



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL PAPEL DEL GEN *rifP* EN LA
BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA**

T E S I S

que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

Angel Eduardo Absalón Constantino



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
unidad iztapalapa

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DEL PAPEL DEL GEN *rifP* EN LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA

V^oB^o



Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Alvarez
(DIRECTOR)

Dr. Francisco José Fernández Perrino
(ASESOR)

Miembros del Jurado:

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Presidente)

Dr. Javier Barrios González (Secretario)

Dr. Octavio Loera Corral (Vocal)

Dr. Sergio Sánchez Esquivel (Vocal)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
unidad iztapalapa

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DEL PAPEL DEL GEN *rifP* EN LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA

V^oB^o

Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Alvarez
(DIRECTOR)

Dr. Francisco José Fernández Perrino
(ASESOR)

Miembros del Jurado:

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Presidente) _____

Dr. Javier Barrios González (Secretario) _____

Dr. Octavio Loera Corral (Vocal) _____

Dr. Sergio Sánchez Esquivel (Vocal) _____

A Diana, Sebastián y Leonardo,

AGRADEZCO EL APOYO ECONÓMICO DEL CONACYT OTORGADO A TRAVES DE LA BECA-CRÉDITO NÚMERO DE BECARIO 17300

DE IGUAL MANERA AGRADEZCO LA SUBVENCIÓN DE MATERIAL Y EQUIPO PROPORCIONADA POR EL PROYECTO DE CONVENIO SEP-2003-CO2-44911. PAPEL DE LOS CITOCROMOS P450 EN LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA POR *Amycolatopsis mediterranei*.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Francisco J. Fernández Perrino por toda su ayuda brindada durante toda mi estancia en el laboratorio, desde el Servicio Social, PDI y ahora la tesis de maestría. Sin sus consejos, estoy convencido de que no hubiera logrado clonar el primer plásmido. Pero el agradecimiento también lo hago extensivo al plano personal, ya que no es solo mi mentor, sino un gran amigo. Gracias.

También deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Armando Mejía por la ayuda otorgada tanto en el ámbito científico como personal, y la confianza que ha depositada en mi todos estos años.

A Jaime Marcial Quino por ayudarme a sacar los tubos o matraces de la incubadora, revelarme el gel, y ayudarme con los tubos cuando tenía que cortar el gel para aislar los fragmentos de ADN. También por acompañarme durante las largas noches en que estudiábamos para los cursos teóricos, y escucharme todas las locuras que planeaba, que sirvieron para ayudarme a aterrizar mis ideas.

También agradezco a mis compañeros de laboratorio que alguna vez me ayudaron: a Vero Flores que siempre me dejaba su arroz a la hora de la comida, a Bety que me ayudó durante mis primeros meses en el laboratorio, a Edgar Sierra que siempre me ayudo a resolver problemas cuando no me salían las técnicas, a Pedro Cortés por ayudarme cuando tenía mucho trabajo y a Roberto, que aunque lo acabo de conocer se ha convertido en un gran amigo. También quiero agradecer a Rocío Suárez, Jesús Baños por su amistad, Sandra Pérez, Tania Cuadra, Juan Carlos y Priscila.

Por otro lado, y por ser los más importantes los he dejado al final.

A mis papas por apoyarme en todo, aún cuando mis decisiones no siempre fueron las correctas.

A Sebastián y Leo por enseñarme las cosas más importantes de la vida. Gracias por estar conmigo.

A Veronipa quiero agradecerle más que a nadie que me ayudara a decidir lo que quería en la vida, como esta maestría. Por dejarme tiempo para trabajar, cuando deberías estar juntos, y con anticipación quiero agradecer tu ayuda en el siguiente paso que voy a dar, porque se que vas a estar “comigo”. Te amo.

RESUMEN

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas cuya importancia biotecnológica radica en su capacidad de producir un gran número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los antibióticos. La rifamicina es un antibiótico producido por *A. mediterranei* cuya importancia farmacológica radica en tener actividad contra el microorganismo causante de la tuberculosis y otras micobacterias.

Durante la segunda mitad del siglo pasado se incrementaron los estudios para el mejoramiento genético de actinomicetos con miras a incrementar los niveles de producción. Se identificaron una gran cantidad de genes involucrados en el metabolismo secundario de los actinomicetos. Dentro de ellos se han encontrado genes involucrados en la resistencia y exportación de los antibióticos propios de cada microorganismo productor. Sin embargo, se ha puesto poca atención el papel que juegan estos genes en la regulación de los niveles de producción. Pues puede presentarse un efecto tóxico propio de la actividad del antibiótico que sintetizan cuando las concentraciones del mismo son altas lo que marca un límite en la producción en cepas industriales de alta producción.

En microorganismos eucariontes que producen antibióticos como *Penicillium chrysogenum* productor de penicilina, los antibióticos son concentrados en vesículas membranales internas que posteriormente son liberados al medio por exocitosis. Sin embargo los organismos procariontes no son capaces de formar tales vesículas, por lo que tienen que exportan el producto por un sistema de transporte de membrana. Se han identificado en muchos actinomicetos proteínas de membrana que funciona como una bomba exportadora de antibiótico. Tal es el caso de *Streptomyces pristinaespiralis*, productor de pristinamicina en quien el gen *ptr* codifica una proteína responsable de la exportación de dicho antibiótico mediante un sistema antiport, pristinamicina/protón.

Por otro lado, en 1998 August *et al.* reportaron la secuencia de nucleótidos de los genes involucrados en la biosíntesis de rifamicina. Dentro del cluster, encontraron 34 marcos abiertos de lectura, uno de los cuales, denominado *rifP* presenta un 66.1% de homología con el gen *ptr* de

Streptomyces pristinaespiralis, mientras que a nivel protéico RifP y Ptr tienen una similitud de 81.2%. Como se mencionó Ptr en *S. pristinaespiralis* actúa como una proteína transmembranal exportadora de pristinamicina, y con base en esta homología pensamos que el gen *rifP* codifique para una proteína que tenga la función de exportar la rifamicina.

Para probar nuestra hipótesis, diseñamos un método de silenciamiento por ARN antisentido para inactivar la expresión del gen *rifP*. Para esto fue necesario la construcción de un vector plasmídico de expresión con replicación autónoma en *A. mediterranei*.

El módulo de expresión *rifP_{as}* se construyó en el plásmido pBluescript® utilizado el terminador del gen *asd* de *Amycolatopsis lactamdurans* (Tasd) y el promotor del gen de resistencia a eritromicina modificado (*PermE**). El gen *rifP* fue amplificado por PCR a partir del ADN total de *A. mediterranei* S699, y clonado en el plásmido pGEM-T® (Promega). Posteriormente el gen *rifP* se subclonó en el sitio *Bam*HI existente entre promotor y terminador. Se seleccionaron los vectores que contenían el gen *rifP* antisentido con respecto al promotor. El módulo de expresión (promotor, gen y terminador) fue subclonado a un vector de replicación autónoma de *Amycolatopsis* junto con el gen de resistencia a eritromicina como marcador de selección.

El plásmido construido llamado pUAMAE5 contenía todos los elementos necesarios para silenciar al gen *rifP*. Utilizando este plásmido se transformó la cepa S699 de *A. mediterranei* mediante una técnica diseñada durante el desarrollo de esta tesis basada en la electroporación.

La producción de rifamicina de la cepa transformante denominada *A. mediterranei rifP_{as}* se comparó con la de la cepa parental S699 en condiciones de producción, encontrándose que el silenciamiento del gen *rifP* ocasiona una disminución de la producción de un 80 %.

I. Presentación	I
II. Miembros del jurado	II
III. Dedicatoria	III
IV. Agradecimientos	IV
V. Resumen	VII
VI. Índice	X
VII. Abreviaturas	XVI
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1 Biosíntesis de rifamicina.	3
2.2 Factores que afectan la biosíntesis de rifamicina.	8
2.3 Mecanismos de resistencia a productos en actinomicetos productores de antibióticos.	9
2.3.1 Bloqueo del paso al interior de la célula.	11
2.3.2 Modificación directa sobre el antibiótico.	11
2.3.3. Modificaciones en los sitios de acción.	11
2.3.4 Sistemas de excreción mediado por proteínas integrales de membrana.	13
2.4 El conjunto de genes de biosíntesis de rifamicina.	16

3. Justificación.	17
4. Hipótesis.	19
5. Objetivos.	20
6. Materiales y métodos.	21
6.1 Microorganismos.	21
6.1.1 Conservación de los microorganismos.	22
6.1.2 Condiciones de cultivo de los microorganismos.	23
6.2 Plásmidos.	24
6.3 Medios de cultivo.	26
6.3.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .	26
6.3.2 Medios de cultivo para <i>A. mediterranei</i> .	27
6.3.3 Antibióticos y suplementos.	31
6.4 Aislamiento de ADN.	32
6.4.1 Aislamiento de ADN plasmídico.	32
6.4.1.1 MiniPreparaciones.	32
6.4.1.2 MegaPreparaciones.	33
6.4.1.3 Preparaciones rápidas.	34
6.4.1.3 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>A. mediterranei</i> .	35

6.4.2 Aislamiento de ADN total de <i>A. mediterranei</i> .	36
6.5 Purificación de ADN.	37
6.5.1 Eliminación de ARN de las muestras de ADN.	37
6.5.2 Eliminación de proteínas de las muestras de ADN.	37
6.6 Diseño de cebadores para PCR.	38
6.7 Diseño de la secuencia de terminación.	38
6.8 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).	38
6.8.1 Condiciones de reacción y amplificación.	40
6.9 Clonación de productos de PCR en el plásmido pGEM [®] -T.	41
6.9.1 Protocolo de ligación usando el plásmido pGEM [®] -T.	42
6.10 Digestión y ligación de fragmentos de ADN.	43
6.11 Purificación de las muestras de ADN de ADN.	43
6.12 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.	44
6.13 Aislamiento y purificación de ADN a partir de geles de agarosa.	43
6.14 Transformación de los microorganismos con ADN plasmídico.	47
6.14.1 Transformación de <i>E. coli</i> .	47
6.14.1.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> por el método del cloruro de rubidio.	47

6.14.1.2 Procedimiento de transformación de células de <i>E. coli</i> .	48
6.14.2 Transformación de <i>A. mediterranei</i> .	48
6.14.2.1 Preparación de la células de <i>A. mediterranei</i> .	49
6.14.2.2 Transformación de <i>A. mediterranei</i> .	49
6.15 Evaluación de rifamicina en <i>A. mediterranei</i> .	50
6.15.1 Condiciones de producción.	50
6.15.2 Cuantificación de rifamicina.	51
6.15.3 Cuantificación de biomasa.	51
7. Resultados.	53
7.1 Diseño de un sistema de silenciamiento con ARN antisentido.	53
7.1.1 Construcción del módulo de expresión del gen <i>rifP</i> , sentido y antisentido.	53
7.1.1.1 Promotor.	54
7.1.1.2 Gen <i>rifP</i> .	54
7.1.1.3 Terminador.	55
7.1.2 Inserción del terminador en pBluescrip [®] KS(+).	57
7.1.3 Subclonación del promotor <i>Perme</i> del plásmido pBKSVH en pAET1.	57

7.1.4 Amplificación del gen <i>rifP</i> por PCR.	60
7.1.5 Clonación del gen <i>rifP</i> en el plásmido pAEPT1 en dirección antisentido.	65
7.2 Construcción de un plásmido de replicación autónoma y seleccionable en <i>A. mediterranei</i> .	68
7.2.1 Construcción del plásmido pUAMAE2.	68
7.2.1.1 Restricción de los plásmidos donantes.	68
7.2.1.2 Análisis de transformantes.	70
7.2.2 Construcción del plásmido pUAMAE5.	73
7.3 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699.	76
7.3.1 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699 con el plásmido pUAMAE2.	76
7.3.2 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699 con el plásmido pUAMAE5.	77
7.4 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>A. mediterranei</i> .	78
7.5. Evaluación de la producción de rifamicina en cultivo sumergido.	79
8. Discusión de resultados.	82
8.1 Diseño de un sistema de silenciamiento con ARN antisentido.	82
8.2 Construcción del sistema de expresión.	84
8.3 Elección del vector de replicación, y del marcador de selección.	84

8.4 Diseño del módulo de expresión para <i>A. mediterranei</i> .	85
8.5 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699.	86
8.5.1 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699 con el plásmido pUAMAE2.	86
8.5.2 Transformación de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699 con el plásmido pUAMAE5.	89
8.6 Evaluación de la producción de rifamicina en <i>A. mediterranei</i> S699 y rifP _{as} .	90
9. Conclusiones.	92
10. Perspectivas.	94
11. Referencias.	95

ABREVIATURAS

IPTG	Isopropil tio β D Galactosido
X- Gal	5 bromo, 4 cloro, 3 indol β D Galactosido
AHBA	ácido 3-amino-5-hidroxibenzóico
PEG	Poli-Etilenglicol
PM	Peso molecular
<i>rifP</i> _{as}	<i>rifP</i> antisentido
<i>rifP</i> _s	<i>rifP</i> sentido
pb	Pares de base
kb	kilo bases (1kb=1000pb)
mm	milímetros
nm	nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
ddH ₂ O	H ₂ O desionizada
g	gramos
ng	nanogramos
min	minutos
s	segundos
h	horas

1. INTRODUCCIÓN.

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas cuya importancia biotecnológica radica en su capacidad para producir un gran número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran antitumorales, ionóforos, coccidiostáticos, antihelmínticos, inmunosupresores, herbicidas, pigmentos y antibióticos, entre otros. Estas características metabólicas han destacado a los actinomicetos como el principal grupo de microorganismos en cuanto a su aportación en la salud y economía del hombre (Demain, 1997).

Uno de estos actinomicetos, caracterizado en primera instancia como *Streptomyces mediterranei* (Sensi *et al.*, 1959), y posteriormente como *Amycolatopsis mediterranei* (Lechevalier *et al.*, 1986) fue aislado en un bosque de pinos de Francia. Su importancia biotecnológica radica en la capacidad de producir rifamicina, un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (particularmente a *Mycobacterium tuberculosis*, el microorganismo causante de la tuberculosis, y otras micobacterias). Su producción a nivel industrial comenzó en 1962 en Milán Italia.

La rifamicina actúa inhibiendo la síntesis de RNA, al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa. Esta unión no impide el inicio de la traducción, sino que disminuye la afinidad de la ARN polimerasa por la cadena de ADN, lo que ocasiona que no se transcriban completos los genes (Wehrli y Stachlin, 1971).

A partir de la última década del siglo pasado se han intensificado las investigaciones enfocadas al estudio de los mecanismos de regulación y de los genes implicados en la biosíntesis de rifamicina con el fin de incrementar la producción de dicho antibiótico.

Dos de los factores importantes que determinan los niveles de producto generado, entre otros, son la capacidad de resistencia a su propio producto y la capacidad de excretarlo al medio. Algunos microorganismos como *A. mediterranei* que producen antibióticos son susceptibles de sufrir daños si la concentración intracelular de producto es excesiva. Para evitar esto los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a su producto. El estudio y control de dichos mecanismos de resistencia es un abordaje interesante, por tanto, para poder incrementar la producción de los antibióticos.

2. ANTECEDENTES.

2.1 BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA

La rifamicina es un antibiótico que pertenece al grupo de las ansamicinas, llamadas así por tener una cadena “ansa” incluida en la molécula. La rifamicina B (Fig. 2.1) está formada básicamente por *i*) un cromóforo, que tiene su origen en el metabolismo primario, en la vía del aminosikimato (una ramificación de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos) y *ii*) la cadena ansa que está unida al cromóforo a través de un átomo de nitrógeno al C-2 y un oxígeno al C-12. La cadena ansa es sintetizada por el complejo multienzimático de una policétido sintetasa (PKS) que se expresa durante el metabolismo secundario. Existen también

dos moléculas de oxígeno atmosférico que se incorporan a la molécula en reacciones intermedias (Anderson *et al.*, 1989).

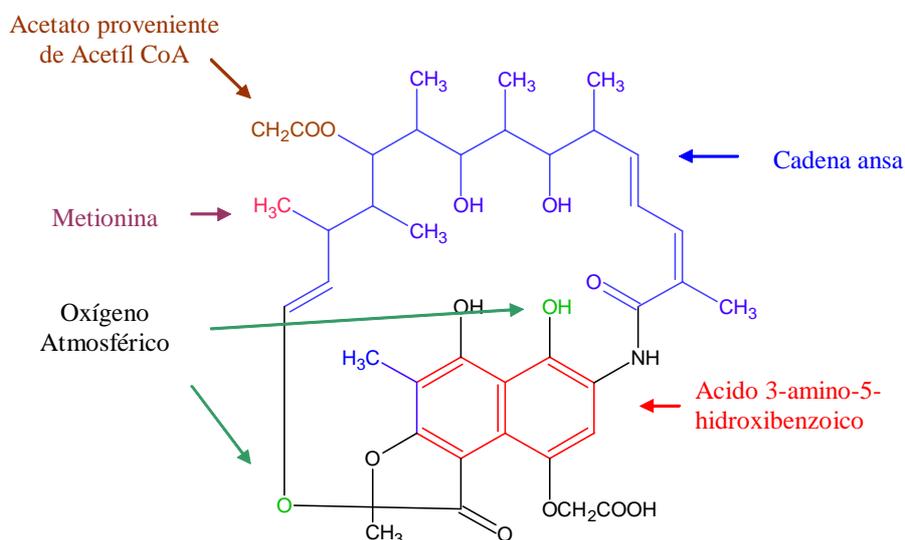


Figura 2.1. Estructura de la molécula de rifamicina B. En el esquema se muestran los componentes de la molécula y su origen. La cadena ansa formada por la policétido sintetasa, el Cromóforo que se origina en la vía del aminosikimato, un grupo acetilo que proviene de una molécula de acetil CoA, y dos átomos de oxígeno atmosférico.

La vía del sikimato comienza inicia con la condensación de dos moléculas del metabolismo primario: el fosfoenól piruvato (PEP) y la eritrosa 4 fosfato (E4P), la diferencia en la vía del aminosikimato es que la fusión del PEP se da con una molécula de aminoE4P. Y mientras la E4P es un intermediario de la vía de las pentosas, la amino E4P se forma en la vía del kanosamino, una vía intermedia en la formación de alcaloides y otros metabolitos (Guo y Frost, 2002). La molécula formada es el ácido amino 3, 4 didesoxi, D arabinoheptulosanico (aminoDAHP). La siguiente reacción en ambas vías es una ciclación, para formar 3 dihidroquinato en la vía del sikimato y el amino 3 dihidroquinato en la vía del aminosikimato.

La siguiente reacción en la vía del aminosikimato es una deshidratación para formar Amino dehidroxisikimato, y finalmente una última deshidratación catalizada por la enzima AHBA sintetasa para formar el ácido 3-amino-5-hidroxi-benzóico (AHBA).

Estas reacciones son catalizadas por los productos de los genes *rifH*, *rifG*, *rifJ* y *rifK*, localizadas en el conjunto de genes de la ruta de biosíntesis de rifamicina. Las proteínas codificadas son isoenzimas de las que catalizan la misma reacción en la vía del sikimato (Fig. 2.2) (Kim *et al.*, 1997)

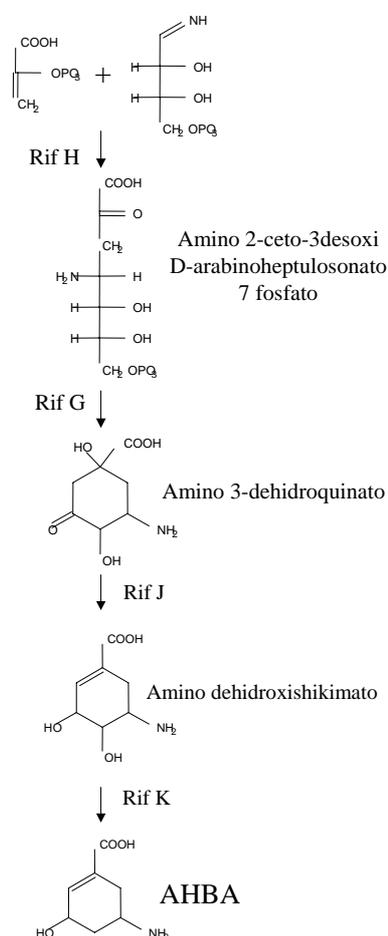


Figura 2.2 Ruta del aminosikimato

El precursor de la rifamicina formado en la vía del aminosikimato es el ácido 3-amino-5-hidroxibenzóico. (AHBA), y es éste el sustrato del complejo multienzimático de la policétido sintetasa, la primera enzima de la ruta de biosíntesis de rifamicina (Kim *et al.*, 1998), (Admiral *et al.*, 2001).

La policétido sintetasa (PKS) está formada por 10 módulos además de un módulo de carga y al menos 45 sitios activos, y cataliza la formación de la cadena ansa mediante la adición de moléculas de metil malonil CoA, malonil CoA y Acetil CoA. Esta serie de reacciones son procesivas y en diferentes sitios activos del complejo (Tin-Wein *et al.*, 1999) (figura 2.3).

