los amplicones obtenidos por RT-PCR de los SCO5831 (Carril 1) y SCO0848 (Carril 2) a partir de muestras de ARN de *S.coelicolor* M145 a 24 h (A) y 72 h (B) de crecimiento en agarosa 2.5% en buffer TAE a 100V por 60 min.

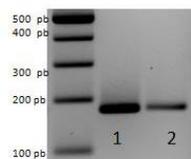


Figura 27. Separación de los amplicones obtenidos por PCR punto final (Carril 1) y RT-PCR (Carril 2) del SCOr09 usando 100 ng de ADN genómico de *S. coelicolor* M145 como templado.

Por lo tanto, con estos resultados y tomando como referencia de intensidad de las bandas de expresión del SCOr09 a las 24 horas y las 72 horas, se analizaron las bandas de los demás genes obteniendo las relaciones de expresión de los 21 genes codificantes para enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en *S. coelicolor* como se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Nivel de expresión semicuantitativa referida a la expresión del ARNr 16S

GEN	RT 24 h	RT 72 h
Citrato sintasa 1 (SCO2736)	2.84	0.36
Citrato sintasa 2 (SCO5831)	0.00	0.28
Citrato sintasa 3 (SCO5832)	0.05	0.59
Citrato sintasa 4 (SCO4388)	0.67	2.64
Aconitasa (SCO5999)	0.13	0.47
αKGDH-1 E2 (SCO1268)	0.00	0.00
αKGDH-1 E2 (SCO2181)	1.33	3.98
αKGDH-1 E2 (SCO7123)	0.00	0.00
αKGDH-1 E3 (SCO0884)	0.00	0.35
αKGDH-1 E3	0.99	4.17

(SCO2180)		
αKGDH-1 E3 (SCO4919)	0.87	1.37
αKGDH-2 (SCO4594)	1.15	0.00
αKGDH-2 Subunidad β (SCO4595)	0.00	0.00
Succinil-CoA sintetasa C1 Subunidad β (SCO4808)	0.60	2.45
Succinil-CoA sintetasa Subunidad α (SCO4809)	0.00	0.00
Succinil-CoA sintetasa Subunidad α (SCO6586)	0.00	0.00
Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S (SCO0922)	0.48	0.23
Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S (SCO4855)	2.36	4.12
Succinato deshidrogenasa Subunidad Fe-S (SCO5106)	0.27	2.69
Succinato deshidrogenasa Subunidad de flavoproteína (SCO7109)	0.00	0.00
Fumarasa Clase II (SCO5042)	0.00	0.25
ARNr 16S (SCOr09)	1	1

De acuerdo a estos resultados se esquematizan el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a las 24 h y 72 h, respectivamente, en la Fig. 28 y 29 en las cuales el grosor de las flechas representa el nivel de expresión de las enzimas.

