



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Efecto de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* en la
producción de ácido clavulánico por
Streptomyces clavuligerus.

TESIS

Para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

B. E. Karla Soledad Macedo Osorio.

Director de tesis: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Enero 2012.

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

El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca de maestría con número de registro **268205**.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de Dr. Armando Mejía Álvarez y con la asesoría del Dr. Francisco José Fernández Perrino.

México D.F. a 1 de febrero del 2012.

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

**Efecto de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* en la producción de ácido clavulánico por
Streptomyces clavuligerus.**

que presentó

B.E. Karla Soledad Macedo Osorio

Comité Tutorial:

Director: Armando Mejía Álvarez

Asesor: Francisco José Fernández Perrino

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía.

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro.



The image shows four handwritten signatures on horizontal lines. From top to bottom, they correspond to the President, Secretary, and two vocal members of the Jury. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

A mi mamá, porque aunque el camino no siempre ha sido fácil tú siempre has estado ahí para recordándome que debo seguir. Te quiero.

A mis hermanos, Gaby y Emiliano por hacer mis días mejores.

A mi Sus, por permanecer en cada respiro.

"Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto."

Noel Clarasó

Agradecimientos.

Al Dr. Francisco J. Fernández Perrino, por su valiosa ayuda durante toda mi estancia en el laboratorio, brindarme su amistad y ser participe de mi formación académica y personal.

Al Dr. Armando Mejía, por abrimme las puertas del laboratorio, permitirme formar parte de sus proyectos y enseñarme a querer a los actinomicetos.

A los doctores: Francisco Fierro y Octavio Loera por el tiempo invertido en la revisión de este documento, por sus amables correcciones y comentarios.

A los doctores: Araceli Tomasini y Javier Barrios, por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio y por preocuparse que tuviéramos lo necesario para realizar nuestros proyectos.

A mis queridos amigos: Ara, Cristian y Marcial, por hacer más ligera la carga, por ser parte de esta odisea de principio a fin, por las innumerables veladas científicas, por darme ánimos en momentos difíciles..., por su invaluable amistad.

Al Dr. Jaime Marcial, por su ayuda durante todo este tiempo, por no dejarme renunciar en momentos de obscuridad, por enseñarme a amar la ciencia y la glucólisis, por hacerme crecer cada día. Por ahorrarme largas horas de trabajo, regalándome sus tapones y gorros.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Omarsuco, Jessie, Pao, Rox, Dany, Octopus, Marisol, Tere, Mariel, Hugo, Gaby, Lewis, Jibus, Paty, Alejandro, Araceli, Tania, Sandra, Maura, Edgar, y a los externos: Dafné, Luis Humberto, Jenny, Isa, Viol, por los momentos compartidos, las risas y amenas conversaciones.

A todos, por ser parte de lo que amo.

RESUMEN

Streptomyces clavuligerus es un actinomiceto que produce más de veinte metabolitos secundarios, entre los más importantes se encuentran la cefamicina C y el ácido clavulánico (AC). Este último es un potente inhibidor de un amplio rango de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el antibiótico β -lactámico inactivando su función. Por ello, el AC es capaz de potenciar la actividad de penicilinas y cefalosporinas contra bacterias resistentes productoras de β -lactamasas.

Dada la importancia clínica del AC, se han realizado diversos estudios conducidos a entender los mecanismos que afectan a su producción. En este trabajo se analizaron los efectos que produce la interrupción de los genes *sclB* (SCLAV_4638) y *sclC* (SSCG_04361), genes que se encuentran localizados fuera del *cluster* biosintético de AC y que aparentemente tienen una función reguladora (observado tras realizarse un análisis *in silico* de la composición aminoacídica de sus proteínas). Estos dos genes fueron estudiados previamente en *Streptomyces coelicolor*, demostrándose su participación en la respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, la interrupción de ambos en *S. clavuligerus* tuvo efectos pleiotrópicos sobre el metabolismo, afectando tanto a la producción de AC como a la diferenciación celular y crecimiento, aún sin la presencia de estrés osmótico. Ambas mutantes presentaron morfología calva (*bald*) en sus colonias, caracterizada por la ausencia de micelio aéreo. De igual manera, la producción de AC disminuyó considerablemente por efecto de la mutación: en la mutante $\Delta sclB$ la producción específica de AC fue aproximadamente 5 veces menor en comparación con la cepa silvestre, en el caso de $\Delta sclC$ la disminución no fue tan drástica, sin embargo se observó el mismo comportamiento. Estos resultados sugieren que los genes *sclB* y *sclC* son reguladores globales esenciales para la producción de AC y para la diferenciación celular del microorganismo.

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus is an actinomycete which produces more than 21 secondary metabolites, among the most important are cephamycin C and clavulanic acid (AC), the latter is a potent inhibitor of a wide range of β -lactamases, enzymes that hydrolyze the β -lactam antibiotic inactivating their function, so the AC is able to enhance the activity of penicillins and cephalosporins against resistant bacteria producing β -lactamases.

Given the clinical importance of the AC, there have been several studies conducted to understand the mechanisms behind their production. In this paper, we analyzed the effects that disruption the *sclB* (SCLAV_4638) and *sclC* (SSCG_04361) genes, these genes are located outside the AC biosynthetic cluster, by in silico analysis of the aminoacid composition of its proteins, we determined that both have a regulatory function, these genes were previously studied in *S. coelicolor* resulting involved in osmotic stress response. However, the disruption of both in *S. clavuligerus* had pleiotropic effects on metabolism, affecting both the production of AC as cell differentiation and growth, even without the presence of osmotic stress. Both mutants showed morphology bald in their colonies, characterized by the absence of aerial mycelium; similarly, the production of AC decreased significantly for effect of the mutation, the specific production AC of the Δ *sclB* mutant, was approximately 5 times lower compared to the wild type, in the case of Δ *sclC*, the decline was not drastic, however, we observed the same behavior. These results suggest that *sclB* and *sclC* genes are essential global regulators for the production of AC and differentiation of the microorganism.

ÍNDICE GENERAL.

Página:

ÍNDICE GENERAL..... IX

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS..... XIII

TABLAS..... XV

ABREVIATURAS:..... XVI

INTRODUCCIÓN..... XVII

1. MARCO TEÓRICO. - 1 -

1.1. Antibióticos β -lactámicos..... - 1 -

1.1.1. Mecanismo de acción. - 3 -

1.2. Resistencia a antibióticos β -lactámicos..... - 3 -

1.2.1. Inhibición enzimática de antibióticos. - 4 -

1.3. Inhibidores de β -lactamasas. - 8 -

1.3.1. Sulbactama..... - 8 -

1.3.2. Tazobactama..... - 9 -

1.3.3. Brobactama..... - 9 -

1.3.4. Ácido clavulánico..... - 9 -

1.3.4.1. *Streptomyces clavuligerus*..... - 10 -

1.3.4.2. Biosíntesis de ácido clavulánico. - 12 -

1.3.4.3. Cluster de genes biosintéticos de ácido clavulánico. - 13 -

1.3.4.4. Producción fermentativa de ácido clavulánico. - 14 -

2. ANTECEDENTES.18

2.1. Mejoramiento genético de cepas para la producción de AC.....18

2.2. Regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces sp.*20

2.2.1. Sistema de regulación de dos componentes.....21

3. JUSTIFICACIÓN.26

4. HIPÓTESIS.27

5. OBJETIVOS.....	27
5.1. Objetivo general.	27
5.2. Objetivos particulares.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Microorganismos utilizados.	28
6.1.1. <i>E. coli</i> DH5 α	28
6.1.2. <i>E. coli</i> IBEC-58.	28
6.1.3. <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064 (NRRL 3585).....	28
6.2. Medios de cultivo.	29
6.2.1. Antibióticos.	32
6.3. Mantenimiento y conservación de cepas.	33
6.4. Vectores plasmídicos.	34
6.5. Extracción de ADN total de <i>S. clavuligerus</i>	36
6.6. Manipulación de ADN.	37
6.6.1. Desproteización del ADN.	37
6.6.1.1. Extracción con fenol-cloroformo.	37
6.6.1.2. Precipitación con etanol.....	37
6.6.2. Eliminación de ARN.....	37
6.6.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	38
6.6.4. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.	39
6.6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	39
6.6.6. Digestión con enzimas de restricción.....	40
6.6.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina y ligación.....	41
6.7. Amplificación de plásmidos.....	42
6.7.1. Preparación de células electrocompetentes.....	42
6.7.2. Transformación por electroporación.....	42
6.7.3. Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	43
6.7.3.1..... Minipreparaciones.	43
6.7.3.2. Megapreparaciones.	44
6.8. Construcción de los plásmidos pJetB y pJetC.	44
6.8.1. Amplificación por PCR de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i>	44
6.8.1.1. Diseño de los cebadores.....	44
6.8.1.2. Condiciones para la reacción de PCR.	47
6.8.2. Clonación de <i>sclB</i> y <i>sclC</i> en el plásmido pJET.	48
6.9. Construcción del cassette de interrupción.	49

6.9.1. Amplificación del gen <i>aac(3)IV</i> por PCR.....	49
6.9.1.1. Diseño de cebadores.	49
6.9.1.2. Condiciones de reacción de PCR.	52
6.9.2. Inserción del gen <i>aac (3) IV</i> en los plásmidos pJETB y pJETC.....	53
6.10. Construcción de los vectores de interrupción.	53
6.11. Transformación de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	53
6.11.1. Formación de protoplastos de <i>S. clavuligerus</i> (Baltz, 1980; Kieser y col., 2000). 54	
6.11.2. Transformación de protoplastos y selección de mutantes.	54
6.12. Comprobación de la interrupción de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i>	55
6.12.1. PCR de colonia a partir de las transformantes obtenidas de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	56
6.13. Evaluación del efecto de la interrupción en la producción de ácido clavulánico.	57
6.13.1. Fermentación líquida.	57
6.13.2. Cuantificación de ácido clavulánico por espectrofotometría	57
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	59
7.1. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas codificadas por los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i> en <i>S. clavuligerus</i>	59
7.2. Interrupción de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i>	63
7.2.1. Extracción de ADN de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	63
7.2.2. Transformación de plásmidos por electroporación y amplificación.	63
7.2.3. Amplificación de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i> por PCR.	64
7.2.3.1. Diseño de cebadores.	64
7.2.4. Ligación del gen <i>sclB</i> y <i>sclC</i> en el plásmido pJET.....	67
7.2.5. Obtención del gen <i>aac(3)IV</i> por PCR.	69
7.2.6. Clonación del gen <i>aac(3) IV</i> en los plásmidos pJETB y pJETC	70
7.2.7. Construcción de los vectores de interrupción pMEBA y pMECA.	72
7.3. Transformación y selección de mutantes.	74
7.3.1. Formación de protoplastos y transformación en <i>S. clavuligerus</i>	74
7.3.2. Comprobación de la interrupción de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i>	75
7.4. Evaluación del efecto en la morfología y producción de AC en <i>S. clavuligerus</i> y mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$	77
7.4.1. Morfología de las mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$	77
7.4.2. Evaluación de la producción de ácido clavulánico en <i>S. clavuligerus</i> y mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$	78
8. CONCLUSIONES.	82

9. PERSPECTIVAS.....83

10. ANEXO.....84

11. REFERENCIAS.....85

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

	Página:
Fig. 1. Estructura de antibióticos β -lactámicos	1
Fig. 2. Efecto de las β -lactamasas sobre la penicilina	5
Fig. 3 Estructura química de inhibidores de β - lactamasas: (1) Ácido clavulánico, (2) Sulbactama y (3) Tazobactama	8
Fig. 4. Ruta de biosíntesis de ácido clavulánico y compuestos clavam	13
Fig. 5. <i>Clusters</i> biosintéticos de A) ácido clavulánico B) compuestos clavam y C) genes parálogos en <i>Streptomyces clavuligerus</i>	14
Fig. 6. Conexión del metabolismo del glicerol y arginina/ornitina en la biosíntesis de ácido clavulánico	17
Fig. 7. Estructura de un sistema de regulación de dos componentes	22
Fig. 8. Modelo de la modulación de la actividad σ^B por OsaC	24
Fig. 9 Mapa de restricción del plásmido comercial pJET1.2/blunt	34
Fig. 10. Mapa del transposón 5062 (Tn5062)	34
Fig. 11. Mapa de restricción del vector de pME6	35
Fig. 12. Marcadores de peso molecular comerciales	39
Fig. 13. Proceso de doble recombinación homóloga y recombinación simple	55
Fig. 14. Estrategia utilizada para la interrupción de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i> y comprobación de las mutantes por PCR	56
Fig.15. Reacción de imidazol con ácido clavulánico	58
Fig. 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>sclB</i> en <i>S. clavuligerus</i> y sus semejantes en <i>S. coelicolor</i> , <i>S. avermitillis</i> y <i>S. lividans</i>	60
Fig. 17. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>sclC</i> en <i>S. clavuligerus</i> y sus semejantes en <i>S. coelicolor</i> , <i>S. avermitillis</i> y <i>S. lividans</i>	61
Fig. 18. Análisis de los dominios localizados en SclB. Solo se presenta un domino REC común en los reguladores respuesta	62
Fig. 19. Análisis de los dominios localizados en SclC	63

Fig. 20. ADN genómico de obtenido de la cepa de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	63
Fig.21. Reamplificación de los plásmidos pQM5052 y pME6 por megapreparaciones	64
Fig. 22. Productos de amplificación por PCR del gen <i>sclB</i> (A) y <i>sclC</i> (B)	67
Fig. 23. Mapas de restricción y digestión de los plásmidos pJETB y pJETC	68
Fig. 24. Amplificación por PCR del gen <i>aac(3)IV</i> a diferentes temperaturas de hibridación ...	70
Fig. 25. ADN plasmídico obtenido por minipreparaciones de las transformantes pJETCA	71
Fig. 26. A) Mapa de restricción del plásmido pJETBA, B) digestión con <i>Bam</i> HI del plásmido:1) pJET y 2) pJETBA	71
Fig. 27. (A) Análisis de restricción del plásmido (3) pJETCA con la enzima <i>Bam</i> HI y (B) mapa de restricción del mismo plásmido	72
Fig. 28. A) Mapa de restricción del plásmido pMEBA y B) Mapa de restricción del plásmido pMECA	73
Fig. 29. (1) Micelio de <i>S. clavuligerus</i> y (2) protoplastos formados después de 15 min de incubación con lisozima. (Fotografía tomada de un microscopio de contraste de fases)	74
Fig. 31. Comprobación de la interrupción por PCR del gen <i>sclB</i> (I) y <i>sclC</i> (II). Las mutantes $\Delta sclB$ (MB2) y $\Delta sclC$ (MC1-MC8) presentan un tamaño 1049 pb mayor en comparación con la cepa silvestre (S), confirmando la presencia del gen de resistencia a apramicina	76
Fig. 32. Comprobación de la interrupción por PCR del gen <i>sclB</i> (I) y <i>sclC</i> (II), la amplificación se realizó con el <i>primer</i> reverso del gen de resistencia a apramicina y el <i>primer</i> directo de los genes <i>sclB</i> y <i>sclC</i> , respectivamente	76
Fig. 33. Mutantes de <i>S. clavuligerus</i> $\Delta sclB$ (I-IV) y $\Delta sclC$ (MC4), las cuales carecen de micelio aéreo, en comparación con la cepa silvestre (S), incubadas en medio ME.....	77
Fig. 34. I) Cinética de crecimiento, II) producción volumétrica y III) producción específica de AC de ■ <i>S. clavuligerus</i> $\Delta sclB$ (MB2) y ● <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064, en medio de producción	79
Fig. 35. I) Cinética de crecimiento, II) producción volumétrica y III) producción específica de AC de ▲ <i>S. clavuligerus</i> $\Delta sclC$ (MC4) y ● <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064, en medio de producción A, durante 120 horas de incubación a 28°C	80

TABLAS.

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las enzimas β -lactamasas 7

Tabla 2. Concentraciones de antibióticos empleados para la selección de transformantes en *E coli* y *S. clavuligerus* 33

Tabla 3. Concentraciones de agarosa utilizadas para diferentes tamaños de fragmentos de ADN. 38

Tabla 4. Números de acceso de las secuencias aminoacídicas de proteínas similares a SclB y SclC en diferentes estreptomicetos..... 58

Tabla 5. Porcentajes de similitud de las proteínas codificadas por los genes (A) *sclB* y (B) *sclC* en 1) *S. clavuligerus* y sus genes homólogos en 2) *S. coelicolor*, 3) *S. avermitilis* y 4) *S. lividans* 59

Abreviaturas:

A₂₆₀	Absorbencia a 260 nm de λ	min	Minuto
A₂₈₀	Absorbencia a 280 nm de λ	µg o ug	Microgramo
aa	Aminoácido	µL	Microlitro
AC	Ácido clavulánico	mg	Miligramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mL	Mililitro
Amp^R	Resistencia a ampicilina	mm	Milímetro
ARN	Ácido ribonucleico	mM	Milimolar
c. b. p.	Cuanto baste para	MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
CIA	Cloroformo-alcohol isoamílico	ng	Nanogramos
CM	Cefamicina C	nm	Nanómetros
Dam	ADN adenin metil transferasa	°C	Grados Celsius
Dcm	ADN citosin metil transferasa	p	Peso
D. O.	Densidad óptica	pb	Pares de bases
DMSO	Dimetilsulfóxido	PBP	Proteínas de unión a la penicilina
dNTPs	Mezcla de dexosirribonucleótidos trifosfato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	PEG	Polietilenglicol
Fig	Figura	PEP	Fosfoenolpiruvato
g	Gramo	pH	Potencial de hidrogeno
g	Fuerza de la gravedad	r.p.m.	Revoluciones por minuto
h	Horas	seg	Segundo
IBL	Inhibidores de β -lactamasas	SDS	Dodecilsulfato de sodio
kb	Kilobase	TES	Acido N-[tris (hidroximetil) metil] 2-aminoetanosulfónico
Km^R	Resistencia a kanamicina	Tn	Transposón
L	Litro	U	Unidad enzimática
Λ	Longitud de onda	V	Voltio
lb.	Libra de presión	v	Volumen
M	Molar		

INTRODUCCIÓN.

Los antibióticos β -lactámicos han sido empleados eficazmente desde hace más de 70 años para el tratamiento de enfermedades infecciosas, gracias a su función antimicrobiana, inhibiendo la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana. Son producidos por diversos microorganismos, sin embargo el 60 % de los antibióticos conocidos son sintetizados por actinomicetos.

A pesar de la gran capacidad de inhibición de microorganismos patógenos, el mal uso de los antibióticos β -lactámicos ha provocado que algunos microorganismos generen mecanismos de resistencia; uno de ellos es la producción de β -lactamasas, enzimas que degradan al antibiótico y por consiguiente lo inactivan. Sin embargo, existen compuestos como el ácido clavulánico (AC) que se unen a las β -lactamasas inactivándolas, por lo que su uso en combinación con los antibióticos β -lactámicos (p. ej. amoxicilina) hace que el antibiótico lleve a cabo su función original. Este compuesto es producido naturalmente por *Streptomyces clavuligerus*, una bacteria filamentosa que además de producir AC produce más de veinte compuestos bioactivos, entre los que se encuentran la cefamicina C y la penicilina N. Dada la importancia del AC en el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos resistentes a antibióticos β -lactámicos, se han diseñado mecanismos para el mejoramiento de su producción a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. En este último aspecto, ya se han caracterizado los genes biosintéticos, sin embargo es de gran interés el estudio de genes reguladores que pudieran afectar positiva o negativamente a la producción.

En este trabajo se estudió el efecto de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC*, analizando parámetros como el crecimiento, diferenciación y producción de AC en *S. clavuligerus*. Los resultados obtenidos pueden servir como una propuesta para el mejoramiento en la producción a nivel industrial de este compuesto.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizadas por métodos químicos. Su función antimicrobiana suprime el crecimiento de otros microorganismos, por lo que se considera un producto de la evolución y puede conferir una ventaja selectiva a quienes los producen en un ecosistema específico (Cordiés, 1998).

Los antibióticos más empleados son los β -lactámicos, los cuales tienen una larga historia en el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Representan más del 65% del mercado mundial de antibióticos, con más de 50 fármacos comercializados (incluyendo penicilinas y sus derivados, cefalosporinas, cefamicinas, carbapénemicos, monocarbámicos y monobactámicos). Su característica principal es poseer un anillo β -lactámico de cuatro miembros que puede estar como un anillo aislado o fusionado formando un anillo bicíclico (Fig. 1). Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 se ha descrito una gran cantidad de antibióticos naturales y sintéticos (Essack, 2001; Poole, 2004).

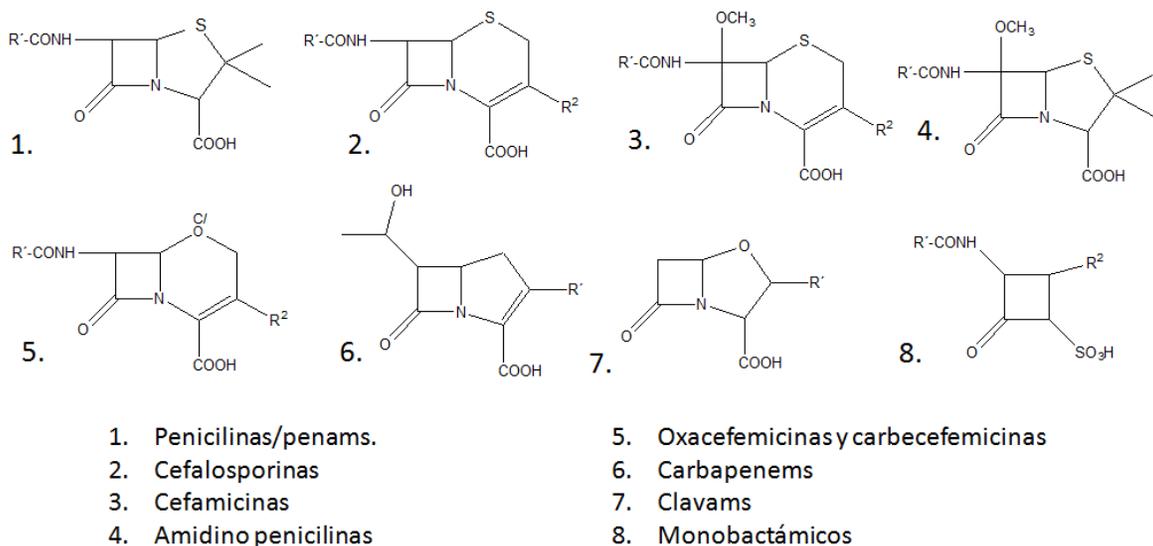


Fig. 1. Estructura de antibióticos de tipo β -lactámico.

Como muchos otros metabolitos secundarios, los antibióticos β -lactámicos poseen estructuras químicas inusuales, muy diferentes a los clásicos metabolitos primarios. Por ejemplo, la estructura de la penicilina consiste en un núcleo penam formado de un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, este último, contiene un átomo de azufre y una cadena lateral acilo, unidos a un grupo amino presente en el C-6. Esta estructura bicíclica es producida por algunas especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, así como por algunos ascomicetos. Otro compuesto con estructura β -lactámica de gran importancia, la cefalosporina C, es producida por *Acremonium chrysogenum* y fue descubierto en 1955 (Newton y Abraham, 1955). En esta molécula el anillo tiazolidina de las penicilinas es reemplazado por un anillo dihidrotiazina, formando un núcleo cefem. Ambos compuestos, penicilina y cefalosporina C, son de gran interés como inhibidores de la biosíntesis de peptidoglicano en bacterias. Sin embargo, durante las últimas tres décadas, un gran número de compuestos de la misma familia ha sido descubierto usando nuevas técnicas de detección y aislamiento. Algunos de estos nuevos compuestos son cefalosporinas modificadas, como la familia de las cefamicinas, la cual además de contener el anillo cefem contiene una cadena lateral de α -aminoadipilo y un grupo metoxilo en el C-7. El grupo metoxilo en su estructura hace que este compuesto sea insensible a muchas β -lactamasas. Todos los antibióticos antes mencionados, ya sean producidos por hongos filamentosos o por bacterias, tienen un modo de acción común, precursores similares y comparten parcialmente las mismas vías de biosíntesis (Aharonowitz y col., 1992).

Otros compuestos β -lactámicos, muchos sin la estructura convencional, han sido descubiertos y caracterizados desde 1970. Algunos de ellos, incluyendo los carbapenémicos y nocardicinas, también inhiben la biosíntesis de peptidoglicano. Otros, como el ácido clavulánico, funcionan como potentes inhibidores de β -lactamasas, o tienen actividad anti fúngica, como algunos antibióticos clavam. Estos β -lactámicos no convencionales, además de contener un anillo β -lactámico, poseen usualmente también una estructura bicíclica diferente: por ejemplo, el segundo anillo en la molécula del ácido clavulánico posee un oxígeno en lugar del azufre característico en la penicilina. Los antibióticos carbapenémicos y la familia del ácido olivánico poseen un anillo carbapenémico que contiene un átomo de carbono en lugar del de azufre. También existen muchos otros compuestos que sólo poseen una estructura monocíclica, es decir, contienen el anillo β -lactámico y diferentes cadenas laterales. Estos compuestos son conocidos como

monobactámicos, y algunos de ellos (como es el caso de la nocardicina), son producidos por actinomicetos, pero otros, como el sulfacezin, son producidos por proteobacterias (Liras y Martín, 2006).

1.1.1. Mecanismo de acción.

Los antibióticos β -lactámicos interfieren con la etapa final de la síntesis de la pared celular, inhibiendo las enzimas bacterianas transpeptidasas y carboxipeptidasas que catalizan las reacciones de síntesis de peptidoglicano. Estas enzimas, comúnmente llamadas PBP (proteína de unión a la penicilina, *Penicillin Binding Protein*), se entrecruzan con el peptidoglicano, el cual es un componente esencial de la pared celular bacteriana y protege al organismo de la ruptura osmótica, determina la forma celular, y participa en el crecimiento y división celular (Essack, 2001).

La última fase en la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de tetrapéptidos a partir de pentapéptidos, para lo que es necesaria la acción de enzimas transpeptidasas. El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere, ya que es incapaz de soportar la presión osmótica (Suárez y Guidol, 2009).

1.2. Resistencia a antibióticos β -lactámicos.

La eficacia de los antibióticos β -lactámicos es dependiente de su accesibilidad a los sitios blanco, el grado de resistencia a la inactivación enzimática por β -lactamasas y de la capacidad del antibiótico para inhibir el blanco PBPs. Alterar uno o varios de estos parámetros puede traducirse en un fenómeno de resistencia, la cual es común en bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas (Bellido y col., 1991; Cordiés y col., 1998; Poole, 2004).

Existen cuatro mecanismos principales por los cuales las bacterias pueden vencer la acción de los antibióticos β -lactámicos (Babic, 2006; Drawz, 2010):

- Cambios en el sitio activo de las PBPs, los cuales pueden disminuir la afinidad a los antibióticos β -lactámicos y subsecuentemente aumentar la resistencia a estos agentes. Esto se observa en *Streptococcus pneumoniae* en el caso la PBP2x. A través de la transformación natural y la recombinación con el ADN de otros organismos, varias especies de *Neisseria* y *Streptococcus spp.* han adquirido gran resistencia y baja afinidad de sus PBP por el antibiótico. El fenotipo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos puede ser también conferido por la adquisición del gen *mecA*, que produce la PBP2a (también denominada PBP2); esta proteína puede ensamblar una nueva pared celular en presencia de altas concentraciones de penicilinas y cefalosporinas.
- La disminución de la expresión de proteínas de la membrana externa es otro mecanismo de resistencia. Para poder acceder a las PBPs en la membrana plasmática interior, los antibióticos β -lactámicos deben difundir o, directamente, atravesar canales (como porinas) en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.
- Presencia de bombas de flujo, las cuales son capaces de exportar una amplia gama de sustratos del espacio periplasmático al medio ambiente. Estas bombas son un determinante importante de resistencia múltiple de patógenos Gram-negativos, especialmente *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*
- Producción de enzimas β -lactamasas, el mecanismo de resistencia más común e importante en las bacterias Gram-negativas.

1.2.1. Inhibición enzimática de antibióticos.

La causa más simple de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos o β -lactamasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace amídico (previa unión al grupo carboxilo) en el anillo β -lactámico de cefalosporinas y penicilinas, lo que produce la inactivación del antibiótico antes de su unión con las PBP, al formarse un compuesto no funcional (por ejemplo en el caso de la penicilina, el ácido

peniciloico). La producción de β -lactamasas se presenta especialmente en bacterias Gram negativas (Essack, 2001; Lee y col., 2002) (Fig. 2).

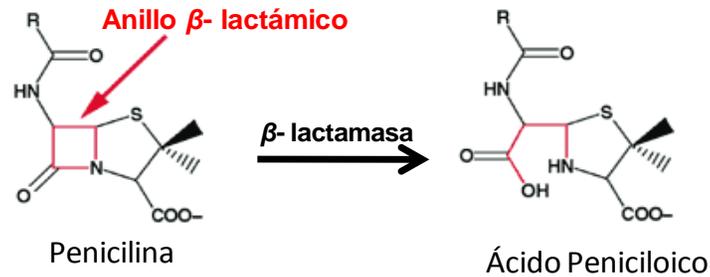


Fig. 2. Efecto de las β -lactamasas sobre la penicilina. La β -lactamasa rompe un enlace en el anillo β -lactámico de la penicilina que desactiva la molécula. Las bacterias capaces de producir estas enzimas pueden resistir los efectos de la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos.

