

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

Construcción de una proteína híbrida con una hemoglobina y un citocromo P450 bacterianos para mejorar la producción del antibiótico rifamicina.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R A E N B I O T E C N O L O G Í A

PRESENTA:

QBP. Doris Judith Luna Escalona

Director de tesis: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesores: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dr. Luis Horacio Gutiérrez González

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, se encuentra inscrita en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

El presente trabajo es financiado por CONACyT (SEP 2003-C02-44911). Papel de los citocromos P450 en la biosíntesis de rifamicina por *Amycolatopsis mediterranei*.

Iztapalapa, D.F. a 18 de diciembre de 2007.

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

**Construcción de una proteína híbrida con una hemoglobina y
un citocromo P450 bacterianos para mejorar la producción del
antibiótico rifamicina.**

Que presentó

Q.B.P. Doris Judith Luna Escalona

Vo.Bo.

COMITÉ TUTORIAL:



**Dr. Armando Mejía
Álvarez
Director**



**Dr. Luis Horacio
Gutiérrez González
Asesor**

**Dr. Francisco José
Fernández Perrino
Asesor**

Miembros del Jurado:

Dr. Javier Barrios González (Presidente)
Dr. Octavio Loera Corral (Secretario)
Dr. Luis Horacio Gutiérrez González (Vocal)
Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca (Vocal)



D e d i c a t o r i a

A m i s p a d r e s :
A m e l i a y A n g e l

A m i s h e r m a n a s :
E l i z a b e t h
X o c h i t l
R o c i o
A u r o r a

A m i s a m i g o s :

A LOS QUE LES PIDO UNA GRAN DISCULPA POR NO PONER SUS
NOMBRES. PERO GRACIAS A DIOS SON MUCHOS Y ESTE PEQUEÑO
ESPACIO NO ALCANSARIA PARA NOMBRARLOS A TODOS.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco al Dr. Armando Mejía Álvarez mi director de tesis por el apoyo brindado para la realización de este trabajo; por las pláticas y recomendaciones durante mi estancia en el laboratorio.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Francisco Fernández Perrino por la asesoría que me brindaste en la realización del trabajo y la palabra de aliento que siempre tenías cuando estaba por renunciar al trabajo.

Gracias Dr. Luis Horacio Gutiérrez González por el apoyo brindado en la realización del trabajo y por despertar en mí ese interés por química, ya olvidado.

Estoy agradecida con mis queridos compañeros y amigos de trabajo Isaac, Luis, José Luis y Cristina por abrirme las puertas del laboratorio de Fitopatología; pero, sobre todo gracias por dejarme entrar en su corazón. Gracias por el apoyo y paciencia que me brindaron a lo largo de este tiempo.

Gracias mis amigos y compañeros de generación de maestría por compartir conmigo momentos inolvidables.

Magda amiga mía muchas gracias por tu amistad y consejos.

Agradezco a Tania, Roxana, Maura, Arturo, Ana, Octavio y Sandra; compañeros y amigos del laboratorio por compartir esos pequeños tips (siempre tan indispensables), su sinceridad al analizar los resultados y su apoyo en tiempos difíciles.

Quiero dar gracias a las dos mujeres que son el aliento en mi vida. Gracias Amelia y Aurora.

A mis hermanas Xochitl y Elizabeth muchas gracias por ser pilares importantes en mi vida.

RESUMEN

En este trabajo propone resolver la limitación de oxígeno en la biosíntesis de rifamicina B en *A. mediterranei*, mediante una estrategia donde se redirecciona la utilización del oxígeno; mediante la fusión de las enzimas citocromo P450 (CYP450); monooxigenasa que es responsable de catalizar el paso limitante en la biosíntesis de rifamicina, con la hemoglobina (VHb) de *Vitreoscilla stercoraria*.

Se realizaron diferentes modelamientos para predecir la probable conformación que adoptará la nueva proteína (VHB-CYP); resultante de la unión del CYP450 con la VHb. Además de evaluar la posibilidad de introducir aminoácidos que funcionaran como una bisagra y permitieran un mayor acoplamiento de ambas proteínas.

Una vez descartada la utilización de aminoácidos como bisagra y obtener un modelo con una alta probabilidad de existencia en la naturaleza. Se procedió a diseñar y construir un vector de expresión en *Amycolatopsis mediterranei* para la proteína de fusión Vgh/CYP.

Para esta construcción se empleó el plásmido pULVK2, el cual contiene un sitio de replicación para *E. coli* y *A. mediterranei*, un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección y un sitio múltiple de clonación que fue aprovechado para la inserción y fusión de los genes *orf 5* y *vhb*. Logrando construir el primer plásmido pUAMLQ1 con las características antes mencionadas.

Debido a que *A. mediterranei* tiende a formar mutantes espontáneas resistentes a kanamicina, fue necesaria la incorporación de un segundo marcador de selección; que fue el gen de resistencia a eritromicina. Este gen fue obtenido del plásmido pIJ4026; realizando una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* e insertado en el plásmido pUAMLQ1. Obteniendo nuestra segunda construcción, la cual fue utilizada para transformar a *A. mediterranei*, empleando la técnica de biobalística. Para la selección de las colonias transformadas se empleo un medio de selección con 10 µg/mL de

medio; aquellas colonias que crecieron fueron sometidas a una segunda selección cualitativa.

La selección cualitativa de las transformantes que presentaban mayor crecimiento y que tenían una coloración naranja intensa; se interpretó como un probable incremento en la producción de rifamicina B; o bien, por efecto de un mayor contenido de proteínas con grupos *hemo*, hay que recordar que tanto la hemoglobina como el citocromo P450, podrían generar cierto tono rojizo a las colonias transformantes. De esta forma, se eligió la cepa 10; por cumplir con los criterios antes mencionados, y se procedió a realizar las pruebas de fermentación apreciándose una producción de rifamicina a partir de las 24 h de iniciada la fermentación en la cepa transformada con el plásmido pUAMLQ-2, a diferencia de la cepa parental. Incrementándose su producción en condiciones limitantes de aireación, después de 4 días del proceso; en siete veces comparándola con la cepa parental.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. Introducción | |
| a. Microorganismo filamentosos productores de antibióticos | 1 |
| b. Limitación de oxígeno durante el proceso fermentativo en la producción de antibióticos | 1 |
| II. Antecedentes | |
| a. Rifamicinas | 4 |
| b. Posibles soluciones al problema de la limitación del oxígeno | 7 |
| c. Hemoglobina bacteriana | 9 |
| d. Citocromo P450 | 11 |
| e. Proteínas de fusión | 13 |
| f. Modelamiento de proteínas | 14 |
| III. Hipótesis | 16 |
| IV. Objetivos | |
| a. Objetivo general | 17 |
| b. Objetivos específicos | 17 |
| V. Materiales y Metodos | 18 |
| a. Microorganismos empleados: | 18 |
| b. Aparatos y reactivos: | 18 |
| c. Vectores empleados | 19 |
| d. Medios de Cultivo | 20 |
| e. Dinámicas para la obtención del modelo de la proteínas de fusión vhb-cyp | 22 |
| f. Secuencias de genes | 25 |

| | |
|---|----|
| g. Diseño de oligonucleótidos | 26 |
| i. Tamaño y especificidad | 27 |
| ii. Temperatura de fusión (T _m) | 27 |
| iii. Complementariedad en la secuencia de los oligonucleótidos | 27 |
| iv. Contenido en G/C y extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G) | 27 |
| v. Secuencia 3'-terminal | 28 |
| vi. Secuencia 5'-terminal y regiones centrales. | 28 |
| h. Preparación de células electrocompetentes: | 30 |
| i. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5α con los plásmidos pULVK2, pGEM orf 5 y pIJ4026. | 30 |
| j. Mega preparaciones | 32 |
| k. Obtención de genes <i>orf 5</i> y <i>vhb</i> con el promotor P _{emE} por PCR | 33 |
| l. Generación de DNA recombinante | 35 |
| i. Digestión del ADN | 35 |
| ii. Integración de los fragmentos de los genes <i>orf 5</i> y <i>vhb</i> en el plásmido pULVK2 | 37 |
| m. Transformación: incorporación del plásmido recombinado a las bacterias | 38 |
| n. Selección de las células transformadas | 40 |
| o. Electroforesis en gel de agarosa | 41 |
| p. Introducción del gen de resistencia a eritromicina | 41 |
| q. Transformación de <i>A. mediterranei</i> Biobalística | 42 |
| r. Fermentación (Producción de rifamicina) | 46 |

| | |
|------------------|----|
| VI. Resultados | 48 |
| VII. Discusión | 63 |
| VIII. Conclusión | 71 |
| IX. Referencias | 72 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de Rifamicina B. | 4 |
| Figura 2. Organización genética del cluster biosintético de Rifamicina. | 5 |
| Figura 3 Mecanismo propuesto para la formación del enlace y rearreglo del policetido en la biosíntesis de la rifamicina B, la enzima P450 del gen <i>rif-orf 5</i> puede ser involucrada en la formación del enlace oxidativo y conversión de la rifamicina W. | 7 |
| Figura 4.- Efecto de aireación sobre la producción de rifamicina B (P), biomasa (X), y viscosidad en medio F2m1 con una variante NCH. Condiciones 500 rpm y 28 °C. | 8 |
| Figura 5 Mapa de restricción del plásmido pULVK2. | 19 |
| Figura 6 Mapa de restricción del plásmido pIJ4026. | 20 |
| Figura 7 Secuencia del Promotor de <i>S.erythraea</i> (P_{ermE}), identificación del gen M11200. En letras de color verde se marca la secuencia empleada para el primer VHF. | 25 |
| Figura 8 Secuencia del gen <i>vhb</i> de <i>V. stercoraria</i> (<i>vhb</i>), identificación del gen M27061. En letras de color rojo se marca la secuencia empleada para el primer VHR. | 25 |
| Figura 9 Secuencia del gen <i>orf5</i> (<i>cyp450</i>) de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> , identificación del gen AAC01729.1. En letras de color rojo se marca la secuencia empleada para el primer VHR. | 26 |
| Figura 10. Primers diseñados para la amplificación por PCR del gen <i>vhb</i> con el promotor de Eritromicina; empleando como molde al plásmido pUAMSAG2 . | 29 |
| Figura 11. Primers diseñados para la amplificación por PCR del gen <i>orf 5</i> ; empleando como molde al plásmido pGEM <i>orf 5</i> . | 29 |
| Figura 12 Esquema general de ligación, para la fusión de los genes <i>orf 5</i> y <i>vhb</i> en el plásmido pULVK2. | 37 |
| Figura 13 Plásmido pUAMLQ-1, el cual contiene la fusión de los genes <i>orf 5</i> y <i>vhb</i> en el plásmido pULVK2. | 38 |
| Figura 14 Mapa de restricción del pUAMLQ2, el cual contiene los genes fusionados <i>vhb</i> y <i>orf 5</i> , además del segundo marcador de selección; el gen de resistencia a la eritromicina (E_{RM}). | 42 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 15 | Figura. 15 Citocromo P450 165C4. Pertenece a la misma familia 1 de CYP'S. Se encuentra involucrada en la formación de enlaces en la cadena aromática del heptapeptido de la vancomicina. | 48 |
| Figura 16 | Citocromo P450 165B3, pertenece a la familia 1 de CYP. Enzima involucrada en la formación de enlaces de la cadena aromática del heptapeptido de vancomicina. | 49 |
| Figura 17 | Modelo propuesto para la enzima cyp 450 de <i>A. mediterranei</i> , cuya función de monooxigenasa interviene en la transformación de rifamicina W a rifamicina S en la biosíntesis de rifamicina B. | 49 |
| Figura 18 | Acercamiento de las proteínas CYP 450 de <i>A. mediterranei</i> y Vhb de <i>V. stercoraria</i> en un intento de acoplar ambas proteínas y fusionarlas. | 50 |
| Figura 19 | Modelo propuesto para la proteína quimérica Vhb/CYP. | 51 |
| Figura 20 | Amplificación de los plásmidos pIJ4026 y pULVK2. | 52 |
| Figura 21 | Amplificación y digestión de los plásmidos: pGEM orf 5 y pUAMSAG 1; liberando los genes <i>orf 5</i> y <i>vhb</i> | 53 |
| Figura 22 | Amplificación del gen <i>orf 5</i> a partir del plásmido pUAMSAG2, con un peso molecular de 1266 pb | 53 |
| Figura 23 | Amplificación del gen <i>vhb</i> a partir del plásmido pGEM orf 5, con un peso molecular de 612 pb | 54 |
| Figura 24 | Identificación de la colonia transformada. Donde se muestra la liberación de los genes fusionados del vector de clonación pULVK2 y corroboración de su identidad. | 54 |
| Figura 25 | Digestión con la enzima EcoRI para linearizar del plásmido pUAMLQ1 y corroborar su identidad. | 55 |
| Figura 26 | Liberación de los genes fusionados a partir del plásmido pUAMLQ-1. | 55 |
| Figura 27 | Electroforama de la secuencia de nucleótidos del gen <i>vhb</i> . En la parte superior la secuencia obtenida a partir del primer <i>vhb</i> F y en la inferior la obtenida con el primer <i>vhb</i> R | 56 |
| Figura 28 | Alineamiento de las secuencias <i>vhb</i> F y <i>vhb</i> R. | 57 |
| Figura 29 | Digestión parcial del plásmido pUAMLQ-1 con las enzimas Xba I y EcoRI. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb, en el carril no. 2 corresponde al ADN plásmidico de pUAMLQ-1 y del carril 3-8 corresponde a las digestiones parciales con la enzima Xba I. | 59 |
| Figura 30 | Digestión total con la enzima EcoRI del plásmido pUAMLQ1 previamente linearizado con Xba I. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 31 Obtención del gen E_{erm} a partir de la digestión del plásmido pIJ4026 con las enzimas EcoRI y XbaI. | 60 |
| Figura 32 Linerización y comprobación del plásmido pUAMLQ-2. En el primer carril se muestra la linearización del plásmido seguido del marcador de peso molecular de 1 kb y finalmente una doble digestión del plásmido para liberar el gen de eritromicina | 60 |
| Figura 33 Producción de rifamicina por las cepas de <i>A. mediterranei</i> transformada y parental. | 62 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Identificación de las proteínas que se emplearon para modelar a la proteína codificada por <i>orf5</i> . | 25 |
| Tabla 2. Citocromos P 450 a partir de los cuales se obtuvo el modelo de la proteína orf 5. | 48 |
| Tabla No. 3 Concentración de rifamicina durante el proceso de fermentación comparando las cepas de <i>A. mediterranei</i> pUAMLQ-2 y su contraparte la cepa parental; en un periodo de 96 h. | 62 |

I. INTRODUCCIÓN

a) Microorganismo filamentosos productores de antibióticos

Los microorganismos que sintetizan productos útiles para el hombre representan, como máximo, unos pocos centenares de especies de entre las más de 100,000 descritas en la naturaleza. Los pocos que se han encontrado con utilidad industrial son apreciados por elaborar alguna sustancia que no se puede obtener de manera fácil o barata por otros métodos. Los microorganismos de usos industriales son: hongos filamentosos, levaduras y bacterias filamentosas. Encontrándose que desde la segunda mitad del siglo XX se ha informado cerca de 50,000 productos naturales provenientes de actinomicetos, de los cuales más de 10,000 son biológicamente activos y más de 8,000 son agentes antibióticos y antitumorales (Fenical, 1993).

De los 12,000 antibióticos conocidos el 55% son producidos por bacterias filamentosas del género *Streptomyces* (anfotericina B, kanamicina, neomicina, estreptomycin, tetraciclina, etc.) (Demain, 1999), 11% de otras bacterias filamentosas, 12% de bacterias no filamentosas (géneros *Bacillus*, productor de antibióticos como: gramicidina, bacitracina, polimixina, proteasas e insecticidas y 22% por hongos filamentosos (del género *Penicillium* y *Cephalosporium*) (Demain, 1999).

b) Limitación de oxígeno durante el proceso fermentativo en la producción de antibióticos

Está comprobado que más de 500 sustancias antibióticas distintas son producidas por actinomicetos y que tienen múltiples aplicaciones en la medicina, veterinaria y agricultura (Cross, 1981). La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos filamentosos no solo incluyen antimicrobianos, si no también anticancerígenos y antiinflamatorios, (Cross,

1981; Jensen y Fenical, 1994). Debido a ello surge la necesidad de encontrar estrategias para mejorar la producción de estos metabolitos secundarios. Un problema común en todos estos procesos es el tipo de crecimiento de estos microorganismos miceliares en medio líquido, que dificulta la transferencia de oxígeno en el medio por elevación de la viscosidad. (Mejía, *et al.*, 1998; Virgilio *et al.*, 1964; Lancini y Cavalleri, 1997).

Un ejemplo donde la limitación del oxígeno tiene un efecto directo sobre la producción de un antibiótico se encuentra en la biosíntesis de penicilina. Su producción está regulada por factores, como el contenido de carbono, nitrógeno y oxígeno (Feng, *et al.* 1994). La biosíntesis total de la penicilina es severamente reducida bajo condiciones bajas de oxígeno. La reducción de oxígeno suplementado durante el proceso fermentativo incrementa la acumulación de iso-penicilina N, un precursor de la penicilina. Posiblemente los bajos niveles de oxígeno afectan directamente los pasos biosintéticos, donde podrían ser afectadas diversas reacciones de oxidación, altos niveles de oxígeno podrían hacer más eficiente el metabolismo el metabolismo general y reflejarse en un incremento en la producción de penicilina. (Feng, *et al.* 1994)

Otro caso donde se ha observado que la limitación de oxígeno afecta en algunas reacciones involucradas en la biosíntesis de la rifamicina (Anderson *et al.* 1989).

Krishna y colaboradores (1998), identificaron a la aireación como un parámetro crítico en la producción de la rifamicina. Sugieren como parámetros óptimos un índice de aireación de 250 rev/min para un volumen 50 mL, con un inóculo del 10% para un período de fermentación de 11 días. Aplicando este tipo de variantes incrementaron la producción de 350 mg/l a 2000 mg/l (Krishna, *et al.*, 1998).

Estudios realizados por Tayeb y colaboradores (2004) sobre la producción de este antibiótico, destacan a la aireación y el oxígeno disuelto como parámetros que deben de ser altamente cuidados para mantener una buena producción de rifamicina. Usando una variante de *Amycolatopsis mediterranei* (NCH), se logró

optimizar la producción al controlar y ajustar la aireación a 1 vvm por tres días, oxígeno disuelto (DO) al 30% de saturación. Manteniendo estos parámetros se incrementó la producción de 9.77 a 11.96 (22%) y 13.39 (37%) respectivamente (Tayeb, *et al.*, 2004).

Estudios realizados por Jin (2004) demostrarán que el efecto del oxígeno disuelto durante la fermentación de rifamicina B para la producción de este antibiótico con el microorganismo *A. mediterranei* XC 9-25 juega un papel importante, ya que necesita un alto contenido de oxígeno disuelto.

II. ANTECEDENTES

a) RIFAMICINAS

Las rifamicinas son antibióticos importantes de uso clínico pertenecientes a las ansamicinas, integrados por un cromóforo naftalénico y una cadena ansa larga alifática. Las rifamicinas (figura 1) y las farmacos semisintéticas derivadas de ellos ejercen su actividad antibiótica por la inhibición específica de la RNA polimerasa bacteriana dependiente de DNA (Wehrli, 1977). En concentraciones más altas, estos antibióticos también inhiben la RNA polimerasa dependiente de DNA de retrovirus (Szabo, *et al.*, 1976). Aunque la rifamicina se utilizan para el tratamiento contra las infecciones de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, agentes causales de la tuberculosis y lepra, respectivamente (Szabo, *et al.*, 1976; Oppenheim, *et al.*, 1986; Barakett, *et al.*, 1993; Bachs, *et al.*, 1992). Además, fue demostrado recientemente que la rifamicina puede curar infecciones relacionadas con *Staphylococcus* (Zimmerli, *et al.*, 1998).

