



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN SAV4194
SOBRE LA EXPORTACIÓN DE AVERMECTINA EN
S. AVERMITILIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

I.B.Q. VICTORIA SICAIROS DÍAZ

DIRECTOR:

DR. ARMANDO MEJÍA ALVAREZ

MÉXICO, D.F.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

El trabajo Análisis de la función del gen SAV4194 sobre la exportación de metabolitos secundarios en *Streptomyces avermitilis* contó con el apoyo de CONACYT otorgado a través del número de beca: 2693 y Número de registro: 203433.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN SAV4194 SOBRE LA
EXPORTACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN
*Streptomyces avermitilis***

Que presentó

I.B.Q Victoria Sicairos Díaz

Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Alvarez

(Director)

Dr. Javier Barrios González

(Asesor)

Miembros del Jurado:

Dr. Javier Barrios González (Presidente)

Dr. Octavio Loera Corral (Secretario)

Dr. Francisco Fierro Fierro (Vocal)

Dr. Alejandra Serrato Díaz (Vocal)

DEDICATORIA

A mi esposo, David.

Simplemente porque sin ti no hubiera podido.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por la vida, por permanecer siempre fiel a tus promesas aun cuando yo te he sido infiel. Pero aún más, gracias porque nunca me has dejado sola, me rodeas de gente buena, mis amigos, mi familia, David.

A Javier, Ale, Paco pepe, Paco Fierro, Octavio, Dra. Tomasini, gracias mis queridos doctores por su tiempo y sus consejos. Fueron de inspiración y muy importantes para mi formación.

A todos mis compañeros del lab: Tere, Rox, Jess, Maura, Jaime, Gabys, Cristian, Hugo, Alejandro, Mariel, Aras... Somos como una gran familia, nos peleamos, nos perdonamos y en muchas ocasiones nos ayudamos...y todo porque pasamos más tiempo juntos en el lab que en nuestras casas. Gracias por los tips en el trabajo, por reírse de mis malos chistes y por el tiempo compartido.

Al grupo de trabajo: Ana, Karlita, Armando, Omar y Octavio, creo que hicimos un muy buen equipo. Ha sido un gusto trabajar con ustedes. Gracias por toda la ayuda que me dieron en los experimentos y que espero me la sigan dando eh!... porque nos falta camino por recorrer...

A Armando, por la palabra sabia ante el tropiezo. Tuve la oportunidad de conocerte desde el verano científico y por eso estoy aquí. Hemos pasado por muchas cosas juntos y te agradezco la paciencia porque cuando llegué al lab no sabía ni usar una micropipeta... Gracias por tus consejos, tu cariño y amistad. Más que mi asesor sabes que eres un gran amigo y te quiero mucho. "Jefe" por fin!!!

A Tere y David, mis suegros. Gracias por estar siempre pendiente de mi trabajo, por sus oraciones y por alegrarse de mis triunfos.

A Ivan, Ana, Rbk y Kary, Pienso que lo mejor de este trabajo no solo es obtener el grado de MC, sino además los amigos que haces en el camino. Gracias por hacer mi trabajo más placentero, por las eternas conversaciones, por las arrugas que se me hicieron de tanto reír, por no dejarme comer solita, por sus palabras de aliento, por dejarme hablar, hablar y hablar cuando lo necesitaba, gracias por el coffee break. Simplemente gracias porque nunca estuve sola.

A mis padres y hermanas porque a pesar de la distancia siempre han estado para mí. Son mi marco a seguir y el orgullo de mi vida. Este último año fue muy difícil, tuvimos la alegría de Danna pero al mismo tiempo la tristeza por mi papá, pero una vez más salimos adelante juntas. Si la familia se eligiera, sin dudar los escogería de nuevo. Los extraño!!

A David, por tu amor, apoyo y paciencia. Gracias por todos los fines de semana, noches, madrugadas y vacaciones que tuviste que pasar en el lab. Por no dejarme renunciar, por sacrificar el tiempo en que debimos estar juntos. Gracias por no quejarte y estar siempre de buen humor, por tus apapachos cuando sentía que no iba a poder. Ya lo sabes... Te admiro y te amo.

RESUMEN

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas cuya importancia biotecnológica radica en su capacidad de producir un gran número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los antibióticos. *Streptomyces avermitilis* produce 28 metabolitos secundarios entre los que destacan por su interés industrial las avermectinas y la oligomicina. Las avermectinas son empleadas en medicina y agricultura, debido a sus propiedades antiparasitarias y antihelmínticas, aunque también se han reportado con actividad antibacterial y antifúngica si se usan en altas concentraciones (Egerton *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 2008). La oligomicina es un compuesto que muestra una amplia variedad de actividades biológicas, especialmente un fuerte efecto antifúngico por inhibición específica de la ATPasa mitocondrial, actividad inmunosupresora (Wei *et al.*, 2006), y una potente actividad antitumoral contra hepatoma humano, leucemia mielógena crónica y varios tipos de células de carcinoma colónico (Xiuping *et al.*, 2009). Debido a lo anterior se han incrementado los estudios para el mejoramiento genético de este microorganismo.

Por otro lado, se han encontrado genes involucrados en la resistencia y exportación de los antibióticos propios de cada microorganismo productor. Se ha demostrado que puede presentarse un efecto tóxico propio de la actividad del antibiótico que sintetizan cuando las concentraciones del mismo son altas lo que marca un límite en la producción en cepas industriales de alta producción. En este sentido se han identificado en muchos actinomicetos proteínas de membrana que funciona como una bomba exportadora de antibiótico. Tal es el caso de *Streptomyces pristinaespiralis*, productor de pristinamicina en quien el gen *ptr* codifica una proteína responsable de la exportación de dicho antibiótico mediante un sistema antiport, pristinamicina/proton (Folcher *et al.*, 2001).

Con estos antecedentes, se buscó una proteína similar en *S. avermitilis* y mediante análisis insílico se encontró que el gen SAV4194 contiene 13 dominios transmembranales típicos de proteínas transportadoras además, se identificó que presenta 78% de similitud con el gen *Ptr* de *S. pristinaespiralis* y 74% con el gen *RifP* de *A. mediterranei*. Tanto el gen

Ptr como el gen *Rif^R* codifican para proteínas transportadoras de antibióticos (Folcher *et al.*, 2001; Absalón *et al.*, 2007). En base a esta similitud es que consideramos que el gen SAV4194 también codifica para una proteína de transporte.

Para probar la hipótesis, se plantearon dos estrategias. La primera fue interrumpir el gen SAV4194 mediante el transposón Tn5062. Para esto fue necesario en principio, amplificar el gen mediante PCR, posteriormente clonarlo en el plásmido pME6 e interrumpir con el transposón el gen ya clonado. Finalmente se trató de transformar a *S. avermitilis* con este nuevo vector para que mediante recombinación homóloga el gen interrumpido se integrara al cromosoma; con lo cual se obtendrían mutantes con el gen SAV4194 interrumpido. Sin embargo, no fue posible transformar por ninguna de las técnicas reportadas la cepa de *S. avermitilis* con la cual se trabajó lo que nos llevó a la conclusión de que el problema se debía a que se ha reportado que este microorganismo tiene un sistema de restricción muy fuerte (Macneil *et al.*, 1998, Hwang *et al.*, 2001, Gong *et al.*, 2004). Por lo tanto, fue necesario implementar una estrategia alternativa para obtener información que nos permitiera responder la pregunta original del presente trabajo de tesis, sobre si este gen codifica o no para una proteína transportadora de avermectinas. Ésta consistió en evaluar la expresión del gen durante la trofofase e idiofase de *S. avermitilis* en diferentes medios de cultivo (medio semilla, medio de producción de oligomicina y medio de producción de avermectina). Las muestras de ARN se estudiaron mediante métodos cualitativos (RT-PCR) y cuantitativos (QRT-PCR). Tanto los resultados de RT-PCR como los de PCR en tiempo real mostraron que el gen SAV4194 no se expresa durante la producción de avermectinas pero si se expresa durante la producción de oligomicina. Por lo tanto, la no expresión del gen SAV4194 en el medio de producción de avermectina demuestra que este gen no está involucrado en su exportación. Y la expresión del gen SAV4194 en los medios donde hay producción de oligomicina sugiere que este gen podría estar implicado en el transporte de oligomicina hacia el exterior de la célula.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. <i>S. avermitilis</i>	3
2.2. Avermectinas	4
2.3. Biosíntesis de avermectinas	5
2.3.1. Biosíntesis de unidades de iniciación.	6
2.3.2. Biosíntesis del aglicón inicial por la policétido sintetasa.	6
2.3.3. Modificación del aglicón inicial para formar la avermectina glicocilada.	8
2.3.4. Glicocilación del aglicón de avermectina usando desoxitimidina difosfato (dTDP)-L-oleandrosa para formar avermectinas.	9
2.3.5. Regulación de la biosíntesis de avermectina.	9
2.4. <i>Cluster</i> Biosintético	10
2.5. Proteínas transportadoras.	12
2.5.1. Proteínas Integrales de membrana.	12
2.5.2. Sistemas de excreción mediados por proteínas integrales de membrana.	12
3. Justificación.	16
4. Hipótesis.	17
5. Objetivos.	18
6. Materiales y Métodos.	19
6.1. Microorganismos.	19
6.1.1. Conservación de los microorganismos.	20
6.1.2. Condiciones de cultivo de los microorganismos.	20
6.2. Plásmidos.	20
6.3. Transposón	22
6.4. Medios de cultivo.	24
6.5. Extracción y purificación de ADN total de <i>S. avermitilis</i> .	27
6.6. Aislamiento y amplificación del gen de interés.	27
6.6.1. Diseño de oligonucleótidos para PCR.	27
6.6.2. Amplificación del gen SAV4194 mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).	28
6.6.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.	31
6.6.4. Aislamiento y purificación de ADN a partir de geles de agarosa. (6.6.4)	32
6.7. Preparación de células electrocompetentes (JM109).	32
6.8. Transformación de JM109 con los plásmidos pME6 y pQM5062.	33
6.9. Purificación de pME6 y pQM5062.	34
6.10. Digestión de los plásmidos pME6 y pQM5062 así como del gen SAV4194.	35
6.10.1. Purificación de ADN por precipitación.	36
6.11. Ligación del producto de PCR en el vector <i>pGEM®-T Easy</i> y su purificación.	37

6.11.1. Digestión del vector pGEM4194	39
6.12. Clonación del gen SAV4194/ <i>EcoRI</i> en el plásmido pME6 y su purificación.	39
6.12.1. Digestión de pME6-4194.	42
6.13. Interrupción del gen SAV4194 con el transposón Tn5062.	42
6.13.1. Digestión del plásmido pME6-4194	43
6.13.2. Desfosforilación del vector pME6-4194	44
6.13.3. Clonación del Tn5062 en el plásmido pME6-4194	44
6.13.4. Digestión del vector pMET4194	45
6.14. Transformación de <i>S. avermitilis</i> mediante biobalística.	45
6.14.1. Preparación de las células blanco.	45
6.14.2. Preparación de <i>microcarriers</i> .	45
6.14.3. Revestimiento de <i>microcarriers</i> con DNA.	46
6.14.4. Bombardeo.	47
6.14.5. Selección de las mutantes con resistencia a un solo marcador.	47
6.15. Transformación de <i>S. avermitilis</i> mediante protoplastos	48
6.15.1. Preparación de protoplastos	48
6.15.2. Transformación por protoplastos	49
6.16. Transformación de <i>S. avermitilis</i> por la técnica de electroporación	49
6.17. Estudios de expresión	49
6.17.1. Extracción de ARN	50
6.17.2. Cuantificación de ARN	51
6.17.3. Electroforesis en geles desnaturalizantes (agarosa/formaldehído)	51
6.18. RT-PCR	52
6.19. Tiempo real PCR (qRT-PCR)	53
6.20. Ensayo de oligomicina.	54
7. Resultados y Discusión.	56
7.1. Extracción de ADN total de <i>S. Avermitilis</i> .	56
7.2. Amplificación del gen SAV4194 mediante la Reacción en Cadena de la ADN polimerasa (PCR).	57
7.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.	58
7.4. Purificación de los plásmidos pME6 y pQM5062.	59
7.5. Digestión de los plásmidos pME6 y pQM5062.	60
7.6. Plásmido pGEM4194 (clona 1).	61
7.7. Digestión del plásmido pGEM4194 (clona 1).	61
7.8. Plásmido pME6-4194 (clona 2).	62
7.8.1. Digestión del plásmido pME6-4194 (clona 2) con la enzima <i>EcoRI</i> .	63
7.8.2. Digestión del plásmido pME6-4194 (clona 2) con la enzima <i>NruI</i> .	63
7.9. Plásmido pMET4194	64
7.9.1. Digestión del plásmido pMET4194.	65
7.10. Transformación de <i>S. avermitilis</i> con el plásmido que contiene el	

gen SAV4194 interrumpido.	66
7.11. Estudios de expresión	67
7.11.1. RT-PCR	67
7.11.2. Tiempo real PCR (qRT-PCR)	69
7.12. Ensayo de oligomicina	71
8. Conclusiones.	72
9. Referencias.	73

1. INTRODUCCIÓN.

El mecanismo de resistencia a antibióticos más frecuentemente encontrado en actinomicetos productores de antibióticos es el que está mediado por proteínas integrales de membrana (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000). Este mecanismo, además, funciona como un sistema de excreción del antibiótico producido.

En microorganismos eucariontes que producen antibióticos como *Penicillium chrysogenum* productor de penicilina, los antibióticos son concentrados en vesículas membranales internas para ser posteriormente liberados al medio por exocitosis. Sin embargo, los organismos procariontes no forman tales vesículas, por lo que tienen que exportar el producto por un sistema de transporte de membrana, el cual también funciona como un mecanismo de defensa frente a antibióticos (Paulsen *et al.*, 1996 y Putman *et al.*, 2000).

Se han identificado en muchos actinomicetos proteínas de membrana que funcionan como una bomba exportadora de antibiótico (Folcher *et al.*, 2001). Este sistema de transporte abre la posibilidad de ser usado como blanco dentro de un programa de mejoramiento genético, ya que consideramos que este transporte podría ser

determinante en la concentración intracelular del metabolito, lo cual a su vez podría retrorregular su biosíntesis.

Por otro lado y de manera específica se considera de gran importancia hacer mejoramiento genético en cepas de interés industrial, como *Streptomyces avermitilis*, la cual produce una serie de metabolitos entre los cuales se encuentran la oligomicina y las avermectinas; el primero posee un fuerte efecto antifúngico (Wei *et al.*, 2006) y anticancerígeno, con una potente actividad antitumoral contra hepatoma humano, leucemia mieloides crónica y varios tipos de células de carcinoma colónico (Xiuping *et al.*, 2009). El segundo, es un metabolito utilizado como un excelente antiparasítico en la ganadería, bioinsecticida en la agricultura (Ikeda *et al.*, 2003) y además en seres humanos como tratamiento de enfermedades causadas por parásitos (oncocercosis, escabiosis, elefantiasis, etc.) (Rodríguez y Rivas, 1991).

2. ANTECEDENTES.

2.1. *Streptomyces avermitilis*.

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas que crecen en la tierra (Hodgson *et al.*, 2000), pantanos, y hábitats marinos costeros, y forman filamentos como los micelios de los hongos. La diferenciación morfológica en *Streptomyces* involucra la formación de un micelio terrestre y un micelio aéreo, con la posterior formación de grupos de esporas (Lamb *et al.*, 2003). Este proceso, único entre bacterias Gram-positivas, requiere la coordinación especializada del metabolismo y es más complejo que en otras bacterias Gram-positivas (Satoshi *et al.*, 2001). Debido al estilo de vida saprófito de los actinomicetos, éstos han desarrollado un micelio vegetativo, que les sirve tanto de anclaje como para captar nutrientes.

Sin embargo, este sistema les impide poder desplazarse a otros nuevos nichos, pero mediante un sistema de dispersión por medio de esporas, las cuales son sintetizadas en el llamado micelio aéreo; han podido resolver este problema (Schauer *et al.*, 1988 y Schauer *et al.*, 1991).

La característica más interesante del género *Streptomyces* es su habilidad de producir metabolitos secundarios incluyendo antibióticos y compuestos bioactivos apreciados en la medicina humana, veterinaria, y en la agricultura (Chen *et al.*, 2008). Se observa una gran diversidad estructural en estos metabolitos secundarios ya que no sólo abarcan compuestos antibacterianos (p. e. la higromicina B), antifúngicos (p. e. destomicina), antivirales, antiparasitarios (p. e. la paramomicina) y antitumorales, sino también metabolitos con propiedades inmunosupresoras, antihipertensivas, y propiedades antihipercolesterolémicas (Satoshi *et al.*, 2001).

Dentro de este género, se encuentra la bacteria *Streptomyces avermitilis*, cuyo genoma ha sido secuenciado al completo debido a su gran importancia como microorganismo industrial. Por lo menos 8.7 millones de pares de bases existen en su cromosoma lineal; ésta es la secuencia de genoma bacteriano más grande conocida, y proporciona una visión acerca de la diversidad intrínseca de la producción de metabolitos secundarios de *Streptomyces*. Se ha encontrado que este estreptomiceto produce veinticinco tipos de metabolitos secundarios (Satoshi *et al.*, 2001). *S. avermitilis* produce oligomicina, compuesto que muestra una amplia variedad de actividades biológicas, especialmente un fuerte efecto antifúngico por inhibición específica de la ATPasa mitocondrial, actividad inmunosupresora (Wei *et al.*, 2006), y una potente actividad antitumoral contra hepatoma humano, leucemia mielógena crónica y varios tipos de células de carcinoma colónico (Xiuping *et al.*, 2009).

Por otro lado, *S. avermitilis* produce un grupo de compuestos llamados avermectinas, las cuales son empleadas en medicina y agricultura, debido a sus propiedades antiparasitarias y antihelmínticas, aunque también se han reportado con actividad antibacteriana y antifúngica si se usan en altas concentraciones (Egerton *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 2008).

2.2. Avermectinas.

En 1975 William Campbell, un investigador veterinario que trabajaba en el Instituto Kitasato de Japón aisló del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* un grupo de lactonas macrocíclicas a las que llamó avermectinas.

Esta familia de nuevos agentes antihelmínticos son policétidos producidos por la fermentación de *S. avermitilis* y presentan un gran poder insecticida (Burg *et al.*, 1979; Miller *et al.*, 1978). Fue usada en granjas y en animales domésticos (Egerton *et al.*, 1979) desde 1977. En 1978 el Dr. William Campbell probó la ivermectina (derivado semisintético de las avermectinas) contra parásitos intestinales en caballos, teniendo éxito su experimento, y señaló que este fármaco era también efectivo contra el parásito *Onchocerca volvulus* que causa la oncocercosis o "ceguera de los ríos".

S. avermitilis produce una mezcla de ocho avermectinas estructuralmente relacionadas A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b (MacNeil *et al.*, 1988, Xu y Cen 1998). Los tipos de avermectina más comunes son A2a, A1a, B2a y B1a. (Xu y Cen, 1999). Las fracciones de avermectinas a y b difieren en las unidades de iniciación para su biosíntesis (2-metil butirato e isobutarato, respectivamente) (Mironov *et al.*, 2002). De los ocho componentes del complejo avermectinas, la fracción B1 es la que tiene la más alta actividad antiparasítica (Ikeda *et al.*, 1997). Cerca del 28-34% del total de avermectinas corresponde al componente B1a. (Egerton *et al.*, 1979). Y de todas ellas la única usada en humanos desde 1981 es la ivermectina cuando se descubrió su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por nemátodos endoparásitos, como es el caso de la oncocercosis, enfermedad causada por *Onchocerca volvulus* y cuyas secuelas son la pérdida total de la visión (Dadzie *et al.*, 2002). Este derivado semisintético (ivermectina) fue indicado como el fármaco de elección desde 1988 en el Programa de Control de la Oncocercosis (OCP) en países del África y en América Latina, en donde la enfermedad es endémica. El fármaco es también efectivo en el tratamiento de la filariasis y contra nemátodos intestinales, principalmente estrogiloidiasis. Asimismo, en el sur de Texas y norte de México, se ha reportado su uso en el tratamiento de la fiebre del ganado transmitida por la garrapata *Boophilus annulatus*, que produce pérdidas económicas importantes (Millar *et al.*, 2001).

Las avermectinas tienen su mecanismo de acción modulando los canales γ -aminobutiricálicos en las neuronas de los vertebrados (Sigel y Baur, 1987) y también actúan sobre los canales de unión de glutamato en nemátodos (Arena *et al.*, 1991).

2.3. Biosíntesis de avermectinas.

La biosíntesis de avermectinas puede ser dividida en 4 etapas;(1) biosíntesis de unidades de iniciación, (2) la formación inicial de un aglicón, (6, 8a-seco-6,8a-desoxi-5-oxoavermectina aglicón) por policétido sintasa (PKSs), (3) la modificación del aglicón inicial para formar la avermectina glicosilada, (4) glicosilación del aglicón de avermectina usando desoxitimidina difosfato (dTDP)- L-oleandrosa para formar avermectinas (Yoon *et al.*, 2003).

2.3.1. Biosíntesis de unidades de iniciación.

Estudios de marcaje mostraron que el grupo *acilo* iniciador para formar avermectinas es derivado del catabolismo de L-isooleucina (2-metil butirato) en las series alternas *a* y/o L-valina (isobutarato) en las series *b*. Figura 2.1.