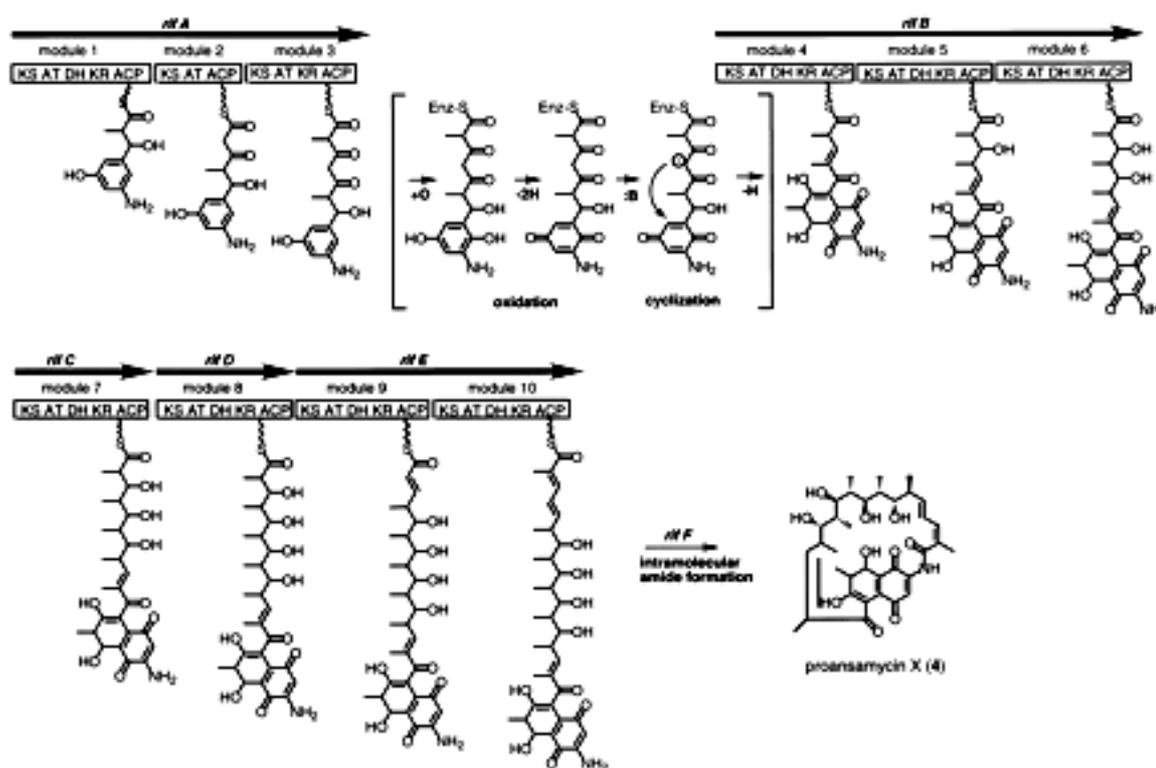


Figura 2.3 Intermediarios de cada uno de los módulos de la policétido sintetasa.

Posteriormente la cadena ansa es ciclada y sufre una serie de modificaciones de oxidorreducción en la que se forman varios intermediarios (figura 2.4). Cabe señalar que en estas reacciones se incorporan dos átomos de oxígeno atmosférico, lo cual resalta la importancia que tienen las condiciones de aireación en la biosíntesis de rifamicina.

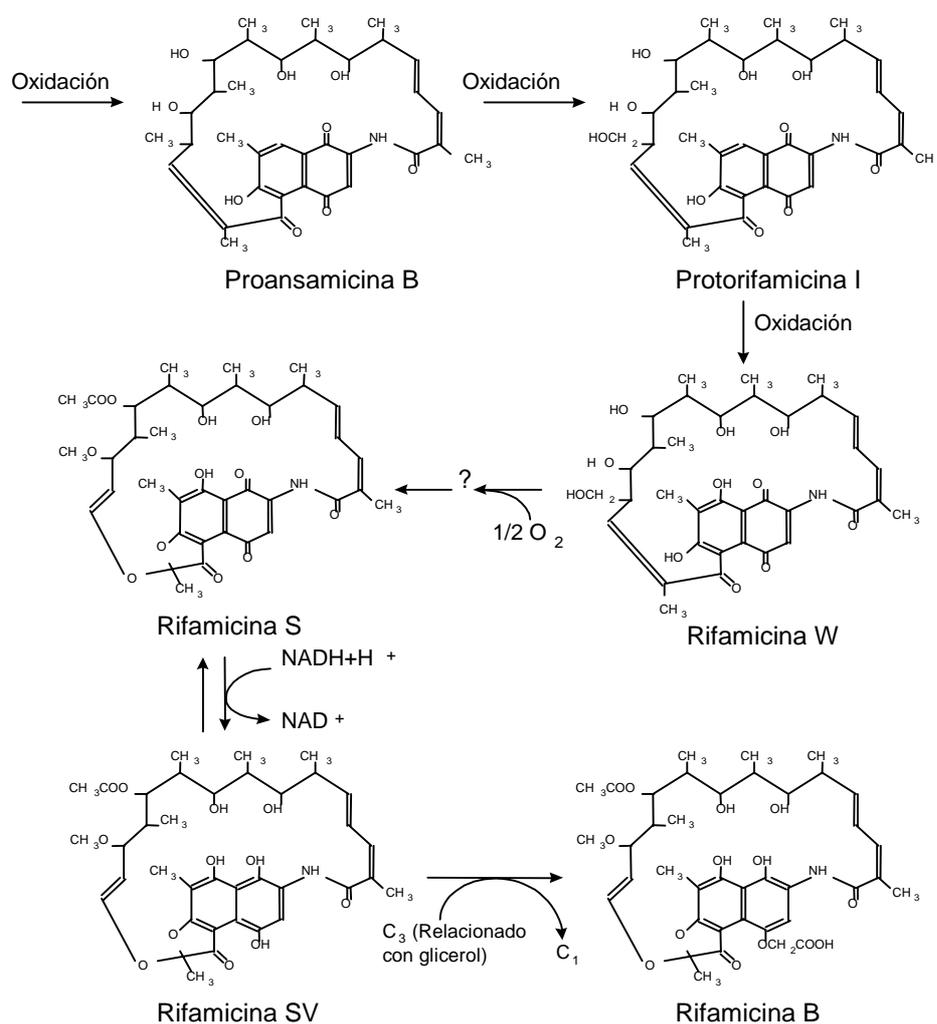


Figura 2.4. Reacciones finales en la biosíntesis de rifamicina B (Mejía, 1998)

2.2 Factores que afectan la biosíntesis de rifamicina.

Los antibióticos, y en general los metabolitos secundarios, no son indispensables para el crecimiento del microorganismo que los produce, aunque tienen gran importancia en farmacología. Estos compuestos se producen durante la idiofase, o cuando la velocidad de crecimiento es menor a la velocidad máxima, lo cual implica que los genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de rifamicina se encuentren reprimidos durante la fase de crecimiento rápido (Piret y Demain, 1988)

Entre los principales factores que pueden afectar a la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentra la regulación por carbono y nitrógeno. La fuente y la cantidad de carbono pueden reprimir o inhibir la síntesis de metabolitos secundarios. La glucosa es un carbohidrato de consumo rápido, que le permite al microorganismo crecer, aunque son otros carbohidratos, (sobre todo los de alto peso molecular como los oligosacáridos) los que favorecen la biosíntesis de metabolitos secundarios al ser menos fáciles de metabolizar. En *A. mediterranei* sin embargo, no hay represión catabólica por glucosa; contrariamente se ha encontrado que la adición de 120 g/L de glucosa al medio de producción después del cuarto día de fermentación incrementa la producción de rifamicina B en un 50% (El-Tayeb *et al.*, 2004b). Por otro lado la fuente, y no la concentración de nitrógeno, juega un papel importante en la producción de rifamicina, se ha descrito que las fuentes inorgánicas favorecen en un 50 % la producción de rifamicina B sobre el uso de fuentes orgánicas, mientras que concentraciones del 0.9 y el 1.8% de KNO_3 solo originan una diferencia del 6 % (El-Teyeb *et al.*, 2004a).

Otro factor que afecta directamente a la producción de rifamicina es el oxígeno, un factor que afecta a la mayoría de los microorganismos miceliales. La formación de micelio de *A. mediterranei* dificulta la transferencia de oxígeno a las células que se encuentran en el interior de la colonia, lo que provoca disminución en la producción de rifamicina B (Mejía, 1998).

Existen otro tipo de moléculas que estimulan la producción de antibióticos, entre los cuales se encuentra el 5,5 dietil barbiturato (barbital) el cual favorece la formación de rifamicina B, por encima de los otros tipos de rifamicinas (Mejía *et al* 1998).

Hay, por otro lado, un sin número de factores genéticos que regulan la biosíntesis de antibióticos. Uno de estos, que pensamos podría afectar la producción, son los sistemas de resistencia y exportación del antibiótico sintetizado, los cuales, aunque se han identificado en varios actinomicetos, aún no se describe su participación en la producción de antibióticos. La exportación mediante proteínas de membrana se la solución al problema del efecto tóxico del antibiótico y del efecto osmótico producto de su acumulación.

2.3 Mecanismos de resistencia a productos en actinomicetos productores de antibióticos.

Como ya se mencionó, en algunos microorganismos que sintetizan antibióticos puede darse el caso de presentar sensibilidad a su propio producto, es decir que al sintetizar el antibiótico, éste puede actuar inhibiendo el crecimiento del microorganismo. Para solucionar este problema dichos microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia. Existen, en general, cuatro mecanismos de resistencia a antibióticos aplicables tanto a microorganismos productores como a no productores, (Putman *et al.*, 1996) (figura 2.5) .

- i) Bloqueo del paso al interior de la célula (no aplica en microorganismos productores).
- ii) Modificación directa sobre el antibiótico (Aplica en microorganismos productores y no productores).
- iii) Modificaciones en los sitios de acción (aplica en microorganismos productores y no productores).
- iv) Sistemas de excreción mediado por proteínas integrales de membrana (aplica en microorganismos productores y no productores).

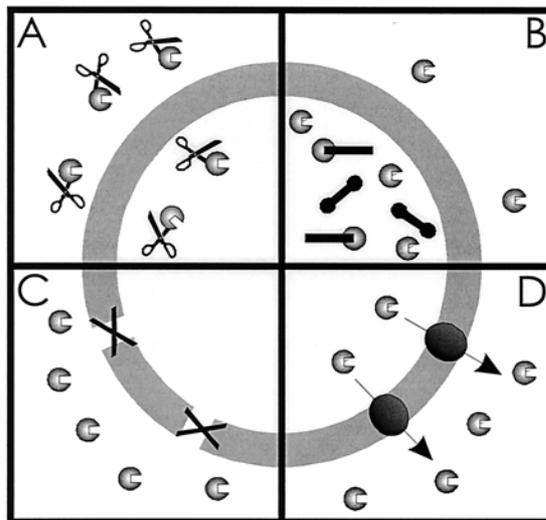


Figura 2.5. Clasificación general de mecanismos de resistencia a antibióticos. A) Modificación directa sobre el antibiótico, B) Modificaciones en los sitios de acción, C) Bloqueo del paso al interior de la célula, D) Sistemas de excreción mediados por proteínas integrales de membrana. (Putman *et al.*, 2000)

2.3.1 Bloqueo del paso al interior de la célula.

El primer mecanismo de resistencia a antibióticos consiste en impedir el paso del antibiótico al interior de la célula. Este mecanismo se presenta solo en microorganismos no productores de antibióticos, y se basa en la baja permeabilidad de las bacterias Gram negativas y en la barrera, altamente eficiente, que representa la pared celular de las bacterias Gram positivas (Putman et al., 1996)

2.4.2 Modificación directa sobre el antibiótico.

Los mecanismos de resistencia basados en la modificación directa del antibiótico mediados por enzimas son una de las estrategias más comunes en microorganismos no productores de antibióticos, aunque se presenta en baja escala en los actinomicetos. Por ejemplo, el gen *tetX* de codifica para una proteína que reduce las tetraciclinas inactivándolas mediante la oxidación de una molécula de NADPH. También existe una amplia familia de acetiltransferasas, fosfotransferasas y adeniltransferasas, proteínas de membrana que modifican antibióticos del tipo de los aminoglucósidos por acetilación, fosforilación o adenilación, respectivamente, de sus grupos amino (Chopra y Roberts, 2001).

2.4.3 Modificaciones en los sitios de acción.

Algunos microorganismos generan resistencia a un antibiótico cuando sufren una modificación en el sitio en que actúa el mismo. Por ejemplo, en la bacteria Gram positiva productora de eritromicina *Saccharopolyspora erythraea*, el producto del gen *ermE* confiere resistencia a dicho antibiótico. El gen *ermE* codifica para una proteína ARN metilasa, que modifica algunas bases en el ARN ribosomal de la subunidad 23S (el sitio de acción de la

eritromicina y algunos otros antibióticos como las lincosamidas o la estreptogramina B), impidiendo que estos se unan (Reeves *et al.*, 1999).

Por otro lado, las tetraciclinas son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse al sitio aceptor de los aminoacil-tARN-EF-TuGTP del ribosoma. En microorganismos productores de tetraciclinas, como *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus* (que sintetizan clortetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente) se presenta también el fenómeno de resistencia. En estas especies se encuentran presentes genes (*otrA*, y *tetM* respectivamente) que codifican para proteínas que presentan secuencias de alta homología con la región amino terminal de los factores de elongación EF-Tu y EF-G. En presencia de OtrA ó TetM las tetraciclinas se separan del ribosoma (Chopra y Roberts 2001.).

En otros casos las modificaciones se llevan a cabo a nivel de ADN mediante mutaciones puntuales. Por ejemplo, las quinolonas son antibióticos que actúan uniéndose a la subunidad A de la ADN girasa (que es la enzima que participa en el superenrollamiento negativo del ADN), relajando así el ADN en un enrollamiento positivo. La resistencia a las quinolonas se presenta cuando aparecen alteraciones en la subunidad A de la ADN girasa, debidas a mutaciones puntuales en el gen que la codifica.

A. mediterranei también es un caso de resistencia por modificación del sitio de acción. La rifamicina actúa inhibiendo el inicio de la transcripción por unión a un sitio alostérico de la ARN polimerasa bacteriana, lo que impide que continúe la elongación del transcrito. Sin embargo, en *A. mediterranei*, hay modificaciones en la secuencia de nucleótidos de éste gen que impiden que la rifamicina se una a la ARN polimerasa (Blanco *et al.*, 1984).

2.4.4 Sistemas de excreción mediados por proteínas integrales de membrana.

El mecanismo de resistencia a antibióticos más frecuentemente encontrado en actinomicetos productores de antibióticos es el que está mediado por proteínas integrales de membrana (Paulsen *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 2000). Este mecanismo, además, funciona como un sistema de excreción del antibiótico producido. En microorganismos eucariontes que producen antibióticos como *Penicillium chrysogenum* (productor de penicilina) o *Acremonium chrysogenum* (productor de cefalosporina), los antibióticos son concentrados en vesículas membranales internas y posteriormente son liberados al medio por un mecanismo de exocitosis. Sin embargo, los organismos procariontes no son capaces de formar tales vesículas, por lo que tienen que excretar el producto mediante un sistema de transporte a través de membrana distinto.

Las proteínas involucradas con este mecanismo de resistencia son conocidas como “Sistemas Transportadores Multifarmaco”. Estos sistemas bacterianos están divididos en cuatro familias: *i*) Superfamilia de difusión facilitada (MFS), *ii*) familia de resistencia a pequeños multifarmacos (SMR) *iii*) familia de resistencia a la división celular (RND) y *iv*) la familia de excreción de compuestos tóxicos y multifarmacos (MATE). Los cuatro sistemas participan en los mecanismos de defensa a diversos antibióticos, además de participar en el transporte de monosacáridos y oligosacáridos y de intermediarios del ciclo de Krebs, y otras vías metabólicas (Putman *et al.*, 2000).

Por mencionar algunos ejemplos, en *Streptomyces virginiae* (productor de virginiamicina S), se ha demostrado que el producto del gen *varS* es una proteína que excreta al antibiótico. En un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de VarS se encontró

una similitud de entre el 68 y el 73% con otras proteínas exportadores de antibióticos (Lee *et al.*, 1999). En 2001, Namwat y colaboradores encontraron que a 82 pb del final del gen *varS* se encuentra un gen al que llamaron *varR*, y comprobaron el producto de dicho gen es un regulador de la expresión de *varS*. En sus estudios demostraron que VarR se une a una región del ADN cercana al promotor del gen *varS* impidiendo la transcripción del mismo. En presencia de virginiamicina S, VarR se separa del ADN y permite la expresión de *varS*.

Streptomyces venezuelae es productor de cloranfenicol, un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. En el conjunto de genes que codifica para las enzimas involucradas en la biosíntesis de cloranfenicol se encontró, mediante estudios topológicos y disrupción génica mediada por recombinación homologa, que el producto del gen *cmIF* participa en el mecanismo de resistencia y exportación del cloranfenicol (He *et al.*, 2001). Por otro lado, se encontró en el conjunto de genes de biosíntesis de candicidina, un antibiótico sintetizado por *Streptomyces griseus*, dos genes relacionados con la exportación de dicho antibiótico, además de otro gen relacionado con la regulación de la expresión de los genes de resistencia *camRA* y *camRB* (Campelo y Gil, 2002)

Streptomyces antibioticus, productor de simociclinona, posee dentro del grupo de genes de biosíntesis de este antibiótico dos genes que presentan alta homología con proteínas exportadoras, *simEx1* y *simEx2*. Además está presente un gen que codifica para una proteína que presenta alta homología con el represor TetR involucrado en la resistencia a tetraciclina (Trefzer *et al.*, 2002)

En el actinomiceto *Streptomyces pristinaespiralis* productor de pristinamicina, el producto del gen *ptr* es responsable de la exportación de pristinamicina. Ptr pertenece a la

familia de proteínas exportadoras multifármacos que confiere resistencia a antibióticos, y utiliza un sistema antiport, pristinamicina/protón. Existen otros antibióticos que pueden ser transportados por Ptr, como la rifampicina, un derivado semisintético de la rifamicina (figura 2.6).

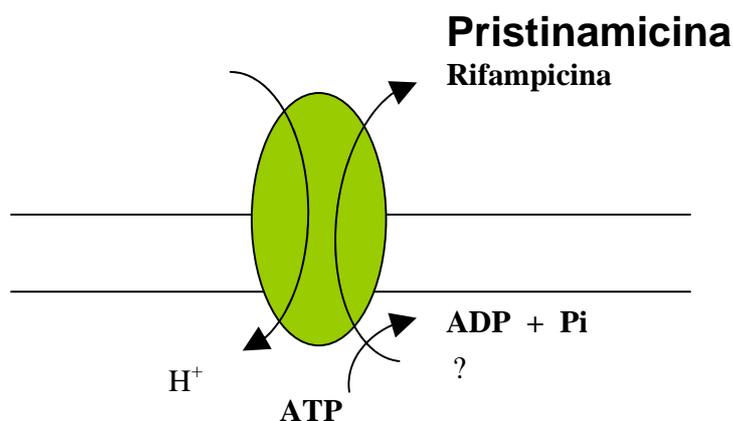


Figura 2.6 Mecanismo propuesto por Folcher *et al.*, en el 2001 para la exportación y resistencia a pristinamicina en *Streptomyces pristinaespiralis*, mediada por la proteína transmembranal Ptr

La expresión del gen *ptr* también está regulada por un represor, producto del gen *pip*. Pip se une a un operador que se encuentra junto al promotor del gen *ptr*. Pip tiene un sitio de unión a pristinamicina, y la presencia del antibiótico le provoca a la proteína un cambio conformacional que disminuye la afinidad de la misma por el operador. Al separarse Pip, el gen *ptr* se transcribe constitutivamente (Folcher *et al.*, 2001)

2.4 El conjunto de genes de la biosíntesis de rifamicina

En 1998, August y colaboradores reportaron la secuencia de nucleótidos de los genes involucrados en la biosíntesis de rifamicina. Dentro del conjunto de genes un tamaño aproximado de 90 kb, encontraron 34 marcos abiertos de lectura. La mayor parte del grupo la abarcan cinco genes (*rifA*, *rifB*, *rifC*, *rifD* y *rifE*) que codifican para cinco proteínas que forman los 11 módulos de la policétido sintetasa encargada de la síntesis la cadena ansa de la rifamicina que se mencionó anteriormente. Otros de los genes están involucrados en modificaciones intermedias que forman precursores de la rifamicina B.

Dentro del mismo grupo de genes se encuentran dos marcos de lectura abierta denominados *rifP* y *rifQ*. El gen *rifP* presenta un 66.1% de similitud con el gen *ptr* de *Streptomyces pristinaespiralis*, mientras que a nivel proteico RifP y Ptr tienen una similitud de 81.2 %. Como se comentó anteriormente la proteína Ptr actúa en *S. pristinaespiralis* como exportadora de pristinamicina con sistema antiport antibiótico/protón, que requiere la hidrólisis de ATP (August *et al.*, 1998); (Folcher *et al.*, 2001). Con base en esta homología es posible especular con el hecho de que el gen *rifP* codifique para una proteína que actúe como mecanismo de resistencia a la rifamicina por exportación de la misma.

Por otro lado, el gen *rifQ* tiene un alto porcentaje de similitud con *actII-orf1*. En *S. coelicolor* el producto del gen *actII-orf1* actúa como un represor del gen *actII-orf2* cuyo producto es una proteína que excreta actinorrodina como mecanismo de resistencia a la misma (August *et al.*, 1998). De acuerdo a esta similitud, también sería posible que el producto del gen *rifQ* actuara como un represor de la expresión del gen *rifP* de manera similar a como lo hacen las proteínas *Pip* y *ActII-orf1*.

3. JUSTIFICACIÓN.

La rifamicina es un antibiótico que tiene actividad contra los microorganismos causantes de la lepra y tuberculosis. Dichas enfermedades se creían erradicadas, pero en los últimos años han resurgido con más fuerza, en muchos casos como infecciones secundarias en pacientes con SIDA. Por lo tanto los estudios enfocados a elevar la producción de dicho antibiótico contribuirán a la disminución de costos y a la disponibilidad a la comunidad en general.