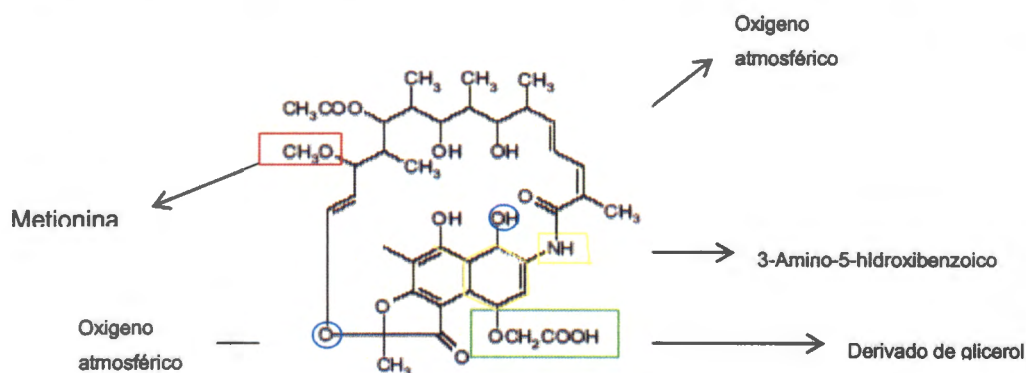


Figura 1. Estructura química de Rifamicina B (Ansgar Stratmann, 2002).

La identificación y orden del grupo de genes de la policétido sintasa de la rifamicina (PKS), se muestra en la figura 2. Encontrándose cinco genes, rifA-rifE, responsables de la síntesis de la cadena del policétido de la rifamicina

(Schupp, *et al.*, 1998). Las enzimas multifuncionales codificadas contienen un total de diez módulos de PKS, que utilizan el ácido 3-amino-5-hydroxybenzoico (AHBA) como una unidad de inicio para catalizar el alargamiento de la cadena del policétido; para construir la espina dorsal del policétido de la molécula del rifamicina. Estudios realizados para demostrar el rol que juega cada uno de los genes involucrados en la biosíntesis de la rifamicina B condujo a emprender la inactivación del gene del *rifF*, directamente de los genes de PKS, y a analizar el efecto de esta mutación en la biosíntesis de la rifamicina. El producto del gene del *rifF* ha sido caracterizado como una sintetasa de amida de la rifamicina por homologías de la secuencia a diversas N-N-acetiltransferasas aril-amino (August, *et al.*, 1998) y la función supuesta de la proteína de *RifF* en la biosíntesis de rifamicina fue sugerida como una ciclasa, catalizando la formación de un enlace intramolecular de la amida entre el carboxilo terminal sintetizado en la cadena del policétido y el grupo amino de la unidad de AHBA (Chen, *et al.*, 1999).

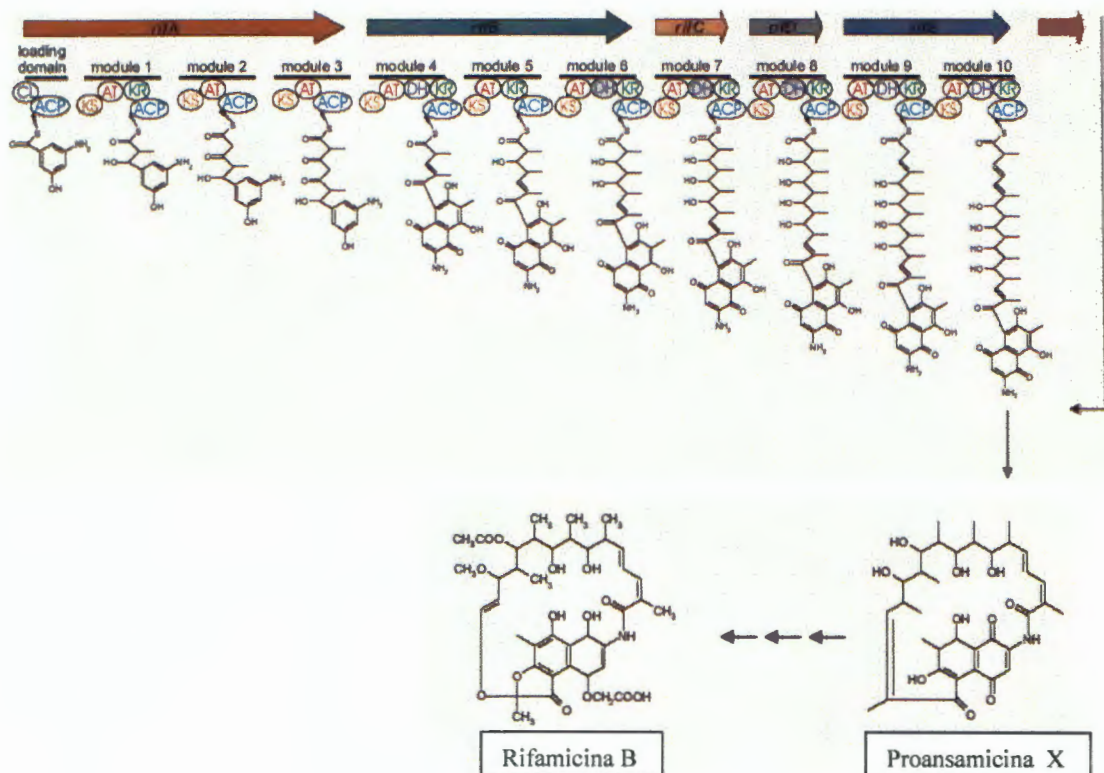


Figura 2. Organización genética del cluster biosintético de rifamicina (Ansgar Stratmann, 2002).

En la etapa final de la biosíntesis de la rifamicina B debemos resaltar la incorporación de oxígeno atmosférico, como demostró Anderson y colaboradores (1989). En este paso se incorpora un átomo de oxígeno como grupo éter vinílico en el carbono 29 de la rifamicina S. Este oxígeno al igual que el del carbono 1 del grupo aromático, provienen del oxígeno atmosférico, como lo demostraron Anderson y sus colaboradores en 1989, mediante sus estudios con una atmósfera artificial con oxígeno radiactivo ($^{18}\text{O}_2$). Este oxígeno es empleado por un citocromo P450 para la biosíntesis de la rifamicina. Estudios realizados por Lee y sus colaboradores (2004), demostraron que el producto del gen *orfO*, por comparación de secuencias, codificaba para una citocromo P450 monooxigenasa; su función dentro de la ruta biosintética del antibiótico se demostró al eliminar este gen; observándose el cese de la producción de la rifamicina B. De esta forma demostraron que esta monooxigenasa interviene en reacciones de deshidrogenación e hidroxilación del macrocíclico, proansamicina X (Lee, *et. al.* 2004). Además dentro del clouster biosintético encontramos al gen *rif-orf 5*, un gen que codifica para una enzima P450, y que se demostró se encuentra involucrada en la modificación de la rifamicina W a uno de los intermediarios directos de la rifamicina B.

White y colaboradores demostraron en sus experimentos que al lavar el micelio de las cepas productoras de rifamicina B de *A. mediterranei* se logró la transformación de rifamicina W en rifamicina B (White *et al.*, 1974). Y como resultado de la inactivación del gen *rif-orf5* a partir de las mutantes capaces de producir rifamicina W, Xu y sus colaboradores proponen que la función del gen *rif-orf 5* es la formación de un doble enlace en el C12–C29 de la rifamicina W para formar una estructura ceto; como se muestra en la fig.(3); esto seguido de una oxidación del C-34 pasando de un alcohol a un ácido carboxílico y después a una descarboxilación y deshidratación, obteniendo DMDARS (Rifamicina S), continuando con su conversión a rifamicina B (Xu, *et al.*, 2005). Por tanto es claro que la biodisponibilidad del oxígeno es fundamental para la síntesis de este antibiótico.

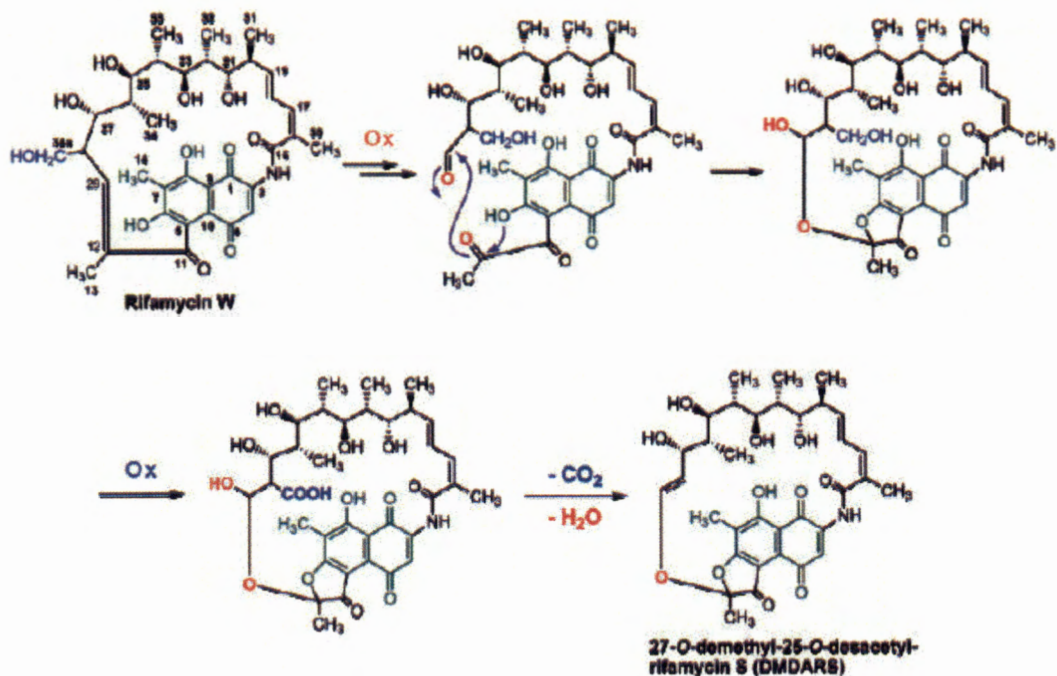


Fig. 3 Mecanismo propuesto para la formación del enlace y rearrreglo del policetido en la biosíntesis de la rifamicina B, la enzima P450 del gen *rif-orf 5* puede ser involucrada en la formación del enlace oxidativo y conversión de la rifamicina W.

b) POSIBLES SOLUCIONES AL PROBLEMA DE LA LIMITACIÓN DEL OXÍGENO

Como ya se vió, una característica del proceso fermentativo cuando se emplea a *A. mediterrane*, un actinomiceto; es el alto requerimiento de oxígeno, durante su crecimiento y producción del antibiótico; así que la aireación tiene un efecto importante sobre la producción de rifamicina B. Si esta demanda de oxígeno no es resuelta por una fuente adecuada, se obtiene una producción final muy baja de rifamicina B (Virgilio, *et al.*, 1964; Lancini y Cavalleri, 1997).

Para la comprensión de este problema analizaremos la figura 4 donde se observa la relación existente entre las concentraciones de oxígeno disuelto y el nivel de producción de rifamicina B. Observándose que a los 2 días y medio de la fermentación se encuentra la mayor demanda de oxígeno y la menor

concentración de oxígeno disuelto; llegando a niveles de casi cero; según datos reportados por Virgilio y colaboradores (Virgilio, *et al.* 1964)

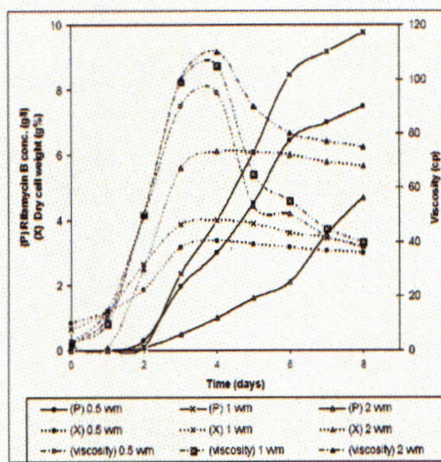


Fig. 4.- Efecto de aireación sobre la producción de rifamicina B (P), biomasa (X), y viscosidad en medio F2m1 con una variante NCH. Condiciones 500 rpm y 28 °C

Dentro de las posibles soluciones para este problema Virgilio y sus colaboradores realizaron estudios donde emplearon diferentes diámetros de turbinas, además de probar varias velocidades de agitación, durante el proceso de fermentación. A pesar de que se modificaron estas variables no se resolvió el problema de demanda de oxígeno y solo se recorrió la hora crítica de la caída en la producción de este antibiótico (Virgilio, *et al.* 1964)

El-Tayeb y colaboradores efectuaron diversas investigaciones para resolver este problema, incrementando la velocidad de aireación. Pero observaron al incrementar el flujo de aireación a 2 vvm; no se incrementa la producción de rifamicina. Este fenómeno fue explicado por el incremento en la biomasa y por lo tanto al incremento en la viscosidad durante el proceso; lo que impide una adecuada transferencia de oxígeno durante la fermentación (El-Tayeb, *et al.* 2004). En los trabajos realizados por Margaritis y Zajic (1978) reportaron resultados similares; quienes explicaron que esta masa celular excedió el nivel de transferencia óptima del oxígeno requerido para la máxima producción de rifamicina durante la fermentación.

Además de modificar la velocidad de aireación y de emplear diferentes tamaños de turbinas; se desarrollaron tecnologías de sensores para determinar la concentración de oxígeno disuelta y tratar de mantenerlo en un nivel constante (Oosterhuis y Kossen, 1983).

Hasta el momento todas estas propuestas no han resuelto satisfactoriamente el problema; así la tecnología del DNA recombinante en microorganismos de uso industrial ofrece una alternativa más. Muchas de sus aplicaciones se han enfocado en el incremento de la producción de determinadas proteínas deseadas o en re-direccionar el flujo metabólico para la obtención de un producto (por ejemplo: amino ácidos o antibióticos).

Uno de estos microorganismos que posee un gran potencial para resolver el problema de limitación de oxígeno, es: *Vitreoscilla*, una bacteria aerobia estricta que cuando es crecida bajo condiciones limitantes de oxígeno incrementa la expresión de una hemo-proteína homodimerica (VHb). Las características de la VHb: de sólo asociarse y su valor de la constante para la disociación del oxígeno, que es inusualmente grande; hace a esta proteína una candidata para resolver el problema de limitación de oxígeno.

c) Hemoglobina bacteriana

La hemoglobina bacteriana (VHb) es producida por especies de *Vitreoscilla* que son bacterias gram positiva, aerobia estricta, miembros de la familia Beggiatoa; y cuyos habitats son generalmente hipotóxicos. Este microorganismo aumenta al doble la producción de la hemo-proteína (VHb) cuando hace frente a limitaciones de oxígeno (Boerman y Webster, 1982). La proteína VHb ha sido extensamente estudiada con respecto a sus características bioquímicas y estructurales. Se ha especulado, basado en la construcción de cinéticas de oxígeno, que la función de VHb es facilitar el flujo del oxígeno a la membrana donde se lleva a cabo el proceso de respiración (Liu y Webster, 1974; Orri y Webster, 1986). Esto fue corroborado por Webster en 1987, demostrando que la función de la proteína VHb es facilitar la respiración en concentraciones

bajas de oxígeno, transportándolo a una oxidasa terminal por mecanismos de difusión facilitada (Webster, 1987).

Ensayos de Biología Molecular han permitido clonar el gen *vhb* que codifica para la parte globular de la proteína VHb y expresarla en *E. coli* (Dikshit, y Webster, 1988; Khosla y Bailey, 1988). Estudios iniciales sobre la expresión del gen *vhb* y la actividad del promotor en *E. coli* indican que la expresión del gen es regulada por el oxígeno (Dikshit, 1989). Evidencia concluyente para esta observación ha sido obtenida a través de estudios de fusión transcripcional con los genes reporteros *cat* y *xylE* (Dikshit, y Webster, 1990; Khosla y Bailey, 1989).

Empleando técnicas de ingeniería genética han logrado integrar a *vhb* en sistemas microbianos heterólogos y se ha demostrado que facilitó el crecimiento de su hospedero en bajas concentraciones de oxígeno (Khosla y Bailey, 1988). Meenal evidenció la exportación parcial de VHb al espacio periplásmico de *E. coli*; sugirió que su localización puede proporcionar una ventaja, generando un flujo adicional de oxígeno para la cadena respiratoria y que puede ser fisiológicamente relevante bajo limitaciones de oxígeno para organismo aerobios estrictos (Meenal, 1998); como lo son los actinomicetos.

La expresión de VHb en bacterias heterólogas a menudo incrementa el crecimiento, producción de antibióticos y proteínas recombinantes bajo condiciones de limitación del oxígeno. Kyung-Won y sus colaboradores demostraron una interacción significativa entre VHb y la subunidad intacta I del citocromo b_0 . Debido a que la subunidad I contiene el centro binuclear donde el oxígeno se reduce a agua, estos datos apoyan la función propuesta para la VHb de proporcionar oxígeno directamente a la oxidasa terminal; puede también explicar sus efectos positivos en *Vitreoscilla* así como en organismos heterólogos (Kyung-Won, *et al.* 2002; Khosla y Bailey, 1988).

Khosla y colaboradores (1990) demostraron que la expresión de *vhb* incrementó la síntesis de proteínas en la recombinante de *E. coli*. Este efecto

también fue observado al expresar *vhb* en *Streptomyces*, donde se incrementó la producción de actinorodina (Magnolo, *et al.*, 1991).

Conjuntando las técnicas de biología molecular para transformar a *Amycolatopsis mediterranei* y el potencial de la hemoglobina aislada de *Vitreoscilla stercoraria* se han obtenido resultados interesantes en cuanto al incremento en la producción de la rifamicina B (Guerra, 2006)

d. Citocromo p 450

Como ya se mencionó, la limitación de oxígeno afecta algunas reacciones involucradas en la biosíntesis de la rifamicina (Anderson *et al.* 1989). Siendo en la etapa final de la ruta metabólica de la rifamicina B donde existe la incorporación de oxígeno atmosférico. En este paso, se incorpora un átomo de oxígeno como grupo éter vinílico en el carbono 29 de la rifamicina S. Este oxígeno proviene del oxígeno atmosférico y es empleado por un citocromo P450 para la biosíntesis de la rifamicina (Anderson, *et al.*, 1989; Lee, *et al.* 2004; August *et al.*, 1998).

Cabe señalar, que la actividad de este tipo de enzimas o citocromos P450 (CYP), no se limita a la participación en la biosíntesis de antibióticos como la rifamicina, si no que desempeña un papel muy importante en la resistencia a efectos farmacológicos y toxicológicos de diversas farmacos. Esta capacidad de modificación se considera cada vez más, como esencial para el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos (Vermeulen, 2003.).

Un ejemplo reciente de la aplicación de CYP en la síntesis de fármacos potenciales y reacciones químicas especiales, es el uso del CYP102 proveniente de *Bacillus megaterium* que interviene en la conversión de araquidonato en ácido epoxieicosatrienoico y ácido linoleico en leucotoxina B, respectivamente. (Falck, *et al.*, 2001). Un ejemplo más es la reacción 6- β -hidroxilación catalizada por un CYP de *Mucor hiemalis*, para obtener el compuesto hipocolesterolemico "pravastatina" (Serizawa, *et al.*, 1983). Además

se demostró su intervención en la síntesis de eritromicina y tetraciclinas que ha sido bien caracterizado por Hutchinson y sus colaboradores (Shafiee y Hutchinson, 1988; Shen y Hutchinson, 1994).

Sin embargo el uso de CYP's en la producción de farmacos no ha sido explotado con todo su potencial. La síntesis de antibióticos puede ser considerado como un modelo y una meta práctica en el continuo reemplazamiento de antibióticos; es un *fait accompli* en el mundo farmacéutico (Shafiee y Hutchinson, 1988; Shen y Hutchinson, 1994).

Retomando al problema en la biosíntesis de rifamicina, donde uno o más citocromos P450 requieren de oxígeno atmosférico para su adecuada actividad. Y como ya se comentó en determinado momento de la fermentación, las colonias del cultivo que tienden a formar pellets o esferulas; hace más crítica la transferencia de oxígeno, por lo que este elemento se vuelve limitante. En un intento por resolver este problema, se clonó el gen *vhb* en un plásmido denominado pUAMSAG1 con el cual se transformó a la bacteria *A. mediterranei* y cuando se realizó el proceso de fermentación bajo condiciones limitantes de oxígeno se observó un incremento en la producción de rifamicina B en las células transformadas (Guerra, 2005).