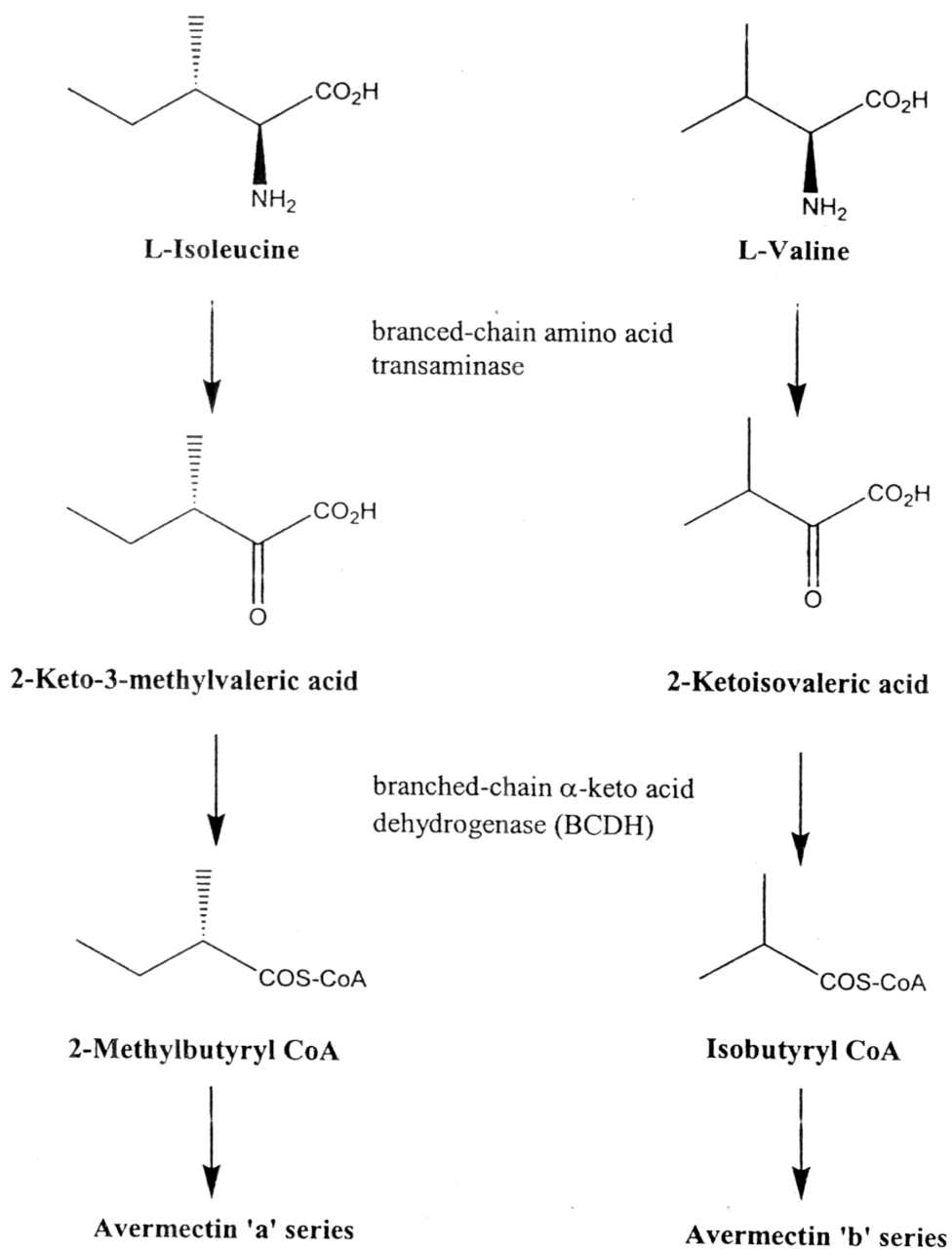


Figura 2.1. Ruta biosintética de las unidades iniciadoras. Las formas acil-CoA de la unidad de iniciación son formadas a través de una transaminación, formándose cetoácidos, seguida de una deshidrogenación por una deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (BCDH) (Yoon *et al.*, 2003).

2.3.2. Biosíntesis del aglicón inicial por la policétido sintasa.

Las avermectinas agliconadas son sintetizadas por la adición de siete acetatos y cinco unidades de propianato para elongar la unidad de iniciación, en un proceso similar a la biosíntesis de otros tipos de policétidos.

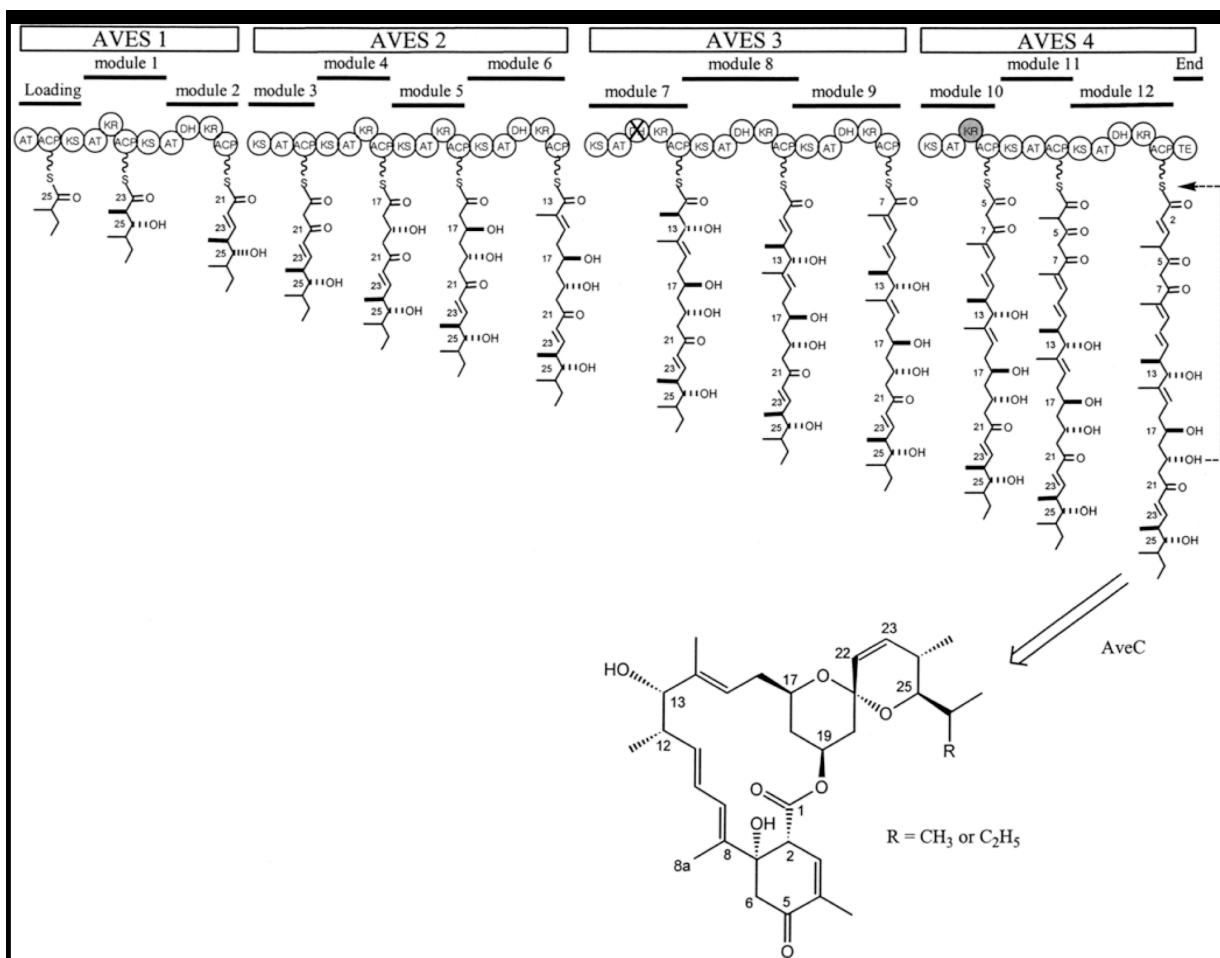


Figura 2.2. Predicción de la organización modular y productos (6, 8a-seco-6,8a-deoxy-5-oxoavermectin aglycons) de la avermectina policétido sintasa. Cada subunidad de proteína es mostrada como una barra ancha. Cada círculo representa un dominio enzimático cuya identidad (indicada por iniciales) es explicada en el texto. Cada módulo cataliza un ciclo de elongación de la cadena y el procesamiento del grupo beta-ceto, con el resultado final de la biosíntesis de una macrolactona (Yoon *et al.*, 2003).

Los genes PKS están organizados en dos bloques de marcos de lectura abierta (ORFs), AVES1-AES2 Y AVES3-AVES4, los cuales son convergentemente transcritos. Estos cuatro grandes marcos de lectura abierta codifican un módulo iniciador más doce módulos de elongación. Cada módulo contiene diferentes dominios con actividades enzimáticas específicas requeridas para un ciclo de elongación del policétido (Yoon *et al.*, 2003). Véase figura 2.2.

Seguido de cada condensación, el grupo beta-ceto es reducido a un grupo hidroxilo por una cetoreductasa (KR), y el grupo hidroxilo es deshidratado para generar un doble enlace por una deshidratasa (DH) (Yoon *et al.*, 2003).

2.3.3. Modificación del aglicón inicial para formar la avermectina glicosilada.

La cadena de carbono presenta diversas modificaciones puesto que la formación de un anillo de furano ocurre después de la formación del aglicón inicial y antes de la reducción del grupo ceto en el carbono C5 (Yoon *et al.*, 2003). Figura 2.3.

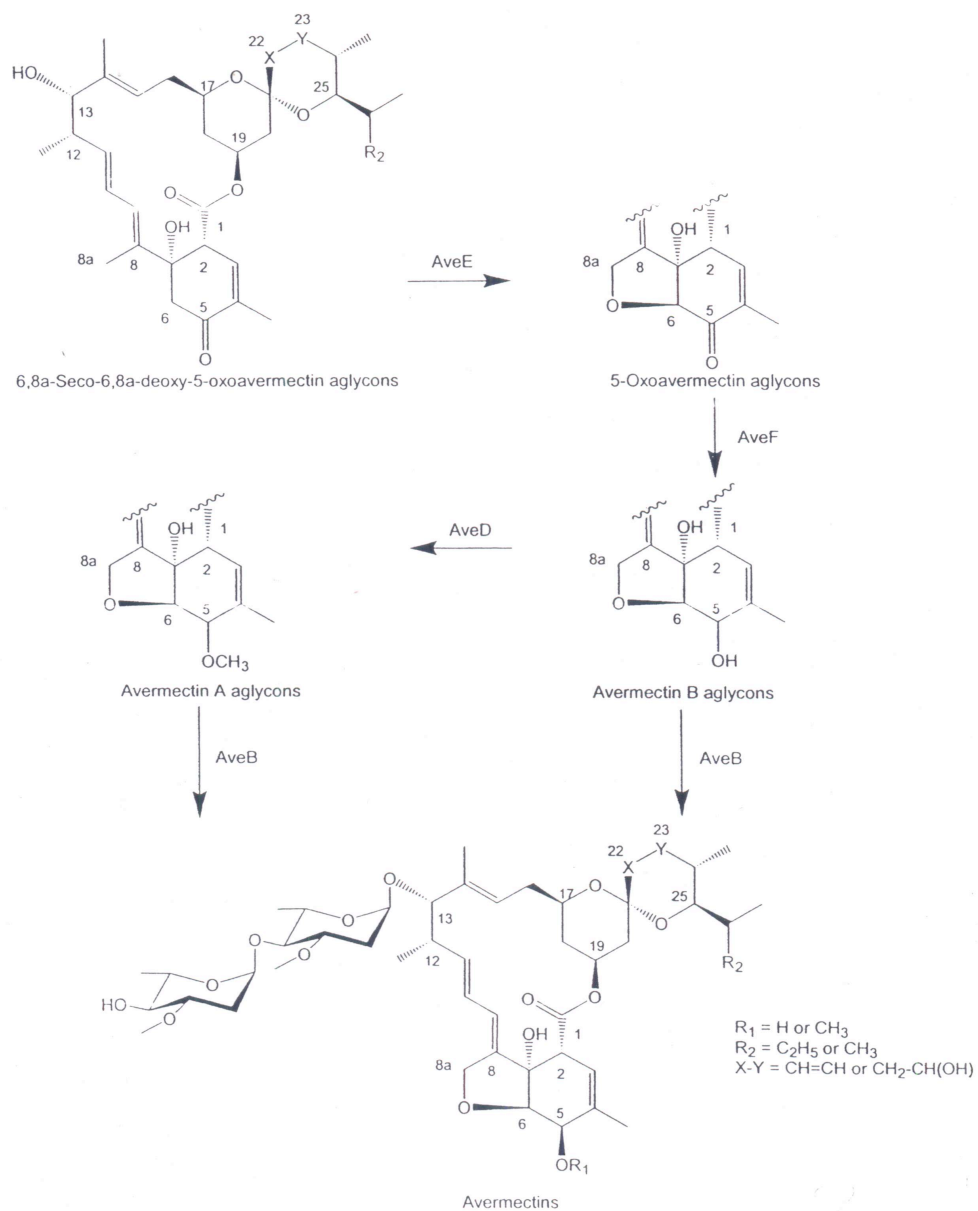


Figura 2.3. Ruta propuesta para las modificaciones post-policétido en la biosíntesis de avermectinas (Yoon *et al.*, 2003).

2.3.4. Glicosilación del aglicón de avermectina usando desoxitimidina difosfato (dTDP)-L-oleandrosa para formar avermectinas.

En los pasos finales de la síntesis de la avermectina glicosilada interviene un derivado de la oleandrosa (dioxitimidin difosfato oleandrosa), para así formar la avermectina como se muestra en la figura 2.4 (Satoshi *et al.*, 2001). El gen *aveB1* codifica una glicosiltransferasa para catalizar el paso de incorporación de oleandrosa dentro del aglicón (Yoon *et al.*, 2003).

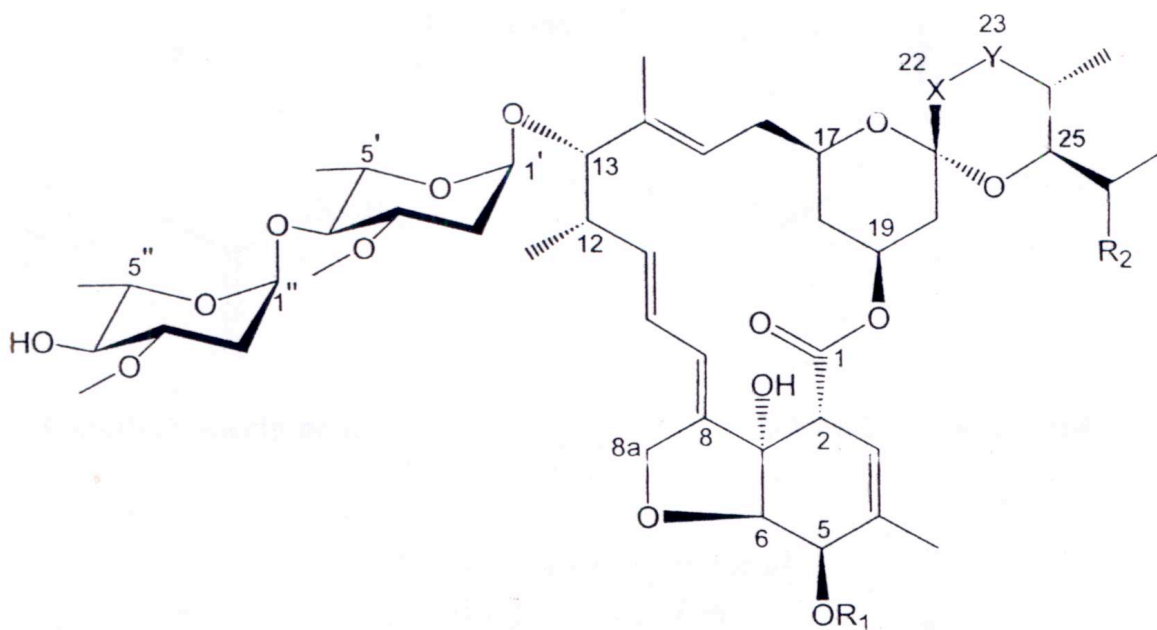


Figura 2.4. Estructura química de la ivermectina (Yoon *et al.*, 2003).

2.3.5. Regulación de la biosíntesis de avermectinas

Se cree que el gen *aveR* codifica a un regulador positivo en la producción de avermectinas, ya que la secuencia polipeptídica traducida demuestra identidad significativa con diversas secuencias predictivas por tener un dominio de unión *helix-loop-helix* (Mac Neil, 1988).

Los análisis de la secuencia mostraron que el producto de *aveR* contiene un *helix-loop-helix* que le permite unirse al ADN, lo cual también fue encontrado en otras probables proteínas reguladoras. El tamaño del gen *aveR* es de 5 kb, mucho más grande que otros reguladores positivos de rutas específicas que involucran la producción de metabolitos secundarios (Yoon *et al.*, 2003).

Mientras que casi todos los genes reguladores de rutas específicas se localizan dentro del conjunto de genes cuya expresión controlan, los genes de regulación global (broad-domain regulators) se localizan fuera del conjunto de genes, estos últimos pueden controlar la biosíntesis de más de un antibiótico (Yoon *et al.*, 2003). Vease figura 2.5.

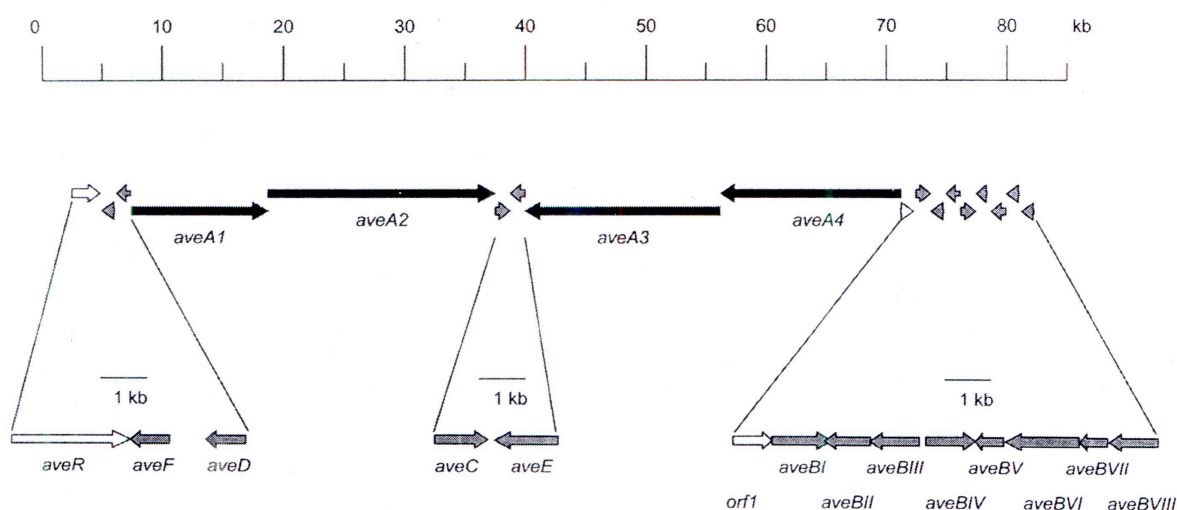


Figura 2.5. Organización del *cluster* para la biosíntesis de avermectinas. La dirección de la transcripción y los tamaños relativos de los ORFs deducidos del análisis de la secuencia de nucleótidos son indicados (Yoon *et al.*, 2003).

2.4. Cluster Biosintético

Tanto el interés en la salud como el interés económico que tienen las avermectinas han llevado a profundizar los estudios en el conocimiento sobre su producción, de tal manera que se ha secuenciado completamente el *cluster* biosintético (Ikeda *et al.*, 2003).

Los genes involucrados en la producción de avermectina están organizados dentro del *cluster* en una manera similar a los de otros policétidos complejos, incluyendo los genes de la eritromicina en *Sacchapolyspora erythraea*, y la rifamicina, en *S. hygroscopicus* (Weber, 1985).

La secuencia de 82 Kb del *cluster* biosintético ha sido determinada, encontrándose que contiene 18 ORF's. La organización genética del *cluster* parece reflejar bien el módulo natural ordenado de las PKS (Haruo *et al.*, 2003).

Cuatro extensos ORF's (*aveA1*, *aveA2*, *aveA3* y *aveA4*) codifican los policétidos multifuncionales, constituyendo la avermectina policétido sintasa. Dentro de este *cluster*, dos grupos convergentemente transcritos, de las seis repeticiones modulares, *aveA1-aveA2* y *aveA3-aveA4*, generan los doce módulos de actividad enzimática responsable de la elongación de la cadena de policétidos. (Mac Neil, 1988). Dos ORF's *aveC* y *aveE*, se encuentran entre los dos grupos de genes PKS y están implicados en la modificación del policétido (Mac Neil, 1988).

Hacia la izquierda, *aveD* y *aveF* transcriben una C5 O-metiltransferasa y una C5-Cetoreductasa, respectivamente, las cuales están asociadas con la modificación de los intermediarios de la avermectina. Corriente arriba de *aveA4* se encuentran varios genes que muestran homología con los genes de la síntesis de la oleandrosa (*aveBII-aveBVIII*) y los genes de la glicosilación (*aveB1*) implicados en la biosíntesis de los macrólidos (MacNeil, 1988).

La naturaleza modular del conjunto de genes de la policétido sintasa tipo I ha facilitado las investigaciones combinatorias para generar nuevos compuestos. La manipulación genética ha probado poder alterar el número, contenido y orden de los módulos dentro del *cluster* genético, resultando en la síntesis de nuevos policétidos (Cane *et al.*, 1983). Por ejemplo, el módulo de lectura para el policétido sintasa de la avermectina ha sido sustituido dentro del *cluster* genético de la eritromicina, en lugar de un dominio de lectura normal (Weber *et al.*, 1985). Este trabajo demostró que la expresión de la enzima híbrida resulta en la producción de nuevos análogos de eritromicina (Marsden *et al.*, 1998). Otros estudios comparativos entre los genomas de *S. coelicolor* y *S. Avermitilis* han revelado

una región altamente conservada, cuya importancia radica en que es una zona que contiene genes involucrados en su metabolismo secundario (Bishop *et al.*, 2004).

Otras evidencias sobre la relación que guardan distintas especies de *Streptomyces* es la descripción sobre la clonación de un fragmento regulador (ESCO5749) de *S. avermitilis* en *S. coelicolor*, el cual causa una sobreproducción de actinorrodina y undecilprodigiosina en este último (Bishop *et al.*, 2004), y la relación que guarda la osmoadaptación con la sobreproducción de antibiótico (Bishop *et al.*, 2004).

2.5. Proteínas transportadoras.

2.5.1. Proteínas Integrales de membrana.

Las proteínas integrales de membrana son aquellas que cruzan la membrana y aparecen a ambos lados de la capa de fosfolípidos (figura 2.6). Una parte de estas proteínas son glicoproteínas, proteínas que tiene unidos uno varios monosacáridos (Prakash *et al.*, 2001). La naturaleza de las proteínas de membrana determina su función; por ejemplo, las proteínas transportadoras son proteínas que cambian de forma para dar paso a determinados productos.