Algunos aspectos de la biosíntesis de rifamicina y su regulación no se encuentran totalmente descritos por lo que su estudio podría aplicarse con fines de incrementar la producción de este antibiótico. Además, el conocimiento de los procesos de exportación de

la rifamicina y la regulación del mismo pueden aplicarse a *A. mediterranei* y otros actinomicetos como estrategia de mejoramiento genético.

Por otro lado, en México el número de industrias biotecnológicas es escaso, y las pocas que hay no son capaces de competir con las grandes compañías biotecnológicas, que invierten millones de dólares en investigación. Por esta razón, la investigación se ha delegado a las universidades y centros de investigación, y compete a ellas el desarrollo de métodos y técnicas que pongan a la vanguardia a la industria mexicana en este sentido.

4. HIPÓTESIS.

De acuerdo con los estudios del mecanismo de resistencia a antibióticos que se han realizado en otros actinomicetos hemos encontrado evidencia para plantear la hipótesis de investigación de que el producto del gen *rifP* es la proteína que exporta y a la vez funciona como un sistema de resistencia a rifamicina en *Amycolatopsis mediterranei*.

5. OBJETIVOS.

•Objetivo general

–Comprobar si existe alguna participación del gen *rifP* en la biosíntesis de rifamicina.

Objetivos específicos

–Inactivar el gen *rifP* de *A. mediterranei*,

–Comprobar el efecto de la inactivación del gen *rifP* sobre la producción de rifamicina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Microorganismos.

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1974): Cepa utilizada para la transformación y la amplificación del ADN plasmídico. Esta cepa tiene la cualidad de ser de alta eficiencia de transformación, pudiéndose obtener hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN. Esta cepa crece adecuadamente a 37°C y en medio líquido se agita a 250 rpm.

Escherichia coli JM110 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985): Esta es una cepa que tiene una mutación que impide que metile el ADN. Esta cepa se puede transformar de manera efectiva por electroporación.

Amycolatopsis mediterranei S699 (August *et al.*, 1998): Esta es una cepa de baja producción de rifamicina de la que se aisló el ADN genómico para amplificar por PCR el gen *rifP*. Se utilizó esta cepa porque en ella se identificó y secuenció el grupo de genes de la ruta de biosíntesis de rifamicina. Fue donada por el Dr. Heins Floss de la Universidad de Washington.

6.1.1 Conservación de los microorganismos.

Las cepas de *E. coli* se conservaron en cajas de Petri a 4°C, selladas con parafilm durante tiempos cortos (2 ó 3 semanas). Para tiempos más largos (hasta 6 meses) se conservaron en glicerol al 20 % a -20°C. Las células competentes para transformación preparadas por el método de RbCl se conservaron en solución RF2 a -80°C previamente congeladas con nitrógeno líquido.

Para la conservación de *A. mediterranei* se utilizó cualquiera de estos dos métodos:

1) se incubó el microorganismo en medio YEME con un resorte metálico durante 48 horas, posteriormente un volumen de este cultivo con el micelio disgregado se mezcló con un volumen de glicerol al 40 % (la concentración final de glicerol es del 20 %) y se repartieron en tubos criogénicos de 2 mL

2) Se incubó el microorganismo en medio semilla durante 48 h con un resorte metálico y posteriormente se repartieron alícuotas en tubos criogénicos de 2 mL.

Para ambos casos los tubos se mantuvieron a -20°C. Las células preparadas para electroporación se mantuvieron en tampón de electroporación a -80°C.

6.1.2 Condiciones de cultivo de los microorganismos.

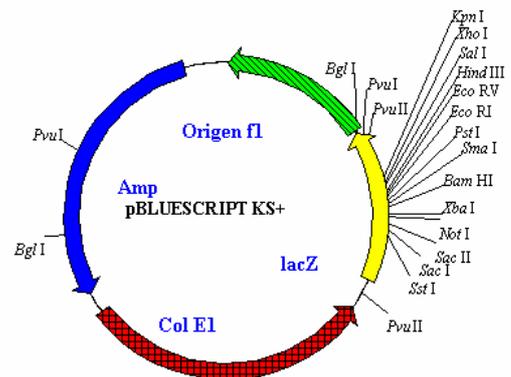
Las cepas de *E. coli* se cultivaron en los medios adecuados según su uso, a una temperatura de incubación de 37°C. Cuando se utilizó un medio líquido se agitó a 250 rpm. En el caso de células transformadas con ADN plasmídico se agregó un antibiótico de selección de acuerdo al gen de resistencia contenido en el plásmido. Para el caso de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pULVK2 se agregó cloranfenicol a una concentración final de 170 $\mu\text{g/mL}$ dos horas antes de finalizar el cultivo con el objeto de incrementar el rendimiento en la concentración de ADN recuperado.

La cepa de *A. mediterranei* se cultivó en el medio adecuado para cada caso. En los casos en que sólo se deseaba un crecimiento masivo del micelio la temperatura de incubación fue de 28°C y en el caso de cultivo sumergido se agitó a 150 rpm. Cuando se requería un crecimiento disgregado se añadió al matraz un resorte de acero inoxidable de 10 cm de largo y de 1 cm de diámetro. Para el crecimiento en condiciones de producción de rifamicina la temperatura de incubación fue de 25°C y la agitación de 250 rpm.

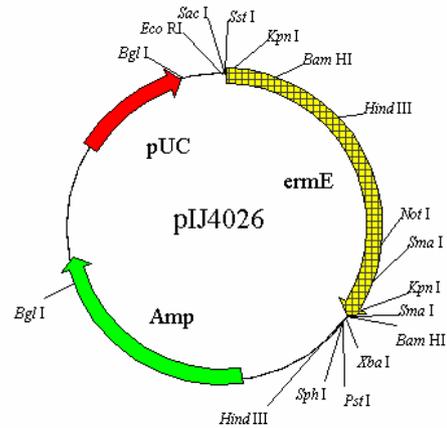
6.2 Plásmidos.

A continuación se muestran las características y mapa de restricción de los plásmidos utilizados durante este estudio:

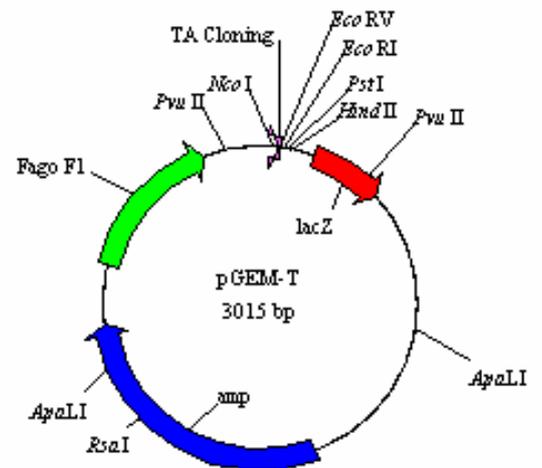
pBluescript® KS + (Stratagene) Este fásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina (am), un replicón del plásmido pUC (pMB1 modificado), un origen de replicación del fago f1, y un fragmento del gen *lacZ* capaz de complementar la mutación en la subunidad α de la β -galactosidasa presente en algunas cepas de *E. coli*. Posee una región de clonaje múltiple en medio de la secuencia del gen *lacZ*. Esta característica permite seleccionar transformantes que hayan integrado el plásmido con un color azul en presencia de X-Gal. La inserción de un fragmento en la región de clonaje múltiple del plásmido provoca la desaparición del color azul.



pIJ4026 (Bibb *et al.*, 1985) Este plásmido es derivado del pGEM3Zf(+), contiene en su secuencia el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) de *Saccharopolyspora erythraea*, un origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina (*amp*). Este plásmido se utilizará para subclonar el gen de resistencia a eritromicina.



pGEM-T[®] Este plásmido tiene un tamaño aproximado de 3 kb. Fue adquirido a Promega como parte del sistema “pGEM T-A cloning”, Este plásmido está linearizado y tiene extremos 3’T que permiten ligar fácilmente productos de PCR amplificados por enzimas que agregan una adenina al extremo 3’ como la Taq polimerasa.



6.3 Medios de cultivo.

6.3.1 Medios de cultivo para *E. coli*.

Medio Luria-Bertani (LB) (Millar, 1972). Este medio se utilizó para el crecimiento de células de *E. coli*. después de haber sido transformadas con ADN plasmídico.

Bacto-triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
dH ₂ O hasta	1000 mL
pH= 7.5 con NaOH	

Para su uso como medio sólido se añaden 20 g de agar por litro.

Medio TB (Sambrook y Russell, 2001). Este medio se utilizó para el crecimiento de transformantes de *E. coli* con el fin de aislar el ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24 g
Bacto-triptona	12 g
Glicerol	4 mL
dH ₂ O hasta	900 mL

Después de esterilizar se agregó solución estéril (autoclave) de

KH ₂ PO ₄ 170 mM y K ₂ HPO ₄ 720 mM	100 mL
---	--------

Medio SOB (Hanahan, 1983). Este medio se utilizó para el crecimiento de células de *E. coli* con el fin de hacer células competentes para su transformación con ADN plasmídico.

Extracto de levadura	5 g
Bacto-triptona	20 g
NaCl	0.5 g
dH ₂ O hasta	1000 mL
pH= 7.5 con KOH	

Después de esterilizar se agregaron 5 mL de solución estéril de MgSO₄ 2 M (esterilizada por filtración en filtro de 0.22 µm de diámetro de poro)

Para su uso como medio sólido (Medio LA) se añaden 20 g de agar por litro.

Medio SOC (Hanahan 1983) Este medio se utilizó para recuperar las células de *E. coli* DH5α después del choque térmico durante la transformación con ADN plasmídico. Este medio es idéntico al medio SOB, solo que antes de utilizarse se agregaron 20 mL de una solución estéril de glucosa 1 M (esta solución se esteriliza por filtración con 0.22 µm de diámetro de poro), por litro de medio SOB.

6.3.2 Medios de cultivo para *A. mediterranei*

Caldo nutritivo. Este medio se utilizó como prueba de esterilidad de los cultivos de *A. mediterranei*.

Caldo nutritivo	8 g
dH ₂ O hasta	1000 mL

Medio R2L (Hopwood *et al.*, 1985). Este medio se utilizó para la recuperación de *A. mediterranei* después de la transformación.

D-Manitol	73.2 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	10.1 g
Glucosa	10 g
Casaminoácidos	0.1g
Extracto de levadura	5 g
dH ₂ O hasta	880 mL
TES 11.5 %	50 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O 7.36 %	40 mL
KH ₂ PO ₄ 0.5 %	10 mL
Solución de elementos traza ¹	2 mL
L-Asparagina 10 %	20 mL
NaOH 1 M	5 mL

Se esterilizan por separado
y se agregan al usarse

Para su uso como medio sólido se agregaron 7 g de agarosa de bajo punto de fusión.

¹ **Solución de elementos traza:** FeSO₄ 0.1%, MnCl₂ 4 H₂O 0.1% y ZnSO₄ 7H₂O 0.1%

Medio YMG (Lal *et al.*, 1998). Este medio se utilizó para el crecimiento de *A. mediterranei* en placa.

Glucosa	4 g
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Agar bacteriológico	18 g
dH ₂ O hasta	1000 mL

Medio YEME (Hopwood *et al.*, 1985). Este medio se utilizó cuando se requería un crecimiento masivo de *A. mediterranei*.

Glucosa	10 g
Sacarosa	103 g
Extracto de levadura	3 g
Bacto peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
dH ₂ O hasta	1000 mL

Después de esterilizar se agregó solución estéril (autoclave) de

MgCl ₂ 6H ₂ O (2.5 M)	2 mL
---	------

Cuando se quería un crecimiento disgregado se agregó también solución estéril (autoclave) de Glicina (20%) 25 mL.

Medio Bennet (Margalith y Pagani, 1961). Este medio se utilizó para el crecimiento de *A. mediterranei*.

Glucosa	10 g
Extracto de malta	1 g
NZ amina A	2 g
Extracto de levadura	1 g
dH ₂ O hasta	1000 mL

Para utilizarlo como medio sólido se agregaron 20 g de agar.

Medio Semilla (Kluepfel *et al.*, 1965). Este medio se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de *A. mediterranei*.

Glucosa	20 g
Harina de soya	20 g
CaCO ₃	2.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.05 g
CoSO ₄ 6H ₂ O	0.003 g
dH ₂ O hasta	1000 mL
pH= 7.5 con NaOH 5N	

Medio S27M (Hopwood *et al.*, 1985) Este medio se utilizó para el crecimiento en placa de *A. mediterranei* después de ser transformada.

D-Manitol	73.2 g
Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
dH ₂ O hasta	1000 mL

Para utilizarlo como medio sólido se agregaron 15g de Bacto-Agar.

Medio de producción Lee (Lee *et al.*, 1983) Este medio se utilizó para evaluar la producción de rifamicina de *A. mediterranei*.

Glucosa	120 g	
Extracto de levadura	10 g	
Bacto peptona	10 g	
5,5 dietilbarbiturato de sodio	0.7 g	
dH ₂ O hasta	1000 mL	pH 7.2 con NaOH

6.3.3 Antibióticos y suplementos.

Para el crecimiento de cepas que contenían un plásmido se agregó siempre un antibiótico para seleccionar las transformantes y como presión de selección. Los antibióticos usados, y las concentraciones finales en el medio de cultivo fueron: Ampicilina a 100 µg/mL, Kanamicina a 100 µg/mL y Eritromicina a 10 µg/mL. Cuando se trató de células de *E. coli*

transformadas con el plásmido pULVK2 y sus derivados, se agregó cloranfenicol a una concentración final de 170 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001).

Cuando se clonaron fragmentos en los sitios de clonaje múltiple de plásmidos que contenían la subunidad α de la β -galactosidasa se agregó isopropil β D tiogalactosido (IPTG) como inductor de este gen, y 5 bromo, 4 cloro, 3 indolil β D galactosido (X-Gal) como sustrato. El X-Gal es sustrato de la β galactosidasa que lo convierte en un compuesto insoluble de color azul. El IPTG se agregó a una concentración final de 5 mM y el X-Gal a una concentración de 1.6 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001).

6.4 Aislamiento de ADN

6.4.1 Aislamiento de ADN plasmídico.

Para aislar ADN plasmídico de *E. coli* se siguieron los siguientes protocolos.

6.4.1.1 MiniPreparaciones

Este protocolo se siguió cuando se deseaba obtener ADN plasmídico en pequeña escala para analizar plásmidos recombinantes. (Holmes y Quigley, 1981).

Se inocularon 800 µL de medio TB con una colonia de células de *E. coli* DH5 α transformada con un palillo estéril (el medio debe contener el antibiótico adecuado para mantener el plásmido dentro de la bacteria). El tubo se incubó 37 °C y 250 rpm durante 12-16 horas. Para el caso de transformantes del plásmido pULVK2 y sus derivados se agregó una solución de cloranfenicol a una concentración final de 170 µg/mL en las últimas dos horas de cultivo.

Las células se colectaron por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 350 μL de STET², posteriormente se añadieron 20 μL de una solución de lisozima a una concentración de 10 mg/ mL en agua para una concentración final de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los tubos se mezclaron durante 1 min y posteriormente se hirvieron en un baño de agua durante 45 s. Las proteínas, los restos celulares y el ADN cromosómico se precipitaron inmediatamente por centrifugación a 14, 000 rpm durante 15 min y se eliminaron con un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 μL de acetato de sodio 3M, pH= 5.2 y 600 μL de isopropanol. Se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min.

El ADN plasmídico se precipitó por centrifugación a 14 000 rpm durante 15 min y se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v). El precipitado se secó y resuspendió en 20 μL de TE³ ó ddH₂O estéril. Para realizar el análisis de restricción del ADN plasmídico aislado se usaron 2 μL de esta solución.

6.4.1.2 MegaPreparaciones

Este método se utilizó para aislar ADN plasmídico en gran cantidad (Fernández, 1997).

Se inocularon 100 mL de medio TB en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con una colonia o 10 μL de una suspensión conservada en glicerol al 20% de células de *E. coli* DH5 α transformadas (el medio debe contener el antibiótico adecuado para mantener el plásmido dentro de la bacteria). El matraz se incubó a 37°C y 250 rpm durante 12-16 horas. Para el caso

² STET: EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v)

³ TE: Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1mM pH 8.0

de transformantes del plásmido pULVK2 y sus derivados se agregó una solución de cloranfenicol a una concentración final de 170 µg/ mL en las últimas dos horas de cultivo.

Las células se colectaron por centrifugación a 5, 000 rpm durante 10 min. El precipitado de células se resuspendió en 6 mL de STET y la mezcla obtenida se repartió en tubos Eppendorf en alícuotas de 350 µL. A cada tubo se le añadieron 20 µL de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/ mL en agua, para una concentración final de 500 µg/ mL.

Se mezclaron durante 30 s y se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 90 s. Se centrifugó inmediatamente a 14, 000 rpm durante 15 min, para precipitar proteínas, restos celulares y ADN cromosómico, que se eliminaron con ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 600 µL de isopropanol. Se mezcló y mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min.

El ADN plasmídico se precipitó por centrifugación a 14, 000 rpm durante 15 min y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Cada alícuota del ADN plasmídico precipitado se resuspendió en 100 µL de TE. Las fracciones se colectaron y se procedió a eliminar el ARN y proteínas residuales de las mismas.

6.4.1.3 Preparaciones rápidas

Este método se utilizó para identificar rápidamente plásmidos recombinantes que hayan integrado un fragmento de ADN en su secuencia (Law, 1997) con la condición de que el inserto sea un fragmento de ADN mayor 500 pb.

Se resuspendió una colonia (o un cultivo de 800 µL de células de *E. coli*) en 100 µL de solución de lisis⁴ caliente y se agregaron 10 µL de tampón de carga 6×⁵. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 5 min y posteriormente se enfriaron en hielo durante 5 min.

Las muestras se centrifugaron 1 min a 14, 000 rpm. Una alícuota de 20 µL de cada mezcla se colocó en un pocillo de un gel de agarosa previamente elaborado y a continuación se separó por electroforesis.

6.4.1.4 Aislamiento de ADN plasmídico de *A. mediterranei*.

El aislamiento de ADN plasmídico de *A. mediterranei* se realizó siguiendo el método descrito por Moretti *et al.*, en 1985.

S inoculó una colonia de *A. mediterranei* en 100 mL de medio YEME adicionado con 10 µg/mL de eritromicina, y se incubó a 25°C durante 3 días.

Pasado ese tiempo las células se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min. Las células se resuspendieron en 10 mL de solución de lisozima⁶ y se incubó la mezcla durante 2 h. Posteriormente se agregaron 3.5 mL de solución SDS⁷, y la mezcla se incubó a 80°C durante 10 min. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Después de este paso se procedió con los pasos descritos en la sección de desproteinización de muestras de ADN

⁴ **Tampón de lisis:** EDTA 5 mM, Sacarosa 10 % (p/v), SDS 0.25 % (p/v), NaOH 100 mM, y KCl 60 mM

⁵ **Tampón de Carga 6×:** Azul de bromofenol 0.25 % (p/v), Sacarosa 40 % (p/v) y Xileno cianol 0.25 % (p/v)

⁶ **Solución de lisozima:** Sacarosa al 10.3 %, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 25 mM pH 8 y lisozima 10 mg/mL.

⁷ **Solución de SDS:** SDS al 2 % y NaOH 0.3 M

6.4.2 Aislamiento de ADN total de *A. mediterranei*.

Este método se utilizó para aislar ADN total para utilizarlo como ADN molde en la amplificación del gen *rifP* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se inocularon 2 mL de un vial de *A. mediterranei* en glicerol al 20% en 100 mL de medio YEME contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se incubó a 28 °C y 150 rpm durante 72-96 horas.

Las células se colectaron por filtración a través de un filtro de nylon Nyltal y se lavaron 3 ó 4 veces con dH₂O estéril. El micelio se transfirió a una caja de Petri desechable, se congeló y posteriormente se liofilizó. El micelio seco se pulverizó en un mortero de porcelana. Este micelio se repartió en tubos Eppendorf de 1.5 mL con aproximadamente 10-15 mg cada uno.

Se agregaron 0.5 mL de solución Hepes⁸ a cada tubo y se agitó con un vortex durante 30 s. Posteriormente se agregaron 50 µL de SDS al 10 % y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a 65 °C durante 15 min.

Se agregaron 0.5 mL de solución Tris-EDTA⁹ y se homogenizó por inversión. La mezcla se desproteinizó por fenolización, y posteriormente se precipitó el ADN con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío. El ADN se recuperó por centrifugación y se lavó con etanol al 70 %. Posteriormente se resuspendió en 0.5 mL de solución TE y se procedió a una purificación adicional descrita en la sección 6.5.

⁸ **Solución Hepes:** Hepes 10 mM, Sacarosa 0.5 mM y EDTA 20 mM

⁹ **Solución Tris-EDTA:** Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM

6.5 Purificación del ADN

6.5.1 Eliminación del ARN de las muestras de ADN

A cada tubo con ADN disuelto en TE o en ddH₂O se le agregó solución de ARNasa¹⁰ hasta una concentración final de 100 µg/mL. Se mezcló suavemente para evitar la fractura del ADN (sobre todo si es de alto peso molecular) y se incubó a 37°C durante 90 min.

6.5.2 Eliminación de proteínas de las muestras de ADN

Esta técnica se utilizó preferentemente después del tratamiento con ARNasa.

Se agregó un volumen de fenol-CIA^{11,12} a la solución que contiene el ADN y se mezclaron durante 3 min. Posteriormente se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 7 min. Se recuperó la fase acuosa (contiene el ADN) y se colocó en un tubo Eppendorf limpio. Se repitió esta operación 1 ó 2 veces más.

La fase acuosa del segundo o tercer tratamiento se mezcló con un volumen de CIA¹³ y se agitaron durante 3 min. Posteriormente se centrifugó a 14, 000 rpm durante 8 min. La fase acuosa se recuperó y el ADN se precipitó agregando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mantuvo a -20°C durante al menos 2 horas.

¹⁰ **Solución de ARNasa:** La ARNasa se disuelve en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7.5 a una concentración final de 10 mg/ mL. La solución se coloca en un baño de agua hirviendo durante 15 min y se deja enfriar lentamente. Posteriormente se conserva a -20 °C.

¹¹ **Fenol neutro:** Se prepara mezclando 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. La mezcla se mantiene en reposo durante 24 horas. Posteriormente la fase acuosa se retira y se agrega un volumen de Tris-HCl pH 8.0.

¹² **Fenol CIA:** Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y CIA

¹³ **CIA:** Cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1.

El ADN se recuperó por centrifugación a 14, 000 rpm a 4°C durante 15 min, y el precipitado se lavó con etanol al 70 % y posteriormente se secó. El ADN se resuspendió en el volumen adecuado de TE ó ddH₂O.

6.6 Diseño de cebadores para PCR

Con el fin de amplificar y aislar el gen *rifP* codificado dentro del conjunto de genes de biosíntesis de rifamicina (August *et al.*, 1998) se diseñaron cebadores para la amplificación por parte de la polimerasa.

De acuerdo a la secuencia de nucleótidos de dicho conjunto con número de acceso AF040570 y AF040571 en el banco de genes del “*National Center of Biotechnology Information*” (NCBI), el gen *rifP* se encuentra comprendido entre los nucleótidos 64,540 y 66,109 alrededor de los cuales se diseñaron los cebadores

6.7 Diseño de la secuencia de terminación de la transcripción.

La secuencia de nucleótidos de terminación de la transcripción se sintetizó químicamente para insertarla a un vector con extremos compatibles. Dicha secuencia se construyó a partir de la región de terminación Rho dependiente del gen para la aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) de *Amycolatopsis lactamdurans* (Hernando-Rico *et al.*, 2001). Esta secuencia es un palíndromo de aproximadamente 20 pares de bases.

6.8 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

Este método se utilizó para la amplificación del fragmento de ADN del gen *rifP*. Esta técnica se basa en la actividad de las ADN polimerasas, cuya función es sintetizar en dirección 5' → 3' una cadena de ADN a partir de una cadena molde, un cebador y desoxinucleótidos.

Las ADN polimerasas *Pfu* polimerasa y *Taq* polimerasa, provenientes de los microorganismos termófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermus aquaticus* respectivamente se han utilizado preferentemente en esta técnica por su estabilidad a las altas temperaturas requeridas para desnaturalizar el ADN. Con esta técnica es posible amplificar fragmentos específicos de ADN, acotados por los cebadores diseñados para tal efecto, mediante la repetición de tres pasos: *i*) desnaturalización del ADN molde, *ii*) hibridación de los cebadores a cada una de las cadenas molde y *iii*) polimerización a partir de los cebadores.

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

2) La hibridación de los cebadores a cada una de las cadenas molde, se realiza a una temperatura inferior, de entre 40 y 60°C. A ésta temperatura el ADN se renaturaliza, pero al estar presentes los cebadores en alta concentración, estos tienden a unirse al ADN molde antes que la cadena molde complementaria lo haga. Una temperatura de hibridación menor a la señalada favorece la unión inespecífica de los cebadores a otras regiones del ADN.

3) Finalmente, en el paso de polimerización a partir de los cebadores interviene la ADN polimerasa termoestable, cuya temperatura óptima de amplificación se encuentra entre 70 y 75°C. Esta enzima sintetiza la cadena complementaria a partir de los cebadores.

Para obtener una alta cantidad de ADN amplificado, estos tres pasos se repiten entre 25 y 35 ciclos., Es recomendable que el número de ciclos no sea muy alto ya que la frecuencia de

mutaciones por parte de la Taq ADN polimerasa se incrementa exponencialmente a partir del ciclo 30. Por otro lado el uso de 25 ciclos en la amplificación ocasiona un bajo rendimiento. Recomendar número de ciclos sea de 30 lo que a partir de una sola copia del ADN molde presente en la mezcla, es posible obtener 1 073 741 824 copias en 30 ciclos.

6.8.1 Condiciones de reacción y amplificación.

Previo a la preparación todos los componentes de la mezcla con excepción de la *Taq* ADN polimerasa se homogenizaron por agitación en vortex durante 30 s. Durante la preparación de la mezcla de reacción los tubos se mantuvieron a 4 °C. Hecha la mezcla se homogenizó por agitación suave y se centrifugaron los tubos a 14, 000 rpm a 4°C durante 10 s.

La mezcla de reacción fue como se muestra a continuación

ddH ₂ O	25 µL
Tampón 10× ¹⁴ <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 µL
MgCl 50mM	1.5 µL
Mezcla de dNTP's ¹⁵	2 µL
Cebador 1 (20 µM)	2.5 µL
Cebador 2 (20 µM)	2.5 µL
ADN molde (20 µg/mL)	10 µL
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL

¹⁴ **Tampón 10× para la *Taq* ADN polimerasa:** KCl 0.5 M y Tris-HCl 0.1 M pH 8.3

¹⁵ **Mezcla de dNTP's:** Esta solución contiene dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dCTP 10 mM y dGTP 10 mM.

Los tubos se colocaron en un termociclador con las siguientes condiciones

Desnaturalización	94 °C	5 min
-------------------	-------	-------

30 ciclos de:

Desnaturalización	94 °C	1 min
-------------------	-------	-------

Hibridación	50 °C	1 min
-------------	-------	-------

Polimerización	72 °C	2 min
----------------	-------	-------

Después de 30 ciclos:

Polimerización	72 °C	10 min
----------------	-------	--------

6.9 Clonación de productos de PCR en el plásmido pGEM[®]-T.

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

La actividad de transferasa terminal independiente de molde de la *Taq* ADN polimerasa se puede utilizar para el ligado de fragmentos amplificados por PCR con una extensión A-3', utilizando un vector linearizado con un nucleótido de timina 3' protuberante lo

que permite el apareamiento de Watson y Crick y favorece la reacción por parte de la T4 ADN ligasa. El uso de este sistema es más eficiente que la ligación de extremos romos. Y también que la ligación de fragmentos digeridos con una sola enzima de restricción, porque con estos puede generarse un alto número de plásmidos recircularizados, mientras que el “TA-cloning” el número de recircularizaciones es menor debido a que los extremos 3’ T no permiten apareamiento de Watson y Crack, por lo que no pueden ser ligados.

Según lo expuesto por los proveedores (Promega), la construcción del vector pGEM®-T se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Marchuk *et al.* en 1991. El vector linearizado pGEM®-T se construyó a partir del plásmido pGEM®-5Zf(+) linearizado con la enzima *EcoRV*, y posteriormente se agregó el extremo 3’ T con la enzima *Taq* polimerasa.

6.9.1. Protocolo de ligación.

Para realizar la ligación se preparó la siguiente mezcla:

2× Tampón de ligación rápida ¹⁶ :	5 µL
pGEM®-T	1 µL
Producto de PCR purificado	3 µL
T4 ADN ligasa	1 µL

Una vez hecha la mezcla se mantuvo a 4°C durante 12-14 horas, y posteriormente se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α. La transformación se sembró en placas adicionadas con IPTG y X-Gal.

¹⁶ 2× **Tampón de ligación rápida**: Tris-HCl pH 7.8 60 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y PEG 8000 10 % (p/v)

6.10 Digestión y ligación de fragmentos de ADN.

Las reacciones de digestión y ligación con endonucleasas de restricción y T4 ADN ligasa respectivamente, se realizaron considerando siempre tres componentes en la mezcla: el ADN, la solución amortiguadora adecuada para cada enzima y la enzima a utilizar.

i) ADN. La cantidad fue siempre un factor importante en la reacción. Cuando solo se requería hacer un patrón de bandeos de un fragmento de ADN, 300-700 ng de ADN fueron suficientes para poder visualizarlos en un gel de agarosa. Cuando se requería mayor cantidad de ADN como para clonar un fragmento dentro de un vector 1-2 µg de ADN fueron digeridos.

ii) Solución amortiguadora. Cada una de las enzimas actúan en condiciones específicas de temperatura, pH, concentración de sales, cofactores, etc. Con excepción de la temperatura las demás condiciones son aportadas por el proveedor en solución amortiguadora 10 veces concentrada en el caso de las enzimas de restricción, y 5 veces concentrada para la enzima de ligación.

iii) Enzima. La cantidad de enzima que se agregó a la reacción dependió de la cantidad de ADN a digerir o ligar, de la concentración de la enzima, y de la vida media de la misma.

6.11 Purificación de muestras de ADN

Cuando los fragmentos de ADN digeridos por enzimas de restricción se utilizaron para la construcción de vectores se purificaron siguiendo el protocolo de desalado y concentrado de soluciones de ADN QIAEX II (QIAGEN). Este paso es muy importante para el clonaje de

fragmentos de ADN, porque la cantidad de sales y restos protéicos pueden interferir en la reacción de ligado mediante la ADN ligasa del bacteriófago T4. Con esta técnica es posible eliminar de la muestra enzimas de restricción, fosfatasas, polimerasas, nucleótidos y sales.

En el protocolo, a la muestra de ADN en solución se le agregaron 3 volúmenes de solución QG¹⁷ y se mezcló. Para fragmentos menores a 4 kb se aplicó agitación con vortex.

La mezcla se incubó a 50°C durante 10 min, cuidando de agitar cada 2 min. Se verificó que el color de la muestra fuera amarillo, cuando era morado, se agregaron 10 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2.

La muestra se colocó en la columna que contiene la membrana de sílica, y se hizo pasar a través de ella por centrifugación a 13, 000 rpm durante 1 minuto. La membrana se lavó con 500 µL de solución PE¹⁸. Se centrifugó nuevamente y el filtrado fue desechado.

La columna se centrifugó una vez más a 13, 000 rpm durante 2 min para eliminar totalmente los restos de tampón PE. Posteriormente se eluyó el ADN por adición de 50 µL de ddH₂O y posterior centrifugación a 13, 000 rpm durante 1 min.

6.12 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.

Para separar los fragmentos de ADN se utilizó la electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó agarosa SeaKem LE (grado biología molecular) en concentraciones entre 0.5-1.0 %

¹⁷ **QG**: La composición de esta solución no es proporcionada por el proveedor, pero se sabe que contiene tiocianato de guanidina que rompe los puentes de hidrógeno que se forman entre moléculas de azúcar en los polímeros de agarosa, disolviendo así el gel y favoreciendo la unión del ADN a la membrana de sílica.

¹⁸ **PE**: La composición de esta solución no es proporcionada por el proveedor, pero se sabe que esta solución contiene etanol, y elimina eficientemente las sales contaminantes.

según el caso, disuelta en solución TAE $1\times$ ¹⁹. El gel se sumergió en la cámara de electroforesis y se cubrió con solución TAE $1\times$ 0.5 cm por encima del gel. La concentración más baja de agarosa se utilizó para separar fragmentos de entre 5 y 12 kb, mientras que la más alta se usó para separar fragmentos de alrededor de 2 kb.

Las muestras se mezclaron con 1/10 del volumen de tampón de carga. Las muestras se calentaron a 65°C durante 5 min y posteriormente se enfriaron en hielo durante tres min. Posteriormente se cargaron en los pocillos del gel y se sometieron a una diferencia de potencial de entre 50 y 150 V.

Después de la separación electroforética, el gel se trató con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este reactivo se intercala con el ADN y permite su visualización mediante radiación ultravioleta (UV). Los geles se observaron a través de un fotodocumentador GelDoc 2000 de BioRad, y las imágenes fueron procesadas mediante el software Quantity One de BioRad.

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

1) ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind*I, que genera fragmentos de 23,130, 9,416, 6,557, 4,361, 2, 322, 2,027, 564 y 125 pb;

2) ADN del fago λ digerido con *Eco*RI, que genera tamaños de 24,756, 7,421, 5,994, 5,643 y 4,878 pb; y

¹⁹ **TAE 50x**: Ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M pH 8.0 100 mL y Tris-Base 242 g disueltos en un litro de agua destilada. Esta solución se disuelve a $1\times$ para utilizarse en la preparación de geles de agarosa.

3) ADN del fago λ digerido en doble digestión con *HindIII* y *EcoRI* que genera tamaños de 24,756, 5,148, 4,973, 4,268, 2,027, 1,904, 1,709, 1,375, 947, 831 y 564 pb.

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

Para los fragmentos de ADN que fue necesario purificar a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema de purificación Qiaquick (QIAGEN). La técnica que se siguió fue la siguiente.

Se cortó el trozo de gel que contenía el fragmento de ADN deseado (< 250 mg) y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se le agregaron 3 volúmenes de solución QG1 y se mezcló. Para fragmentos menores a 4 kb se aplicó agitación con vortex.

La mezcla se incubó a 50°C durante 10 min, cuidando de agitar cada 2 min. Se verificó que el color de la muestra fuera amarillo, cuando era morado, se agregaron 10 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2.

La muestra se colocó en la columna que contiene la membrana de sílica, y se hizo pasar a través de ella por centrifugación a 13, 000 rpm durante 1 minuto. La membrana se lavó con 500 μ L de solución PE²⁰. Se centrifugó nuevamente y el filtrado fue desechado.

La columna se centrifugó una vez más a 13, 000 rpm durante 2 min para eliminar totalmente los restos de tampón PE. Posteriormente se eluyó el ADN por adición de 50 μ L de ddH₂O y posterior centrifugación a 13, 000 rpm durante 1 min.

²⁰ PE: La composición de esta solución no es proporcionada por el proveedor, pero se sabe que esta solución contiene etanol, y elimina eficientemente las sales contaminantes.

6.14 Transformación de los microorganismos con ADN plasmídico

6.14.1 Transformación de *E. coli*.

Para la transformación de *E. coli* se siguió el método descrito por Hanahan en 1983 y 1985, basado en el tratamiento con cloruro de rubidio, y que genera células competentes con alta eficiencia de transformación ($\sim 5 \times 10^8$ transformantes/ μg de ADN)

6.14.1.1 Preparación de células competentes de *E. coli* por el método del cloruro de rubidio.

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio SOB (líquido) y 10 μL de un conservado de células en glicerol al 20%, o una colonia proveniente de una caja de Petri con 12-14 horas de crecimiento. Se incubó a 37°C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó un valor de absorbancia entre 0.4 y 0.45 a 600 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente el matraz se mantuvo a 4°C durante 20 min.

Para coleccionar las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en solución RF1²¹ (un tercio del volumen inicial) con suavidad y cuidando que la temperatura se mantuviera a 4°C. Posteriormente la mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min.

²¹ **RF1**: Acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15 % (p/v), MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. El pH de esta solución se ajusta con ácido acético 0.2 M, y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0.2 μm de diámetro de poro.

La mezcla se centrifugó nuevamente a 3, 000 rpm durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en solución RF2²² (1/12.5 del volumen inicial). Posteriormente la mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min.

La suspensión se repartió en alícuotas de 200 µL y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Posteriormente se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

6.14.1.2 Procedimiento de transformación de células de *E. coli*.

Se descongelaron las células competentes en un baño de hielo y agua y se mezclaron 100 µL con el ADN plasmídico, manteniéndose en hielo durante 20 min.

Posteriormente, la mezcla se expuso a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42°C durante 45 s, y se enfrió rápidamente en hielo durante 3 min.

Transcurrido ese tiempo se añadieron 800 µL de medio SOC y se incubó a 37°C y 250 rpm durante una hora (con el fin de que las células que hayan incorporado el plásmido expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección).

A continuación se sembró una alícuota en placas con medio LA ó SOB adicionado con el antibiótico utilizado como marcador de selección de los transformantes, y se incubaron durante 12-14 horas a 37 °C.

6.14.2 Transformación de *A. mediterranei*.

Para la transformación de *A. mediterranei* se diseñó una técnica basada en la electroporación.

²² RF2: CaCl₂ 75 mM, glicerol 15 % (p/v), MOPS 10 mM pH 7.0 y RbCl 10 mM. El pH se ajusta a 6.8 con NaOH y se esteriliza por filtración.

6.14.2.1 Preparación de la células de *A. mediterranei*.

El protocolo final es el siguiente:

Se inocularon 5 mL de un cultivo de 48 horas en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio YEME con un resorte. El matraz se incubó durante 48 horas a 28°C y 150 rpm.

Transcurrido este tiempo, las células se recuperaron por centrifugación a 10, 000 rpm durante 10 min a 4°C. Es importante a partir de este punto que la muestra se mantenga el mayor tiempo posible a 4°C. A continuación se lavaron las células 2 veces con un volumen de glicerol frío al 10%.

Las células lavadas se resuspendieron en 4 mL de solución GYT²³ y se repartieron en alícuotas de 200 µL y posteriormente se mantuvieron a -80°C.

6.14.2.2 Transformación de *A. mediterranei*.

Para la transformación, las células se descongelaron en un baño de hielo y posteriormente se mezclaron 100 µL de células con 1 µg de ADN²⁴. Se incubaron en hielo durante 1 min y posteriormente se electroporaron a 10 kv/cm (separación de los electrodos en la celda. Las celdas utilizadas en este trabajo fueron de 0.1 y 0.2 cm de separación de los electrodos.

Previamente a la transformación se prepararon placas de Petri con 25 mL de medio S27M, y se dejaron secar destapadas en una campana de flujo laminar durante 2 h.

²³ GYT. Glicerol al 10 % (p/v) y extracto de levadura 2% (p/v)

²⁴ El volumen de ADN no debe ser mayor a 5 µL.

Inmediatamente después de electroporar, las células se recuperaron con 1 mL de medio R2L. Posteriormente una alícuota se mezcló con 2 mL de medio R2L-Agarosa. Dicha mezcla de transformación se depositó en las placas de medio S27M ya preparadas y se dejaron secar hasta que la mezcla gelificó.

Las placas se incubaron durante 12 horas a 28°C y posteriormente se les agregó 1 mL de solución de eritromicina a una concentración final en la placa de 10 µg/mL. Se dejó secar y posteriormente se incubaron nuevamente a 28°C durante 5-7 días.

6.15 Evaluación de rifamicina en *A. mediterranei*.

6.15.1 Condiciones de producción.

Para evaluar la producción de rifamicina, se preparó un cultivo semilla de *A. mediterranei* (parental y transformada) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YEME y un resorte metálico. Este cultivo se incubó a 25°C durante 48-50 horas (en este tiempo el cultivo se encuentra en la etapa final de la trofofase). Al medio del cultivo semilla de la cepa transformante se le agregaron 10 µg/mL de eritromicina.

El cultivo para cuantificar la producción de rifamicina se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio de producción Lee. A los matraces se les agregó un resorte de acero inoxidable de 10 cm de largo y 1 cm de diámetro. Para el caso de la cepa transformante se usaron dos tratamientos, uno con y otro sin eritromicina (10µg/mL).

Para inocular el medio de producción, se estandarizó la biomasa del cultivo semilla por centrifugación en tubos cónicos graduados volumen celular empacado. Una vez estandarizada la biomasa se tomaron alícuotas 2.5 mL para inocular cada matraz de medio de producción.

El cultivo se incubo a 25 °C y 200 rpm durante 6 días. Se evaluó la producción de rifamicina cada día durante todo el tiempo de cultivo. Para cada tratamiento se usaron dos repeticiones.

6.15.2 Cuantificación de rifamicina.

La cuantificación de rifamicina se realizó siguiendo una modificación (Mejía, 1998) del método propuesto por Pasqualucci y colaboradores en 1970.

El protocolo para cuantificar la rifamicina es el siguiente:

A 1 mL de medio de cultivo libre de células se le agregó 10-15 mg de Bisulfito de sodio (NaHSO₃) y se mezcló. Posteriormente esta mezcla se tomo como blanco a 425 nm en un espectrofotómetro, contra la absorbancia de la misma muestra de medio de cultivo libre de células a la misma longitud de onda.

Esta técnica se basa en la oxidación de la rifamicina por el NaHSO₃ que ocasiona un cambio en la absorbancia a 425 nm. La cantidad de rifamicina se calcula siguiendo la formula de Pasqualucci, basada en el coeficiente de extinción molar de la rifamicina.

$$[RifamicinaB] = \frac{(DO_{425})(50000)}{21.5}$$

6.15.3 Cuantificación de biomasa.

La biomasa del medio líquido de producción se cuantifico por peso seco. Para ello las muestras fueron secadas en estufa de vacío a 60°C durante 12 horas.

Para estandarizar la biomasa a inocular en el medio de producción, se estandarizó la biomasa a 5 mL de volumen celular empacado en tubos cónicos graduados, y posteriormente se resuspendió en medio de producción Lee hasta un volumen de 50 mL.

7. RESULTADOS

7.1 Diseño de un sistema de silenciamiento con ARN antisentido.

Para inactivar el gen se utilizó el sistema de silenciamiento con ARN antisentido. Para esto se decidió utilizar un plásmido de replicación autónoma en *A. mediterranei* (Kumar *et al.*, 1994); A este plásmido se le insertó un gen que sirviera como marcador de selección para este hospedero, concretamente el gen de resistencia a eritromicina, y el gen clonado en dirección antisentido bajo el control de un promotor, y un terminador adecuado (Tummala *et al.*, 2003).

7.1.1 Construcción del módulo de expresión del gen *rifP*, sentido y antisentido.

Para llevar a cabo este proceso se requieren tres constituyentes básicos:

- i) un promotor,
- ii) el gen orientado en sentido opuesto a su transcripción natural,
- iii) un terminador.

7.1.1.1 Promotor.

El promotor utilizado fue el del gen de resistencia a eritromicina modificado (*PermE**) (Bibb *et al.*, 1985), el cual tiene la cualidad de ser constitutivo y de alto nivel de expresión. Esto, aunado a que el plásmido hospedero en *A. mediterranei* se encuentra en alrededor de 20 copias (Kumar *et al.*, 1994) garantiza que el fragmento transcrito por la ARN polimerasa estará presente siempre y en alta concentración dentro de la célula.

Este promotor tiene un tamaño de 197 pb y ha sido clonado previamente en nuestro laboratorio en el plásmido pBKSVH (Suárez 2003). Este promotor está acotado por dos sitios de reconocimiento para las endonucleasas *HindIII* al inicio del promotor, y *BamHI* al final.

7.1.1.2 Gen *rifP*.

El gen *rifP* fue amplificado por PCR, para lo que se diseñaron cebadores específicos para la secuencia de nucleótidos que es traducida a aminoácidos. El tamaño del fragmento amplificado es de 1607 pb. Los cebadores diseñados tienen la siguiente secuencia:

5'GATG**GATCCATCC**ATGCACGCCACGGCGGCGGTG 3'

5'CGCG**GATCCATCC**CCTCCCTTCTCACCGGAGGTC 3'

La secuencia marcada en negritas corresponde con la secuencia del gen *rifP*, la secuencia subrayada es un sitio de reconocimiento para la enzima *BamHI* que se utilizará para

ligar el gen amplificado al promotor. La secuencia resaltada en gris es una parte del promotor *PermE*; finalmente las últimas tres bases del extremo 5' se agregaron para facilitar la restricción del sitio *BamHI* agregado.

7.1.1.3 Terminador.

El terminador utilizado es el de la enzima aspartato semialdehído deshidrogenasa de *Amycolatopsis lactamdurans* (*Tasd*) (Hernando-Rico *et al.*, 2001). Dicho terminador consta de una secuencia palindrómica Rho dependiente de 42 pares de bases. El terminador fue sintetizado químicamente, añadiéndosele extremos cohesivos para la enzima *BamHI*, para ligarlo al gen *rifP*, y *XbaI* al otro extremo. La secuencia de los oligonucleótidos del terminador es la siguiente:

5'GATCCGGGCCGCACCGCACGGGCACCCGCCCGCGCCGTGCGGCCCGGAATT3'

3'GCCCCGGCGTGGCGTGCCCGTGGGCGGGCGCGGCACGCCGGGGCCTTAAGATC 5'

7.1.2 Inserción del terminador en pBluescript® KS(+)

Los oligonucleótidos que contenían la secuencia del terminador *Tasd* se mezclaron en cantidades equimolares (aproximadamente 1 µg) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar lentamente para permitir la hibridación adecuada de ambos fragmentos. De esta mezcla se tomaron 0.5 µg de ADN bicatenario y se preparó una reacción de ligado con el plásmido pBluescript® KS(+) (Stratagene) digerido previamente con las enzimas *BamHI* y *XbaI*. La mezcla de ligación se transformó utilizando células competentes de *E. coli* DH5α. Se seleccionaron colonias en cajas de Petri con LA adicionadas con ampicilina, IPTG y X-Gal. A pesar de que el tamaño del inserto es muy pequeño, éste cambió el marco de

lectura del fragmento del gen *lacZ* del plásmido por lo que se obtuvieron colonias azules (sin inserto) y blancas (con inserto).

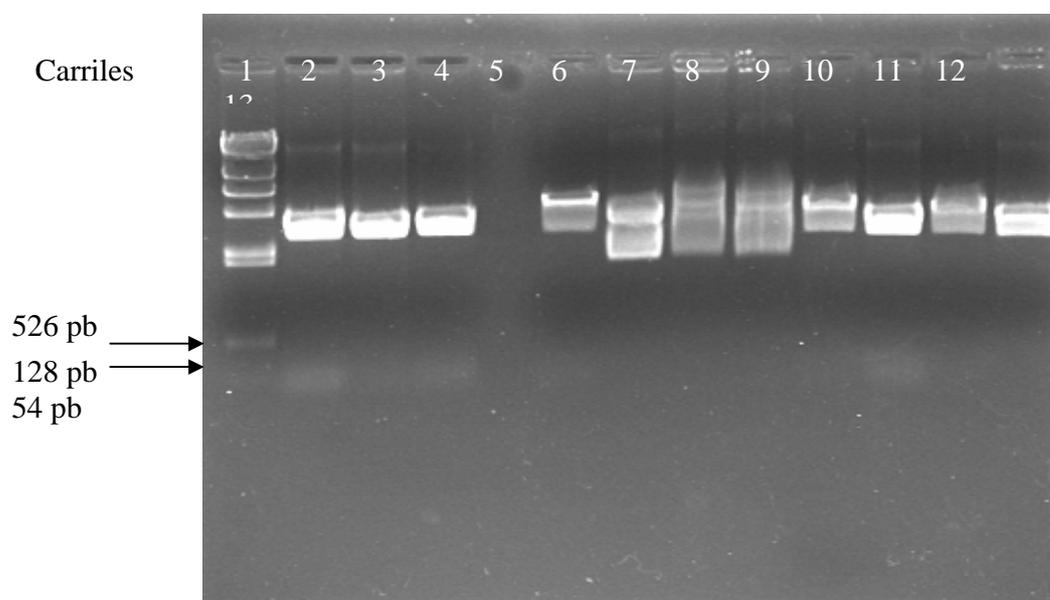


Figura 7.1 Gel de agarosa que muestra el ADN plasmídico aislado de las colonias transformantes, digerido con *Eco*RI. En el carril 1 se encuentra el fago λ digerido con la enzima *Hind*III, los fragmentos más pequeños son de 526 y 128 pb. Las colonias de los carriles 2, 4 y 11 muestran la liberación de un fragmento menor a las 123 pb.

Las colonias blancas se sembraron en TB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se procedió a la purificación de los plásmidos recombinantes por la técnica descrita como minipreparaciones. El ADN plasmídico se digirió con la enzima *Eco*RI, que ahora tiene dos cortes en el plásmido, uno en el polilinker y otro en la secuencia del terminador. Se eligieron las colonias que liberaron un fragmento de 66 pb, es decir, las que habían insertado el terminador (Fig. 7.1). Se encontraron 3 colonias que muestran un fragmento del tamaño esperado.

El nuevo plásmido construido fue llamado pAET1, y tiene las mismas características de replicación y resistencia del pBluescript®KS + con el terminador *asd* inserto entre los sitios de restricción *Xba*I y *Bam*HI. La inserción entre dichos sitios de restricción ocasionó que se perdiera el sitio de restricción para la enzima *Spe*I. En la figura 7.2 se muestra un mapa de este plásmido.

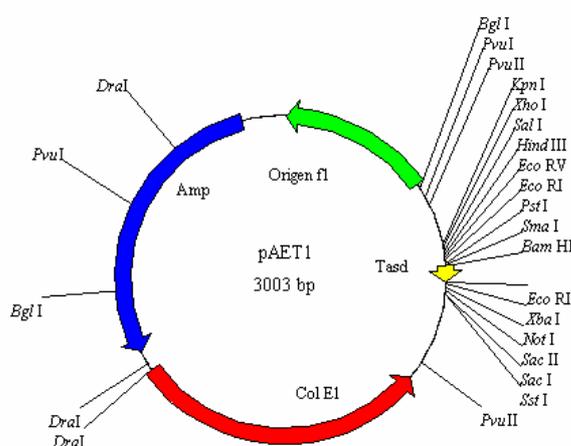


Figura 7.2 Mapa del plásmido pAET1 construido.

Para continuar con la construcción del sistema de expresión, se seleccionó y amplificó el ADN plasmídico de la colonia del carril 2 y se procedió a preparar el plásmido para ligarlo con el promotor.

7.1.3 Subclonación del promotor *Perme* del plásmido pBKSVH en pAET1

El promotor del gen de resistencia a eritromicina modificado por Bibb *et al.*, en 1985 (*Perme**) presente en el plásmido pBKSVH (Suárez 2003, el mapa de restricción de este plásmido se encuentra en la sección 7.2 de material y métodos) se liberó del plásmido

mediante digestión con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. El producto de la digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. El fragmento correspondiente al promotor *PermE**, de 192 pb, fue escindido del gel y purificado utilizando el sistema para aislamiento y purificación de fragmentos de ADN Qiaquick® (QIAGEN).

Por otro lado, el plásmido pAET1 se digirió con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. El producto de la digestión se purificó siguiendo el protocolo para desalado y concentrado de muestras de ADN del sistema Qiaex II® (QIAGEN).

La mezcla de ligado se realizó mezclando el plásmido pAET1 digerido con el fragmento purificado correspondiente a *PermE* en proporción 1:3 es decir 3 partes de promotor por cada parte de plásmido. Se incubó a 4 °C durante 16 horas y posteriormente se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α. La transformación se sembró en cajas de Petri con medio LA adicionado con ampicilina, X-Gal e IPTG. De todas las colonias transformadas se aisló el plásmido y el ADN se digirió con las enzimas *HindIII* y *XbaI*, en doble digestión. Se esperaba que los plásmidos que hubieran insertado el fragmento *PermE* al ser digeridos con las enzimas *HindIII* y *XbaI* liberaran un fragmento de 244 pb correspondiente al tamaño de promotor y terminador unidos. En la figura 7.3 se muestra el resultado de la electroforesis de los plásmidos aislados de las colonias transformantes digeridas con las dos enzimas.

El patrón de restricción de los plásmidos recombinantes de las colonias 3, 6, 8, 10 y 19 concuerdan con el patrón esperado teóricamente. A este nuevo plásmido obtenido se le nombró pAEPT1 y tiene características replicativas y de selección por resistencia idénticas al pBluescript® KS+. Este plásmido tiene el promotor *PermE** y el terminador *Tasd* entre los

sitios *Hind*III y *Xba*I. Además, posee un sitio de restricción *Bam*HI entre promotor y terminador que servirá para la clonación del gen *rif*^R. El mapa de restricción del plásmido pAEPT1 se muestra en la figura 7.4.

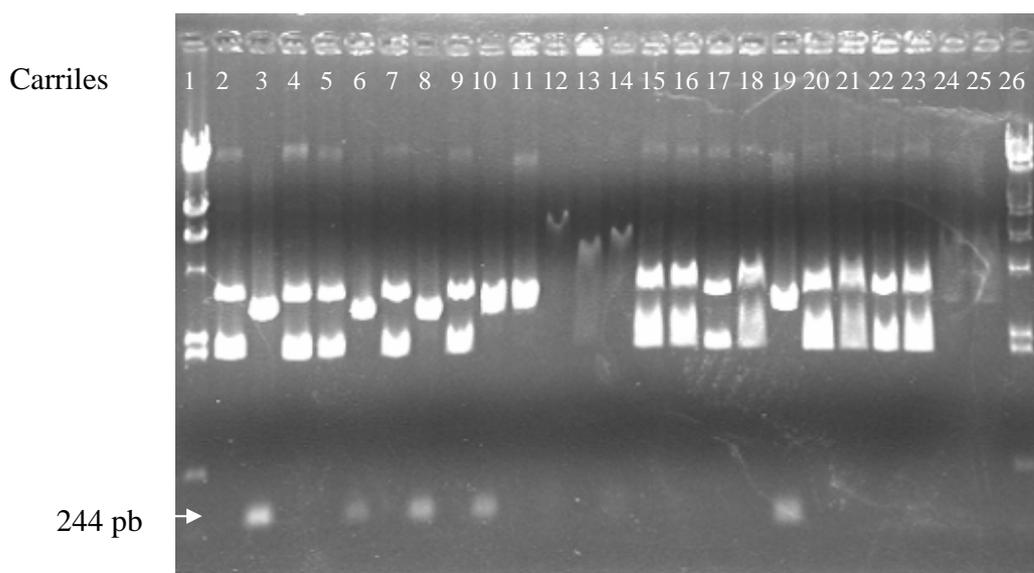


Figura 7.3 Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión *Hind*III y *Xba*I de los plásmidos aislados de las células transformantes. En el carril 1 y 26 se encuentra el fago ADN del λ digerido con la enzima *Hind*III. En los carriles 3, 6, 8, 10 y 19 se encuentran los plásmidos que liberan el fragmento de 244 pb esperado.

Debido a la inserción del fragmento *Perme* entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III se perdieron los sitios de restricción del polilinker *Eco*RI, *Eco*RV, *Pst*I y *Sma*I.

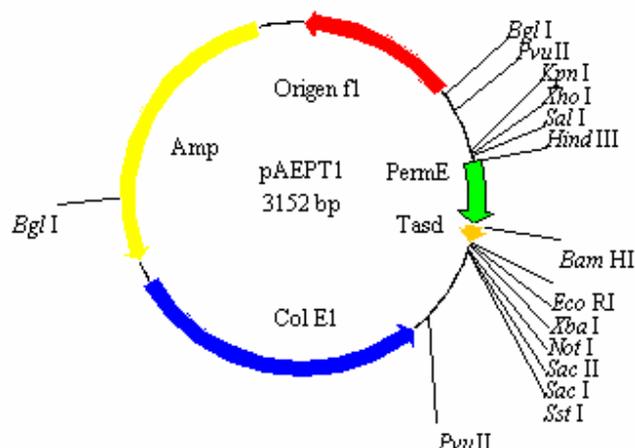


Figura 7.4. Mapa del plásmido pAEPT1

El plásmido del carril número 3 se seleccionó y amplificó y se procedió a su preparación para la clonación del gen *rifP*.

7.1.4 Amplificación del gen *rifP* por PCR.

Con base en la secuencias de nucleótidos reportadas con número de acceso AF040570 y AF040571 del banco de genes del “*National Center of Biotechnology Information*” (NCBI) se diseñaron oligonucleótidos para ambos extremos del gen *rifP*. Los oligonucleótidos diseñados contienen en el extremo 5’ 12 nucleótidos extras que no aparean con el gen, de éstos, los primeros 3 se agregaron para facilitar la digestión con la enzima *Bam*HI (cuyo sitio de restricción se incorporó también a los oligonucleótidos), para fines de clonación del producto de PCR. Las 9 bases siguientes son parte de la secuencia de *PermE*, que contiene además un sitio de restricción *Bam*HI. El sitio de restricción *Bam*HI se encuentra en el extremo 3’ del *PermE* y fue muy importante para fines de la subclonación del gen *rifP* en medio de promotor y terminator.

Para amplificar el gen se utilizó ADN de *A. mediterranei* S699. Se utilizó esta cepa por ser la que se usó para secuenciar el conjunto de genes de la ruta de biosíntesis de rifamicina. El aislamiento de ADN total y la amplificación por PCR se realizó como se describe en Material y Métodos.

Posterior a la amplificación por PCR del gen *rifP*, se separaron los fragmentos amplificados en un gel de agarosa (Fig. 7.5).

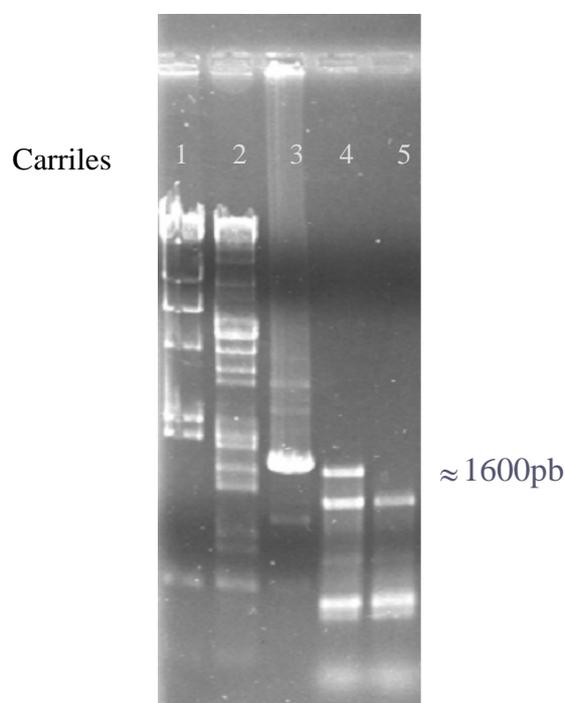


Figura 7.5 En esta electroforesis se observan tres marcadores de peso molecular en los carriles 1, 2 y 3 que corresponden respectivamente al ADN del fago λ digerido con *HindIII*, el ADN del fago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI* y la digestión del plásmido pIJ4026 con *EcoRI* y *XbaI* que se sabe genera un fragmento de 1655 pb. En los carriles 4 y 5 se muestran dos reacciones de amplificación por PCR, siendo en el carril 4 que se observa un fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1600 pb.

En el esquema del gel de agarosa, en los carriles 4 y 5 se observan los fragmentos amplificados por PCR: en la reacción del carril 4 se amplificaron tres fragmentos de ADN, uno de los cuales se encuentra entre las bandas de 1584 y 1709 pb del marcador de peso molecular λ HindIII-EcoRI (carril 2) que es el tamaño aproximado del fragmento esperado (1600 pb). La diferencia entre los carriles 4 y 5 radica en la adición del reactivo Q²⁵ (QUIAGEN),

El fragmento del carril 4 se aisló a partir del gel de agarosa y se purificó. Para comprobar que el fragmento amplificado correspondía al del gen *rifP* se digirió usando la enzima de restricción *XhoI*, ya que se sabe que el gen *rifP* tiene un sitio de reconocimiento para la enzima *XhoI* a la altura de las 950 pb. Por lo tanto se esperaban dos fragmentos producto de la digestión con la enzima *XhoI*, uno de 950 y otro de 650 pb.

El producto de PCR del gen *rifP* purificado se ligó al plásmido linearizado pGEM-T[®] (Promega) de acuerdo al protocolo propuesto para tal efecto. La mezcla de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α y se seleccionaron transformantes en medio LA suplementado con ampicilina, IPTG y X-Gal. Las colonias que contenían el plásmido recombinante se seleccionaron por su color blanco prueba de que se perdió la característica de la α -complementación aportada por el plásmido original. Se aisló el ADN plasmídico siguiendo el protocolo de minipreps y este se digirió con la enzima *PstI*. Las digestiones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa mostrado en la figura 7.6.

²⁵ **Reactivo Q:** El proveedor (QUIAGEN) No da información acerca de la naturaleza química de este compuesto, sin embargo se sabe que este reactivo disminuye la formación de estructuras secundarias durante la amplificación de la polimerasa, por lo que resulta útil al usarlo al amplificar muestras de ADN ricas en G y C.

El plásmido pGEM-T® tiene un sitio de reconocimiento para la enzima *Pst*I, y el gen *rif*P tiene dos sitios de reconocimiento para esta enzima en los sitios 896 y 1376. Por lo tanto al digerir el ADN plasmídico purificado se esperaría que se liberara un fragmento de 480 pb (que es el fragmento que existe entre los dos sitios de reconocimiento *Pst*I dentro del gen *rif*P), otro fragmento desde el corte *Pst*I del plásmido a uno de los del gen (cuyo tamaño dependería de la orientación con que se inserte el gen), y finalmente el resto del plásmido.

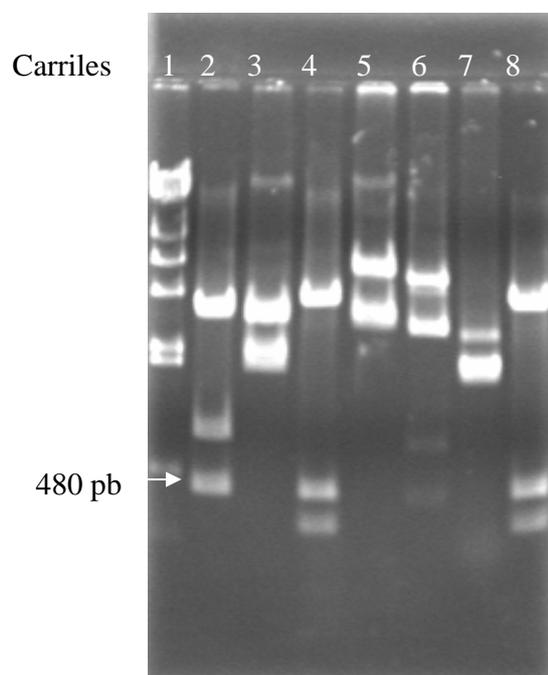


Figura 7.6 Electroforesis de las digestiones con la endonucleasa *Pst*I de los plásmidos recombinantes (carriles 2-8). En el carril 1 se muestra el ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind*III como marcador de peso molecular.

De acuerdo a esto, en los carriles 2, 4, 6 y 8 de la figura 7.6 se encuentra el ADN correspondiente a colonias que insertaron el fragmento del gen *rif*P con las dos orientaciones

posibles. Posteriormente se procedió a digerir los mismos ADNs con la enzima *Bam*HI. Esta enzima debería tener dos sitios de reconocimiento, uno a cada lado del gen *rif*P, que se anexaron en las secuencias de los cebadores. Para la posterior subclonación entre promotor y terminadores utilizaría dicho sitio de restricción para liberar el gen. De acuerdo al patrón de restricción de los plásmidos recombinantes se observó que las dos orientaciones con que se ligó el fragmento *rif*P se encuentran en las colonias de los carriles 2 y 8 cuyos plásmidos se denominaron pRIFP(+) y pRIFP(-). Dichos plásmidos se muestran en las figuras 7.8A y 7.8B.

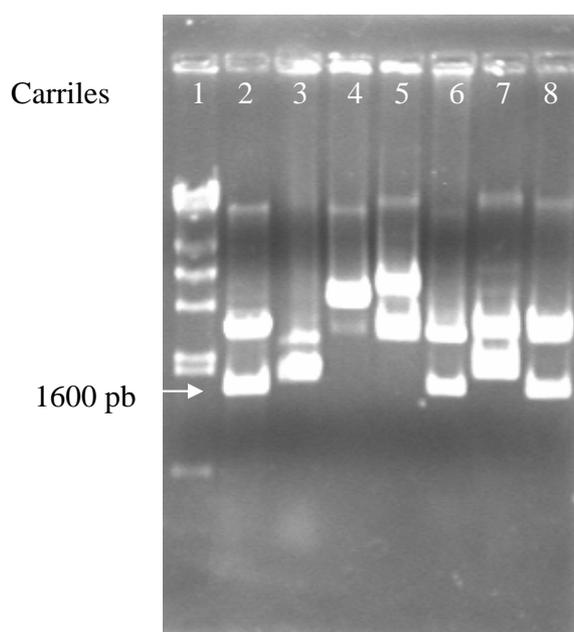


Figura 7.7 Electroforesis de las digestiones enzimáticas con *Bam*HI de los plásmidos recombinantes (carriles 2-8). En el carril 1 se muestra el ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind*III como marcador de peso molecular.

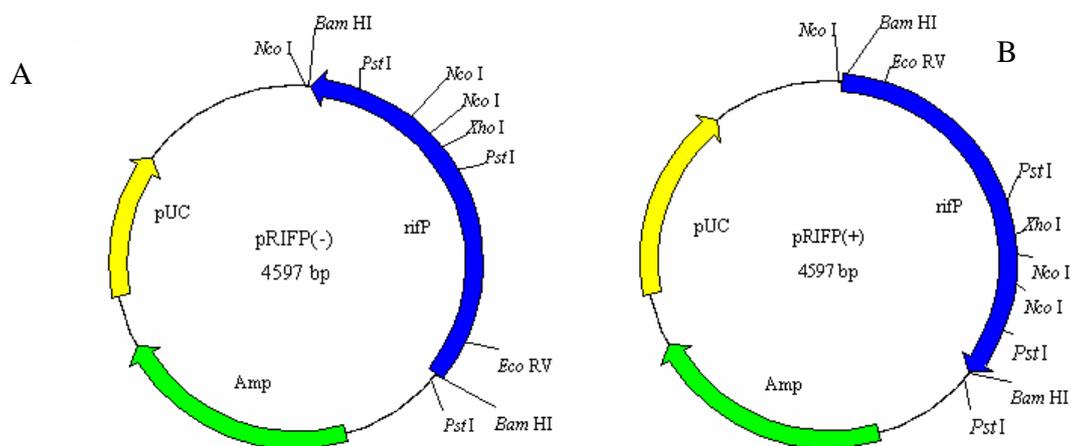


Figura 7.8 Mapas de restricción de los plásmidos pRIFP(-) (A), y pRIFP(+) (B)

7.1.5 Clonación del gen *rifP* en el plásmido pAEPT1 en dirección antisentido.

La construcción del módulo de expresión del gen *rifP* en dirección antisentido se realizó usando como vehículo el plásmido pAEPT1 y como donador del inserto el plásmido pRIFP(+). Para subclonar el gen *rifP* del plásmido pRIFP(+), éste se digirió con la enzima *Bam*HI. El producto de digestión se separó en un gel de agarosa por electroforesis, y el fragmento de aproximadamente 1600 pb fue purificado. Por otro lado, el plásmido pAEPT1 fue digerido con la misma enzima y posteriormente tratado con fosfatasa de camarón para evitar la recircularización del plásmido. Ambos fragmentos de ADN se mezclaron en proporción 3:1 inserto-vector y se ligaron a 4°C durante 12 h. Finalmente la reacción de ligado se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . De las colonias transformantes se purificó el plásmido, y se buscó un incremento en el tamaño del plásmido de 3 kb a 4.7 kb. El ADN procedente de una de las colonias, que presentó el incremento esperado en el tamaño del

plásmido se digirió con varias enzimas de restricción para comprobar la inserción del gen *rifP* en dirección antisentido al promotor *Perme*.

La colonia seleccionada se digirió con las enzimas de restricción: i) *XhoI* para comprobar la dirección del inserto; ii) *BamHI* para comprobar la inserción del fragmento *rifP*; iii) *HindIII*, *XbaI*, y *EcoRI* para comprobar que son de corte único ya que son las enzimas que se utilizarían para subclonar el módulo de expresión *rifP_{as}* y para comprobar el tamaño del plásmido formado (Fig. 7.9).

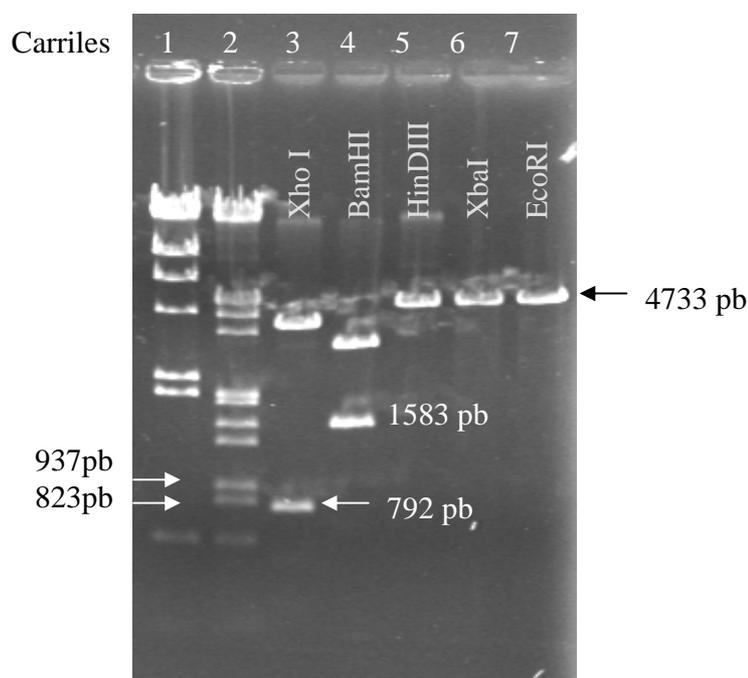


Figura 7.9 Gel de agarosa separado por electroforesis, donde en los carriles 1 y 2 se muestran los marcadores de peso molecular λ *HindIII*, y λ *HindIII-EcoRI*, respectivamente. En los carriles 3, 5, 6, y 7 se muestra la digestión del plásmido pAEPGT(-) con diferentes enzimas de restricción.

La digestión del plásmido recombinante con la enzima *Xho*I sirvió para comprobar que el gen *rifP* se insertó en dirección antisentido con respecto al promotor y terminador. De acuerdo con el mapa de restricción del plásmido esperado (Fig. 7.10), la enzima *Xho*I tiene dos sitios de reconocimiento, uno de ellos (fijo) ubicado corriente arriba del promotor, a la altura de las 669 pb, y un segundo (variable, de acuerdo a la orientación en que se insertó el gen) que, de haberse insertado el gen *rifP* en dirección antisentido, se encontraría a la altura de la base 1,461. Por lo tanto, con la digestión *Xho*I, en el caso de la inserción *rifPas* deberían generarse un fragmento de 792 pb y otro de 3,641 pb. En caso contrario (la inserción *rifP* en dirección sentido) los fragmentos generados serían de 1,201 y 3,532 pb. El plásmido formado se denominó pAEPGT(-) (Fig. 7.10)

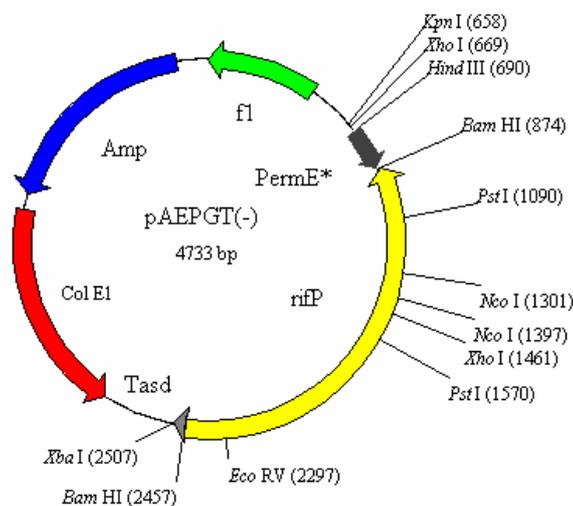


Figura 7.10 Mapa del plásmido pAEPGT(-)

7.2 Construcción de un plásmido de replicación autónoma y seleccionable en *A. mediterranei*.

Con el fin de obtener un plásmido que se replique y sea seleccionable en *A. mediterranei*, se construyó en un principio el plásmido pUAMAE2.

7.2.1 Construcción del plásmido pUAMAE2

Para transcribir el gen *rif^P_{as}* se utilizará un vector de replicación autónoma en *A. mediterranei*. Para seleccionar transformantes se requiere un marcador de selección adecuado, como un gen de resistencia a un antibiótico. Sin embargo *A. mediterranei* es resistente a una gran cantidad de antibióticos (Lal *et al.*, 1998), incluida la kanamicina, que es el marcador de selección codificado en el plásmido pULVK2 (Kumar *et al.*, 1994)

Por esta razón es necesaria la inserción de un nuevo gen de resistencia en el plásmido pULVK2 para seleccionar transformantes en *A. mediterranei*. Uno de los antibióticos a los que es sensible *A. mediterranei* es la eritromicina, por lo que se insertará un gen de resistencia para este antibiótico cuya expresión se ha probado ya en el género *Amycolatopsis* (Bibb *et al.*, 1985).

El gen de resistencia a eritromicina se encuentra clonado en el plásmido pIJ4026 (Bibb *et al.*, 1985), por lo que a partir de éste se escindiré para su inserción en el pULVK2.

7.2.1.1 Restricción de los plásmidos donantes

De acuerdo con el mapa de restricción del plásmido pULVK2, este tiene un fragmento de aproximadamente 1700 pb (acotado por los cortes *EcoRI-XbaI*) que aparentemente no tienen ninguna función en la replicación del plásmido (Tuteja *et al.*, 2000), por lo que este

fragmento puede ser delecionado. El fragmento restante de aproximadamente 4000 pb contiene el origen de replicación en *E. coli* del plásmido pBR322, el gen de resistencia a kanamicina y el origen de replicación del plásmido nativo pA387 de *A. mediterranei*.

Por otro lado, el plásmido pIJ4026 contiene el gen de resistencia a eritromicina *ermE*, y a ambos lados del gen hay varios sitios de corte únicos para enzimas de restricción. En el extremo 3' del gen se encuentra un sitio de corte único para *EcoRI*, mientras que en el extremo 5' se encuentra un sitio de corte único para *XbaI*; ambas enzimas delimitan un fragmento de aproximadamente 1700 pb que contienen al gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) (Fig. 7.11).

Ambos plásmidos fueron purificados y se sometieron a un análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* por separado y en doble digestión para comprobar el patrón de restricción. En la figura 7.11 se puede ver el patrón de bandeo resultante, en el carriles 2 y 3 se observa el plásmido pIJ4026, de aproximadamente 4312 pb linearizado con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente, y en carril 4 el mismo plásmido digerido con ambas enzimas, en donde se pueden ver bandas de 1700 y 2700 pb. En los carriles 5 y 6 se observa el plásmido pULVK2, de 5700 pb digerido con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* respectivamente, y en carril 7 el mismo plásmido digerido con ambas enzimas, generando un fragmento de 1700 pb y otro de 4000 pb, (este último conserva todas las características funcionales del plásmido).

El fragmento *EcoRI-XbaI* de 1700 pb del pIJ4026 y el fragmento *EcoRI-XbaI* de 4000 pb de pULVK2 se purificaron a partir del gel de agarosa y se mezclaron en condiciones de ligado.

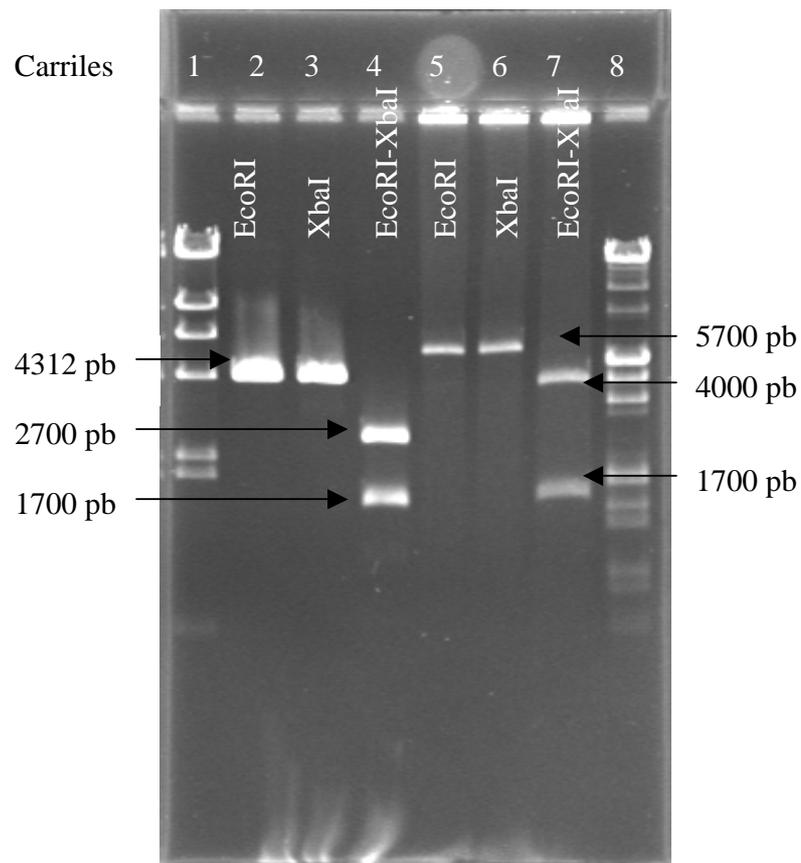


Figura 7.11 Gel de agarosa separado por electroforesis, en donde se muestra en los carriles 1 y 8 los marcadores de peso molecular λ *Hind*III, y λ *Hind*III-*Eco*RI, respectivamente. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones del plásmido pIJ4026, y en los carriles 5, 6 y 7 las digestiones del plásmido pULVK2.

El producto de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α y éstas se sembraron en placas de LA suplementado con kanamicina.

7.2.1.2 Análisis de transformantes

Cinco colonias transformantes fueron seleccionadas para el análisis del ADN plasmídico. Los plásmidos aislados de las colonias transformantes fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

De un análisis previo de las secuencias de nucleótidos y del patrón de restricción, se esperaban dos cortes en el plásmido recombinante para cada enzima (Fig. 7.12). La restricción con *Bam*HI generaría dos fragmentos, uno de 700 y otro de 5000 pb, mientras que la restricción *Hind*III generaría un fragmento de 900 y otro de 4800 pb (Figura 7.13).

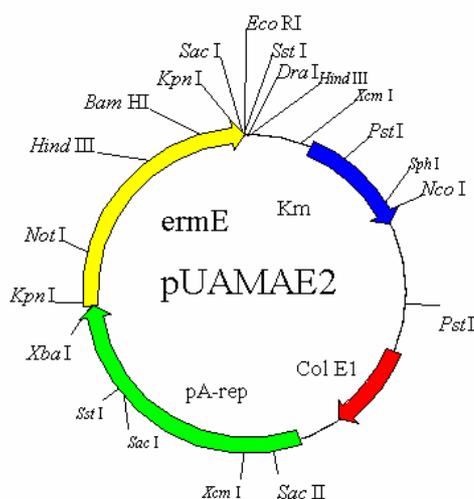


Figura 7.12 Mapa del plásmido pUAMAE2 construido a partir de los plásmidos pULVK2 y pIJ4026

Las cinco colonias transformantes analizadas muestran un cambio en el patrón de restricción para las enzimas antes mencionadas. Para la enzima *Bam*HI (carriles 2-6) se generan dos fragmentos, uno de 800 pb y otro de 4900 pb aproximadamente. Mientras que el patrón de restricción con la enzima *Hind*III (carriles 8-12) genera dos fragmentos, uno de 1000 pb y otro de 4700 pb aproximadamente. Como control, en los carriles 7 y 13 se muestra el plásmido pULVK2 digerido con las mismas enzimas, y se observa corte único. En los carriles extremos (1 y 14) de la figura 7.9 se encuentra el marcador λ *Hind*III.

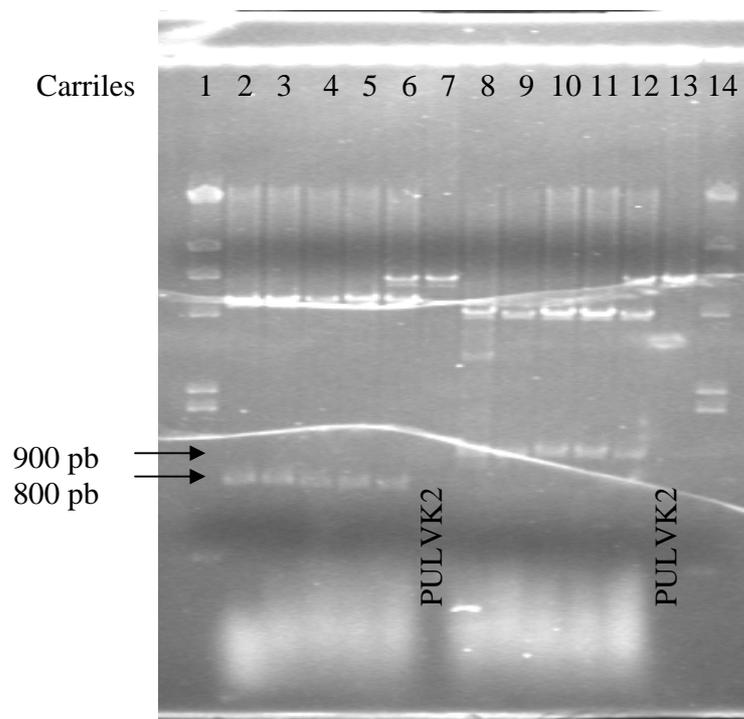


Figura 7.13 Restricción de los plásmidos recombinantes obtenidos de las transformantes con las enzimas *Bam*HI (Carriles 2 al 6) y *Hind*III (carriles 8 al 12). En los carriles 1 y 14 se muestra el marcador de peso molecular λ *Hind*III. En los carriles 7 y 13 se encuentra el plásmido pULVK2 digerido con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III como control; estas enzimas son de corte único en este plásmido.

De esta manera el fragmento *Eco*RI-*Xba*I del plásmido pULVK2 fue reemplazado por el gen *ermE*. Debido a que ambos fragmentos son casi del mismo tamaño, el nuevo plásmido mantiene un tamaño aproximado al anterior, de aproximadamente 5.7 kb.

El nuevo plásmido construido fue llamado pUAMAE2 (figura 7.12) y tiene las siguientes características: 1) el origen de replicación para *E. coli* Col E1 del plásmido pBR322; 2) un gen de resistencia a kanamicina para seleccionar transformantes en *E. coli*; 3)

el origen de replicación autónoma para *A. mediterranei* (Tuteja *et al.*, 2000), y 4) el gen de resistencia a eritromicina *ermE*, para seleccionar transformantes en este último hospedero.

Por el patrón de restricción del plásmido pUAMAE2 se pensó que se podría insertar el módulo de expresión antisentido digiriendo *EcoRI* y mediante digestión parcial con *HindIII*. El plásmido pUAMAE2 serviría como control de la transformación.

7.2.2 Construcción del plásmido pUAMAE5

Una vez construido el casete de expresión antisentido del gen *rifP* se procedió a subclonarlo a un vector de replicación autónoma en *Amycolatopsis mediterranei*. Por los resultados obtenidos en el intento de transformación de *A. mediterranei* con el plásmido pUAMAE2, se consideró utilizar todo el plásmido completo, incluyendo el fragmento deletado para la construcción de pUAMAE2. Por lo tanto, además de agregar el casete de expresión *rifPas*, se debe agregar el gen *ermE*. Para insertar el *rifPas*, y *ermE* en el plásmido pULVK2 se consideró la ligación de todos los fragmentos de interés en una sola reacción (Fig. 7.14). El plásmido pULVK2 se digirió con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. Esta digestión no modifica ninguna de las características originales del plásmido, ya que estos sitios de restricción están separados por unas 50 pb aproximadamente (Kumar *et al* 1994) , y no están dentro de una secuencia importante del plásmido. El plásmido pAEPGT(-) se digirió con las enzimas *HindIII* y *XbaI* que son los sitios de restricción que acotan al casete de expresión del gen *rifPas*. Por otro lado el plásmido pIJ4026 se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* que son las enzimas que acotan al gen *ermE*.

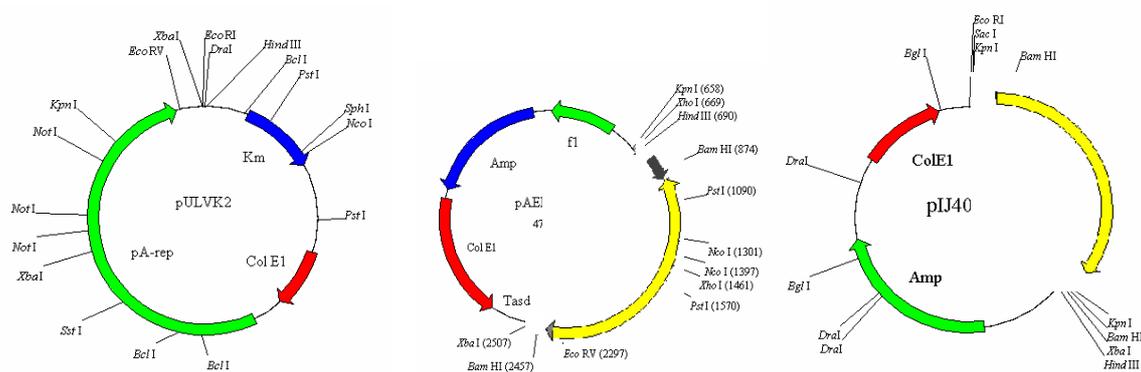


Figura 7.14 Esquema de los plásmidos donantes, cada uno muestra el fragmento que formará parte del nuevo plásmido, que incluirá todas las características para seleccionar transformantes en *A. mediterranei*, expresar *rifPas*, y replicarse autónomamente en el mismo huésped.

Teóricamente la ligación se realizaría como sigue: el extremo *EcoRI* del plásmido pULVK2 se ligaría con el extremo *EcoRI* del fragmento *ermE*; mientras que el extremo *HindIII* se ligaría con el extremo *HindIII* del fragmento *rifPas*. Finalmente los extremos *XbaI* de los fragmentos *rifPas* y *ermE* se ligarían entre sí.

La mezcla de ligación se realizó en proporción 1:3:3 de pULVK2-*ermE*-*rifPas* respectivamente, y posteriormente se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α .

Como resultado de la transformación se encontraron solo 2 colonias transformantes resistentes a kanamicina. A estas dos colonias se les purificó el plásmido y posteriormente digirió con enzimas de restricción para comprobar que contenían los insertos *rifPas* y *ermE*.

El ADN plasmídico purificado de las transformantes se digirió con dos enzimas de restricción por separado cada uno, *HindIII* y *EcoRI*. De acuerdo al mapa de restricción del plásmido esperado, la enzima *HindIII* tiene dos sitios de reconocimiento, uno de ellos en donde se realizó la ligación pULVK2-*rifPas*, y otro de ellos en la secuencia interna del gen

ermE, lo que generaría dos fragmentos de ADN de 2.5 y 7.7 kb aproximadamente. La enzima *EcoRI* debería tener dos sitios de restricción, uno en el sitio de ligación pULVK2-*ermE*, y otro en la secuencia del terminador *Tasd* del casete *rif*^R, lo que generaría dos fragmentos de ADN de 7.5 y 1.7 kb respectivamente (Fig.7.15).

Este plásmido se amplificó en una cepa de *E. coli* que no metila el ADN y purificó para transformar *A. mediterranei*. Se utilizó ADN plasmídico no metilado para la transformación de *A. mediterranei* porque es un factor que incrementa hasta en un 20% la eficiencia de transformación en diferentes actinomicetos.

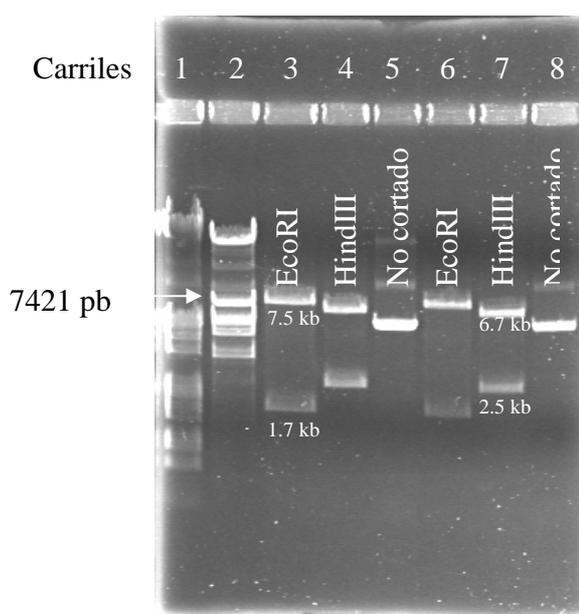


Figura 7.15 Electroforesis en gel de agarosa que muestra el análisis de las dos colonias transformantes obtenidas. En los carriles 1 y 2 se muestran los marcadores de peso molecular λ *HindIII* y λ *EcoRI*. En los carriles 3, 4 y 5 se muestra el ADN plasmídico de una las transformantes, y en los carriles 6, 7 y 8 la otra.

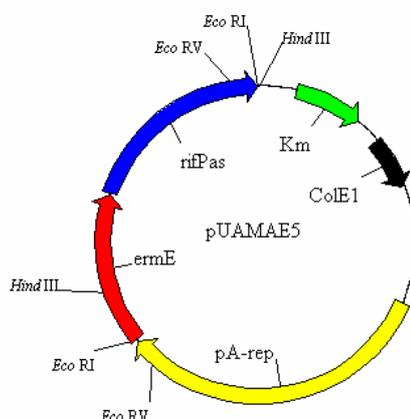


Figura 7.16 Mapa de restricción del plásmido pUAMAE5

7.3 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699

La transformación de *A. mediterranei* se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección de material y métodos. Esta técnica es una modificación del autor a varias técnicas descritas previamente, y se enfoca en tratar de proteger a las células del estrés osmótico causado por la formación de poros en la membrana plasmática y pared celular.

7.3.1 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699 con el plásmido pUAMAE2

Se realizó la transformación siguiendo lo descrito en la sección 7.15.2 de material y métodos, sin embargo no se obtuvieron transformantes. Se descartaron fallas en el método pues hay crecimiento adecuado en los controles de viabilidad después de la transformación (Tabla 7.1), las posibles causas se comentan en la sección de discusión de resultados. En la columna 1 se encuentra el resultado de la transformación seleccionada en placas de medio adicionado con eritromicina, en donde no se observó crecimiento de alguna transformante. En

el tratamiento 2 se muestra el control de sensibilidad después de electroporar, en donde no hubo crecimiento. El tratamiento 3 es control de viabilidad después de electroporar; en donde se comprobó que las células no mueren. El tratamiento 4 es el control de sensibilidad a eritromicina de las células antes de la electroporación. Y Finalmente el control de viabilidad antes de la electroporación.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Electroporadas	Electroporadas	Electroporadas	No electroporadas	No electroporadas
Con plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido
Con antibiótico	Con antibiótico	Sin antibiótico	Con antibiótico	Sin antibiótico
-	-	+	-	+

TABLA 7.1 Resultados de la transformación de *A. mediterranei* con el plásmido pUAMAE2

7.3.2 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699 con el plásmido pUAMAE5

En la tabla 7.2 se muestran los resultados del diseño experimental de la transformación. En la columna correspondiente al tratamiento 1 se encuentra el resultado de la transformación seleccionada en placas de medio adicionado con eritromicina. Aquí se encontraron 26 posibles transformantes al día 7 de incubación. En el tratamiento 2 se muestra el control de sensibilidad después de electroporar, este control se justifica por el hecho de que algunos microorganismos al ser electroporados adquieren resistencia espontánea a ciertos antibióticos, sin embargo en este experimento no ocurrió así. El tratamiento 3 es control de viabilidad después de

electroporar; en este experimento se trataba de observar si el voltaje era tal alto que mataba a las células, pero se puede observar que el voltaje utilizado (10kV/cm) no mata a las células. El tratamiento 4 es el control de sensibilidad a eritromicina de las células antes de la electroporación. Y Finalmente el control de viabilidad antes de la electroporación.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Electroporadas	Electroporadas	Electroporadas	No electroporadas	No electroporadas
Con plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido
Con antibiótico	Con antibiótico	Sin antibiótico	Con antibiótico	Sin antibiótico
+	-	+	-	+

TABLA 7.2 Resultados de la transformación de *A. mediterranei* por electroporación.

7.4. Aislamiento de ADN plasmídico de *A. mediterranei*.

Para comprobar que se había insertado el plásmido pUAMAE5 en *A. mediterranei* se procedió a purificar el plásmido de 3 colonias transformantes (Fig. 7.17)

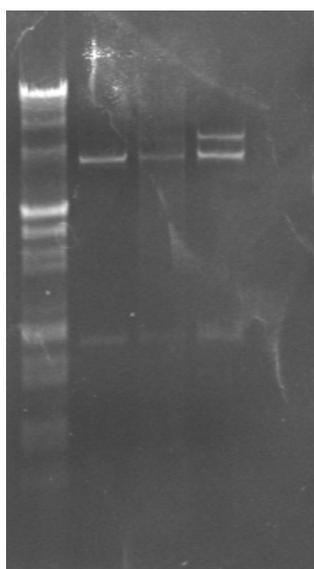


Figura 7.17 ADN plasmídico aislado de *A. mediterranei* rif^{as}. En el carril 1 se observa el ADN del fago λ digerido con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, en los carriles 2, 3 y 4 en ADN aislado de 3 colonias transformantes. En el carril 5, como control, *A. mediterranei* S699 sometida al mismo proceso.

7.5. Evaluación de la producción de rifamicina en cultivo sumergido.

Para evaluar la producción de rifamicina entre la cepa *rifPas* y la parental S699 se crecieron en condiciones de producción. Cada tratamiento se realizó por duplicado y las medias de pH, biomasa y rifamicina grafican a continuación.

En la figura 7.18 se grafica la producción de rifamicina de la cepa S699 y *rifPas* en condiciones de producción.

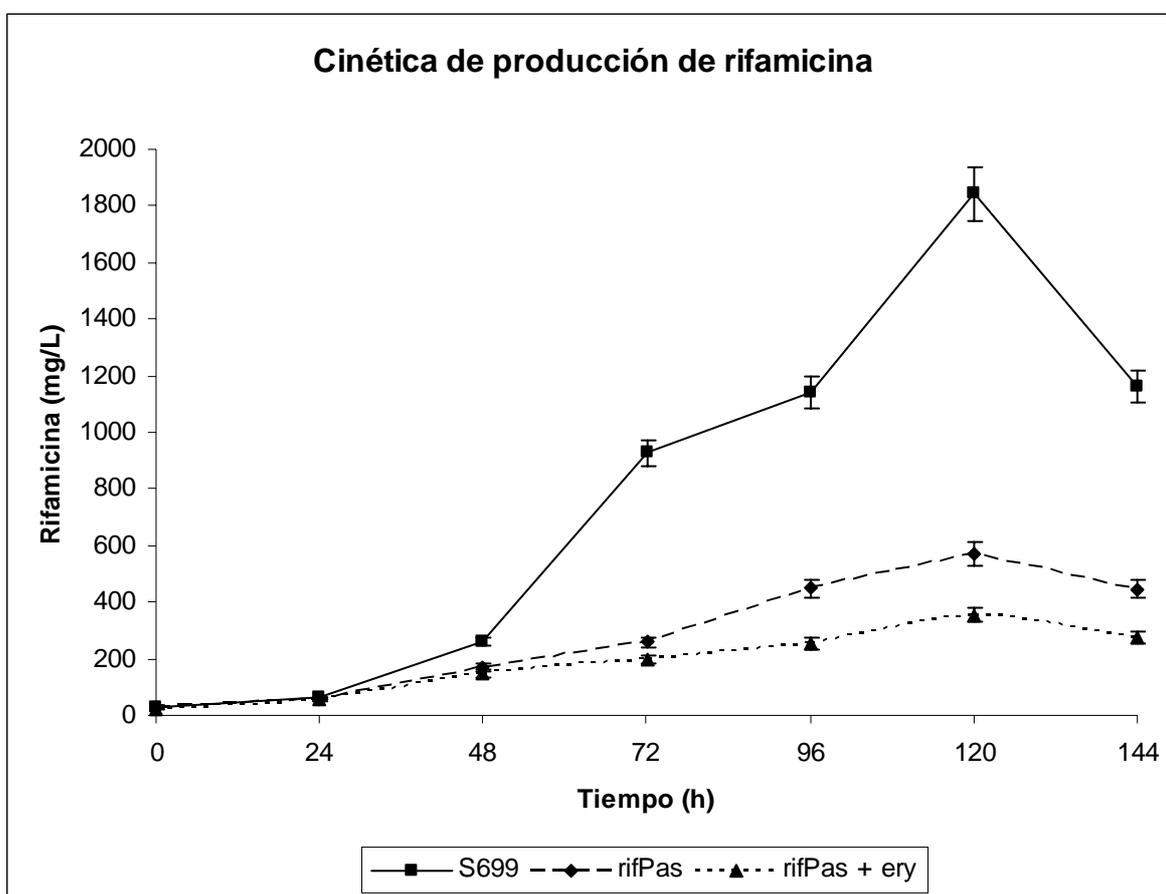


Figura 7.18 Gráfico de la producción de rifamicina de las cepas S699 y *rifPas* en condiciones de producción.

De forma adicional se evaluó la cantidad de biomasa producida durante la fermentación. En la figura 7.19 se grafica la cantidad de biomasa durante la fermentación, y se observa que la inactivación del gen *rifP* tiene un efecto sobre el crecimiento en la cepa *rifP*_{as}, pero éste, no se debe a la eritromicina presente en el medio de cultivo.

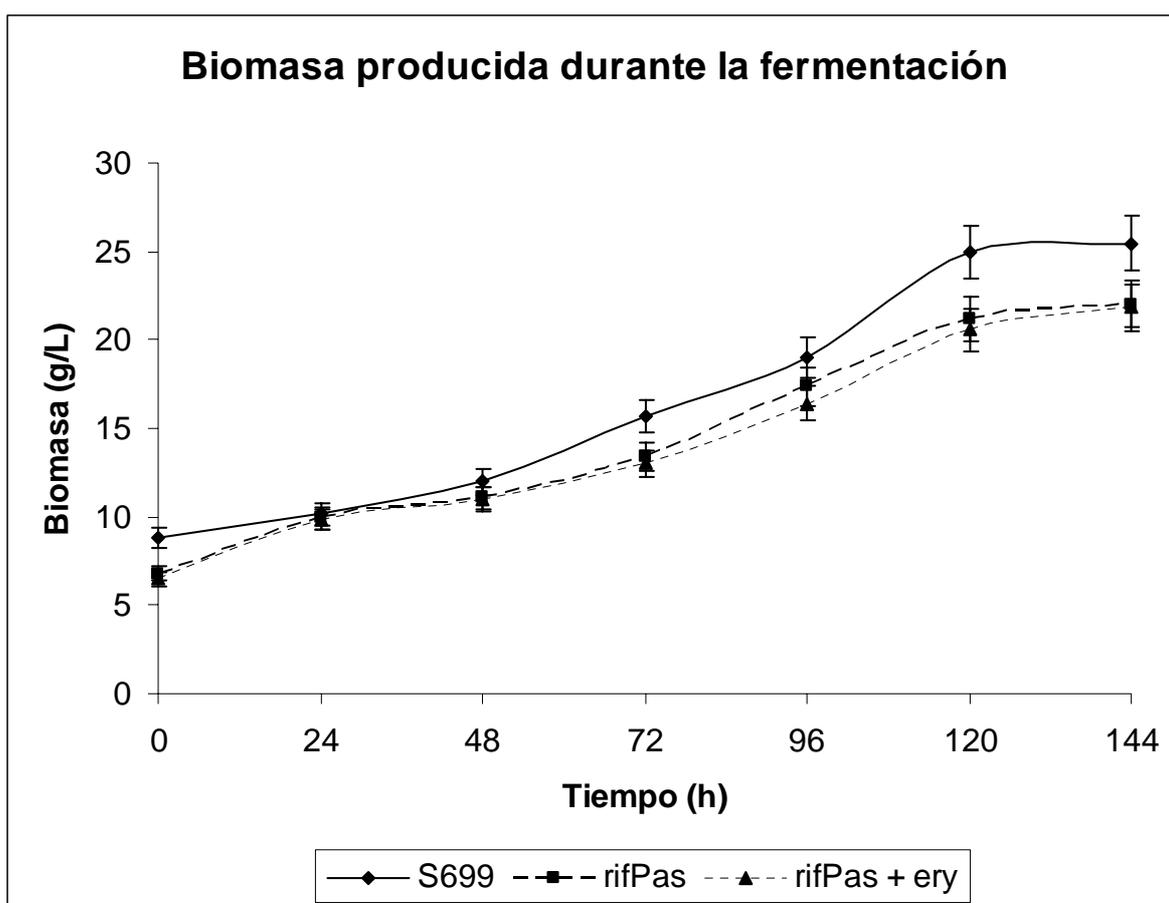


Figura 7.19 Gráfico de biomasa de las cepas S699 y *rifP*_{as} en condiciones de producción.

Finalmente se evaluó la variación en el pH del pH entre la cepa transformada y la parental, en donde la misma está dada por la cantidad de rifamicina producida (Fig. 7.20).

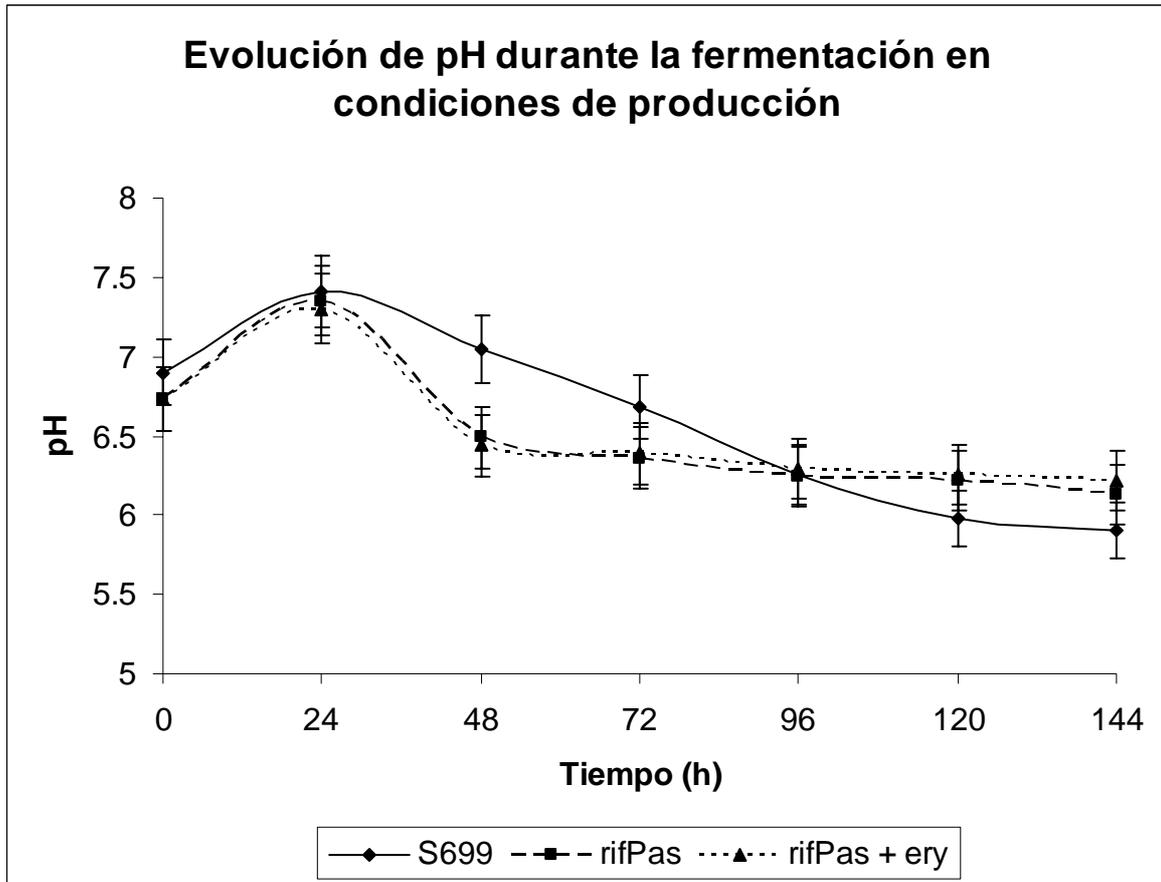


Figura 7.19 Gráfico de la evolución del pH durante la fermentación en condiciones de producción de las cepas S699 y *rifP_{as}* en condiciones de producción.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Diseño de un sistema de silenciamiento con ARN antisentido.

Para inactivar el gen se utilizó el sistema de silenciamiento con ARN antisentido (ARN_{as}). Este sistema es usado muy frecuentemente por los procariontes de forma natural como una forma de regular la expresión génica a nivel postranscripcional.

El sistema de regulación con ARNas se identificó por primera vez en el fago λ (Simons y Kleckner, 1988), aunque no se llegó a comprender totalmente hasta que se identificó como un sistema de regulación de la replicación y del número de copias en el plásmido ColE1 (Tomizawa *et al.*, 1981). Posteriormente se ha descubierto regulación mediante ARN_{as} en

otros tipos de plásmidos de *E. coli*, fagos (Wu *et al.*, 1987), transposones (Simons y Kleckner, 1988), y algunos genes codificados en el cromosoma como los involucrados con la osmoregulación (Aiba *et al.*, 1987) y con la regulación de la expresión génica (Okamoto y Freundlich, 1986).

La regulación de la expresión génica se puede llevar a cabo de diversas formas; una de ellas ocurre a cabo a nivel ribosomal, cuando la complementación entre las hebras de ARN incluye la zona del codón de inicio y/o el sitio de unión al ribosoma (ya que este sólo reconoce ARN monocatenario). Otro modelo postula que después del apareamiento de las hebras de ARN sentido y antisentido la doble cadena es degradada por la ARNasa III. La regulación de la expresión génica se puede llevar a cabo en hebras de ARNs que hibridan con el extremo 3' terminal; en este caso el extremo 5' está libre y puede iniciar la traducción, pero al llegar a la zona de doble cadena la síntesis del péptido queda bloqueada y no se concluye la formación de la proteína.

El método de silenciamiento mediante ARN_{as} ofrece una ventaja si se compara con el sistema de inactivación insercional, pues permite bloquear la expresión de más de una copia del gen de interés que pudiera haber en el cromosoma bacteriano. Por otro lado, es bien conocido que algunos microorganismos, sobre todo los que han sido modificados por técnicas de genética clásica para uso en la industria, tienen varias copias de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del metabolito que produzcan (Fierro *et al.*, 1995). Por ello, el uso de los sistemas de silenciamiento por ARN_{as} garantizaría que de haber varias copias del gen *rifP* transcribiéndose en ARNm, el ARN_{as} bloqueará la síntesis de la proteína RifP, impidiendo por tanto su participación en los procesos bioquímicos celulares.

La eficacia de este sistema ha sido probada anteriormente, y se ha encontrado que es posible utilizar solo algunos fragmentos del gen para bloquear la síntesis de proteínas, sobre todo cuando se trata de fragmentos cortos del extremo 5' del gen (3' del gen antisentido) llegándose a obtener bloqueos de la expresión génica de hasta el 75 %, aproximadamente. El uso del gen completo, sin embargo permite bloquear la expresión hasta en un 95 % (Tummala *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo este método se pensó utilizar un plásmido que se replique autónomamente en *A. mediterranei*, por lo que además se necesitaba que poseyera un marcador de selección para este hospedero.

9.2 Construcción del sistema de expresión.

La construcción de un sistema de expresión para el gen *rifP_{as}* implicó la construcción de un plásmido que tuviera un promotor y un terminador orientados en el mismo sentido, de la forma en la que se abordó la construcción del plásmido pAEPT1. Este plásmido puede ser utilizado no solo para este estudio, y para este microorganismo, sino para cualquier gen que se desee expresar en actinomicetos, debido a que el promotor *PermE* elegido tiene la capacidad de expresarse constitutivamente y puede generar una gran cantidad de transcritos, ya que la ARN polimerasa de actinomicetos tiene alta afinidad por su secuencia (Bibb *et al.*, 1985).

9.3 Elección del vector de replicación, y del marcador de selección.

Del género *Amycolatopsis* se han identificado dos plásmidos naturales, con capacidad de transformar entre otros, a *Amycolatopsis mediterranei*: el primer plásmido caracterizado fue el pMEA100 (Moretti *et al.*, 1985) el cual tiene un tamaño de 23.7 kb. A partir de éste se han

construido varios plásmidos artificiales; sin embargo todos tienen la desventaja de ser de bajo número de copias, y para nuestro caso en particular, de poderse integrar en el cromosoma. El segundo plásmido caracterizado fue el pA387 (Lal *et al.*, 1991), de 29.6 kb de tamaño. A partir de éste se han generado varios plásmidos artificiales, como los de la serie pRL, todos ellos con la cualidad de ser de replicación autónoma y de alto número de copias.

Con base en sus características decidimos utilizar el plásmido pULVK2 (derivado del pRL1 y a su vez este derivado del pA387), por no ser integrativo, y si, de alto número de copias.

El plásmido pULVK2 (Kumar *et al.*, 1994), además de tener el origen de replicación autónoma de *Amycolatopsis*, posee otro origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a kanamicina. *A. mediterranei*, sin embargo, presenta resistencia espontánea (en un 80% de los casos) a kanamicina, por lo que fue necesario utilizar otro marcador de selección. A pesar del amplio espectro de antibióticos a los que es resistente *A. mediterranei* se encontró la eritromicina era un buen candidato, por lo que se decidió utilizar el gen *ermE* que confiere resistencia a dicho antibiótico como marcador de selección.

8.4 Diseño del módulo de expresión para *A. mediterranei*.

Para que se transcriba el gen *rifP_{as}* se utilizó el promotor del gen de resistencia a eritromicina (*PermE*), y como final de la transcripción el terminador del gen *asd* (*Tasd*).

El promotor *PermE** utilizado tiene modificaciones en su secuencia que le permiten tener mayor tasa de transcripción (Bibb *et al.*, 1985), lo que aunado al alto número de copias del vector garantiza que en el citoplasma existan múltiples copias del ARN del gen *rifP_{as}*.

suficientes como para silenciar al gen *rifP* aún cuando existan varias copias del gen en el cromosoma.

El terminador que se utilizó es el de la enzima aspartato semialdehído deshidrogenasa de *Amycolatopsis lactamdurans* (Hernando-Rico *et al.*, 2001). Dicho terminador consta de una secuencia palindrómica Rho dependiente de 42 pares de bases.

8.5 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699

8.5.1 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699 con el plásmido pUAMAE2

El hecho de que la transformación de *A. mediterranei* con el plásmido pUAMAE2 no llevara a la aparición de transformantes, lo que si se consiguió con el plásmido pUAMAE5, indujo a pensar que tal vez el fragmento *XbaI-EcoRI* eliminado en la construcción de pUAMAE2 es importante para el mantenimiento del plásmido en el huésped. En el momento de obtener nuestros resultados de la transformación con el plásmido pUAMAE2 (agosto del 2003) se publicó un artículo (Ding *et al* 2003) en donde se reportó un análisis del origen de replicación y estabilidad de plásmidos derivados del plásmido nativo pA387 de *A. mediterranei* y encontraron datos distintos a los reportados por Tuteja *et al* en el 2000 (artículo en que se basó nuestro experimento). Cabe señalar que los plásmidos reportados en ambos estudios son derivados del pA387.

En el reporte publicado por Tuteja *et al.*, se obtuvo un plásmido, (pRL50) por deleciones debidas a recombinación genética dentro de *A. mediterranei*. A partir del plásmido obtenido se secuenció un fragmento de aproximadamente 1 kb, y se reportó este fragmento como el mínimo origen de replicación para este hospedero. El fragmento secuenciado se

encuentra disponible en la base de datos de NCBI con el número de acceso AF175205 (Tuteja *et al.*, 2000).

En el reporte publicado por Ding *et al* en el 2003, se realizó un análisis del origen mínimo de replicación, realizando deleciones del mismo con enzimas de restricción y probando su capacidad de replicación en *A. mediterranei*. El plásmido con capacidad replicativa y mayor estabilidad que obtuvieron fue el pDXM32, secuenciado completamente y que se encuentra disponible en la base de datos de NCBI con el número de acceso AY256857 .

En función del análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos (Cuadro 7.1) se encontró que el fragmento reportado por Tuteja *et al.*, no puede tener capacidad de replicación autónoma en *A. mediterranei*.

La construcción del plásmido pUAMAE2 está basada en el origen de replicación reportado por Tuteja *et al.*, por lo que el fragmento acotado por las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, de aproximadamente 1600 pb, fue delecionado del plásmido. Por lo que posiblemente esta sea la razón para no haber obtenido transformantes durante este experimento Cabe mencionar que el plásmido pULVK2 tiene capacidad replicativa en *A. mediterranei* según los datos reportados por Ding *et al*.

De forma adicional, un plásmido derivado del pULVK2 el plásmido pGEL (Suarez, 2003) que tiene inserto en el sitio de restricción *KpnI* (único) situado en medio del origen de replicación, el gen de resistencia a eritromicina, tampoco se ha logrado transformar eficientemente en *A. mediterranei*.

El cuadro 7.1 esquematiza estos resultados de manera sencilla. La zona deletionada durante la construcción del plásmido pUAMAE2 (*EcoRI-XbaI* de aproximadamente 1600 pb) corresponde con la zona que de que carece el plásmido pDXM14, el cual según sus autores no tiene capacidad de replicación autónoma.

Cuadro 7.1 Comparación de los fragmentos de ADN de diferentes plásmidos y su capacidad de replicarse autónomamente (Tomada con algunas modificaciones de Ding *et al.*, 2003).

	<i>Bcl</i> I <i>Bcl</i> I <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I <i>Eco</i> R V <i>Eco</i> R I	Replicación Autónoma
		pDXM32 +
		pULVK2A +
		pDXM13 -
		pDXM14 -
		pDXM2 +/-
		pDXM11 -
		pUAMAE2
		Tuteja <i>et al.</i> 2000

Estas observaciones sugieren que la secuencia reportada por Tuteja *et al.*, en el 2000 no comprende el origen mínimo de replicación para *A. mediterranei*. Sin embargo, cabe aclarar

que debido al método de obtención, no hay duda de que el plásmido pRL50 tenga capacidad de replicación autónoma, pero al parecer la secuencia reportada como origen mínimo de replicación por estos autores está incompleta.

8.5.2 Transformación de *Amycolatopsis mediterranei* S699 con el plásmido pUAMAE5.

La transformación de *A. mediterranei* utilizando el plásmido pUAMAE5 se realizó satisfactoriamente utilizando la técnica descrita en la sección de Material y Métodos. La técnica aquí descrita es una combinación de las técnicas descritas por Ding *et al* en el 2003 para la transformación de *A. mediterranei* por electroporación y la descrita por Hopwood *et al.*, en 1985 para la transformación de protoplastos de *Streptomyces*.

Previamente se utilizaron otras técnicas de transformación, como Biolística (Shark *et al.*, 1991) en donde no se obtuvieron resultados muy claros ya que las transformantes comenzaron a crecer el día 18 después de la transformación. Utilizando la técnica descrita por Lal *et al.*, en 1998 basada en electroporación, no se obtuvieron transformantes. Igual resultado se obtuvo cuando se intentó transformar protoplastos de *A. mediterranei* siguiendo la técnica descrita por Hopwood *et al.*, en 1985.

Utilizando la técnica antes mencionada se obtuvieron 26 colonias transformantes, que aparecieron el día 7 de incubación después de la transformación. A estas colonias transformantes se les nombró como *A. mediterranei rifP_{as}*. En primera instancia las colonias que aparecieron fueron muy compactas, pero lo que reforzó la idea de que efectivamente contenían el plásmido pUAMAE5, y de que se estaba expresando el gen *rifP_{as}* fue que no teñían el medio de color rojizo como la cepa parental. El color rojizo en el medio es

característico cuando inicia la biosíntesis de rifamicina, ya que esta tiene un color rojo. El hecho de que el medio no estuviera adquiriendo la tonalidad rojiza de la rifamicina indica la importancia del gen *rifP* en la biosíntesis de rifamicina, como exportadora de la misma.

8.7 Evaluación de la producción de rifamicina en *A. mediterranei* S699 y *rifP*_{as}

La cepa parental y la transformante se compararon en cuanto a su capacidad de producción de rifamicina (en Medio de producción Lee, 25°C, 200 rpm de agitación con resorte) durante 6 días. La cepa *rifP*_{as} se incubó bajo dos condiciones: 1) medio Lee, y 2) medio Lee suplementado con eritromicina). La condición con y sin antibiótico se debe a que, como se comentó en el apartado de resultados, se observaba un efecto de crecimiento disminuido de la cepa transformada con respecto a la parental en placa. Para evaluar el posible efecto de la eritromicina sobre este fenómeno, y más aún sobre la misma biosíntesis de rifamicina se decidió correr ambos experimentos. Sin embargo, no se observan diferencias en cuanto a la cantidad de biomasa en las dos condiciones con las que trató la cepa *rifP*_{as}, lo cual significa que la disminución en el crecimiento no se debe a la eritromicina suplementada sino al efecto del silenciamiento del gen *rifP*.

De los resultados obtenidos se encontró que la máxima producción de la cepa parental al día 5 fue de 1841 mg/L, mientras que en la cepa *rifP*_{as} solo producciones de 353 mg/L y 569 mg/L, en medio suplementado con eritromicina y no suplementado respectivamente. Esto representa una disminución de la producción del 80 y 70 % respectivamente en medio suplementado con eritromicina y no suplementado, lo que refleja que existe un efecto importante sobre la producción de rifamicina debida al silenciamiento del gen *rifP*. Si efectivamente esta proteína funcionara como exportadora de la rifamicina, lo que estaríamos

observando es un efecto de la disminución de la producción debida a la acumulación interna. Dicha acumulación tal vez esté bloqueando la biosíntesis de rifamicina por un efecto sobre el equilibrio termodinámico de las reacciones enzimáticas.

La diferencia observada entre las dos condiciones de la cepa *rifP_{as}* se deben tal vez a un efecto de conservación del plásmido dentro de la bacteria. Sin una presión de selección, las células pueden ir perdiendo el plásmido en el curso de la fermentación. El plásmido pULVK2 es poco estable en la cepa hospedera dado que sólo es capaz de mantenerse durante 3 resiembras en la célula sin una presión de selección (Ding *et al.*, 2003).

9. CONCLUSIONES

Se construyó un módulo de expresión con el promotor *PermE** y el terminador *Tasd* con un sitio de reconocimiento entre ellos para la enzima *BamHI* en el plásmido pAEPT1 que puede utilizarse para la expresión constitutiva de genes en actinomicetos.

Se estableció un sistema de transformación de *A. mediterranei* por electroporación. Las condiciones fueron 2 kv/cm, 25 μ F de capacitancia en cubetas de electroporación de 0.2 cm de abertura de electrodos.

Se construyó un sistema de silenciamiento del gen *rifP* en un plásmido de replicación autónoma en *A. mediterranei*.

El silenciamiento del gen *rifP* tiene un efecto importante sobre la producción de rifamicina, ya que disminuye la producción en un 80%. La presencia de 10 µg/mL de eritromicina en el medio de cultivo, no afecta las funciones básicas del microorganismo.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, se considera importante continuar los estudios enfocados a probar la función del gen *rifP* como proteína transportadora, mediante la clonación heteróloga del gen en *Streptomyces lividans*, y evaluar la resistencia a rifamicina.

Por otro lado, dado el efecto que tiene la inactivación del gen *rifP* sobre la biosíntesis de rifamicina, es factible realizar la sobre expresión del gen y evaluar su efecto sobre la producción del mismo antibiótico.

Ambas sugerencias son relativamente sencillas de realizar, considerando que se cuenta ya con un módulo de expresión en actinomicetos en el plásmido pAEPT1.

11. REFERENCIAS

Admiraal S., Walsh C. y Khosla C. (2001).The loading module of rifamycin synthetase is an adenylation thiolation didomain with substrate tolerance for substituted benzoates. *Biochemistry* **40**, 6116-6123.

Aiba H., Matsuyama S., Mizumo T. y Matzushima S (1987).Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3007-3012.

Anderson M., Monypenny D., Richards R. y Rothschild A. (1989). Biosynthetic origins of the oxygen atoms in the ansamycin antibiotic rifamycin B, O and S. *J. Chem. Soc. Commun.* **5**: 311-313.

Arakawa K., Muller R., Mahmud T., Tin-Wein Y. y Floss H. (2002). Characterization of the early stage aminoshikimate pathway in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid. The RifN protein specifically converts kanosamine into kanosamine 6-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10644-10645.

August P., Tang Li., Ion Y., Ning S., Muller R., Yu T., Taylor M., Hoffmann D., Kim C., Zhang X., Hutchinson R. and Floss H. (1998). Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chemistry and Biology* **5** (2).69-79.

Bibb M. J., Janssen G. R. y Ward J. M (1985). Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **42**, E357-E362.

Blanco G., Hardisson C. y Salas J. (1984). Resistance to inhibitors of RNA polymerase in actinomycetes which produce them. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2883-2891.

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

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

Clark J. (1988). *Nuc. Acid. Res.* **18**, 6069-6074.

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

Ding X., Tian Y., Chiao J., Zhao G. y Jiang W. (2003). Stability of plasmid pA387 derivatives in *Amycolatopsis mediterranei* producing rifamycin. *Biotech. Lett.* **25**, 1647-1652.

El-Tayeb O., Salama A. Hussein M. y El-Sedawy H. (2004a). Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. I. The role of colony morphology and nitrogen sources in productivity. *Afr. J. Biotechnol.* **3**(5), 266-272.

El-Tayeb O., Salama A. Hussein M. y El-Sedawy H. (2004b). Optimization of industrial production of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei*. III. Production in fed-batch mode in shake flasks. *Afr. J. Biotechnol.* **3**(8), 387-394.

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

Fierro F. Barredo J. Díez B., Gutierrez S., Fernández F. y Martín J. (1995). The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. *Procc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 6200-6204.

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

Guo J. y Frost J. (2002). Kanosamine Biosynthesis: A likely source of the aminoshikitate pathway's nitrogen atom. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 10642-10643.

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

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

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

Hernando-Rico V., Martín J. F., Santamarta I. y Liras P. (2001). Structure of the *ask-asd* operon and formation of the aspartokinase subunits in the cephamycin producer *Amycolatopsis lactamdurans*. *Microbiology.* **147**, 1547-1555.

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

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

Kim C., Yu T., Fryhle C., Handa S. y Floss H. (1997). 3 Amino 5 hidroxybenzoic Acid synthase, the Terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in the rifamycin and related antibiotics. *J. Biol, Chem.* **273** (11), 6030-6040.

Kluepfel D., Lancini G. y Sartori G. (1965). Metabolim of barbital by *Streptomyces mediterranei*. *Appl. Microbiol.* **13** (4), 600-604

Kumar C., Coque J., y Martín J. F. (1994). Efficient transformation of the Cephamycin C producer *Nocardia lactamdurans* and development of shuttle and promoter-probe cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4086-4093.

Lal R., Lal S., Gruñid E. y Eichenlaub R. (1991). Construction of a hybrid plasmid capable of replication in *Amycolatopsis mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (3) 665-671.

Lal R., Hhanna R., Dhingra N., Khanna M., y Lal S. (1998). Development of a improved cloning vector and transformation system in *Amycolatopsis mediterranei* (*Nocardia mediterranei*). *J. Antibiot (Tokio)*. **51**(2), 161-169.

Law D. (1997). Use of a simplified rapid size screen protocol for the detection of recombinant plasmids. En *Elsevier Science*, <http://www.elsevierscience.com/protocols/>

Lancini G. y Grandi M. (1981). Biosíntesis of ansamycins. En *Antibiotics biosynthesis Editado por Corcoran J. W.* Editorial Springer-Verlag. Berlín, Alemania. 12-40.

Lechevalier M., Prauser H., Labeda D. y Ruan J. (1986). Two new genera of nocardioform *Actinomycetes*: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36** (1), 29-37.

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

Lee J., Choi C. Seong B y Han M (1983). Optimal pH profile in rifamycin B fermentation. *J. Ferment. Technol.* **61**(1), 49-53.

Marchuk D., Drumm M., Sauling A. y Collins F. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nuc. Acid. Res.* **19** (5).1154.

Margalith P. y Pagani H. (1961). Rifomycin:XIV. Production of rifomycin B. *Appl. Microbiol.* **9**, 325-333.

Mejía A. (1998). Efecto del Dietil barbiturato sobre la biosíntesis de rifamicina. *Tesis Doctoral.* Universidad Nacional Autónoma de México.

Mejía A., Barrios J. y Viniegra G. (1998). Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *J. Antibiotics (Tokio).* **51** (1), 58-63.

Miller (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor* .New York.

Mole S. E., Iggo R. D. y Lane D. P. (1989). *Nuc. Acid.Res.* **17**, 3319

Moretti P., Hintermann G. y Hutter R. (1985). Isolation and characterization of an extrachromosomal element from *Nocardia mediterranei*. *Plasmid.*(**14**), 126-133.

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

National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Okamoto K. y Freundlich M. (1986). Mechanism for the autogenous control of the *crp* operon. Transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **83**, 5000-5004.

Piret J. y Demain A. (1988). Actinomycetes in Biotechnology: an overview. En *Actinomycetes in Biotechnology*. Editado por Goodfellow M., Williams S. y Mordarski M. Academic Press. Reino Unido.

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

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

Reeves A., Samuel E., Lampel J., Post D. y Vanden-Boom T. (1999). Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *J.Bacteriol.* **181** (22), 7098-7106.

Sambroock J. y Russell D. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor laboratory Press.*, Cold Spring Harbor, Nueva York, E.U.A.

Sensi P., Margalith P. y Timbal M. (1959). Rifamycin, a new antibiotic, preliminary report. *Farmaco. Ed. Sci.* **14**, 146-147.

Shark K., Smith F., Harpending P., Rasmussen J. Sanford J. (1991). Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2), 480-485.

Simons R. y Kleckner N. (1988). Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 567-600.

Sturino J y Klaenhammer T. (2002). Expression of antisense RNA targeted against *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2), 588-596.

Suàrez M.R. (2003) Datos no publicados.

Joyce S., Grebe T., Tait-Kamradt A. and Wondrack L (1996). Detection of erythromycin resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **40** (11).2562-2566.

Tin-Wein Yu, Shen Y., Doi-Katayama Y., Tang L., Park C., Moore B., Hutchinson R. y Floss H. (1999). Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 9051-9056.

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

Tomizawa J., Itoh T., Selzer G. Y Som T. (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 1421-1425.

Tummala S., Welker N. y Papoutsakis E. (2003). Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.*, **185**, (6), 1923-1934.

Tuteja D., Meenakshi D., Khanna R., Dhingra N., Khanna M., Kaur H. Saxena D. y Lal R. (2000). The importance of the homologous recombination in the generation of large deletions in hybrid plasmids in *Amycolatopsis mediterranei*. *Plasmid.* **43**, 1-11.

Vrijbloed J. W., Jelinkova M., Hessels G. I y Dijkhuizen L. (1995). Identification of the minimal replicon of plasmid pMEA300 of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Mol. Microbiol.* **18** (1).21-31

Yanisch-Perron C., Vieira J. y Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**, 103-119.

Wehrli W. y Stachlin M. (1971). Actions of rifamycins. *Microbiol. Rev.* **35**, 290-309.

Wu T., Liao S., McClure W. y Susskind M. (1987). Control of gene expression in bacteriophage P22 by small anti-sense RNA. *Genes Dev.* **1**, 204-212.