A pesar de que este aumento en la captación de oxígeno se dio, no se observó un incremento de la magnitud esperada; por lo que creemos que el oxígeno que es captado por la hemoglobina bacteriana se libera en el citosol y nuevamente se lleva a cabo una competencia por el oxígeno dentro de las distintas rutas metabólicas que lleva a cabo *A. mediterranei* y que no se usa exclusivamente en la biosíntesis de la rifamicina B. Es por ello que surge la idea de fusionar a la hemoglobina bacteriana y el citocromo P450 que consideramos es el catalizador de una reacción intermediaria crucial en la biosíntesis de la rifamicina B.

e) Proteínas de fusión

El fusionar proteínas tiene como meta final “el diseño de nuevos biocatalizadores”; que tengan una actividad dual; que mantengan su especificidad de catálisis y que a su vez den otros beneficios a la ruta metabólica que deseemos mejorar (Brennard, *et al.*, 1986; Windass, *et al.*, 1980; Stanzak *et al.*, 1986; Bailey, 1991).

Uno de los primeros ejemplos de ingeniería metabólica (la transferencia genética de fenotipos usuales a organismos heterólogos), fue la expresión de Vhb en bacterias, levaduras, hongos y plantas, todos aerobios; para incrementar su crecimiento y productividad (Bailey, *et al.*, 1996; Bülow. *et al.*, 1999; Holmberg, *et al.*, 1997; Minas, *et al.*, 1998).

Existiendo varios antecedentes donde esta tecnología es aplicada con el único objetivo de incrementar la producción de un metabolito de interés. Parece ser esta una opción muy atractiva como posible solución al problema de la limitación de oxígeno en la biosíntesis de rifamicina B. Como recordamos para tratar de subsanar este problema se introdujo el gen *vhb* para incrementar la captación de oxígeno dentro de la célula, sin embargo este oxígeno, que es liberado en el citosol de la bacteria, consideramos que podría estar sujeto a una nueva competencia (demanda), al ser empleado por todas aquellas rutas metabólicas donde es requerido, y no en la biosíntesis de la rifamicina, que es donde nos interesa su utilización.

En un intento por redirigir esta utilización de oxígeno hacia la ruta biosintética de rifamicina B proponemos la fusión del CYP, que cataliza la introducción del oxígeno a la rifamicina W (resultados no publicados) y obtener como producto a la rifamicina S, pues consideramos a esta reacción como la limitante en la producción de rifamicina B, con la hemoglobina bacteriana de *Vitreosilla stercoraria*. Garantizando de esta forma que el oxígeno que fuese captado por la célula sea destinado para esta reacción. Y así resolver el problema de la limitación de oxígeno; asegurando un incremento relevante en la producción de rifamicina B.

f) Modelamiento de proteínas

En los últimos años las técnicas de Biología Molecular han puesto a nuestra disposición un gran caudal de información genética en forma de largas secuencias, es por eso cada vez más importante el problema de extraer información útil a partir de estos datos. Tradicionalmente se ha considerado que con el análisis estructural de toda la proteína, y en especial con la determinación de la configuración, naturaleza y localización del sitio activo, se tenía información suficiente para determinar su función biológica. Por ello, la determinación de la estructura tridimensional activa y de la función biológica han compartido, en principio, los mismos instrumentos de análisis y predicción con todas sus limitaciones, desestimándose parámetros físico-químicos cruciales que podrían dar cuenta de un fenómeno tan importante para la función biológica como es la selectividad.

Los posibles usos de los modelos obtenidos de la proteína dependen en gran parte de la calidad de los mismos (Sali y Kuriyan, 1999; Peitsch, 2002; Kopp, Peitsch y Schwede, 2003). La exactitud de un modelo puede variar perceptiblemente, incluso dentro de diversas regiones de la misma proteína: las regiones generalmente altamente conservadas de la plataforma se pueden modelar mucho más confiables que las regiones variables de enlaces o los residuos superficiales. El programa SWISS-MODEL proporciona varias herramientas para permitir que el usuario evalúe la confiabilidad del modelo. Esto incluye la energía del campo de fuerza (van Gunsteren, 1996; <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) para la estructura total y para que cada residuo individual, identificándose regiones conformacionales o problemas electrostáticos. Siendo las alineaciones inexactas de la plantilla blanco son la fuente de errores más frecuente en modelos. Esto ocurre cuando la secuencia blanco y la plantilla tienen menos del 40% de compatibilidad, y es necesario corregir manualmente la alineación para alcanzar un modelo satisfactorio.

El conocimiento de la estructura tridimensional de las proteínas da valiosa información para discernir las bases moleculares en la función de la proteína,

para un efectivo diseño experimental, como la mutagénesis dirigida, las bases para el diseño estructural de un inhibidor específico o como en nuestro caso predecir la conformación espacial al fusionar dos proteínas para formar una nueva proteína quimérica.

III. HIPÓTESIS

La proteína de fusión Vgh/CYP provocará una mayor eficiencia bajo condiciones de transferencia de oxígeno limitantes, en la reacción dependiente de oxígeno atmosférico responsable de la transformación de la rifamicina W reflejándose en un incremento en la biosíntesis de rifamicina B.

IV. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Evaluara el efecto de la expresión de un gen quimérico (*vgh/orf5*) en la producción de rifamicina B por *Amycolatopsis mediterranei* en condiciones de baja aireación.

b. Objetivos específicos

1. Determinar la distancia de fusión, con base en el modelamiento de la proteína de fusión teórica Vgh/CYP y el estudio de las posibles interacciones resultantes.
2. Construir el vector de expresión con los genes fusionados *vgh* y *cyp*.
3. Transformar *Amycolatopsis mediterranei* con el gen que codifica para la proteína de fusión.
4. Evaluar las transformantes obtenidas en su capacidad de biosíntesis de rifamicina B.

V. MATERIALES Y METODOS

a. Microorganismos empleados:

***Escherichia coli* DH5 α** : Microorganismo empleado en las técnicas de clonación y construcción de plásmidos. Cuyo crecimiento óptimo es de 37° C; en caso de crecimiento en medio líquido se empleó una agitación de 250 rpm.

Amycolatopsis mediterranei: Cepa mutante (**Msb1**), derivada de la cepa M18 (ATCC 21789), empleada para transformar el gen de fusión *vhb-cyp* 450 y evaluar su efecto sobre la biosíntesis de rifamicina B. Se empleó una temperatura de incubación de 30°C y para los cultivos en medio líquido una agitación de 200 rpm. Para evaluar la expresión del gen de fusión se llevó a cabo la producción de rifamicina, realizando una fermentación en condiciones de baja aireación como lo describió Krishna y colaboradores (1998).

b. Aparatos y reactivos:

Aparatos

Balanza analítica OHAUS Explorer

Bomba de vacío

Cámaras de electroforesis: Electrophoretic Gel System E-C Minicell EX370 M y EC 350

Centrifuga 5415 Eppendorf

Electroporador 2510 Eppendorf

Espectrofotometro UV-1201 Shimadzu

Estufa

Fuente de Poder: Power Pac 3000 BIO-RAD

Gel DOC 2000 BIO-RAD

Incubadora con agitación orbital: Environ-Shaker 3597

Microondas SANYO

Microscopio Olympus CH30

Potenciómetro Orion modelo 525 A

Sistema de Biobalística

Termociclador: Mastercycle Personal, Eppendorf

Transiluminador de luz U.V.

Ultracentrifuga AVANTI™ 30 BECKMAN

Ultracongelador -20°C Revco

Ultracongelador -70°C Forma Scientific

c. Vectores empleados

Plásmido pULVK2: Con un peso de 5.7 kpb. Derivado del plásmido endógeno *N. lactamdurans* LC 411 pRL1. Con un origen de replicación para *E. coli* del plásmido pBRL32 (pBR-ori) y *Amycolatopsis* sp., cuyo marcador de selección es la resistencia a kanamicina obtenido a partir del Tn5 (Km^r) y un sitio de clonación múltiple (Kumar et al., 1994).

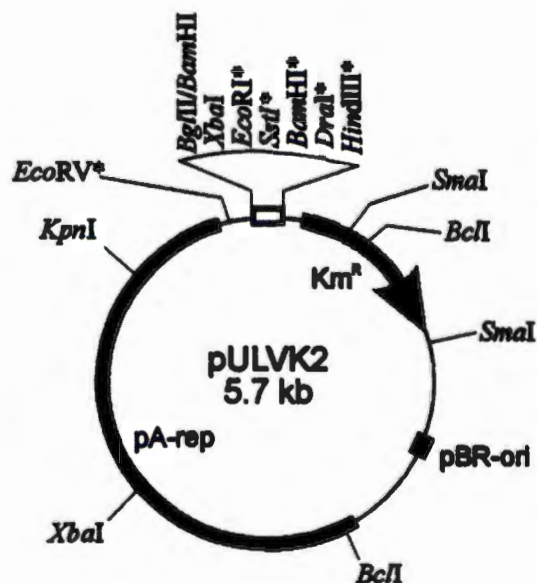


Fig. 5 Mapa de restricción del plásmido pULVK2.

Plásmido pJ4026 con 4,312 pb, (Bibb *et al.*, 1985). Derivado del pGEM3Zf (+), el cual contiene en su secuencia el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) de *Saccharopolyspora erythraea*, con origen para replicación para *E. coli* y un de resistencia a ampicilina como marcador selección. A partir de este plásmido se obtuvo el gen de resistencia a eritromicina para clonarlo en el plásmido pUAMLQ2.

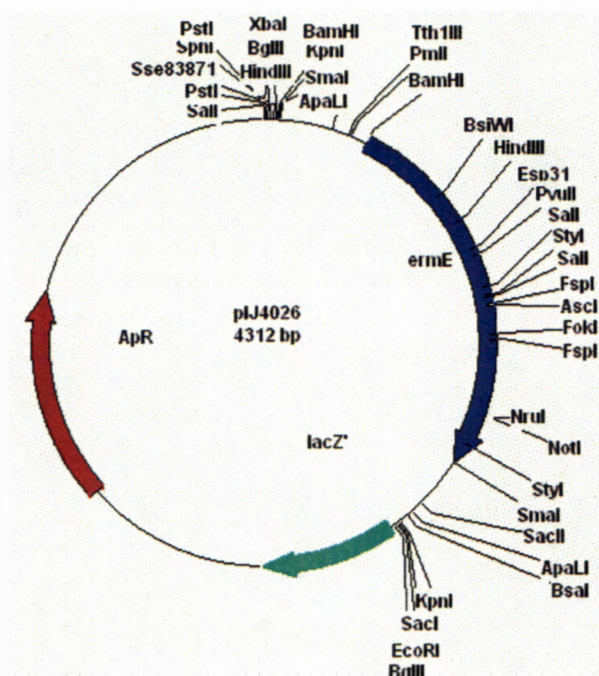


Fig. 6 Mapa de restricción del plásmido pJ4026

d. Medios de Cultivo

Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972): Empleado para cultivar a *E. coli*.

| | |
|----------------------|------|
| Bacto-triptona | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |

Ajustando el pH a 7.5 con NaOH, y el volumen a un litro. Para su utilización como un medio sólido, añadir 20 g de agar por litro de medio antes de esterilizar.

Medio Bennet (Margalith y Pagani, 1961), Medio de cultivo empleado para *A. mediterranei*.

| | |
|----------------------|------|
| Glucosa | 10 g |
| Extracto de Carne | 1 g |
| NZ-Amina A | 2 g |
| Extracto de Levadura | 1 g |

Ajustando el pH a 7.0 y el volumen a un litro. Para su utilización como un medio sólido, añadir 20 g de agar por litro de medio antes de esterilizar. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Difco.

Medio YEME (Hopwood *et al.*, 1985), Empleado para el crecimiento masivo y disgregado de *A. mediterranei*.

| | |
|----------------------|-------|
| Glucosa | 10 g |
| Sacarosa | 103 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Bacto peptona | 5 g |
| Extracto de malta | 3 g |

Ajustando el pH a 7 y el volumen a un litro. Después de esterilizar esta mezcla se adicionaran 2 mL de una solución 2.5 M de $MgCl_2 \cdot H_2O$. Y glicina al 20% (p/v), lo que equivale a 25 mL por cada litro de medio. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Difco.

Medio Lee (Lee *et al.*, 1983) Utilizado para la producción de rifamicina

| | |
|---------------|-------|
| Glucosa | 120 g |
| Bacto peptona | 10 g |

| | |
|--------------------------------|-------|
| Extracto de levadura | 10 g |
| 5,5-Dietilbarbiturato de sodio | 0.7 g |

Se recomienda esterilizar por separado la solución de glucosa en 500 mL de agua destilada, y después mezclarlo con los otros compuestos esterilizados en 500 mL; para finalmente completar un litro. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Difco.

e. Dinámicas para la obtención del modelo de la proteína de fusión vhb-cyp

Este tipo de modelos moleculares facilita la visión espacial y permite superar la dificultad de captar los aspectos tridimensionales de la estructura molecular, y por tanto posibilita que consigan un aumento significativo para la comprensión del aspecto espacial de estas biomoléculas, y de su implicación en distintos procesos biológicos y biotecnológicos.

Todo es posible gracias a los programas como DeepView (Suizo-PdbViewer); el cual fue diseñado para integrar las funciones de: visualización, análisis y manipulación de la estructura de una proteína. Este programa; (DeepView) necesita de secuencias que debemos descargar en formato PDB o ExpDB y archivarlas directamente al servidor de DeepView. Usando las herramientas de alineación integradas de la secuencia y los algoritmos estructurales de la superposición, una secuencia blanco se puede trasponer sobre las plantillas que modelaran a nuestra proteína. Una vez obtenida la alineación inicial de nuestra proteína puede ser optimizada manualmente; permitiéndonos observar los cambios en tiempo real en la superposición estructural exhibida. El archivo de proyecto completo entonces se somete al servidor de SWISS-MODEL para la construcción de prototipos.

Para la reconstrucción de las cadenas laterales se basa en las posiciones cargadas de residuos correspondientes en las estructuras del modelo. Comenzando con los residuos conservados, el modelo es construido por

reemplazamiento iso-estérico que substituye cadenas laterales de la estructura de la plantilla. Las posibles conformaciones de la cadena lateral se seleccionan de una biblioteca dependiente de la espina dorsal, que se ha construido y que consideraba cuidadosamente la calidad de las estructuras de la fuente (Lovell, *et al.*; 2000). Una función que denota y determina las interacciones favorables (enlaces de hidrógeno, puentes de disulfuro) y los contactos de cierre se aplica para seleccionar la conformación más probable.

El parámetro que nos indica la probabilidad de que nuestro modelo se acerque a la realidad es la energía de minimización. La desviación en la geometría de la estructura de la proteína, que fue modelada en base al logaritmo de sus fragmentos en forma rígida, se basa en el cálculo de la energía de minimización mayor a su pendiente empleando campos de fuerza GROMOS (Van Gunsteren; 1996). El uso acertado de la dinámica molecular restrictiva ayuda a mejorar modelos de homología; según datos recientes (Flohil, Vriend, y Berendsen, 2002). El programa DeepView (Suizo-PdbViewer) (Guex y Peitsch, 1997; Schwede, 2000) se puede utilizar para revisar los proyectos SWISS-MODEL que resultan del 'primer acercamiento a'. DeepView nos permite un ajuste manual sobre la alineación mientras que visualmente se verifican las implicaciones estructurales, la colocación de inserciones y de deleciones o la conservación de características estructurales con un papel funcional. El proyecto de modelamiento entonces se somete nuevamente a otro reajuste en la construcción de modelos al servidor vía modo de proyecto. Finalmente, los detalles finos del modelo, tal como revisión de la energía, formación de enlaces; se puede también realizar directamente en los archivos de proyecto vueltos con DeepView.

Todos los métodos que modelan por homología consisten en los siguientes cuatro pasos: (i) selección de la plantilla; (ii) alineación de la plantilla blanco; (iii) construcción de patrones; y (iv) evaluación. Estos pasos pueden ser repetidos e iterativos, hasta que se alcanza una estructura modelo de satisfacción. Varias y diversas técnicas para la construcción de modelos se han desarrollado (Guex y Peitsch, 1997; Lund, *et al.*, 1997; Sali y Blundell, 1993; Sutcliffe; 1987).

(i)Selección de la plantilla: A partir de la biblioteca ExPDB se obtuvo el archivo PDB (plantilla) necesario para el modelamiento. Este archivo contiene las coordenadas de las cadenas individuales, así como modelos teóricos y estructuras de la proteína que proporcionan Ca.(van Gunsteren,1996) o ANOLEA (Melo y Feytmans,1998).

(ii)Alineación: Se generaron alineamientos estructurales después de remover los modelos incompatibles. Particularmente, los residuos aislados en la alineación se mueven a los flancos para facilitar el proceso de creación de enlaces.

(iii)Construcción de modelos: Para generar la base del modelo, las posiciones del átomo de la espina dorsal de la estructura de la plantilla se generaron mediante un promedio de las mismas. Las plantillas de tal modo son cargadas por su semejanza en secuencia con respecto a la secuencia blanco, mientras que se excluyen las posiciones de los átomos en base a su desviación perceptiblemente. Para generar esas porciones, un conjunto de fragmentos compatibles con los vástagos vecinos se construye usando la programación de espacio forzado (CSP). Se selecciona el mejor enlace usando un esquema que explica la fuerza del campo de energía, usando un centro químico y las interacciones favorables como la formación de enlaces con hidrógeno. Si ningún enlace conveniente puede ser identificado, los residuos que lo flanquean se incluyen al fragmento reconstruido para permitir más flexibilidad. En casos donde el CSP no da una solución satisfactoria y para los enlaces de 10 residuos, una biblioteca de enlaces derivada de las estructuras experimentales se busca para encontrar fragmentos compatibles enlazantes. (Torsten, *et al.*; 2003).

Bases de datos a partir de las cuales se realizó un consenso para obtener una probable estructura terciaria de la proteína citocromo P450 se encuentra en la página en Internet <http://www.rcsb.org> empleando la identificación de la columna Uniprot AC.

| UniProt AC | UniProt ID |
|------------|-------------|
| Q8RN03 | C5C4_AMYOR |
| Q8RN04 | C5B3_AMYOR; |

Tabla 1. Identificación de las proteínas que se emplearon para modelar a la proteína codificada por *orf5*.

f. Secuencias de genes

El promotor de *S. erythraea* (P_{ermE}), el cual fue empleado para fusionarlo con el gen *vhb* de *V. stercoraria* que se encuentran clonados en el plásmido pUAMSAG2.