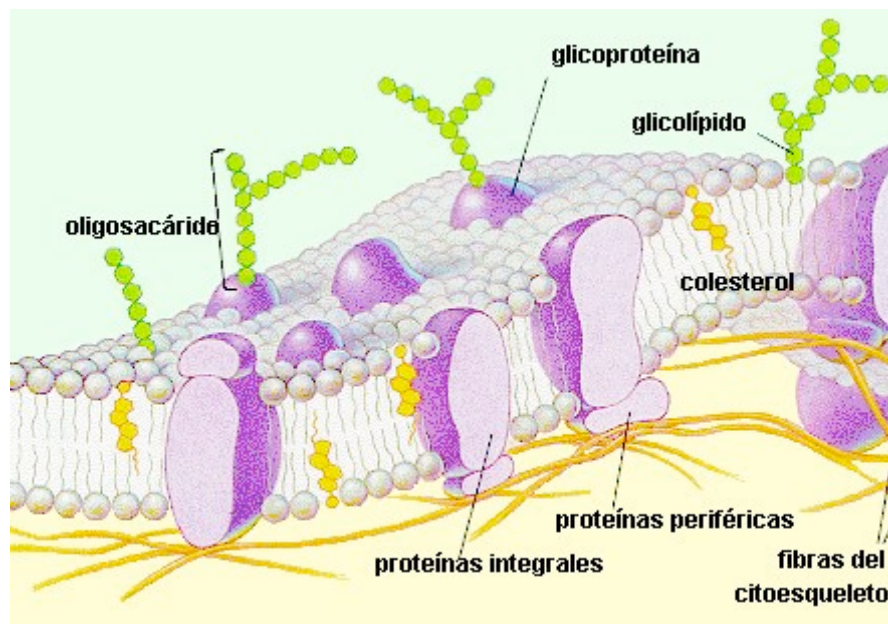


Figura 2.6. Proteína integral de membrana.

2.5.2. Sistemas de secreción mediados por proteínas integrales de membrana.

El mecanismo de resistencia a antibióticos más frecuentemente encontrado en actinomicetos productores de antibióticos es el que está mediado por proteínas integrales de membrana (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000). Este mecanismo, además, funciona como un sistema de secreción del antibiótico producido.

Se han identificado en muchos actinomicetos proteínas de membrana que funcionan como una bomba exportadora de antibiótico. Tal es el caso de *Streptomyces pristinaespiralis* (figura 2.7), productor de pristinamicina, en el cual el gen *ptr* codifica una proteína responsable de la exportación de dicho antibiótico mediante un sistema antiporte, pristinamicina/protón.

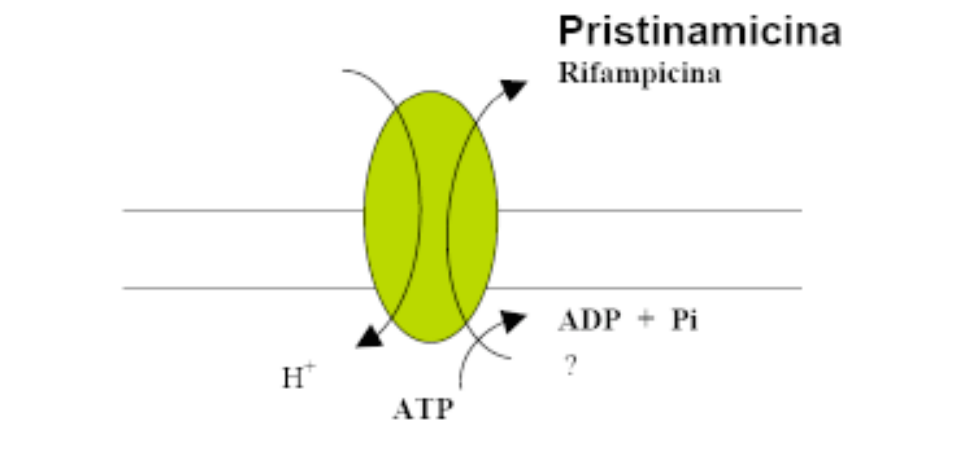


Figura 2.7. Mecanismo propuesto por Folcher *et al.*, (2001) para la exportación y resistencia a pristinamicina en *Streptomyces pristinaespiralis*, mediada por la proteína transmembranal Ptr.

Existe un mecanismo mediado por proteínas integrales de membrana (Paulsen *et al.*, 1996 y Putman *et al.*, 2000) que funciona como un sistema de transporte del metabolito secundario producido hacia el exterior de la célula. En microorganismos eucariontes que producen antibióticos como *Penicillium chrysogenum* (productor de penicilina) o

Acremonium chrysogenum (productor de cefalosporina), los antibióticos son concentrados en vesículas membranales internas y posteriormente son liberados al medio por un mecanismo de exocitosis. Sin embargo, los organismos procariontes no son capaces de formar tales vesículas, por lo que se ven obligados a excretar el producto generado mediante un sistema de transporte a través de membrana distinto. Las proteínas involucradas en este mecanismo son conocidas como “secondary multidrug transporters”. Estos sistemas bacterianos están divididos en cuatro familias:

- 1) Superfamilia de difusión facilitada. The **M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily (MFS),
- 2) Familia de resistencia a pequeños multifármacos. The **S**mall **M**ultidrug **R**esistance (SMR),
- 3) Familia de resistencia a la división celular. The **R**esistance **N**odulation-cell **D**ivision (RND),
- 4) La familia de excreción de compuestos tóxicos y multifármacos. The **M**ultidrug **A**nd **T**oxic **C**ompound **E**xtrusion (MATE).

Los cuatro sistemas participan en el transporte de monosacáridos y Oligosacáridos, y como intermediarios del ciclo de Krebs y otras vías metabólicas (Putman *et al.*, 2000).

Por mencionar algunos ejemplos, en *Streptomyces virginiae* (productor de virginamicina S), se ha demostrado que el producto del gen *varS* es una proteína que secreta al antibiótico. En un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de VarS se encontró una similitud de entre el 68 y el 73% con otras proteínas exportadores de antibióticos (Lee *et al.*, 1999).

Streptomyces venezuelae es productor de cloranfenicol, un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. En el conjunto de genes que codifica para las enzimas involucradas en la biosíntesis de cloranfenicol se encontró, mediante estudios topológicos y disrupción génica mediada por recombinación homóloga, que el producto del gen *cmIF* participa en el mecanismo de resistencia y exportación del cloranfenicol (He *et al.*, 2001).

Por otro lado, se encontró en el conjunto de genes de biosíntesis de candidina, un antibiótico sintetizado por *Streptomyces griseus*, dos genes relacionados con la exportación de dicho antibiótico, (Campelo y Gil, 2002). *Streptomyces antibioticus*, productor de simociclinona, posee dentro del grupo de genes de biosíntesis de este antibiótico dos genes que presentan una alta identidad con proteínas exportadoras, *simEx1* y *simEx2*. Además está presente un gen que codifica una proteína que presenta alta identidad con el represor TetR involucrado en la resistencia a tetraciclina (Trefzer *et al.*, 2002).

Por su parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el producto del gen *rifP* de *Amycolatopsis mediterranei* es la proteína que exporta y a la vez funciona como un sistema de resistencia a rifamicina (Absalón *et al.*, 2007). En ese sentido se realizó una búsqueda de posibles genes similares involucrados en el transporte de metabolitos secundarios, tomando como referencia a *Streptomyces pristinaespiralis* y *Amycolatopsis mediterranei*. Los resultados de la búsqueda mostraron un gen SAV4194 de *S. avermitilis* cuyo producto es similar al del gen *ptr* en *S. pristinaespiralis* y al gen *rifP* en *A. mediterranei*. La similitud encontrada fue del 79% con el gen de *S. pristinaespiralis* y del 74% con el de *A. mediterranei*.

3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la necesidad de la disminución de costos y a la disponibilidad a la comunidad en general de las avermectinas, es que se considera de gran importancia intensificar las investigaciones enfocadas al estudio de cómo incrementar la producción de dichos antibióticos.

En este sentido existen diferentes factores muy importantes que determinan los niveles de producto generado (metabolitos secundarios) y uno de ellos es la capacidad que tiene el microorganismo de secretarlo al medio. Además, conociendo que otros genes como el caso del gen *ptr*, el cual codifica para una proteína de transporte en *S. pristinaespiralis* y que existe un gen (SAV4194) en *S. Avermitilis* con un alto grado de similitud (79%), se espera que el producto del gen sea una proteína que transporte los metabolitos producidos al exterior de la célula.

De confirmarse lo anterior, se podría proponer como estrategia de mejoramiento genético el incremento de la dosis génica del gen SAV4194.

4. HIPÓTESIS.

De acuerdo a la evidencia que hay sobre la similitud que existe entre el gen SAV4194 de *Streptomyces avermitilis* y otros genes cuyo producto son proteínas exportadoras, se plantea la hipótesis:

El gen SAV4194 se expresa durante la producción de avermectina y su interrupción provocará la falta de la proteína membranal de transporte, con lo cual, el metabolito producido no será exportado al medio.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general

Determinar el papel del gen SAV4194 sobre la exportación de avermectina en *Streptomyces avermitilis*.

Objetivos específicos

- Construir un vector con el gen SAV4194 interrumpido con el transposón Tn5062.
- Obtener una cepa transformante con el gen SAV4194 interrumpido y evaluar su capacidad de exportación de metabolitos secundarios.
- Cuantificar la expresión del gen SAV4194 durante la trofofase e idiofase de *S. avermitilis* en diferentes medios de cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Microorganismos.

Streptomyces avermitilis ATCC31267, cepa silvestres donada por el Dr. P. Dayson.

Streptomyces avermitilis ATCC31780, cepa sobreproductora de avermectina.

Escherichia coli JM109, cepa que tiene una mutación en el genoma que impide que metile el ADN, por lo cual el ADN foráneo amplificado en esta cepa puede ser usado para la transformación de organismos con un sistema de restricción fuerte.

6.1.1. Conservación de los microorganismos.

Las células electrocompetentes de *E. coli* JM109 se almacenaron a -70°C en glicerol al 20% para su conservación.

Streptomyces avermitilis se conservó mediante suspensión de esporas (1×10^9) que se almacenó a -20°C en glicerol al 20%.

Para la obtención de nuevas esporas se prepararon cajas Petri con 25 ml de medio SFM en las cuales se añadieron 20ml de la suspensión de esporas. La suspensión de esporas se hizo de la siguiente manera:

1. Se tomó una caja de Petri que contenía un césped *S. avermitilis* ya esporulado y se le adicionaron 2 ml de glicerol al 20%.
2. Posteriormente con un asa flameada se raspó suavemente la superficie de la caja para despegar la mayor cantidad de esporas posibles.
3. Se hizo cuenta de esporas
4. Finalmente con una micro pipeta se tomaron las esporas y se colocaron en viales, las cuales fueron almacenadas como se indicó previamente.

6.1.2. Condiciones de cultivo de los microorganismos.

A las células de *E. coli* transformadas con ADN plasmídico se les agregó un antibiótico de selección de acuerdo al gen de resistencia contenido en el plásmido.

Para el caso de *E. coli* JM109 transformada con el plásmido pME6 se agregó Kanamicina (Km). La concentración de la solución patrón de antibiótico fue de 25 mg/ml y se llevó a una concentración final en el medio de cultivo de 25 mg/ml. *E. coli* JM109 transformada con el plásmido pQM5062 se utilizó Apramicina (Apm). La concentración de la solución patrón de antibiótico fue de 100 mg/ml y la concentración final utilizada en el medio de cultivo fue de 100 mg/ml. *S. avermitilis* se cultivó en 25 ml de medio SFM, sin antibiótico y se incubó a 28°C durante 7 días.

6.2. Plásmidos.

A continuación se muestran las características y mapas de restricción de los plásmidos utilizados durante este trabajo:

El plásmido pGEM®-T *Easy Vector* (figura 6.1) contiene un gen de resistencia a la ampicilina (Apm), pUC ori, un origen de replicación del fago f1, y un fragmento del gen *lacZ* capaz de complementar la mutación en la subunidad α de la β -galactosidasa presente en algunas cepas de *E. coli*. Posee una región de clonación múltiple con enzimas de corte único en medio de la secuencia del gen *lacZ*. Esta característica permite seleccionar transformantes que hayan integrado el plásmido con un color crema en presencia de IPTG y X-gal ya que la inserción de un fragmento en la región de clonaje múltiple del plásmido

provoca la desaparición del color azul. Posee además secuencias complementarias para oligonucleótidos M13 que permiten secuenciar los productos clonados y los promotores SP6 RNA polimerasa y T7 RNA polipemerasa.

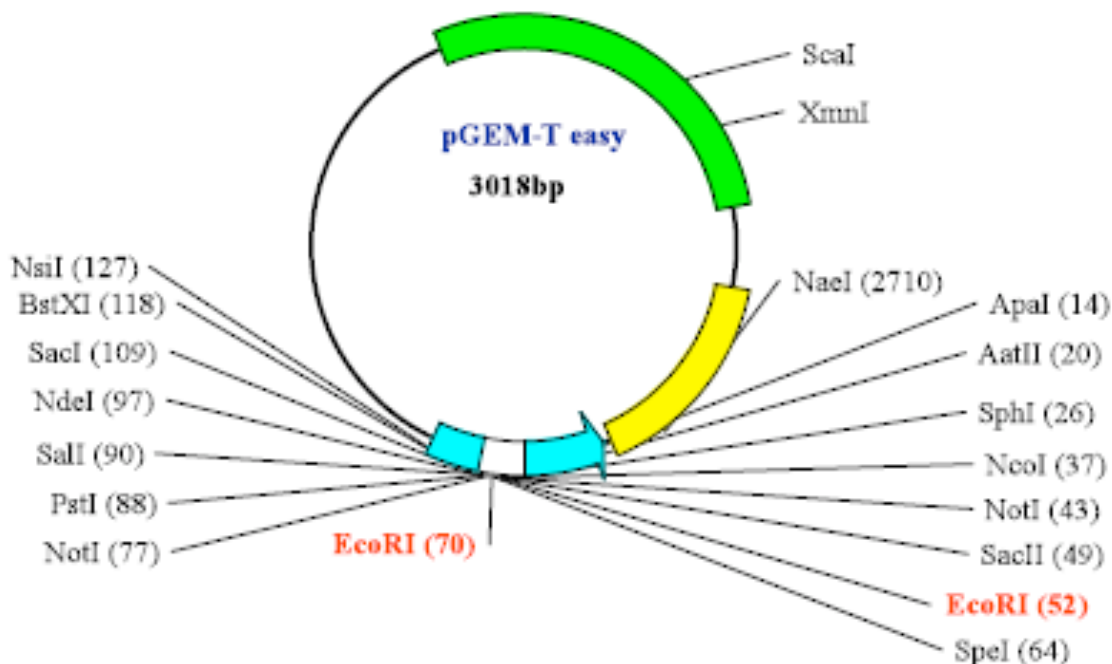


Figura 6.1. Mapa del pGEM®-T Easy Vector.

El plásmido pME6 (figura 6.2) contiene un gen de resistencia a Kanamicina (Km), pUC ori, un origen de replicación del fago f1, y un fragmento del gen *lacZ*. Posee una región de clonación múltiple con enzimas de corte único en medio de la secuencia del gen *lacZ*. Otro de los plásmidos utilizados en el presente trabajo fue el pQM5062. Este plásmido posee resistencia a la Apramicina (Apm) y tiene insertado un Transposón llamado Tn5062 de 3442pb.

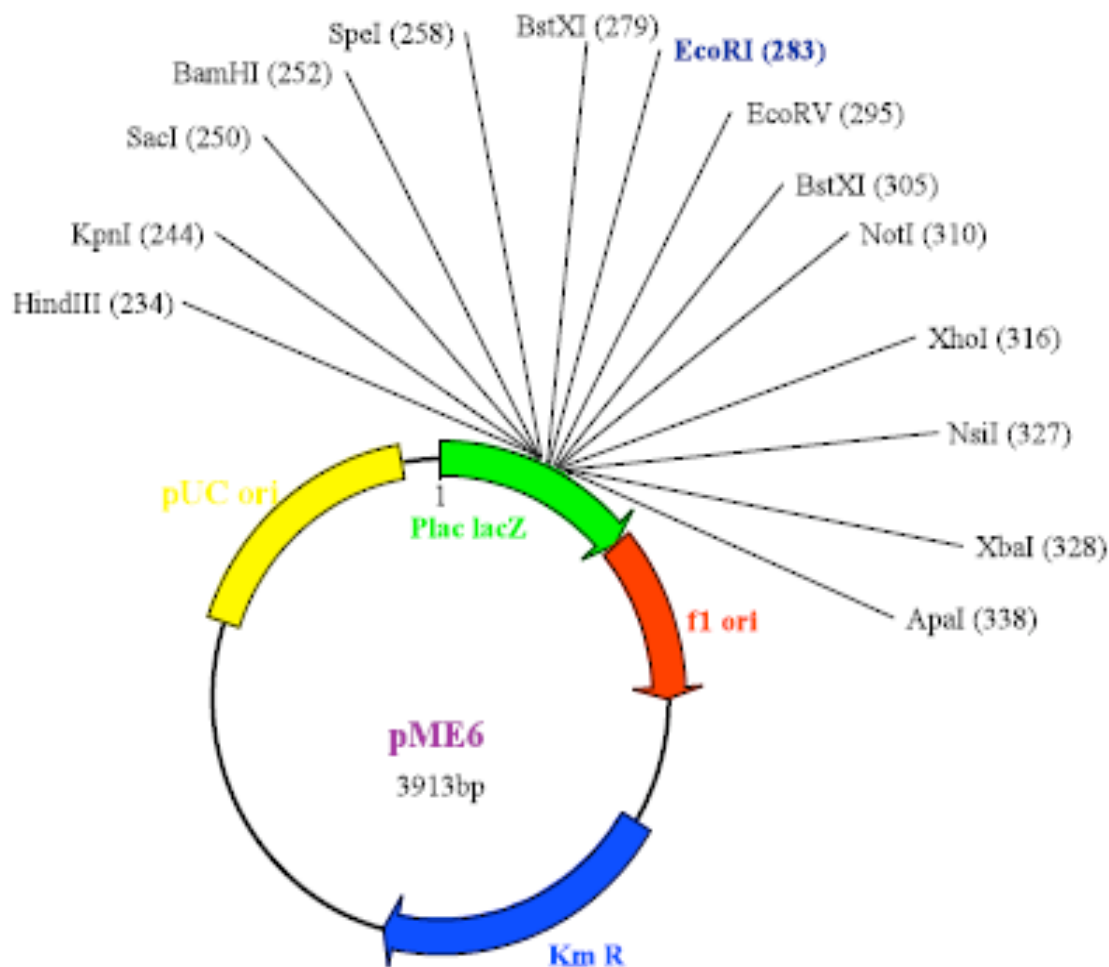


Figura 6.2. Mapa del plásmido pME6.

6.3. Transposón.

Los elementos genéticos transponibles son secuencias de ADN que tienen la propiedad de cambiar de posición dentro del genoma, por tal causa también reciben el nombre de elementos genéticos móviles. Cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio, se produce una deleción o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen.

De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen se produce una adición de una gran cantidad de nucleótidos que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen. Por consiguiente, los elementos genéticos transponibles producen mutaciones. Su existencia fue propuesta por B. Mc Clintock (1951 a 1957) en maíz, sin embargo, su existencia no se demostró hasta mucho más tarde en bacterias. En el fenómeno de la transposición no se ha encontrado una relación clara entre la secuencia de la sede donadora (lugar en el que está el transposón) y la sede aceptora (lugar al que se incorpora el transposón). Algunos transposones muestran una preferencia por una determinada región (zona de 2000 a 3000 pares de bases), pero dentro de ella parecen insertarse al azar. En bacterias existen dos tipos de elementos genéticos móviles:

Transposón Simple. Secuencia de Inserción o Elemento de Inserción (IS): los transposones simples contienen una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos una secuencia repetida en orden inverso. Esta secuencia repetida en orden inverso no es necesariamente idéntica, aunque sí muy parecida. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de la secuencia diana (5-12pb).

Transposón Compuesto (Tn): contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los Factores de transferencia de resistencia (RTF), poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos (apramicina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, etc.).

El transposón Tn5062 (figura 6.3) que se extrajo del plásmido pQM5062 es del tipo compuesto (Tn) y contiene resistencia a la apramicina. A este transposón se le eliminó el gen que codifica para la transposasa para que una vez dentro del genoma no pueda transponerse a otros sitios provocando la interrupción de otros genes que no son de interés para el presente estudio.

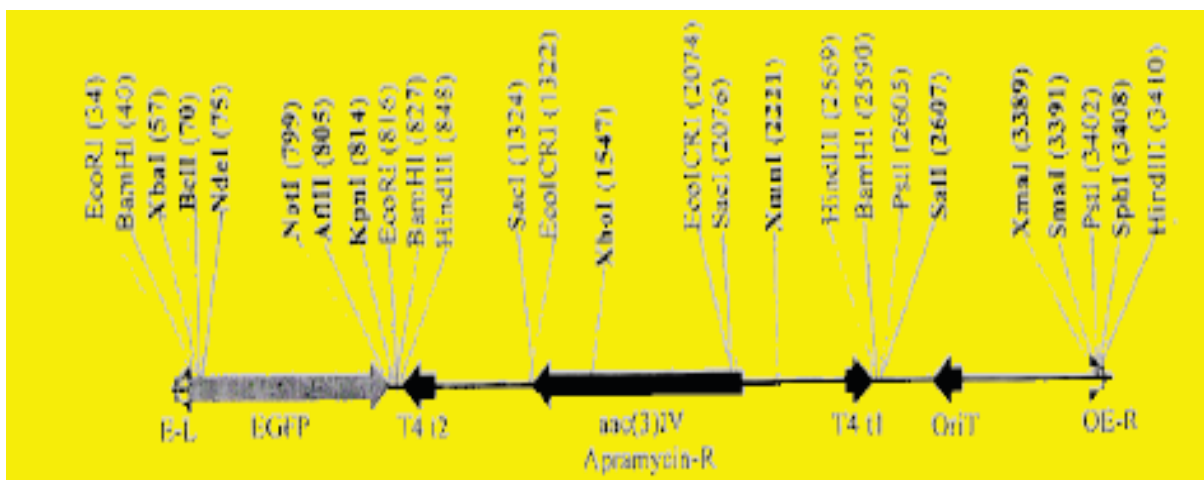


Figura 6.3. Transposón Tn5062. (E-L y OE-R) Secuencias repetidas invertidas que flanquean una región interna que contiene los siguientes elementos: (EGFP) Gen sin promotor que produce una proteína verde fluorescente, (aac3(IV)) gen de resistencia a la apramicina flanqueado por sus dos terminadores transcripcionales (T4t2 y T4t1) y un origen de transferencia (OriT).

6.4. Medios de cultivo.

Medio Luria-Bertani (LB) líquido (Miller, 1972).

Este medio se utilizó tanto para recuperar las células de *E. coli* JM109 después del choque térmico durante la transformación con ADN plasmídico, como para crecer células de *E. coli* y extraer su ADN plasmídico después de haber sido transformadas.