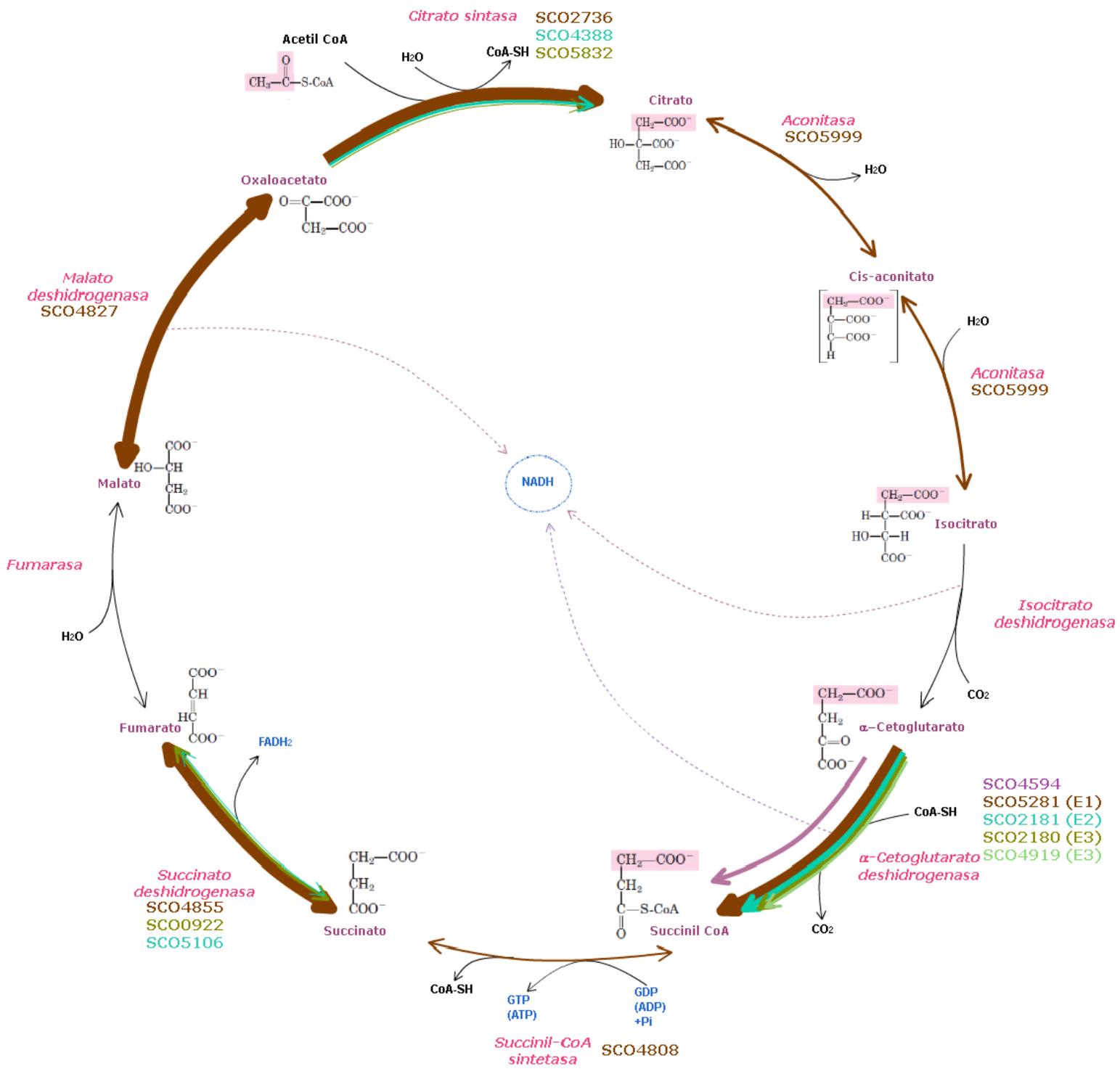


Figura 28. Expresión semicuantitativa de los genes que codifican a las enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos a las 24 horas de crecimiento en MM con glucosa 1% de *S. coelicolor* M145. El grosor de las flechas es proporcional al nivel de expresión de cada gen, el color de la flecha es el color del letrero de cada SCO.

7 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La multiplicidad de genes en los microorganismos procariontes es un tema al cual se le ha puesto poca atención en la investigación, no así en organismos eucariontes y pluricelulares en las cuales existen diferentes isoformas de enzimas que se expresan dependiendo del estado nutricional o ambiental en el que se encuentren; gracias a estos estudios se han podido mejorar cultivos de vegetales con ingeniería genética, por ejemplo (Jao *et al.*, 2014).

La existencia de más de un gen codificante para la misma enzima sugiere que existe una regulación de la expresión que pudiera depender del estado nutricional o de factores hasta ahora desconocidos; el estudio de éstos puede ser una manera de mejorar la producción de compuestos con actividad biológica importantes en la industria como los que produce *S. coelicolor*. En cuanto a genes múltiples, hasta ahora en actinomicetos se tiene descrita la existencia de tres genes codificantes para citrato sintasa en *Sacharopolyspora erytrhaea*: *cit A*, *cit A4* y *gltA-2* (Liao *et al.*, 2014), las cuales sufren regulación por CRP, GlnR y DasR; proteínas reguladoras transcripcionales, ya conocidas en la síntesis de metabolitos secundarios, en el metabolismo del nitrógeno y en la síntesis de N-acetilglucosamina, respectivamente. El *GlnR* y el *DasR* regulan negativamente la transcripción de *citA* y *citA 4*, mientras que es CRP un receptor de unión de AMPc quien afecta la transcripción de *gltA-2* cuando aumenta la concentración de AMPc (Liao *et al.*, 2014). La citrato sintasa es la primera enzima del TCA por lo cual es común que este altamente regulada en la mayoría de los organismos aeróbicos.

Existen dos tipos de citrato sintasas, las de tipo II son alostéricamente inhibidas por los productos finales del ciclo como NADH o 2-oxoglutarato mientras que las de tipo I son insensibles a estos efectores alostéricos (Weitzman y Jones, 1968; Nguyen *et al.*, 2001; Weitzman y Dunmore, 1969).

En este mismo sentido está descrito en *Bacillus subtilis* dos isoformas de la misma enzima: CitZ y CitA (Jin y Sonenshein, 1994); el gen que codifica para CitZ está

regulado por las proteínas CodY, CcpA y CcpC y está contenida en un cluster genómico junto con los genes *CitC* y *CitH* que codifican para las enzimas isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa respectivamente (Sonenshein, 2007). Por lo tanto, podemos decir que los genes de citrato sintasa en los microorganismos están regulados por múltiples proteínas transcripcionales, indicando que la síntesis de esta enzima es atenuada por señales intracelulares y ambientales (Liao et al., 2014). En cuanto a su expresión, *citA* y *citZ* en *S. erythraea* y *B. subtilis* se reportan bajas en la fase estacionaria del crecimiento, mientras que el gen *gltA-2* esta expresado en etapas muy tempranas y sufre un decaimiento entrando a etapa estacionaria (Dingman et al., 1987; Jin y Sonenshein, 1994), lo que justificaría el hecho de que existan múltiples genes codificantes.