Promotor de *S. erythraea* (P_{ermE}).

```

51 cggagttcga ggtacgctgc ttgcaggtcc aggaagggga cgtccatgcg
101 agtgtccggt cgagtggcgg cttgcgcccg atgctagtcg cggllgacg
151 gcgatcgag gtgcacgctg tcgatcttga cggctggcga gaggtgcggg
201 gaggatctga ccgacgcggt ccacacgtgg caccgcgatg ctgttggtgg
251 ctggacaatc gtgccggttg gtaggatcca gcggtgagca gttcggacga

```

Fig.7 Secuencia del Promotor de *S. erythraea* (P_{ermE}), identificación del gen M11200. En letras de color verde se marca la secuencia empleada para el primer VHF

Gen *vhb* de *V. stercoraria*

```

151 cagcaaacca ttaacatcat caaagccact gttcctgtat tgaaggagca
201 tggcgttacc attaccacga ctttttataa aaacttgttt gccaaacacc
251 ctgaagtacg tcctttgttt gatatgggtc gccaagaatc tttggagcag
301 cctaaggctt tggcgtatgac ggtattggcg gcagcgcaaa acattgaaa
351 tttgccagct attttgctg cggtcacaaa aattgcagtc aaacattgct
401 aagcaggcgt ggcagcagcg cattatccga ttgtcgggtca agaattgttg
451 ggtgcgatta aagaagtatt gggcgatgcc gcaaccgatg acattttgga
501 cgcgtggggc aaggcttatg gcgtgattgc agatgtgttt attcaagtgg
551 aagcagatth gtacgctcaa gcggttgaat aaagtttcag gccgctttca
601 ggacataaaa aacgcacat aaggtgtct ttttacgtct gatatttaca
651 cagcagcagt ttggctgttg gccaaaactt gggacaaaata ttgccctgtg
701 taagagcccg ccgttgctgc ga cgtottca ggtgtgcctt ggcat

```

Fig.8 Secuencia del gen *vhb* de *V. stercoraria* (*vhb*), identificación del gen M27061. En letras de color rojo se marca la secuencia empleada para el primer VHR

Gen *orf5* de *Amycolatopsis mediterranei*

```
1  atgaccacca ctgccgagac ttcggccgaa cgggtcgacc tgttctcccc ggaagtggtc
61  gccgaccctg ggggagcgca cgcggcggtc cgcgaggcgc cgacgctgca gatcggcggc
121  ttcattggcg ggccgccgat gtacctggcc gcccgctacg aagacgtccg ccaggctctg
181  atggaccagc ggttccagtg caaccgctg gccgattccc ccgccgagga catccgcaac
241  ggcgtcttcc ggcacctgga catgccggag gagctgatcc cctggctgaa gaacctcatc
301  aacgcctccg acggcgagga gcacgcccgg ctgcgcaagc tggctctcta cgcgctcacc
361  gcgcaccggg tcggcaagtt ccgccccggg gtcgaagagc tcaccgcgga gctgctcgac
421  aagctggaag cggcggggcg tgacggcacg ccgatcgacc tcgtcgagtc gttctgctac
481  ccgctgccgg tcaccgtgat ctgcgagctg gtcggcgtcg accacgaaga ccggccgag
541  tggcgtgctg ggagcgacgc gatggccacc ctggacggca agcggctccc ggaagaagt
601  cgcaagacc tcgccgccgc ccgcgggatg atcgagcggc gccgcgccga gccgaaggac
661  gacatggtca ccgcgctcgt cgaggcgag gccaagaacc ccggcatcgc caccgacgac
721  gagctggctg gcgtctgtt cagcctggtc accgccgggc accagacgac cacctacctg
781  atcggaact cgggtgctgg cctgcacgag caccgccgacc agctcgcgcg gctcaaggcc
841  gaccctcgc tgtggccgca ggccgtgctg gaactgcagc gcctggggcc gatccagttc
901  gggcagccgc ggttcgccac cgaggacatc gaggtgggcg gcacggtgat cccgcggcgc
961  atgccctggt tgccgctgat catggccgcc aacagcgacc cgcggaagtt ccccgagccg
1021  gagaagctgc agatcgaccg gctcggcgtc ggcagcgaga gccacctcgg cttcggcaag
1081  ggcattccacc gctgectcgg ccagcacgct gcctacctgg aggcggaagt ggccctgctc
1141  ggctgtaca cccggttccc ggacatgacg ctggcggtgc cgcgcgaaga gatcccgtgg
1201  atcctcgggc ccggcttcac ccggaccaag gacctcccgg tgcggtcgc ccggccggcg
1261  tcctga
```

Fig. 9 Secuencia del gen *orf5* (CYP450) de *Amycolatopsis mediterranei*, identificación del gen AAC01729.1. En letras de color morado se marca la secuencia empleada para el primer orfF y en azul las del primer orfR.

g. Diseño de oligonucleótidos

Uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación por PCR de los genes *vhb* y *orf5* es el diseño de los oligonucleótidos cebadores (oligos o *primers*).

Las variables que se consideraron:

i. Tamaño y especificidad: El tamaño del oligonucleótido influye en la especificidad, en la temperatura de fusión y en el tiempo necesario para la hibridación del oligonucleótido a su secuencia complementaria, por tanto es decisivo para una amplificación eficiente. Los oligonucleótidos de 18 a 24 bases son muy específicos de secuencia, siempre que la temperatura de hibridación sea óptima.

El tamaño del oligonucleótido es proporcional a la eficiencia de hibridación: en general, cuanto más largo sea el oligonucleótido más ineficiente será la hibridación.

ii. Temperatura de fusión (T_m): Considerando que la relación entre temperatura de hibridación y temperatura de fusión es muy importante en PCR. Como regla general consideramos que la temperatura de hibridación debe ser 5- 8°C más baja que la de fusión. Es importante tener en cuenta que en una reacción de PCR hay dos oligonucleótidos y ambos oligonucleótidos deberían diseñarse de manera que tengan temperaturas de fusión similares.

iii. Complementariedad en la secuencia de los oligonucleótidos

Es muy importante que los oligonucleótidos no tengan homología intra-oligonucleótido en más de 3 pares de bases. Si un oligonucleótido tiene una región de auto-homología, se pueden formar estructuras parcialmente de doble cadena que interferirán con la hibridación al molde. El extremo 3' no debe de ser complementario del otro, ni debe de complementarse en regiones inespecíficas del plásmido

iv. Contenido en G/C y extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G)

La composición de bases de los oligonucleótidos debería ser del 45% al 55% en GC. La secuencia del oligonucleótido debería elegirse de manera que no contenga zonas de poliG o poliC que puedan llevar a hibridación no específica. Hay que evitar también las zonas ricas en poli A y poli T, ricas en

polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G); ya que podrían ocasionar inestabilidad en el complejo molde–oligonucleótido lo que llevaría a una menor eficiencia de amplificación. Idealmente el oligonucleótido deberá tener una mezcla casi a alzar de nucleótidos, con un contenido de GC del 50% y ~ 20 bases (la Tm estaría en el rango de 56°C – 62°C).

v. Secuencia 3'-terminal

Se sabe que la posición 3' terminal de los oligonucleótidos de PCR es esencial para controlar el apareamiento incorrecto. Otra variable que hay que considerar es que haya algún residuo de G o C en el extremo 3' del oligonucleótido. Este “zona de GC”, ayuda a asegurar que el extremo 3' hibride correctamente debido a los enlaces de hidrógeno que se dan entre los residuos de GC. También ayuda a mejorar la eficiencia de la reacción de PCR minimizando cualquier deshibridación que pudiese ocurrir.

vi. Secuencia 5'-terminal y regiones centrales.

Es conveniente incluir al inicio del primer F estas bases “GC” para dar mayor estabilidad a la hibridación del oligonucleótido con su secuencia diana.

Todos estos parámetros fueron considerados para el diseño de nuestros primers que a partir del conocimiento de las secuencias de los genes de *orf 5* y *vhb* que se encuentran clonados en los plásmidos pGEM *orf5* y pUAMSAG1; se diseñaron los oligonucleotidos o primers necesarios para lo obtención por PCR de dichos fragmentos a los cuales se les adiciono los sitios de corte *Hind* III y *Eco* R1 para su posterior clonación en el vector pULVK2, todo esto con la finalidad de dirigir nuestra clonación y fusión de los genes. Además de 4 codónes de histidina que facilitarían la purificación de la proteína quimérica. Especificaciones que se muestran en las imágenes abajo mencionadas.

Primers para amplificar el gen *vhb* en donde fue eliminado el codón de paro para permitir su fusión con el gen *orf5*:

h. Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon células electrocompetentes de *Escherichia coli* para transformarlas con los plásmidos pULVK2, pGEM orf 5, pIJ4026 y las nuevas construcciones de plásmidos que se realizarán posteriormente.

- 1.- Se siembra en una placa por estría cruzada a la cepa de *Escherichia coli* DH 5 α , para la obtención de colonias aisladas. Condiciones de incubación 37°C durante 12-24 h.
- 2.- A partir de una colonia aislada inocular un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB. Incubándolo a 37°C con agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de 0.4-0.45. Pasando inmediatamente a una temperatura de 4°C por 20 minutos.
- 3.- Centrifugar el cultivo para colectar las células a 5,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C.
- 4.- Resuspender gentilmente las células en 80 ml de medio LB helado. Durante 10 min.
- 5.- Centrifugar el cultivo para colectar las células a 5,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C.
- 6.- Resuspender las células gentilmente en 20 ml de medio LB helado y 1.4ml DMSO
- 7.- En tubos eppendorf depositar volúmenes de 50 μ l y guardar a -70°C.

i. Transformación de células de *E. coli* DH5 α con los plásmidos pULVK2, pGEM orf 5 y pIJ4026.

Se siguieron los pasos descritos por Sambrook y Russell (2001), que se detallan a continuación:

Se realizaron las siguientes modificaciones :

Se emplearon celdas de electroporación de 1mm

60 μ l de células electrocompetentes

3 μ l del plásmido correspondiente

Se dieron dos pulsos

1. Se descongelan las células competentes en un baño de hielo y agua. Enfriar también las cubetas de electroporación, y el tubo contenedor del ADN a electroporar.
2. En un tubo eppendorf frío se mezclan 60 μ l de células electrocompetentes con 10 μ g – 25 ng del ADN a electroporar.
3. Incubar el tubo en hielo por 30 a 60 sg.
4. Ajustar el aparato de electroporación para que proporcione un pulso de 1 kV y 200 μ s de resistencia.
5. Colocar la mezcla de células/ADN en una cubeta. Secar la condensación y la humedad del exterior de la cubeta.
6. Colocar la cubeta en el aparato de electroporación
7. Aplicar dos pulsos de electricidad a las células en las condiciones indicadas en el punto 4. El aparato debe registrar un tiempo de 1 – 2 milisegundos con una fuerza de campo mínima de 8.5 kV/cm para asegurar que la transformación ha ocurrido.
8. Rápidamente después del pulso, retirar la cubeta de electroporación y agregar 1 mL de medio LB atemperado a 37 °C.
9. Transferir las células a un tubo eppendorf e incubar el cultivo a 150 rpm por 1.5 h a 37 °C.
10. Plaquear diferentes volúmenes (50, 100, 150 y 200 μ l) de las células electroporadas en medio LB con el antibiótico apropiado para la selección.
11. Sembrar por dispersión en placa cada uno de los volúmenes anteriores.
12. Incubar a 37 °C. Las transformantes deben aparecer en un periodo no mayor de 12 – 16 h.

j. Mega preparaciones

Esta técnica se utilizó para aquellos experimentos en los que se requería una gran cantidad de ADN plásmidico. Los pasos necesarios son los siguientes:

1. Se inoculan 100 mL de medio LB con la colonia de *E. coli* que porta el plásmido que queremos amplificar, se cultivan las células bacterianas durante 12 -16 H a 37°C con agitación de 250 rpm. El medio LB debe suplementarse con un antibiótico que permita el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria portadora. La concentración final de estos antibióticos en el medio de cultivo fue descrita por Sambrook y col. (1989): 100 µg/mL en el caso de ampicilina y 50 µg/mL para la kanamicina.
2. Tras este tiempo se colectan las células por centrifugación a 5,000 rpm durante 3 minutos. Las células se resuspenden en 6 mL de STET¹ y la suspensión de bacterias se reparte en alícuotas de 350 µL. A cada tubo se añaden 20 µL de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.
3. Se mezcla durante 30 segundos y se hierve durante 45 seg. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico de la bacteriana se precipitan por centrifugación a 14,000 r.p.m. durante 15 minutos y se elimina con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 µL de isopropanol, mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos. Este tiempo puede reducirse debido a la gran cantidad de ADN obtenido por este método.
4. El ADN se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se seca y el precipitado correspondiente a cada alícuota se resuspende en 100 µL de TE². Tras la resuspensión del ADN se reúnen todas las fracciones en un mismo

¹ STET :EDTA 50mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/V), Tris-HCl 10mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

² TE: EDTA 1mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0

tubo y se limpia la solución de ADN mediante fenolización³. Posteriormente se precipitará de acuerdo a los métodos habituales y se resuspenderán en un volumen adecuado de TE o de agua destilada estéril.

K. Obtención de los genes *orf 5* y *vhb* con el promotor P_{o_{me}} por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN.

Considerando que la mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (*Pfu*) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP–.

Dicha mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación.

a) Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95°C, se separan las dos cadenas del ADN molde.

³ Fenol neutro: Se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 vol de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separe la fase superior acuosa y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, manteniéndose durante al menos un mes.

b) Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

c) Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72°C y la enzima *Taq* o *Pfu* ADN polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA. La *Taq* o *Pfu* polimerasa comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

Para obtener dichos fragmentos de interés por PCR se realizaron diferentes mezclas de reacción y se probaron diferentes temperaturas de hibridación, con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para la reacción de PCR.

Considerando que para la amplificación del gen *vhb* con el promotor P_{ermE} por PCR las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción:

| | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 10 X Tampón | 5 µL |
| 10 mM Nucleótidos | 1 µL |
| Primer F (160.21 picomol/ µL) | 1.45 µL una dilución 1/10 |
| Primer R (126.65 picomol/ µL) | 1.45 µL una dilución 1/10 |
| ADN molde (pUAMSAG 2) | 1 µL (sin diluir) |
| Pfu 5u / µL | 0.5 µL |

Temperaturas empleadas por ciclo:

| | |
|--------------------------|--------|
| Desnaturalización: 94° C | 45" |
| Hibridización: 62° C | 45" |
| Elongación: 72° C | 1' 30" |

Y para la amplificación del gen *orf 5*

| | | | |
|---------------------|------------------------------------|--------------|----------------------|
| Mezcla de reacción: | Dimetilsulfoxido | 2.5 μ L | |
| | 10 X Tampón | 5 μ L | |
| | 10 mM Nucleótidos | 1 μ L | |
| | Primer F (154.06 picomol/ μ L) | 1.45 μ L | una dilución 1/10 |
| | Primer R (343.89 picomol/ μ L) | 1.45 μ L | una dilución 1/20 |
| | ADN molde | 1 μ L | (sin diluir) |
| | Pfu 5u / μ L | 0.5 μ L | |

Temperaturas empleadas por ciclo:

| | |
|--------------------------|--------|
| Desnaturalización: 94° C | 3' |
| Hibridización: 66° C | 45" |
| Elongación: 72° C | 1' 30" |

Una vez amplificados los genes *vhb* con el sitio de corte *Hind III* localizado al inicio del fragmento y el gen *orf5* con el sitio de corte *Eco RI* ubicado al final del gen, nos permitió dirigir la clonación de los mismos en el plásmido pULVK2.

Se dirigió la clonación mediante la digestión de los genes amplificados por PCR y del plásmido pULVK2 con las enzimas *Hind III* y *EcoRI*, bajo las condiciones antes mencionadas

I. Generación de DNA recombinante

i. Digestión del ADN

Las enzimas empleadas fueron usadas siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura, concentración de sales y condicione

de pH (estas dos últimas características la proporciona el tampón de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar un décimo del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas (concentraciones que incluso podrían inhibir por completo la actividad enzimática).

- 1) En un tubo eppendorf de 1.5 mL se mezclan, en orden mencionado, los siguientes componentes de la reacción:
 - i) Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.
 - ii) Tampón de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere un volumen que sea la décima parte del volumen final de la mezcla, debido a que el tampón se distribuye con una concentración 10 veces mayor de la recomendada para su uso).
 - iii) $n \mu\text{g}$ de ADN disuelto en H_2O o en tampón TE (si el ADN está disuelto en TE es recomendable que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción, para evitar modificar las características del tampón de digestión).
 - iv) $2n$ unidades de enzima.

Posteriormente se incubaba a la temperatura adecuada durante 2-3 horas. El ADN digerido se utilizaba para su análisis por migración electroforética en geles de agarosa o se limpia con fenol para su posterior uso.

Así procedimos a digerir el vector plásmido pULVK2 con *Hind* III y *Eco*RI, produciendo dos extremos cohesivos, y los genes amplificados por PCR a partir de los correspondientes plásmidos. El *vhb* fue amplificado a partir del plásmido pUAMSAG1 y fue digerido con *Hind* III; por otra parte el gen *orf* 5 fue amplificado a partir del plásmido pGEM *orf* 5 y fue digerido con *Eco*RI.

De tal forma que el gen *vhb* tiene al inicio un extremo cohesivo *Hind* III y el gen *orf* 5 tiene al final un extremo cohesivo *Eco*RI.

El DNA fue mezclado para permitir un apareamiento de los fragmentos complementarios; así hibridaron algunas moléculas de *vhb* y *orf 5* dentro del vector pULVK2 en los sitios *Hind* III y *Eco*RI correspondientes.

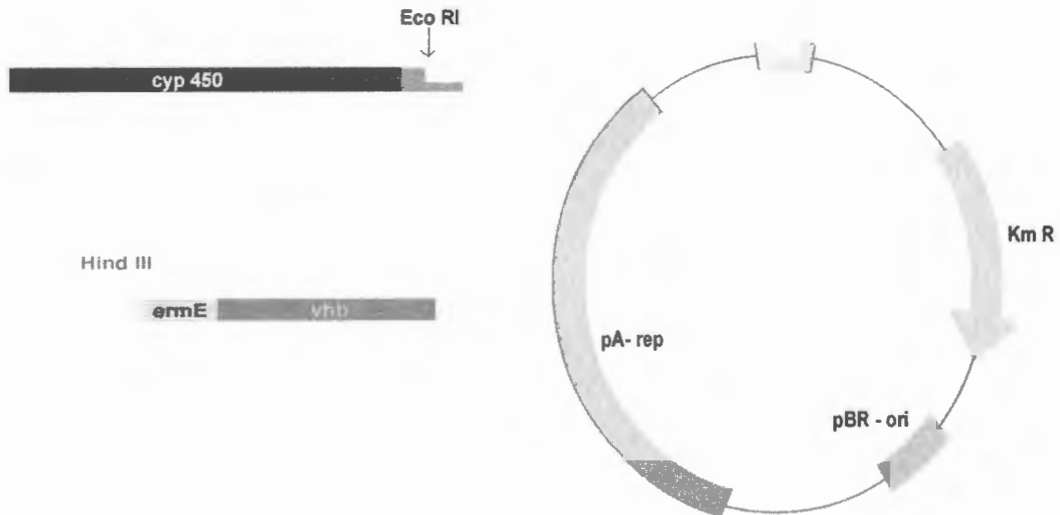


Fig. 12 Esquema general de ligación, para la fusión de los genes *orf 5* y *vhb* en el plásmido pULVK2.

ii. Integración de los fragmentos de los genes *orf 5* y *vhb* en el plásmido pULVK2

Esquema general de ligación:

1.- Se añade la cantidad necesaria de H₂O para alcanzar un volumen final de reacción de 20 µl.

2.- DNA:

Vehículo de clonación digerido con *Hind* III y *Eco* RI: 200 ng

vhb digerido con *Hind* III: 68.42 ng

orf5 digerido con *Eco*RI: 126.31 ng

3.- 2 µl de buffer de ligación

4.- 1 μ l de enzima ligasa del fago T4
Volumen final de ligación 20 μ l

Se incubara toda lo noche a 4°C.

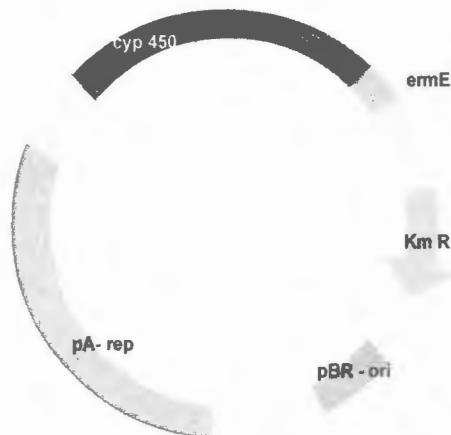


Fig. 13 Plásmido pUAMLQ-1, el cual contiene la fusión de los genes *orf 5* y *vhb* en el plásmido pULVK2.

Una vez realizada la ligación, tanto de extremos cohesivos como de extremos romos, se purifico el DNA para su posterior inserción por electroporación en las células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α ; con este nuevo plásmido.

m. Transformación: incorporación del plásmido recombinado a las bacterias

Para la incorporación del plásmido pUAMLQ-1, se siguieron los pasos descritos por Sambrook y Russell (2001), que se detallan a continuación:

Se realizaron las siguientes modificaciones :

Se emplearon celdas de electroporación de 1mm

60 μ l de células electrocompetentes

3 μ l del plásmido correspondiente

Se dieron dos pulsos

1. Se descongelan las células competentes en un baño de hielo y agua. Enfriar también las cubetas de electroporación, y el tubo contenedor del ADN a electroporar.
2. En un tubo eppendorf frío se mezclan 60 μ L de células electrocompetentes con 10 pg – 25 ng del ADN a electroporar.
3. Incubar el tubo en hielo por 30 a 60 sg.
4. Ajustar el aparato de electroporación para que proporcione un pulso de μ F de capacitancia, 1 kV y 200ahm de resistencia.
5. Colocar la mezcla de células / ADN en una cubeta. Secar la condensación y la humedad del exterior de la cubeta.
6. Colocar la cubeta en el aparato de electroporación
7. Aplicar dos pulsos de electricidad a las células en las condiciones indicadas en el punto 4. El aparato debe registrar un tiempo de 1 – 2 milisegundos con una fuerza de campo mínima de 8.5 kV/cm para asegurar que la transformación ha ocurrido.
8. Rapidamente después del pulso, retirar la cubeta de electroporación y agregar 1 mL de medio LB atemperado a 37 °C.
9. Transferir las células a un tubo eppendorf e incubar el cultivo a 150 rpm por 1.5 h a 37 °C.
10. Plaquear diferentes volúmenes (50, 100, 150 y 200 μ l) de las células electroporadas en medio LB con el antibiótico apropiado para la selección.
11. Sembrar por dispersión en placa cada uno de los volúmenes anteriores.
12. Incubar a 37 °C. Las transformante deben aparecer en un periodo no mayor de 12 – 16 h.

n. Selección de las células transformadas

El plásmido vector contiene un gen de resistencia a kanamicina, lo que hace a la célula resistente. El crecimiento de las células transformadas (células que han recibido el plásmido) se puede identificar sobre un medio de agar que contenga el antibiótico a una concentración de 50 mg/mL. Este plásmido puede o no tener los genes fusionados, para poder discernir entre estas opciones se procedió a picar cada una de las colonias para su crecimiento y obtención de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala.