Bacto-triptona	10.0g
NaCl	10.0g
Extracto de levadura	5.0g
dH ₂ O aforar	1L
pH = 7.2 con NaOH	

Medio LB agar. Este medio se utilizó para crecer y aislar células de *E. coli* JM109 después de haber sido transformadas.

Bacto-triptona	10.0g
NaCl	5.0g
Extracto de levadura	5.0g
Agar	15.0g
dH ₂ O aforar	1L
pH = 7.2 con NaOH	

Medio 2X YT (extracto de levadura-triptona 2X). Este medio se utilizó para obtener biomasa de la cepa nativa de *S. avermitilis* y extraer ADN total.

Bacto-triptona	10.0g
NaCl	5.0g
Extracto de levadura	10.0g
Agar	20.0g
dH ₂ O aforar	1L

Medio SFM. Este medio fue utilizado para obtener esporas de *S. avermitilis*.

Manitol	20.0g
Harina de soya	20.0g
dH ₂ O aforar	1L
pH = 7.2 y esterilizar	

Medio ϕ (phage) líquido. Utilizado para obtener biomasa de *S. avermitilis* y extraer ADN.

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.5g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	4.2g
Extracto de levadura (Difco)	5.0g
Glucosa monohidratada	10.0g
Triptona	5.0g
Lab-lemco powder (Oxoid)	5.0g
Agar	15.0g
H ₂ O de la llave, aforar	1L
pH = 7.2 con NaOH y esterilizar	

Medio 1F manitol. En este medio se crecieron colonias de *S. avermitilis* que se usaron para ser transformadas con ADN plasmídico. Se esterilizó una papa sin cáscara durante 20min en autoclave a 20lb. Se molió la papa y se agregaron la soluciones en el siguiente orden:

Papa	20.0g
CaCl ₂ (al 20%)	1.9ml
MgSO ₄ (al 5%)	0.5ml
NaCl (al 20%)	1.9ml
KNO ₃ (al 20%)	5.0ml
K ₂ HPO ₄ (al 5%)	0.6ml
Manitol (cf = 0.75M)	27.3g
Agar	4.0g
dH ₂ O aforar a 200ml.	
Se esterilizó a 20lb durante 15 min.	

Medio SFM sorbitol 0.75M. Utilizado para crecer a *S. avermitilis* para ser transformado por la técnica de biobalística.

Manitol	20.0g
Harina de soya	20.0g
Sorbitol	136.6g
dH ₂ O aforar	1L

Medio YPD. Medio de propagación para *S. avermitilis* (Pitman *et al.*, 2001).

Extracto de levadura	5.0g
Peptona	5.0g
Dextrosa	2.5g
Agar	14.0g
dH ₂ O	500ml
pH = 6.9	

Medio Ap-5. Medio utilizado para la producción de oligomicina (Pitman *et al.*, 2001).

Acido glutámico	0.6g
FeSO ₄	0.01g
*Solución de metales traza	1.0ml
Almidón de maíz soluble	80.0g
Extracto de levadura	5.0g
CaCO ₃	7.0g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g
Agar	17.0g
dH ₂ O, aforar	1L

*Solución de metales traza. Se esteriliza aparte y se agrega a la mezcla anterior.

ZnCl ₂	20.0mg
FeSO ₄ . 7H ₂ O	20.0mg
MnCl ₂ . 4H ₂ O	20.0mg
dH ₂ O	20.0ml
pH = 6.9	

Medio MS (Hobbs *et al.*, 1989). Usado para crecimiento rápido, buena esporulación y en conjugación.

Manitol	20g
Harina de soya	20g
Agar	20g
Agua Aforar a	1L

Medio de Producción de avermectinas (MP) (Hwang *et al.*, 2001).

Sacarosa	70.0g
Harina de soya	14.0g
Extracto de levadura	2.5g
NaCl	0.1g
CaCO ₃	1.0g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MOPS	10.0g
H ₂ O Aforar	1L
pH = 7.24	

6.5. Extracción y purificación de ADN total de *S. avermitilis*.

Este método se utilizó para aislar ADN total y utilizarlo como ADN molde en la amplificación del gen SAV4194 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción de ADN total de *Streptomyces avermitilis* se hizo con el protocolo *del kit DNA system purification (Promega®)*.

6.6. Aislamiento y amplificación del gen de interés.

6.6.1. Diseño de oligonucleótidos para PCR.

En el diseño de los oligonucleótidos se partió de la secuencia del gen SAV4194 (figura 6.4) previamente descubierta en el Instituto Kitasato de Japón por el Dr. Omura S. y colaboradores en 2001; la cual se encuentra en el banco de genes del “*National Center of Biotechnology Information*” (NCBI).

Los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes:

5'-TTA**CTTAAG**CTACGCGGACGCCGC- 3' R

Con un contenido de C+G = 58.33%, Tm de 76°C y longitud 24b.

5'- TAG**GAATTC**ATGTCCACCTCCCCG-3' F

Con un contenido de C+G = 54.17%, Tm de 74°C y longitud 24b.

Fueron diluidos hasta una concentración de 5 pmol/ml.

CTACGCGGACGCCGC Secuencia complementaria del extremo 3' del gen SAV4194

ATGTCCACCTCCCCG Secuencia que corresponde al extremo 5' del gen SAV4194

CTTAAG y **GAATTC** Sitio de corte que reconoce la enzima *EcoRI*

atgtccacctccccggctcccagggtccccagggccacccccagcgctggctgatcctc
gggtcatctgcctcgcgcagctaccgtcctgctcgacaacaccgtgctgaacgtggcg
atccccctcctcaccgggagctggcgcgggcagctccgacatccagtgatgaac
gcctactcgtggtgcagtcgggctgctgctcaccgcgggcagcgcgggcaccgctac
ggccgcaagaagatgctgatcgcggggctcgcgctgttcggcgctggttccctgatgcc
ggactcgccgactccaccgggagctgatcgccgcgggccgggatgggtgggcgggc
gcgctgctgctgaccacgacctcgccgtggcgatgcagatcttctcgcccaggagacc
ccgaaggcgatcggcatctggagcgggtaacgcgctgggcttcgcggtcggccccctt
ctcggcggttcatgctgaaccacttctggtggggcgatcttctgatcaacctgccg
gtggcgcgctggggctggtcgggtcatgccctcgtgccgagtcgaagaatccgagc
ggcgaccggcccagccctgggcccgtactctccacgatcggcatgacctgctcgtg
tacgcgatcatctcggggccggagcacggctggacctgggaggggtgctgctgaccgcg
gccgtggcggtggccgtgctgggggcttcgctactgggagagccggatcccgtacccc
atgctggacctgcacttctccgggaccggcgcttcacgggcgggctcggggcggtg
ctcatcaccttcggcatggcgggcgctgttctgctcaccagcacctccagtctgc
ctcgggtacggggcggtggaggcgggcctcggacggccccgctcgcgctctcgggtggtg
gcgctgaacttctcggggctgctggcgaagtggagcggcgaagctgggcgcgccggtgctg
atcgcgctcggcatggcgctgatgccggcgactggtgctgatcgcgacgctcggccc
gacggctacggcggcacgctcgtcggcctgctcctcatcggcggggctgcgctcggcc
aaccgcatggtgctacgcatcatgagcgcgatcccccggaaggcgggcggtgggc
gcgggcatcaacggcacgctcggcagttcggcaacggcctggcggtggcggtgctcggc
gcggtcctcaactcccgttcggcgctgatcccggctcggcgctcctcgtcggcg
gcgctggcgctcggcggtatcgccgaggagcgcggacggatcacggacgcttctcatcg
ggcctggagaccagcagctggtgggcccgggtggccgtgctgctcggcgactgctggcg
gcggcggtgctgcggggcgagcgggagactccgcggtggcgggctccgcgtag

Figura 6.4. Secuencia del gen SAV4194.

6.6.2. Amplificación del gen SAV4194 mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

Esta técnica se basa en la actividad de las ADN polimerasas, cuya función es sintetizar en dirección 5' flecha 3' una cadena de ADN a partir de una cadena molde, oligonucleótidos y desoxiribonucleótidos.

Las ADN polimerasas *Pfu* polimerasa y *Taq* polimerasa, provenientes de los microorganismos termófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermus aquaticus* respectivamente, se han utilizado preferentemente en esta técnica por su estabilidad a las altas temperaturas requeridas para desnaturalizar el ADN.

Con esta técnica es posible amplificar fragmentos específicos de ADN, acotados por los oligonucleótidos diseñados para tal efecto, mediante la repetición de tres pasos:

1) desnaturalización del ADN molde, 2) hibridación de los oligonucleótidos a cada una de las cadenas molde y 3) polimerización a partir de los cebadores.

1) La desnaturalización del ADN molde es el primer paso para amplificar el ADN; este proceso se debe realizar a temperaturas altas (entre 93 y 95°C, durante 3-5 minutos en el primer ciclo, y posteriormente entre cada ciclo solo 1 minuto) para romper los puentes de hidrógeno que mantienen el apareamiento de Watson y Crick y permitir la separación de las dos cadenas complementarias de ADN.

2) La hibridación de los oligonucleótidos a cada una de las cadenas molde, la temperatura óptima va a depender de los oligonucleótidos, la diferencia de temperatura entre ellos no debe de ser mayor de 2°C. Al estar presentes los cebadores en alta concentración, estos tienden a unirse al ADN molde antes que la cadena molde complementaria lo haga. Una temperatura de hibridación menor a la óptima favorece la unión inespecífica de los cebadores a otras regiones del ADN.

3) Finalmente, en el paso de polimerización a partir de los oligonucleótidos es donde interviene la ADN polimerasa termoestable, cuya temperatura óptima de amplificación se encuentra entre 70 y 75°C. Esta enzima sintetiza la cadena complementaria a partir de los oligonucleótidos. Para obtener una alta cantidad de ADN amplificado, estos tres pasos se repiten entre 25 y 35 ciclos.

Es recomendable que el número de ciclos no sea muy alto ya que la frecuencia de mutaciones por parte de la *Taq* ADN polimerasa se incrementa exponencialmente a partir del ciclo 30. Por otro lado el uso de 25 ciclos en la amplificación ocasiona un bajo rendimiento. Se recomienda que el número de ciclos sea de 30, por lo que a partir de una sola copia del ADN molde presente en la mezcla, es posible obtener 1 073 741 824 copias en 30 ciclos.

Para amplificar el gen en este trabajo se utilizó la *Taq* ADN polimerasa ya que aun cuando el tamaño del gen que se deseaba amplificar tiene más de 1000pb y esta enzima podría tener más de un error cuando lo amplificara, no era importante puesto que el objetivo era interrumpir el gen.

Previo a la preparación todos los componentes de la mezcla de reacción con excepción de la *Taq* ADN polimerasa, se homogenizaron perfectamente. Durante la preparación de la mezcla los tubos se mantuvieron a 4°C.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Agua	28.0µl
10Xbuffer (NH ₄) ₂ SO ₂	5.0µl
MgCl (25mM)	4.0µl
Dimetilsulfóxido (10%)	5.0µl
ADN (100ng/ml)	1.0µl
Oligo F (5 pMol)	2.0µl
Oligo R (5 pMol)	2.0µl
dNTPs (10mM)	2.0µl
Enzima (5u/µl)	1.0µl
Volumen Total	50.0µl

Hecha la mezcla se homogenizó por agitación suave y se les aplicó un pulso en la centrífuga durante 3 seg.

La reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos con el siguiente programa:

1. Temperatura de desnaturalización	T = 95°C 3 min
2. Temperatura de desnaturalización	T = 95°C 1 min
3. Temperatura de Hibridación	T = 66°C 45 seg
4. Temperatura de elongación	T = 72°C 1.45 min
5. Ir al 2 rep 30	
6. Incubación	T = 4°C

La posición del Gen SAV4194 dentro del genoma se muestra en la figura 6.5.

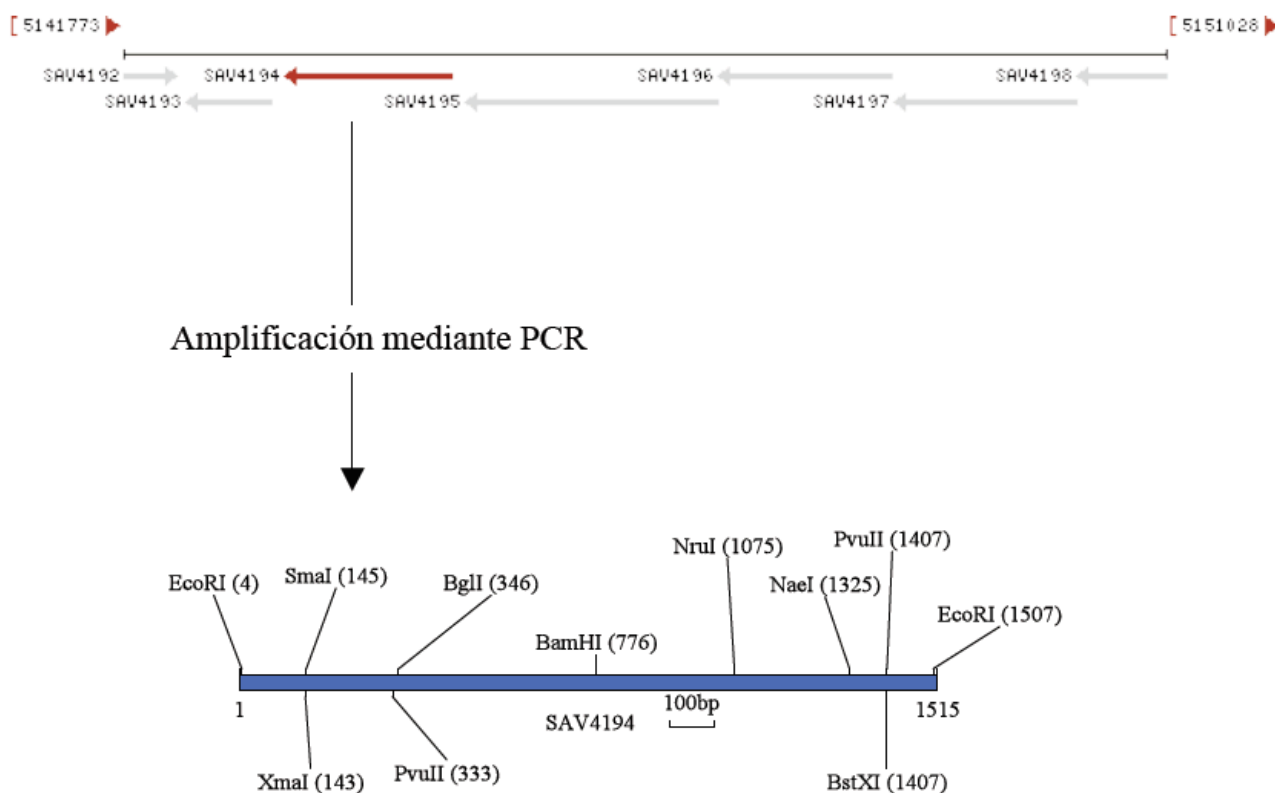


Figura 6.5. Gen SAV4194 amplificado mediante la técnica de PCR.

6.6.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.

Para separar los fragmentos de ADN se utilizó la electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó agarosa SeaKem LE (grado biología molecular) en concentraciones entre 0.5-1.0% según el caso, disuelta en solución TAE 1% y con bromuro de etidio a una concentración de 0.02 µg/ml. El gel se sumergió en la cámara de electroforesis y se cubrió con solución TAE 1% 0.5 cm por encima del gel.

Las muestras se mezclaron con 1/10 del volumen de tampón de carga y se cargaron en los pocillos del gel. Se sometieron a una diferencia de potencial de entre 50 y 100 V.

El bromuro de etidio es un reactivo que se intercala con el ADN y permite su visualización mediante radiación ultravioleta (UV). Los geles se observaron a través de un fotodocumentador *GelDoc* 2000 de BioRad®, y las imágenes fueron procesadas mediante el *software Quantity One* de BioRad®.

Para identificar los tamaños de los fragmentos de ADN observados se utilizaron marcadores de peso molecular hechos con el ADN de fago I digerido con endonucleasas de restricción. Se utilizaron:

- 1) ADN del fago & digerido con la enzima *HindIII*, que genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.
- 2) ADN del fago & digerido con *EcoRI*, que genera tamaños de 24756, 7421, 5994, 5643 y 4878pb.
- 3) ADN del fago & digerido en doble digestión con *HindIII* y *EcoRI* que genera tamaños de 24,756, 5,148, 4,973, 4,268, 2,027, 1,904, 1,709, 1,375, 947, 831 y 564pb.

También se utilizaron dos marcadores comerciales: 1Kb el cual genera 14 bandas de tamaños 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250pb y 1Kb que genera 13 bandas de tamaños 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250pb

6.6.4. Aislamiento y purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

Cuando se encontraron las condiciones adecuadas para la amplificación del gen, el producto del PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% y la banda que correspondía al

tamaño del fragmento esperado, se cortó y purificó con el protocolo de *Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®).

6.7. Preparación de células electrocompetentes (*E. coli* JM109).

El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

1. Se tomaron alícuotas de 50 μ l de las células electrocompetentes y se pusieron en 5 ml de medio LB líquido en un frasco. Cuando se partió de colonias, se tomó una de ellas con una punta y se colocó en un frasco que contenía de 5 a 10 ml de medio LB.
2. Se incubaron un tiempo de 18 a 20 hrs a 37°C y 250 rpm.
3. Posteriormente se tomaron alícuotas de 400 μ l y se colocaron en 40 ml de medio de cultivo LB.
4. Se incubaron por 3 horas o hasta observar un medio turbio y después de esto los siguientes pasos se hicieron en frío.
5. Se distribuyó el cultivo en alícuotas de 500 μ l, en tubos *Eppendorf* y se centrifugaron a 14000 rpm durante 3 min a 4°C. Se tiró el sobrenadante.
6. Se adicionó 1ml de glicerol al 10% y se centrifugó a 14000 rpm durante 3min a 4°C. Se tiró el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más.
7. Y finalmente se agregaron de 40-50 μ l de glicerol al 10% para su conservación a -70°C.

6.8. Transformación de *E. coli* JM109 con los plásmidos pME6 y pQM5062.

Una vez que se prepararon las células electrocompetentes de la cepa de *E. coli* JM109, fueron transformadas mediante la electroporación con el plásmido pME6. Otra alícuota de la misma suspensión fue transformada con el plásmido pQM5062. La técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Se agregaron 1.5 μ l de plásmido, ya fuera pME6 o pQM5062 en 50 μ l de células JM109 contenidas en un *ependorf*.
2. Después se colocó el contenido del *Eppendorf* en la celda de electroporación y se le aplicaron dos pulsos de 1000 volts.
3. Posteriormente se sacó la celda y se le agregaron 400 μ l de medio LB líquido.

4. Con una micropipeta se tomó el contenido de la celda y se colocó en un nuevo Eppendorf para incubarlo a 37° C a 250 rpm durante 1 hr.

5. En este lapso de 1 h se prepararon cajas con medio LB agar con su respectivo antibiótico.

Cuando se transformó con el plásmido pME6 se utilizó Kanamicina. En este caso se adicionaron 50 µl de Km en 50ml de LB agar en cada caja. Cuando se transformó con el plásmido pQM5062 se utilizó Apramicina. En este caso se adicionó 50 µl de Apm en 50 ml de LB agar en cada caja. También se preparó una caja sin antibiótico como control.

6. Ya habiendo transcurrido la hora, se tomaron 130 µl aproximadamente de las células transformadas y se agregaron a las cajas previamente preparadas. Se hizo un césped y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas.

6.9. Purificación de los plásmidos pME6 y pQM5062.

Para la extracción y purificación de los plásmidos, se prepararon previamente cultivos de la siguiente manera:

1. Se tomó con una punta una colonia transformada con el plásmido de interés, de 16 hrs de incubación aproximadamente, y se colocó en un frasco que contenía de 5 a 10 ml de medio LB líquido con su respectivo antibiótico. Se hicieron 4 frascos. Los frascos fueron incubados a 37°C a 250rpm durante aproximadamente 16 horas.

2. Transcurridas las 16 hrs, se utilizó el protocolo del *kit Wizard(R) Plus Minipreps DNA Purification Sistem* (Promega®), con la modificación de que el paso 4 se omitió ya que *Streptomyces avermitilis* es una bacteria gram positiva y este paso es para bacterias gram negativas. También se hizo extracción de plásmido siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se tomó con una punta de micropipeta, una colonia transformada con el plásmido de interés de 16hrs de incubación aproximadamente y se colocó en un frasco que contenía de 5 a 10 ml de medio LB líquido con su respectivo antibiótico. Se hicieron 4 frascos. Los frascos fueron incubados a 37°C a 250 rpm durante aproximadamente 16hrs.

Trascurrido las 16hrs, se tomó 1.5 ml del cultivo y se colocó en un *Eppendorf*. Se utilizó un *Eppendorf* por cada frasco con medio de cultivo.

2. Las células se colectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 350 μl de STET1, posteriormente se añadieron 20 μl de una solución de lisozima a una concentración de 10 mg/ml en agua para una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
3. Los tubos se mezclaron durante 1 min y posteriormente se hirvieron en un baño de agua durante 90 segundos. Las proteínas, los restos celulares y el ADN cromosómico se precipitaron inmediatamente por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min y se eliminaron con un palillo estéril.
4. Para precipitar el DNA plasmídico, se agregaron 40 μl de acetato de sodio 3M, pH = 5.2 y 600 μl de isopropanol. Se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min.
5. Finalmente se centrifugó el DNA plasmídico a 14000 rpm durante 5 min y se lavó el precipitado con 500 μl de etanol al 70%(v/v). Se secó y se resuspendió en 50 μl de agua estéril.