Se han documentado más de 250 β -lactamasas, la primera fue reportada en *Escherichia coli* por Abraham y Chain (1940). Estas enzimas se encuentran en muchas bacterias Gram negativas, positivas y micobacterias; son codificadas de manera variada, ya sea en plásmidos (en este caso pueden ser transferibles) o cromosómicamente, y frecuentemente están asociadas con elementos genéticos móviles como los transposones e integrones. En el caso de las enzimas codificadas en plásmidos, los inhibidores de β -lactamasas suelen inactivarlas, como ocurre con las producidas por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y algunas enterobacterias y anaerobios, como *Bacteroides fragilis* (Lowy, 2003; Tristram y col., 2007). En el caso de los microorganismos con β -lactamasas de origen cromosómico (*Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.* y *Serratia spp.*), estas enzimas son a menudo inducibles, aumentando su producción tras la exposición a los antibióticos β -lactámicos (especialmente cefalosporinas) y no son sustrato para los inhibidores de las β -lactamasas. El uso de los antibióticos durante décadas ha favorecido la evolución de estas enzimas hacia una nueva generación, las llamadas BLEE (β -lactamasas de espectro extendido, o por sus siglas en inglés ESBL, *Extended Spectrum β -lactamase*), que son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación y el monobactámico aztreonam (Suárez y Guidol, 2009).

Los factores que influyen en este mecanismo de inhibición son: la cantidad de β -lactamasa producida, la afinidad de la enzima por el antibiótico, la velocidad de hidrólisis del antibiótico y

la localización de la β -lactamasa. Las β -lactamasas de organismos Gram positivos son enzimas extracelulares, mientras que en organismos Gram negativos se encuentran localizadas en el espacio periplasmático, entre la membrana citoplasmática y el exterior, donde intentan mantener la concentración local de antibiótico por debajo del umbral bactericida (Poole, 2004).

Se conocen cuatro clases moleculares de β -lactamasas, denominadas A-D y divididas en dos grupos: enzimas dependientes de metales (requieren Zn^{2+} ; Clase B) y enzimas independientes de metales (su sitio activo es la serina; clase A, C y D) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación y propiedades de β -lactamasas (Poole, 2004).

Clasificación	Tipo de Enzima	Sustratos de preferencia:	Inhibido por:		Enzimas representativas
			AC	EDTA	
A	Penicilinasas.	Penicilina.	+	-	Penicilinasas de bacterias Gram- positivas.
	β - lactamasa de espectro restringido.	Penicilina y cefalosporina.	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1.
	β - lactamasa de espectro extendido.	Penicilina, cefalosporinas y monobactámicos.	+	-	Numerosas SHV y variantes TEM, CTX-M-1 a28, PER-1 y 2, VEB-1, GES-1, IBC-1, diversas enzimas de bacterias Gram negativas.
	β - lactamasa resistente a inhibidores.	Penicilinas y cefalosporinas.	-	-	TEM-30 a 41, 44, 45, 51, 54.
	β - lactamasa de espectro extendido resistente a inhibidores.	Penicilinas y cefalosporinas.	-	-	TEM-50, 68, 80.
	Carbapenemasas	Penicilinas, cefalosporinas, carbapénemicos, monobactámicos; algunos β -lactámicos de espectro extendido.	+	-	NMC-A, SME-1 a 3, IMI-1, KPC-1 a 3, GES-2, SVH-38.
B	Carbapenemasas	Antibióticos β -lactámicos de espectro extendido, carbapénemicos y cefalosporinas de cuarta generación.	-	+	IMP1-13, VIM-1-7, SPM-1, diversas enzimas de bacterias Gram-negativas.
C	Cefalosporinasas de espectro extendido	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y monobactámicos.	-	-	CMY-2 a 13, LAT-1, MOX-1 y 2, FOX-1 a 6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 y 2, ACC-1, CFE-1 y diversas enzimas de bacterias Gram-negativas.
D	Penicilasas de bajo espectro	Penicilinas, cloxacilina.	\pm	-	Numerosas variantes de OXA.
	β - lactamasa de espectro extendido.	Antibióticos β -lactámicos de espectro extendido, cloxacilina, penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de cuarta generación.	\pm	-	Derivados de OXA-2 y 10, OXA-18, 29, 30, 31, 32, 45.
	Carbapenemasa	Penicilina, oxacilina, carbapénemicos.	+	-	OXA-23 a 27, 40, 48, 54.

1.3. Inhibidores de β -lactamasas.

Los inhibidores de las β -lactamasas (IBL) son compuestos farmacológicos con poca actividad antimicrobiana intrínseca, sin embargo su función principal (como su nombre lo indica) es la de inhibir la actividad de un gran número de β -lactamasas. Por ello, en combinación con los antibióticos β -lactámicos, restauran la propiedad antimicrobiana que han perdido debido a la presencia de estas enzimas. Los dos mayores grupos de inhibidores de importancia clínica son el ácido clavulánico y las sulfonas de ácido penicilánico, sulbactama y tazobactama (Fig. 3) (Essack, 2001; Suárez y Guidol, 2009).

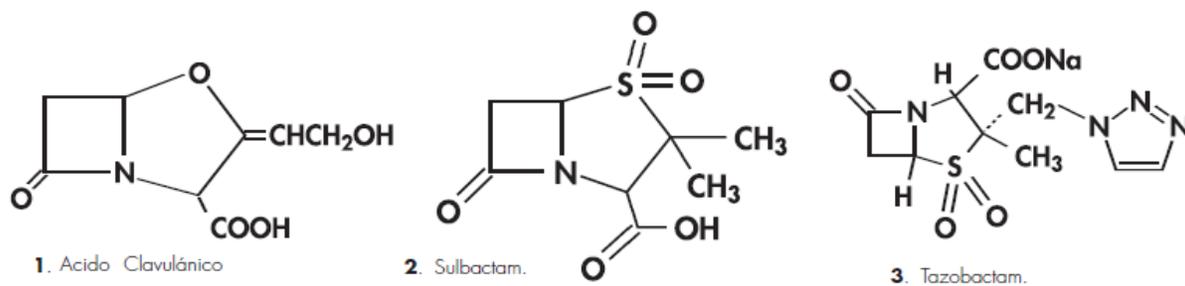


Fig. 3 Estructura química de inhibidores de β -lactamasas: (1) ácido clavulánico, (2) sulbactama y (3) tazobactama (Bush, 1988).

Las combinaciones de antibióticos más conocidas y utilizadas actualmente son: ampicilina-sulbactama, amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina-ácido clavulánico, amoxicilina-sulbactama y piperacilina-tazobactama. Todos los inhibidores tienen estructura β -lactámica, similar a la de los antibióticos con los que actúan, como se puede observar en las figuras 1 y 3. Ejercen su función principalmente por dos mecanismos: ligándose de manera irreversible, por su alta afinidad, con el sitio catalítico de las β -lactamasas, previniendo de esta manera la hidrólisis de las penicilinas (por esta razón se les denominó en un principio "antibióticos suicidas") y mediante la fijación directa a las PBP bacterianas, lo cual incrementa la actividad antibacteriana de la penicilina.

1.3.1. Sulbactama.

Es una sulfona de ácido penicilánico, posee débil poder antibacterial y es relativamente activa contra *Neisseria gonorrhoea* y muchos aislados de *Acinetobacter spp.* y *Bacteroides spp.* La

sulbactama inhibe las BLEEs y las penicilinasas, sin embargo es menos eficiente que el ácido clavulánico. Su poder inhibitorio de la TEM-1 es débil, particularmente si la β -lactamasa es sobreproducida. La sulbactama ha sido reportada como un inductor pobre de muchas cefalosporinasas, con excepción de las producidas en particular por *Proteus vulgaris* (Essack, 2001).

1.3.2. Tazobactama.

La tazobactama es también una sulfona de ácido penicilánico. Es un inhibidor irreversible de β -lactamasas y tiene actividad contra algunas cefalosporinasas codificadas cromosómicamente, como las producidas por *Providencia stuartii*. La tazobactama posee la misma potencia de acción que el ácido clavulánico, sin embargo su viabilidad contra SHV, derivado de BLEE, es controversial. Estudios como los de Bauernfeind (1990) reportan que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y sus transconjugantes que expresan SHV-2, 3, 4 y 5, son típicamente resistentes a la inhibición por tazobactama, mientras que Livermore (1995) reportó que existe una buena susceptibilidad de estas cepas a la combinación tazobactama-piperaciclina (Essack, 2001).

1.3.3. Brobactama.

La bromobactama, o ácido 6- β -bromopenicilánico, es un eficiente inhibidor de β -lactamasas producidas por bacterias Gram- positivas y Gram- negativas. Inhibe potencialmente a muchas enzimas codificadas por plásmidos, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las enzimas tipo OXA son también susceptibles a la inhibición por brobactama, como es el caso de las producidas por *Klebsiella aerogenes* y de las cefalosporinasas de *P. vulgaris* y *Proteus rettgeri* (Essack, 2001).

1.3.4. Ácido clavulánico.

El ácido clavulánico (AC) es un compuesto β -lactámico, por sí solo posee actividad antibacterial débil siendo sus valores de concentración mínima inhibitoria de 25-125 $\mu\text{g/mL}$. Su función principal, sin embargo, es actuar como un potente inhibidor de β -lactamasas de clase A, incluyendo penicilinasas de estafilococos, cefalosporinasas, β -lactamasas de amplio espectro (BLEE), muchas β -lactamasas codificadas en plásmidos de bacilos Gram-negativos (TEM-1), y algunas codificadas cromosómicamente en *Bacteroides fragilis*, *P. vulgaris* y *Citrobacter*

diversus; también posee una ligera actividad contra β -lactamasas de tipo C (Essack, 2001; Lee y col., 2002).

El AC posee la capacidad de penetrar en las paredes celulares bacterianas y ahí inactivar tanto β -lactamasas intracelulares como extracelulares (sin embargo, tiene mayor poder inhibitorio contra enzimas libres celulares). Este mecanismo de acción varía con la β -lactamasa inhibida, pero generalmente actúa como un inhibidor competitivo y frecuentemente irreversible (Essack, 2001).

El AC es clasificado como un metabolito clavam, caracterizado por su núcleo bicíclico. Este compuesto es un análogo de la estructura básica de la penicilina, aunque a diferencia de ésta la molécula de AC posee un átomo de oxígeno en lugar de azufre, un grupo acilamino se encuentra ausente en el C-6 y una *exo*- β -hidroxietilidina está unida al C-2, dando como resultado un compuesto que inactiva irreversiblemente a las β -lactamasas, en lugar de ser cortado por la enzima (Baggaley y col., 1997; Saudagar y col., 2008) (Fig. 2).

La actividad del ácido clavulánico difiere de la de los otros metabolitos clavam, a pesar de su estructura similar, debido a que estas poseen estereoquímica 3S, 5S y sólo muestran actividad antifúngica y antibacteriana, el ácido clavulánico tiene una estereoquímica 3R, 5R que le da su actividad inhibitoria de β -lactamasas, aunque pobre actividad antibacteriana (Song y col., 2010).

El ácido clavulánico fue identificado por primera vez en *S. clavuligerus* y después en *Streptomyces jumonjinesis* y *Streptomyces katsurahamanus*. Diversas especies de *Streptomyces* han sido identificadas como productoras de otros metabolitos clavam estructuralmente similares al AC, como el ácido clavamínico, el 2- hidroxietilclavam, la valclavama y las clavamicinas; se ha observado que las especies de *Streptomyces* que producen AC también producen antibióticos β -lactámicos, pero las que producen otros metabolitos clavam no lo hacen (Jensen y Paradkar, 1999).

1.3.4.1. *Streptomyces clavuligerus*.

Los *Streptomyces* son bacterias filamentosas Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina en su genoma, están presentes principalmente en muestras de suelo. Son importantes

desde el punto de vista comercial, debido a que producen más del 60 % de los antibióticos conocidos; por ello han sido objeto de numerosos estudios con el objetivo de mejorar su productividad (Rodríguez y col., 2005).

El estilo de vida del género *Streptomyces* es muy similar al de los hongos filamentosos: ambos crecen como hifas ramificadas que forman micelio vegetativo y se dispersan a través de esporas; estas similitudes son el resultado de adaptaciones a nichos ecológicos similares, aunque tienen diferente origen evolutivo. Al igual que los hongos, muchos *Streptomyces* viven como organismos saprofitos en el suelo, poblando exitosamente una amplia gama de nichos tanto terrestres como acuáticos. Sin embargo, algunas cepas son patógenas para plantas y animales (Flärdh y Buttner, 2009).

El desarrollo de *Streptomyces* comienza cuando una espora encuentra condiciones favorables y nutrientes, germina con la emisión de uno o dos tubos germinales, que crecen y forman una hifa. Estos tubos germinales se desarrollan y ramifican para formar micelio vegetativo. En respuesta a la carencia de nutrientes y otras señales, tanto la producción de metabolitos secundarios como la diferenciación morfológica se inician. Las hifas aéreas rompen la tensión superficial y escapan del medio acuoso y del micelio vegetativo, creciendo en el aire. Las hifas aéreas comienzan posteriormente a dividirse de manera controlada, formando largas cadenas de compartimentos llamados pre-esporas, que después se desarrollan, formando esporas pigmentadas grises y adquiriendo otras características de las esporas maduras (Flärdh y Buttner, 2009).

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 (NRRL 3585, DSM 738) descrito por primera vez por Higgins y Kastner en 1971, fue aislado de una muestra del suelo de Sudamérica. Su nombre se refiere a la forma en la que se encuentran sus esporas: *clavula* del latín que significa “pequeño trébol” y el sufijo *-igerus* significa “producción”, sus esporas son de color grisáceo a verde grisáceo (Higgins y Kastner, 1971).

Streptomyces clavuligerus produce alrededor de 20 metabolitos secundarios, incluyendo compuestos β -lactámicos de gran importancia industrial, como el ácido clavulánico, y antibióticos como la cefamicina C (CM), desacetoxicefalosporina C y penicilina N, así como una

gran diversidad de compuestos con estructura clavam y metabolitos no β -lactámicos como la holomicina (Liras y col., 2008).

1.3.4.2. Biosíntesis de ácido clavulánico.

La vía de biosíntesis de AC es parcialmente conocida, se sabe que procede de los precursores L-arginina y 3-fosfogliceraldehido. La biosíntesis comienza con una reacción de condensación de estos dos compuestos, formándose N²-(2-carboxietil)-arginina (CEA), reacción catalizada por la enzima carboxietilarginina sintasa (CEAS), el gen *ceas* se encuentra localizado junto a los genes involucrados en la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas y en el extremo final del *cluster* biosintético de AC. La síntesis del anillo β -lactámico de CEA es catalizado por una β -lactámico sintetasa, enzima codificada por el gen *bls*, convirtiendo CEA en ácido deoxiguanidino proclavamínico. Este paso es completamente distinto de la reacción que genera el anillo β -lactámico de cefamicinas y penicilinas, que involucra la ciclación de un tripéptido no ribosomal δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina por una proteína simple (la isopenicilin N sintasa); en contraste, la reacción catalítica de Bls se da por la adenilación de la N²-(2-carboxietil)-arginina β -carboxilato seguida de la ciclación de un oxoanión en presencia de ATP y Mg²⁺. Dos enzimas actúan después de Bls: clavaminato sintasa (CAS) y proclavaminato amidinohidrolasa (PAH). *S. clavuligerus* posee dos isoenzimas CAS (CAS1 y CAS2), codificadas por los genes *cas1* y *cas2* respectivamente, CAS2 cataliza la hidroxilación del ácido deoxiguanidino proclavamínico a ácido guanidino proclavamínico y la ciclación del ácido proclavamínico a ácido clavamínico. PAH, enzima codificada por el gen *pah.*, hidroliza el residuo del ácido guanidinoproclavamínico a la forma de ácido proclavamínico, removiendo el grupo guanidino derivado de la arginina. La enzima N-glicil clavamínico sintetasa (GCAS) ha sido identificada como una proteína codificada por *orf17*, gen localizado cerca del *cluster* de genes que codifican para las enzimas de los primeros pasos de la biosíntesis de AC, esta enzima ha mostrado ser importante en la biosíntesis de AC debido a que en la mutante deficiente del gen *gcas* el AC es indetectable (Jensen y col., 2004). GCAS cataliza la conversión de ácido clavamínico a ácido N-glicil clavamínico, este compuesto es específico de la ruta de biosíntesis de AC y no se presenta en otros metabolitos clavam. Una doble epimerización y una reacción de desaminación oxidativa son los pasos siguientes a GCAS, dando como producto clavaldehido. Por último, la enzima clavulanato-9-

aldehído reductasa (CAR) se cree que probablemente participa en la conversión directa de clavaldehído (3*R*, 5*R*- clavulanato-9-aldehído) a AC y es codificada por el gen *car* (también nombrado *cad*, por ácido clavulánico deshidrogenasa) (Mellado y col., 2002; Song y col., 2010). La ruta de biosíntesis del ácido clavulánico se muestra en la fig. 4.

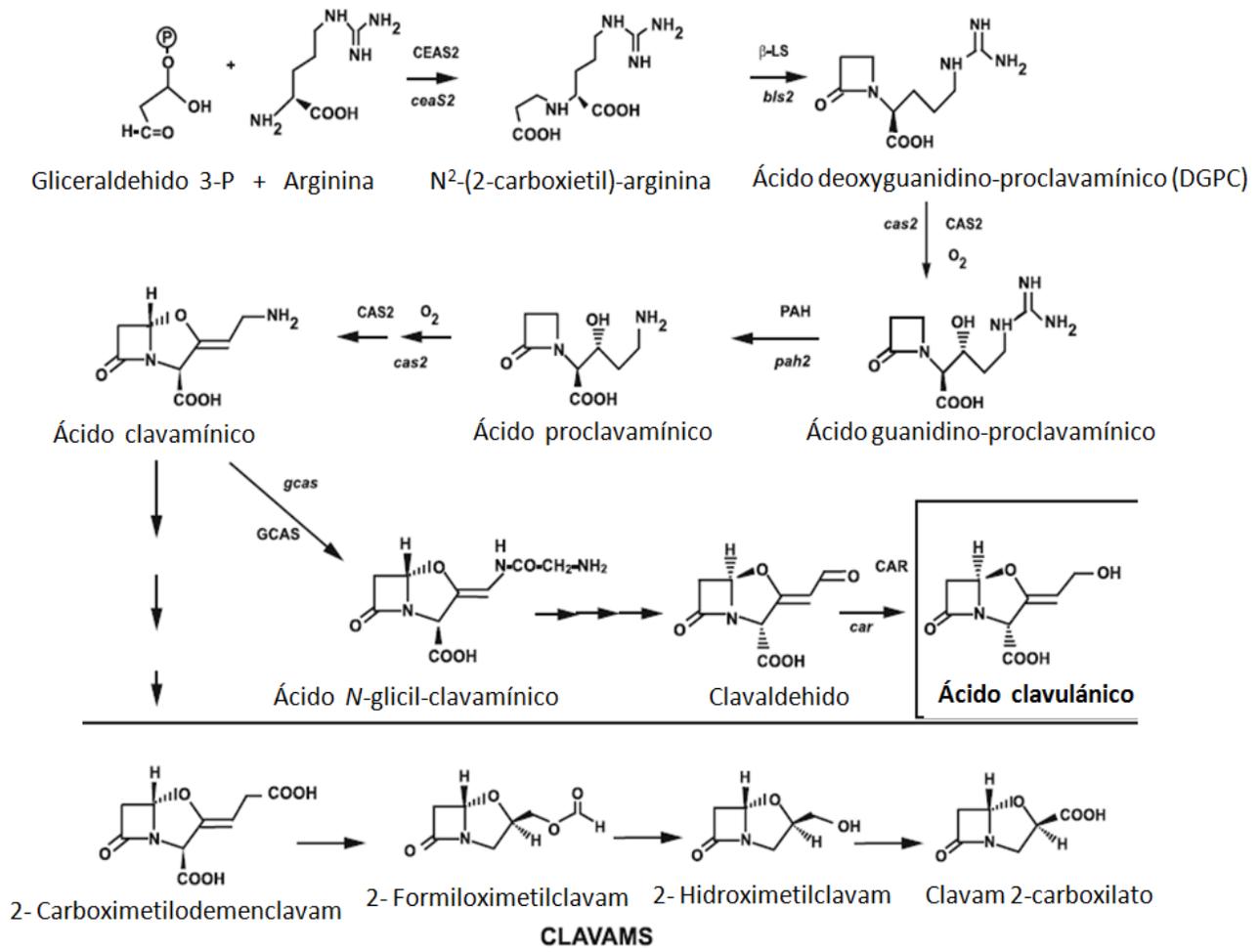


Fig. 4. Ruta de biosíntesis de ácido clavulánico y compuestos clavam (Liras y col., 2008).

1.3.4.3. Cluster de genes biosintéticos de ácido clavulánico.

La producción de cefamicina C (CM) en *S. clavuligerus* ocurre en paralelo con la del ácido clavulánico. Los genes biosintéticos de ambos compuestos se encuentran adyacentes en el genoma, formando un *cluster* de alrededor de 60 kb. El *cluster* de cefamicina C contiene enzimas biosintéticas codificadas por genes como *pcbAB*, *pcbC*, *cefD*, *cefE*, *cefF*, *cmcI*, *cmcJ*, *cmcH*,

genes de la biosíntesis de precursores α -aminoadípicos (como *lat* y *pcd*), y genes para la resistencia a antibióticos β -lactámicos, como *bla*, *pcbR* y *pbp74* (Liras y col., 2008).

Un total de 11 genes involucrados en la biosíntesis de AC se han localizado inmediatamente en la región contigua al *cluster* de biosíntesis de cefamicina C. Además de los cinco genes antes mencionados (*ceaS*, *bls*, *cas2*, *pah* y *car*) se han encontrado otros que también participan en la biosíntesis, como ORF6, ORF7, *claR*, *cyp*, *fd* y ORF12 (Fig. 5). De estos, ORF6 y ORF7 codifican respectivamente para una posible ornitina aciltransferasa y una proteína implicada en el transporte de péptidos. El gen *claR* codifica para una proteína reguladora similar a los activadores transcripcionales de la familia LysR, proteína que está involucrada en la regulación de los últimos pasos de la biosíntesis. Mientras, los genes *cyp* (codifica un citocromo P450) y *fd* (codifica una ferredoxina) pueden estar involucrados en la última reacción oxidativa de la vía (Mellado y col., 2002).

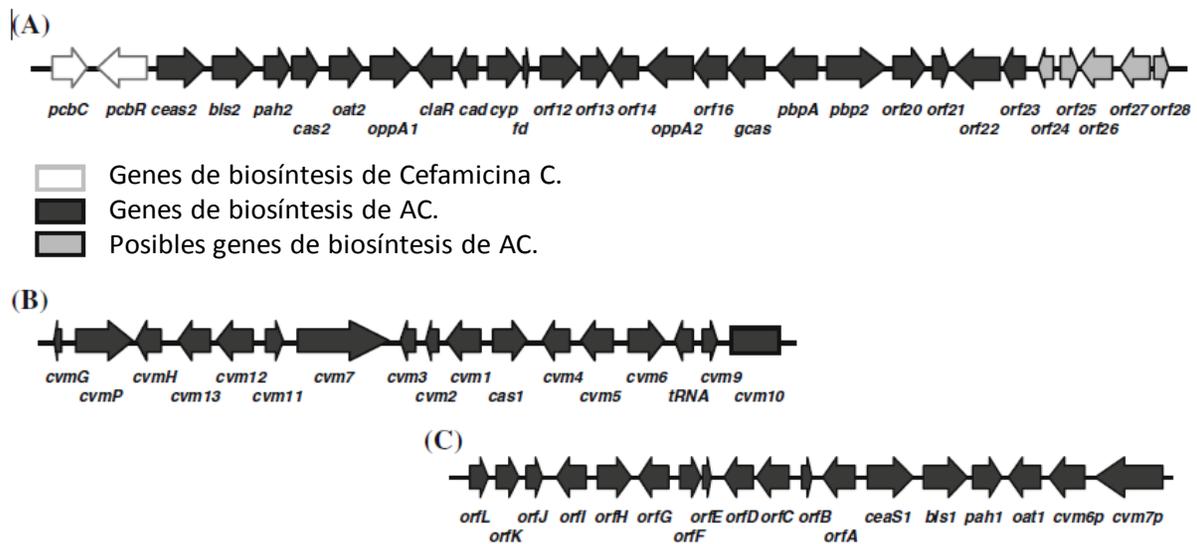


Fig. 5. Clusters biosintéticos de A) ácido clavulánico B) compuestos clavam y C) genes parálogos en *S. clavuligerus*. (Song, 2010).

1.3.4.4. Producción fermentativa de ácido clavulánico.

Los procedimientos clásicos de fermentación para la producción de metabolitos secundarios están subdivididos en tres fases:

- Primero, el desarrollo del inóculo.
- La segunda fase, en la cual el antibiótico es sintetizado.

- Y por último, recuperar el producto sintetizado.

Para el desarrollo del inóculo es necesario tomar en cuenta que el microorganismo debe estar en forma activa, con el fin de minimizar la fase *lag* en la subsecuente fermentación, y en proporción adecuada (entre el 3 y 10 % del volumen del medio), así como estar libre de contaminación (Saudagar y col., 2008).

Streptomyces clavuligerus, como la mayoría de los *Streptomyces* y hongos de importancia industrial, es capaz de reproducirse asexualmente por medio de esporas, es por ello que es común utilizar una suspensión de esporas para el desarrollo del inóculo primario. El mayor problema de usar como inóculo biomasa en crecimiento vegetativo es la dificultad para obtener un precultivo uniforme, debido a la diferenciación morfológica asociada con el crecimiento de este tipo de microorganismos (Saudagar, 2008).

Sánchez y Braña (1996) demostraron que la densidad celular influencia la síntesis de antibiótico en *S. clavuligerus*: la biosíntesis es activada rápidamente después de la germinación de las esporas al aplicar una alta densidad de inóculo.

Como se mencionó anteriormente, *S. clavuligerus* puede producir una gran variedad de metabolitos secundarios diferentes, y cambios en los nutrientes y su concentración tienen diversos efectos en la acumulación de estos metabolitos, controlados por efectores intracelulares (Saudagar, 2008). Con base en esto se ha determinado que la mejor fuente de carbono para la producción de AC es el glicerol. En ausencia de este compuesto no se produce AC, pero se produce cefamicina C (Saudagar y Singhal, 2007). Se ha demostrado que el glicerol es un compuesto incorporado en el anillo β -lactámico del AC, lo que indica que el esqueleto de carbono del anillo β -lactámico es un derivado del glicerol y no de algún arreglo molecular de otros intermediarios de tres carbonos (Elson y Oliver, 1978).

Sin embargo, la fuente preferente de carbono para la producción de AC por *S. clavuligerus* son los lípidos. Los carbohidratos son simplemente fuentes de energía empleadas para el crecimiento. El rápido catabolismo de la glucosa y otros carbohidratos se ha visto reflejado en una disminución en la velocidad de biosíntesis de antibióticos. Revilla y col. (1984) reportaron que

catabolitos de carbono pueden inhibir la producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* y la síntesis de cefamicina C en *S. clavuligerus*. La adición de aceite al medio de crecimiento es preferida como fuente básica de energía, debido a que es capaz de producirse mayor ATP que utilizando glucosa; la desventaja de esto es la alta concentración de aceite residual y el aumento en la viscosidad del medio, lo que dificulta la transferencia de oxígeno al microorganismo (Saudagar y col., 2008).

El medio de cultivo para *S. clavuligerus* puede contener de 0.1 a 10% (p/v) de fuente de nitrógeno, como extracto de levadura, proteína vegetal o hidrolizados de proteínas. Las proteínas de soya han mostrado ser uno de los más importantes nutrientes en la producción de AC. Gouveia y col. (1999) demostraron que incrementar la concentración total de nitrógeno provoca una larga producción de AC, independientemente del sustrato empleado en el medio de cultivo.

Otro factor importante en la producción es la concentración de fosfato. Se ha observado que éste es un nutriente limitante que regula la síntesis de antibióticos, ya que concentraciones de fosfato de 0.3-300 mM permiten un amplio crecimiento del microorganismo y, sin embargo, concentraciones de 10 mM o superiores suprimen la síntesis de antibióticos (Martín, 1976; Saudagar y col., 2008). En cuanto al AC, Aharonowitz y Demain (1978) reportaron que su producción disminuye en un 80% con concentraciones de fosfato en el medio de fermentación mayores o iguales a 100 mM.

Aminoácidos como la ornitina y la arginina son utilizados preferentemente sobre otras opciones para la producción de AC, el anillo oxazolidin del AC es derivado directamente de aminoácidos del ciclo de la urea. Los precursores primarios de la biosíntesis de AC son intermediarios de C3 y C5, es bien sabido que son derivados del glicerol y arginina/ornitina respectivamente (Baños y col., 2009) (Fig. 6).