Para ello se siguió el método descrito por Colmes y Quigley (1981).

1.- Cembrar cada colonia aislada en un tubo eppendorf con 1 mL de medio LB estéril al cual se le añade Kanamicina, para mantener el plásmido dentro de la célula bacteriana. Se incuba a 37°C por 12 h y 260 rpm.

2.- Centrifugar los tubos por un minuto a 14,000 rpm. Las células son resuspendidas en 350 µL de STET y 10 µL de una solución de lizosima preparada en el momento a una concentración de 10 mg/mL.

3.- Mezclar vigorosamente durante 30 sg; posteriormente hervir durante 45 sg. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico precipitarán y por centrifugación a 14,000 rpm 10 min los separaremos y retiraremos con ayuda de un palillo estéril.

4.- En la solución tendremos el ADN plasmídico el cual precipitaremos al adicionar 40 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol frío, mezclaremos la solución y la mantendremos a temperatura ambiente durante 15 min.

5.- Recolectaremos el ADN plasmídico por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. La pastilla formada se lavó con etanol al 70% (v/v). Y se secará hasta evaporación total.

6.- Dejar resuspender el ADN plasmídico en 30 μ L de TE.

o. Electroforesis en gel de agarosa

Para identificar cual de nuestras colonias es la que tiene el plásmido con el inserto es necesario la obtención de su ADN plasmídico y el corrimiento de este en un gel de agarosa. Siguiendo los métodos descritos por Maniatis *et al.*,(1982) y Sambrook y Russell (2001). Utilizando una concentración final de agarosa del 0.7%, que fue disuelta por calentamiento en tampón TAE⁴.

Cada una de las muestras obtenidas de ADN plasmídico se mezclaron con 1/10 del volumen final de amortiguador de carga⁵ concentrado, se recomienda que se calienten 5-10 min a 65°C, enfriándolos posteriormente en un baño de hielo y agua durante 2-3 min. El ADN se carga en el gel y la electroforesis se desarrolla en amortiguador TAE mediante la aplicación de un diferencial de potencial de 1 a 5 V/cm. El revelado del gel se realizó empleando una solución de bromuro de etidio⁶ a una concentración final de 0.5 μ g/mL. Y se fotografiaron a través de un fotodocumentador (Gel Doc 2000 de BioRad[®]) y procesando las imágenes utilizando el software Quantity One de BioRad[®].

Para identificar el tamaño del ADN se prepararon diferentes marcadores de peso molecular empleando el ADN del fago λ y endonucleasas de restricción.

p. Introducción del gen de resistencia a Eritromicina

Una vez que se tiene la fusión de los genes *vhb* y *orf 5* y tenemos la primera construcción pUAM-LQ1; es necesario resolver un segundo problema; *Amycolaptosis mediterranei* genera un gran número de mutantes espontáneos resistentes a kanamicina, por lo cual debemos introducir un segundo marcador

⁴ TAE 50 X: 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

⁵ Tampón de carga 6X: Azul de bromofenol al 0.25%(p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza en una olla a presión por 20 min. Se conserva a 4°C para evitar crecimiento de microorganismos.

⁶ Bromuro de etidio: Se prepara una solución 10mg/mL en agua y se conserva a 4°C. Para un litro se requieren 50 μ l de esta solución.

de selección. Para ello se selecciono el gen de resistencia a eritromicina, a partir del plasmido pIJ4026, el cual fue digerido con *EcoRI* y *XbaI*, liberando este gen. El producto de esta digestión fue separado empleando un gel de agarosa al 0.7%, para finalmente cortar banda y purificar para obtener a nuestro gen listo para ligar en el plasmido pUAM-LQ, por otro lado nuestro vector fue sometido a una digestión parcial con la enzima *XbaI* y una digestión total con *EcoRI*, de tal forma que dirigimos nuestra clonación del gen de resistencia a eritromicina, una vez obtenidos ambos productos de digestión fueron purificados empleando el sistema Quick protocol de promega, para su posterior ligación. De tal forma que obtenemos a nuestra segunda construcción el plasmido pUAM-LQ2

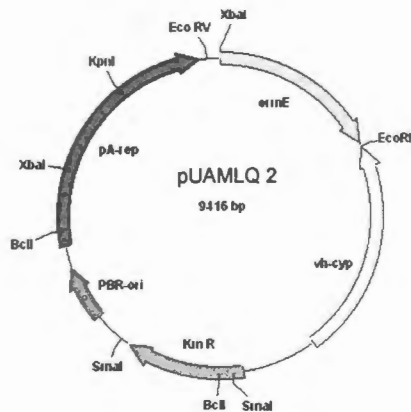


Fig. 14 Mapa de restricción del pUAMLQ-2, el cual contiene los genes fusionados *vhb* y *orf 5*, además del segundo marcador de selección; el gen de resistencia a la eritromicina (E_{RM}).

q. Transformación de *A. mediterranei* por Biobalística.

Para la transformación con pUAMLQ-2 en 100 mL de medio Bennett se cultivaron a las células de *A. mediterranei* por 48 h a 28 °C y 250 rpm. Estas células se emplearon para sembrar cajas con medio Bennet suplementado con sorbitol al 0.6 M como osmoregulador. Obteniéndose un césped completo y se dejaron incubar por 32, 34, 36, 38 h a 28 °C; bombardeando las placas con

proyectiles de tungsteno previamente recubiertos con el plásmido pUAML-Q2 a una concentración de 1.278 μg de DNA

Preparaciones de microcarriers

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

1. Pesar 30 mg de micropartículas (oro ó tungsteno) en un tubo de 1.5 mL.
2. Adicionar 1 mL de etanol al 70%.
3. Agitar vigorosamente (con vortex) de 3 a 5 min.
4. Permitir que las partículas se empapen en etanol por 15 min.
5. Obtener un pellet de micropartículas centrifugando por 5 sec.
6. Remover y descartar el sobrenadante.
7. Adicionar 1 mL de agua estéril.
8. Agitar vigorosamente por 1 min
9. Reposar por 1 min.
10. Centrifugar por 5 sec para obtener un pellet.
11. Remover el sobrenadante y descartar.
12. Repetir el lavado con agua tres veces.
13. Adicionar 500 μL de glicerol al 50%, estéril.

Las micropartículas pueden ser almacenadas hasta por dos semanas en un ambiente seco. Las micropartículas de tungsteno se conservan mejor a -20°C y las de oro a 4°C .

Revestimiento de microcarriers con DNA

Este procedimiento es para ejecutar un total de 6 bombardeos. Durante este procedimiento es muy importante agitar continuamente.

1. Agitar vigorosamente las partículas en glicerol, para destruir los aglomerados.
2. Remover 50 μL de microcarriers a un tubo de 1.5 mL.
3. Con agitación continua agregar en orden:
 1. 5 μL de DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
 2. 50 μL de CaCl_2 2.5 M
 3. 20 μL de spermidina 0.1 M (grado cultivo celular) (Preparar en el momento de uso)
4. Continuar agitando por 2 ó 3 min.
5. Reposar 1 min.
6. Colectar el pellet centrifugando por 2 sec.
7. Remover el líquido y decantar.
8. Adicionar 140 μL de etanol al 70% (grado HPLC)
9. Remover el líquido y decantar.
10. Adicionar 140 μL de etanol al 100% (grado HPLC).
11. Remover el líquido y descartar.
12. Adicionar 48 μL de etanol al 100%.
13. Resuspender gentilmente el pellet por agitación manual y luego con vortex a baja velocidad por 2 ó 3 sec.

Bombardeo

1. Seleccionar y ajustar los parámetros de bombarde (distancia).

2. Ajustar la presión de Helio (200 psi en exceso de la presión de ruptura).
3. Limpiar el área y tener estéril el material necesario.
4. Lavar los microcarries y resuspenderlos con glicerol al 50%.
5. Revestir los microcarriers con DNA y colocar 6 μ L en el macrocarrier/macrocarrier holder dentro de una minicámara con CaCl_2 como desecante.
6. Encender el equipo.
7. Limpiar las paredes de la cámara con etanol al 70%.
8. Colocar el disco de ruptura (estéril) dentro del retaining cap estéril.
9. Fijar el retaining cap al final del tubo de aceleración de gas, apretar con la llave inglesa.
10. Colocar el macrocarrier y el stopping screen dentro del microcarrier launch assembly.
11. Colocar el microcarrier launch assembly y las células blanco dentro de la cámara, cerrar la puerta.
12. Encender el vacío al nivel deseado (mínimo 5 pulgadas de mercurio).
13. Bombardear la muestra: Mantener el botón FIRE continuamente presionado hasta que el disco de ruptura estalle y el nivel de presión de Helio baje a cero.
14. Liberar el vacío.
15. Remover las células blanco de la cámara.
16. Desarmar el microcarrier launch assembly.
17. Remover el disco de ruptura dañado.
18. Bajar la presión de helio.

La selección de las colonias bacterianas con el plásmido pUAMLQ-2 se lleva a cabo en cajas de medio Bennett con una concentración de 10 mg/mL del

antibiótico eritromicina; concentración que ha sido reportado por Guerra en 2006 como inhibidora del crecimiento de *Amycolatopsis mediterranei*.

r. Fermentación (Producción de Rifamicina)

Aquellas colonias que presentaban un crecimiento mayor y con una coloración naranja intensa fueron seleccionadas; las cepas denominadas como T8 y T10 fueron crecidas en medio Bennett para después montar la fermentación y cuantificar la producción de rifamicina de estas cepas transformadas, comparandolas con la cepa parental de *Amycolatopsis mediterranei*.

Estas cepas fueron inoculadas en placas de medio Bennett con eritromicina y sin antibiótico según corresponda para la obtención de un césped completo, se raspo una superficie de 2 cm² recolectandose el cultivo para inocular matraces de 250 mL de medio YEME con 50 mL y un resorte de acero inoxidable (para un crecimiento disperso). Adicionando eritromicina a una concentración final de 10 µg/mL para la conservación del plásmido para las cepas transformadas, y se incuban a 30°C y 150 rpm durante 72-96 h.

Pasado este tiempo se estandarizó la biomasa, tomando 10 mL de cada cultivo y se transfieren a un tubo centrifuga, para medir la biomasa se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 min, a partir de la menor biomasa empacada en el fondo del tubo se considero para ajustar las otras dos cepas; realizandose los cálculos necesarios, e inoculándolo en los matraces de 250 mL con medio de producción Lee. Considerando que se requieren condiciones de baja aireación para evaluar el efecto de la expresión de los genes fusionados *vhb-cyp* de las transformantes, se incrementó el volumen del medio de producción (de 20 mL a 90 mL en matraces de 250 mL) e incrementándose el inóculo de (20 a 30 %) y se mantuvo una agitación de 200 rpm (Krishna *et al.*, 1998).

La cuantificación de la rifamicina se realizó por un método espectrofotométrico reportado por Pasqualucci (Pasqualucci, *et al.*, 1970), con algunas

modificaciones, donde se oxidó la hidroquinona (grupo cromóforo) del compuesto, modificando su máximo de absorción (425 nm) en el espectro de luz visible. De esta forma se obtiene una absorción diferencial de la rifamicina B contra su forma oxidada, lo cual permite restar todos los compuestos que absorben a 425 nm presentes en el medio de fermentación; empleando NaNO_2 al 1% disuelto en un buffer de acetato⁷ pH 4.63 con un tiempo de reacción de 5 min.

La cuantificación de biomasa se realizó centrifugando los 60 mL de cada cultivo y lavado las células con agua destilada para eliminar los residuos de glucosa, centrifugándose a 10,000 rpm durante 10 min; se repitió dos veces y la biomasa obtenida se secó en estufa durante 48 h y por diferencia de peso se cuantificó.

⁷ Buffer de acetato: Acetato de sodio 0.7413 M y ácido acético 1 M.

VI. RESULTADOS

Como no existe un modelo para la estructura terciaria de la proteína codificada por el gen *orf 5* de *A. mediterranei* se procedió a realizar un consenso de los diferentes citocromos P450 y de los que presentaban mayor similitud se logró un modelo para la proteína del gen *orf 5*; estos datos se obtuvieron a partir de las siguientes proteínas provenientes de *Amycolatopsis orientalis* que se encuentran involucrados en la biosíntesis de vancomicina que es un antibiótico; datos provenientes de la base de datos de SWISS-MODEL.

| UniProt AC | UniProt ID | Nombre de la proteína | Nombre del gen |
|------------|-------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Q8RN03 | C5C4_AMYOR; | Citocromo P450 165C4 | <i>CYP165C4</i> Sinónimos: oxy C |
| Q8RN04 | C5B3_AMYOR; | Citocromo P450 165B3 | <i>CYP165B3</i> ; Sinónimos: oxyB |

Tabla 2. Citocromos P 450 a partir de los cuales se obtuvo el modelo de la proteína *orf 5*

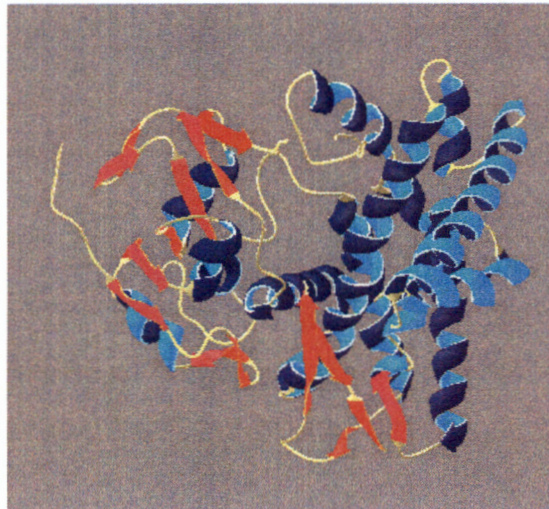


Fig. 15 Citocromo P450 165C4. Pertenece a la misma familia 1 de CYP'S. Se encuentra involucrada en la formación de enlaces en la cadena aromática del heptapeptido de la vancomicina.



Fig.16 Citocromo P450 165B3, pertenece a la familia 1 de CYP. Enzima involucrada en la formación de enlaces de la cadena aromática del heptapeptido de vancomicina.



Fig. 17 Modelo propuesto para la enzima CYP 450 de *A. mediterranei*, cuya función de monooxigenasa interviene en la transformación de rifamicina W a rifamicina S en la biosíntesis de rifamicina B.

Una vez obtenido el modelo para la proteína orf 5 a través del alineamiento de los citocromos P450 con mayor similitud al de *A. mediterranei*; se procedió a fusionar a las dos proteínas.

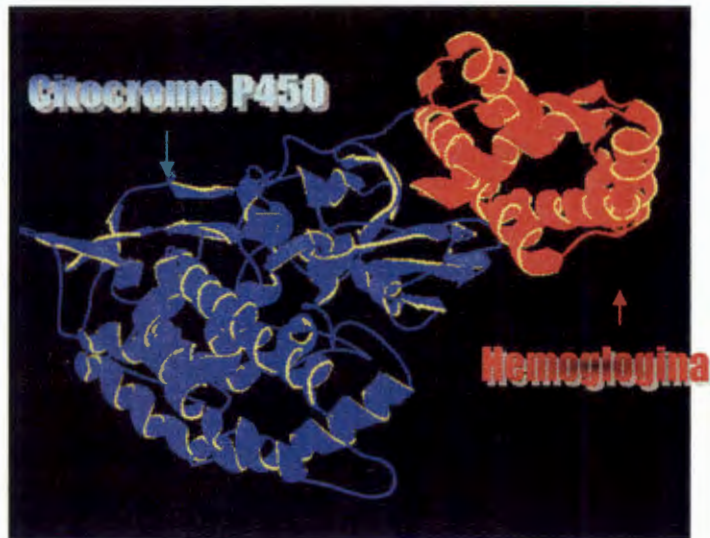


Fig. 18 Acercamiento de las proteínas CYP 450 de *A. mediterranei* y VHb de *V. stercoraria* en un intento de acoplar ambas proteínas y fusionarlas.

Para el diseño del modelo de la proteína quimérica VHb-CYP se analizaron por separados ambas estructuras tridimensionales de las proteínas involucradas para evaluar las posibilidades de insertar una bisagra de aminoácidos o realizar una unión directa de las cadenas proteicas. Se optó por la última opción la unión directamente la proteína orf 5 y la vhb. Se calculó la energía de minimización. Después de realizar varios modelos y de comparar las energías de minimización; el modelo para la proteína quimérica elegido fue el que presentó la menor energía de minimización; $E = -20\ 620$ kJ/mol.

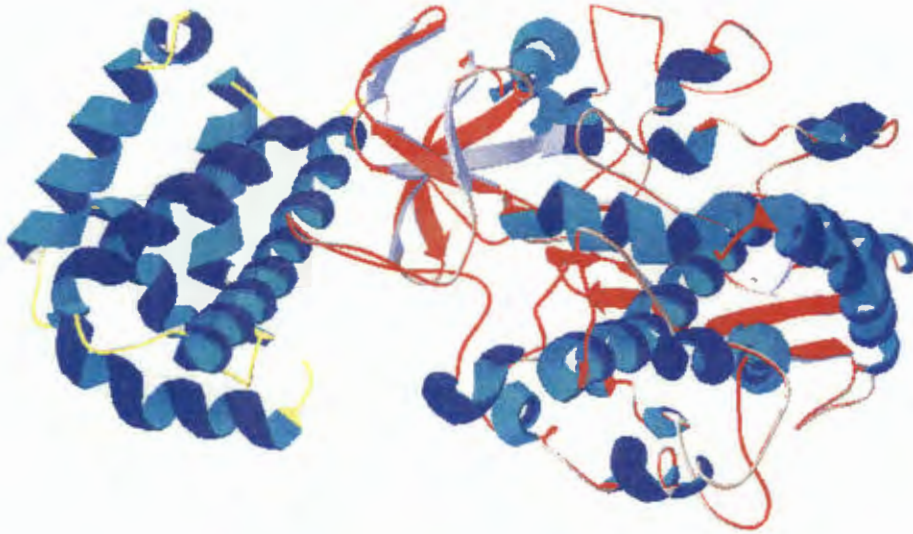
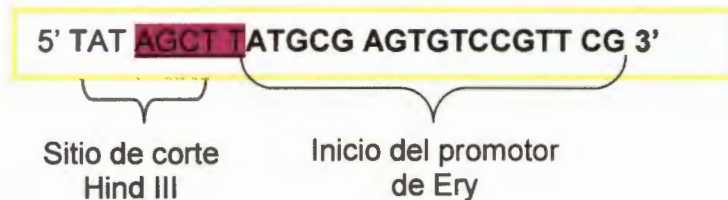


Fig. 19 Modelo propuesto para la proteína quimérica Vhb/CYP.