6.10. Digestión de los plásmidos pME6 y pQM5062 así como del gen SAV4194.

Para clonar el gen SAV4194 en el plásmido pME6 fue necesario digerir tanto el plásmido como el gen con la enzima *EcoRI* (figura 6.6). La mezcla de reacción fue la siguiente:

Agua	24.0 μl
10X buffer (1X)	5.0 μl
pME6 (50ng/ μl)	20.0 μl
Enzima (12u/ μl)	1.0 μl
Volumen Total	50.0 μl

Agua	14.0 μl
10X buffer (1X)	5.0 μl
SAV4194 (10ng/ μl)	30.0 μl
Enzima (12u/ μl)	1.0 μl
Volumen Total	50.0 μl

1. Se agregó a la solución de ADN - 1/10 de volumen de AcNa 3M. Para este experimento se agregaron 5 µl, puesto que se tenían 50 µl de solución. - 2 volúmenes de etanol 100%. Para este trabajo se agregaron 100µl.
2. Se mezcló y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente o a -20°C durante 1hr. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y a 4°C.
3. Se descartó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente.
4. Después se agregaron 500 µl de etano al 70% frío y se agitó en vortex de manera rápida. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.
5. Finalmente se resuspendió el ADN en 50µl de agua libre de DNAsas. Las muestras se almacenaron a -20°C

6.11. Ligación del producto de PCR en el vector *pGEM®-T Easy* y su purificación.

Este sistema se basa en la actividad de transferasa terminal independiente del molde que presentan algunas polimerasas como la enzima *Taq* ADN polimerasa. Esto da como resultado la adición de un nucleótido en el extremo 3' (Clark, 1988) (Mole *et al.*, 1989) durante la amplificación de fragmentos por PCR. La actividad de transferasa terminal puede agregar cualquiera de los 4 nucleótidos (dAMP, dTMP, dCMP, y dGMP) en esa posición, pero preferentemente se incorpora un nucleótido de adenina (dAMP), con lo cual los fragmentos amplificados por PCR tienen en su mayoría extremos 3' con un nucleótido adenina protuberante (Clark, 1988).

La actividad de transferasa terminal independiente de molde de la *Taq* ADN polimerasa se puede utilizar para el ligado de fragmentos amplificados por PCR con una extensión A-3', utilizando un vector linearizado con un nucleótido de timina 3' protuberante lo que permite el apareamiento de Watson y Crick y favorece la reacción por parte de la T4 ADN ligasa. El uso de este sistema es más eficiente que la ligación de extremos romos. Y también que la ligación de fragmentos digeridos con una sola enzima de restricción, porque con estos puede generarse un alto número de plásmidos recircularizados, mientras que el "TA-cloning" el número de recircularizaciones es menor debido a que los extremos 3'T no permiten apareamiento de Watson y Crick, por lo que no pueden ser ligados.

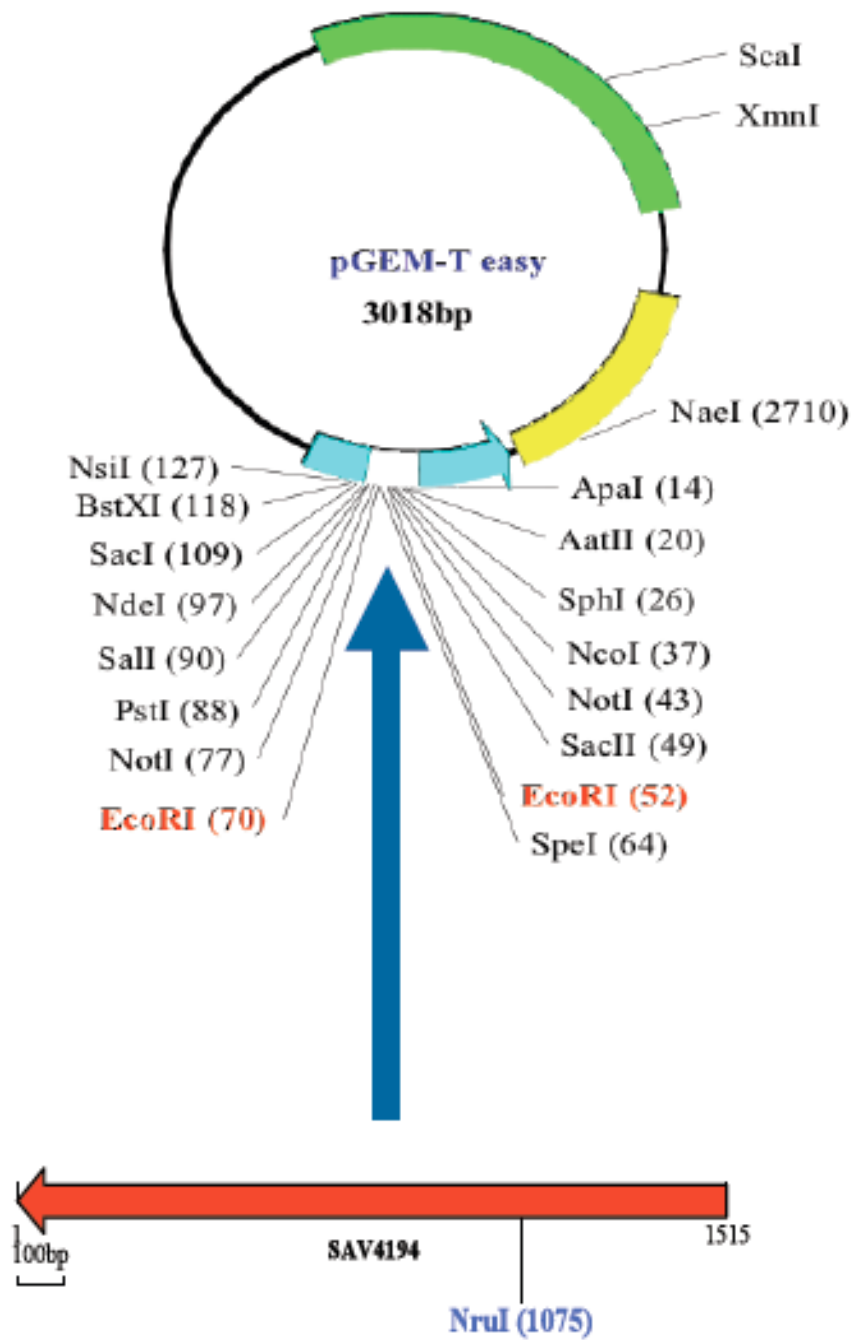
Según lo expuesto por los proveedores (Promega®), la construcción del vector pGEM®- T se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Marchuk *et al.*, en 1991.

El vector linearizado pGEM®-T se construyó a partir del plásmido pGEM®-5Zf(+) linearizado con la enzima *EcoRV*, y posteriormente se agregó el extremo 3' T con la enzima *Taq* polimerasa.

Fue necesario utilizar este vector debido a que los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar el gen SAV4194 no contenían los sitios de corte que se les pidieron a los fabricantes. Por lo que al ser clonado el gen dentro de este vector (figura 6.7 y 6.8) se solucionó el problema ya que en el sitio múltiple de clonación hay un sitio de reconocimiento para la enzima que en un principio se esperaba. El protocolo de ligación fue el siguiente: Se dio un pulso al tubo del vector y para homogenizar el buffer de ligación se usó vortex por 20 seg. Todo el procedimiento se realizó en hielo.

Buffer 2x de ligación rápida	5.0µl
Vector (50ng/µl)	1.0µl
SAV4194 (50ng/µl)	3.0µl
T4 DNA Ligasa (3u/µl)	1.0µl
Volumen Total	10.0µl

*Se mezcló con la micropipeta, se dio un pulso en la centrifuga y se cerró el tubo *Eppendorf* con *parafilm* para evitar la evaporación. Se incubó la mezcla a 4°C por 16 hrs. Posteriormente se transformó la cepa JM109 de *E. coli* con la mezcla de ligación mediante electroporación, con el objetivo de amplificar el nuevo vector.



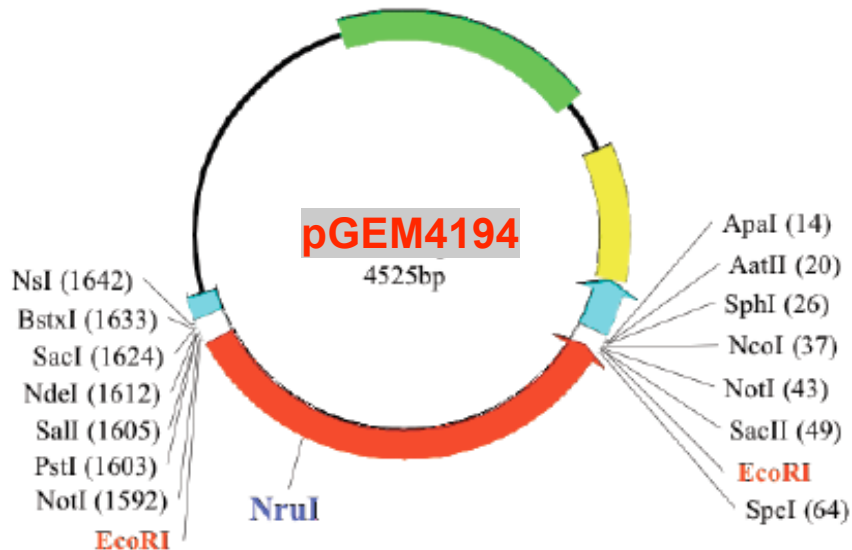


Figura 6.8. Clonación 1. pGEM4194.

6.11.1. Digestión del vector pGEM4194

Las condiciones de digestión fueron las siguientes:

Agua estéril	1.5µl
Vector (100ng/µl)	15.0µl
10X Buffer H (1X)	2.0µl
Enzima (EcoRI) (12u/µl)	1.5µl
Volumen Total	50.0µl

Se incubó durante 1h a 37° C. Se inactivó la actividad de la enzima incubando la mezcla a 74° C durante 15 min.

6.12. Clonación del gen SAV4194/EcoRI en el plásmido pME6 y su purificación.

Antes de ligar el gen sav4194 en el plásmido pME6 (figura 6.9) se desfosforiló el vector con el fin de prevenir que el plásmido se religara dando falsos positivos.

Condiciones:

H2O estéril	2.5µl
pME6/EcoRI (480ng/ml)	15.0µl
10Xbuffer E (1X)	2.0µl
*Enzima TSAP (20u/µl)	0.5µl
Volumen Total	20.0µl

*Fosfatasa de camarón

Se incubó la mezcla a 37°C por 25 min e inmediatamente después se inactivó la enzima incubando la mezcla a 74°C por 15 min.

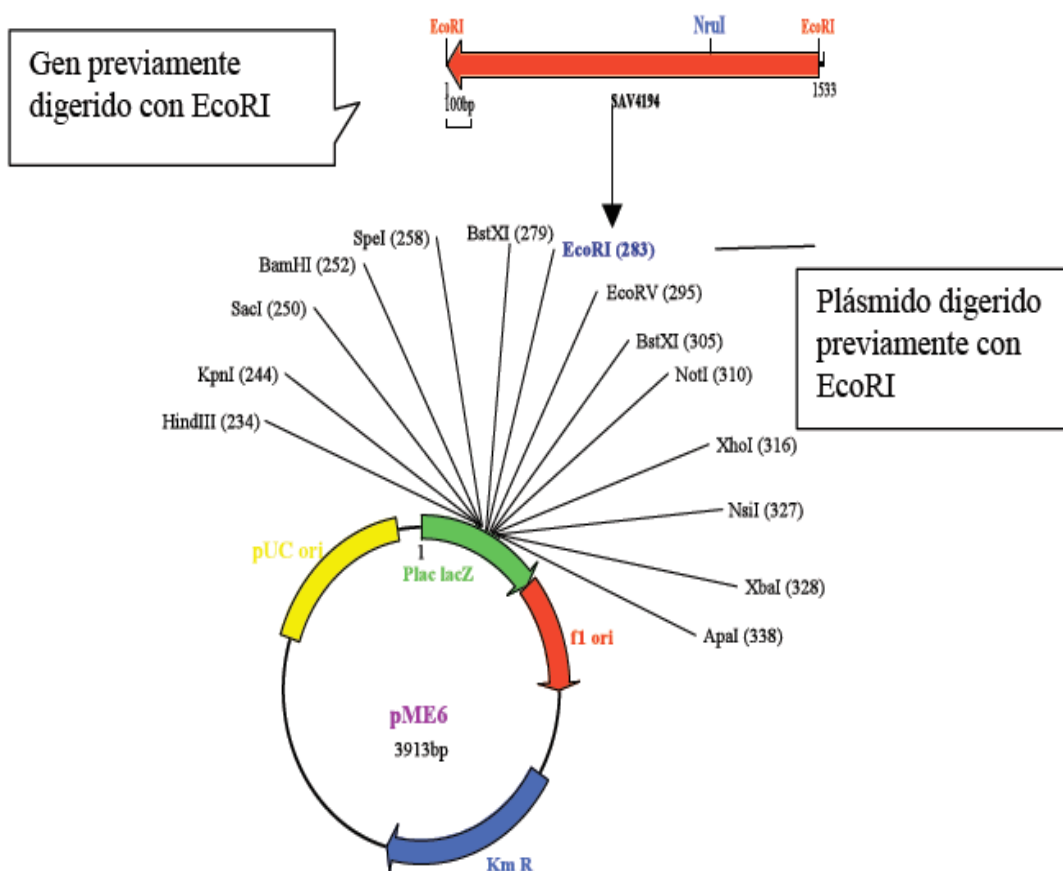


Figura 6.9. Clonación del gen SAV4194/EcoRI en pME6.

Para realizar la ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa y las condiciones fueron las siguientes:

10X buffer (1X)	1.0µl
pME6 (40ng/µl)	2.0µl
Inserto (20ng/µl)	6.0µl
Enzima (3u/µl)	1.0µl
Volumen Total	10.0µl

Se le dio un pulso en la centrífuga para mezclar y se dejó durante 6 días a 4°C.

Después se colocó el *Eppendorf* con la ligación en hielo y se le agregaron 30 µl de agua libre de DNAsas. Más tarde se electroporó a *E. coli* JM109 con la ligación. El procedimiento realizado fue el anteriormente descrito pero con la siguiente modificación del paso 5:

5. En el lapso de 1h se prepararon 3 cajas con 25 ml de medio LB agar, 50 microlitos de Kanamicina, 40 µl de X-gal y 15 µl de IPTG. Para la purificación de este nuevo plásmido, pME6-4194, se utilizó el procedimiento previamente descrito. Cabe resaltar que las colonias seleccionadas fueron las de color crema y esto debido a: β-galactosidasa y X-Gal. *E. coli* utiliza los productos de la hidrólisis de la lactosa: la glucosa y la galactosa. La β-galactosidasa hidroliza la lactosa, pero si no la encuentra en el medio de cultivo, *E. coli* expresa solamente muy poco de β-galactosidasa. Al contrario, en presencia de lactosa, la β-galactosidasa es abundantemente expresada.

La β-galactosidasa hidroliza también el substrato sintético X-gal: ella produce entonces un compuesto coloreado de azul. LacZ alfa péptido (lacZ). El LacZ-alfa péptido es una parte de la β-galactosidasa que no posee actividad por sí misma, pero que es necesaria para la acción de la enzima. LacZ forma parte del gen de β-gal. Es posible cortar la secuencia LacZ y meterla en un plásmido donde ella utilizará el péptido alfa. Existen cultivos comerciales de *E. coli* a los cuales se les ha quitado el alfa péptido y de plásmidos que contienen ése péptido.

Para este estudio se utilizó las células de *E. coli* JM109 que precisamente no tienen la subunidad alfa y el plásmido utilizado pME6 contiene LacZ-alfa. Pero debido a que en este plásmido se clonó el gen SAV4194 dentro del sitio LacZ-alfa, las bacterias no tendrán actividad β -gal, por lo que la coloración de las células seleccionadas fueron las cremas. Como ya se mencionó, la lactosa cuando está presente es un inductor de la expresión de β -gal pero existen otros compuestos capaces de reaccionar e inducir. En el laboratorio, se utilizó como inductor el isopropil - β -D-galactosido (IPTG). Solo que al contrario de la lactosa, el IPTG no es metabolizado y subsiste en el medio.

A continuación se muestra gráficamente como quedó la ligación (figura 6.10).

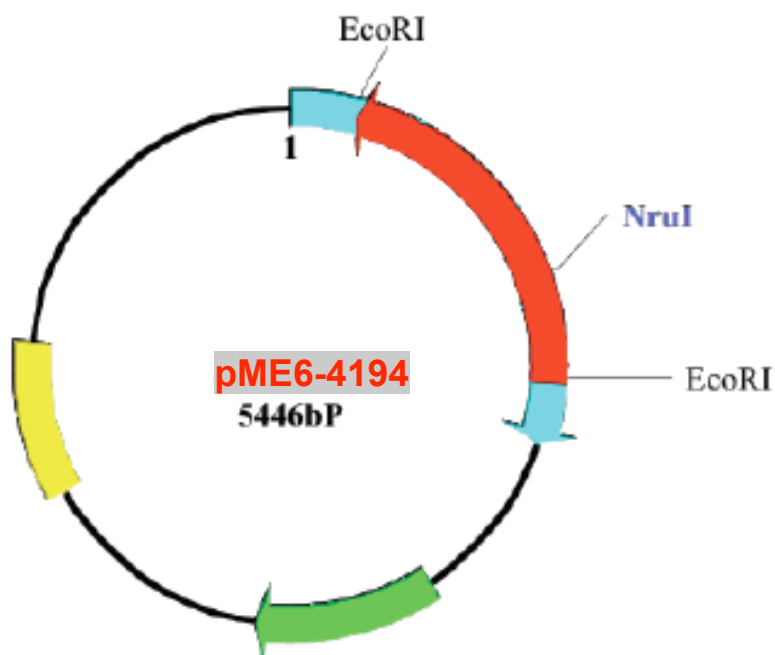


Figura 6.10. Mapa del plásmido pME6-4194 con un sitio de reconocimiento para la enzima *NruI*, en donde será insertado el Tn5062.

6.12.1. Digestión de pME6-4194.

Después de haber sido purificado el plásmido, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y mediante la técnica de electroforesis se corrió un gel de agarosa al 1% para ver mediante el tamaño de las bandas si se obtuvo el plásmido esperado.

El protocolo de digestión realizado fue el siguiente:

Agua	2.0µl
10X buffer (H) (1X)	1.0µl
pME6-4194 (50ng/µl)	5.0µl
Enzima (10u/µl)	1.0µl
Volumen Total	10.0µl

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora.

6.13. Interrupción del gen SAV4194 con el transposón Tn5062.

Para esta parte del trabajo ya se contaba con el transposón Tn5062 con extremos romos hechos por la enzima *PvuII* y también con el gen SAV4194 clonado en el plásmido pME6. Este plásmido se digirió (descrito previamente) con la enzima *NruI*, que al igual que la enzima *PvuII*, también deja extremos romos. Vease figura 6.11.

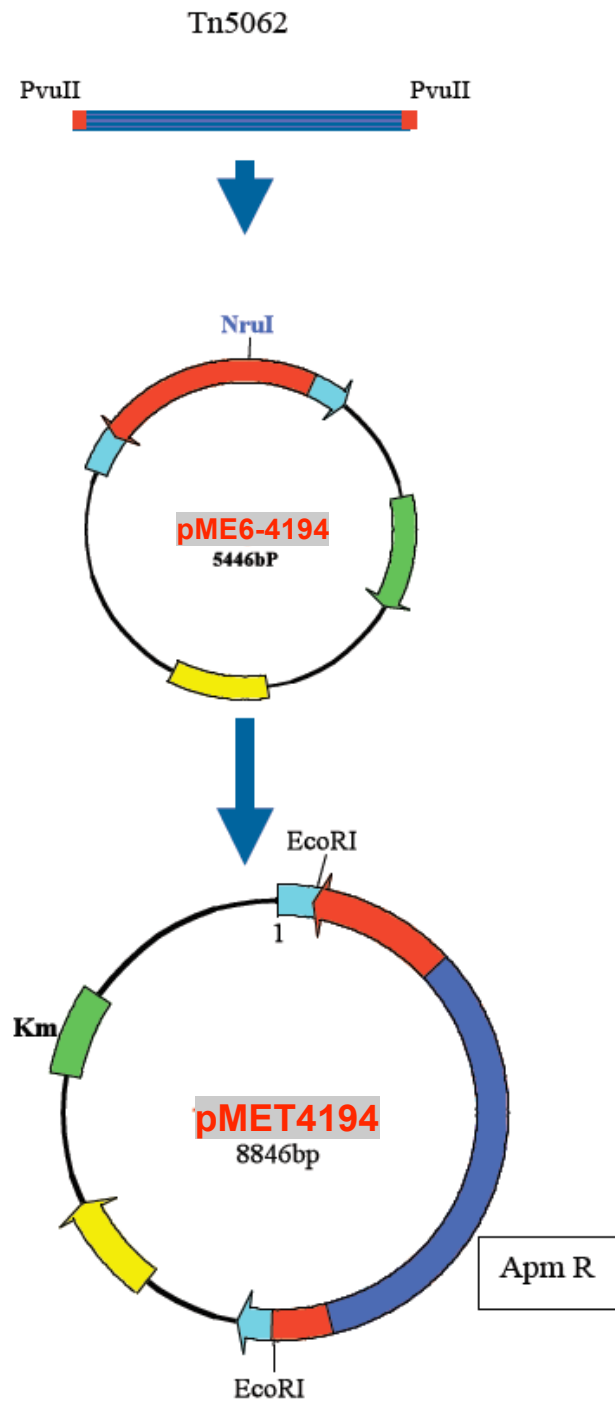


Figura 6.11. Vector pMET4194

6.13.1. Digestión del plásmido pME6-4194.

La enzima utilizada en esta digestión fue la *NruI*.

Condiciones de reacción:

dH ₂ O	3.5µl
10X buffer (H) (1X)	1.0µl
Vector (50ng/µl)	5.0µl
Enzima (10u/µl)	1.0µl
dH ₂ O	3.5µl
Volumen Total	10.0µl

Se incubó a 37°C durante una hora y posteriormente se inactivo la enzima a 74°C durante 15 min.

6.13.2. Desfosforilación del vector pME6-4194.

La enzima utilizada para la desfosforilación fue la fosfatasa de camarón (TSAP).

dH ₂ O	3.5µl
10X buffer (H) (1X)	1.0µl
Vector (50ng/µl)	5.0µl
Enzima (10u/µl)	1.0µl
dH ₂ O	3.5µl
Volumen Total	10.0µl

6.13.3. Clonación del Tn5062 en el plásmido pME6-4194.

La reacción de ligación fue la siguiente:

5X buffer T4 DNA Ligasa (1X)	3.0µl
Vector (25ng/µl)	2.0µl
Inserto (20ng/µl)	8.5µl
Enzima (3u/µl)	1.5µl
5X buffer T4 DNA Ligasa (1X)	3.0µl
Vector (25ng/µl)	2.0µl
Volumen Total	10.0µl

Se incubó la mezcla de ligación a 4°C durante 6 días.

Posteriormente se transformó a *E. coli* JM109 con esta mezcla de ligación mediante la técnica de electroporación y se hicieron minipreps con el objetivo de purificar y amplificar el nuevo vector pMET4194. El protocolo es el descrito por el *kit Lizard® plus sv minipreps* de Promega®.