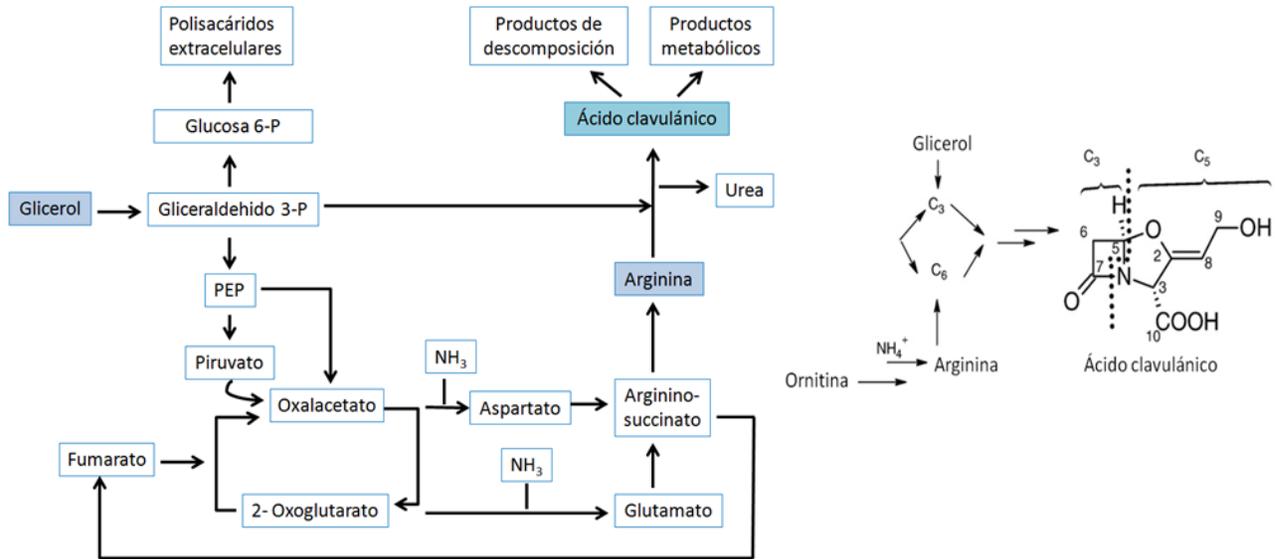


Fig. 6. Conexión del metabolismo del glicerol y arginina/ornitina en la biosíntesis de ácido clavulánico (Valentine y col., 1993).

Como ya se mencionó, la biosíntesis de AC comienza con la condensación de arginina y un intermediario glicolítico de tres carbonos, siguiendo una serie de reacciones hasta formar el ácido clavulámico y posteriormente el AC. Sin embargo, los precursores de tres carbonos parecen ser los factores limitantes en la velocidad de síntesis de AC: con un exceso de arginina no se incrementa la producción (Valentine y col., 1993).

2. ANTECEDENTES.

2.1. Mejoramiento genético de cepas para la producción de AC.

Inicialmente, los estudios sobre la producción de AC se basaron en identificar y localizar los genes involucrados en la producción de AC y deducir la vía específica de biosíntesis. Posteriormente, se han dirigido a la manipulación genética para el mejoramiento de cepas productoras (Song y col., 2010), siendo ésta una parte esencial en el desarrollo de productos de fermentación microbiana, debido a que:

- Permite la reducción de costos por el desarrollo de cepas con productividad incrementada.
- Confiere la capacidad para usar materias primas de bajo costo.
- Confiere características especiales deseables, como mejorar las propiedades de filtración.
- Confiere la capacidad para producir bajo ciertas condiciones de temperatura o disponibilidad de oxígeno.

La aplicación de técnicas moleculares avanzadas en *Streptomyces* se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, trayendo consigo un mejor conocimiento, control y manipulación. Las estrategias de mejoramiento para la producción de metabolitos secundarios se han basado en duplicar o amplificar los genes biosintéticos, inactivar vías metabólicas competitivas o la expresión de enzimas heterólogas, así como la interrupción o silenciamiento de genes reguladores negativos y la sobreexpresión de genes reguladores positivos (Saudagar, 2008).

Sin embargo una limitante importante para estos procesos es que los *Streptomyces* poseen un potente sistema de restricción, lo que se convierte en una barrera para la introducción de ADN procedente de otras fuentes. Además, el alto contenido de guanina y citosina en su material genético dificulta su manipulación (Rodríguez y col., 2005).

En *S. clavuligerus*, la producción industrial de AC se lleva a cabo por fermentación a gran escala. Las cepas capaces de soportar altos niveles de producción de AC, derivadas de la cepa silvestre, han sido analizadas bioquímicamente y se ha observado que aún tienen la capacidad genética de producir cefamicina C y antibióticos con estructura clavam, productos indeseables en la producción de AC; por lo que ha sido de gran interés determinar si la eliminación de las vía de

biosíntesis de cefamicina C y clavamas podría tener efectos benéficos en la productividad de AC en cepas sobreproductoras (Saudagar y col., 2008).

En el caso de la manipulación de los genes biosintéticos, la amplificación del regulador transcripcional CCaR en *S. clavuligerus* resultó en la sobreproducción de AC, así como de efamicina C (tres veces más que en la cepa silvestre), mientras que su inactivación ocasionó la acumulación de ácido clavamínico (Pérez-Llarena y col., 1997).

Por otro lado, Pérez-Redondo y col. (1999) realizaron la sobreexpresión de los genes *ces1* y *ces2* en cepas recombinantes de *S. clavuligerus*, lo cual resultó en aumento de la producción de AC del 60% y 100%, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre. Townsend y col. (2001) lograron aumentar la producción de AC insertando el gen *orf2* en *S. clavuligerus* y manipulando la concentración de gliceraldehído 3-fosfato, un sustrato de la *N*-(2-carboxietil) arginina sintasa, proteína codificada por *orf2*.

Estudios como el de Li y Townsend (2006) demostraron que existe una relación en el aumento de la producción de AC y la manipulación genética de la vía glicolítica de *S. clavuligerus*. Un ejemplo de ello es que la interrupción del gen *gap1* en *S. clavuligerus* provoca un aumento al doble en la producción de AC cuando en el medio de cultivo se adiciona arginina, sugiriendo que este aminoácido puede ser limitante para la biosíntesis.

Recientemente, el proyecto de secuenciación del genoma de *Streptomyces clavuligerus* 27064, fue publicado, la información obtenida debe proporcionar nuevas perspectivas sobre los mecanismos utilizados por este microorganismo para producir su amplia gama de metabolitos y es probable que proporcione información adicional sobre capacidades metabólicas aún no reconocidas, lo cual será de gran ayuda para la manipulación genética del organismo y facilitar el desarrollo de *S. clavuligerus* como una "fábrica" de antibióticos para la producción de metabolitos valiosos (Song y col., 2010); por ejemplo, uno de los datos importantes que mostró fue la presencia de *clusters* biosintéticos de varios metabolitos secundarios, muchos más de los encontrados en cualquier otro genoma de *Streptomyces* (Medema y col., 2010).

2.2. Regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces sp.*

Los genes reguladores de la biosíntesis de antibióticos se encuentran generalmente localizados dentro del *cluster* biosintético, junto con los genes de producción, secreción y resistencia al antibiótico. Otros, sin embargo, son reguladores pleiotrópicos globales que controlan diversas vías metabólicas y pueden no estar ligados a genes específicos del *cluster* biosintético. Estos reguladores globales responden a una amplia variedad de señales de estrés nutricional y ambiental, por ejemplo carencia de fosfato o nitrógeno, presencia de quitina o N-acetilglucosamina en el medio, daño en la pared celular, cambios en la temperatura o pH, entre otros (Bibb, 2005; Martín y Liras, 2010). Estos reguladores globales tienen una gran influencia en la fase estacionaria del crecimiento de *Streptomyces sp.*, ya que en esta etapa es donde se presenta la producción de metabolitos secundarios y la diferenciación morfológica, que proporcionan al microorganismo la capacidad para responder y adaptarse a cambios en el medio ambiente, especialmente a la limitación de nutrientes (Lee y col., 2004; Nieselt y col., 2010).

La modulación de cambios ambientales también requiere de sensores que detecten señales químicas y/o físicas y de reguladores que lleven a cabo cambios en los niveles de expresión génica, ya sea inhibiendo o promoviendo la producción de determinadas proteínas (Mitrophanov y col., 2008). Como consecuencia de ello, *Streptomyces sp.* posee una enorme capacidad de regulación, evidencia de ello es que un total de 965 (12.3%) proteínas codificadas en el genoma de *S. coelicolor* tienen función reguladora, incluyendo la existencia de más de 60 factores sigma (Fernández y col., 2009; Song y col., 2009).

Algunos genes que codifican para factores σ alternativos, pertenecientes a la familia *sigB*, están involucrados en la osmodetección y diferenciación. Se cree que estos factores coordinan la expresión de una red de regulones del desarrollo; por ejemplo la osmoadaptación, la cual es crítica para la diferenciación de *Streptomyces*, ya que al producirse presión de turgencia se favorece la formación de hifas aéreas. (Cho y col., 2001).

Durante muchos años se ha propuesto que la expresión de genes biosintéticos de antibióticos (y otros metabolitos bioactivos) se controla a través de cascadas de regulación que modulan la expresión de genes de vías reguladoras asociadas. Un ejemplo de ello son los sistemas piramidales que controlan la biosíntesis de estreptomicina, tilosina y cefamicina C/ácido clavulánico (Bibb, 2005). En todos estos casos, la posición superior en la cascada de regulación es ocupado por una proteína receptora de butirilactona (Brp), en coordinación con su molécula afín (la butirilactona). Hay sistemas Brp-butililactona en la mayoría de la especies de *Streptomyces* para la respuesta a señales externas; estos sistemas disparan la expresión de genes reguladores, colectivamente llamados SARP (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*), muchos de los cuales son reguladores positivos. Un mecanismo diferente de control de metabolitos secundarios se ejerce por los sistemas de dos componentes (TCS), que responden a una variedad de señales de estrés externas. Hay un gran número de TCS en *Streptomyces*. Con excepción de algunos (por ejemplo, AbsA1-AbsA2 en *S. coelicolor*), la mayoría de los genes que los codifican se localizan fuera de los *clusters* de biosíntesis de antibióticos. La mayoría de estos genes reguladores se encuentran en la región central del cromosoma, lejos de los extremos cromosomales, que son propensos a inestabilidad genética (Martín y Liras, 2010).

2.2.1. Sistema de regulación de dos componentes.

Los sistemas de regulación de dos componentes son uno de los medios más frecuentes por los cuales las bacterias sienten, responden y se adaptan a cambios en su medio ambiente o en su estado intracelular; se han encontrado en casi todos los genomas bacterianos secuenciados (Laub y Goulian, 2007).

Estos sistemas de señalización, consisten en un sensor quinasa (HK) que autofosforila una histidina, por lo general en respuesta a la presencia de una señal, y un regulador respuesta (RR) que activa o reprime la expresión de genes cuando es fosforilado por el sensor quinasa al que está acoplado (Chang y Stewart, 1998; Cheung y Hendrickson, 2010).

Los sensores quinasa generalmente consisten en un dominio de señal de entrada acoplado a un dominio autoquinasa que puede ser dividido en un subdominio histidina fosfotransferasa (PT) y un subdominio de unión a ATP. La detección del estímulo por la HK induce la hidrólisis de ATP

y la fosforilación de la histidina. El RR posee un dominio regulatorio (R) que controla la actividad del dominio de salida (Hoch y Varughese, 2001; Krell y col., 2010) (Fig. 7).

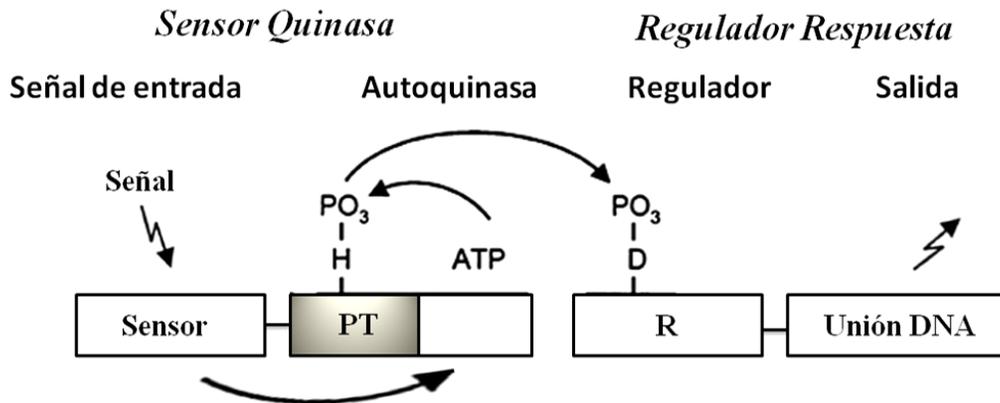


Fig. 7. Estructura del sistema de regulación de dos componentes (Hoch y Varughese, 2001). El sensor quinasa o histidina quinasa (HK), sensor ambiental que fosforila el dominio receptor de una proteína reguladora respuesta (RR); la fosforilación de RR activa un dominio adjunto de salida, que puede producir cambios en la fisiología celular, induciendo un cambio conformacional en la respuesta reguladora, activando el dominio efector y provocando una respuesta celular, frecuentemente la regulación de la expresión génica (Stock y col., 2000).

En el genoma de *Streptomyces coelicolor* se han encontrado 85 genes que codifican para sensores quinasa y 79 genes que codifican para reguladores respuesta (Liras y col., 2008; Fernández y col., 2009); estos sistemas sirven como un mecanismo básico de acoplamiento estímulo-respuesta que permite a los organismos detectar y responder a los cambios en diferentes condiciones ambientales (Stock y col., 2000), adaptándose a un amplio rango de entornos, estreses y condiciones de crecimiento (Hutchings y col., 2004). Esto incluye nutrientes, estados celulares red-ox, cambios en la osmolaridad y otras condiciones (Wolanin y col., 2004). En general, estos sistemas son conocidos por regular varios aspectos del crecimiento y metabolismo, incluyendo la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor* (Bishop y col., 2004).

Se ha comprobado experimentalmente la presencia del sistema de regulación de dos componentes en la producción de antibióticos y en el desarrollo en *Streptomyces spp.* Un ejemplo de ello es el sistema PhoPR, que controla el regulón de genes *pho* y actúa como regulador negativo en la

producción de metabolitos secundarios como la actinorrodina y la undecilprodigiosina en *S. coelicolor* (Sola-Landa y col., 2003). Asimismo, Chang y col. (1996) demostraron que CutRS ejerce una regulación negativa en la producción de antibióticos: cuando el gen fue bloqueado se observó la sobreproducción de actinorrodina en *S. coelicolor*, por el contrario, su sobreexpresión provocó una disminución en la producción.

Bishop y colaboradores (2004) encontraron que el gen *osaB* codifica para un regulador de respuesta y *osaA* para su histidin quinasa. Este sistema de dos componentes es requerido para el desarrollo morfológico cuando el organismo crece en condiciones hiperosmóticas, definiendo parte de la respuesta a la osmoadaptación. En *S. coelicolor* se ha visto que la interrupción de OsaB genera un aumento en la producción de metabolitos secundarios, así como una diferenciación morfológica, al no observarse producción de hifas aéreas bajo condiciones de estrés osmótico. El regulador respuesta tiene un dominio receptor que bloquea el motivo de unión al ADN. La presencia de un motivo de hélice súper enrollada (*coiled-coil motif*) sugiere que este interacciona con otras proteínas de hélice súper enrollada, pudiendo ser críticas para la transducción de señales.

La capacidad para modular la expresión de genes en respuesta al medio ambiente y cambios fisiológicos es parte también de las funciones de los diferentes factores sigma. Ha sido propuesto que uno de estos factores sigma, σ^B , es un regulador que responde al estrés osmótico y oxidativo y controla la cascada de expresión de diversos factores sigma relacionados. En *Bacillus subtilis*, σ^B controla en general la respuesta a estrés; en *S. coelicolor*, *sigB* es parte de un operón, el cual está precedido por *rsbA* y *rsbB*, genes que en *Bacillus subtilis* codifican para el factor anti sigma RsbW y su antagonista RsbV, respectivamente (Fernández y col., 2009).

Se ha encontrado un gen contiguo a *osaB*, el gen *osaC*, que se cree que participa (al igual que *osaB*) en mecanismos de regulación para el desarrollo de la bacteria en condiciones de estrés osmótico, ya que se ha observado que mutantes *osaC*⁻ son incapaces de diferenciarse en medio suplementado con osmolitos. La inusual arquitectura de OsaC indica que además de sus tres dominios sensores internos, posee un dominio N-terminal quinasa y un C-terminal fosfatasa (Fernández y col., 2009).

El modelo propuesto por Fernández y col. (2009), sobre la posible función de *osaC*, indica que su dominio N-terminal quinasa funciona como un factor anti-sigma σ^B posterior a la respuesta a estrés osmótico (REO), similar a la función observada para *RsbA* antes de la respuesta a estrés osmótico (Fig. 8) Después de la REO, y en respuesta a señales fisiológicas que indican los ajustes en la fisiología celular que pudieran ser percibidos por los dominios sensibles PAS y GAF, *OsaC* puede fosforilar e inactivar su pareja antagonista y luego unirse y secuestrar a σ^B , interrumpiendo la REO (dependiente de σ^B).

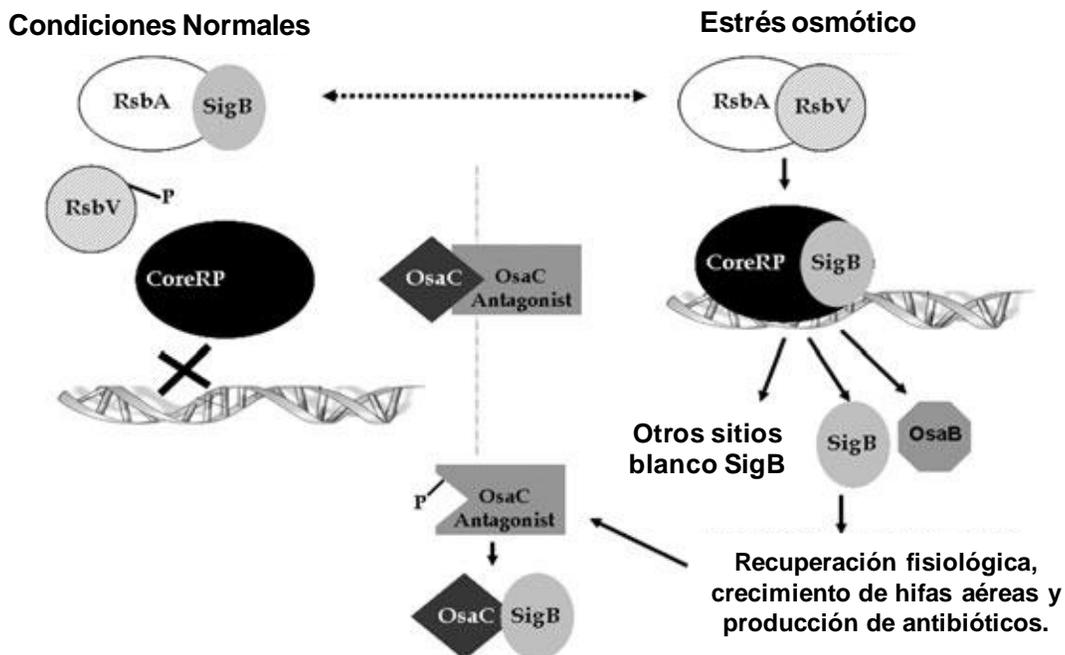


Fig. 8. Modelo de la modulación de la actividad σ^B por *OsaC*. Bajo condiciones normales σ^B es secuestrado por el factor antisigma *RsbA* y el regulon *sigB* no es inducido. Como resultado del estrés osmótico, el antagonista de *RsbA*, *RsbV*, es desfosforilado y se une a *RsbA*. Como consecuencia σ^B puede combinarse con el núcleo de la RNA polimerasa y transcribir genes pertenecientes al regulon *sigB*, incluyendo *osaB*. La recuperación fisiológica del estrés osmótico resulta en la activación del dominio quinasa de *osaC*, que también fosforila el antagonista de *osaC*, lo que libera obligadamente a *osaC* que puede asociarse con σ^B y previene que continúe la expresión del regulon *sigB* (Fernández y col., 2009).

La modulación de la actividad mediada por *OsaC* después de REO aparentemente no es crítica para el restablecimiento fisiológico, dado que la mutante *osaC* puede sufrir un desarrollo normal después de 16 hrs de la inducción de REO, indicando que continúa la regulación sobre el regulon σ^B (incluyendo *osaB*) en la mutante, sin impedir su recuperación. Por el contrario, la incapacidad

de la mutante *osaB* para recuperarse del cambio osmótico implica un papel más crítico del regulador de respuesta en la osmorregulación (Fernández y col., 2009).

Aunque los mecanismos de regulación que controlan la biosíntesis de ácido clavulánico no han sido totalmente entendidos, se ha encontrado que hay genes río abajo del *cluster* AC-CM que podrían jugar un papel muy importante en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y producción de AC y CM bajo ciertas condiciones ambientales (Song y col., 2009). Un ejemplo de ello es que se han encontrado en *S. clavuligerus* proteínas con un alto nivel de similitud (más del 85%) con *osaB* y *osaC* de *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces avermitilis*, suponiéndose que la interrupción de los genes homólogos *sclB* y *sclC* en *S. clavuligerus* podría tener un efecto similar sobre la producción de metabolitos secundarios y en la diferenciación celular.

3. Justificación.

Desde la llegada de la era de los antibióticos con las sulfamidas, en los años 30 del siglo pasado, la ciencia médica ha sido testigo de la exitosa aplicación de numerosas clases de antibióticos, siendo efectivos en el tratamiento de un gran número de enfermedades infecciosas. Sin embargo, éstas siguen siendo la principal causa de muerte en el mundo, con la presencia de nuevas enfermedades emergentes y el incremento de la prevalencia de patógenos resistentes a antibióticos (Suárez y Guidol, 2009).

La resistencia es una inevitable consecuencia de la presión selectiva impuesta por el uso indebido y generalizado de antibióticos. Afecta negativamente a la economía y a la terapia clínica, debido a que provoca una larga duración en el tiempo de hospitalización, una alta morbilidad y aumenta la velocidad de mortalidad, lo que se refleja en el incremento en los costos de cuidado y salud, por la necesidad de administración de fármacos alternativos, caros y tóxicos. El problema de la resistencia a antibióticos o sus consecuencias son más evidentes en los antibióticos β -lactámicos (que son los más ampliamente usados), debido a la producción de β -lactamasas. Compuestos como el AC han sido eficazmente usados para inhibir esos efectos negativos. Este compuesto es producido por *S. clavuligerus*, y a pesar de que ya se conocen los genes biosintéticos, existen genes fuera del *cluster* que pueden estar implicados en la regulación de su biosíntesis. Dada la importancia del AC en la terapia clínica y considerando que *S. clavuligerus* es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos reguladores que controlan la biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios (de la Fuente y col., 2002), el análisis de los genes involucrados en la biosíntesis de dichos metabolitos aportaría información de gran interés que podría permitir posteriormente la manipulación genética encaminada al incremento de la producción. Asimismo, podría emplearse como base para el estudio en otras especies de *Streptomyces*, con el objetivo de mejorar la producción de diversos compuestos de interés industrial.

4. HIPÓTESIS.

La interrupción de los genes *sclC* y *sclB* tendrá un efecto directo en la diferenciación morfológica y biosíntesis de ácido clavulánico en *S. clavuligerus*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Determinar el efecto de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* sobre la producción de ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus*.

5.2. Objetivos particulares.

- ❖ Obtener los genes *sclB* y *sclC* de *Streptomyces clavuligerus*.
- ❖ Interrumpir los genes *sclB* y *sclC* con el gen *aac3 (IV)* por doble recombinación homóloga.
- ❖ Comparar los cambios morfológicos y la producción de ácido clavulánico en las cepas mutantes y parental.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Microorganismos utilizados.

6.1.1. *E. coli* DH5a.

Cepa utilizada en técnicas de clonación y amplificación de plásmidos, previamente preparadas como células electrocompetentes con alta eficiencia de transformación (hasta 1×10^8 transformantes/ μg de ADN). Posee una deleción en el gen *lacZ*, lo que permite seleccionar fácilmente colonias transformantes con plásmidos capaces de originar α -complementación. Este microorganismo se propagó a 37 °C en medio LB, y en el caso de cultivo líquido con una agitación de 250 r.p.m.

6.1.2. *E. coli* IBEC-58.

Cepa utilizada para la amplificación de plásmidos que serán incorporados a especies de *Streptomyces* que poseen un alto sistema de restricción del ADN metilado, debido a que tiene interrumpidos los sistemas de modificación *dam*, *dcm* y *hsd* (Dam metila la adenina en la secuencia GATC; Dcm metila la segunda citosina de la secuencia CC(A/T)GG) y Hsd metila las adeninas dentro de la secuencia de reconocimiento AAC(N)₆GTGC). Estas interrupciones permiten la estabilidad del ADN al ser incorporado a *Streptomyces*. Las condiciones de crecimiento de este microorganismo son a 37 °C, y en el caso de cultivo líquido con una agitación de 250 r.p.m. (González-Cerón y col., 2009).

6.1.3. *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (NRRL 3585).

Cepa tipo progenitora capaz de producir ácido clavulánico y cefamicina C. Las condiciones de crecimiento de este microorganismo son a 28 °C y 220 r.p.m.

6.2. Medios de cultivo.

Todos los medios fueron esterilizados mediante autoclave a 15 lb de presión durante 15 min.

Escherichia coli.

- **Medio Luria-Bertani (LB o LA)** (Miller, 1972).

Se empleó para el crecimiento de *E. coli*. DH5 α e IBEC-58.

- NaCl 10 g
- Bacto triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

El pH fue ajustado a 7.5 con NaOH 1 N. En el caso de requerirse en sólido (LA) se añadieron 20 g/L de agar bacteriológico.

Streptomyces clavuligerus

- **Medio Phage (ϕ)** (Vrancken y col., 2010).

Se utilizó este medio para el crecimiento abundante de *S. clavuligerus*, ya que es un medio asimilativo y permite una alta tasa de crecimiento.

- MgSO₄•7 H₂O 0.5 g
- CaCl₂•2 H₂O 0.74 g
- D(+) glucosa H₂O 10 g
- Bacto triptona 5 g
- Extracto de levadura 5 g
- Lab Lemco Powder (extracto de carne refinado) 5 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

El pH fue ajustado a 7.2 con NaOH 1 N.

- **Medio MYG (ISP-2).**

Este medio es empleado comúnmente para la caracterización de especies de *Streptomyces*, de acuerdo al Proyecto Internacional *Streptomyces*.

- Extracto de malta 10 g
- Extracto de levadura 4 g
- Dextrosa 4 g
- Bacto agar (Difco) 20 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

El pH fue ajustado a 7.2 con NaOH 1 N

- **Medio ME (Sánchez y Braña, 1996).**

Medio utilizado para la esporulación *S. clavuligerus*.

- MOPS 21 g
- Glucosa 5 g
- Extracto de levadura 0.5 g
- Extracto de carne 0.5 g
- Hidrolizado enzimático de caseína (NZ-amina) 1 g
- Agar bacteriológico 20 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 N

- **Medio R2YE** (Kieser y col., 2000).

Medio empleado para la regeneración de protoplastos.

- Sacarosa 103 g
- K_2SO_4 0.25 g
- $MgCl_2$ 10.12 g
- Glucosa 10 g
- Casaminoácidos 0.1 g
- Agua destilada (c. b. p.) 800 mL

Se realizarón alícuotas de 80 mL y se agregó a cada una 2.2 g de Bacto agar (Difco).

Al usar agregar a cada 80 mL:

- 1 mL KH_2PO_4 0.5% p/v
- 8 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.68% p/v
- 1.5 mL L-Prolina 20% p/v
- 10 mL *Buffer* TES 5.73% p/v pH.7.2
- 0.2 mL Solución de elementos traza. *
- 0.5 mL NaOH 1 N.
- 5 mL Extracto de Levadura 10% p/v

*Solución de elementos traza:

- 40 mg/L $ZnCl_2$
- 200 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
- 10 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$
- 10 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- 10 mg/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
- 10 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

- **Caldo tripticaseína de soya (TSB).**

Medio empleado para el crecimiento abundante de *S. clavuligerus*. Fue utilizado como medio semilla para la producción de ácido clavulánico.

- Peptona de caseína 17 g
- Peptona de soya 3 g
- Glucosa 2.5 g
- NaCl 5 g
- K₂HPO₄ 2.5 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

- **Medio A** (Kuo-Cheng y col., 2002).

Medio empleado para la producción de ácido clavulánico por *S. clavuligerus*.

- Glicerol 15 g
- Extracto de harina de soya* 0.5 L
- Peptona 10 g
- KH₂PO₄ 1 g
- Agua destilada (c. b. p.) 1 L

*El extracto de harina de soya se obtiene de la esterilización por calor (15 lb) de una solución de 40 g/L de harina de soya, posteriormente se separa el extracto del sedimento por decantación.