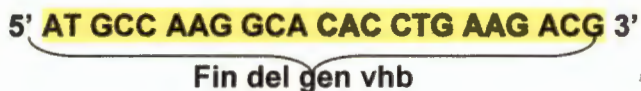
Diseño de los oligonucleotidos para la obtención por PCR de los genes *vhb* y *orf5*

Empleando las secuencias de los genes *vhb* y *orf 5* se diseñaron los oligonucleotidos que se utilizaron para la amplificación de estos genes por PCR, a los cuales se les adicionaron sitios de corte para dirigir nuestra clonación el plásmido pULVK2 como se muestra a continuación:

FW: (*vhb* F)



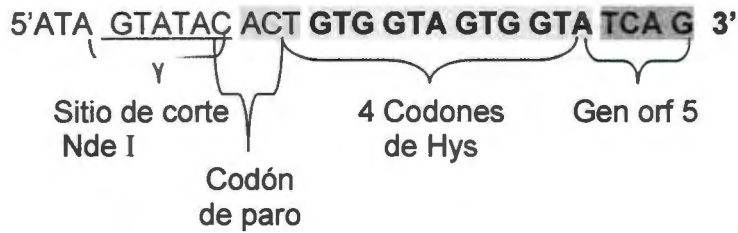
RW: (*vhb* R)



FW (orf F)

TAC TGG TGG TGA CGG CTC TGA AGC

RW (orf R)



Amplificación de los plásmidos: pGEM orf 5, pIJ4026, pUAMSAG 1 y pULVK2.

Se amplificaron los plásmidos pGEM orf 5, pIJ4026, pUAMSAG 1 y pULVK2; los cuales contienen la secuencia del gen *orf 5*, E_{erm} (que codifica para la resistencia a eritromicina), el gen *vhb* con el promotor de eritromicina y nuestro vector de clonación, respectivamente. Cuya identidad fue corroborada al digerir con una endonucleasa y linearizar el plásmido verificando así su tamaño. Como se muestra en las figuras 20 y 21.

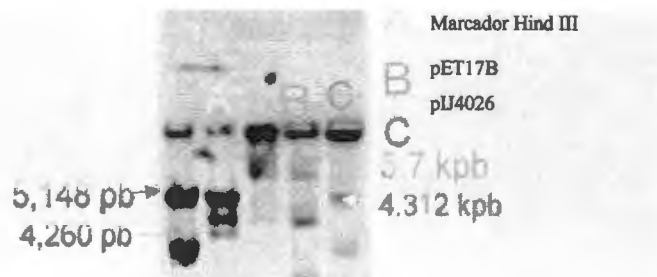


Fig. 20 Amplificación de los plásmidos pIJ4026 y pULVK2.

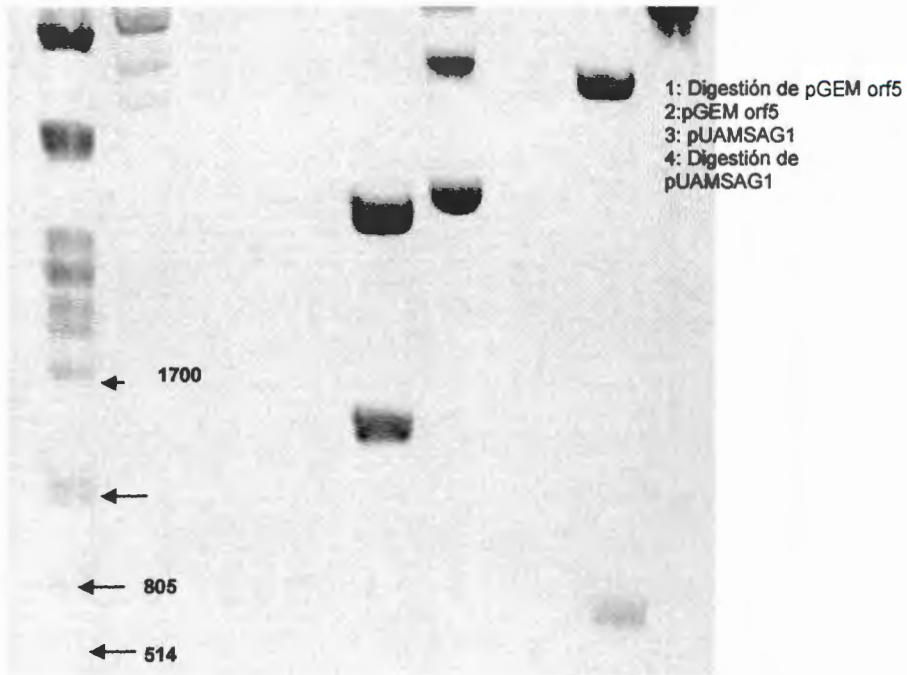


Fig. 21 Amplificación y digestión de los plásmidos: pGEM orf 5 y pUAMSAG 1; liberando los genes *orf 5* y *vhb* respectivamente.

A partir del ADN de las megapreparaciones de los plásmidos pGEM orf 5 y pUAMSAG 2 se amplifica por PCR los genes *orf 5* y *vhb* respectivamente; empleando los primers diseñados (*orf F* y *orf R* para el citocromo; *vhb F* y *vhb R* para la hemoglobina). (Fig. 22)



Fig. 22 Amplificación del gen *orf 5* a partir del plásmido pUAMSAG2, con un peso molecular de 1266 pb.

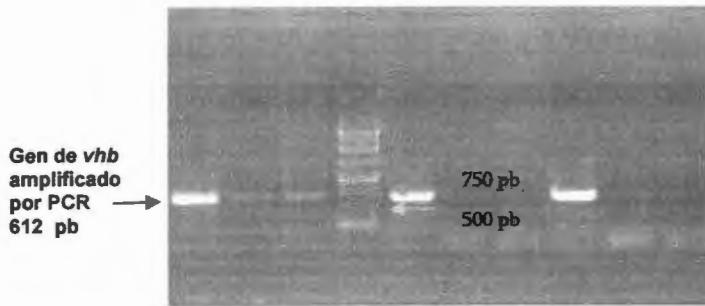


Fig. 23 Amplificación del gen *vhb* a partir del plásmido pUAMSAG 1, con un peso molecular de 612 pb.

Una vez amplificados el gen *vhb* con el sitio de corte *Hind* III localizado al inicio del fragmento y el gen *orf5* con el sitio de corte *Eco* RI ubicado al final del gen, nos permitió dirigir la clonación de los mismos en el plásmido pULVK2, este fue digerido con estas dos enzimas, al mismo tiempo los genes amplificados por PCR fueron sujetos a las mismas condiciones de digestión y se procedió a ligar los fragmentos amplificados por PCR y el plásmido abierto por digestión. Posterior a ello se transformó a *Escherichia coli* con la nueva construcción y se procedió a la selección de la clona.

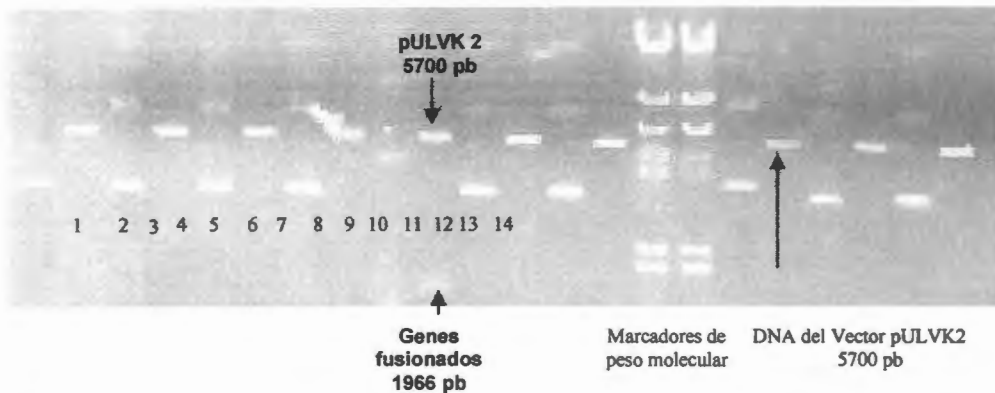


Fig. 24 Identificación de la colonia transformada. Donde se muestra la liberación de los genes fusionados del vector de clonación pULVK2 y corroboración de su identidad.

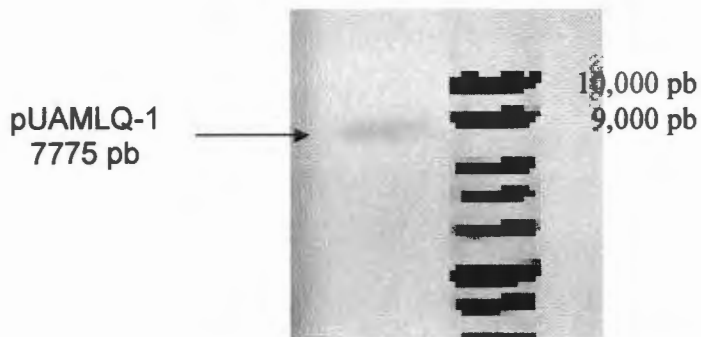


Fig. 25 Digestión con la enzima *EcoRI* para linearizar del plásmido pUAMLQ1 y corroborar su identidad.

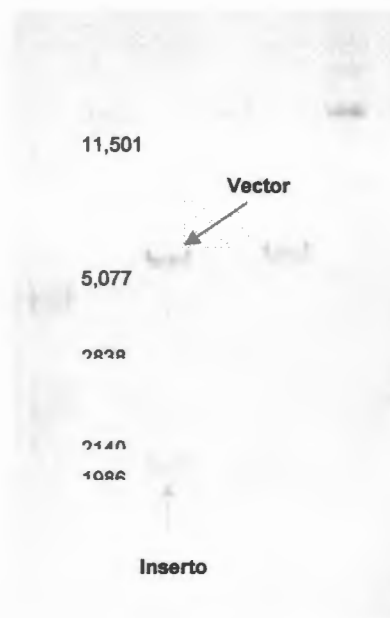


Fig. 26 Liberación de los genes fusionados a partir del plásmido pUAMLQ-1

Secuenciación del gen *vhb*

Se determinó la secuencia de nucleótidos del gen de hemoglobina debido a que cuando se trató de liberar el inserto y comprobar su peso en un gel de agarosa después de ser digerido el plásmido pUAMLQ-1 con la enzima *Hind III* y *EcoRI* que nos ayudaron en la estrategia de dirigir la clonación. No se obtuvo las dos bandas como se esperaba y sólo se observaba la banda correspondiente a la linearización de nuestra construcción. A continuación se

muestra la secuenciación del gen de hemoglobina para comprobar que no existiera un corrimiento en el marco de lectura o alguna mutación en dicho gen; además de eliminar la posibilidad de haber clonado cualquier otro fragmento que no correspondiera al gen de interés.

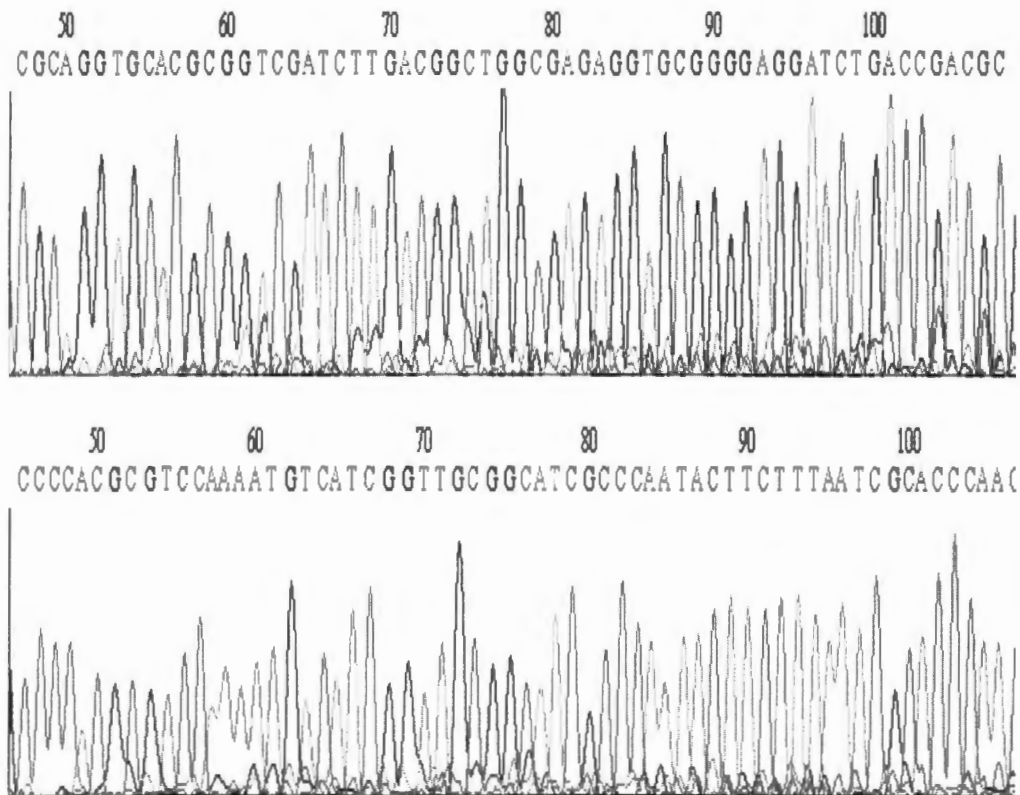


Fig. 27 Electroforama de la secuencia de nucleotridos del gen *vhb*. En la parte superior la secuencia obtenida a partir del primer *vhb* F y en la inferior la obtenida con el primer *vhb* R

| | | | | | |
|------------------|--|-----|-----|-----|-----|
| | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | CCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAATACTTCT | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | CCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAATACTTCT | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | CCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAATACTTCT | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | |
| | TTAATCGCACCCAACAATCTTGACCGACAATCGGATAATGCGCTG | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | TTAATCGCACCCAACAATCTTGACCGACAATCGGATAATGCGCTG | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | TTAATCGCACCCAACAATCTTGACCGACAATCGGATAATGCGCTG | | | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| | CTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTGACTGCAATTTTTTTGACCGC | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | CTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTGACTGCAATTTTTTTGACCGC | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | CTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTGACTGCAATTTTTTTGACCGC | | | | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | |
| | AGGCAAAATAGCTGGCAAATTTCAATGTTTTGCGCTGCCGCCAAT | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | AGGCAAAATAGCTGGCAAATTTCAATGTTTTGCGCTGCCGCCAAT | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | AGGCAAAATAGCTGGCAAATTTCAATGTTTTGCGCTGCCGCCAAT | | | | |
| | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | ACCGTCATCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAGATTCTTGCGGAC | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | ACCGTCATCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAGATTCTTGCGGAC | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | ACCGTCATCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAGATTCTTGCGGAC | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 |
| | CCATATCAAACAAAGGACGTACTTCAGGGTGTGGCAAACAAGTT | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | CCATATCAAACAAAGGACGTACTTCAGGGTGTGGCAAACAAGTT | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | CCATATCAAACAAAGGACGTACTTCAGGGTGTGGCAAACAAGTT | | | | |
| | 300 | 310 | 320 | 330 | |
| | TTTATAAAAAGTCGTGGTAATGGTAACGCCATGCTCCTTCAATACA | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | TTTATAAAAAGTCGTGGTAATGGTAACGCCATGCTCCTTCAATACA | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | TTTATAAAAAGTCGTGGTAATGGTAACGCCATGCTCCTTCAATACA | | | | |
| | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 |
| | G`tAACAGTGGCTTTGATGATGTTAATGGTTTGCTGGTCTAACATC | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | G`tAACAGTGGCTTTGATGATGTTAATGGTTTGCTGGTCTAACATC | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | G`tAACAGTGGCTTTGATGATGTTAATGGTTTGCTGGTCTAACATC | | | | |
| | 390 | 400 | 410 | 420 | |
| | GCTGGATCCTACCAACCGGCACGATTGTCCAGCCCACAACAGCATC | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | GCTGGATCCTACCAACCGGCACGATTGTCCAGCCCACAACAGCATC | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | GCTGGATCCTACCAACCGGCACGATTGTCCAGCCCACAACAGCATC | | | | |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 |
| | GCGGTGCCACGTGTGGACCGCGTCGGTCAGATCCTCCCAGCACCTC | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | GCGGTGCCACGTGTGGACCGCGTCGGTCAGATCCTCCCAGCACCTC | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | GCGGTGCCACGTGTGGACCGCGTCGGTCAGATCCTCCCAGCACCTC | | | | |
| | 480 | 490 | 500 | 510 | |
| | TCGCCAGCCGTCAAGATCGACCGCGTGCACCTGCGA | | | | |
| vhb_f.SEQ(1>511) | TCGCCAGCCGTCAAGATCGACCGCGTGCACCTGCGA | | | | |
| vhb_r.SEQ(1>555) | TCGCCAGCCGTCAAGATCGACCGCGTGCACCTGCGA | | | | |

Fig. 28 Alineamiento de las secuencias *vhb F* y *vhb R*

Una vez realizada la secuenciación se procedió a alinear ambas secuencias, para comprobar su identidad en la base de datos Blast, obteniéndose los siguientes resultados:

```

> gb|M27061.1|VITVHB V.stercoraria vhb gene encoding hemoglobin,
complete cds
Length=745

Score = 669 bits (362), Expect = 0.0
Identities = 365/367 (99%), Gaps = 1/367 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1
CCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAATACTTCTTTAATCGCACCCAA 60
|||||
Sbjct 507
CCACGCGTCCAAAATGTCATCGGTTGCGGCATCGCCCAATACTTCTTTAATCGCACCCAA 448

Query 61
CAATTCCTTGACCGACAATCGGATAATGCGCTGCTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTTGAC 120
|||||
Sbjct 447
CAATTCCTTGACCGACAATCGGATAATGCGCTGCTGCCACGCCTGCTTGACAATGTTTGAC 388

Query 121
TGCAA          GACCGCAGGCAAATAGCTGGCAAATTTTCAATGTTTTCGCTGCCGC 180
|||||
Sbjct 387
TGCAATTTTTTTGACCGCAGGCAAATAGCTGGCAAATTTTCAATGTTTTCGCTGCCGC 328

Query 181
CAATACCGTCATCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAAGATTCTTGCGGACCCATATCAAA 240
|||||
Sbjct 327
CAATACCGTCATCGCCAAAGCCTTAGGCTGCTCCAAAGATTCTTGCGGACCCATATCAAA 268

Query 241
CAAAGGACGTACTTCAGGGTGTTTGGCAAACAAGTTTTTATAAAAAGTCGTGGTAATGGT 300
|||||
Sbjct 267
CAAAGGACGTACTTCAGGGTGTTTGGCAAACAAGTTTTTATAAAAAGTCGTGGTAATGGT 208

Query 301
AACGCCATGCTCCTTCAATACAGSTAACAGTGGCTTTGATGATGTTAATGGTTTGCTGGT 360
|||||
Sbjct 207 AACGCCATGCTCCTTCAATACAGG-
AACAGTGGCTTTGATGATGTTAATGGTTTGCTGGT 149

Query 361 CTAACAT 367
|||||
Sbjct 148 CTAACAT 142

```

Con un valor de expectancia igual a cero y un 99% de identidad se corroboró que el gen que fue amplificado por PCR y mandado a secuenciar corresponde a la secuencia codificante del gen de hemoglobina proveniente de *V. stercoraria*.

Inserción de un segundo marcador de selección en el plásmido pUAMLQ1

Debido al gran porcentaje que las cepas de *Amycolaptosis mediterranei* tienen de generar mutantes espontáneas resistentes a kanamicina, fue necesaria la introducción de un segundo marcador de selección, para lo cual se amplificó el plásmido pIJ4026 para digerir y purificar el gen de resistencia a eritromicina e introducirlo en el plásmido pUAM-LQ1,

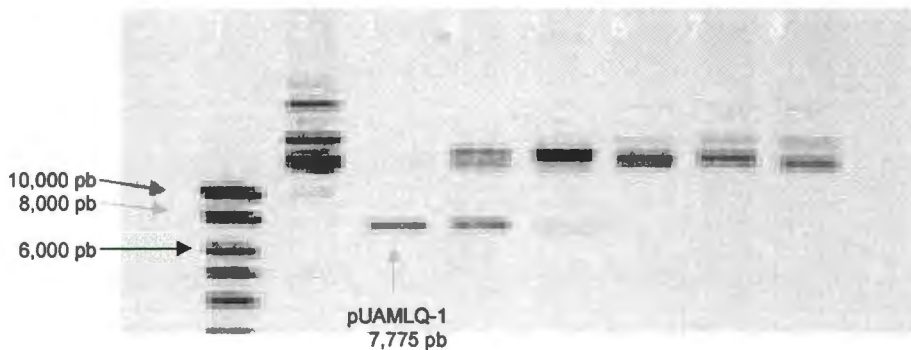


Fig. 29 Digestión parcial del plásmido pUAMLQ-1 con la enzima *Xba* I. (Primera digestión)

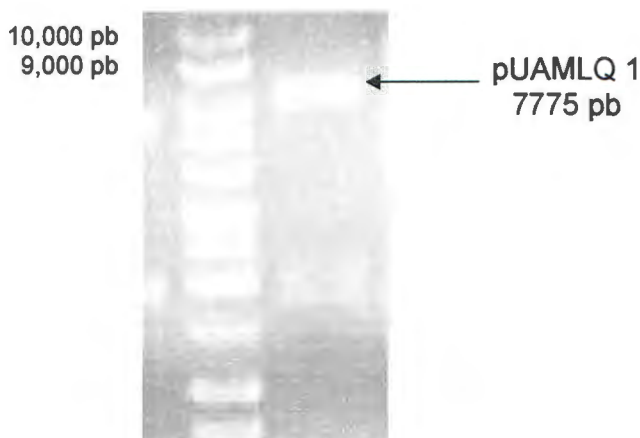


Fig. 30 Digestión total con la enzima *Eco*RI del plásmido pUAMLQ1 previamente linearizado con *Xba* I.

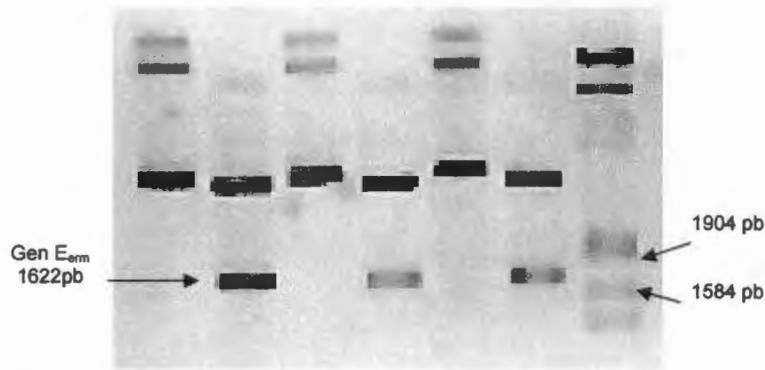


Fig. 31 Obtención del gen E_{erm} a partir de la digestión del plásmido pIJ4026 con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*.

Una vez digerido nuestro vector con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, y obtenida la banda del gen E_{erm} , se realizó la mezcla de ligación para nuestra segunda construcción el plásmido pUAMLQ-2; se transformó a *E. coli* DH5 α por electroporación y se procedió a la búsqueda de la clona; la cual se obtuvo como se ve en la fig. 32.

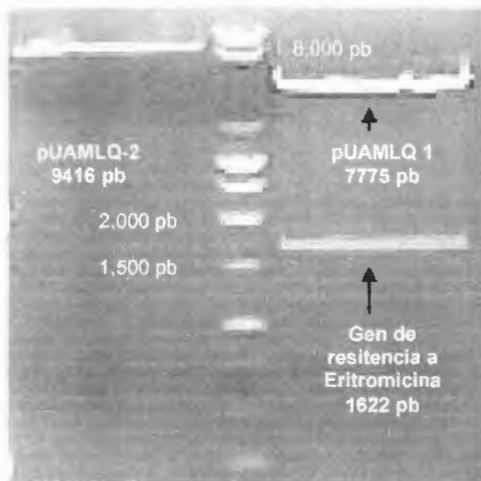


Fig. 32 Linerización y comprobación del plásmido pUAMLQ-2. En el primer carril se muestra la linearización del plásmido seguido del marcador de peso molecular de 1 kb y finalmente una doble digestión del plásmido para liberar el gen de eritromicina.

La construcción del plásmido pUAMLQ-2 fue empleada para transformar a *Amycolaptosis mediterranei* y poder seleccionar adecuadamente las clonas con el vector.

Fermentación (Producción de Rifamicina)

Aquellas colonias que presentaban un crecimiento mayor y con una coloración naranja intensa fueron seleccionadas; crecidas en medio Bennett para después montar la fermentación y cuantificar la producción de rifamicina de estas cepas transformadas, comparándolas con la cepa parental de *Amycolatopsis mediterranei*.

Considerando que se requieren condiciones de baja aireación para evaluar el efecto de la expresión de los genes fusionados *vhb-cyp* de las transformantes, se incrementó el volumen del medio de producción (de 20 mL a 90 mL en matraces de 250 mL) e incrementándose el inóculo de (20 a 30 %) y se mantuvo una agitación de 200 rpm (Krishna *et al.*, 1998).

Se cuantifico la producción de rifamicina y la biomasa producida en un periodo de 96 h; como se muestra en la tabla No. 3

| Cepa transformada de <i>A. mediterranei</i> con pUAML-Q2 | | | Cepa parental de <i>A. mediterranei</i> | | |
|--|-------------|--------------------|---|-------------|--------------------|
| Tiempo en h. | Abs. 425 nm | Rifamicina (µg/mL) | Tiempo en h. | Abs. 425 nm | Rifamicina (µg/mL) |
| 24 | 0 | 0 | 24 | 0 | |
| 48 | 0.0074 | 0.68837209 | 48 | 0.019588 | 0.9794 |
| 72 | 0.082 | 7.62790698 | 72 | 0.020816 | 1.0408 |
| 96 | 0.1296 | 12.055814 | 96 | 0 | 0 |

Tabla No. 3 Concentración de rifamicina durante el proceso de fermentación comparando las cepas de *A. mediterranei* pUAML-Q-2 y su contraparte la cepa parental; en un periodo de 96 h.

Datos obtenidos al aplicar la siguiente formula:

$$\text{Rifamicina B } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(A_{425}) (2000)}{21.5}$$

Donde:

A_{425} = Valor de Absorbancia obtenida a 425 nm.

2000 = Factor de dilución. Debido a que la fermentación se llevó a cabo en condiciones de baja aireación y la concentración de rifamicina B obtenida fue baja, se utilizó una dilución 1:2 (en lugar de 1:50 que fue empleada en los trabajos de Pasqualucci, *et al.*, 1970)

21.5 = Absortividad de la rifamicina B determinada por este método.

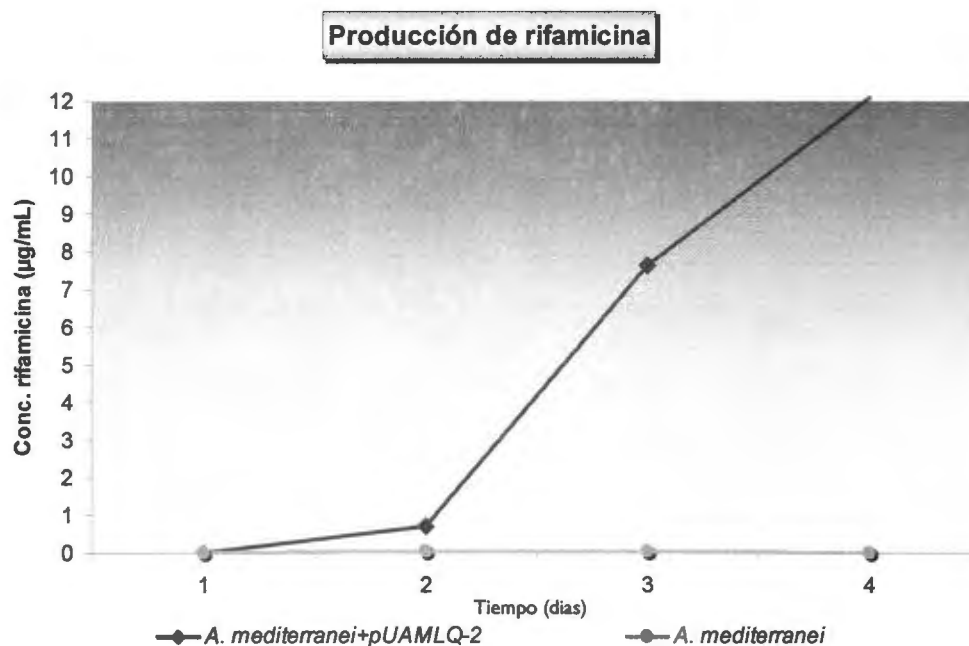


Fig. 33 Producción de rifamicina durante el crecimiento de las cepas de *A. mediterranei* transformada y parental, en un sistema de baja aireación.

Discusión

A. mediterranei es un microorganismo con alto requerimiento de oxígeno durante su crecimiento y producción de rifamicina B filamentoso; que tiende a formar pellets o esférulas durante procesos de fermentación en medio líquido; lo que impide una adecuada difusión del oxígeno. Disminuyendo su crecimiento y la producción de rifamicina B. (Virgilio et al., 1964; Lancini y Cavalleri, 1997).

Cuando *A. mediterranei* es sometido a procesos de fermentación convencionales para la producción de rifamicina B se ha observado la acumulación de uno de los intermediarios; que es la rifamicina W. A esta molécula es necesaria la incorporación de un átomo de oxígeno por la enzima citocromo P450 (codificada en el gen *orf 5*), para continuar con la ruta biosintética de la rifamicina B. Se ha cuantificado la acumulación de la rifamicina W en alrededor de 500 mg/mL al final de la fermentación; lo cual nos indica que este proceso se puede eficientizar.

En los trabajos de Guerra (2006) se demostró que al introducir el gen de hemoglobina (*vhb*) en *A. mediterranei* la producción de rifamicina B, en condiciones de limitación de oxígeno se incrementó de 400 a cerca de 600 mg/mL. Así que aún restaran 300 mg/mL de rifamicina W que no han sido transformados en rifamicina B por la enzima citocromo P450.

El mecanismo por el cual la hemoglobina causa un efecto positivo en la producción de rifamicina se encuentra sustentado bajo la doble hipótesis de que la hemoglobina forma enlaces con el oxígeno y que tiene una alta constante de disociación (K_D 5.72 mM). Permitiendo el ingreso del poco oxígeno disuelto en el medio.

En trabajos donde realizan expresión heteróloga de esta proteína en *Escherichia coli* muestran cambios bioquímicos y fisiológicos; como un incremento en la producción de ATP, incremento en la expresión y actividad del citocromo O, una disminución de los niveles en la reducción de nucleótidos de

pirimidina además de cambios en el metabolismo central. (Chen, R., and J. E. Bailey. 1994; Kallio, *et al.*, 1994; Nilsson, *et al.*, 1999; Tsai, *et al.*, 1995; Tsai, *et al.*, 1996; Tsai, *et al.*, 1996). Pensamos que lo mismo ocurre en *A. mediterranei* y que el oxígeno que ingresa a la célula gracias a la acción de la hemoglobina, sufre una nueva competencia por las diferentes rutas metabólicas; por tanto, no es empleado exclusivamente en la ruta biosintética de rifamicina B. Esto significa que la producción de rifamicina B aún podría ser mejorada.

Bajo esta hipótesis se originó la propuesta de fusionar los genes que codifican para: hemoglobina (VHb) y citocromo P450 (CYP450). Esta última proteína cuya función es la transformación de rifamicina W a S y que es considerado como paso limitante en la biosíntesis de rifamicina B; por ser una reacción dependiente de oxígeno atmosférico. La fusión de estas dos proteínas generaría una sola proteína quimérica, la cual sea capaz de captar el poco oxígeno disuelto durante los procesos de fermentación y cederlo directamente a la enzima CYP450; para catalizar la reacción de transformación de rifamicina W a rifamicina S

En este trabajo tratamos de redirigir la utilización del oxígeno, específicamente por este citocromo P450 e incrementar así la producción de rifamicina. Para ello, primero se realizaron modelamientos de la proteína de fusión, apoyándonos en el programa DeepView donde se exploró la probabilidad de que esta proteína pudiese existir de forma activa.

Basándonos en la energía de minimización; que nos indica la posibilidad de que esta proteína pueda expresarse y adoptar determinada conformación tridimensional en la naturaleza.

Según estos valores entre menor sea esta energía, mayor la probabilidad de éxito. Así los datos que arroja cada modelo diseñado en el programa son analizados y evaluados de acuerdo a este parámetro (van Gunsteren, 1996).

Pero antes de poder desarrollar nuestro modelo de la proteína quimérica se tuvo que establecer un modelo de la probable estructura terciaria que adoptaría el CYP450, ya que no existen reportes de ella. Se realizó tomando como base modelos de citocromos P450 similares al nuestro, haciendo un alineamiento de las estructuras primarias de los citocromos pertenecientes a esta familia se obtuvo un modelo que consideramos es lo más cercano a lo que podría darse en la realidad.

Ahora ya con el modelo de la estructura terciaria del CYP450; se tenía la duda de la integración de una *bisagra* de aminoácidos para unir a las dos proteínas. Al analizar la estructura primaria de la VHB y del CYP450, por separado se observó que la cadena final de la proteína de la hemoglobina forma un alfa hélice lo que da rigidez y si el inicio de la cadena del CYP450 fuese una lamina beta o un alfa hélice, podría ocasionar que nuestras proteínas al unirse formasen un ángulo de 180°, de tal forma que sus centros catalíticos jamás se orientaran de forma favorable. Esto ocasionaría que el oxígeno que fuese captado por la VHB no se liberara de forma directa al CYP450 y que fuese liberado al citoplasma de la célula. Produciendo una nueva competencia por las diferentes rutas metabólicas que lo requieran, repitiéndose lo que sugerimos en la hipótesis cuando sólo se transformó a *A. mediterranei* con el gen *vhb*.

Sin embargo al analizar la estructura del citocromo P450 notamos que la cadena inicial de esta proteína no tiene ninguna estructura secundaria y que; por tanto, podría fungir como *bisagra* y así prescindir de la integración de aminoácidos para este fin.

Finalmente se obtuvo un modelo que se muestra en la figura No. 11 de los resultados; con una energía de minimización de -20,630 kJ/mol, lo cual nos indica que es factible la fusión directa de estos dos genes y la obtención de la proteína quimérica VHB-CYP. Además se demostró a nivel de modelo que no fue necesario la incorporación de una cadena de aminoácidos (como: glicinas) que sirvieran como *bisagras* para disminuir el impedimento estérico entre ambas proteínas y que la fusión directa es factible.

Al comparar el acoplamiento del dímero de la hemoglobina con el modelo propuesto para la VHb-CYP y ver las posibilidades de que la proteína quimérica pudiese formar dímeros como lo hace la hemoglobina, lo cual no es factible. Los dímeros de hemoglobina se acoplan para cubrir sus zonas hidrofóbicas y en el modelo propuesto la zona hidrofóbica de la VHb es cubierta por la enzima CYP; por lo cual consideró que no se formarían dímeros de la proteína quimérica. Aunque faltaría la expresión y purificación de esta proteína para; justamente, evidenciar la estructura terciaria que adoptara la proteína quimérica y dilucidar la probabilidad de formar dímeros o algún tipo de interacciones de estas proteínas.

A partir de estos datos se procedió el diseño de los *primers* para la amplificación por PCR de los genes *vhb* y *orf 5*, para lo cual se consideró la integración de sitios de corte específicos que nos permitieran dirigir la clonación y fusión en el vector pULVK2. Así en el primer *vhb F* el cual contiene parte de la secuencia de inicio del promotor del gen del promotor de eritromicina que esta unido al gen *vhb* se adicionó un sitio de corte *Hind III* al inicio. Por otra parte en el primer *vhbR* que contiene el final del gen *vhb* fue eliminado el codón de paro y en el primer *orfF* se eliminó el codón de inicio del gen, esto bajo la estrategia de fusionar los genes; en el primer *orfR* se adicionaron 4 codones de histidina enseguida del final del gen, se *rEcoR*rió el codón de paro después de los codones de histidina y finalmente se adicionó un sitio de corte para *Eco RI*. Los codones de histidina fueron adicionados para facilitar la purificación de proteína quimérica en estudios futuros.

Para la amplificación por PCR del gen *orf 5* se tuvieron dificultades debido a la formación de dímeros y estructuras secundarias en los primers *orf F* y *orf R*, además del alto contenido de GC en el gen *orf 5*. Estos problemas fueron resueltos al disminuir la concentración de los *primers* a 15.4 picomol/ μ L del primer F de 20.56 picomol/ μ L y el primer R de 22.92 a 17.19 picomol/ μ L. Con esto se disminuyó la posibilidad de que los primers se encontraran entre si.

Además, se incrementó el tiempo de desnaturalización a 3 minutos en vez de 1 minuto como lo marcaba el protocolo y se empleó dimetil sulfoxido como parte

de la reacción de PCR, a una concentración final del 5%. Ya que *A. mediterranei* es un actinomiceto y este tipo de microorganismos tienen como característica un alto contenido de guanina citosina (GC) en su DNA; lo que le da una gran estabilidad en su conformación de doble hélice. Por tanto *A. mediterranei* contiene en su DNA una concentración de GC de 68%, lo que dificultaba que las hebras de DNA se abran fácilmente y permitan la amplificación por la enzima polimerasa (Pfu). Al incrementar el tiempo de desnaturalización en la reacción de PCR se incrementó la energía cinética y facilitó de esta forma la desnaturalización del DNA de *A. mediterranei*. El conjunto de estas condiciones permitieron la amplificación exitosa del gen *orf 5*.

Posterior a ello se procedió a la clonación de los genes amplificados por PCR en el vector pULVK2 el cual contiene como marcador de selección un gen de resistencia a kanamicina. Así se logró la construcción del plásmido pUAM-LQ1, pero al realizar los cortes con las enzimas Eco RI y *Hind* III en el plásmido para liberar los genes fusionados del vector; se obtenía sólo una banda en el gel que correspondía al peso molecular del plásmido pUAM-LQ1 linearizado. Sólo se logró la liberación del gen fusionado cuando se digirió con Eco RI y Eco RV, es decir que se perdió el sitio de corte *Hind* III y temiendo que además de este sitio también se hubiese modificado el gen de hemoglobina se amplificó por PCR este gen tomando como DNA molde el plásmido pUAM-LQ1. Y posteriormente mandarlo a secuenciar.

Los resultados obtenidos eliminaron esta sospecha; obteniendo un 99% de identidad al ser comparado con la base de datos mediante el servidor BLAST y que sólo se perdió el sitio de corte *Hind* III.

Por otro lado, según datos reportados por Guerra (2006) al transformar este vector directamente en la cepa de *A. mediterranei* este microorganismo tiende a generar mutantes espontáneos resistentes a este antibiótico. Para evitar este inconveniente; fue necesario la inserción de un segundo marcador de selección; el gen *Erm*, que se obtuvo a partir del plásmido pIJ4026; este gen confiere resistencia a eritromicina.

Para sacar este gen del plásmido pIJ4026 se emplearon los sitios de corte EcoRI y Xba I y posterior a la digestión, la muestra se corrió en un gel de agarosa al 0.7% para purificar este gen cuyo peso molecular es de 1622 pb. Para el plásmido pUAM-LQ1, la estrategia empleada fue diferente pues presenta 2 sitios para la enzima XbaI y uno de ellos se encuentra en el sitio pA-rep; zona requerida para la replicación en *A. mediterranei*. Por lo cual fue necesaria la realización de una digestión parcial con la enzima XbaI; una vez encontrando la concentración de enzima que nos permitió linearizar el plásmido pUAM-LQ1 se procedió a la segunda digestión con la enzima EcoRI. Posterior a ello se procedió a correr en un gel de agarosa y cortar la banda correspondiente al peso molecular de 7,775 pb. Reduciéndose así las probabilidades de interrumpir el gen pA-rep, que como ya se mencionó; es necesario para la replicación de este plásmido en la cepa de *A. mediterranei*.

Así se logró la construcción del plásmido pUAM-LQ2, el cual fue introducido a la MSB de *A. mediterranei* empleando la técnica de biobalística; se optó emplear esta técnica por los antecedentes en los trabajos de Guerra (2006), en los que probó sin éxito la transformación de este microorganismo por electroporación sin obtenerse ningún transformante. Sin embargo al emplear la técnica de biobalística se lograron buenos resultados. Para ello se usaron dos concentraciones de ADN y diferentes edades del cultivo de *A. mediterranei* encontrando una mayor eficiencia a las 34 hrs. de crecimiento; y en cuanto al empleo de diferentes concentraciones de ADN, no se halló una diferencia significativa en el número de transformantes obtenido. Cabe señalar que no existe ningún reporte que indique el uso de la biobalística para transformar actinomicetos, por lo que se puede considerar como una aportación adicional del presente trabajo.

La selección cualitativa de las transformantes que presentaban mayor crecimiento y que tenían una coloración naranja intensa; se interpretó como un probable incremento en la producción de rifamicina B; o bien, por efecto de un mayor contenido de proteínas con grupos *hemo*, hay que recordar que tanto la hemoglobina como el citocromo P450, podrían generar cierto tono rojizo a las colonias transformantes. De esta forma, se eligió la cepa 10; por cumplir con

los criterios antes mencionados, y se procedió a realizar las pruebas de fermentación apreciándose una producción de rifamicina a partir de las 24 h de iniciada la fermentación en la cepa transformada con el plásmido pUAMLQ-2, a diferencia de la cepa parental.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Khang (2003) en sus trabajos en que logra fusionar a la VHb proveniente de *Vitreoscilla hemoglobin* con la D- aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis*. Mediante una comparación de dominios previa a la fusión; pero, a diferencia nuestra, sin la realización de un modelamiento teórico de la proteína resultante de esta fusión. Khang (2003) al ver la compatibilidad de sus dominios; decide fusionar ambas proteínas, logrando estabilizar a la enzima DAO y proporcionarle el oxígeno requerido por ella, para catalizar su reacción. Sobre expresó esta proteína en *E.coli* y la purificó; para su posterior inmovilización y evaluación de la actividad específica en condiciones similares a las de biorreactor.

Al medir la actividad de esta enzima quimérica en biorreactores de 200 mL; observó un incremento significativamente en la estabilidad en el proceso de bioconversión de cefalosporina C, incrementada la eficiencia catalítica en tres veces en comparación con la enzima DAO. Al realizar el escalamiento del proceso a un birreactor de 5 L, obtuvo un 99% de bioconversión de cefalosporina C a un flujo de 0.2 (v/v); incrementándose dos veces, obteniendo un 99.77% de rendimiento en la transformación del intermediario del ácido D-alfa-aminoadipico a ácido glutaril-7-aminocefalosporanico (7-ACA); un componente inicial para la producción de antibióticos semisintéticos β -lactámicos. Sugiriendo que la fusión de la proteína VHb-DAO puede incrementar su producción y que mediante tres procesos de bioconversión con DAO sería posible la obtención de cefamandole (cefalosporina de amplio espectro) sin la necesidad de la purificación para eliminar intermediarios.

Este estudio nos da una idea del efecto que tiene la enzima VHb-DAO, dirigiendo la producción a un solo tipo de cefalosporina.

Como observamos en la grafica No. 1 al comparar la producción de rifamicina de la cepa transformada con la parental apreciamos un incremento desde las 24 h en su producción; datos comparables con los obtenidos por Khang (2003) al emplear volúmenes similares en los biorreactores, lo que nos sugiere que la fusión de la proteína Vhb-CYP adquiere una conformación adecuada para nuestros intereses. Y sus centros reactivos se encuentran orientados adecuadamente; de tal forma que no se bloquean entre si las dos proteínas. Manteniéndose la actividad de ambas proteínas. Sin embargo se considera que aun falta mucho por desarrollar dentro de este proyecto. Aunque son muy favorables los resultados obtenidos hasta hoy, queda por dilucidar la estructura terciaria de la proteína quimérica y evaluar la posibilidad de mejorar su estructura terciaria.

Conclusiones

1. Se obtuvo un modelo de la proteína de fusión VHb/CYP con una energía de minimización de -20 620 kJ/mol.
2. Se construyó el vector de expresión pUAMLQ-2 que contiene el gen quimérico *vgh/orf5* y el marcador de resistencia a eritromicina.
3. Se logró un incremento en la producción de rifamicina B bajo condiciones limitadas de aireación con la cepa transformada con el plásmido pUAMLQ-2 de 7 veces su producción comparandola con la cepa parental.

REFECENCIAS

Ansgar, S. 2002. Die Biologie der Ansamycine: Beispiel Rifamycin, Überblick, BIOSpektrum · 3/04 · 10. Jahrgang, 249-253

Appel, R.; Bairoch, A. y Hochstrasser, D. 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. Trends Biochem. Sci., 19, 258–260.

August, R.; Tang, L. y Yoon, Y. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. Chem. Biol. 5, 69–79.

Bachs, L.; Pares, A.; Elena, M.; Piera, C. y Rodes, J. 1992. Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 102, 2077-2080 .

Bailey, J.; Sburlati, A.; Hatzimanikatis, K.; Lee, K.; Renner, W. y Tsai, P. 1996. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. Biotechnol. Bioeng. 52:109–121.

Barakett, V.; Lesage, D.; Delisle, F.; Vergez, P. y Petit, J. 1993. Killing kinetics of vancomycin and rifamycin tested alone and in combination against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 69-71

Bèrdi, J. 1989. The discovery of the new bioactive microbial metabolites. Screening and identification. En M.E. Bushell y U. Gräfe (editores). Bioactive metabolites from microorganism. Progress in industrial microbiology. Vol. 27. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Boerman, S. y Webster, D. 1982. Control of heme content in *Vitreoscilla* by oxygen. J. Gen. Appl. Microbiol. 28:35–43.

Buřlow, L.; Holmberg, G.; Lilius, L. y Bailey, J. 1999. The metabolic effects of native and transgenic hemoglobins on plants. *Trends Biotechnol.* 17:21–24.

Chen, R., and J. E. Bailey. 1994. Energetic effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression in *Escherichia coli*: an on-line ³¹P NMR and saturation transfer study. *Biotechnol. Prog.* 10:360–364.

Chen, S.; von Bamberg, D.; Hale, V.; Breuer, M.; Hardt, B.; Müller, R.; Floss, H.; Reynolds, K. y Leistner, E. (1999). Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin: identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* T ü 1892. *Eur. J. Biochem.* 261, 98-107.

Chiao, J.; Xia, T.; Ni, L.; Gu, W.; Jin, Z.; Mei, B. y Zhang, Y. 1988. Studies on the metabolic regulation of rifamycin SV biosynthesis. In: *Biology of Actinomycetes* 88.

Cragg, G. y Newman, D. 2001 Medicinals for the millennia. The historical record. *Ann. NY. Acad. Sci.*; 953: 3-25.

Cross T. 1981, Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of Actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*; 50: 397-423.

Dairi, T.; Hamano, T.; Furumai, L.; y T. Oki. 1999. Development of a selfcloning system for *Actinomadura verrucosospora* and identification of poliketide synthasa genes essential for production of the angucyclic antibiotic pradimicin. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2703-2709.

Demain, A. y Davies J. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2ª Ed. ASM Press. Washington D.C.

Dikshit, K. y Webster, D. 1988. Cloning characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *E. coli*. *Gene* 70:377–386.

Dikshit, K.; Spaulding, D.; Braun, A.; y Webster, D. 1989. Oxygen inhibition of globin (vgb) gene transcription and bacterial haemoglobin synthesis in *Vitreoscilla*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2601–2609.

Dikshit, K.; Dikshit, R. y Webster, D. 1990. Study of *Vitreoscilla* globin (vgb) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* 18:4149–4155.

Dikshit, K.; Orri, Y.; Navani, N.; Patel, S.; Huang, H.; Stark, B. y Webster, D. 1998. Site directed mutagenesis of bacterial hemoglobin: the role of glutamine (E7) in oxygen binding in the distal heme pocket. *Arch. Biochem. Biophys.* 349:161–166.

El-Tayeb, O.; Hussein, M.; Salama, A.; y El-Sedawy, H. 2004 Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. IV. Production in the fermentor; *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (9), pp. 432-440.

El-Tayeb, O.; Hussein, M.; Salama, A. y El-Sedawy, H. 2004 Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. II. The role of gene amplification and physiological factors in productivity in shake flasks; *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3, No. 5, , pp. 273-280

El-Tayeb, O.; Hussein, M.; Salama, A. y El-Sedawy, H. 2004. Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. IV. Production in the fermentor. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (9), pp. 432-440.

Falck, J.; et al., 2001, Practical, enantiospecific sythesis of 14,15-EET and leukotoxin B (vermolic acid). *Tetrahedron Lett.* 42, 4131-4133

Feng, Bo; Friedlin E. y Marzluf, G. 1994. A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, no. 12, p. 4432-4439.

Eyrich, V.; Marti-Renom, M.; Przybylski, D.; Madhusudhan, M.; Fiser, A.; Pazos, F.; Valencia, A.; Sali, A. y Rost, B. 2001. EVA: continuous automatic evaluation of protein structure prediction servers. *Bioinformatics*, 17, 1242–1243.

Fenical W. 1993 Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev*; 93: 1673-83.

Flohil, J.; Vriend, G. y Berendsen, H. 2002. Completion and refinement of 3-D homology models with restricted molecular dynamics: application to targets 47, 58, and 111 in the CASP modeling competition and posterior analysis. *Proteins*, 48, 593–604.

Ghisalba, O.; Auden, J.; Schupp, T y Nüesch, J. 1984. The rifamycins: properties, biosynthesis and fermentation. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Vandamme, E. ed. Basel: Marcel Decker, Inc. New York, pp. 281-327.

Ghisalba, O.; Auden, J; Schupp, T. y Nüesch, J. 1984. The rifamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, pp. 281-327. Edited by E. J. Vandamme. New York & Basel: Marcel Dekker.

Guex, N. y Peitsch, C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723.

Hardison, C. 1996. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5675–5679.

Holmberg, N.; Lilius, G.; Bailey, J. y Bu'low, L. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla hemoglobin* exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat. Biotechnol.* 15:244–247.

Horan, A. 1994. En V. P. Gullo (editor). *Aerobic actinomycetes. A continuing source of novel natural products. The discovery of Natural products with therapeutic potential.* Butterworth-heinemann, USA.

Horan, C. 1994. En V. P. Gullo (editor). *Aerobic actinomycetes. A continuing source of novel natural products. The discovery of Natural products with therapeutic potential.* Butterworth-heinemann, USA.

Huang, X. y Miller, W. 1991 A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.*, 12, 337–357.

Kallio, P. T., D. J. Kim, P. S. Tsai y J. E. Bailey. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla hemoglobin* alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.* 219:201–208.

Khang, Y.; Kim, I.; Hah, Y.; Hwangbo, J. y Kang, K. 2003. Fusion protein of *Vitreoscilla hemoglobin* with D-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C. *Biotechnol Bioeng.* 2003 May 20;82(4):480-8.

Kumar, C.; Coque, J. y Martín, F. 1994. Efficient transformation of the Cephamycin C producer *Nocardia lactamdurans* and development of Shuttle and promoter-probe cloning vectors. *Applied and environmental microbiology*, p. 4086-4093

Iwai, Y. y Takahashi, Y. 1992 E. S. Omura (Editor) Selection of microbiological sources of bioactive Compounds. *The Search for Bioactive Compounds from microorganism* Springer-Verlag. New York pp. 281-302.

Jensen, P. y Fenical, R. 1994, W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol*; 48: 559-84.

Koehl P. y Levitt, M. 1999. A brighter future for protein structure prediction. *Nature Struct. Biol.*, 6, 108–111.

Kopp, J.; Peitsch, M. y Schwede, T. 2003. Protein structure modeling. In Galperin, M.Y. and Koonin, E.V. (eds), *Frontiers in Computational Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, Vol. 3, pp. 89–121.

Khosla, C. y Bailey, J. 1988. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *E. coli*. *Nature* 331:633–635.

Khosla, C. y Bailey, J. 1988. The *Vitreoscilla haemoglobin* gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214:158–161.

Khosla, C. y Bailey, J. 1989. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla hemoglobin* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:5995–6004.

Kyung-Won, P.; Kyung-Jin, K.; Andrew, J.; Howard, A.; Benjamin, C.; Stark, C. y Dale, A. 2002. *Vitreoscilla hemoglobin* Binds to Subunit I of Cytochrome bo Ubiquinol Oxidases. *Journal of Biological Chemistry*; Vol. 277, No. 36, pp. 33334–33337.

Labeda, D. y Shearer, P. 1990. En. D.P. Labeda. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. Isolation of biotechnological organism from nature., McGrawhill, INC, 21-51.

Lal, R.; Khanna, M.; Hardeep, K.; Srivastava, N.; Tripathi, K. y Lal, S. 1995. Rifamycins: Strain improvement program. *Crit. Rev. Microbiol.* 21(1): 19-30.

Lancini, G. y Cavalleri, B. 1997. Rifamycins. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics. Strohl, W.R. ed. 2nd ed. Marcel Decker, New York, pp. 521-549.

Lancini, C. y Hengeller, C. 1971. U.S. patent 3; 597,324. Cited in: Biotechnology of Industrial Antibiotics. Strohl, W.R. ed. 2nd ed. Marcel Decker, New York, p. 537.

Lee, S.; Cha-Yong, Ch.; Jong-Seong, A.; Jae-Yong, Ch.; Cheon-Seok, P. y Yeo J. 2004. Identification of a Cytochrome P450 Hydroxylase gene Involved in rifamycin biosynthesis by *Amycolaptosis mediterranei* S699. J. Microbiol. Biotechnol. 14(2), 356-362.

Liu, C. y Webster, D. 1974. Spectral characteristics and interaction of the reduced, oxidized and oxygenated forms of purified cytochrome 'O'. J. Biol. Chem. 249:4261–4266.

Lovell, S.; Word, J.; Richardson, J. y Richardson, D. 2000. The penultimate rotamer library. Proteins, 40, 389–408.

Lund, O.; Frimand, K.; Gorodkin, J.; Bohr, H.; Bohr, J.; Hansen, J. y Brunak, S. 1997. Protein distance constraints predicted by neural networks and probability density functions. Protein Eng., 10, 1241–1248.

Lysko, A. y Gorskaia, S. 1986. Effect of various forms of inorganic nitrogen on biosynthesis of rifamycin B. J. Antibiot. Med. Biotechnol. 31:519.

Magnolo, S.; Leenutaphong, D.; DeModena, J.; Curtis, J.; Bailey, J.; Galazzo, J. y Hughes, D. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. Biotechnology (N Y). 1991 May;9(5):473-6.

Meenal, J.; Shekhar, M.; Kanak, L. y Dik, Sh. 1998. Hemoglobin biosynthesis in *Vitreoscilla stercoraria* DW: cloning, expression, and characterization of a new

homolog of a bacterial globin gene. Applied and environmental microbiology, Vol. 64, No. 6 p. 2220–2228

Melo, F. y Feytmans, E. 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. J. Mol. Biol., 277, 1141–1152.

Melo F. y Feytmans, E. 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. J. Mol. Biol., 277, 1141–1152.

Minas, W.; Brünker, P.; Kallio, P. y Bailey, J. 1998. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*. Biotechnol. Prog. 14:561–566.

Moult J. (1996) The current state of the art in protein structure prediction. Curr. Opin. Biotechnol., 7, 422–427.

Nilsson, M., P. T. Kallio, J. E. Bailey, L. Bülow y K.-G. Wahlund. 1999. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study. Biotechnol. Prog. 15:158–163.

Nisbet, L. 1992. En secondary metabolites: their function and evolution. Useful functions of microbial metabolites. Ciba Foundation Symposium. 171. John Wiley and Sons pp 215-235.

Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. J. ind. Microbiol., 10: 135-156.

Omura, S. 1992. The expanded horizon for microbial metabolites- a review. Gene 115: 141-149.

Oppenheim, B.; Koornhof, H.; y Austrian, R. 1986. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in children at Baragwanath hospital, Johannesburg. Pediatr Infect Dis 5, 520-524

Orri, Y., y Webster, D. 1986. Photo dissociation of oxygenated cytochrome 'o'(s) (Vitreoscilla) and kinetic studies of reassociation. J. Biol. Chem. 261:3544–3547

Pape, H. y Rehm, H. 1985. Microbial Products. In: Rehm HJ, Reed G (eds) Biotechnology. VCH, pp. 436–457.

Peitsch, M. 2002. About the use of protein models. Bioinformatics, 18, 934–938.

Peterson, D. 1952. Microbial transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. J. Am. Chem. Soc. 74, 5933-5936.

Sali, A. y Kuriyan, J. 1999. Challenges at the frontiers of structural biology. Trends Cell Biol., 9, M20–M24.

Sali, A. y Blundell, T. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol., 234, 779–815.

Schupp, T. y Divers, M. 1986. Protoplast preparation and regeneration in *Nocardia mediterranei*. FEMS Microbiol. Lett. 36: 159-162.

Schupp, T.; Toupet, C.; Engel, N. y Goff, S. 1998. Cloning and sequence analysis of the putative rifamycin polyketide synthase gene cluster from *Amycolatopsis mediterranei*. FEMS Microbiol Lett 159, 201-207.

Schwede, T.; Diemand, A.; Guex, N. y Peitsch, M. 2000. Protein structure computing in the genomic era. Res. Microbiol., 151, 107–112.

Serizawa, N.; et al., 1983. Microbial hydroxylation of ML-236B. J. Antibiot. (Tokio). 36, 604-607.

Shafiee, A. y Hutchinson, C. 1988. Purification and reconstitution of the electron transport components for 6-deoxyerythronolide B hydroxylasa, a cytochrome P-

450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis. *J. Bacteriol.* 170, 1548-1553.

Shen, B. y Hutchinson, C. 1994. Triple hydroxylation of tetracenomycin A2 to tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*: overexpression of the *tcmG* gene in *Streptomyces lividans* and characterization of the tetracenomycin A2 oxygenase. *J. Biol. Chem.* 269, 30726-30733.

Sutcliffe, M.; Haneef, I.; Carney, D. y Blundell, T. 1987. Knowledge based modelling of homologous proteins, Part I: Three-dimensional frameworks derived from the simultaneous superposition of multiple structures. *Protein Eng.*, 1, 377-384.

Szabo, C.; Bissel, M. y Calvin, M. 1976. Inhibition of infectious rous sarcoma virus production by a rifamycin derivative. *J Virol* 18, 445-453.

Tarricone, C.; Galizzi, A.; Coda, A.; Ascenzi, P. y Bolognesi, M. 1997. Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla sp.* *Structure* 5:497-507.

Tsai, P. S., V. Hatzimanikatis y J. E. Bailey. 1996. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 49:139-150.

Tsai, P. S., M. Naegeli y J. E. Bailey. 1996. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*. *Biotechnol. Bioeng.* 49:151-160.

Tsai, P. S., G. Rao y J. E. Bailey. 1995. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential. *Biotechnol. Bioeng.* 47:347-354.

van Gunsteren, W.; Billeter, S.; Eising, A.; Hünenberger, P.; Krüger, P.; Mark, A.; Scott, W. y Tironi, I. 1996. Biomolecular simulations: The GROMOS96 manual and user guide. VdF Hochschulverlag ETHZ, Zürich.

Venkateswarlu, G.; Murali, P.; Sharma, G. y Venkateswarlu, R. 2000. Improvement of rifamycin B production using mutant strains of *Amycolatopsis mediterranei*. Bioprocess Eng. 23: 315-318.

Vermeulen, N. 2003. Prediction of drug metabolism: the case of cytochrome P450 2D6. Curr Top Med Chem.;3(11):1227-39.

Vinning, L. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity- A review. Gene 115: 135-140.

Virgilio, A.; Marcelli, E. y Arimino, A. 1964. Aeration-Agitation Studies on the Rifamycin Fermentation. Biotechnology and bionengineering, Vol. VI: 271-283.

Vitkup, D.; Melamud, E.; Moulton, J. y Sander, C. 2001. Completeness in structural genomics. Nature Struct. Biol., 8, 559–566.

Webster, D. 1987. Structure and function of bacterial haemoglobin and related proteins, p. 245–265. In G. L. Eichorn and L. G. Magill (ed.), Advances in inorganic biochemistry, vol. 7. Heme proteins. Elsevier, New York, N.Y

Wehrli, W. 1977. Ansamycins: chemistry, biosynthesis and biological activity. Topics Curr Chem 72, 21-49.

White, R. J., Martinelli, E. y Lancini, G. (1974). Ansamycin biogenesis: studies on a novel rifamycin isolated from a mutant strain of *Nocardia mediterranei*. Proc Natl Acad Sci U S A 71, 3260–3264.

Xu, J.; Wan, E.; Kim, Ch.; Floss, H. y Mahmud, T. 2005. Identification of tailoring genes involved in the modification of the polyketide backbone of

rifamycin B by *Amicolatopsis mediterranei* S699, *Microbiology* , 151, 2515–2528

Zimmerli, W.; Widmer, A.; Blatter, M.; Frei, R. y Ochsner, P. 1998. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 279, 1537-1541.