Viollier y colaboradores en 2001 estudiaron y caracterizaron a citrato sintasa y aconitasa de *S. coelicolor*; los resultados que obtuvieron fue que la cepa deletada de *citA* produce auxotrofia para glutamato y produce colonias calvas, es decir que no forman micelio aéreo ni producen antibióticos pigmentados al ser crecida en medio con glucosa como fuente de carbono, sin embargo cabe resaltar que es una cepa viable lo que proyecta nuestra atención al hecho de que existen más genes probables codificantes para esta enzima (SCO4388, SCO5832 y SCO5831 descritos en este trabajo) que pudieran estar expresándose en lugar de *CitA* en las condiciones de cultivo, de la misma manera que *gltA-2* en *S. erythraea* se expresa en condiciones diferentes pues tiene un 71% de identidad con *CitA* (Viollier et al., 2001).

Comparando este contexto con los resultados obtenidos en este trabajo resultan concordantes, pues el gen *citA* (SCO2736) se expresa 2.84 veces más que el control a las 24 horas, que en *S. coelicolor* es considerada la etapa temprana del crecimiento, reflejando que es este gen el que contribuye más a la actividad enzimática. En contraste los niveles de expresión a las 72 horas del gen *citA* son de 0.36 y es el SCO4388 el cual ahora se expresa 2.64 veces más que el control en esta etapa que ya es estacionaria, sugiriendo que es este gen y no *citA* quien se

encarga de realizar la traducción de la citrato sintasa con actividad enzimática en condiciones de escasez de nutrientes o incluso tal vez cuando está expuesto a condiciones de estrés.

En cuanto a la enzima aconitasa, Viollier y colaboradores (2001) obtuvieron también una mutante deletada del gen *acoA* que tiene deficiencias en el crecimiento, no produce micelio aéreo ni antibióticos pigmentados y reportaron su expresión en etapas tempranas del crecimiento; también obtuvieron una doble mutante de *citA* y *acoA* que es viable lo que refuerza la teoría de que el motivo por el cual *S. coelicolor* tiene múltiples genes para el metabolismo del carbono es porque sufren regulaciones diferentes de acuerdo al ambiente con el objetivo de sobrevivir en las más diversas circunstancias (Viollier *et al.*, 2001).

Se tiene reportado en otros organismos, como en *E. coli*, la presencia de dos aconitasas AcnA y AcnB, las cuales se regulan de manera diferente y tienen un papel fisiológico distinto (Cunningham *et al.*, 1997); las aconitasas de *E. coli* y de *B. subtilis* tienen un centro de hierro-azufre que censa niveles bajos de hierro y estrés oxidativo (Rouault y Klausner, 1997), por lo cual es una enzima que se relaciona con condiciones de estrés.

Los niveles de expresión reportados en este trabajo para el gen *acoA* (SCO5999) fueron de 0.13 a las 24 horas y 0.47 veces más a las 72 horas, aunque en general son niveles bajos en los dos tiempos, en etapas tardías la expresión aumentó aproximadamente tres veces y media, lo que reafirmaría los estudios en los que relacionan a aconitasa con estrés en el desarrollo. A excepción de estos estudios no existen otras investigaciones que hablen sobre la multiplicidad de genes en actinomicetos que nos puedan guiar para predecir el patrón de expresión en medios de cultivo específicos o en condiciones específicas, es por eso que este trabajo nos da un primer acercamiento al panorama y el motivo por el cual los ensayos de expresión por RT-PCR fueron semicuantitativos.

En trabajos anteriores en el laboratorio ya se han realizado curvas de crecimiento de *S. coelicolor* en glucosa como fuente de carbono (Barrios, 2016; Mendoza, 2008) (Fig.30). Es por eso que tomamos a 24 horas de crecimiento como etapas tempranas pues es cuando el microorganismo se encuentra en etapa exponencial y a 72 horas como una etapa tardía pues es cuando está en plena etapa estacionaria. Esto como punto de partida para tratar de detectar algún patrón de expresión usando glucosa al 1% como fuente de carbono por ser la más común en este tipo de experimentos y sabiendo que en esa proporción la bacteria se encuentra en niveles estándar de crecimiento.

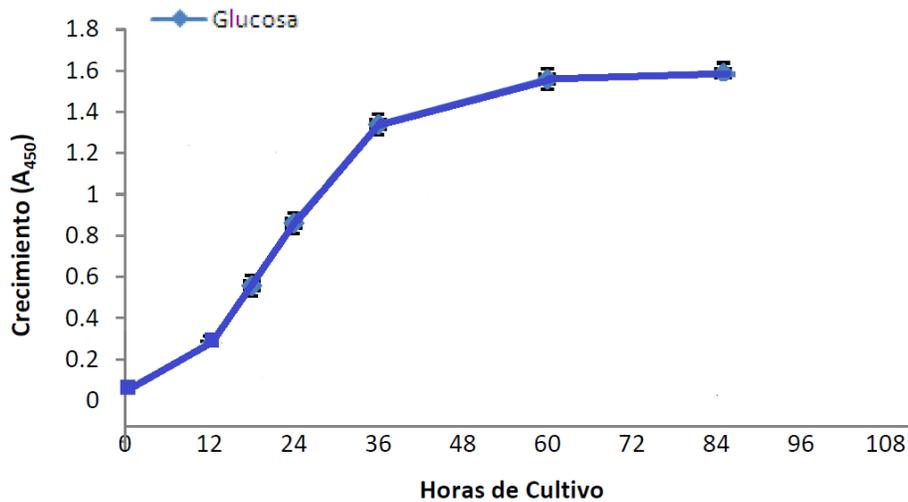


Figura 30. Curva de crecimiento de *S. coelicolor* M145 en medio mínimo con glucosa 1% como fuente de carbono. Modificado de Mendoza, 2008.

Los ensayos de RT-PCR semicuantitativo se realizan comparando con un gen de referencia en el microorganismo, es decir que se exprese de manera constante en cualquier medio de cultivo y en cualquier condición. En estudios anteriores se utilizaba el gen *hrdB* que codifica para un factor sigma, sin embargo, por experiencia en el laboratorio encontramos que su transcripción no era igual en diferentes condiciones o cepas (Vilchis, 2016) por lo cual decidimos usar esta vez el

gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, y que en los resultados obtenidos presenta una expresión semicuantitativa constante.

Al analizar los resultados de la expresión semicuantitativa de todos los genes codificantes de todas las enzimas del ciclo TCA, lo primero que podemos notar es que no existe ningún patrón previsible de expresión pues a excepción, tal vez, de las enzimas con un único gen que son aconitasa y fumarasa ninguna otra enzima mostró una expresión constitutiva en los dos tiempos de muestreo.

Tomado en consideración el orden de aparición en el ciclo y habiendo discutido un poco el papel de la primera enzima que es citrato sintasa podemos analizar el hecho de que existen cuatro genes y sólo uno ha sido caracterizado, el SCO2736 que es el que más se expresa en etapa exponencial de la bacteria dejando a los demás genes en niveles de expresión de no más de 0.6 veces más que el control; panorama que cambia drásticamente a las 72 horas pues es el SCO4388 el cual se expresa en mayor proporción dejando a los demás genes incluyendo el SCO2736 con niveles muy bajos de expresión.

El gen de aconitasa (*acoA*) sufre un ligero aumento de expresión de las 24 horas a las 72 horas de crecimiento sin embargo su nivel de expresión en ambos tiempos no supera el 0.5; prosiguiendo con las etapas del ciclo está la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual tiene tres subunidades. La subunidad E1 (SCO5281) ya se había estudiado en el laboratorio y presenta una expresión constante de 2.5 veces más que el control en ambos tiempos (Tabla 10). Los genes que codifican a la subunidad E2 son tres (SCO1268, SCO2181 y SCO7123) de los cuales sólo el SCO2181 tuvo niveles de expresión de 1.33 veces a las 24 horas y 3.98 veces a las 72 horas lo que sugiere que es éste el único gen de la subunidad E2 que se transcribe y traduce en la proteína en estas condiciones que forma parte del complejo. Esto tiene concordancia con el hecho de que está descrito que los genes de mayor importancia en el organismo se encuentran en la parte central del cromosoma y los que pueden ser prescindibles están en los brazos; de esta manera

los SCO1268 y SCO7123 se encuentran posicionados en los brazos y el SCO2181 en el centro (Fig. 31). En este contexto el SCO0884 que codifica para la subunidad E3 también se encuentra en los brazos de cromosoma y también presenta niveles muy bajos de expresión, no así los SCO2180 y SCO4919 que en etapas tempranas se expresan con niveles cercanos a uno en comparación con el control y a etapas tardías es el SCO2180 el que presenta un nivel de 4.17 veces más que el control, siendo el nivel más alto de expresión de todos los experimentos lo que confirma su importante papel enzimático en estas condiciones de crecimiento.

Tabla 10. Expresión semicuantitativa de las enzimas MDH y α KGDH subunidad E1 a 24 y 72 horas de crecimiento en glucosa 1% de *S. coelicolor* M145 previamente medidas en el laboratorio. Los resultados están referidos a la expresión del gen de ARNr 16S en las mismas condiciones normalizándola a 1.

Enzima (SCO)	Nombre completo	RT 24 H	RT 72 H
MDH (SCO4827)	Malato deshidrogenasa	2.68	4.09
αKGDH E1 (SCO5281)	α -Cetoglutarato deshidrogenasa Subunidad E1	2.43	2.96