6.2.1. Antibióticos.

Para evitar la pérdida de los plásmidos introducidos en los microorganismos, fue necesario mantenerlos bajo presión selectiva adicionando en el medio de cultivo los antibióticos correspondientes a la resistencia del plásmido contenido. Las concentraciones empleadas se

muestran en la tabla 2, los antibióticos fueron esterilizados por filtración con una membrana de nylon (tamaño de poro 0.25 μm) y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Tabla 2. Concentraciones de antibióticos empleados para la selección de transformantes en *E. coli* y *S. clavuligerus*

Antibiótico	Solución stock	Concentración final	
		<i>E. coli</i>	<i>S. clavuligerus</i>
Ampicilina	100 mg/mL en agua	100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-----
Apramicina	50 mg/mL en agua	50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Cloramfenicol	30 mg/mL en etanol	30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	-----
Kanamicina	50 mg/mL en agua	30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

6.3. Mantenimiento y conservación de cepas.

Las cepas de *E. coli* fueron almacenadas en glicerol a una concentración final de 40 % v/v a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, así como los cultivos en placa se sellaron con Parafilm y se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ máximo un mes.

S. clavuligerus fue conservado en forma de esporas, en una mezcla 1 : 1 de glicerol 80% v/v : Tween 0.1% v/v y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o en forma de micelio, contenido en glicerol al 40% v/v a la misma temperatura.

6.4. Vectores plasmídicos.

- **pJET1.2/blunt** (Fermentas®).

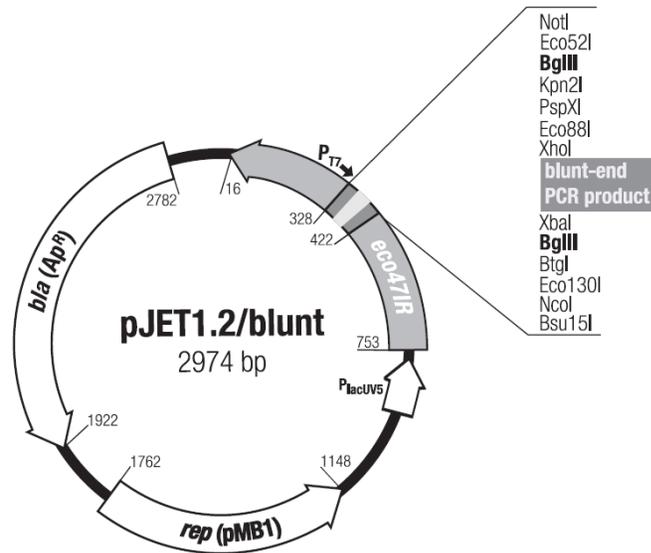


Fig. 9. Mapa de restricción del plásmido comercial pJET1.2/blunt, Fermentas.

Vector de clonación comercial para *E. coli*, se encuentra en forma lineal y está diseñado para la clonación de productos amplificados por PCR. Contiene un gen letal (*eco47IR*) que es interrumpido al ligar el inserto de ADN en el sitio de clonaje, lo que facilita la selección de las recombinantes. Asimismo, posee un origen de replicación *rep*, perteneciente al plásmido pMBI. Tiene un tamaño de 2794 pb y como marcador de selección posee resistencia a ampicilina (*bla*). Este plásmido fue utilizado para la clonación de los genes *sclB* y *sclC*.

- **pQM5062**

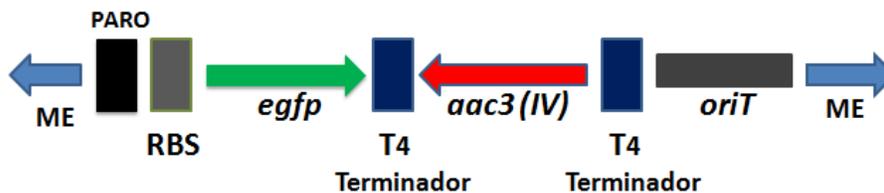


Fig. 10. Mapa del transposon 5062 (*Tn5062*), posee un tamaño de 3442 pb y el gen *aac(3) IV* que proporciona resistencia a apramicina.

El plásmido pQM5062 contiene el Tn 5062, que posee un tamaño de 3442 pb y está compuesto por el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*), el gen *egfp* que codifica para una proteína verde fluorescente, el origen de replicación para *E. coli oriT* y dos terminadores T4 provenientes del fago T4. Este plásmido fue utilizado como molde para la amplificación por PCR del gen *aac(3)IV*, el cual codifica para una aminoglicósido 3-N-acetiltransferasa tipo IV. La resistencia a apramicina ha sido usada ampliamente en estudios genéticos en *Streptomyces* (Skeggs y col., 1986), en este trabajo servirá para la interrupción de los genes estudiados así como para selección de mutantes (Bishop y col., 2004).

- **pME6.**

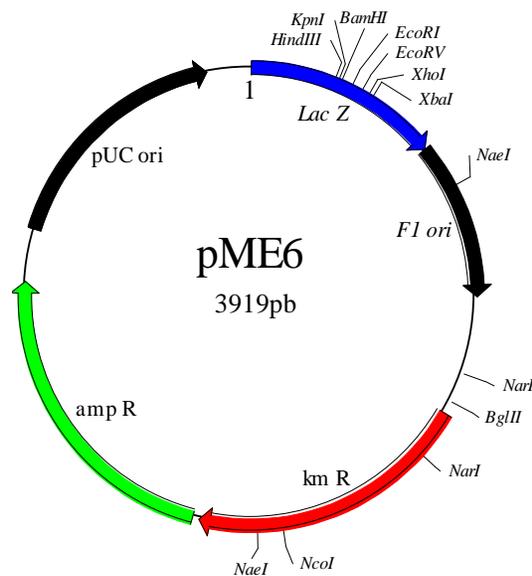


Fig. 11. Mapa de restricción del vector de pME6.

Este plásmido fue construido eliminando un fragmento de 12 pb producto de la digestión y religación del vector comercial pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) con la enzima *EcoRI*. Contiene el origen de replicación pUC para *E. coli* y ori f1, el gen *lacZ* y como marcadores de selección resistencia a kanamicina (kmR) y ampicilina (ampR). Posee un tamaño de 3919 pb. Fue utilizado para clonar los genes interrumpidos *sclB* y *sclC* y posteriormente transferido a *S. clavuligerus* por transformación de protoplastos. Debido a que contiene como marcador de selección resistencia a kanamicina, facilitó la selección de las mutantes que presentan recombinación homóloga.

6.5. Extracción de ADN total de *S. clavuligerus*.

Método Gist Brocades - R. Luiten.

Este método se utilizó para aislar ADN total que fue utilizado como molde en la amplificación de los genes *sclB* y *sclC* de *S. clavuligerus* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se cultivó *S. clavuligerus* en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio ϕ , utilizando como inóculo suspensión de esporas a una concentración de 1×10^9 esporas/mL, se incubó a 30 °C durante 48 hrs, con agitación de 250 r.p.m.

Se obtuvieron alícuotas de 1.5 mL del cultivo y se centrifugaron en una microcentrífuga a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos, se lavó el micelio precipitado con 1 mL de solución fisiológica (0.9 % p/v de NaCl), y se agregaron 500 μ L de *buffer* de lisis (STET¹), 10 μ L de RNAsa² (10 mg/mL) y 50 μ L de lisozima (20 mg/mL STET) a cada alícuota. Se incubaron durante 1 hr a 37 °C y transcurrido este tiempo se adicionaron 500 μ L de SDS al 1 % p/v y 2 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) mezclando bien con ayuda de una pipeta; se incubó nuevamente a 37 °C durante una hora. Posteriormente, se realizó una extracción con fenol-cloroformo con el objetivo de eliminar las proteínas restantes.

¹ **STET.** Sacarosa 8% p/v
Tris-Base 10 mM pH 8
EDTA 50 mM pH 8
Triton X-100 0.5% v/v

² **RNAsa:** Se disuelve la RNAsa a una concentración de 10 mg/mL, en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5. La mezcla se hierve durante 15 min, se enfría a temperatura ambiente. Se reparte en alícuotas y se almacenan a -20 °C.

6.6. Manipulación de ADN.

6.6.1. Desproteización del ADN.

6.6.1.1. Extracción con fenol-cloroformo.

Este método permite eliminar residuos de proteínas en muestras de ADN, para lo cual se agregó 1 volumen de fenol neutro³ a cada muestra de ADN, se mezcló por inversión y se centrifugaron las muestras a 14,000 r.p.m. durante 5 min, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo utilizando una punta cortada y se agregó un volumen de fenol neutro-CIA⁴ (1:1). Se realizaron varios lavados hasta que la interfase blanca desapareciera y un último lavado con un volumen de CIA; posteriormente se realizó la precipitación con etanol.

6.6.1.2. Precipitación con etanol.

A la muestra de ADN se le agregaron 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5) y 2.5 volúmenes de etanol frío al 96 % v/v o absoluto. Se almacenó la muestra durante 2 horas o más a -20 °C (en el caso de ADN total fue durante toda la noche). Las muestras fueron centrifugadas en una microcentrifuga a 14,000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C; se decantó el sobrenadante, el pellet fue lavado con etanol 70 % v/v y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El sobrenadante se eliminó y el pellet se secó a temperatura ambiente; por último, se resuspendió en agua inyectable o TE⁵.

6.6.2. Eliminación de ARN.

A cada muestra de ADN se le agregó RNAsa² a una concentración final de 100 µg/mL. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 90 minutos. Pasado el tiempo de incubación se eliminó la RNAsa con una extracción de fenol-CIA y precipitación con etanol.

³ **Fenol neutro:** Se mezclaron por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 8. La mezcla se dejó reposar hasta que se separaron las dos fases. Se almacenó a 4 °C en un recipiente opaco. Para la preparación de fenol ácido se mezclaron 500 mL de fenol sólido con 500 mL de H₂O, se agitó y se dejó reposar para separar las dos fases. Se eliminó la fase superior acuosa y se guardó a 4 °C en un recipiente obscuro. Se puede almacenar hasta 3 meses en este estado.

⁴ **CIA:** Se prepara mezclando cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1.

⁵ **TE:** EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0

6.6.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los geles de agarosa permiten la visualización y separación de fragmentos de ADN así como la determinación de su tamaño. La concentración de agarosa depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de agarosa utilizadas para diferentes tamaños de fragmentos de ADN.

Concentración de agarosa (% p/v)	Tamaño del ADN (kb)
0.5	1-30
0.75	0.8-12
1	0.5-10
1.25	0.4-7
1.50	0.2-3
2-5	0.01-0.5

La técnica utilizada se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001). La agarosa fue disuelta en TAE 1X⁶, calentando en microondas hasta observarse una solución transparente.

Las muestras de ADN se mezclaron con 1/10 de volumen final de tampón de carga⁷, posteriormente fueron cargadas en los pozos del gel de agarosa y corridas a un voltaje de 90 V durante aproximadamente 90 minutos. La tinción de los geles se realizó agregando un microlitro de la solución stock de bromuro de etidio⁸ a 50 mL de agarosa; o posterior a la corrida del gel, para lo cual se sumergió en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/mL durante aproximadamente 15 min.

⁶ **TAE 50X:** 100 mL de EDTA 0.5 M, 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial. Aforar con agua destilada hasta completar un litro.

⁷ **Tampón de carga 6X:** Azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), sacarosa 40 % (p/v) y xileno cianol 0.25 % (p/v). Se esteriliza por autoclave durante 20 min y se almacenó a 4 °C para evitar el crecimiento de microorganismos.

⁸ **Bromuro de etidio:** Se prepara una solución stock de bromuro de etidio a 10 mg/mL en agua destilada y se conserva a 4 °C. Para un litro de agua destilada se requieren 50 µL de la solución stock.

Los marcadores de tamaño utilizados fueron 1 kb DNA Ladder de Promega y Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder de Fermentas (Fig. 12).

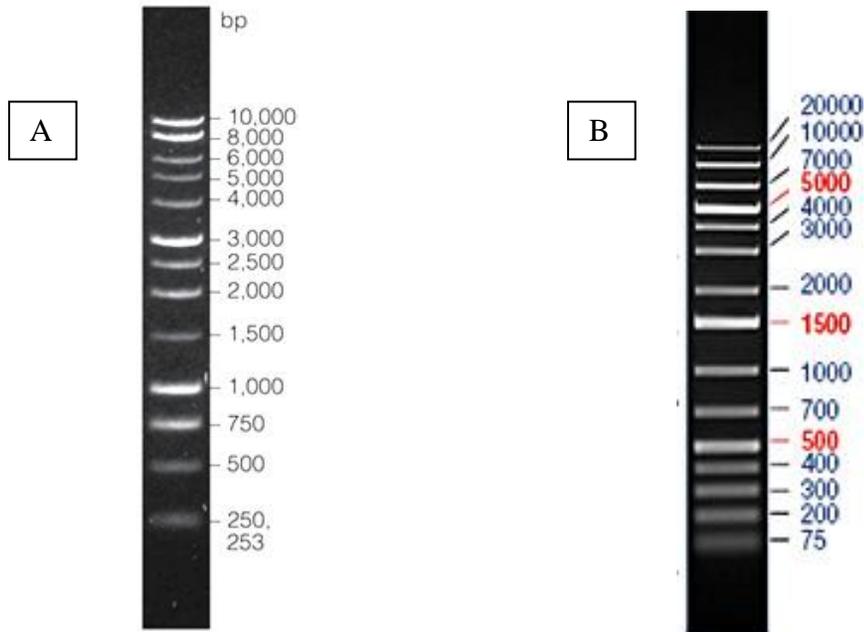


Fig. 12. Marcadores de peso molecular comerciales A) 1kb DNA Ladder de Promega y B) Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder de Fermentas.

6.6.4. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.

Las bandas a purificar fueron visualizadas en un transiluminador y cortadas con un bisturí, posteriormente se utilizó el sistema Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System de Promega para su purificación.

6.6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación de la muestras se realizó por espectrofotometría, al mismo tiempo que se verificó su pureza de acuerdo con Sambrook y Rusell (2001).

Se prepararon diluciones 1/10 o 1/100 en agua y se midieron las absorbencias a longitudes de onda 230, 260 y 280 nm, utilizando como blanco agua destilada. Se realizaron los cálculos pertinentes utilizando los siguientes criterios:

- El cociente A_{260}/A_{280} debe ser cercano a 1.8 para ADN y 2.0 para ARN para certificar que las muestras están libres de impurezas, debido a que cocientes menores a estos parámetros indican la presencia de proteínas, restos de fenol o material soluble.

El cociente A_{260}/A_{230} deben ser mayor que 2 y menor a 2.4 tanto para ADN como para ARN.

- Para determinar la concentración se toma en cuenta la densidad óptica a 260 nm, considerando que una unidad equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso del ADN y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ARN.

6.6.6. Digestión con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción (ER), también llamadas endonucleasas, son enzimas que reconocen secuencias cortas y específicas de ADN (frecuentemente palíndromos) y cortan la doble cadena de ADN en sitios específicos o adyacentes a su secuencia de reconocimiento. Cada ER tiene sus condiciones óptimas de funcionamiento, las condiciones generales que recomienda el fabricante son las siguientes:

Componentes	Concentración final.
Agua Milli Q	Completar a 20 μL
Buffer 10X (especifico para cada ER)	1X
BSA acetilado* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
ADN	1 μg
Enzima de restricción	1-10 U

*Se agregó en caso de ser requerido por la enzima.

La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 1-4 hrs y posteriormente corrida en un gel de agarosa. En el caso de requerirse una banda en específico, ésta se cortó y se purificó a partir del gel.

6.6.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina y ligación.

Las fosfatasas alcalinas son usadas para prevenir la religación de los vehículos de clonación linealizados, eliminando sus grupos fosfato del extremo 5'-terminal. La fosfatasa alcalina utilizada fue la fosfatasa alcalina de camarón (SAP) de Promega; a diferencia de la de intestino de ternera esta puede ser inactivada elevando la temperatura y es más específica, asimismo permite utilizar los fragmentos de ADN desfosforilado para la ligación sin la necesidad de purificar previamente. Se incubó 1 U de SAP por cada microgramo de ADN digerido con endonucleasas a 37 °C durante 15 min. en *buffer* SAP 1X, en un volumen final de 30-50 µL. Se inactivó la enzima por incubación a 65 °C durante 15 min., posteriormente se centrifugó la reacción y se obtuvo una alícuota de 2 µL para la ligación.

La ligación es una reacción que cataliza la unión entre dos dobles cadenas de ADN, para ello se empleó la enzima T4 ADN ligasa de Promega utilizando una proporción molar inserto: vector 3:1. Para calcular la cantidad de inserto a adicionar se siguió la formula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{longitud en kb del inserto}}{\text{longitud en kb vector}} \times \text{proporción molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Una vez calculada la cantidad de inserto y vector a adicionar, la reacción se completo con 1 µL de *buffer* 10X, 1U de T4 ligasa y agua hasta completar un volumen de 10 µL. Se incubó toda la noche a 14 °C y posteriormente se emplearon de 2-3 µL de la mezcla para eletroporar células electrocompetentes de *E. coli*, con el objetivo de amplificar el producto de la ligación.

6.7. Amplificación de plásmidos.

6.7.1. Preparación de células electrocompetentes.

Se inoculó una colonia de *E. coli* (DH5 α o IBEC-58, según sea el caso) en 50 mL de medio LB, incubándose con agitación (250 r.p.m) durante 12 hrs a 37 °C. De este precultivo se tomaron 6 mL y se adicionaron a 125 mL de medio LB, el cultivo fue incubado en las mismas condiciones de agitación y temperatura, el crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm (D.O._{600nm}) hasta obtener 0.4 D.O._{600nm} (aproximadamente 3 horas). El cultivo fue enfriado en baño de hielo durante 30 minutos y distribuido en 4 tubos de 50 mL; se centrifugó a 1000 $\times g$ durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue decantado y el precipitado de cada tubo se lavó con 15 mL de agua calidad Milli-Q estéril. Se juntaron las fracciones en 2 tubos y fueron centrifugados a 1000 $\times g$ durante 20 minutos a 4 °C; se decantó el agua y se adicionaron 8 mL de glicerol 10 % v/v a cada tubo. El precipitado fue resuspendido en frío y distribuido en 2 tubos de 10 mL, se centrifugó en las condiciones antes mencionadas, se repitió el lavado con 2 mL de glicerol 10 % v/v y se distribuyó en 6 tubos de 1.5 mL centrifugando en las mismas condiciones. A continuación, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L de la solución GYT⁹, disolviendo el precipitado en frío, se reunieron las fracciones en un único tubo y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 20 minutos, a 4 °C en una microcentrifuga. El sobrenadante fue decantado y se adicionaron 500 μ L de la solución GYT, en la cual fue resuspendido el precipitado. Por último se obtuvieron alícuotas de 40 μ L en tubos de 1.5 mL, almacenándose a -70 °C hasta su utilización.

6.7.2. Transformación por electroporación.

A un tubo de células electrocompetentes, preparadas como se describió en el apartado anterior, se le adicionaron 1-5 μ L del plásmido a amplificar. Se resuspendieron suavemente y todo el volumen fue colocado en una celda de electroporación fría de 1 mm. La muestra fue introducida en el electroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) dando 2 pulsos a un voltaje de 1100 V,

⁹ GYT: 10 % v/v Glicerol.
0.125 % p/v Extracto de levadura.
0.25 % p/v Bacto triptona.
Ajustar pH 7.5 con NaOH 1N y esterilizar por autoclave.

posteriormente se adicionaron 400 μ L de medio LB, en el cual fueron resuspendidas las células electroporadas, y el volumen fue transferido suavemente a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, para ser incubadas las muestras a 37 °C con agitación de 200 r.p.m. durante una hora. Pasado este tiempo, se sembraron 100 μ L del cultivo en placas de LB agar previamente preparadas con el antibiótico de resistencia del plásmido insertado (con el fin de seleccionar sólo las colonias que contuvieran el plásmido deseado). Se hizo una placa control con LB agar sin antibióticos. Las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 16 hrs, aproximadamente. Se seleccionaron las colonias aisladas y se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante minipreparaciones (si se desea obtener una cantidad pequeña de plásmido) o megapreparaciones (si se requiere una concentración abundante de plásmido).

6.7.3. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*.

La extracción de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por dos métodos, por medio del kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System de Promega, para el cual se siguió el protocolo establecido por la compañía, y por medio de minipreparaciones, utilizando lisozima.

6.7.3.1. Minipreparaciones.

Cada colonia de *E. coli* a analizar fue picada con un palillo estéril e inoculada en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con caldo LB (con el antibiótico de selección del plásmido a aislar). Se incubó a 37 °C con agitación a 200 r.p.m. durante al menos 6 horas, o toda la noche. Los cultivos se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 3 min y el sobrenadante de cada tubo fue eliminado, resuspendiéndose el precipitado en 350 μ L de STET. A cada tubo se le añadieron 10 μ L de una solución de lisozima (10 mg/mL), mezclándose por inversión durante 30 segundos; inmediatamente se sometió a ebullición durante 45 segundos. Para precipitar las proteínas y restos celulares, se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos en una microcentrifuga, el precipitado fue eliminado con ayuda de un palillo estéril y al sobrenadante que contiene el ADN plasmídico se precipitó con 40 μ L de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 600 μ L de isopropanol frío, mezclando cuidadosamente e incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a la misma velocidad, se desecho el sobrenadante y el

precipitado fue lavado con 500 μ L de etanol al 70 % v/v mezclando vigorosamente con ayuda de un vortex durante 2 seg. Se realizó una nueva centrifugación a la misma velocidad durante 10 min; el etanol fue eliminado por inversión y el precipitado secado. Posteriormente se resuspendió en 30 μ L de agua inyectable estéril y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

6.7.3.2. Megapreparaciones.

Se inoculó una colonia con un palillo estéril en 100 mL de caldo LB, incubándose toda la noche a 37 °C con agitación a 250 r.p.m.. El cultivo fue centrifugado a 1000 \times g. durante 10 minutos, el precipitado se resuspendió en 6 mL de solución de STET y se repartió en alícuotas de 350 μ L. A cada alícuota se le añadieron 20 μ L de lisozima (10 mg/mL), mezclando suavemente durante 30 segundos, y se incubaron en un baño de ebullición durante 45 segundos. Las proteínas y restos celulares se precipitaron por microcentrifugación a 14,000 r.p.m. durante 15 min, el precipitado se eliminó con un palillo estéril, mientras que el ADN plasmídico contenido en el sobrenadante se precipitó añadiendo 40 μ L de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 600 μ L de isopropanol. Se mezcló y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 min; pasado este tiempo se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 min, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% v/v y se secó con el objetivo de eliminar los restos de etanol, por último se resuspendió en 100 μ L de agua. Se reunieron las fracciones obtenidas y se trataron con RNAsa a una concentración final de 100 μ g/mL, incubándose a 37 °C durante 90 minutos. Pasado este tiempo se realizó la extracción con fenol-cloroformo, para eliminar restos de proteínas (ver sección 6.6.1.1).

6.8. Construcción de los plásmidos pJetB y pJetC.

6.8.1. Amplificación por PCR de los genes *sclB* y *sclC*.

6.8.1.1. Diseño de los cebadores.

Los cebadores se diseñaron utilizando como base la secuencia nucleotídica de los genes *sclB* (SCLAV_4638) y *sclC* (SSCG_04361) con número de acceso NCBI ZP_06774111.1 y ZP_05007034.1, respectivamente. Cada par fue diseñado con el fin de amplificar un fragmento de aproximadamente 2000 pb que incluyera el gen a interrumpir y algunas bases adicionales corriente arriba y corriente abajo de éste, con el objetivo de favorecer el reconocimiento y especificidad de la secuencia para la recombinación homóloga.

Secuencia de gen *sclB*.

El gen *sclB*, con número de acceso NCBI ZP_06774111.1, posee un tamaño de 798 pb y codifica una proteína de 265 aa.

```
1   ATGACCGGCA CAACATTGGG CGACGCAAGG GAGTCGTCCC CTGGGGCGGC GCCGGTGGTG
61  CCTCCCGGCT CGTGGAGCCG GGGAGACCCC AGGGCGGGGC GAGGAGGACG GGGCATGGTG
121 CAGAAGGCCA AGATCCTCCT GGTCGATGAC CGGCCGGAGA ATCTGCTGGC GCTGGAGGCC
181 ATTCTTTCCG CGCTCGATCA GACGCTGGTA CGGGCATCGT CAGGGGAGGA AGCGCTCAAG
241 GCACTGCTGA CGGATGATTT CGCCGTCATT CTGCTGGACG TTCAGATGCC CGGCATGGAC
301 GGGTTCGAGA CGGCCGCGCA CATCAAGCGG CGGGAGCGGA CCAGGGACAT CCCGATCATC
361 TTTCTCACCG CGATCAACCA CGGGCCGCAC CACACCTTCC GCGGCTACGC GCGGGGCGCG
421 GTCGACTACA TCTCCAAGCC CTTGATCCG TGGGTGCTGC GGGCGAAGGT CTCGGTGTTC
481 GTCGATCTCT ACATGAAGAA CTGCCAACTG CGGGAGCAGG CGGCACTGCT GAGGCTCCAG
541 CTCGAAGGCG GTGCCCGCGC CGGCGGCGGC GCGGACGGCA AGGAGCCGGT GGGTCTGCTC
601 GCCGAGCTGT CCGCGCGGCT CGCGGCGGTC GAGGAGCAGG CGGAGGCCCT GTCGAAGCAG
661 CTCGACGACG AGTCCGCGGA TGTGGCCGCC GTCGCCACCG CCGCCATCTT GGAACGCAAA
721 CTGACCGGCC TGCGGCGGGC GCTGGACGCG CTGGAGCCGG GCACGGGCGG TCCGAACGCC
781 CTGCCGACCC AGAACTGA
```

Secuencia del gen *sclC*.

El gen *sclC*, con número de acceso NCBI ZP_05007034.1, posee un tamaño de 2754 pb y codifica para una proteína de 917 aa.

```

1 CTGGCTTCCG GCTGTCCAAC CGCCCCGGTC CGCCCCGGCCG GGGTGGCACG GGCACGAGAA
61 CCACCACCGG GCACCTGGAG GGGCAGGCCG ATCATGGCGG AGCCGGGCGT CGACACACGT
121 ACGAGGAGTT CTGTGATCAC CGCGCGGGCG GCTGCCAGCT TTGACCCGTG CGGGCGGTCC
181 GTCGCGACCG CCCGCGCCTT TGTCCGCGAC ACCCTCCAGG GGTGGGGGTA CTCCGATGTC
481 TACAGCCCCG CCCGGAAGCA CGTCTGGTTC CAGCTCGACC TGCCCCGCCG CCCCCTCGGC
541 ACCCGCTCCG CGGGCCCTGT CCTGCCGACC GCCCTGCTCC CCGCCGCCGA CGAACGGGTG
601 CGCGTCGCCG TCGTCCAGAT CGACCGCTGC GCGGCCCTCT CCGCTGGAA CGGGGACGCC
661 GAGAAGATCT TCGGCTACAC CGCCGAACAG GTCGTCGGCA AACCCCTCGC CGACCTCGCC
721 GCCTGGCCCC ACACCCCGG CACCGGTACC GGCATCGCGG AGGCCCTTCA GCTCTCCCGC
781 TGGGAGGGCA GCTACGGCAT CCGCGGCACC GACGGCCGGG TCATCCCCGT CTACGCCTCC
841 CATCTGCGGG TCCGCGACTC CCAGGGCGAG CCGTCCACGG TCTGTCTGCT GGTACGGGAC
901 GACGAACGCG CCATCCTCCA GACCCCGCAG CGCGGCCCGG TACCCGACCC CGCCACAGGC
961 ACCGACGGCA CCGGCGCGGA CCCCTTCGAA GTCTTCATCG GCTCCCCCGC CCCCAGACGAC
1021 CTCGACGGAC TCCTCCAGCG GACCGTCGAA CGCGCCCGCG ACATGCTCGA CGGCGACGCC
1081 GCGTTCCTGC TGCTCGCCAC CGACGACGAG ACCGAACTGG AGGTCCGCGC CACCACCGGG
1141 CTCCCCTCGG CGCGCCAGCG GTTCGCCCGC GTCCCGGTG AGGCAGGCAC CGGACGGTAC
1201 GGCTCCGCGC GGATGCCCGC CGTCCACGAC GACCTCGCCT CCGTCCCCGG TGCGGTGCC
1261 CTGCTCAACT CCACCGGGAT GCGCTCCGTC GTCACCGTCC CGCTCAAGGT CGAGGGGCGG
1321 CTCACCGGCT CGCTGGGGGT CGCCGCCGAG TCCGCCGGAC GGTACTCCAA CGAGGAGGCC
1381 CTGCGGCTCC AGTTCGCCGC CGACCGTATC GCCCTCGCGG TCGAGTCCGC CCGCCTCGGC
1441 GAGCTGGAAC GGCTGCGGGC CGGCTCGCTC TCCTTCCTCG TCGAGGCGTC CGACCTGCTC
1501 GCCGGGACTC TCGACCGGGA CCAGACACTC GCGCTGATGG CGCAGATGAC GGTCCCGACG
1561 CTGGCCACCT GGTGTGCCGT CTACACCATC GCCGACCAGT CCTCCGACCC CTATCTCAGC
1621 TATGTACTGC ACGAGGACGA GGAACGCATC GACGGGCTGA AGGCGCTGCT GTCCAAGGTT
1681 CCCCCGCCG ACCCGGTGCT GACCCCGGGG GCCCGGGTCT GGGCCGCTCC CGGCCGTGCC
1741 GCGCAGCAGG CGGCCCTGCT CACCTCCCGG CGCGAACTGG GTCTCGGCTC CTCGCAGCCG
1801 GTCTCCTCCG GCATCGACAC CACGCTCGCG ACCGCCGCGG CCGTCGGCGG TGAGACGGTG
1861 GTCCTGCCCC TGGTCGCCCC CAACCGCGTC ATCGGGATGC TGACGCTCGG CAAGCCCTCC
1921 GACGACCACT TCCGTAGGA GATCCTGGAG CTGGCCGAGG ATCTGTCCCG CCGGGCCCGG
1981 CTCGCCCTGG ACAACGCCCC CCTGTACTCG GAGCGCGTGG CCAACAGCCA GGCCCTCCAG
2041 CGCAGTCTGC TCCCGCCGGA GTTGCCCGAG GTCCCGGGTG TCGAGGTCGA GGTCATCTAT
2101 CGCGCGGCGG GCGAGGGCAA CGAGGTCGGC GCGCACTTCT ACGACCTGTT CCCCATCCGC
2161 GACGGCGCCT ACGGCTTCGC CATCGGCGAT GTCTGTGGTA CGGGCCCGCA AGCGGCGGCC
2221 GTCACCGGTC TGGCCCGGCA CGCCCTGCGG CTGCTGGCCC GTGAGGGCTT CGGCGGCCCG
2281 GCGGTCTTGG AGCGGCTGAA CGCGGCGATC CTCGACGAGG GGGCCCGCAG CCGCTTCCTC
2341 ACCCTGCTCT ATGGCGAGCT GTGGCCCCAG GAGAACGGCG GAGCCCTGCT GAAGGTGCTC
2401 TGCGCGGGCC ATCCCCTGCC GCTCCGGCTG CACCGCGACG GCACGGTGGG GCCCGCCCGG
2461 GAACCTCAGC CGCTGCTGGG TGTCATGGAC GAACTGGAGC TGTTGAGCA GGAGGTCACC
2521 CTCGACCCGG GCGATGTCCT GCTGTGCGTC ACCGACGGGG TCACCGAGCG CCGTGAAGGC
2581 AGCCGCATGC TGGGCGACGA GGGCCTCGCC GAAGTCCTCG CGGGCTGCAA GGGTCTGACG
2641 GCCGGCGCGG TCGCCGCGCG GGTCCCTCAGA GCGGTGCGAG GCTTCGCCCG GGAGCCCGCG
2701 TCCGATGACA TGGCCATCCT CGCCATGCGT GTCCCGGGTC CGTTCGCTCT CTAG

```

6.8.1.2. Condiciones para la reacción de PCR.

La enzima que se utilizó fue *Go-Taq* polimerasa de Promega. Esta enzima es de baja fidelidad, sin embargo para los fines del proyecto no era necesario que el gen se amplificara sin errores. Asimismo, debido al alto contenido de guanina y citosina que presentan los actinomicetos fue necesario la adición de dimetilsulfóxido a una concentración final del 5 % v/v.