6.13.4. Digestión del vector pMET4194.

Para linealizar el plásmido ya purificado, se digirió con la enzima de restricción *NruI*. Posteriormente mediante la técnica de electroforesis se corrió un gel de agarosa al 1% para ver por el tamaño de las bandas si se obtuvo el plásmido con el gen SAV4194 interrumpido por el transposón. El protocolo de digestión realizado fue el siguiente:

dH ₂ O	3.5µl
10X buffer (H) (1X)	1.0µl
Vector (50ng/µl)	5.0µl
Enzima (10u/µl)	0.5µl
Volumen Total	10.0µl

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1hr y para inactivar la enzima se incubó la mezcla a 74°C durante 15 min.

6.14. Transformación de *S. avermitilis* mediante biobalística.

Debido a que en el presente trabajo no fue posible transformar a *S. avermitilis* con las técnicas de electroporación, protoplastos, y muy baja eficiencia con la técnica por conjugación ; fue necesario implementar la técnica de biobalística. Este método de transformación usa presión de helio para introducir los Microacarreadores revestidos de ADN dentro de las células. Tiene alta eficiencia de transformación y consiste en:

6.14.1. Preparación de las células blanco.

Las condiciones finales fueron:

Se tomaron 23.5 µl de una suspensión de 5X10⁸ esp/ml de *S. avermitilis* y se sembraron por césped en una caja de Petri que contenía 25ml de medio SFM sorbitol 0.75M. Se incubó la placa a 28°C por 18 h.

6.14.2. Preparación de *microcarriers*.

Preparación para 120 bombardeos usando 500 µg de microcarrier por bombardeo.

1. En un tubo de 1.5 ml se pesaron 30 mg de micropartículas de tungsteno .
2. A las micropartículas de tungsteno se le agregaron 1ml de etanol al 70%.
3. Durante 5 min se agitó vigorosamente (con vortex).
4. Para permitir que las micropartículas se empaparan de etanol se dejó reposar por 15 min.
5. Por 5seg se centrifugo para obtener un pellet.
6. El sobrenadante se descartó.
7. Se le adicionó 1 ml de agua estéril.
8. Por 1 min se agitó vigorosamente
9. La mezcla se dejó reposar durante 1 min.
10. Nuevamente se centrifugó durante 5 seg para obtener un *pellet*.
11. El sobrenadante se descartó .
12. Se repitió el lavado con agua 3 veces.
13. Y finalmente se añadieron 500µl de glicerol al 50% estéril.

Las micropartículas fueron almacenadas hasta por dos semanas a -20°C en un ambiente seco.

6.14.3. Revestimiento de *microcarriers* con DNA.

Este procedimiento fue para 6 bombardeos. Durante este procedimiento fue muy importante agitar continuamente.

1. Las partículas en glicerol se agitaron vigorosamente durante 5min para destruir aglomerados.
2. En un tubo estéril de 1.5 µl se colocaron 50 µl de las partículas en glicerol (el resto se almacenó a -20°C por un máximo de 2 semanas).
3. Con agitación fuerte y continua se agregaron en orden:
 - ◇ 5µl de ADN (1µg/µl)
 - ◇ 50µl de CaCl₂ 2.5M
 - ◇ 20µl de Spermina .1M (grado cultivo celular).
4. Durante 3min se continuó agitando.
5. La mezcla se dejó reposar durante 1 min.
6. Para colectar el pellet se centrifugó durante 2 seg.
7. El líquido se descartó .
8. Se adicionaron 140 µl de etanol al 70% (grado HPLC).
9. Y se descartó el líquido.
10. Se adicionaron 140 µl de etanol al 100% (grado HPLC).
11. El líquido se descartó.
12. Se adicionaron 48 µl de etanol al 100%.
13. Y finalmente se resuspendió el *pellet* por agitación manual.

6.14.4. Bombardeo.

1. Los parámetros de bombardeo se seleccionaron y ajustaron. La distancia fue de 9 cm.
2. La presión de helio se ajustó a 200 psi en exceso de la presión de ruptura.
3. El área de trabajo se limpió con etanol al 70% y se colocó todo el material estéril necesario.
4. Se colocaron 6 µl de los *microcarriers* revestidos de ADN en el *macrocarrier holder* dentro de una caja de Petri con una membrana de papel filtro sobre CaCl₂ como desecante.
5. El equipo se encendió.
6. Las paredes de la cámara se limpiaron con etanol al 70%.

7. El disco de ruptura ya estéril (para esterilizarlos, cada disco se sumergió en isopropanol al 70% y se colocaron en un papel filtro para secarlos) se colocó dentro del *Retaining cap* estéril.
8. Se fijó el *Retaining cap* al final del tubo de aceleración de gas y se apretó con la llave inglesa.
9. El *macrocarrier launch assembly* y las células blanco se colocaron dentro de la cámara y se cerró la puerta.
10. Se encendió el vacío a 10 pulgadas de mercurio.
11. La muestra se bombardeó con el botón FIRE continuamente presionado hasta que el disco de ruptura estalló y el nivel de presión de helio bajó a cero.
12. Cuando se liberó el vacío se removieron las células blanco de la cámara.
13. El *microcarrier launch assembly* se desarmó.
14. Se removió el disco de ruptura dañado.
15. Y se bajó la presión de Helio.

6.14.5. Selección de las mutantes con resistencia a un solo marcador.

Después de haber sido bombardeadas las células blanco por las micropartículas de tungsteno revestidas de ADN, fueron incubadas a 28°C durante 10 hrs. Transcurrido el tiempo se le agregó a cada caja Apm (cf: 12.5µg/ml) y se continuó la incubación por 7 días o hasta observar crecimiento de colonias transformantes. La aplicación del antibiótico se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. Se añadieron 6.25 µl de apramicina (100 mg/ml) a 1ml de agua estéril.
- b. Y se vertió todo sobre la caja. Se incubaron de nuevo las cajas hasta que el antibiótico se absorbió completamente y de manera uniforme en el medio.

6.15. Transformación de *S. avermitilis* mediante protoplastos.

También se trató de transformar a *S. avermitilis* mediante la técnica de protoplastos (Gong *et al.*, 2004) como se ha hecho con *S. venezuelae* y *S. clavuligerus* (Graças *et al.*, 2002; Jozef *et al.*, 1989 y Hwang *et al.*, 2001), entre muchos otros actinomicetos.

6.15.1. Preparación de protoplastos.

1. En un matraz de 250 ml se agregaron 50 ml de medio YEME y se inocularon con 150 mL de suspensión de esporas [107 esp/ml]. Se incubó a 28°C y 200 rpm durante 56 h.
2. Se homogenizó el cultivo y se tomaron 2 ml del precultivo para inocular un matraz que contenía 50 ml de medio LB (con 0.5% de glicina y 10% (p/v) de sacarosa). Se incubó a a 28°C y 200rpm durante 28 hrs.
3. Se centrifugó por 10 min a 4000 rpm.
4. Se lavó el *pelet* con 10 ml de NaCl al 0.9%.
5. Se centrifugó por 10 min a 4000rpm.
6. Se lavó el *pelet* con 10 ml de PTC.
7. Se centrifugó por 10 min a 4000 rpm.
8. Se prepararon 7 ml de PTC conteniendo 10 mg/ml de lisozima los cuales se esterilizaron por filtración. Se preparó en el momento.
9. Se resuspendió el *pelet* en 5 ml de la solución de lisozima y se incubó a 28°C a 120 rpm durante 2hrs. Durante este tiempo se formaron los protoplastos y se comprobó que estuvieran listos observándolos al microscopios
10. Se adicionaron 10 ml de PTC buffer, se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min (los protoplastos quedaron en suspensión y el micelio como *pelet*).
11. Se tomó la suspensión cuidadosamente y se transfirió a otro tubo estéril.
12. Se centrifugaron los protoplastos a 4000 rpm por 10 min.
13. Se lavaron los protoplastos con 10 ml de PTC buffer.
14. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min.
15. Se resuspendieron los protoplastos en 7 ml de PTC buffer hasta obtener una OD \approx 1.0.
16. Los protoplastos que no se utilizaron en el momento para la transformación se dividieron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a 70°C.

6.15.2. Transformación por protoplastos.

1. Se tomaron 200 ml de la suspensión de protoplastos y se colocaron en un *Eppendorf* estéril.
2. Se agregaron 3 ml de ADN [1 μ g/ml] a los protoplastos y se mezclaron suavemente por pipeteo.

3. Se adicionaron inmediatamente 500 mL de la solución de PEG 6000 al 35% y se mezcló cuidadosamente por pipeteo. El PEG se preparó en el buffer PTC y se esterilizó por filtración.
4. Se dejó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Se sembraron 150 ml en medio R2 y se incubaron a 28°C durante 20 hrs para que los protoplastos se recuperaran.
6. Se agregó 1 ml de antibiótico (cf = 12.5 mg/ml) en cada caja.

6.16. Transformación de *S. avermitilis* por la técnica de electroporación.

Electroporación fue otra de las técnicas que se desarrollaron en el presente trabajo para tratar de transformar a *S. avermitilis*. El protocolo fue el propuesto por Hwang y colaboradores (2001).

6.17. Estudios de expresión.

Se estudió la expresión del gen en los medios *Phage* (semilla), Medio de producción de avermectinas MP y Medio de producción de oligomicina AP-5.

6.17.1. Extracción de ARN.

El ARN total obtenido por medio de cualquier procedimiento de extracción y purificación debe de estar libre de proteína (*absorbencia* 260 nm/280 nm), libre de ADN genómico, no debe de estar degradado (con una baja cantidad de fragmentos cortos); libre de inhibidores enzimáticos para reacciones de RT y PCR y no debe de haber presencia de nucleasas si se va a almacenar por un largo periodo de tiempo (Fleige *et al.*, 2006).

La mayor dificultad que se presenta en la obtención de ARN de buena calidad y cantidad es debida a la existencia de ARNasas, enzimas muy activas que no necesitan cofactores para su actividad. Cualquier método que pretenda ser válido para la extracción de ARN debe cumplir una serie de requisitos:

- La extracción del ARN ha de realizarse en una solución que contenga algún agente capaz de inactivar las ARNasas (como el fenol, el dietilpirocarbonato o el isotiocianato de guanidina).

- Debe ser un método rápido y realizado en condiciones que no favorezcan la actuación de las ARNasas, como por ejemplo, efectuando el proceso de rotura de las células en presencia de nitrógeno líquido (proporciona una temperatura de -170°C que no permite la actividad de estas enzimas).
- Independientemente del método utilizado, es muy importante el uso de guantes a lo largo de todo el proceso, así como el aumento en el nivel de exigencia en cuanto al grado de limpieza del material utilizado y del lugar de trabajo. Las moléculas de ARN más representadas en la célula son las de ARN ribosómico (ARNr) y las de ARN de transferencia (ARNt), siendo minoritarias las moléculas de ARN mensajero (ARNm). La extracción del ARN para los 3 medios de cultivo se llevó a cabo utilizando columnas de extracción de SV Total RNA Isolation (Promega®) y/o por la técnica del trizol.

Cinética en medio *phage*.

En matraces de 250 ml se inocularon 25 ml de medio *phage* con 50 ml de una suspensión de esporas de 1×10^9 / ml y se incubaron a 28°C , 250 rpm.

La fermentación se monitoreó durante 20 hrs y se tomaron 3 muestras: a las 12 hrs, 15 hrs y 18 hrs. De muestra se tomaron 25 ml, se centrifugaron a 5000 rpm durante 8 min e inmediatamente el pelet se congeló con nitrógeno líquido para la técnica del trizol y para la técnica de extracción con el *kit* de promega, el pelet se trató de inmediato. Este medio también se utilizó como medio semilla para el preinoculo de MP y AP-5.

Cinética en medio de producción de avermectinas (MP) y en medio de producción oligomicina (AP-5).

Con 5 ml de precultivo se inocularon 20 ml de medio MP en matraces de 250 ml que contenían 50 perlas de vidrio. Las condiciones de incubación fueron las mismas en los tres medios de cultivo. El medio AP-5 se inoculó de la misma manera que el medio MP. Tanto la fermentación en medio AP como en MP para la extracción de ARN se monitorearon durante 8 días tomando una muestra de 5 ml cada 24 hrs.

6.17.2. Cuantificación de ARN.

La concentración y pureza del ARN se determinaron midiendo la absorbancia de 2 ml de muestra de ARN que se diluyeron con 998 mL de agua libre de RNAsas a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) en un espectrofotómetro. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 40 mg/ml de ARN ($A_{260}=1=40 \text{ mg/ml}$). La relación entre los valores de absorbancia A_{260}/A_{280} permiten estimar la pureza del ARN, considerándose como puro la siguiente relación: $1.7 > A_{260}/A_{280} < 2.0$.

6.17.3. Electroforesis en geles desnaturalizantes (agarosa/formaldehído).

Esta modalidad de electroforesis se utiliza para conseguir separar las moléculas de ARN en función de su tamaño. Para ello se añade formaldehído como agente desnaturalizante, con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN. La integridad y distribución de tamaños del ARN total purificado se comprueba en estos geles. Dos bandas claras correspondientes a los ARN ribosómicos 23S y 16S deben aparecer, siendo la banda de 23S dos veces más intensa que la de 16S. Si estas bandas no se presentan o aparecen como ARN de tamaño pequeño, es probable que la muestra se haya degradado. Los geles se prepararon de la siguiente manera:

En un matraz libre de RNAsas se agregaron 1.2 g de agarosa para RNA y 10 ml de MAE 10X con 84 ml de H₂O_d-DEPC. Se fundió la agarosa y cuando bajó la temperatura se agregaron 3 ml de formaldehído. Para cargar las muestras en el gel se agregaron 4 ml de *buffer* (bromuro de etidio incluido) por cada ml de ARN, se calentaron a 65°C por 15 min e inmediatamente se cargaron. Todo se preparó en tubos *Eppendorfs* libres de RNAsas. La cámara de electroforesis se lavó con SDS y agua libre de RNAsas.

6.18. RT-PCR.

La técnica de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) consiste en el empleo de una transcriptasa reversa para generar un ADNc a partir de una muestra de ARN, y posteriormente, amplificar este ADNc por medio de la reacción en cadena de la ADN polimerasa.

Ya que la evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico en la obtención de datos significativos en la expresión de genes (Fleige *et al.*, 2006) se realizó un PCR de cada muestra con oligos que amplifican la subunidad alfa de la RNA polimerasa puesto que ésta se expresa de manera constitutiva.

Debido a que es frecuente encontrar ADN junto con el ARN extraído, todas las muestras fueron tratadas con ADNasa y posteriormente se llevó a cabo un PCR con las condiciones ya establecidas para la amplificación del gen SAV4194 utilizando el ARN como molde de la reacción. Se repitieron los tratamientos con ADNasa hasta que estos ensayos por PCR dieron claramente negativos. Inmediatamente después del tratamiento con ADNasa, se llevó a cabo la RT-PCR siguiendo el protocolo descrito:

El coctel de reacción para RT-PCR:

Buffer 5X Quiagen	10.0µl
dNTPs	2.0µl
oligo 5' (0.6µM)	2.4µl
Oligo 3' (0.6µM)	3.4µl
Mezcla enzimática	2.0µl
RNA molde (1µg)	
H ₂ O-DEPC, Aforar a	50.0µl

El programa utilizado para RT-PCR fue:

1.	30min	50°C
2	15min	95°C
3.	1min	94°C
4.	1min	64°C
5.	3min	72°C
6 .	Ir a 3 rep 45 veces	72°C
7.	10min	
8.	HOLD	4°C

6.19. Tiempo real PCR (qRT-PCR).

La PCR en tiempo real permite detectar, amplificar y cuantificar secuencias de ADN. Además de proporcionar información cuantitativa el hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso de amplificación, permite detectar pequeñas variaciones en la cantidad de ARN inicial siendo por tanto muy sensible. La química de detección utilizada en el presente trabajo fue SYBR green 1.

Normalización de ARN en las muestras.

Antes de cuantificar la expresión, se normalizó la concentración de las muestras. Esto con el objetivo de evitar observar un aumento o disminución de la expresión por efecto de una mayor o menor concentración de ARN. En principio, por medio del espectrofotómetro se cuantificó la concentración de ARN y posteriormente se realizó un qRT-PCR con oligos diseñados para amplificar la subunidad alfa de la ARN polimerasa. Y finalmente con los valores de CT obtenidos se cuantificó la cantidad de ARN y se ajustó la concentración en todas las muestras.

Curva patrón.

Se construyó una curva estándar que nos sirviera como base para calcular el número de copias/ μ l del gen de interés. Se tomó como molde el propio gen, del cual se hicieron varias diluciones: $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5} y se le realizó el mismo tratamiento que a todas las muestras.

Paso 1. El objetivo fue pasar el ARN a ADNc mediante la transcriptasa reversa con el *kit one step RT-PCR* (QUIAGEN®).

Master mix 1

2X buffer	12.5 μ l
oligo 5' (10mM)	4.0 μ l
oligo 3' (10mM)	4.0 μ l
ARN X μ l	
H ₂ O-DEPC, Aforar	25.0 μ l

Se incubó la muestra a 95°C durante 2 min. Ya que bajó la temperatura a 50°C se agregó 0.5 µl de la mezcla enzimática, se volvió a mezclar, centrifugar y se dejó incubando durante 30 min a 50°C.

Paso 2. El programa utilizado fue: 2 min a 94°C, 15 seg a 95°C, y 50 ciclos de 90 seg a 64°C en el equipo Rotor Gene® RG-3000. Es importante resaltar que en este paso fue de vital importancia centrifugar las muestras hasta eliminar todas las burbujas de aire ya que eso podría dar resultados erróneos debido a que la medición se hace mediante un sistema óptico.

Master mix 2

Mix SYBR	10.0µl
oligo 5' (10mM)	1.0µl
oligo 3' (10mM)	1.0µl
cDNA	3.0µl
dH ₂ O, Aforar	20.0µl

6.20. Ensayo de oligomicina.

Este ensayo se hizo con el objetivo de saber si había producción de oligomicina en los medios *phage* y MP. La producción de oligomicina en medio *Phage* se monitoreó durante 20 hrs y se tomaron 3 muestras: a las 12 hrs, 15 hrs y 18 hrs. Tanto la producción en medio AP-5 como la del medio MP se monitorearon durante 8 días tomando una muestra de 5ml diariamente.

Se prepararon cajas con 25 ml de medio PDA (óptimo para el crecimiento del hongo), se sembró por césped *A. niger*, se hizo un orificio en el centro de la caja con un sacabocado y se agregó dentro del orificio una cantidad del producto de la fermentación de *S. avermitilis* de cada medio de cultivo en los diferentes tiempos. Las cajas se incubaron a 28°C durante 2 días (Pitman *et al.*, 2001).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Análisis *in silico*.

Se realizaron análisis de la secuencia del gen SAV4194 por medio del programa BLAST. Los alineamientos mostraron que tiene similitud del 79% con la secuencia del gen *rifP* de *S. pristinaespiralis* y del 74% con la secuencia del gen *ptr* de *A. mediterranei*. Tanto el gen *rifP* como *ptr* codifican para una proteína de transporte (Folcher *et al.*, 2001; Absalón *et al.*, 2007). Según el NCBI las proteínas que pertenecen a la familia MFS tienen típicamente de 400 a 600 aminoácidos y la mayoría contienen 12 dominios transmembranales (TMs) conectados por *loops* hidrofílicos. La proteína de interés para el presente trabajo tiene 498 aminoácidos y 13 dominios transmembranales (tabla 1).

Dominio (TMs)	Localización dentro de la proteína
1	15-37
2	86-103
3	109-131
4	144-166
5	171-193
6	206-225
7	231-253
8	272-294
9	309-328
10	335-357
11	367-389
12	401-423
13	467-484

Tabla 1. Dominios transmembranales (TMs) que contiene el producto del gen SAV4194.

Por medio del programa *Swiss-PdbViewer* 4.0.1. se obtuvo una probable estructura de la proteína en 3D (figura 7.1). En esta figura podemos observar la posible disposición de los fragmentos transmembranales hidrofóbicos, formando una estructura en forma de canal que podría funcionar como un transportador específico para el metabolito a secretar.

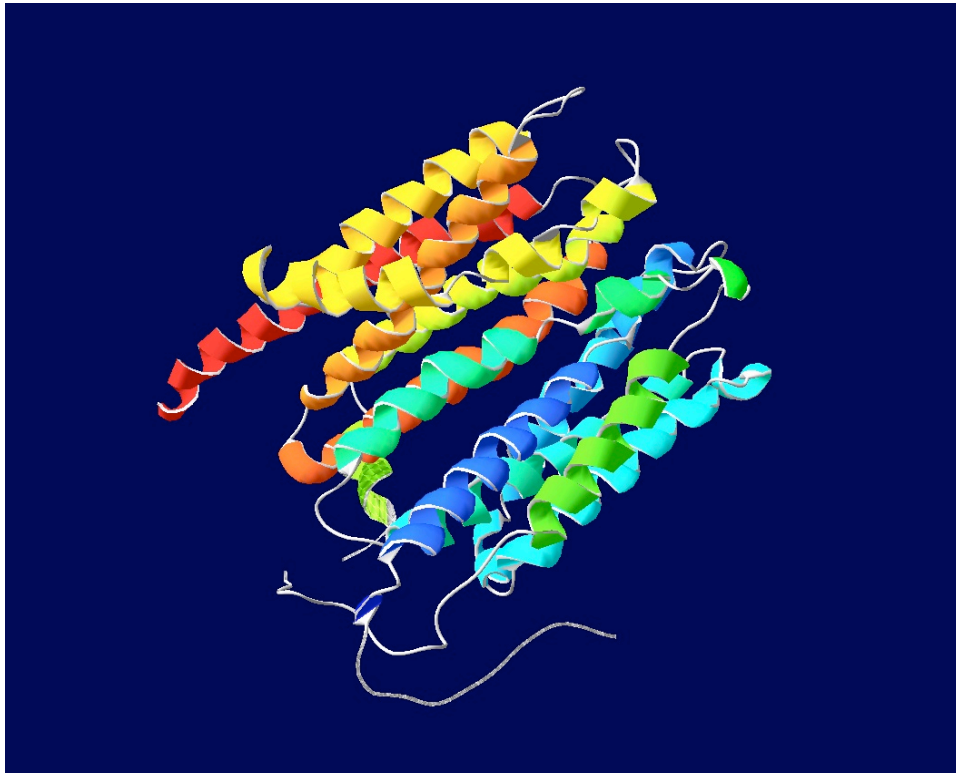


Figura 7.1. Modelamiento en 3D de la proteína codificada por el gen SAV4194 de *S. avermitilis*. Presenta 13 segmentos transmembranales alfa-hélice unidos por *loops* hidrofílicos.