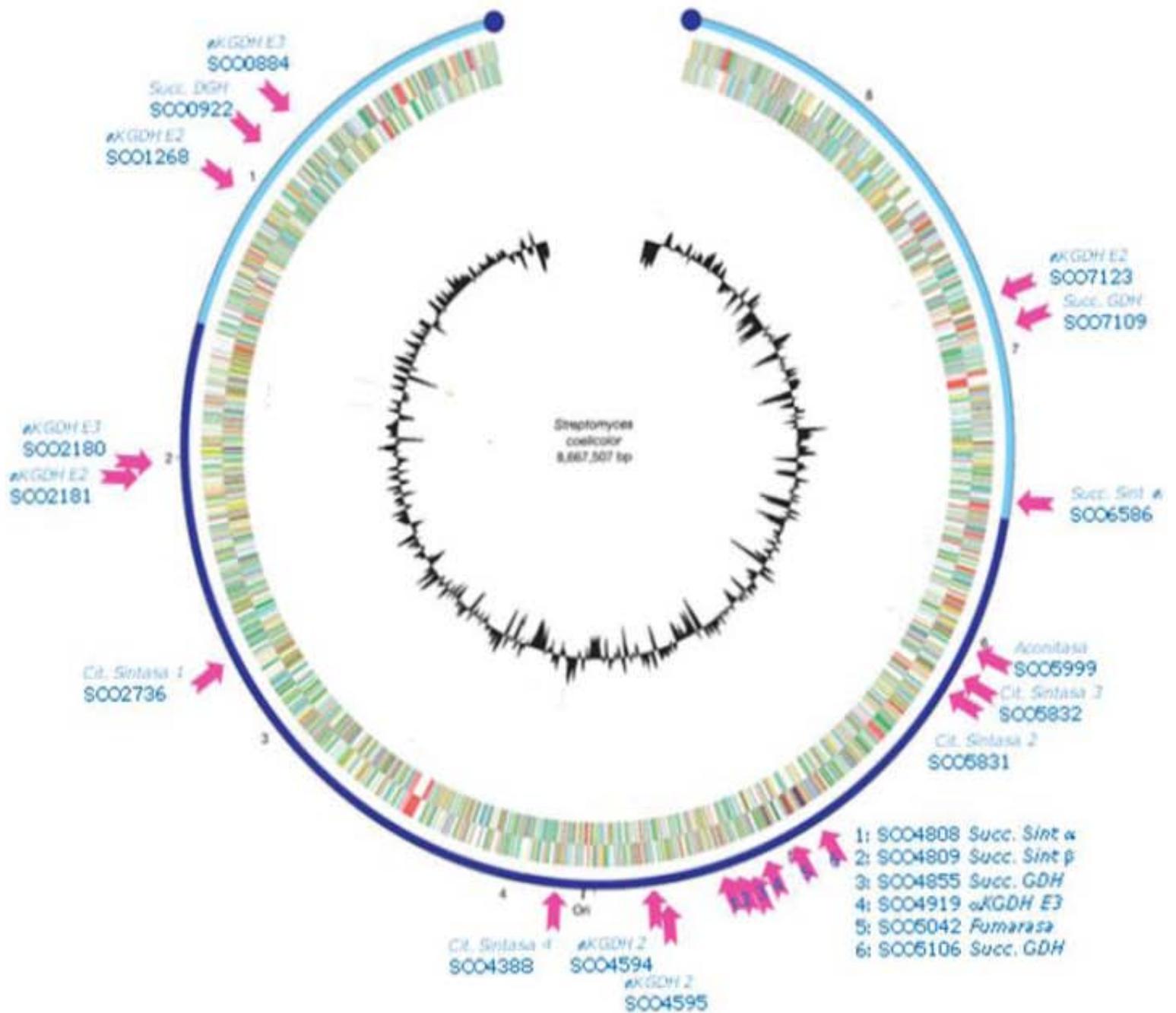


Figura 31. Representación del genoma de *S. coelicolor* A3(2), se indica la posición aproximada de los genes utilizados en este trabajo señalándose en el último círculo exterior en azul oscuro la región correspondiente a la parte central del cromosoma y en azul más claro la región de los brazos. Modificado de Bentley *et al.*, 2002.

Existen otros dos genes que codifican probablemente a un homólogo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, los SCO4594 y SCO4595 de los cuales solamente el primero muestra una expresión de 1.15 en etapas tempranas que podría ser indicio de que estos dos genes, al menos el SCO4595 se puede expresar en otras condiciones y tiempos de cultivo. También se puede inferir que a pesar de estar juntos estos dos genes, no se transcriben como un ARN bicistrónico.

Para la succinil CoA sintetasa se tienen descritos el SCO4808 y SCO4809 para la subunidad β y α , respectivamente y un gen más para la subunidad α , el SCO6586 sin embargo el único gen con expresión fue el SCO4808 teniendo su nivel más alto a 72 horas con 2.45; ya que la enzima succinil CoA sintetasa requiere de dos subunidades para funcionar y que cualitativamente solo la subunidad beta presentó expresión es posible que entonces las subunidades α sí tengan expresión sólo que ha de ser bastante menor ya que los métodos cualitativos no lo detectan.

La siguiente enzima del ciclo es la succinato deshidrogenasa que presenta cuatro genes probables en la misma condición que la α -cetoglutarato deshidrogenasa que los SCO situados en los brazos del cromosoma tuvieron niveles muy bajos o nulos de expresión y los que se encuentran en el centro sí presentan una expresión considerable, son el SCO4855 y el SCO5106, aumentando los dos aproximadamente el doble de su expresión de 24 horas a 72 horas, aunque sobresale el SCO4855 con los niveles más altos, 2.36 a 24 h y 4.12 a 72 h.

De la enzima fumarato hidratasa sólo estudiamos el SCO5042 del cual obtuvimos niveles que no rebasan las 0.3 veces más que el control, siendo el máximo 0.25 a 72 horas de crecimiento. Por último, los niveles de expresión cualitativa de la última enzima del ciclo que es malato deshidrogenasa fueron medidos obteniendo 2.68 a 24 horas e incrementando a casi el doble 4.09 a 72 horas (Tabla 10), sugiriendo que es más activa a etapas tardías del crecimiento lo cual contradice el hecho de que malato deshidrogenasa se inhibe por acumulación de oxaloacetato.

Con esta información se puede afirmar que en *S. coelicolor* existe un patrón diferencial de expresión de los genes y se puede hacer una visualización de cuáles serían los genes activos en etapa exponencial y genes activos en etapa estacionaria, que sorprendentemente, a excepción de la citrato sintasa, resultan ser los mismos genes en ambas etapas los que protagonizan la expresión y por lo tanto la actividad (Tabla 11).

Tabla 11. Expresión diferencial de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en *S. coelicolor*.

Enzima	Genes en etapas tempranas	Genes en etapas tardías
Citrato sintasa	SCO 2173	SCO4388
Aconitasa	SCO5999	SCO5999
α-Cetoglutarato deshidrogenasa	SCO5281 (E1) SCO2181 (E2) SCO2180 (E3)	SCO5281 (E1) SCO2181 (E2) SCO2180 (E3)
Succinil CoA-sintetasa	SCO4808	SCO4808
Succinato deshidrogenasa	SCO4855	SCO4855
Fumarasa	SCO5042	SCO5042
Malato deshidrogenasa	SCO4827	SCO4827

La tendencia general de estos genes es que aumentan su nivel de expresión en etapas tardías, aunque no de la misma manera, es decir no en la misma proporción; además de que los demás genes descritos, aunque no tienen una expresión considerable para hacerlos responsables por la actividad enzimática en ese momento del desarrollo, sí se expresan, o incluso los genes que no presentan ninguna expresión se encuentran en el genoma, por lo tanto no se descarta la

posibilidad de que estos otros genes se estén expresando en otras condiciones o a otro nivel del desarrollo.

Podemos hablar entonces de un microorganismo con bastantes ventajas de adaptación al medio pues ante casi cualquier circunstancia puede sobrevivir expresando tal o cual proteína para muy distintos usos. Así es como genera una gran ventaja adaptativa; sin embargo, el tener un genoma tan grande con múltiples genes codificantes para las mismas enzimas corre el riesgo de sufrir varios errores en la transcripción y por ende también una pérdida de energía nada recomendable. Es hasta que se ahonde en el tema de investigación que sabremos realmente qué es lo que está sucediendo y cómo se regulan realmente estas enzimas.

8 CONCLUSIONES

- Se estandarizaron las condiciones de amplificación óptima por PCR punto final para los múltiples genes que codifican para las enzimas del TCA en *S. coelicolor* M145 (Tabla 8).
- La totalidad de los genes analizados pudo amplificarse de manera eficiente y abundante.
- Se realizaron con éxito ensayos de expresión semicuantitativa de los genes del TCA, por lo cual posteriormente es posible realizar estudios de RT-qPCR para los genes estandarizados.
- En *Streptomyces coelicolor* existen más de un probable gen codificante para la mayoría de las enzimas del TCA.
- Al cultivar a *S. coelicolor* en medio mínimo con glucosa 1% como fuente de carbono, los genes probados se expresan como se presenta en la Tabla 11.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar el RT-qPCR empezando por muestras de ARN total extraído de micelio de *S. coelicolor* a 24 y 72 horas, añadiendo muestras de 12,36,48 y 60 horas de crecimiento en glucosa 1% como fuente de carbono, y probar también con distintas fuentes de carbono.
- Medir actividad y establecer regulación de cada uno de los múltiples genes del TCA y caracterizar las proteínas reguladoras descritas para *S. coelicolor*.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, N. A. (2015). Caracterización fisiológica y bioquímica de una mutante carente del gen malato deshidrogenasa (Δ mdh) de *Streptomyces coelicolor* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ausubel, Frederick M., Brent, Roger, Kingston, E. Robert (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.
- Bagasra, Omar, Hansen, John (1997) *In situ PCR Techniques*. Wiley-Liss Publications.
- Barrios, J. A. (2016). Perfiles de actividad de ICDH, \square -CGDH y MDH en *Streptomyces coelicolor* WT y Δ mdh crecidos en glucosa a diferentes concentraciones (Reporte de Investigación). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., ... Hopwood, D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885): 141-147.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1): 1-26.
- Biassoni, R. y Raso, A. (2014) *Springer Protocols: Quantitative Real-Time PCR, Methods and Protocols*, Humana Press, N.Y. USA.
- Bolívar AM, Rojas A, García-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed* 2014; 3: 25-33
- Bond, D. R., Mester, T., Nesbo, C. L., Izquierdo-Lopez, A. V., Collart, F. L., and Lovley, D. R. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3858-3865.
- Bott, M. (2007). Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends in Microbiology*, 15(9), 417-25. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.08.004>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622.
- Butler, M. J., Bruheim, P., Jovetic, S., Marinelli, F., Postma, P. W., & Bibb, M. J. (2002). Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4731-9.
- Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 1993; 3:S18-29
- Chater, K. F. (2011). Differentiation in *Streptomyces*: the Properties and Programming of Diverse Cell Types en *Streptomyces Molecular*

Biology and Biotechnology. Dyson, P. (ed). Caister Academic Press. Norfolk, UK.