La mezcla de reacción para los dos genes fue:

	Volumen utilizado
ADN genómico (20 mM)	1 μ L
Primers (20 mM)	1 μ L c/u
Buffer 10X <i>Go Taq</i> pol	5 μ L
MgCl₂	Concentración final 1.5 mM.
dNTPS (10 mM)	2 μ L
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Concentración final 5 % v/v.
Enzima <i>Go Taq</i> pol (1 U/μL) (Promega)	1 μ L
Agua	Ajustar a un volumen final de 50 μ L

Para amplificar los genes *sclB* y *sclC* por medio de PCR fue necesario utilizar un termociclador de gradiente, con el propósito de encontrar la temperatura de hibridación más adecuada para la amplificación. De acuerdo a la T_m (temperatura de fusión) de los primers, se estimó un rango de temperaturas de hibridación de 62 °C a 68 °C.

El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente:

	TEMPERATURA	TIEMPO	
DESNATURALIZACIÓN	94 °C	5 min.	
DESNATURALIZACIÓN	94 °C	1 min.	} 30 Ciclos
HIBRIDACIÓN	Rango de temperatura 62°C a 68°C	1 min.	
ELONGACIÓN	72 °C	1 min.	
ELONGACIÓN	72 °C	10 min.	
	4 °C		

6.8.2. Clonación de *sclB* y *sclC* en el plásmido pJET.

Los productos de PCR correspondientes a los genes *sclB* y *sclC* fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega), siguiendo las condiciones del fabricante, y clonados en el plásmido comercial pJET (Clone JET™ PCR Cloning Kit, Fermentas). Las condiciones de clonación fueron las siguientes, con base en el protocolo establecido para fragmentos con extremos cohesivos.

	Volumen
<i>Buffer</i> de reacción 2X	10 µL
Producto de PCR	2 µL
Agua libre de nucleasas	5 µL
Enzima DNA <i>blunting</i>	1 µL
Volumen total	18 µL

La mezcla de reacción fue agitada con ayuda de un vortex durante 3-5 seg. y se incubó a 70 °C durante 5 min., enfriándose en baño de hielo. Esta mezcla se realizó para generar extremos romos en los fragmentos a clonar, ya que en la amplificación se utilizó Taq DNA polimerasa, la cual añade adeninas adicionales en los extremos 3', independientemente del molde.

Para la reacción de ligación, a la mezcla anterior se le añadió:

	Volumen
pJET 1.2/ <i>blunt cloning vector</i>	1 μ L
T4 DNA ligasa (5 U/ μ L)	1 μ L
Volumen total	20 μ L

Se mezcló con ayuda de un vortex y se incubó la reacción a temperatura ambiente (22 °C) durante una hora. Posteriormente se limpió con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se transformó por electroporación, usando como marcador de selección la resistencia a ampicilina. Los plásmidos de las colonias obtenidas fueron obtenidos por minipreparaciones y digeridos con endonucleasas con el fin de comprobar la ligación: *NaeI* para los plásmidos que incorporaron *sclB* y *NruI* para los que incorporaron *sclC*. Los plásmidos obtenidos se nombraron pJETB y pJETC, de acuerdo con el gen contenido.

6.9. Construcción del cassette de interrupción.

6.9.1. Amplificación del gen *aac(3)IV* por PCR.

6.9.1.1. Diseño de cebadores.

El gen *aac(3)IV* codifica para una aminoglicosil acetiltransferasa, proveniente de *E. coli*, proporciona los microorganismos resistencia a apramicina (Magalhaes y Blanchard, 2005). Fue utilizado para interrumpir los genes estudiados, así como marcador de selección de las transformantes. Este gen forma parte del transposón 5062 (Tn 5062) (Bishop, 2004) contenido en el plásmido pQM5062, su amplificación se realizó por PCR.

La importancia de este marcador de selección es su funcionalidad tanto para *E. coli* como para *Streptomyces*, debido a que las especies de *Streptomyces* son naturalmente resistentes a muchos antibióticos (por ejemplo los β -lactámicos), por lo cual es muy limitado el número de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser utilizados. En orden decreciente de eficacia, se han empleado en varios trabajos los siguientes marcadores de selección: *aac(3)IV* (apramicina), *aphII*

(neomicina/kanamicina), *hph* (higromicina), *aadA* (estreptomicina/espectinomicina), *aacI* (gentamicina) y *ermE* (eritromicina) (Herron y col., 2006).

Los *primers* utilizados para su amplificación se diseñaron con base en la secuencia nucleotídica complementaria del Tn5062 (NCBI AJ566337), tomando como base para el diseño de los cebadores la región 1137-2186 pb (sombreada), la cual incluye el promotor propio del gen.

Secuencia Tn5062

```

1 ctgtctctta tacacatctc aaccatcatc gatgaattcg gatcctaatt aattaatcta
61 gaaaggaggt gatcatatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat
121 cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga
181 gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc
241 cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta
301 ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca
361 ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt
421 cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg
481 caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc
541 cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg
601 cagcgtgcag ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct
661 gctgcccgac aaccactacc tgagcaccca gtccgcccctg agcaaagacc ccaacgagaa
721 gcgcatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga
781 cgagctgtac aagtaaagcg gccgcttaag gtaccgaatt cgagggggat ccggtgattg
841 attgagcaag ctttatgctt gtaaaccggt ttgtgaaaaa atttttaaaa taaaaaaggg
901 gacctctagg gtccccaatt aattagtaat ataatctatt aaaggtcatt caaaaggcca
961 tccaccggat cagcttagta aagccctcgc tagattttaa tgcggatggt gcgattactt
1021 cgccaactat tgcgataaca agaaaaagcc agcctttcat gatatatctc ccaatttgtg
1081 tagggcttat tatgcacgct taaaaataat aaaagcagac ttgacctgat agtttggtcg
1141 tgagcaatta tgtgcttagt gcatctaacg cttgagttaa gccgcccgcg gaagcggcgt
1201 cggcttgaac gaattgttag acattatctg ccgactacct tggatgatctc gcctttcacg
1261 tgttgcccca gcaatcagcg cgaccttgcc cctccaacgt catctcgttc tccgctcatg
1321 agctcagcca atcgactggc gagcggcatc gcattcttct catcccgcc tctggcggat
1381 gcaggaagat caacggatct cggcccagtt gaccacagggc tgtcgccaca atgtcgcggg
1441 agcggatcaa ccgagcaaag gcatgaccga ctggaccttc cttctgaagg ctcttctcct
1501 tgagccacct gtccgccaag gcaaagcgct cacagcagtg gtcattctcg agataatcga
1561 cgcgtaccaa cttgccatcc tgaagaatgg tgcagtgtct cggcacccca tagggaacct
1621 ttgccatcaa ctcggaaga tgacgcgtcg tgttggcatc gtgtcccacg ccgaggagaa
1681 gtacctgccc atcgagttca tggacacggg cgaccgggct tgcaggcgag tgaggaggca
1741 ggggcaatgg atcagagatg atctgctctg cctgtggccc cgctgcccga aaggcaaatg
1801 gatggcgct gcgctttaca tttggcaggg gccagaatgt gtcagagaca actccaaggt
1861 ccggtgtaac gggcgacgtg gcaggatcga acggctcgtc gtccagacct gaccacgagg
1921 gcatgacgag cgtccctccc ggaccagcg cagcacgcag ggctcgate agtccaagtg
1981 gccatcttc gaggggcccg acgctacgga aggagctgtg gaccagcagc acaccgcccg
2041 gggtaacccc aaggttgaga agctgaccga tgagctcggc ttttcgcat tcgtattgca
2101 cgacattgca ctccaccgct gatgacatca gtcgatcata gcacgatcaa cggcaactgtt
2161 gcaaatagtc ggtggtgata aacttatcat ccccttttgc tgatggagct gcacatgaac
2221 ccattcaaag gccggcattt tcagcgtgac atcattctgt gggccgtaac ctggtactgc
2281 aaatacggca tcagttaccg tgagccggat cagtgagggg ttgcaactgc gggtaacgga
2341 tctggatttc gatcacggca cgatcatcgt gcgggagggc aagggtcca aggatcgggc
2401 cttgatgtta cccgagagct tggcaccag cctgcgcgag caggggaatt gatccggtgg
2461 atgacctttt gaatgacctt taatagatta tattactaat taattgggga ccctagaggt
2521 cccctttttt attttaaaaa ttttttcaca aaacggttta caagcataaa gcttgctcaa
2581 tcaatcaccg gatccccgac ctgcaggtcg acttttccgc tgcataacct tgcttcgggg
2641 tcattatagc gattttttcg gtatatccat cctttttcgc acgatataca ggattttgcc
2701 aaagggttcg tgtagacttt cttggtgta tccaacggcg tcagccgggc aggatagggtg
2761 aagtagggcc acccgcgagc ggggtgttct tcttactgt ccttattcg cacctggcgg
2821 tgctcaacgg gaatcctgct ctgcgaggct ggccggctac cgccggcgta acagatgagg
2881 gcaagcggat ggctgatgaa accaagccaa ccaggaaggg cagcccacct atcaaggtgt
2941 actgccttcc agacgaacga agagcgattg aggaaaaggc ggcggcgccc ggcattgagcc
3001 tgtcggccta cctgctggcc gtcggccagg gctacaaaat cacgggcgtc gtggactatg
3061 agcacgtccg cgagctggcc cgcatcaatg gcgacctggg ccgcttgggc ggcctgctga

```

```

3121 aactctggct caccgacgac ccgcgcacgg cgcggttcgg tgatgccacg atcctcgccc
3181 tgctggcgaa gatcgaagag aagcaggacg agcttggcaa ggtcatgatg ggcgtggctc
3241 gcccgagggc agagccatga cttttttagc cgctaaaacg gccgggggggt gcgcgtgatt
3301 gccaagcacg tccccatgcg ctccatcaag aagagcgcact tcgcgaggact ggtgaagtac
3361 atcaccgacg agcaaggcaa gaccgatccc cggggacctg caggcatgca agcttcaggg
3421 ttgagatgtg tataagagac ag
    
```

6.9.1.2. Condiciones de reacción de PCR.

La amplificación del gen de resistencia a apramicina, se realizó con la enzima *Pfu* polimerasa Altaenzymes, con el fin de obtener una secuencia de alta fidelidad y con extremos romos, que facilitara su inserción en pJETB y pJETC. La mezcla de reacción empleada se presenta en la siguiente tabla:

	Volumen utilizado
pQM5062 (20 mM)	1 µL
Primers (10 mM)	1 µL c/u
Buffer 10X <i>Pfu</i> con MgSO₄	5 µL
dNTPS (10 mM)	2 µL
Enzima <i>Pfu</i> DNA pol. 5 U/ µL (Altaenzymes)	0.5 µL
Agua Mili-Q	Ajustar a un volumen final de 50 µL

Al igual que para la amplificación de los genes *sclB* y *sclC*, la obtención del fragmento correspondiente al gen *aac(3)IV* se realizó con un gradiente en la temperatura de hibridación. El programa utilizado fue el siguiente:

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	94 °C	5 min.	
Desnaturalización	94 °C	1 min.	} 30 ciclos
Hibridación	Rango de temperatura 59 °C a 65 °C	1 min.	
Elongación	72 °C	1 min.	
Elongación	72 °C	10 min.	
	4 °C		

Una vez obtenido, el fragmento amplificado de tamaño aproximado de 1049 pb se purificó a partir de un gel de agarosa.

6.9.2. Inserción del gen *aac(3)IV* en los plásmidos pJETB y pJETC

Los plásmidos pJETB y pJETC que contienen los genes *slcB* y *slcC* fueron digeridos, respectivamente, con *NaeI* y *NruI*, así como desfosforilados para evitar que el plásmido se religara (debido a que estas enzimas generan extremos romos). En estos extremos se insertó el gen *aac(3)IV* previamente purificado y amplificado por PCR. La ligación se siguió de acuerdo al protocolo del fabricante, tomando como relación de concentración 3:1 (inserto: vector). Las colonias obtenidas fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina y corroboradas por su tamaño al realizarse una minipreparación de las transformantes obtenidas. Los plásmidos resultantes se nombraron pJETBA y pJETCA, fueron amplificados mediante megapreparaciones y la construcción se comprobó por un análisis de restricción con la enzima *NcoI*, para ambos vectores.

6.10. Construcción de los vectores de interrupción.

Los vectores pJETBA y pJETCA fueron digeridos con las endonucleasas *BamHI* y *HindIII*, con el objetivo de liberar cada gen incluyendo su interrupción. Los cassettes $\Delta slcB$ y $\Delta slcC$ de tamaño 3055 pb y 3109 pb, respectivamente, fueron cortados y purificados de geles de agarosa para su posterior clonación en el plásmido pME6, previamente digerido con las mismas endonucleasas, dando origen a los vectores pMEBA y pMECA. Estos vectores fueron empleados para la transformación de *S. clavuligerus*.

6.11. Transformación de *Streptomyces clavuligerus*.

La inserción de los plásmidos pMEBA y pMECA en *S. clavuligerus* se realizó por transformación con protoplastos. Debido a que *S. clavuligerus* posee mecanismos de restricción de metilación específica, los cuales utiliza para protegerse del ingreso de ADN exógeno, se utilizó la cepa de *E. coli* IBEC-58 para amplificar los vectores que serían insertados (como ya se

comentó, esta cepa tiene la característica de no metilar el material genético, lo que facilita la entrada y permanencia de los plásmidos insertados en *S. clavuligerus*).

6.11.1. Formación de protoplastos de *S. clavuligerus* (Baltz, 1980; Kieser y col., 2000).

En un matraz tridentado de 250 mL se inocularon 25 mL de medio YEMEG con 0.1 mL de esporas (1×10^9 esporas/mL). Se incubó en agitación a 250 r.p.m. y 37 °C durante 36-40 hrs. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se centrifugó a 1000 $\times g$ durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó dos veces con 15 mL de sacarosa al 10.3 % (p/V). Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 4 mL de *buffer P*¹⁰ con lisozima (1 mg/mL), incubándose a 30 °C de 15 a 60 minutos con agitación lenta, hasta observarse la formación de protoplastos (monitoreado por observación al microscopio). Los protoplastos se resuspendieron con ayuda de una pipeta y se incubaron 15 min bajo las mismas condiciones, se adicionaron 5 mL de *buffer P* y se repitió la homogenización con ayuda de una pipeta. Los protoplastos fueron filtrados con algodón estéril para eliminar el micelio restante y se transfirieron a tubos de 15 mL, para después centrifugar a 1000 $\times g$ durante 7 min. El sedimento fue resuspendido en 1 mL de *buffer P* repitiendo el lavado 2-3 veces; por último se resuspendió en 1 mL de *buffer P* y se obtuvieron alícuotas de 50 μ L, las cuales fueron almacenadas a -70 °C hasta su utilización.

6.11.2. Transformación de protoplastos y selección de mutantes.

La transformación de protoplastos se realizó de acuerdo a la técnica empleada por García-Domínguez y col. (1987) y Kieser y col. (2000), para lo cual se adicionaron 5 μ L de ADN plasmídico (1 μ g/ μ L) a 50 μ L de la solución de protoplastos, homogeneizándose con 200 μ L de *buffer T*¹¹. Se inocularon 100 μ L de esta solución por placa de medio R2YE. Las cajas fueron incubadas a 30 °C y después de 14-20 hrs. se adicionaron 1-2 mL de antibiótico por placa, considerando el volumen de medio contenido para obtener una concentración final de 25 μ g/mL

¹⁰ **Buffer P:** 10.3 % (p/V) Sacarosa, 0.25 g K₂SO₄, 2.02 g MgCl₂•6H₂O, 2 mL solución de elementos traza (misma que el medio R2YE), agua destilada hasta 800 mL. Se hacen alícuotas de 80 mL y a cada una se le agrega 1 mL KH₂PO₄ 0.5% (p/V), 10 mL CaCl₂•2H₂O 3.68% (p/V), 10 mL *Buffer TES* 5.73% (p/V) pH. 7.2.

¹¹ **Buffer T:** 25 mL Sacarosa 10.3% (p/V), 0.2 mL de solución de elementos traza (misma que el medio R2YE), 1 mL K₂SO₄ 2.5% (p/V), 75 mL agua destilada, esta solución fue esterilizada y una alícuota de 9.3 mL fue suplementada con 0.2 mL de CaCl₂ 5 M y 0.5 mL de *buffer Tris-ácido maléico* (hacer una solución 1 M de *buffer Tris* y ajustar a pH 8 con ácido maléico). Antes de usar, adicionar 1 g de polietilenglicol 1000 (PEG 1000) por cada 3 mL de *buffer T*.

de apramicina. Las cajas se dejaron secar en una campana de flujo laminar y se incubaron a 30 °C hasta observar transformantes, aproximadamente 2-3 días.

De las transformantes obtenidas se seleccionaron las colonias resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina, ya que estas son las que presentan doble recombinación homóloga (en la cual se sustituye parte del genoma receptor -genes a interrumpir. por la secuencia exógena -genes interrumpidos-, sin la inserción del resto del plásmido). El reemplazo del gen endógeno por el gen interrumpido contenido en el vector se aseguraría solamente si se lleva a cabo una recombinación doble, lo que se puede comprobar seleccionando transformantes sensibles a kanamicina. Este procedimiento se esquematiza en la figura 13.

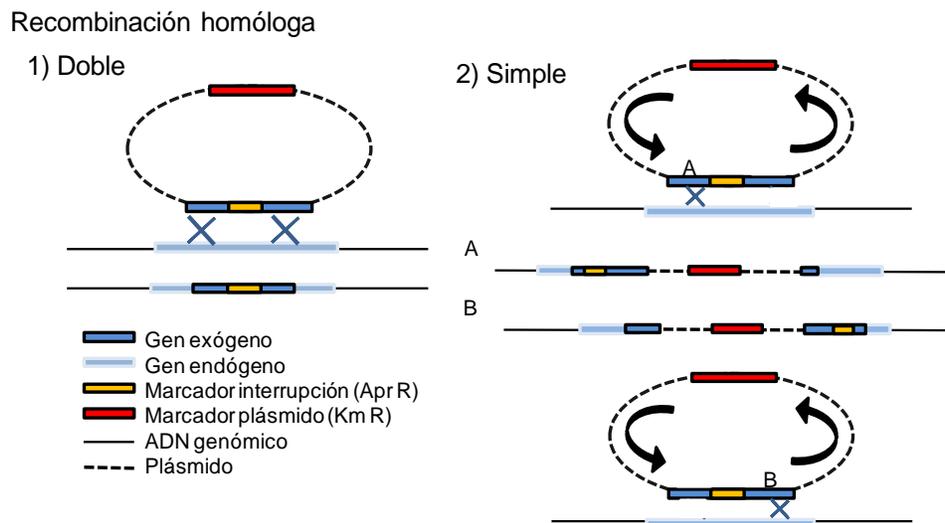


Fig. 13. Proceso de doble recombinación homóloga (1), en el cual se reconocen dos regiones del plásmido con la secuencia genómica, dando como resultado la sustitución de la secuencia exógena que contiene el marcador de resistencia a apramicina, lo que ocasiona la interrupción del gen endógeno; a diferencia del proceso de recombinación simple (2) en el que solo es reconocida una región del plásmido con el genoma insertándose el plásmido completo.

6.12. Comprobación de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC*.

Para confirmar que se llevó a cabo la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* con el marcador de resistencia a apramicina, se realizó un PCR de las colonias resistentes a apramicina utilizando los cebadores *forward* de cada gen (*sclBF* y *sclCF* respectivamente), y el cebador *apraR* con la

finalidad de amplificar la primera mitad del gen interrumpido y el marcador de resistencia a apramicina dando un producto de 2154 pb para $\Delta sclB$ y 2178 pb para $\Delta sclC$. Asimismo se amplificó el gen completo interrumpido utilizando los pares de cebadores *sclBF-sclBR* y *sclCF-sclCR*, los cuales habían sido empleados anteriormente para la amplificación del gen y en este caso amplificaron un fragmento 1049 pb mas grande, que corresponde al marcador de resistencia a apramicina (Fig. 14).

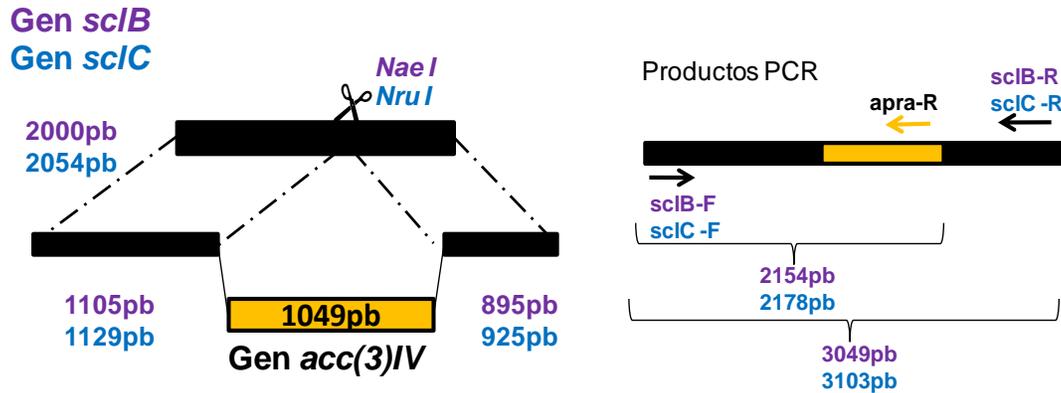


Fig. 14. Estrategia utilizada para la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* y comprobación de las mutantes por PCR.

La comprobación de la interrupción de los genes *sclC* y *sclB* en *Streptomyces clavuligerus* se realizó por medio de PCR de colonia, descrito en el siguiente apartado.

6.12.1. PCR de colonia a partir de las transformantes obtenidas de *Streptomyces clavuligerus*

Se empleó el método descrito por Van Dessel y colaboradores (2003), el cual consiste en seleccionar varias colonias al azar correspondientes a las diferentes transformantes, se tomó cada colonia con un palillo estéril y se recolectó en tubos de 1.5 mL. Cada una se resuspendió en 10 μ L de dimetilsulfóxido 100 % (DMSO) y se hicieron tres mezclas de reacción con diferentes concentraciones de DMSO.

Componentes	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Mezcla DMSO-colonia	5 µL	2.5 µL	1.25 µL
Agua	22 µL	24.5 µL	25.75 µL
Primer Forward (20 mM.)	5 µL	5 µL	5 µL
Primer Reverse (20 mM)	5 µL	5 µL	5 µL
Buffer 5X Go-taq polimerasa (Promega)	10 µL	10 µL	10 µL
dNTPs (10 mM)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
Go- taq polimerasa (Promega) (1 U/µL)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Concentración final DMSO	10 %	5 %	2.5 %

Las condiciones de temperatura fueron las mismas que se utilizaron anteriormente para la amplificación de los genes *sclB* y *sclC*.

6.13. Evaluación del efecto de la interrupción en la producción de ácido clavulánico.

6.13.1. Fermentación líquida.

Para la generación de biomasa se empleó caldo TSB. El medio fue inoculado con una colonia, incubado a 28 °C en agitación continua a 220 r.p.m y se monitoreó hasta que alcanzó una densidad óptica de 5 a 600 nm. Con este cultivo se inoculó (al 10 % v/v) el medio de producción (Medio A), incubándose en las mismas condiciones. Para las cinéticas de producción y crecimiento, se tomó una alícuota de 1.5 mL cada 24 hrs durante 120 hrs. (Liras y Martín, 2005). En cada muestra se cuantificó la biomasa por peso seco y el ácido clavulánico producido por espectrofotometría. Para la condición de estrés osmótico se adicionó al medio de producción KCl a una concentración final de 250 mM.

6.13.2. Cuantificación de ácido clavulánico por espectrofotometría

Este método de análisis está basado en la medición de la absorbencia a 312 nm del producto de la reacción de sales de ácido clavulánico con imidazol. El compuesto formado es 1-(8-hidroxi-6-oxo-4-azaoct-2-enoil)-imidazol (Fig. 15). Este procedimiento permite detectar concentraciones por arriba de los 2 µg/mL, los derivados del ácido clavulánico y otros compuestos con estructura clavam presentan una alta absorbencia en las condiciones del ensayo, en cambio para las penicilinas se observa poca o nula absorbencia (Bird y col., 1982).

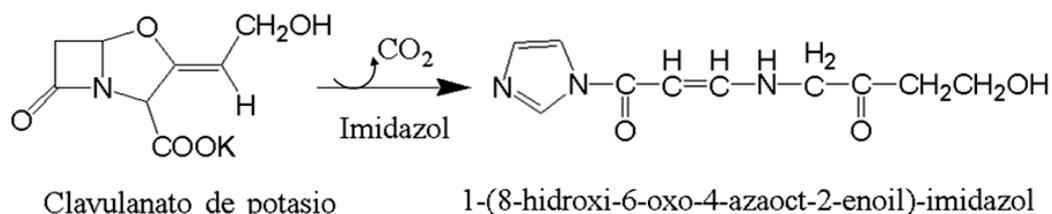


Fig.15. Reacción de imidazol con ácido clavulánico, produce un compuesto capaz de ser detectado espectrofotométricamente.

Las muestras obtenidas de la fermentación fueron procesadas de la siguiente forma: la biomasa fue separada por microcentrifugación (5000 r.p.m., 10 min.) y cuantificada mediante peso seco, el sobrenadante obtenido fue separado en 2 tubos, a un tubo (tubo A) se le agregaron 5 volúmenes de la solución de imidazol (8.25 % p/V, pH 6.8), al segundo tubo (tubo B) se le agregaron 5 volúmenes de agua. Se midió la absorbencia de ambos tubos a 312 nm y se calculó la diferencia entre el tubo A y el B. Para determinar la concentración de clavulanato de cada muestra fue necesario realizar una curva patrón con la sal clavulanato de potasio (Fermic S.A. de C.V.) de 0 a 100 µg/mL (Anexo 1), concentraciones que también fueron tratadas en las condiciones antes mencionadas.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1. Análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los genes *sclB* y *sclC* en *S. clavuligerus*.

Se realizó un alineamiento con el objetivo de determinar la homología que presentan las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes *sclB* y *sclC* de *S. clavuligerus* y secuencias similares encontradas en *S. coelicolor*, *S. avermitillis* y *S. lividans*. Los números de acceso de las secuencias empleadas se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Números de acceso de las secuencias aminoacídicas de proteínas similares a *SclB* y *SclC* en diferentes especies de *Streptomyces*

Organismo	SclB		SclC	
	No. de acceso Genbank. (Tamaño aa.)	Función.	No. de acceso Genbank. (Tamaño aa.)	Función.
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27049	EFG09710 (265 aa.)	Regulador respuesta de un sistema de dos componentes.	ZP_08218551 (873 aa.)	Proteína reguladora.
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	CAA19850 (224 aa.)	Regulador respuesta de un sistema de dos componentes.	CAA19848 (916 aa.)	Posible proteína reguladora.
<i>S. avermitillis</i> MA- 4680	BAC70222 (228 aa.)	Posible regulador respuesta de un sistema de dos componentes.	BAC70224 (915 aa.)	Posible fosfatasa dependiente de magnesio o manganeso.
<i>S. lividans</i> TK24	EFD66343 (224 aa.)	Regulador respuesta de un sistema de dos componentes.	ZP_06528095.1 (916 aa.)	Proteína reguladora.

El análisis de las secuencias aminoacídicas con la base de datos BLAST/UniProt, estableció que *SclB* corresponde a una posible proteína reguladora respuesta, perteneciente a un sistema de dos componentes. De la misma manera, se predijo la función de *SclC* como una proteína reguladora dependiente de magnesio. Este mismo alineamiento predijo un porcentaje de similitud de más del 80% para *SclB*, y del 98 % para *SclC*, con las proteínas similares de *S. coelicolor*, *S. lividans* y *S. avermitillis* (Tabla 5). De igual forma se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes al producto del gen *sclB* y *sclC* en *S. clavuligerus* y sus similares en *S. coelicolor*, *S. avermitillis* y *S. lividans*, los resultados se presentan en las figuras 16 y 17.

Tabla 5. Porcentajes de similitud de las proteínas codificadas por los genes (A) *sclB* y (B) *sclC* en) *S. clavuligerus* y sus genes homólogos en *S. coelicolor*, *S. avermitillis* y *S. lividans*.

A)		B)	
	<i>S. clavuligerus</i>		<i>S. clavuligerus</i>
<i>S. coelicolor</i>	83%	<i>S. coelicolor</i>	98%
<i>S. avermitillis</i>	85%	<i>S. avermitillis</i>	98%
<i>S. lividans</i>	83%	<i>S. lividans</i>	98%



Fig. 16. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes al producto del gen *sclB* en *S. clavuligerus* y sus similares en *S. coelicolor*, *S. avermitillis* y *S. lividans*.

Resultados y análisis de resultados.

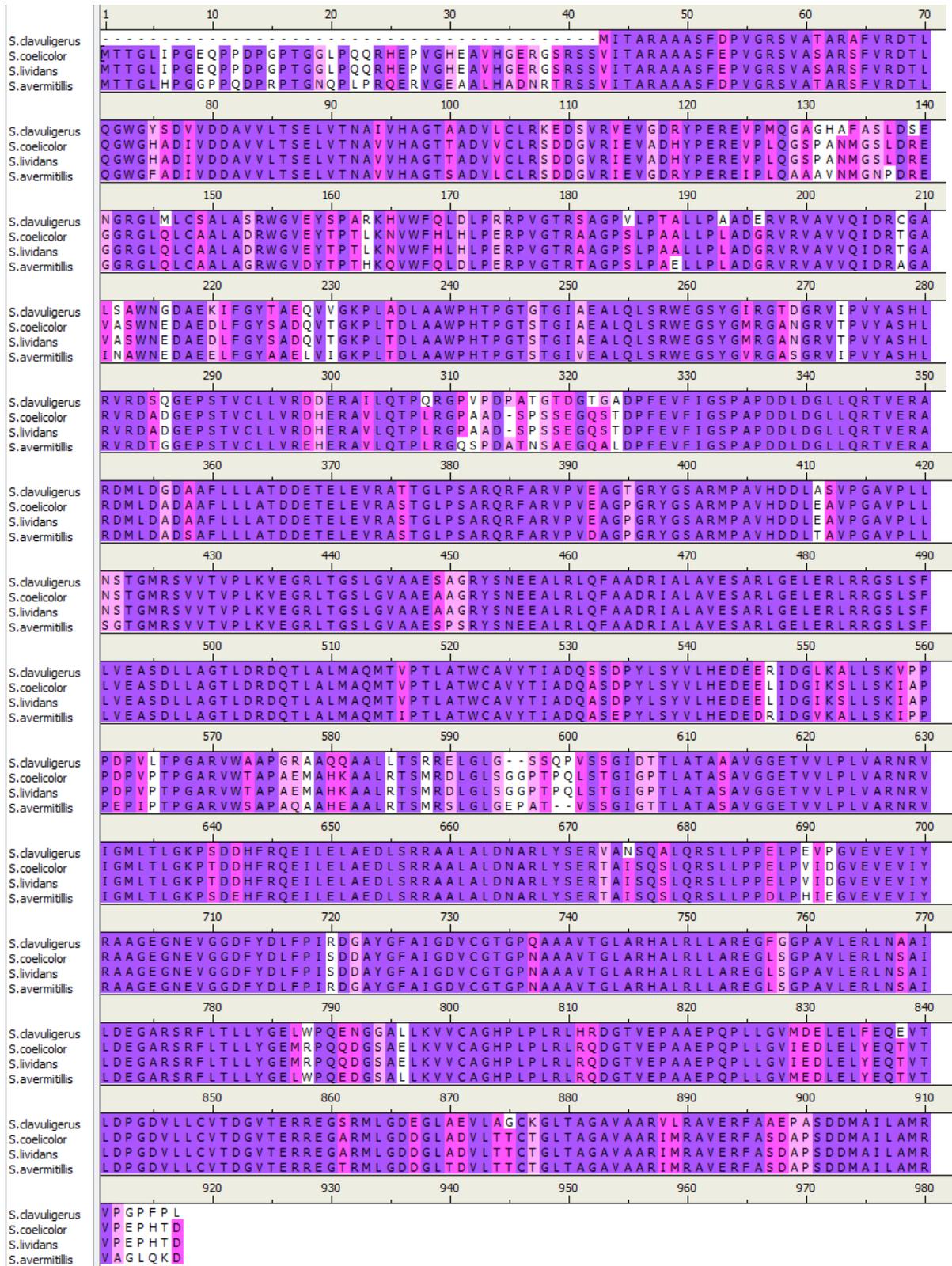


Fig. 17. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes al producto del gen *sclC* en *S. clavuligerus* y sus similares en *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. lividans*.

Resultados y análisis de resultados.

Las secuencias aminoacídicas de SclB y SclC fueron también analizadas en la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), con el objetivo de predecir los dominios que las conforman y corroborar su función. Se obtuvo que la proteína SclB, con un tamaño de 265 aa., contiene un dominio REC, que comprende la región de los aminoácidos 43 al 157; este es un dominio receptor, homólogo a CheY de *S. coelicolor*, y actúa como un dominio receptor de un regulador respuesta, característico en los sistemas de dos componentes. Este dominio contiene un sitio fosfoceptor con un residuo Asp en el extremo N-terminal que es fosforilado por homólogos de histidina quinasas, afectando las propiedades del extremo C-terminal, dominio de unión al ADN (Galperin, 2006).



Fig. 18. Análisis de los dominios localizados en SclB. Sólo se presenta un dominio REC común en los reguladores respuesta.

La proteína SclC posee un tamaño de 886 aa. Su función reguladora está determinada por los cinco dominios predichos que la conforman, los cuales se esquematizan en la figura 19.



Fig.19. Análisis de los dominios localizados en SclC.

- un dominio HATPasa, localizado en la región entre los aminoácidos 48-147. Este dominio aparece en diversas proteínas de unión al ATP.
- un dominio PAS, localizado entre los aminoácidos 160 y 226, dominio presente en un gran número de proteínas de señalización. A diferencia de muchos otros sensores, las proteínas que contienen estos dominios se encuentran localizadas en el citosol y es ahí donde detectan señales internas, aunque pueden también sentir factores ambientales que crucen la membrana celular. La mayoría de los dominios PAS funcionan como módulos sensitivos de quinasas de sistemas de dos componentes (Antón y col., 2007).

- dos dominios GAF, localizados en las regiones 309-453 y 474-642. Al igual que los dominios PAS son importantes en la percepción de señales externas en procariontes. Este tipo de dominio se encuentra en fitocromos y cGMP fosfodiesterasas.
- por último, en el carbono terminal se localiza un dominio SpoIIE (Proteína E del estado de esporulación II), que comprende los aminoácidos 689 a 881. Este dominio es necesario para la formación de un septo polar normal durante la esporulación. Su región N-terminal es hidrofóbica, lo que origina segmentos transmembranales (Carniol y col., 2005).

7.2. Interrupción de los genes *sclB* y *sclC*.

7.2.1. Extracción de ADN de *Streptomyces clavuligerus*.

Se realizó la extracción de ADN de *S. clavuligerus* como se describe en la sección de metodología, el cual servirá como molde para la amplificación por PCR de los genes *sclB* y *sclC*. El ADN obtenido se presenta en la figura 20.

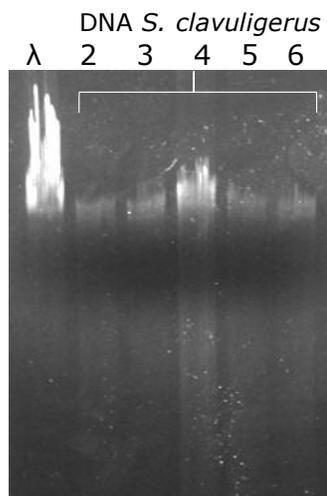


Fig. 20. Extracción de ADN genómico del fago λ (tamaño aproximado de 48.5 kb, carril 1), y ADN genómico extraído de *S. clavuligerus* (carriles 2-6).

7.2.2. Transformación de plásmidos por electroporación y amplificación.

Se introdujeron en *E. coli* los plásmidos pQM5062 y pME6 por medio de electroporación y se seleccionaron las colonias transformantes por su capacidad de resistencia al antibiótico contenido en el medio de cultivo (en el caso del pQM5062 fue apramicina a una concentración final de 100

$\mu\text{g/mL}$ y para el pME6 fue kanamicina a una concentración final de $25 \mu\text{g/mL}$). Las colonias resistentes a estos antibióticos son las que contienen el plásmido de interés. Se obtuvieron colonias aisladas y a partir de ellas se realizó la extracción de plásmido por megapreparaciones (Fig. 21). El plásmido pQM5062 fue usado como ADN molde para la amplificación por PCR del gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*), mientras que en el plásmido pME6 fue clonado el cassette de interrupción.

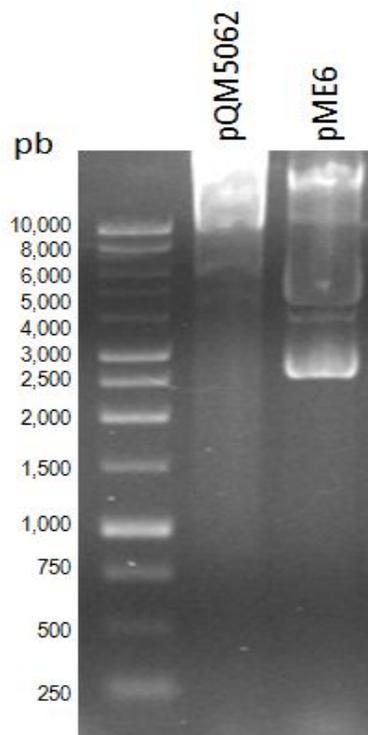


Fig.21. Reamplificación por megapreps de los plásmidos pQM5052 y pME6.

7.2.3. Amplificación de los genes *sclB* y *sclC* por PCR.

7.2.3.1. Diseño de cebadores.

Para construir los *primers* o cebadores que amplifiquen el gen *sclB* se tomó como ADN molde la secuencia del gen incluyendo bases río arriba y río abajo, con el propósito de amplificar un fragmento mayor que facilite la recombinación homóloga. Además era necesario que contuviera dentro del gen un sitio de restricción, de preferencia para una enzima que generara extremos romos, los cebadores se diseñaron incluyendo bases río arriba y río abajo de cada gen. Para el gen *sclB* se amplificó un fragmento de 2000 pb. En el caso del gen *sclC* se consideraron 2054 pb del gen para ser amplificado. Las enzimas que permitirían la inserción del gen *aac(3)IV* fueron *NaeI*

Resultados y análisis de resultados.

para *sclB* y *NruI* para *sclC*. Asimismo, se adicionaron sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *HindIII* en los extremos del cebador con el propósito de facilitar la ligación en el plásmido pME6.

Primers para obtener el fragmento correspondiente al gen *sclB*.

BamHI

sclB-F 5' ATA **G↓GATCC GCG GCG CAC CTA CTC C** 3' Tm 64° C

HindIII

sclB-R 5' ATA **A↓AGCTT CTT GCG GTG GGC TTG GTCG** 3' Tm 63° C

```

1      GCGGCGCACC TACTCCTTCG ACAACGAGAA GGTGCTGATC GTCGACGACG ACATCCGCAA
61     TGTCTTCGCG CTCACCAGCG TGCTGGAGCA GCAGGGCCTG ACGGTGCTGT ACGCGGAGAA
121    CGGCCGGGAG GGGATCGAGG TCCTGGAGCA GCACGACGAT GTCCAGGTCG TCCTGATGGA
181    CATTATGATG CCGGAGATGG ACGGGTACGC GACGACGACC GCGATCCGCA GGATGCCGCA
241    GTTCGCCGGG TTGCCGATCG TGGCGCTGAC GCGAAGGCG ATGAAGGGCG ACCGGGAGAA
301    GGCGATCGAG TCGGGGGCTT CCGACTATGT CACCAAACCG GTCGACCCGG ATCATCTGCT
361    CACGGTGATG GAGCAGTGGG TGC GCGCTCG GTGACCGGAT GCCCGTCTG TTGCTGACTG
421    ACCGTGGCGG AGGATGTGTG CGTCGTCGTC GTGCGGGGAA CCTTTCGGAC TCCC GTTACG
481    TTTCTTCTCC GTGCACAGTG ACATCGTGGT GACAGGGTGT GCGGACAGGC GGGGTGCGGC
541    TACCATGACC GGCACAACAT TGGGCGACGC AAGGGAGTCG TCCCCTGGGG CGGCGCCGGT
601    GGTGCCTCCC GGCTCGTGGA GCCGGGGAGA CCCCAGGGCG GGGCGAGGAG GACGGGGCAT
661    GGTGCAGAAG GCCAAGATCC TCCTGGTCTGA TGACCGGCCG GAGAATCTGC TGGCGCTGGA
721    GGCCATTCTT TCCGCGCTCG ATCAGACGCT GGTACGGGCA TCGTCAGGGG AGGAAGCGCT
781    CAAGGCACTG CTGACGGATG ATTTTCGCCGT CATTTCTGCTG GACGTTT CAGA TGCCCGGCAT
841    GGACGGGTTC GAGACGGCCG CGCACATCAA GCGGCGGGAG CGGACCAGGG ACATCCCGAT
901    CATCTTTCTC ACCGCGATCA ACCACGGGCC GCACCACACC TTCCGCGGCT ACGCGGCGGG
961    CGCGGTCGAC TACATCTCCA AGCCCTTCGA TCCGTGGGTG CTGCGGGCGA AGGTCTCGGT
1021   GTTCGTCGAT CTCTACATGA AGAACTGCCA ACTGCGGGAG CAGGCGGCAC TGCTGAGGCT
1081   CCAGCTCGAA GCGGTTGCCG GCGCCGGCGG CCGCGCGGAC GGCAAGGAGC CGGTGGGTCT
1141   GCTCGCCGAG CTGTCCGCGC GGCTCGCGGC GGTTCGAGGAG CAGGCGGAGG CCCTGTTCGAA
1201   GCAGCTCGAC GACGAGTCCG CGGATGTGGC CGCCGTCGCC ACCGCCGCC ATCTGGAACG
1261   CAAACTGACC GGCTTGC GGGCGCTGGA CGCGCTGGAG CCGGGCACGG GCGGTCCGAA
1321   CGCCCTGCCG ACCCAGAACT GACCACCCGC CGATGACCGA CTGACCCACT GACACCCCT
1381   GCTGATTCCC TGCTGCCCA GCGCTGCTCC CCGGGCGCGA CCGGCCCGGG TCCGCGTGCC
1441   CGACGGCCCG TCCGGACCCG GTGCTCCGCC GTGTTCGGGGC GGTGCGCCGG TCCGCCGGGG
1501   GCCGCTGAGG GAGTGTACG TCAAGGCGGG CACCCGGGCG ACACCAACGG GTGAGGGCGT
1561   GGGCACACGT GTCCGCCGCG TCCCGCACCG GTAATCTCAC CACCATGGCT TCACGTACGT
1621   CCGGCAAGGG CCCCCAGGAA CCGGCGGCTT CCGCCAAGCC GCGCACCGGC CGTACGAGCG
1681   GTGCCACGGC CGCGGCGAAG AAGAAGGCCG CGGCCGGGAA ACCGGGCGCG CCCGCCGCA
1741   AGGGCCCGGC GGGGGGGAAA ACCTCCGCCA AGCCCCCGC GAAGAAGGCC ACCGGCCGGA
1801   AGGCACCGGC GGCAGCGGCC CGGAAGGCAC CCGCGAAGAG GACCGCCGCC CAGAAGGCCG
1861   CCCCCCGGCC CGCGCCCTCC CCGACCGGGG GGCTCTACCG CCTGGTGCGT GCCCTCTGGC
1921   TCGGTCTCGC GCGCACGGTG GGGCCCTCG TCCGGGGCAT AGGGCGGGGT GCGAAAGGGC
1981   TCGACCAAGC CCACCGCAAG

```

En la secuencia anterior se muestran las regiones empleadas para el diseño de los cebadores sclBF (verde) y sclBR (rosa), la secuencia del gen *sclB* (gris) contiene el sitio de corte *NaeI*, (negro) donde se insertó el gen de resistencia a apramicina, *aac(3)IV*.

Resultados y análisis de resultados.

Primers para obtener el fragmento correspondiente al gen *sclC*.

sclC-F 5` TAT **G ↓ GATCC AAC CCC TCG CCG ACC TCG** 3` Tm 66°C

sclC-R 5` TAT **A ↓ AGCTT CTA GAG CGG GAA CGG ACC CGG G** 3` Tm 67°C

```

1      AACCCCTCGC CGACCTCG CC GCCTGGCCCC ACACCCCGG CACCGGTACC GGCATCGCGG
61     AGGCCCTTCA GCTCTCCCGC TGGGAGGGCA GCTACGGCAT CCGCGGCACC GACGGCCGGG
121    TCATCCCCGT CTACGCCTCC CATCTGCGGG TCCGCGACTC CCAGGGCGAG CCGTCCACGG
181    TCTGTCTGCT GGTACGGGAC GACGAACGCG CCATCCTCCA GACCCCGCAG CGCGGCCCGG
241    TACCCGACCC CGCCACAGGC ACCGACGGCA CCGGCGCGGA CCCCTTCGAA GTCTTCATCG
301    GCTCCCCCGC CCCCACAGAC CTCGACGGAC TCCTCCAGCG GACCGTCGAA CGCGCCCGCG
361    ACATGCTCGA CGGCGACGCC GCGTTCCTGC TGCTCGCCAC CGACGACGAG ACCGAACTGG
421    AGGTCCGCGC CACCACCGGG CTCCCCTCGG CGCGCCAGCG GTTCGCCCCG GTCCCGGTTCG
481    AGGCAGGCAC CGGACGGTAC GGCTCCGCGC GGATGCCCGC CGTCCACGAC GACCTCGCCT
541    CGGTCCCCGG TGCGGTGCCC CTGCTCAACT CCACCGGGAT GCGCTCCGTC GTCACCGTCC
601    CGCTCAAGGT CGAGGGGCGG CTCACCGGCT CGCTGGGGGT CGCCGCCGAG TCCGCCGGAC
661    GGTACTCCAA CGAGGAGGCC CTGCGGCTCC AGTTCGCCGC CGACCGTATC GCCCTCGCCG
721    TCGAGTCCGC CCGCCTCGGC GAGCTGGAAC GGCTGCGGCG CGGCTCGCTC TCCTTCCTCG
781    TCGAGGCGTC CGACCTGCTC GCCGGGACTC TCGACCGGGA CCAGACACTC GCGCTGATGG
841    CGCAGATGAC GGTCCCAGCG CTGGCCACCT GGTGTGCCGT CTACACCATC GCCGACCAGT
901    CCTCCGACCC CTATCTCAGC TATGTACTGC ACGAGGACGA GGAACGCATC GACGGGCTGA
961    AGGCGCTGCT GTCCAAGGTT CCCCOCGCGG ACCCGGTGCT GACCCCGGG GCCC GGGTCT
1021   GGGCCGCTCC CGGCCGTGCC GCGCAGCAGG CGGCCCTGCT CACCTCCGG CGCGAACTGG
1081   GTCTCGGCTC CTCGCAGCCG GTCTCCTCCG GCATCGACAC CACGCTCGCG AACC GCCGCG
1141   CCGTCGGCGG TGAGACGGTG GTCCTGCCCC TGGTCGCCC CAACCGCGT ATCGGGATGC
1201   TGACGCTCGG CAAGCCCTCC GACGACC ACT TCCGTCAGGA GATCCTGGAG CTGGCCGAGG
1261   ATCTGTCCCG CCGGCCCGCG CTCGCCCTGG ACAACGCCCG CCTGTACTCG GAGCGCGTGG
1321   CCAACAGCCA GGCCCTCCAG CGCAGTCTGC TCCC GCCGGA GTTGCCCGAG GTCCCGGGTG
1381   TCGAGGTCGA GGT CATCTAT CGCGCGGCGG GCGAGGGCAA CGAGGTCCGC GCGACTTCT
1441   ACGACCTGTT CCCCATCCGC GACGGCGCCT ACGGCTTCGC CATCGGCGAT GTCTGTGGTA
1501   CGGGCCCGCA AGCGGCGGCC GTCACCGGTC TGGCCCGGCA CGCCCTGCGG CTGCTGGCCC
1561   GTGAGGGCTT CGGCGGCCCG GCGGTCTGG AGCGGCTGAA CGCGGCGATC CTCGACGAGG
1621   GGGCCCGCAG CCGCTTCCTC ACCCTGCTCT ATGGCGAGCT GTGGCCCCAG GAGAACGGCG
1681   GAGCCCTGCT GAAGGTCGTC TGCGCGGGCC ATCCCCTGCC GCTCCGGCTG CACCGCGACG
1741   GCACGGTGGA GCCCGCCGCG GAACCTCAGC CGCTGCTGGG TGTCATGGAC GAACTGGAGC
1801   TGTTTCGAGCA GGAGGTCACC CTCGACCCGG GCGATGTCTT GCTGTGCGTC ACCGACGGGG
1861   TCACCGAGCG CCGTGAAGGC AGCCGCATGC TGGGCGACGA GGGCCTCGCC GAAGTCTTCG
1921   CGGGCTGCAA GGGTCTGACG GCCGGCGCGG TCGCCGCGCG GGTCTCAGA GCGGTCGAGC
1981   GCTTCGCCGC GGAGCCCGCG TCCGATGACA TGGCCATCCT CGCCATGCGT GTCCCGGGTC
2041   CGTTCCCGCT CTAG

```

En la secuencia anterior se muestran las regiones empleadas para el diseño de los cebadores sclCF (rojo) y sclCR (azul) con la finalidad de amplificar un fragmento del gen *sclC* (gris). En el sitio de corte *NruI* (amarillo) se insertó el gen de resistencia a apramicina, *aac(3)IV*

Resultados y análisis de resultados.

Para la amplificación de cada uno de los genes se variaron las temperaturas de hibridación en un rango de 62 – 68 °C, obteniéndose un producto de aproximadamente 2000 pb para *sclB* y 2054 pb para *sclC*. La temperatura óptima de hibridación fue 67.8 °C para ambos genes; en esta temperatura se amplificó una banda bien definida, sin productos inespecíficos, tal como se muestra en la fig. 22.

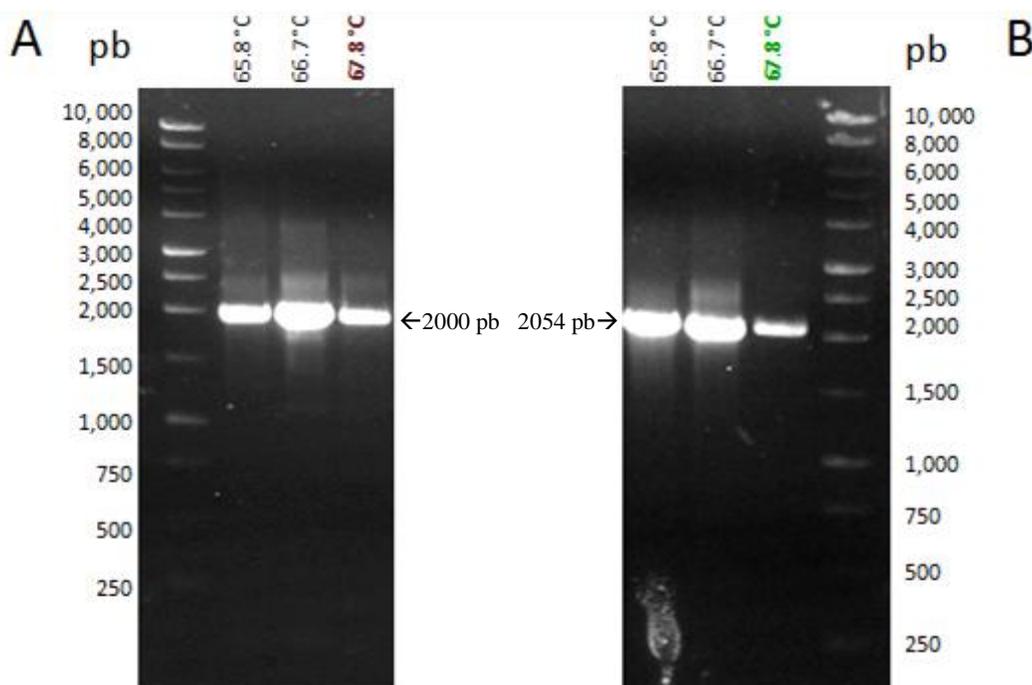


Fig. 22. Productos de amplificación por PCR del gen *sclB* (A) y *sclC* (B), con un tamaño aproximado de 2000 pb y 2054 pb, respectivamente.

Para comprobar que los genes amplificados correspondieran a *sclB* y *sclC*, los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados (Laboratorio Divisional de Biología Molecular, UAM- Iztapalapa) obteniéndose el 99% de identidad para ambos con respecto a la secuencia teórica.

7.2.4. Ligación del gen *sclB* y *sclC* en el plásmido pJET.

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron clonados en el plásmido pJET: para el gen *sclB* se obtuvo un plásmido de 4992 pb, mientras que para el gen *sclC* uno de 5046 pb (Fig. 23). Una vez realizada la ligación y después de obtener colonias transformantes, se seleccionaron al azar 18

Resultados y análisis de resultados.

diferentes colonias resistentes a ampicilina, a las cuales se les realizó la extracción de plásmido por minipreparaciones. Al no mostrar diferencias en el patrón de bandas del plásmido sin digerir, el ADN de una de las minipreparaciones se linealizó con una enzima de restricción de corte único (*Bam*HI) para corroborar que la construcción contenía el inserto de interés y el tamaño correspondiente.

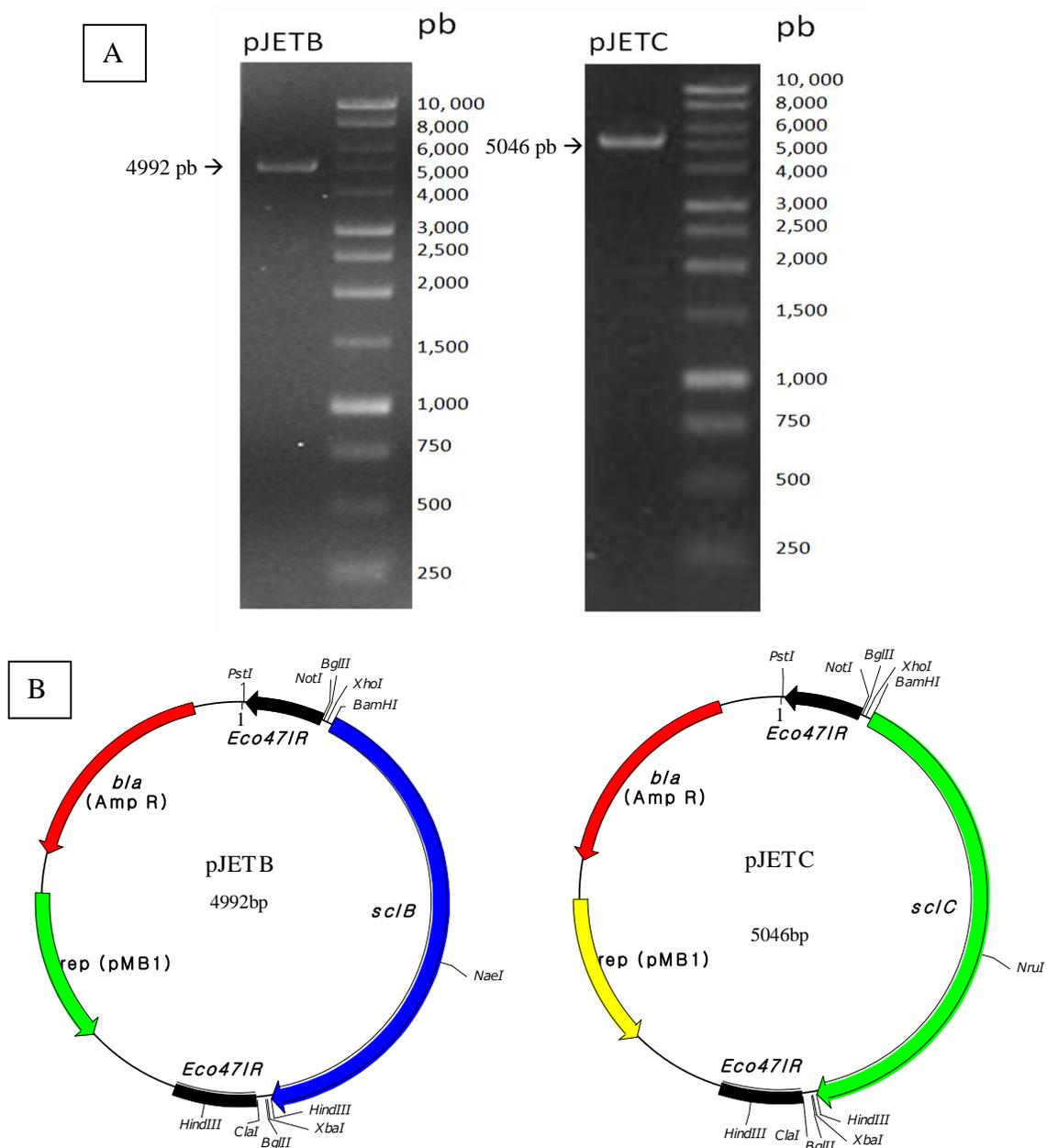


Fig. 23. A) Digestión de los plásmidos pJETB y pJETC con la endonucleasa *Bam*HI. B) Mapas de restricción de los plásmidos pJETB y pJETC, obtenidos de la ligación de los genes amplificados por PCR y el vector comercial pJET.1.2/blunt (Fermentas).

7.2.5. Obtención del gen *aac(3)IV* por PCR.

Para la obtención del gen *aac(3)IV* con su propio promotor, se realizó la amplificación por PCR a partir del plásmido pQM5062, en el cual se encuentra el transposon 5062. Los cebadores diseñados amplifican un fragmento de 1049 pb correspondiente a este gen y se pueden observar en la secuencia siguiente:

Primers utilizados para amplificar el gen *aac(3)IV*.

F-APRA

5' **GCT CAC GGT AAC TGA TGC CG** 3' Tm: 56° C

R- APRA

5' **CAC GTG TTG CCC CAG CAA TC** 3' Tm: 56° C

```

1      GCTCACGGTA ACTGATGCCG TATTTGCAGT ACCAGCGTAC GGCCACAGA ATGATGTCAC
61     GCTGAAAATG CCGGCCTTTG AATGGGTTCA TGTGCAGCTC CATCAGCAAA AGGGGATGAT
121    AAGTTTATCA CCACCGACTA TTTGCAACAG TGCCGTTGAT CGTGCTATGA TCGACTGATG
181    TCATCAGCGG TGGAGTGCAA TGTCGTGCAA TACGAATGGC GAAAAGCCGA GCTCATCGGT
241    CAGCTTCTCA ACCTTGGGGT TACCCCGGC GGTGTGCTGC TGGTCCACAG CTCCTTCCGT
301    AGCGTCCGGC CCCTCGAAGA TGGGCCACTT GGACTGATCG AGGCCCTGCG TGCTGCGCTG
361    GGTCCGGGAG GGACGCTCGT CATGCCCTCG TGGTCAGGTC TGGACGACGA GCCGTTTCGAT
421    CCTGCCACGT CGCCCGTTAC ACCGGACCTT GGAGTTGTCT CTGACACATT CTGGCGCCTG
481    CCAAATGTAA AGCGCAGCGC CCATCCATTT GCCTTTGCGG CAGCGGGGCC ACAGGCAGAG
541    CAGATCATCT CTGATCCATT GCCCCTGCCA CCTCACTCGC CTGCAAGCCC GGTCGCCCGT
601    GTCCATGAAC TCGATGGGCA GGTACTTCTC CTCGGCGTGG GACACGATGC CAACACGACG
661    CTGCATCTTG CCGAGTTGAT GGCAAAGGTT CCCTATGGGG TGCCGAGACA CTGCACCATT
721    CTTCAGGATG GCAAGTTGGT ACGCGTCGAT TATCTCGAGA ATGACCACTG CTGTGAGCGC
781    TTTGCCTTGG CGGACAGGTG GCTCAAGGAG AAGAGCCTTC AGAAGGAAGG TCCAGTCGGT
841    CATGCCTTTG CTCGGTTGAT CCGCTCCCGC GACATTGTGG CGACAGCCCT GGGTCAACTG
901    GGCCGAGATC CGTTGATCTT CCTGCATCCG CCAGAGGGCG GGATGCGAAG AATGCGATGC
961    CGCTCGCCAG TCGATTGGCT GAGCTCATGA GCGGAGAACG AGATGACGTT GGAGGGGCAA
1021   GGTGCGCGCT G ATTGCTGGGG CAACACGTG

```

La temperatura de hibridación en la cual se observó una mejor amplificación del gen *aac(3)IV* fue a 65.7 °C, dicho gen fue clonado en los plásmidos pJETB y pJETC (Fig. 24)

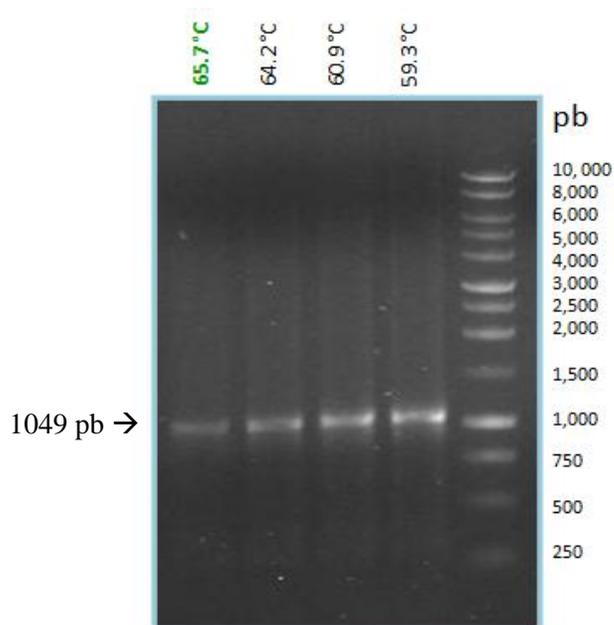


Fig. 24. Amplificación por PCR del gen *aac(3)IV* a diferentes temperaturas de hibridación.

7.2.6. Clonación del gen *aac(3) IV* en los plásmidos pJETB y pJETC

Los genes *sclB* y *sclC* contenidos en los plásmidos pJETB y pJETC, respectivamente, fueron digeridos con las enzimas de corte único *NaeI* para *sclB* y *NruI* para *sclC*, estos cortes se encuentran aproximadamente a la mitad de cada gen; en este sitio se insertó el gen de resistencia a apramicina, *aac(3)IV*, previamente amplificado por PCR, además de servir para la interrupción, este gen también fue empleado para la selección de mutantes. Para favorecer la inserción de este y evitar la religación del plásmido fue necesario tratar los vectores con fosfatasa alcalina.

La ligación se realizó de acuerdo a las condiciones del fabricante y se obtuvieron varias colonias resistentes al antibiótico, a las cuales se les realizó extracción de ADN plasmídico por minipreparaciones (Fig. 25). Los plásmidos obtenidos, que contienen el gen *sclB* y *sclC* interrumpido por el gen *aac(3)IV* se, nombraron respectivamente pJETBA y pJETCA .

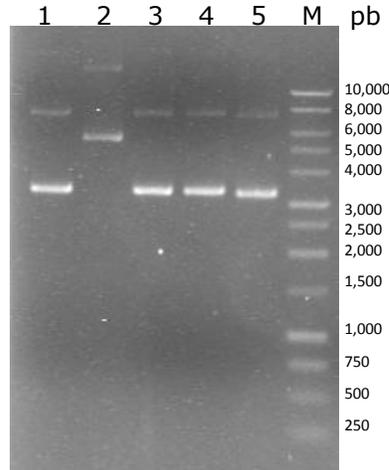


Fig. 25. Extracción de ADN plasmídico por minipreparaciones de transformantes (ligación del plásmido pJETC y el gen *aac(3)IV*). El plásmido proveniente de la colonia del carril 2 posee un tamaño mayor comparado con los de las otras colonias. (M) Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Promega).

A los plásmidos obtenidos se les realizó un análisis de restricción para comprobar su tamaño, corroborando la presencia del inserto de interés. El plásmido pJETBA fue digerido con la enzima *Bam*HI, dando una banda única de aproximadamente 6046 pb (Fig. 26 A-B) y el plásmido pJETCA, digerido con la misma enzima, originó una banda de aproximadamente 6113 pb (Fig. 27, A-B).

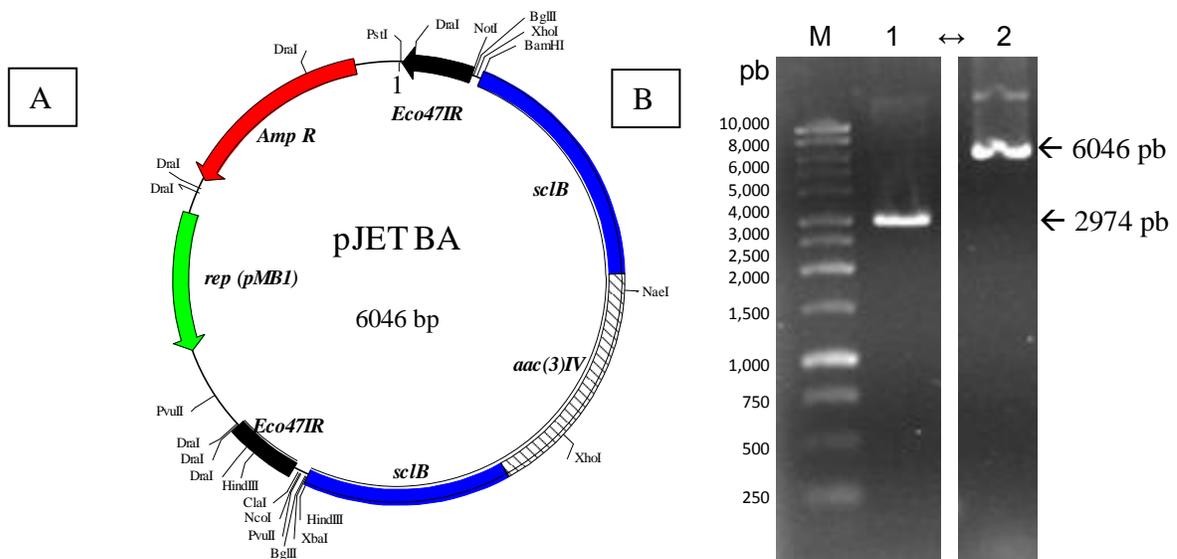


Fig. 26. A) Mapa de restricción del plásmido pJETBA. B) Digestión con *Bam*HI del plásmido (1) pJET, (2) pJETBA y (M) Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega).

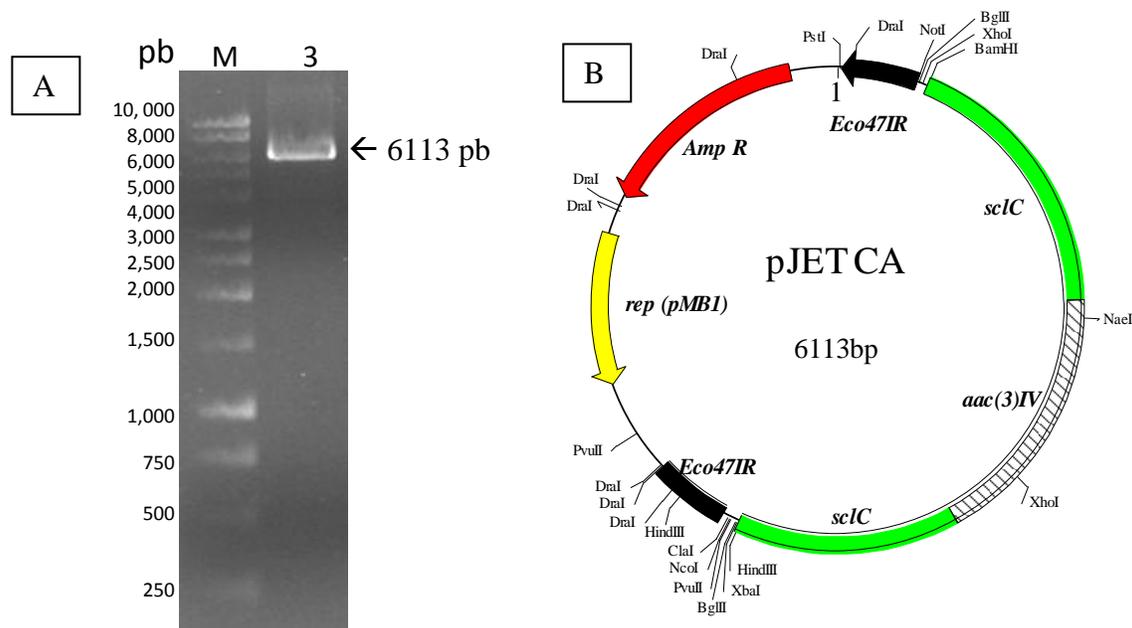
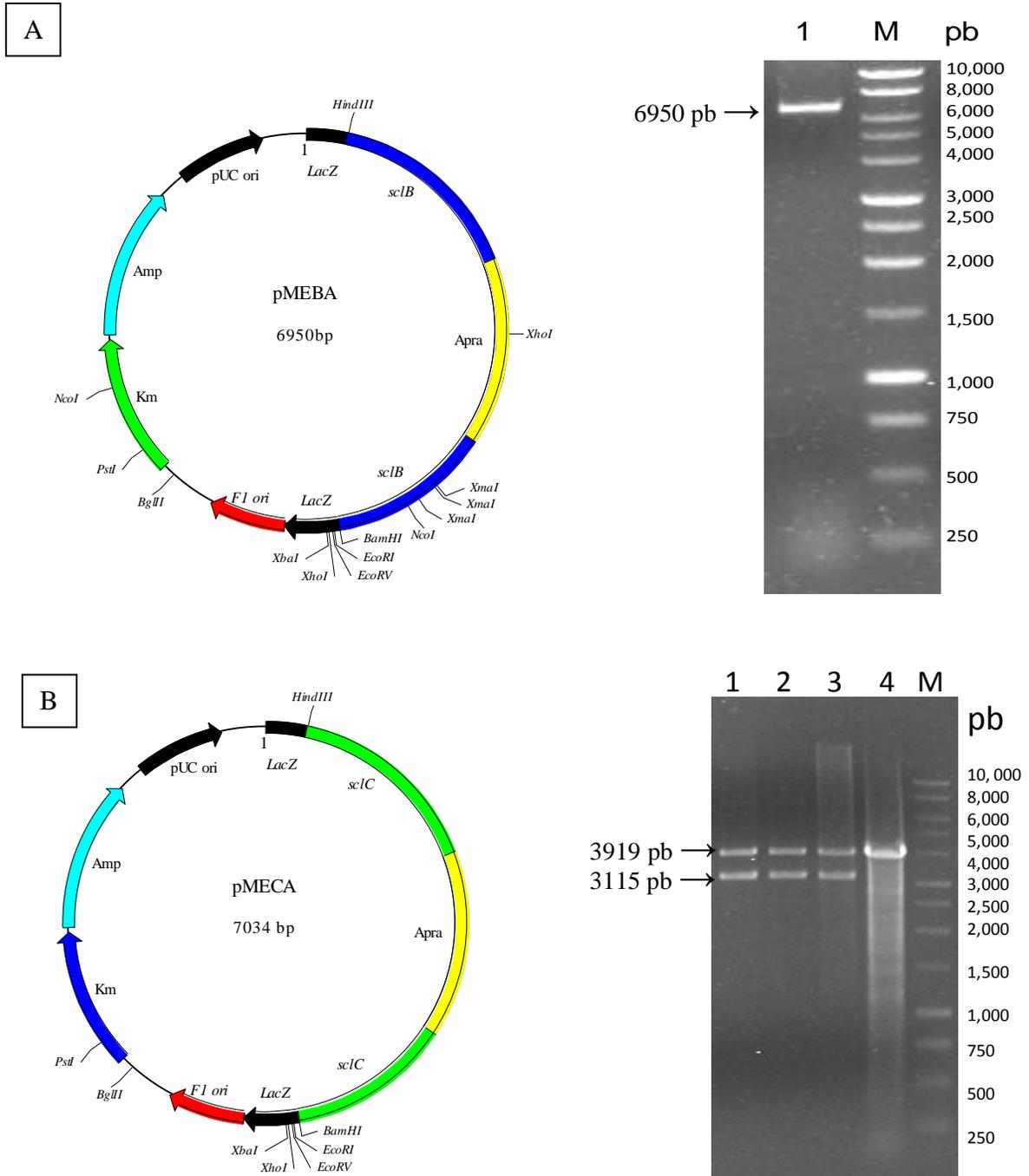


Fig. 27. (A) Análisis de restricción del plásmido (3) pJETCA con la enzima BamHI;(M) Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega). (B) Mapa de restricción del mismo plásmido.

7.2.7. Construcción de los vectores de interrupción pMEBA y pMECA.

Los plásmidos pJETBA y pJETCA fueron digeridos con las enzimas *BamHI* e *HindIII*, con la finalidad de liberar el gen interrumpido del resto del plásmido. Los fragmentos obtenidos fueron purificados y utilizados para la clonación en el plásmido pME6, previamente digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos obtenidos, pMEBA y pMECA, de tamaño 6095 pb y 7034 pb, respectivamente (Fig. 28), fueron purificados de la cepa de *E. coli* IBEC-58 y empleados para transformar *S. clavuligerus* por la técnica de integración en protoplastos. El propósito de esta última clonación es que el plásmido construido no posea un origen de replicación para *Streptomyces*, por lo cual la permanencia de este debe darse únicamente por su inserción en el genoma.



7.3. Transformación y selección de mutantes.

7.3.1. Formación de protoplastos y transformación en *S. clavuligerus*.

La inserción de los plásmidos pMEBA y pMECA en *S. clavuligerus* se llevó a cabo por medio de transformación por protoplastos, los cuales fueron formados después de la incubación de micelio con lisozima (Fig. 29). Una de las consideraciones que se debe tener al introducir ADN a *Streptomyces* es que muchas de estas especies poseen sistemas de restricción altamente activos, es así que el ADN preparado en un huésped diferente a donde se va a introducir, es reconocido como extraño por la cepa receptora y destruido por enzimas de restricción endógenas, para lo cual es necesario la preparación del ADN de la cepa donante y posteriormente transformarlo en la cepa receptora; por ejemplo, el ADN preparado en *E. coli* es altamente atacado por endonucleasas endógenas de *Streptomyces*, sin embargo, el problema puede ser resuelto utilizando una cepa de *E. coli* modificada, deficiente de los sistemas de metilación *dam* y *dcm* (Herron y col., 2006); debido a ello los plásmidos pMEBA y pMECA fueron amplificados en la cepa de *E. coli* IBEC-58, la cual ha sido modificada y presenta mutaciones en los sistemas de metilación *dam*, *dcm*, y *hsd*, lo que permite la estabilidad del ADN exógeno en el interior de *S. clavuligerus*, esencial para que se lleve a cabo la recombinación homóloga.

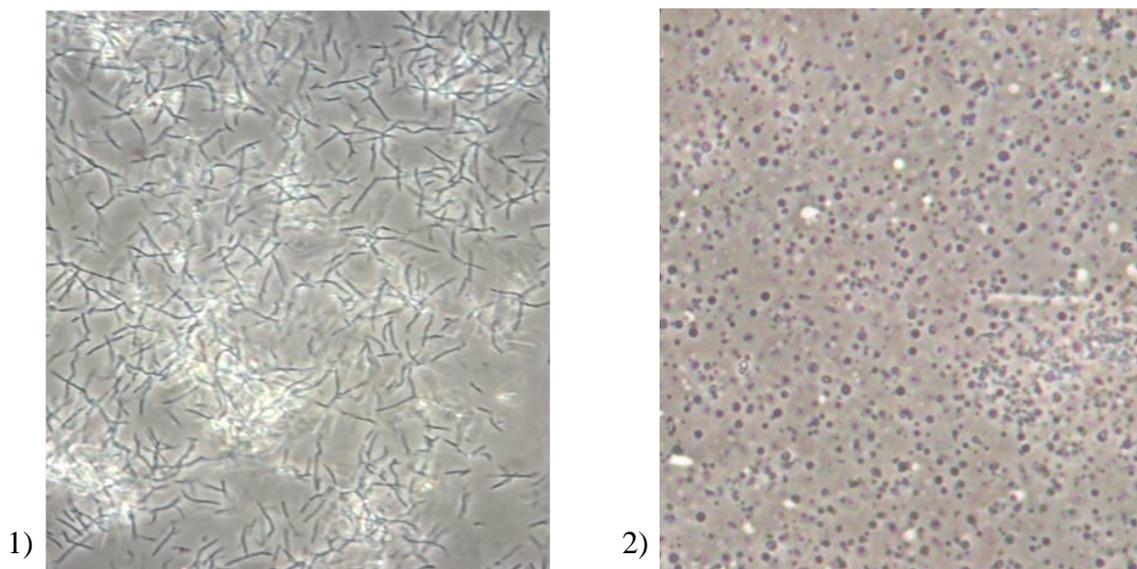


Fig. 29. (1) Micelio de *S. clavuligerus* y (2) protoplastos formados después de 15 min de incubación con lisozima (fotografía tomada de un microscopio de contraste de fases).

Para la transformación se adicionaron 10 μ L de protoplastos por cada microgramo de ADN previamente amplificado y purificado de células de *E. coli* IBEC-58. Se observaron las transformantes a los 10 días de incubación y las colonias obtenidas fueron sembradas en medio MYG con apramicina. Se realizó una réplica de la placa en medio con kanamicina para descartar las colonias que presentaron recombinación simple. Las colonias resistentes a este último antibiótico indican recombinación simple, es decir que todo el plásmido se insertó en el genoma, por lo cual estas mutantes fueron descartadas debido a que el efecto que se observado podría deberse al plásmido más no a la interrupción. Para los posteriores objetivos se emplearon solo las colonias sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina, que indican que se llevó a cabo el reemplazamiento del gen en cuestión (Fig. 13). Las mutantes fueron sembradas hasta la quinta generación antes de realizar la fermentación correspondiente con el objetivo de asegurar la permanecía de la mutación (Jnawali y col., 2008).

7.3.2. Comprobación de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC*.

La interrupción de los genes fue comprobada por PCR de colonia de las mutantes obtenidas, como se describe en la metodología (sección 6.12). Se amplificó el gen completo interrumpido, con los cebadores *sclB*-F y *sclB*-R para el gen *sclB* y con los *sclC*-F y *sclC*-R para el gen *sclC*, amplificándose en los dos casos fragmentos con un tamaño 1049 pb mayor que el gen sin interrumpir, nucleótidos adicionales que corresponden al gen de resistencia a apramicina (Fig. 30, I y II). Asimismo, se realizó otro PCR con el objetivo de amplificar la primera mitad del gen interrumpido y el marcador de resistencia apramicina; para ello se emplearon los *primers forward* (*sclC*-F y *sclB*-F) y el *primer reverse* del gen *aac3(IV)*, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 2000 pb en ambos casos, como se observa en la figura 31.

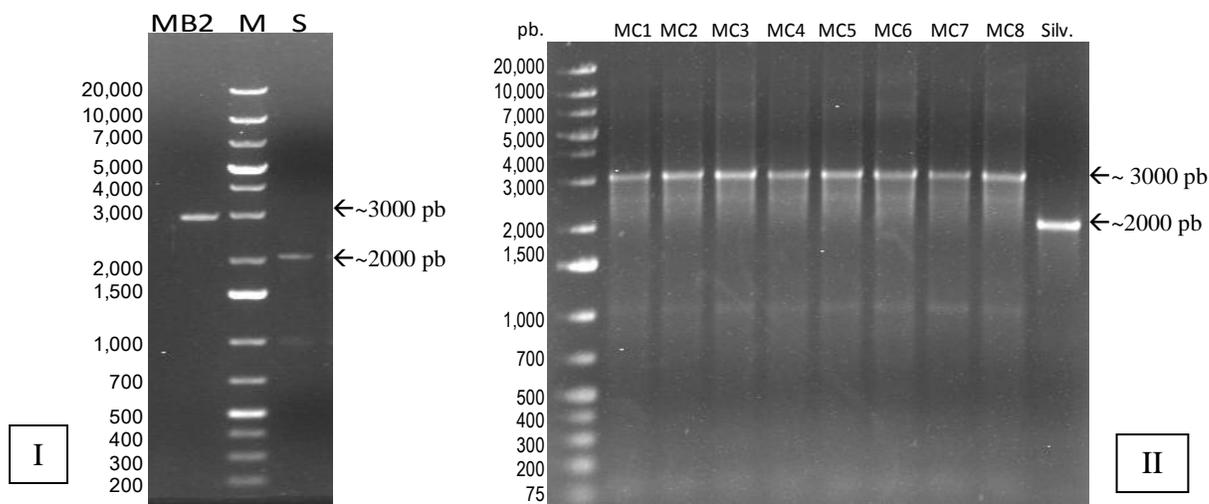


Fig. 30. Comprobación de la interrupción por PCR del gen *sclB* (I) y *sclC* (II). Las mutantes $\Delta sclB$ (MB2) y $\Delta sclC$ (MC1-MC8) presentan un tamaño 1049 pb mayor en comparación con la cepa silvestre (S), confirmando la presencia del gen de resistencia a apramicina.

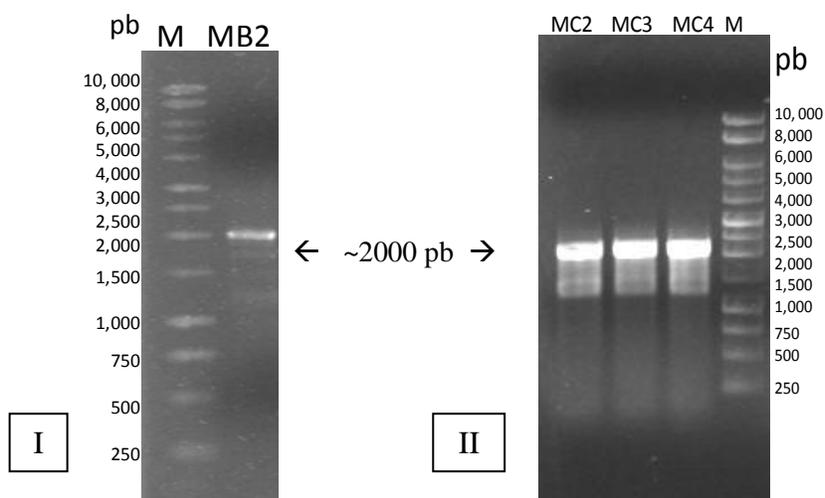


Fig. 31. Comprobación de la interrupción por PCR del gen *sclB* (I) y *sclC* (II), la amplificación se realizó con el primer reverse del gen de resistencia a apramicina y el primer forward de los genes *sclB* y *sclC*, respectivamente.

7.4. Evaluación del efecto en la morfología y producción de AC en *S. clavuligerus* y mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$.

7.4.1. Morfología de las mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$.

Las mutantes obtenidas tanto para el gen *sclB* y *sclC*, aun sin estrés osmótico, presentaron morfología colonial calva o *bald*, fenotipos fácilmente detectables en los que no se observa la formación de micelio aéreo. En la figura 33, se muestra la comparación de las mutantes obtenidas para cada gen con la cepa silvestre, en medio ME sin estrés osmótico. Para observar el efecto del estrés osmótico en la morfología se adicionó al medio ME una concentración 250 mM de KCl. Sin embargo, las mutantes de ambos genes son incapaces de crecer bajo estas condiciones, por lo cual no fue posible determinar el efecto en la producción de AC bajo estrés osmótico.

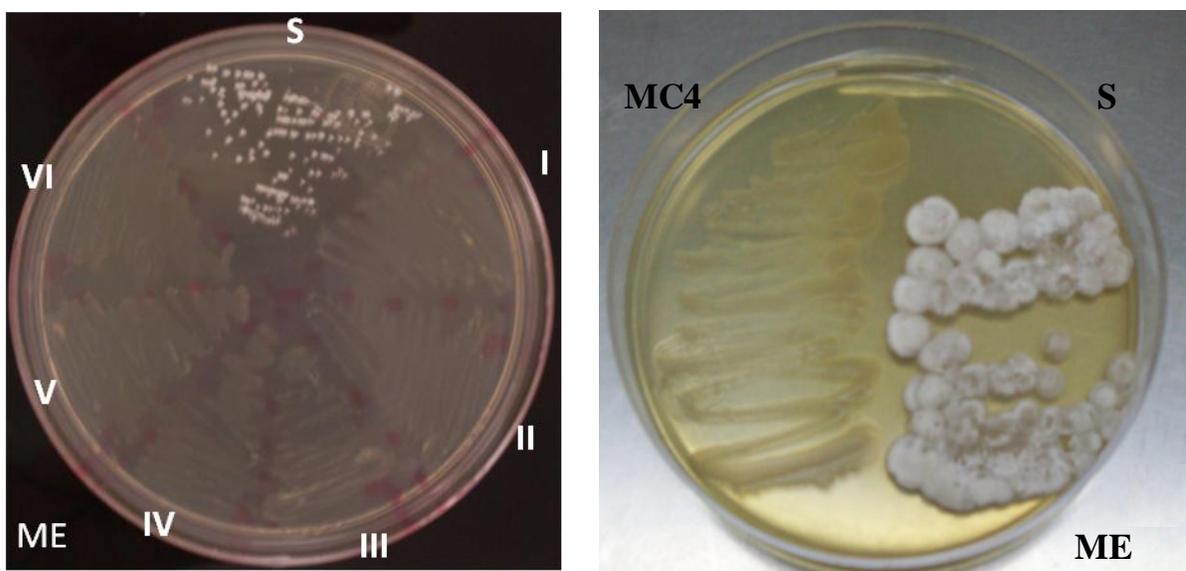


Fig. 33. Mutantes de *S. clavuligerus* $\Delta sclB$ (I-IV) y $\Delta sclC$ (MC4), las cuales carecen de micelio aéreo, en comparación con la cepa silvestre (S), incubadas en medio ME.