La ubicación del gen dentro del genoma de *S. avermitilis* se muestra en la figura 7.2. Este gen no se encuentra dentro de ningún cluster; lo que sugiere que pudiera estar implicado en el transporte de más de un metabolito secundario.



Figura 7.2. Localización del gen SAV4194 en el genoma de *S. avermitilis*, (143193..5144689).

7.2. Extracción de ADN total de *S. avermitilis*.

Se aisló ADN total de *S. avermitilis* para utilizarlo como molde en la amplificación del gen SAV4194 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

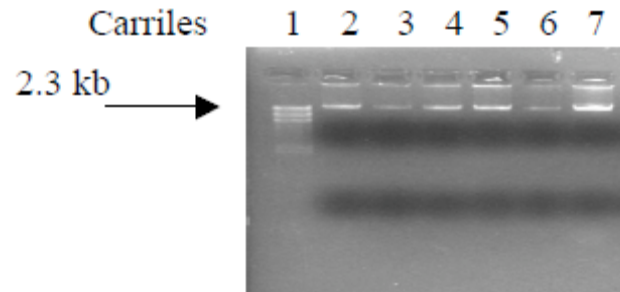


Figura 7.3. Gel de agarosa que muestra el ADN total aislado de *S. avermitilis*. Los carriles del 2 al 7 muestran ADN genómico de 23000 pb aproximadamente. En el carril 1 se encuentra el fago & digerido con la enzima *HindIII*.

7.3. Amplificación del gen SAV4194 mediante la Reacción en Cadena de la ADN polimerasa (PCR).

Se aisló el gen SAV4194 mediante PCR (figura 7.4) a partir del ADN total de *S. avermitilis*. Para esta parte del trabajo fue necesario el uso de dimetil sulfóxido y aumentar la temperatura inicial de desnaturalización debido a que el genoma de *S. avermitilis* tiene un alto contenido de guanina y citosina, por lo que tantos triples enlaces dificultaron la desnaturalización de las cadenas. El dimetil sulfóxido ayudó al rompimiento de estos triples enlaces y por ende a la desnaturalización de las cadenas.

En el diseño de los cebadores fue necesario partir de la secuencia nucleotídica del gen SAV4194 previamente identificada en el Instituto Kitasato de Japón por el Dr. Omura y colaboradores (2001), la cual se encuentra reportada en el banco de genes del “*National Center of Biotechnology Information*” (NCBI). Los oligonucleótidos se diseñaron para ambos extremos del gen SAV4194. Contienen en el extremo 5’ nueve nucleótidos extras que no pertenecen al gen, de éstos, 6 correspondían al sitio de corte que reconoce la enzima *EcoRI*, esto con fines de la posterior clonación del producto de PCR; y los otros 3 nucleótidos se agregaron para facilitar la digestión con la enzima *EcoRI*. Los 15 nucleótidos restantes

aparean con el gen. Los *oligonucleótidos* fueron diluidos hasta una concentración de 5 pmol/ml y sus secuencias se muestran a continuación.

5'-**TTACTTAAGCTACGCGGACGCCGC**- 3' R

Con un contenido de C+G = 58.33%, Tm de 76°C y longitud 24b.

5'- **TACGAATTCATGTCCACCTCCCCG**-3' F

Con un contenido de C+G = 54.17%, Tm de 74°C y longitud 24b.

La parte de la secuencia sombreada corresponde al sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRI*, la subrayada corresponde a la parte que aparece con el gen y la secuencia en negrita son las bases que se diseñaron para facilitar el corte con la enzima.

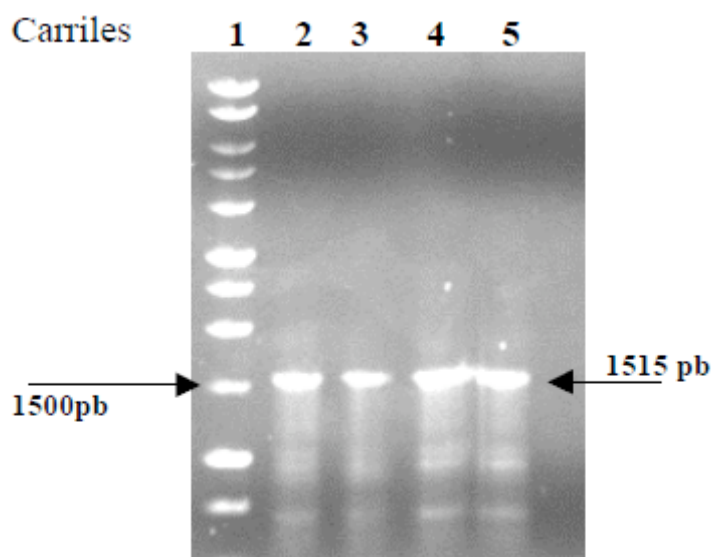


Figura 7.4. En esta electroforesis se muestra el producto de PCR. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular 1 Kb y en los carriles del 2 al 5 se pueden observar bandas de ADN de 1515 pb, peso sugerido por el marcador y esperado para el presente trabajo.

7.4. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.

Para llevar a cabo la clonación del producto de PCR era necesario que se obtuviera una banda específica de 1515pb (que corresponde al tamaño del gen), ya que si la electroforesis mostraba más bandas de diferente tamaños y se clonaba directamente del producto de PCR se corría el riesgo de clonar otros genes que para el presente

trabajo no eran de interés. Por lo tanto fue necesario purificar este producto de PCR a partir del gel de agarosa y así obtener solo la banda que correspondía al tamaño deseado (figura 7.5).

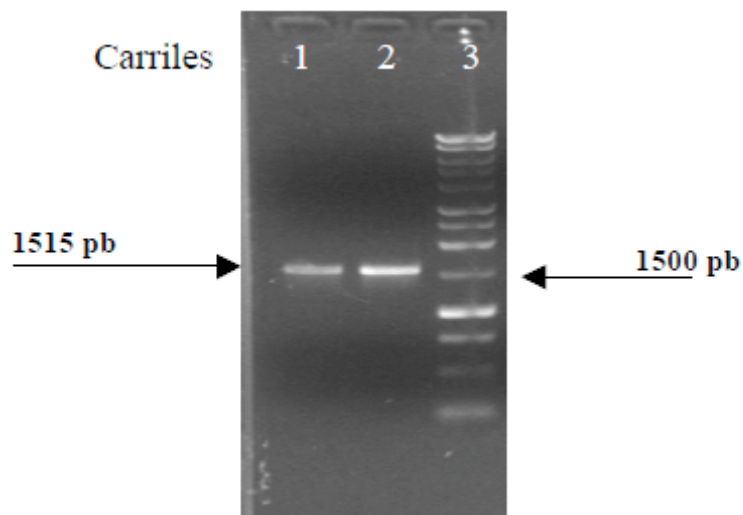


Figura 7.5. ADN que proviene de la purificación de banda del producto de PCR de la figura anterior. El peso molecular de la banda indica que este fragmento de ADN es el gen SAV4194, amplificado por PCR.

7.5. Purificación de los plásmidos pME6 y pQM5062.

Para el presente trabajo fue necesario clonar el gen SAV4194 en el plásmido pME6 (donado por el Dr. Paul Dyson) figura 7.5, debido a que éste cuenta con resistencia a la kanamicina, antibiótico que junto con el IPTG y X-Gal permitieron una mejor selección de las colonias transformantes.

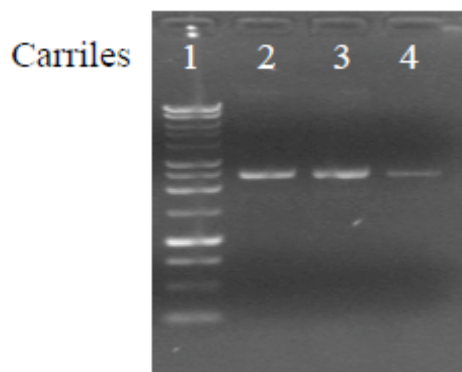


Figura 7.6. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular 1 Kb y en los carriles 2, 3 y 4 se observa el plásmido pME6 ya purificado.

Con el objetivo de amplificar y purificar el transposón Tn5062, que posteriormente se utilizaría para interrumpir el gen SAV4194, fue necesario purificar el plásmido pQM5062 (figura 7.7) ya que el transposón se encontraba dentro de este plásmido (Bishop *et al.*, 2004).

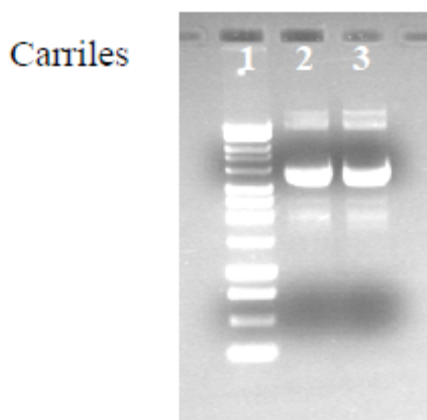


Figura 7.7. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular 1Kb y en los carriles 2 y 3 se observa el plásmido pQM5062.

7.6. Digestión de los plásmidos pME6 y pQM5062.

Con el fin de corroborar que los plásmidos que se estaban amplificando a partir de las supuestas colonias transformantes fueran los correctos, se hicieron 2 digestiones.

Por un lado se digirió el plásmido pME6 con la enzima *EcoRI*, la cual linealizó el plásmido, dando el peso molecular esperado como se muestra en la figura 7.8. Se eligió esta enzima porque el plásmido pME6 tiene un sitio único de reconocimiento para ella. Por otro lado, el plásmido pQM5062 contiene un transposón el cual a su vez posee resistencia a la apramicina. En los extremos del transposón hay un sitio de reconocimiento para la enzima *PvuII*; por lo que para poder amplificar y purificar éste, se digirió el plásmido con la enzima *PvuII* (figura 7.9) (Bishop *et al.*, 2004). Este transposón fue de vital importancia para el trabajo ya que con él se interrumpió (Como se relata más adelante) el gen SAV4194 y además la resistencia que posee permitiría hacer una selección de las posibles colonias transformantes Cabe mencionar que el transposón Tn5062 con el cual se trabajó en el presente estudio, también ha sido utilizado en la interrupción de otros genes de actinomicetos (p.e. *S. coelicor*) por el grupo de trabajo del Dr. Paul J. Dyson (Hoskisson *et al.*, 2006).

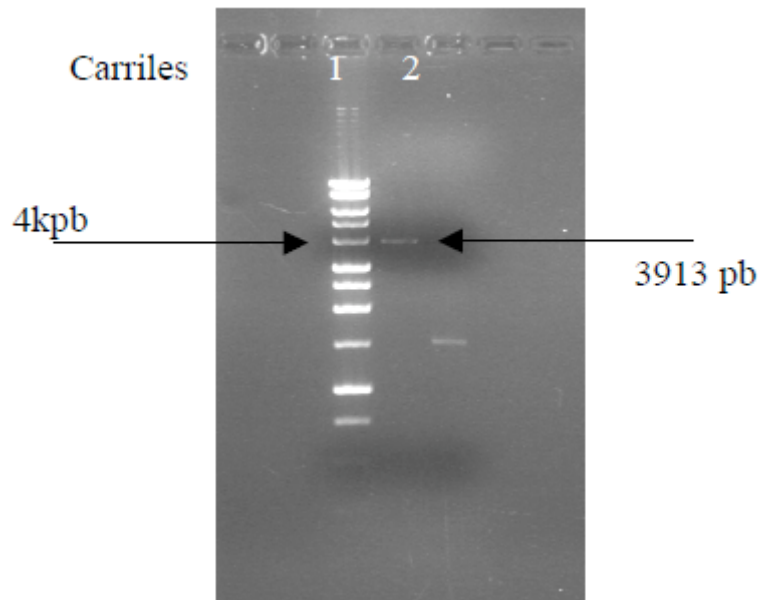


Figura 7.8. Plásmido pME6 digerido con la enzima *EcoRI* en el carril 2. En el carril 1 se observa el marcador 1Kb el cual sugiere el peso molecular del plásmido como de 3.9 Kb, siendo éste el tamaño esperado.

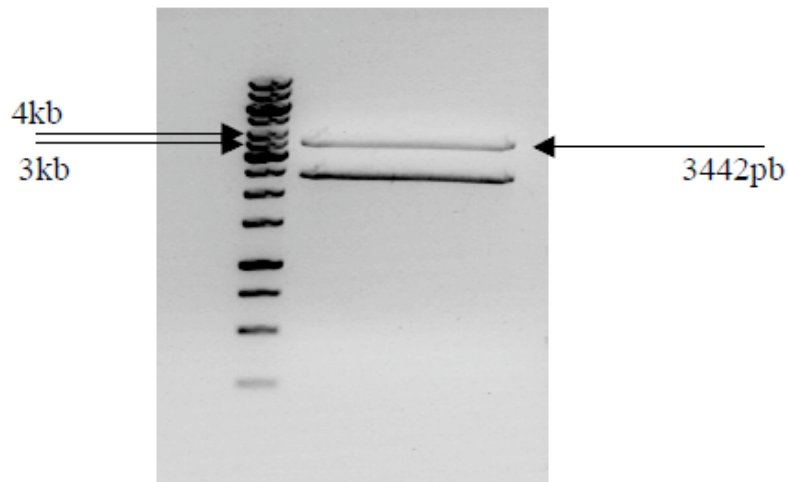


Figura 7.9. Plásmido pQM5062 digerido con la enzima *PvuII*. La banda de 3.4Kb corresponde al transposón Tn5062, de acuerdo con el tamaño de la banda del marcador de peso molecular que se observa en el carril 1. El marcador es el 1Kb.

7.7. Plásmido pGEM4194 (clona 1).

Fue necesario utilizar el vector pGEM-T *Easy* debido a que al parecer el fabricante de los oligonucleótidos para amplificar el gen SAV4194, introdujo un error en el cambio de una base que provocó la pérdida de un sitio de corte para la enzima *EcoRI* originalmente incluido en el diseño del oligonucleótido. Al ser clonado el gen SAV4194 dentro de este vector (figura 7.10) se solucionó el problema, ya que a ambos lados del sitio donde se introduce el inserto en el sitio múltiple de clonación existen dos sitios de reconocimiento para la enzima *EcoRI*, que fue la que en un principio se diseñó para posteriormente clonar en el plásmido pME6.

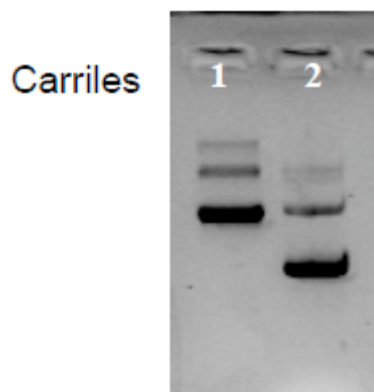


Figura 7.10. En los carriles 1 y 2 se observa el plásmido pGEM4194.

7.8. Digestión del plásmido pGEM4194 (clona 1).

Con el fin de comprobar que el inserto se clonó, se digirió el plásmido con la enzima *EcoRI* (figura 7.11). Se eligió esta enzima porque el inserto (SAV4194) tiene en cada extremo un sitio de corte para ella. Por lo que por medio del peso molecular de los dos fragmentos de ADN que surgieron, indicarían si se clonó el fragmento de tamaño deseado.

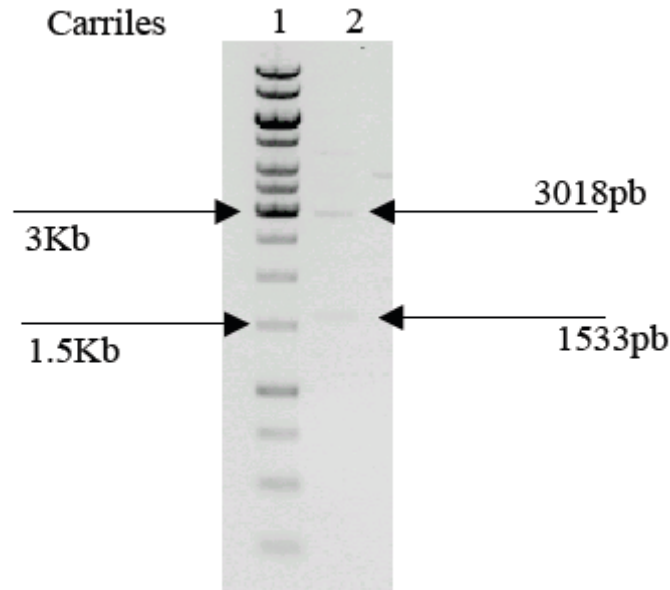


Figura 7.11. El marcador de peso molecular que se observa en el carril 2 es el 1 Kb y al ser digerido este plásmido con la enzima *EcoRI* produce dos bandas de tamaños 3018 pb y 1533 pb que corresponden al los pesos moleculares del plásmido pGEM y del gen SAV4194 respectivamente.

7.9. Plásmido pME6-4194 (clona 2).

La clonación del gen SAV4194 en el plásmido pME6 se llevó a cabo debido a la necesidad de tener el gen de interés clonado en un plásmido con el que se pudiera, posteriormente, hacer una mejor selección de las transformantes. Para obtener la segunda clonación (figura 7.12), el plásmido pME6 fue digerido con la enzima *EcoRI* y posteriormente desfosforilado para evitar que se religara.

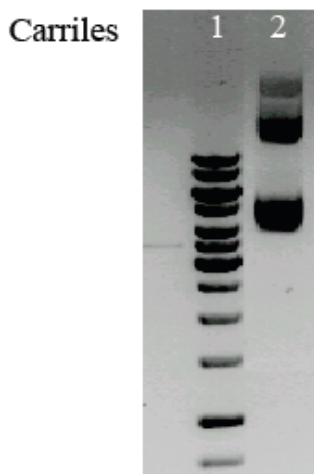


Figura 7.12. Gel de agarosa que muestra en el carril 2 muestra el plásmido pME6-4194 aislado de las células de *E. coli* JM109. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1Kb.

7.9.1. Digestión del plásmido pME6-4194 (clona 2) con la enzima *EcoRI*.

Con el fin de corroborar que el gen de interés se clonó en el plásmido pME6, el plásmido pME6 4194 se digirió con la enzima *EcoRI* (figura 7.13).

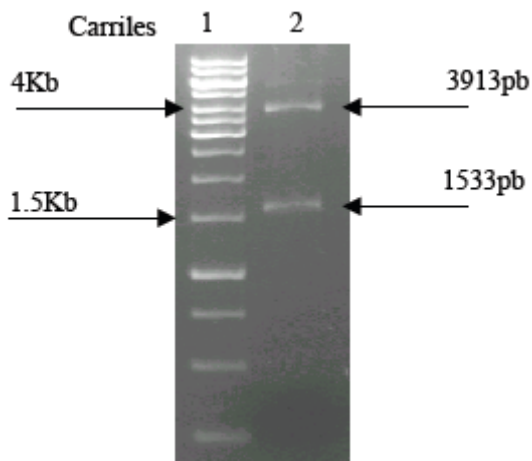


Figura 7.13. El marcador de peso molecular que se observa en el carril 1 sugiere que las bandas del carril 2 son de tamaños 3913 pb y 1533 pb, los cuales corresponden al plásmido pME6 y al gen SAV4194 respectivamente.

7.9.2. Digestión del plásmido pME6-4194 (clona 2) con la enzima *Nru*I.

Para interrumpir el gen SAV4194 con el transposón Tn5062 (Herron *et al.*, 2004) fue necesario digerir el plásmido pME6-4194 (SAV4194 contenido en el plásmido pME6) con la enzima *Nru*I (figura 7.14) ya que esta enzima al cortar el ADN deja extremos romos, de igual forma como lo hace la enzima *Pvu*II (con la cual se digirió el transposón anteriormente). Por lo tanto, al digerir el plásmido pME6-4194 con la enzima *Pvu*II se obtuvo un fragmento de ADN lineal con extremos romos, que después de ser desfosforilado quedó listo para ser ligado con los extremos romos del transposón. Además de dejar extremos romos, se eligió la enzima *Nru*I porque ésta era la única dentro del gen que se encontraba en una posición tal que al cortar el gen dejaba 1000pb de un lado, necesario para la recombinación homóloga, que se necesitaría más adelante.

Después de ser digerido el plásmido pME6-4194 con la enzima *Nru*I, se desfosforiló para evitar que el plásmido se religara y por ende hubiera falsos positivos, además de que disminuiría la probabilidad de que el gen se clonara en el plásmido. Las colonias transformantes se seleccionaron con la presencia de kanamicina en el medio, resistencia que provee el plásmido pME6.

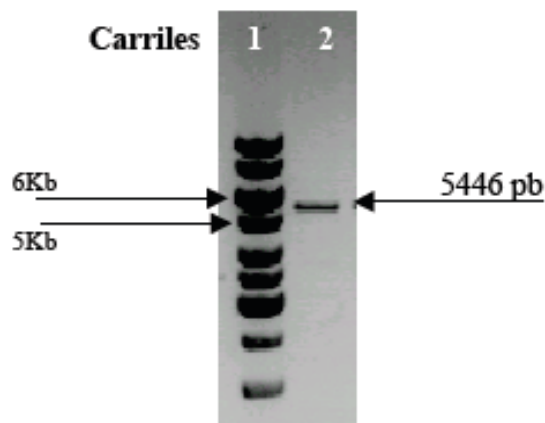


Figura 7.14. Digestión del plásmido pME6-4194 con la enzima *Nru*I. El marcador de peso molecular que se observa en el carril 1 sugiere que el tamaño de la banda del carril 2 es de 5446 pb, tamaño que corresponde con el esperado.

7.10. Plásmido pMET4194.

La tercera clonación (figura 7.15) se llevó a cabo con el objetivo de interrumpir el gen SAV4194 (Herron *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006). El tiempo de ligación fue de 6 días y esto se cree que fue debido a que se estaban ligando extremos romos y además el tamaño del inserto era muy grande (3.4Kb). Este nuevo plásmido se construyó con el fin de posteriormente transformar a *S. avermitilis* para que por medio de recombinación homóloga se integrara al ADN del microorganismo y sustituyera al gen que produce la proteína funcional.

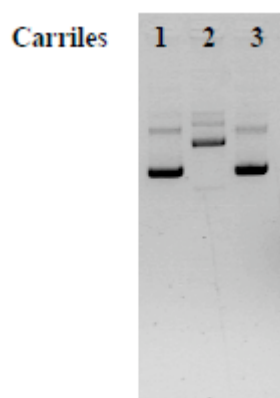


Figura 7.15. ADN plasmídico aislado de las células de *E. coli* JM109. En este plásmido se encuentra el gen SAV4194 interrumpido por el transposón Tn5062.