- Chen, V. C., Sadler, G., McComb, M. E., Perreault, H., and Duckworth, H. W. (2011) *Int. J. Mass Spectrom.* 305, 238-246.
- Cheng-Heng Liao, Li-Il Yao y Bang-Ce Ye (2104) Three genes encoding citrate synthases in *Saccharopolyspora erythraea* are regulated by the global nutrient-sensing regulators GlnR, DasR and CRP, *Molecular Microbiology*, October, 94(5); 1065-1084.
- Cortazar Martínez, A., Silva Rincón, E. Patricia (2004) MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA PCR. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología.
- Corthésy-Theulaz, I. E., Bergonzelli, G. E., Henry, H., Bachmann, D., Schorderet, D. F., Blum, A. L., & Ornston, L. N. (1997). Cloning and characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25659-67.
- Cunningham, L., M. J. Gruer, and J. R. Guest. 1997. Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 143:3795–3805.
- Dingman, D.W., Rosenkrantz, M.S., and Sonenshein, A.L.(1987) Relationship between aconitase gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169: 3068-3075
- Doma, Meenakshi K., Parker, Roy (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes, *Cell* 131, Elsevier Inc., Nov. 16:660-668.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En Eguiarte, E., Souza, V. y Aguirre, X. *Ecología Molecular*. (pp. 517-540), SEMARNAT.
- Ge, Y. D., Cao, Z. Y., Wang, Z. D., Chen, L. L., Zhu, Y. M. y Zhu, G. P. (2010). Identification and biochemical characterization of a thermostable malate dehydrogenase from the mesophile *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11): 2194-2201.
- Green, M.R. y Sambrook, J. (2012), *Molecular cloning a laboratory manual*, 4th Edition, CSH press, N.Y. USA.
- Greif, Gonzalo (2007) PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, Unidad de Biología Molecular. Institut Pasteur Montevideo.
- Hellemans, J. y Vandesompele, J. (2014). Selection of Reliable Reference Genes for RT-qPCR Analysis. En R. Biassoni y A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols* (pp. 19-26). Humana Press.
- Herbig, Alexander, (2014) *Computational Methods for the Identification and Characterization of Non-Coding RNAs in Bacteria* (Tesis de doctorado) Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, PS., Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, Apr;10(4):413-7
- Hodgson, D.A. 2000. Primary Metabolism and its Control in Streptomyces: A Most Unusual Group of Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 42: 47-238.
- Hsiao, Nai-hua, Kirby, Ralph (2007) Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Antonie van Leeuwenhoek* 93:1-25
- Hughes, N. J., Clayton, C. L., Chalk, P. A., & Kelly, D. J. (1998). *Helicobacter pylori* porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1119–28.
- Jin, S. y Sonenshein, A. L. (1994). Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *Journal of Bacteriology*, 176(15): 4680-4690.
- Joao Henrique Frota Cavalcanti,, Alberto A. Esteves-Ferreira^{1,2}, Carla G.S. Quinhones (2014) Evolution and Functional Implications of the Tricarboxylic Acid Cycle as Revealed by Phylogenetic Analysis, *Genome Biol. Evol.* 6(10):2830–2848
- Karlin, S., Mrázek, J., Campbell, A., & Kaiser, D. (2001). Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5025-40.
- Karoonuthaisiri, N., Weaver, D., Huang, J., Cohen, S. N., & Kao, C. M. (2005). Regional organization of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Gene*, 353(1), 53-66. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.042>
- Karrer, EE., Lincoln, JE., Hogenhout, S., Bennett, AB., Bostock, RM., Martineau, B., Lucas, WJ., Gilchrist, DG., Alexander, D. (1995) In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Apr 25;92(9):3814-8.
- Kather, B., Stingl, K., van der Rest, M. E., Altendorf, K., & Molenaar, D. (2000). Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3204-9.
- Liao, C., Rigali, S., Cassani, C.L., Saldana, E.M., Nielsen, L.K., and Ye, B.C. (2014) Control of chitin and Nacetylglucosamine utilization in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology* 160: 1914-1928.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_q$} method. *Methods*, 25(4): 402-408.

- Mendoza von der Borch, A. P. (2008). Regulación de la expresión del gen *mdh* en *Streptomyces coelicolor* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mocellin, S., Rossi, CR., Pilati, P., Nitti, D., Marincola, FM. (2003) Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends. Mol. Med*, May;9(5):189-95
- Molenaar, D., Rest, M. E. Van Der, Drysch, A. y Yücel, R. (2000). Functions of the Membrane-Associated and Cytoplasmic Malate Dehydrogenases in the Citric Acid Cycle of *Corynebacterium glutamicum*, 182(24): 6884-6891.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6th Ed.). Freeman, W. H. & Company.
- Nguyen, N.T., Maurus, R., Stokell, D.J., Ayed, A., Duckworth, H.W., and Brayer, G.D. (2001) Comparative analysis of folding and substrate binding sites between regulated hexameric type II citrate synthases and unregulated dimeric type I enzymes. *Biochemistry* 40: 13177-13187.
- Nimmo, H. G. (1987). Regulation of bacterial metabolism by protein phosphorylation. *Essays in Biochemistry*, 23, 1-27.
- Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D. y Thompson, J. C. 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Molecular Microbiology*, 48 (5): 1289-1303.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 2001;29:e45
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. y Cartuyvels, R. (2009). Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23: 145-151.
- Rodríguez, M. S. (2016). Expresión de los genes *icdh* y *a-kgdh* en una mutante *-mdh* de *Streptomyces coelicolor* (Reporte de investigación). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rouault, T., and R. Klausner. 1997. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr. Top. Cell Regul.* 35:1-19.
- Sanchez, S. y Demain, A. L. (2011). The Biochemical Basis | Secondary Metabolites. En: Murray Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2da. Ed., vol. 1, pp. 154-168. Elsevier.
- Siebring, J. (2010). The Phosphofructokinases of *Streptomyces coelicolor*. University of Groningen, the Netherlands.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 5: 917-927.
- Takahashi-Iñiguez, T., Cruz-Rabadán, S., Burciaga-Cifuentes, L. M. y

- Flores, M. E. (2014). Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of recombinant isocitrate dehydrogenase from *Streptomyces coelicolor* M-145. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(9): 1490-1494.
- Tamay de Dios L., Ibarra C, Velasquillo C., (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, Volumen 2 Número 2.
 - Thomas, L., Hodgson, D. A., Wentzel, A. (2012) Metabolic Switches and Adaptations Deduced from the Proteomes of *Streptomyces coelicolor* Wild Type and *phoP* Mutant Grown in Batch Culture. *Molecular & Cellular Proteomics* 11.2
 - Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., & Nathan, C. (2005). Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10670-5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501605102>
 - Tseng, Chin-Ping, Yu, Chin-Chu, Lin, Hsiao-Hsien (2001) Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of *Escherichia coli* Fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity, *Journal of Bacteriology*, Jan. Vol. 83 No.2: 461-467.
 - Tymoczko, J. L., Berg, J. M. y Stryer, L. (2013). *Biochemistry: a short course* (2da. Ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
 - van Keulen, G. y Dyson, P. J. (2014). Chapter Six Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). En *Advances in Applied Microbiology* (1ra. Ed., Vol. 89, pp. 217-266). Elsevier Inc.
 - van Keulen, G., Siebring, J. y Dijkhuizen, L. (2011). Central carbon metabolic pathways in *Streptomyces*. En P. Dyson (Ed.), *Streptomyces Molecular Biology and Biotechnology* (pp. 105-124). Great Britain: Caister Academic Press.
 - van Ooyen, J., Emer, D., Bussmann, M., Bott, M., Eikmanns, B.J., and Eggeling, L. (2011) Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB, and GlxR. *J Biotechnol* 154:140-148.
 - van Wezel G.P., McKenzie N.L. y Nodwell J.R. (2009). Capítulo 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. *Methods Enzymology*. 458:117-141
 - Van Wezel, G. P., König, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M., & Titgemeyer, F. (2007). A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12(1-2), 67-74.
 - Veit A, Polen T. Wendisch VF. (2007). Global gene expression

analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* Feb;74(2):406-21.

- Vilchis González, Ana Laura (2016) Cuantificación de la expresión de los genes *mdh*, *idh* y *a-Kgdh* en *Streptomyces coelicolor* crecido en diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México.
- Viollier, P. H., Minas, W., Dale, G. E., Folcher, M., & Thompson, C. J. (2001a). Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3184-92.
- Viollier, P. H., Nguyen, K. T., Minas, W., Folcher, M., Dale, G. E., Thompson, C. J. (2001b). Roles of aconitase in growth, metabolism, and morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 183(10): 3193-3203.
- Wacker, M. J. y Godard, M. P. (2005). Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using superscript III. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16 (3): 266-271
- Weitzman, D. J. P. D. J. (2003) *Nature* 219, 270–272.
- Weitzman, P.D., and Dunmore, P. (1969a) Citrate synthases:allosteric regulation and molecular size. *Biochim Biophys Acta* 171: 198-200.
- Weitzman, P.D., and Dunmore, P. (1969b) Regulation of citrate synthase activity by alpha-ketoglutarate. Metabolic and taxonomic significance. *FEBS Lett* 3: 265-267.
- Weitzman, P.D., and Jones, D. (1968) Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. *Nature* 219: 270-272.
- Wu, G., Culley, D. E., & Zhang, W. (2005). Predicted highly expressed genes in the genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and the implications for their metabolism. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 7), 2175-87. <http://doi.org/10.1099/mic.0.27833-0>