En *S. coelicolor* se ha visto que generalmente estas mutantes pierden o se afecta su capacidad de producción de antibióticos (Rokem y col., 2007), tal como ocurre en este trabajo. Se ha encontrado que muchas de las mutantes *bld* reportadas previamente poseen propiedades multifuncionales (pleiotrópicas), debido a que la mutación afecta a múltiples vías, por ejemplo alterando la producción y/o cambios en la morfología (Rokem, 2007). Muchos de los genes *bld*

conocidos codifican para factores reguladores, teniendo un efecto pleiotrópico tanto en la diferenciación morfológica como en la fisiológica (San Paolo, 2007).

7.4.2. Evaluación de la producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus* y mutantes $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$

Una vez realizadas las construcciones con los genes interrumpidos, el siguiente paso, fue evaluar la producción de AC en las cepas transformadas $\Delta sclB$ y $\Delta sclC$. Los parámetros analizados en cada una de las fermentaciones fueron crecimiento y producción de AC.

En cuanto a los efectos de la interrupción del gen *sclB*, se observó una disminución del crecimiento de tres veces en comparación con la cepa tipo (ATCC 27064) a las 24 hrs de cultivo (tiempo en el cual se presenta el pico máximo). Asimismo, la máxima producción volumétrica de AC en ambas cepas se observó a las 48 horas de cultivo, sin embargo, la mutante $\Delta sclB$ produjo aproximadamente 10 veces menos que la cepa silvestre, siendo sus valores máximos de producción 5.56 y 54.06 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dado estos valores, la relación entre la producción y el crecimiento (producción específica) fue de 1.45 μg de AC/mg de biomasa de *S. clavuligerus* $\Delta sclB$ y 5.11 μg de AC/mg de biomasa de *S. clavuligerus* ATCC 27064. Estos resultados se ejemplifican en las siguientes gráficas.

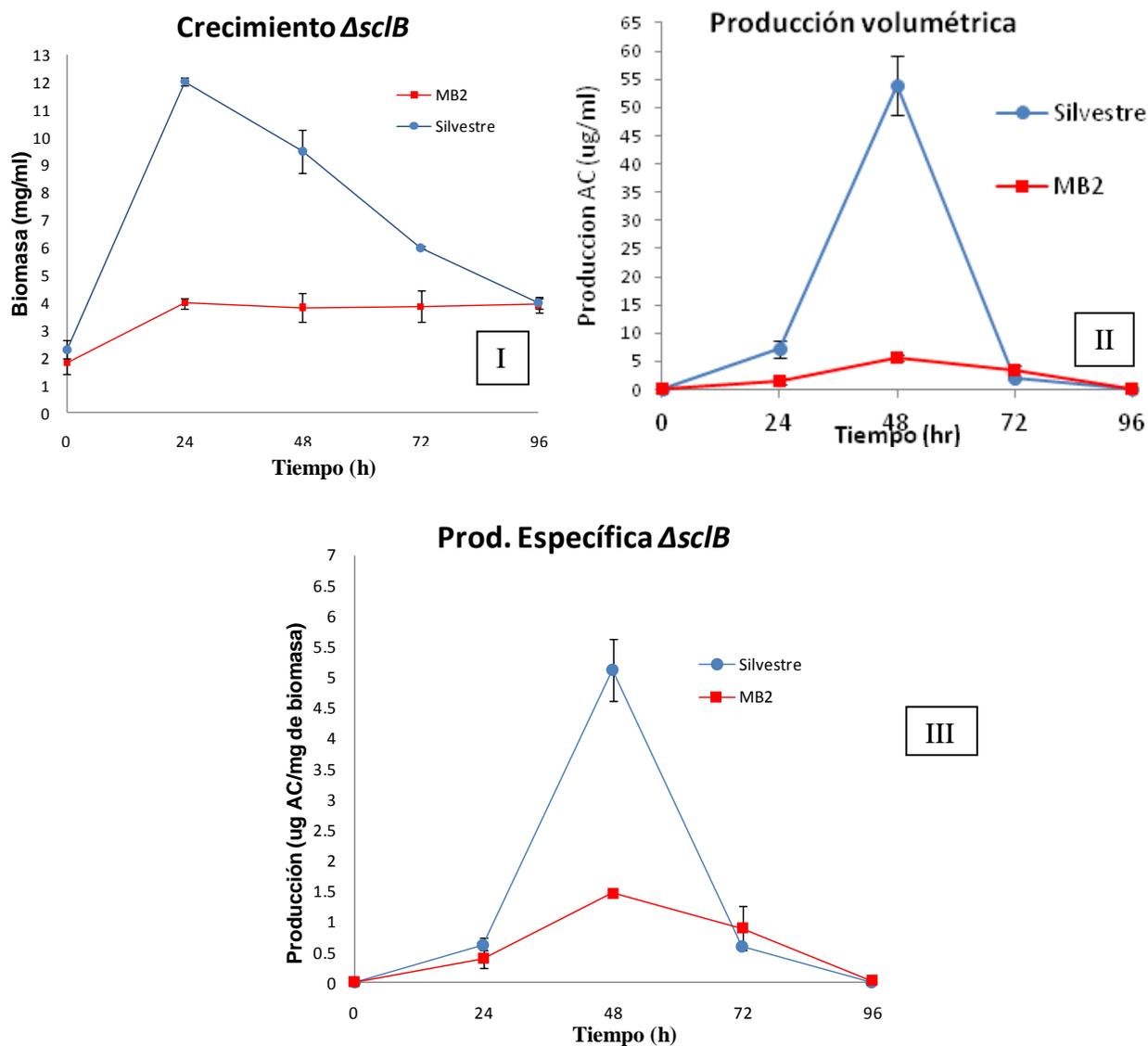


Fig. 34. I) Cinética de crecimiento, II) producción volumétrica y III) producción específica de AC de ■ *S. clavuligerus* $\Delta sclB$ (MB2) y ● *S. clavuligerus* ATCC 27064, en medio de producción A.

Al igual que el efecto observado en $\Delta sclB$, las mutantes $\Delta sclC$ presentaron una deficiencia en el crecimiento y disminuyeron la producción de AC. Sin embargo, a diferencia del caso anterior, la disminución en la producción de AC no fue tan drástica, teniendo un máximo de 12.05 μg de AC/mL a las 72 hrs, mientras que en la cepa tipo se obtuvieron 56.23 μg de AC/mL. La producción específica de la mutante $\Delta sclC$ fue de 4.3 μg de AC/mg de biomasa y la producción máxima se desplazó 24 hrs en comparación con la cepa silvestre.

Resultados y análisis de resultados.

Se realizó la cuantificación de la biomasa y producción de AC de la cepa transformada $\Delta sclC$, mostrando, al igual que en el caso de la mutación $\Delta sclB$, una disminución de la producción y del crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Esta disminución, sin embargo, no fue tan dramática como en el caso de la mutación $\Delta sclB$; asimismo, la producción se desplazó 24 horas.

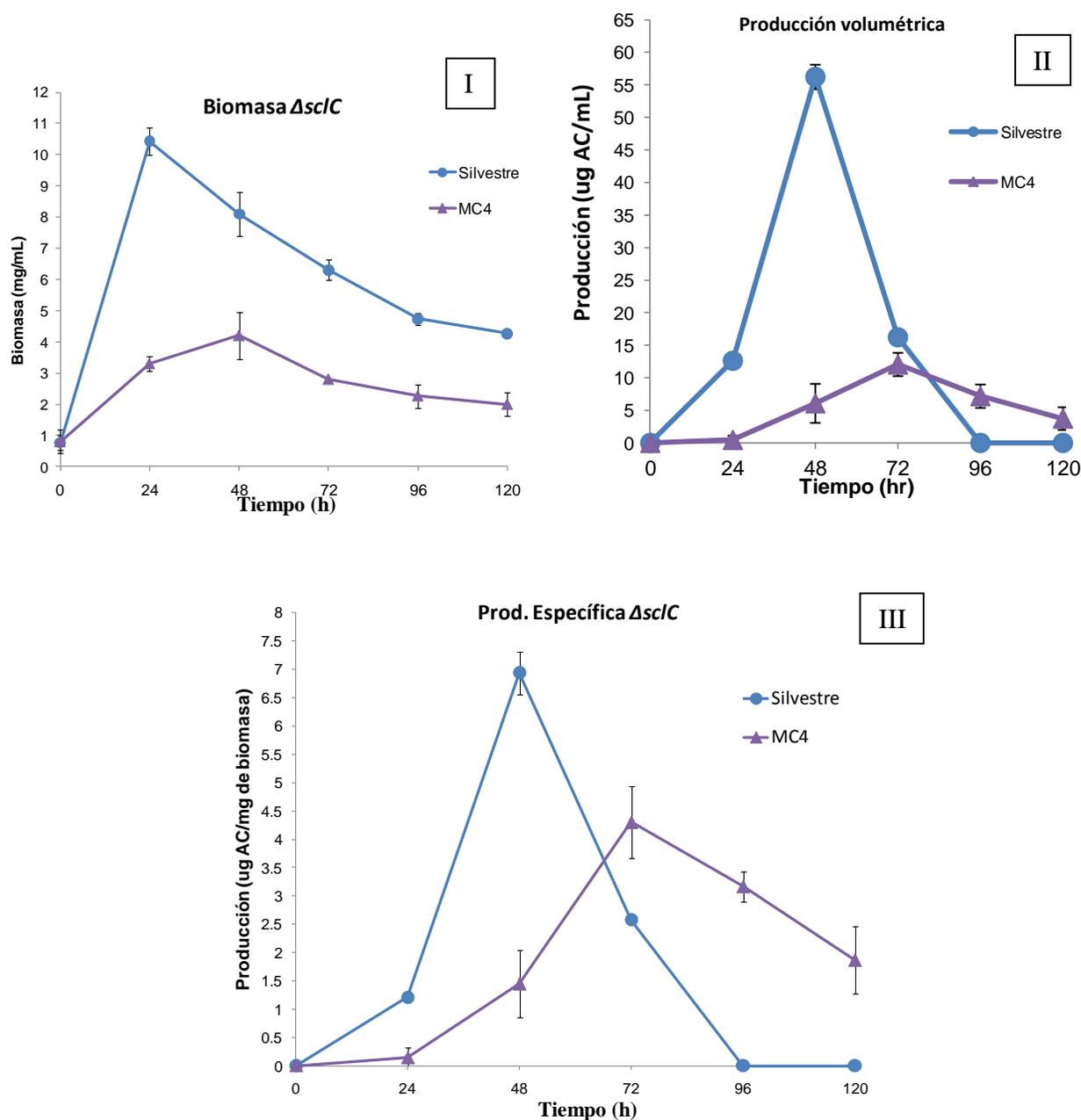


Fig. 35. I) Cinética de crecimiento, II) producción volumétrica y III) producción específica de AC en \blacktriangle *S. clavuligerus* $\Delta sclC$ (MC4) y \bullet *S. clavuligerus* ATCC 27064, en medio de producción A, durante 120 horas de incubación a 28°C

Tomando en consideración que la producción de metabolitos secundarios es un proceso complejo que involucra múltiples niveles de regulación (desde los niveles más bajos que incluyen interacción entre pequeñas moléculas, proteínas reguladoras y promotores hasta los niveles más altos, que incluyen genes que ejercen un control pleiotrópico sobre aspectos del metabolismo secundario, como es la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica) (Antón y col., 2007). Puede suponerse que los genes *sclB* y *sclC* actúan como reguladores en el metabolismo global de *S. clavuligerus*, debido a que su ausencia produce cambios tanto en el crecimiento, diferenciación y producción de AC. Esta misma función se comprueba con la función predicha por su secuencia aminoacídica.

En los trabajos realizados previamente por Bishop (2004) y por Fernández y col. (2009), en los cuales se analizó la posible función de los genes *osaB* y *osaC*, respectivamente, en *S. coelicolor*, se determinó que estos genes están involucrados en la respuesta al estrés osmótico y en la osmoadaptación (figura 8). A diferencia de lo observado en la mutante Δ *osaB* de *S. coelicolor*, la mutante Δ *sclB* de *S. clavuligerus* fue incapaz de crecer bajo condiciones de estrés osmótico (al igual que Δ *sclC*), indicando que estos genes son esenciales en condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, el efecto es mucho más evidente para este microorganismo, ya que incluso en condiciones normales de osmolaridad se observan cambios en el crecimiento, maduración y producción de AC, por lo cual sería de gran importancia determinar los genes que están bajo su regulación.

8. CONCLUSIONES.

- El efecto de la interrupción de los genes *sclB* y *sclC* con el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV*, produjo mutantes *bld*, las cuales mostraron una deficiencia en el desarrollo de hifas aéreas, así como una disminución en la producción de AC. Esto indica que estos genes actúan como reguladores pleiotrópicos del metabolismo de *S. clavuligerus*.
- La composición aminoacídicas de las proteínas SclB y SclC sugiere que poseen una función reguladora, la cual fue confirmada con el efecto de su interrupción.
- Se comprobó que los genes *sclB* y *sclC* son de gran importancia en la producción de AC, ya que su ausencia produce una disminución considerable del antibiótico en comparación con la cepa silvestre.

9. PERSPECTIVAS.

- Dado que al interrumpir los genes *sclB* y *sclC* se observa un decremento en la producción de AC, se tendría que analizar qué sucede cuando se aumenta el número de copias de estos genes.
- *S. clavuligerus* produce una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales están regulados cada uno por diferentes mecanismos. Sería de gran importancia cuantificar los otros metabolitos producidos, con la finalidad de determinar si de igual manera son afectados por las mutaciones.
- Tomando en consideración que los genes *sclB* y *sclC* son reguladores globales en el metabolismo de *S. clavuligerus*, la búsqueda y el análisis de la expresión de los genes que están bajo su regulación podría dar información valiosa.

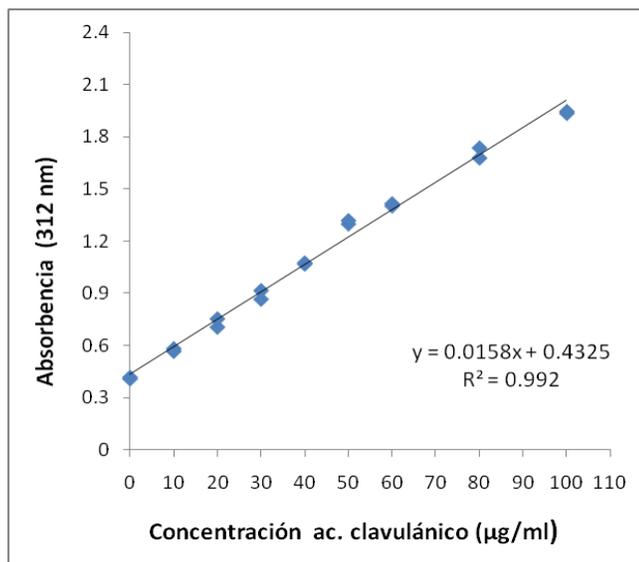
10. ANEXO.

Curva patrón para la cuantificación de ácido clavulánico.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbencia a 312 nm		Diferencia (A-B)
	Tubo A	Tubo B	
0	0.415	0	0.415
0	0.406	0	0.406
10	0.565	0	0.565
10	0.593	0.013	0.58
20	0.72	0.016	0.704
20	0.763	0.011	0.752
30	0.932	0.017	0.915
30	0.924	0.059	0.865
40	1.134	0.06	1.074
40	1.128	0.061	1.067
50	1.304	0.006	1.298
50	1.335	0.017	1.318
60	1.437	0.022	1.415
60	1.416	0.014	1.402
80	1.749	0.013	1.736
80	1.679	0.001	1.678
100	1.946	0	1.946
100	1.949	0.014	1.935

Los datos obtenidos fueron graficados y ajustados a un modelo lineal, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.992, la ecuación obtenida fue la siguiente:

$$[\text{Ácido clavulánico } (\mu\text{g/mL})] = (\Delta \text{ absorbencia }_{(312 \text{ nm})} - 0.4325) / 0.0158$$



11. REFERENCIAS.

- Abraham, E. P., Chain E., **An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.** *Nature*, 1940; 146:837.
- Aharonowitz Y., Demain A. L. **Carbon catabolite repression of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1978; 14:159–164.
- Aharonowitz Y., Cohen G., Martín J. F., **Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation and evolution.** *Annual Review of Microbiology*, 1992; 46:461–495.
- Antón N., Santos-Aberturas J., Mendes M., Guerra S., Martín J. F., Aparicio J., **PimM, a PAS domain positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*.** *Microbiology*, 2007; 153: 3174–3183.
- Babic, M., Hujer A. M., Bonomo R. A., **What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases.** *Drug Resistance Updates*. 2006; 9:142–156.
- Baggaley K. H., Brown A. G., Schofield C. J., **Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams.** *Natural Product Reports*, 1997; 14:309–333.
- Baltz, R. H., **Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*.** *Developments in Industrial Microbiology*, 1980; 21:43–54.
- Baños S., Pérez-Redondo R., Koekman B., Liras P., **Glycerol utilization gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 2009; 75(9):2991–2995.
- Bauernfeind, A., **Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by *Escherichia coli* or *Klebsiella* with plasmidic resistance to third generation cephalosporins.** *Infection*, 1990; 18:48–52.

- Bellido F., Pechére J-C., Hancock R. E. W., **Re-evaluation of the factors involved in the efficacy of β -lactamase against *Enterobacter cloacae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991; 35:73–78.
- Bibb M. J., **Regulation of secondary metabolism in streptomycetes.** *Current Opinion in Microbiology*, 2005; 8:208–215.
- Bird A., Bellis J. M., Gasson B. C., **Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole.** *Analyst*, 1982; 10: 12411– 245.
- Bishop A., Fielding S., Dyson P., Herron P., **Systematic insertional mutagenesis of a *Streptomyces* genome: A link between osmoadaptation and antibiotic production.** *Genome Research*, 2004; 14:893–900.
- Bush K., **β -Lactamase inhibitors - from laboratory to clinic.** *Clinical Microbiology Reviews*, 1988; 1 (1):109–123.
- Carniol K , Ben-Yehuda S., King N., **Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIE and its role in asymmetric division in *Bacillus subtilis*.** *Journal of Bacteriology*, 2005; 187(10):3511–3520.
- Chang C., Stewart R., **The two-component system.** *Plant Physiology*. 1998; 117:723–731.
- Chang H. M., Chen M. Y., Shieh Y. T., Bibb M. J. Chen C. W., **The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin.** *Molecular Microbiology*, 1996; 21:1075–1085.
- Cheung J., Hendrickson W., **Sensor domains of two-component regulatory systems.** *Current Opinion in Microbiology*, 2010; 13:116–123.

- Cho, Y. H., Lee E. J., Ahn B.E., Roe J. H. **SigB, an RNA polymerase σ factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*.** *Molecular Microbiology*, 2001; 42:205–214.
- Cordiés L., Machado L., Hamilton M., **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** *Acta Medica*, 1998; 8 (1):13–27.
- Drawz S. M., Bonomo R. A., **Three decades of β -lactamase inhibitors.** *Clinical Microbiology Reviews*, 2010; 23(1):160–201.
- De la Fuente A., Lorenzana L., Martín J., Liras P., **Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways.** *Journal of Bacteriology*, 2002; 184 (23):6559–6565.
- Elson S. W., Oliver R. S., **Studies on the biosynthesis of clavulanic acid I. Incorporation of ^{13}C -labeled precursors.** *Journal Antibiotics*, 1978; 31:586–592.
- Essack S. Y., **The development of β -lactam antibiotics in response to evolution of β -lactamases.** *Pharmaceutical Research*, 2001; 18(10):1391–1398.
- Fernández M. L., Bishop A., Parkes L., Del Sol R., Salerno P., Sevcikova B., Mazurakova V., Kormanec J., Dyson P., **Osmoregulation in *Streptomyces coelicolor*: modulation of SigB activity by *osaC*.** *Molecular Microbiology*, 2009; 71 (5):1250–1262.
- Flärdh K., Buttner M. J. ***Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.** *Nature Reviews Microbiology*, 2009; 7:36–49.
- García-Domínguez M., Martín J. F., Mahro B., Demain A., Liras P., **Efficient plasmid transformation of the β -lactam producer *Streptomyces clavuligerus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1987; 53 (6):1376–1381.

- Galperin M., **Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations.** *Journal of Bacteriology*, 2006; 188(12):4169–4182.
- González-Cerón G., Miranda-Olivares J. O., Servín-González L. **Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and of the role played by laterally acquired nucleases.** *FEMS Microbiology Letters*, 2009; 301:35–43.
- Gouveia E. R. , Baptista-Neto A., Azevedo A. G., Badino Jr. A. C., Hokka C. O., **Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999; 15:623–627.
- Herron P., Tilley E., Hunter I., (2006), **Molecular Biology of *Streptomyces*.** *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Reino Unido , Segunda edición, vol. 13, pp. 437–460.
- Higgins C. E., Kastner R. E., ***Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -lactam antibiotic producer.** *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1971; 21 (4):326–331.
- Hoch J., Varughese K. I., **Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction.** *Journal of Bacteriology*. 2001; 183 (17):4941–4949.
- Hutchings M. I., Hoskisson P. A., Chandra G., Buttner M. J. **Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3 (2).** *Microbiology*. 2004; 150:2795–2806.
- Jensen S., Paradkar A. S., **Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid.** *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999; 75:125–133.
- Jensen S., Paradkar A. S., Mosher R. H., Anders C., Beatty P. H., Brumlik M. J., Griffin A., Barton B. **Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48:192–202.

- Jnawali H., Tae-Jin Oh, Kwangkyoung L., Byoung Chul Park, Jae Kyung Sohng A, **Two-component regulatory system involved in clavulanic acid production.** *Journal of Antibiotics*, 2008; 61(11):651–659.
- Kieser T., Bibb M., Buttner M. J., Chater K., Hopwood D., **Practical *Streptomyces* genetics.** Norwich, Inglaterra. The John Innes Foundation, 2000.
- Krell T., Lacal J., Busch A., Silva-Jiménez H., Guazzaroni M., Ramos J., **Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals.** *Annual Review of Microbiology*, 2010; 64:539–59.
- Kuo-Cheng C., Yun-Huin L., Cheng-Min T., Chen-Hao H., Jer-Yiing H. **Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding.** *Biotechnology Letters*, 2002; 24:455–458,
- Laub M. T., Goulian M., **Specificity in two-component signal transduction pathways.** *Annual Review of Genetics*, 2007; 41:121–145.
- Lee E. J., Cho Y., Kim H. Ahn B., Roe J., **Regulation σ^B of by an anti- and an anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor* in response to osmotic stress.** *Journal of Bacteriology*, 2004;186(24):8490–8498.
- Lee S. D., Park S. W., Oh K. K., Hong S. I., Kim S.W., **Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*.** *Letters in Applied Microbiology*. 2002; 34:370–375.
- Li R., Townsend C. A. **Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*.** *Metabolic Engineering*, 2006; 8:240–252
- Liras P., Martín J. F. **Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*.** *Methods in Biotechnology*. 2005; 18:149–163.

- Liras P., Martín J. F., **Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from, where did they originate?.** *International Microbiology*, 2006; 9:9–19
- Liras P., Rodríguez-García A., **Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor biosynthesis and molecular genetics.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000; 54:467–475.
- Liras P., Gomez-Escribano J., Santamarta I., **Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008; 35:667–676.
- Livermore D. M., **β -lactamases in laboratory and clinical resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8:557–584.
- Lowy F. D. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(9):1265–1273.
- Magalhaes M. L, Blanchard J. S., **The kinetic mechanism of AAC3-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*.** *Biochemistry*. 2005; 44 (49):16275–16283.
- Martín J. F., **Phosphate regulation of gene expression of candicidin biosynthesis.** *Microbiology*, 1976; 548–552.
- Martín J. F., Liras P., **Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*.** *Current Opinion in Microbiology*, 2010; 13:263–273.
- Medema M. H., Trefzer A., Kovalchuk A., van den Berg M., Müller U., Heijne W., Wu L., Alam M. T., Ronning C. M., Nierman W. C., Bovenberg R. A. L., Breitling R., Takano E. **The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways.** *Genome Biology and Evolution*, 2010.

- Mellado E., Lorenzana L. M., Rodríguez-Saíz M., Díez B., Liras P., Barredo J. L., **The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the car gene.** *Microbiology*, 2002; 148:1427–1438.
- Miller, J. H., **Experiments in molecular genetics.** Nueva York, E. U. A., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1972. pp. 352–355.
- Mitrophanov A., y Groisman E., **Signal integration in bacterial two-component regulatory systems.** *Genes and Development*, 2008; 22:2601–2611
- Newton G. G., Abraham E. P., **Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid.** *Nature*, 1955; 75:548.
- Nieselt K., Battke F., Herbig A., Bruheim P., Wentzel A., Jakobsen O. M., Sletta H., Alam M. T., Merlo M. E., Moore J., **The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*.** *BioMed Central Genomics*, 2010; 11:10.
- Pérez-Llarena F., Liras P., Rodríguez-García A., Martín J. F. **A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulánico acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds.** *Journal of Bacteriology*, 1997; 179:2053–2059.
- Pérez-Redondo R., Rodriguez-Garcia A., Martin J. F., Liras P., **Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit.** *Journal of Bacteriology*, 1999; 181:6922–6928.
- Poole K., **Resistance to β -lactam antibiotics.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004; 61:2200–2223.
- Revilla G., Lopez-Nieto M. J., Luengo J. M., Martin J. F. **Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillin chrysogenum*.** *Journal of Antibiotics*. 1984; 37:781–789.

- Rodríguez V. C., Rosabal S., Morales P. y Vallín P. C., **Evaluación de la capacidad de producción de antibióticos por la cepa *Streptomyces diastaticus* SQF108 modificada genéticamente.** *CENIC Ciencias Biológicas*, 2005; 36(2):93–96.
- Rokem S., Lantz A., Nielsen J., **Systems biology of antibiotic production by microorganisms.** *Natural Product Report.*, 2007; 24:1262–1287.
- Sambrook J., Russell D. W., (2001), **Molecular cloning: a laboratory manual.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, E.U.A.*, tercera edición.
- Sánchez L., Braña A. F., **Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.** *Microbiology*, 1996; 142:1209–1220.
- San Paolo S. **Characterization of regulatory pathways controlling morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*.** 2007; Tesis Doctoral, Facultad de ciencias. Universidad de Basel, Suiza.
- Saudagar P. S., Singhal R. S., **Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*.** *Bioresource Technology*, 2007; 98:2010–2017.
- Saudagar P. S., Shrikant A. S., Rekha S. S., **Clavulanic acid: a review.** *Biotechnology Advances*, 2008; 26:335–351.
- Skeggs P., Holmes D., Cundliffe E., **Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes.** *Journal of General Microbiology*, 1986; 133:915–923.
- Sola-Landa A., Moura R. S., Martín J. F., **The two component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100:6133–6138.

- Song J. Y., Kim S. Eun., Kim W. D., Jensen S., Lee J. K. **A gene located downstream of the clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 encodes a putative response regulator that affects clavulanic acid production.** *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2009; 36:301–311.
- Song J. Y., Jensen S. E., Lee J. K., **Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010; 88:659–669.
- Stock A., Robinson L., Goudreau P., **Two-component signal transduction.** *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69:183–215.
- Suárez C., Guidol F., **Antibióticos betalactámicos.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009; 27 (2):116–129.
- Townsend C. A., Li R., Khaleeli N., **Improvement of clavulanic acid production.** 2001. WO0119959.
- Tristram S., Jacobs M., Appelbaum P., **Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(2):368–389.
- Valentine B. P., Bailey C. R., Doherty A., Morris J., Elson S. W., Bagley K. H. **Evidence that arginine is later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*.** *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1993; 1210–1211.
- Van Dessel W., Van Mellaert L., Geukens N., Anné J., **Improved PCR-based method for the direct screening of *Streptomyces* transformants.** *Journal of Microbiological Methods*, 2003; 53 (3):401–403.
- Vrancken K., Van Mellaert L., Anné J. **Cloning and expression vectors for a gram-positive host, *Streptomyces lividans*.** *Methods in Molecular Biology*, 2010, 668:97–107.

- Wolanin P. M., Thomason P. A., Stock J. B. **Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom.** *Genome Biology*, 2004; 3 (10):3013.1–3013.8.