7.10.1. Digestión del plásmido pMET4194.

Para comprobar que el inserto que se ligó en el gen era el transposón, además de seleccionar las colonias con la resistencia a la apramicina, se digirió el plásmido con la enzima *Nru*I (figura 7.16) para ser linealizado y observar por peso molecular, si el tamaño correspondía al esperado (8846pb).

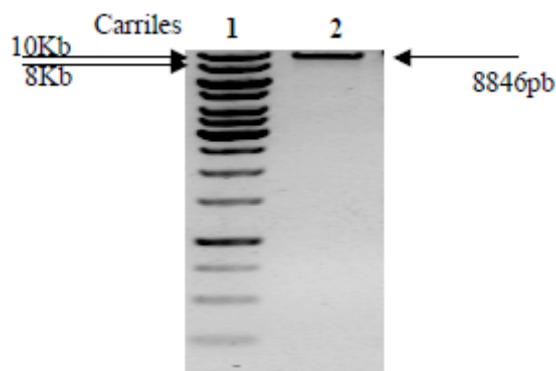


Figura 7.16. ADN plasmídico aislado de las células de *E. coli* JM109 digerido con la enzima *Nru*I. El marcador de peso molecular que se observa en el carril 1 es el 10Kb el cual sugiere que el transposón se encuentra dentro del plásmido ya que el tamaño de la banda del carril 2 es de aproximadamente 8846pb.

7.11. Transformación de *S. avermitilis* con el plásmido que contiene el gen SAV4194 interrumpido.

Mediante diferentes técnicas reportadas como electroporación, conjugación y protoplastos se intentó transformar sin éxito a *S. avermitilis*. Cabe señalar que *S. avermitilis* es reportado como un microorganismo difícil de transformar (Macneil *et al.*, 1998, Hwang *et al.*, 2001, Gong *et al.*, 2004), lo cual se pudo comprobar ya que incluso en trabajos paralelos en el laboratorio con otros genes, se ha logrado una eficiencia tan baja como una sola transformante. Las posibles explicaciones de este hecho serían:

1. El ADN no puede ser ingresado a la célula.
2. El ADN sí ingresa pero no recombina adecuadamente para permitir integrarse al cromosoma.
3. El ADN sí ingresa a la célula pero es reconocido como extraño y es degradado por nucleasas endógenas.

Para responder si el problema es que el ADN no puede ingresar a la célula, se intentó transformar con el método más drástico reportado en la literatura y conocido como Biobalística, el cual consiste en la introducción de micropartículas recubiertas con el ADN mediante el disparo de estos proyectiles sobre un césped de células blanco. Desafortunadamente, hasta el momento no se ha logrado obtener ninguna

transformante, a pesar de que en otros actinomicetos usados como control si se observa una elevada frecuencia de transformación. Esto sugiere que el problema no es el ingreso del ADN a la célula.

La segunda opción, que plantea que el problema es la baja frecuencia de recombinación, se intentó transformar; sin éxito, con plásmidos de replicación autónoma, lo cual indica que tampoco la integración explica la falta de transformantes.

Esto nos deja sólo con la última explicación ya que se encuentra reportado que *S. avermitilis* posee un sistema de restricción único de metilación específica que previene el movimiento de los vectores provenientes de las cepas de *E. coli*. Macneil y colaboradores (1988) demostraron que *S. avermitilis* restringe ADN metilado *in Vitro* con modificaciones en 5-metilcitosina y N6-metiladenina sin una secuencia específica aparente. Por este motivo, resulta muy complicado obtener mutantes de algunas cepas de *S. avermitilis*. Sin embargo, como este microorganismo es de gran interés industrial, se han buscado nuevas estrategias para transformarlo. Por ejemplo, antes de transformar a *S. avermitilis*, el vector lo introducen en algún otro actinomiceto con un sistema de restricción menos fuerte, aunque obviamente esta estrategia sólo es viable para plásmidos de replicación autónoma.

Es importante resaltar que posiblemente no todas las cepas de *S. avermitilis* tienen el sistema de restricción tan fuerte como la que se utilizó en el presente trabajo; y tal es el caso de la cepa 12804, la cual fue transformada con un plásmido que se amplificó en células de *E. coli* GM2929 que no metilan (Pitman *et al.*, 2001).

7.12. Estudios de expresión.

7.12.1. RT-PCR.

Como estrategia alternativa para obtener información que nos permitiera responder la pregunta original del presente trabajo de tesis, sobre si este gen codifica o no para una proteína transportadora de avermectinas, se decidió realizar estudios de la expresión de este gen en los medios de cultivo de producción de avermectinas y los usados para otros metabolitos secundarios como oligomicina. Para observar la expresión del gen de interés, primeramente se llevó a cabo la técnica de RT-PCR (Lu *et al.*, 2007), para lo cual fue necesario establecer un control sobre la calidad del ARN y

otro control sobre posible contaminación con ADN. Este último control para evitar que se concluyera que el gen se estaba expresando en cierto tiempo o medio de cultivo, cuando en realidad lo que se estaba observando era amplificación del ADN que pudiera estar mezclado con el ARN. Cabe mencionar que todas las muestras fueron tratadas previamente con DNAsas.

En el primer control se utilizó como HKG (House Keeping Gen) la subunidad alfa de la RNA polimerasa ya que ésta se expresa de forma constitutiva. En la figura 7.17 se observa amplificación de la subunidad alfa de la ARN polimerasa, lo que sugiere que el ARN es de buena calidad.

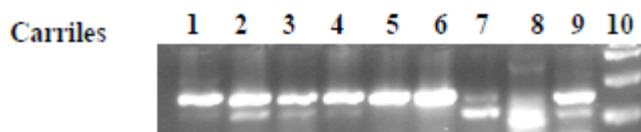


Figura 7.17. Electroforesis del primer control. En los carriles 1 (12 hrs), 2 (15 hrs) y 3 (18 hrs) se encuentran las muestras obtenidas del medio *Phage*, en los carriles 4 (72 hrs), 5 (120 hrs) y 6 (168 hrs) se cargaron las muestras que provienen del medio MP y en los carriles 7 (72 hrs), 8 (120 hrs) y 9 (168 hrs) las muestras que pertenecen al medio AP-5. En el carril 10 se encuentra el marcador de peso molecular 1kb.

Para el segundo control (negativo) se hizo un PCR con las muestras de ARN. La diferencia de este PCR con el convencional es que en lugar de utilizar ADN como molde, se utilizaron las muestras de ARN. Se esperaba que no se obuviera producto de amplificación ya que en teoría las muestras de ARN deberían de estar libres de ADN.

En la electroforesis del control negativo no se observaron bandas en ninguno de los tiempos de los diferentes medios de cultivo, lo que indica que el ARN no estaba contaminado con ADN y cualquier banda que apareciera en el RT-PCR se debería solo a la expresión del gen.

Los resultados del RT-PCR que se observan en la figura 7.18, indican lo siguiente: el gen SAV4194 se está expresando en el medio *phage* después de las 12 hrs.

En el medio de producción de oligomicina AP-5 el gen también se está expresando, pero no se observa expresión en el medio de producción de avermectinas (MP).

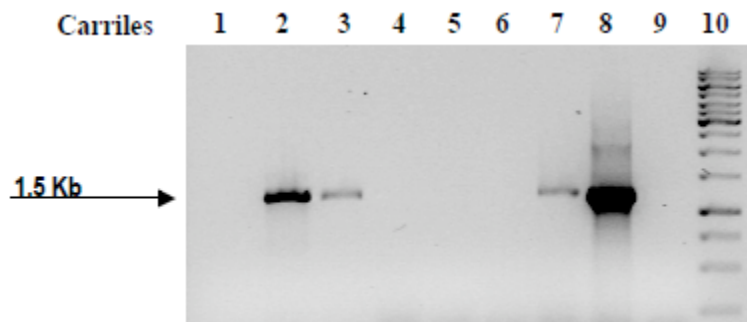


Figura 7.18. Gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído. En los carriles 1 (12 hrs), 2 (15 hrs) y 3 (18 hrs) se encuentran las muestras obtenidas del medio *Phage*, en los carriles 4 (72 hrs), 5 (120 hrs) y 6 (168 hrs) se cargaron las muestras que provienen del medio MP y en los carriles 7 (72 hrs), 8 (120 hrs) y 9 (168 hrs) las muestras que pertenecen al medio AP-5.

El hecho de que no haya expresión en el medio MP indica claramente que contrario a la hipótesis planteada en este trabajo, el gen no codifica para una proteína que transporta avermectina, si no posiblemente, otro metabolito secundario.

Por otro lado, el hecho de que el gen se exprese en el medio AP-5 sugiere que la función de este sea de transporte de oligomicina. Sin embargo, también se observó expresión del gen en el medio *phage* lo cual podría poner en duda que se trate de un transportador específico únicamente de oligomicina.

Para aclarar lo anterior se hizo un ensayo (detallado más adelante) con oligomicina en el cual se demuestra que durante la fermentación de *S. avermitilis* en este medio, también hay producción de oligomicina (Pitman *et al.*, 2001).

Estos resultados; a pesar de ser diferentes de los esperados, son de gran interés ya que Xiuping Lin y colaboradores (2009) publicaron un trabajo en el cual demuestran que la oligomicina A, producto de la fermentación de *S. avermitilis*, es un agente anticancerígeno y posee una potente actividad antitumoral contra hematoma humano, leucemia mielógena crónica y varios tipos de células de carcinoma colónico (Xiuping *et al.* 2009).

7.12.2. Tiempo real PCR (qRT-PCR).

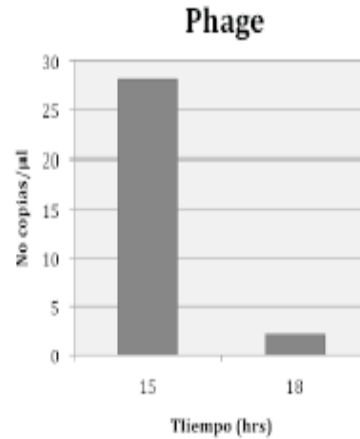


Figura 7.19. Análisis de la transcripción del gen SAV4194 mediante qRT-PCR en matraz de 250 ml con 25 ml de medio *phage*, 230 rpm a 28°C.

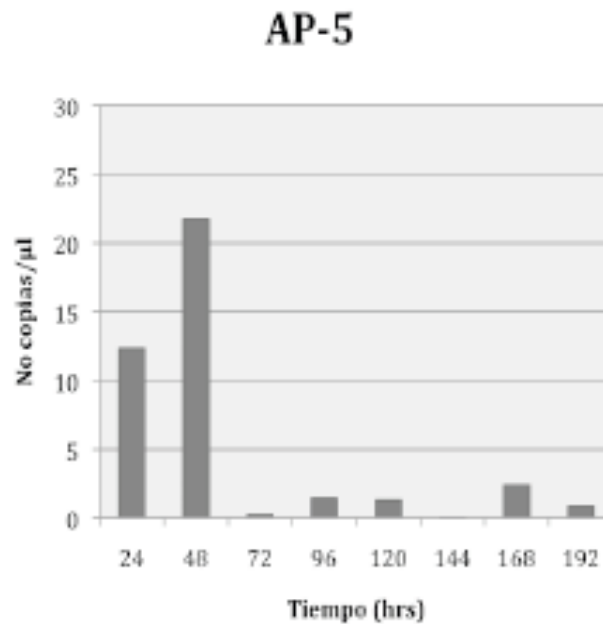


Figura 7.20. Análisis de la transcripción del gen SAV4194 mediante qRT-PCR en matraz de 250 ml con 25 ml de medio de producción de oligomicina (AP), 230 rpm a 28°C.

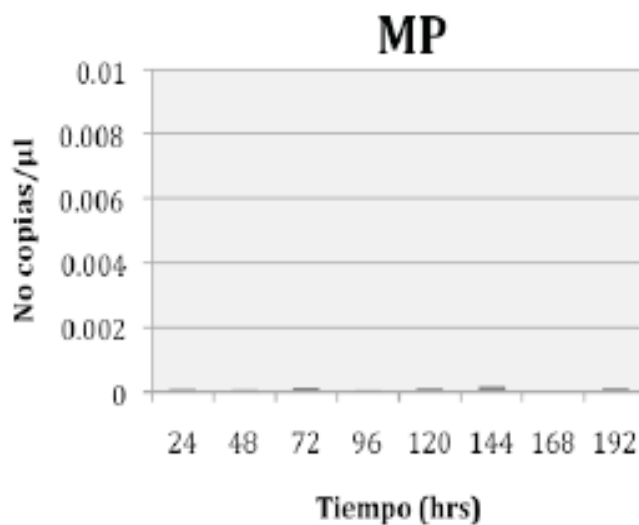


Figura 7.21. Análisis de la transcripción del gen SAV4194 mediante qRT-PCR en matraz de 250 ml con 25 ml de medio de producción de avermectina (MP), 230 rpm a 28°C.

Los análisis de PCR en tiempo real confirman lo observado en los resultados de RT-PCR ya que no se observa expresión del gen SAV4194 en el medio de producción de avermectina (figura 7.21) pero sí en el medio de producción de oligomicina (7.20) y en el medio *phage* (7.19). Esto significa que el gen SAV4194 no participa en la exportación de la avermectina y tal vez si lo haga en el transporte de oligomicina. Por otro lado, el hecho de que se exprese solo bajo ciertas condiciones indica que no es un gen constitutivo, sino inducible.

7.13. Ensayo de oligomicina

Teniendo el conocimiento de que *A. niger* es sensible a oligomicina se hizo el ensayo propuesto por Pitman y colaboradores (Pitman *et al.*, 2001). Tanto el producto de la fermentación de *S. avermitilis* en el medio AP-5 como el del medio *Phage* formaron un halo de inhibición en las cajas de *A. niger*. Este resultado indica una posible correlación entre la producción de oligomicina y la expresión del gen SAV4194.

Como se observa en las figuras 7.19 y 7.20 la expresión del gen es en etapas tempranas del cultivo disminuyendo de forma notoria en etapas tardías, esto podría ser explicado si suponemos que la proteína transportadora una vez formada permanece activa en la biomasa de la idiofase y solo se requerirá reponer la que se pierde por muerte celular para mantener una fase de crecimiento estacionario.

8. CONCLUSIONES.

1. Se construyó el plásmido pMET4194 con el gen SAV4194 interrumpido.
2. La no expresión del gen SAV4194 en el medio de producción de avermectina demuestra que este gen no está involucrado en su exportación.
3. La expresión del gen SAV4194 en los medios donde hay producción de oligomicina sugiere que este gen podría estar implicado en el transporte de oligomicina hacia el exterior de la célula.
4. El gen SAV4194 no es constitutivo.

9. REFERENCIAS.

Absalón, E. A., Fernández, F. J., Olivares, X. P., González, B. J., Mejía, A. A. (2007). RifP; a membrana protein involved in rifamycin export in *Amycolatopsis mediterranei*. *Biotechnol Lett.*, 29(6): 951-958.

Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S y Cully, D. F. (1991). Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus oocytes*. *Mol. Pharmacol.*, 40, 368-374.

Bishop A., Fielding S., Dyson, P y Herron P. (2004). Systematic Insertional mutagenesis of a streptomycete genome: A link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res.*, 14: 893-900.

Burg, W. R., Miller, M. B., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, A. S., Hartman, R., Kong, L., Monaghan, L. R., Olson, G., Putter, I., Tunac, B. J., Wallick, H., Stapley, O. E., Oiwa, R. y Omura, S. (1979). Avermectins, New family of potent agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother.*, 15(3): 361-367.

Campelo A. y Gil J. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiol.*, 148, 51-59.

Cane, D. E., Liang, T. C., Kaplan, L., Nallin, M, K., Schulman, M. D., Hensens, O, D., Douglas, A. W y Albers-Schonberg, G. (1983). Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the avermectins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 105, 4110-4112.

Chen, Lu, Chen, Zhang, Shu, Qin, Yang, Jiang (2008). Characterization of a negative regulator Avel for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 80, 277-286.

Chopra I. y Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics. Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbi. Mol. Bio. Rev.*, 65 (2): 232-260.

Dadzie Y., R. Hopkins y M. Neira. (2002). Final report of the Conference Eradicability of Onchocerciasis. Atlanta, Georgia, USA.

Demain A. (1997). Health, wealth and actinomycetes. *Xth International Symposium on biology of actinomycetes*. May 27-30 Beijing, China.

Egerton, J. R., Ostlind, D. A., Blair, L. S., Eary, C. H., Suhayda, D., Cifelli, S., Riek, R. F y Campbell, W. C. (1979). Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1a component. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.*, 15, 372-378.

Fernández-Perrino F. J. (1997). Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. *Tesis doctoral*. Universidad de León. España.

Folcher M., Morris R., Dale G., Salah-Bey-Hocini K., Viollier P. y Thompson C. (2001). A transcriptional regulator of a pristinomycin resistance gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, 276 (2): 1479-1485.

Gong, Jiang Yang, Chia (2004). Improvement of Transformation and Electroproduction in Avermectin High-Producer, *Streptomyces avermitilis*. *Folia Microbiol.*, 49 (4): 399–405.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.

Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning: A practical approach* (ed. D.M. Glover), 1, 109-135. IRL press, Oxford., U.K. 74

He J., Magarvey N., Pirae M. y Vining L. (2001). The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiol.*, 147, 2817-2829.

Hodgson DA (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.*, 42, 47–238.

Holmes D.S. y Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114, 193-197.

Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J. y Kieser H. M. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. *John Innes, Norwich, UK*. John Innes Foundation.

Hoskisson P., †Rigali S., Fowler K., Findlay K. and Buttne M. (2006). DevA, a GntR-Like Transcriptional Regulator Required for Development in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology.*, 5014-5023, Vol. 188, No. 14.

Hwang Y., Lee J., Kim E. & Choi C. (2001). Optimization of transformation procedures in avermectin high-producing *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnology Letters.*, 23, 457–462.

Ikeda H., Kotaki H. y Omura S. (1987). Genetic Studies of Avermectin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bacteriology*, p. 5615- 5621.

Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Skaki Y., Hattori M. y Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotech.*, 21, 526-531.

Jozef Anné, Lieve Van Mellaert and Hendrik Eyssen (1990). Optimum conditions for efficient transformation of *Streptomyces venezuelae* protoplasts. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 32, 431-435.

J. Miller., R. Davey., D. Oehler., M. Pound y J. George. (2001). The Ivomec SR Bolus for Control of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae) on Cattle in South Texas. *J. Econ. Entomol.*, 94(6): 1622-1627.75

Mironov, Sergeeva, Gavrulina and Danilenko (2003). Dependence of the composition of avermectina complex of *Streptomyces avermetilis* on the glucose content in the médium. *Applied Biochemistry and Microbiology.*, Vol. 39, No. 2, 2003, p. 183–187.

Lamb, C. David., Ikeda, Haruo., Nelson, R. David., Ishikawa, Jun., Skaung, Tove., Jackson, Colin., Omura, Satoshi., Waterman, R. Michael y Kelly, L. Steven. (2003). Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 307, 610-619.

Lee C, Kamitani Y, Nihira T, Yamada Y (1999). Identification and in vivo functional analysis of a virginiamycin S resistance gene (varS) from *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol.*, 181(10): 3293-3297.

Lin, Wen, Li, Chen, Guo, Song, Li (2009). A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro. *Microbiol Biotechnol.*, 81, 839-845.

Lu, Wang, Shu, Zhang, Chen, Qin, Yang, Jiang (2007). Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* , 77, 625-635 525-527.

MacNeil, D. J. (1988). Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bacteriology.* , 5607-5612 .

Marchuk D., Drumm M., Sauling A. y Collins F. (1991). Construction of Tvectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nuc. Acid. Res.*, 19 (5):11-54.

Maria das Graças Carneiro-da-Cunha; José Luiz de Lima Filho; Galba Maria de Campos-Takaki (2002). Protoplast formation and regeneration from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 and clavulanic acid production. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 33, 347-351.

Marsden, A. F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, J y Leadlay, P. F. (1998). Engineering broader specificity into an antibiotic-producing poliketide synthase. *Science.*, 279, 199-202.

Mazy-Servais, Baczkowski, Dusart (1997). Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*. *Microbiology Letters.*, 151, 135-138.

Miller Mironov, V. A., Sergeeva, A.V., Gavrilina, A. V. Y(1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*. New York.

Namwat W., Lee C., Kinoshita H., Yamada Y. y Nihira T. (2001). Identification of the *varR* gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* 183(6): 2025-2031.

Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shibai T., Sakaki Y. y Hattori M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS.*, 98(21): 12215-12220.

Paulsen I., Brown M. y Skurray R. (1996). Proton dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.*, 60 (4): 575-608.

Pitman A, Herron P, Dyson P. (2002). Cointegrate resolution following transposition of Tn1792 in *Streptomyces avermitilis* facilitates analysis of transposon tagged genes. *Journal of Microbiological Methods.*, 49, 89-96.

Putman M., Van Veen H., Konings W. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.*, 64 (4): 672-693.

Rodríguez, P. M. A. y Rivas, A. A. R. (1991). Salud Pública de México, 33(5):493-503.
<http://www.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001160>.

Schauer, A. T., Nelson, A. D. y Daniel, J. B. (1991). Tn4563 transposition in *Streptomyces coelicolor* and its application to isolation of new morphological mutants. *J. Bac.*, 173, 5060-5067.

Trefzer A, Pelzer S., Schimana J., Stockert S., Bihlmaier, Fiedler H., Welzel K., Vente A. y Bechthold (2002). Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 46 (5): 1174-1182.

Weber, J. M., Wierman, C. K y Hutchinson, C. R. (1985). Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J. Bacteriol.*, 164, 425-433.

Wei X., Yunxiang L., Yinghua Z. (2006). Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Letters.*, 28, 911-916.

Xiong W, Liang YX, Zheng YH (2006). Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Lett.*, 28, 911–916.

Xu, Z. y Cen, P. (1999). Stimulation of avermectina B1a biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* by feeding glucose and propionate. *Biotechnol Letters.*, 21, 91- 95.

Yoon J. Y., E. S. Kim., Y.-S. Hwang., C. Y. Choi (2003). Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Microbiol Biotechnol.* 63: 626-634.



ANALISIS DE LA FUNCION DEL
GEN SAV4194 SOBRE LA
EXPORTACION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN STREPTOMYCES
AVERMITILIS.

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día
25 del mes de enero del año 2010 en la Unidad Iztapalapa
de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos
miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO
DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL



VICTORIA SICAIROS DIAZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
DE: VICTORIA SICAIROS DÍAZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del
Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad
Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado
resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la
interesada el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISOR

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

VOCAL

DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ

SECRETARIO

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL