



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

**Direccionamiento del metabolismo primario a
metabolismo secundario para la evaluación de la
producción de actinorrodina por medio de la modulación
de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor***

TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología Aplicada

PRESENTA

Julieta Pérez Curiel

Directora de Tesis:

Dra. Diana V. Cortés Espinosa

Director de Tesis:

Dr. Ángel E. Absalón Constantino



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetlilla, Tlaxcala siendo las 11:00 horas del día 22 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Programa de Maestría En Biotecnología Aplicada para examinar la tesis titulada:

"Direccionamiento del metabolismo primario a metabolismo secundario para la evaluación de la producción de actinorrodina por medio de la modulación de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor*"

Presentada por el alumno:

PÉREZ CURIEL JULIETA
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	2	4	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


DR. ÁNGEL EDUARDO ABSALON
CONSTANTINO


DRA. DIANA VERÓNICA CORTÉS
ESPINOSA

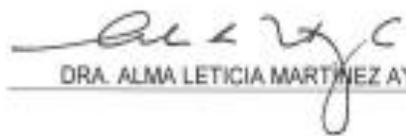

DR. MIGUEL ÁNGEL VILLALOBOS
LÓPEZ


DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ LÓPEZ


DR. ARMANDO MEJÍA ALVAREZ



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DRA. ALMA LETICIA MARTÍNEZ AYALA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal, el día 28 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Julieta Pérez Curiel alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B091248, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada- Tlaxcal, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa y Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino y cede los derechos del trabajo intitulado Direccionamiento del metabolismo primario a metabolismo secundario para la evaluación de la producción de actinorrodina por medio de la modulación de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección eta_3@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Julieta Pérez Curiel

Nombre y firma

RESUMEN

Durante el ciclo biológico de *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo resultado es el mantenimiento de los procesos vitales de la célula (síntesis de ácidos grasos, proteínas, lípidos, polisacáridos, coenzimas etc...) y el incremento de la biomasa total. Estos procesos son esencialmente idénticos en todas las células vivas. Por el contrario, en el metabolismo secundario se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor de estructuras químicas complejas del organismo, sintetizados generalmente al comienzo de la fase estacionaria. No obstante, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica.

El objetivo del presente trabajo fue aumentar la producción de actinorrodina, metabolito secundario de *S. coelicolor*, por medio de la sobreexpresión y silenciamiento de las dos primeras enzimas del ciclo de krebs, citrato sintasa y aconitasa. Se ha reportado la sobreexpresión de la enzima acetyl-CoA carboxilasa mejorando el rendimiento de producción de ACT; resultados en este proyecto la sobreexpresión de citrato sintasa y aconitasa la producción de ACT se vio afectada por los descensos de pH presentados en las primeras 48 hrs. En el caso del silenciamiento por medio de la técnica de ARN antisentido en *S. coelicolor* hasta el momento no se ha reportado el uso de ésta técnica. El estudio de citrato sintasa y aconitasa en *S. coelicolor* se ha reportado por la interrupción de los genes generando clonas no productoras de ACT y fenotipos letales. Nosotros presentamos la alternativa de generar clonas silenciadas con fenotipos no letales y la producción de ACT está influenciada por valores de pH por debajo de pH 6 donde la actinorrodina no es favorable a estos valores alcanzados.

ABSTRACT

During the life cycle of *Streptomyces* can distinguish two types of metabolism, primary and secondary. The primary metabolism is defined as the sum of anabolic and catabolic reactions that result in the maintenance of vital cell processes (synthesis of fatty acids, proteins, lipids, polysaccharides, coenzymes, etc ...) and the increase in total biomass. These processes are essentially identical in all living cells. By contrast, in secondary metabolism products are formed that are not essential for the growth of the organism producing complex chemical structures of the body, usually synthesized at the beginning of the stationary phase. However, products originating usually confer ecological advantages and consequently greater biological competitiveness.

The objective of this research was to increase the production of actinorrodiana, secondary metabolite of *S. coelicolor*, by overexpression and silencing of the two first enzymes of the Krebs cycle, citrate synthase and aconitase. It has been reported overexpression of the enzyme acetyl-CoA carboxylase improving the performance of actinorhodin production, this project results in overexpression of citrate synthase and aconitase actinorhodin production was affected by pH declines presented in the first 48 hrs. For the muting technique using antisense RNA in *S. coelicolor* so far not been reported using this technique. The study of citrate synthase and aconitase in *S. coelicolor* has been reported by the disruption of genes producing actinorhodin non-producing clones and lethal phenotypes. We present an alternative to generate clones with silenced lethal phenotypes actinorhodin production is influenced by pH values below pH 6 where actinorrodina does not support these values achieved.

ÍNDICE

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
INDICE DE TABLAS.....	XII
GENERALIDADES.....	1
1. 1 Generalidades del Genero <i>Streptomyces</i>	1
1.2 Ciclo de Vida de <i>Streptomyces</i>	1
1.3 Características Genéticas de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2).....	2
1.4 Metabolismo secundario en <i>Streptomyces coelicolor</i>	3
1.5 Regulación del metabolismo secundario en <i>Streptomyces coelicolor</i>	5
1.6 Producción de actinorrodina en <i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2).....	6
1.7 Metabolismo primario y secundario actinomicetos.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	14
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	16
4.1 Microorganismos.....	16
4.2 Plásmidos.....	17
4.3 Medios de Cultivo.....	18
4.3.1 Medios de Cultivo para <i>E.coli</i>	18
4.3.2 Medios de cultivo para <i>S. coelicolor</i>	19
4.4 Antibióticos y suplementos.....	21
4.5 Técnicas Experimentales.....	21
4.5.1 Obtención de ADN.....	21
4.5.1.1 MiniPreparaciones.....	21
4.5.1.2 MiniPreparaciones por kit ⁴	22
4.5.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).....	23
4.5.2.1 Diseño de cebadores para PCR.....	24

4.5.2.2 Condiciones de reacción y amplificación.....	25
4.5.3 Plásmido utilizado para la clonación del producto de PCR.....	26
4.5.4 Clonación de productos de PCR	26
4.5.4.1 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	26
4.5.4.2 Reacción de ligación	27
4.5.5 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis	28
4.6 Preparación de células electrocompetentes	29
4.7 Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación.....	29
4.8 Conjugación de <i>S. coelicolor</i>	30
4.9 Evaluación de la producción de actinorrodina.....	31
4.10 Cuantificación de la producción de Biomasa	32
4.11. Evaluación del pH	32
RESULTADOS	33
5.1. Construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar citrato sintasa en <i>Streptomyces coelicolor</i> M510	33
5.1.1 Amplificación de productos de PCR.....	33
5.1.2 Clonación de productos de PCR en el plásmido pJet1.2	34
5.1.3 Clonación del gen <i>citA</i> en el plásmido pAEPT1 en dirección sentido y antisentido.....	35
5.1.4 Clonación de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento en vectores plásmidos para <i>S. coelicolor</i>	39
5.2 Construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar aconitasa en <i>Streptomyces coelicolor</i> M510	44
5.2.1 Amplificación de productos de PCR.	44
5.2.2 Clonación de productos de PCR en el plásmido pJet1.2	45
5.2.3 Clonación del gen <i>sacA</i> en el plásmido pAEPT1 en dirección sentido y antisentido.....	47
5.2.4 Clonación de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento en vectores plásmidos para <i>S. coelicolor</i>	50
5.3 Confirmación de la conjugación de <i>Streptomyces coelicolor</i> M510 utilizando a <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002.	55
5.4 Evaluación del silenciamiento y sobreexpresión del gen citrato sintasa sobre la producción de actinorrodina en cultivo liquido.	61

5.5 Evaluación del silenciamiento y sobreexpresión del gen aconitasa sobre la producción de actinorrodina en cultivo líquido.	65
DISCUSION DE RESULTADOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos secundarios producidos por <i>S. coelicolor</i>	4
Figura 2. Representación esquemática de policétidos sintasa tipo II responsable de la producción de Actinorrodina.....	8
Figura 3. Plásmido pJET1.2. Vector de clonación para productos de PCR. Tiene un gen de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para <i>E.coli</i> y un gen letal que impide el crecimiento de colonias que no hayan integrado un inserto.....	26
Figura 4. Gel de Agarosa que muestra los productos de PCR de la amplificación del gen <i>citA</i> . Carril 1. Marcador de peso molecular ADN λ digerido HindIII/EcoRI. Carril 2. <i>citA</i> con DMSO. Carril 3. <i>citA</i> sin DMSO.	33
Figura 5. Mapa del Plásmido pJcitA construido a partir del plásmido pJET1.2 y producto de PCR de <i>citA</i>	34
Figura 6. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, y 4 las digestiones con enzimas de restricción. En el carril 5 el ADN plasmídico pJcitA.	35
Figura 7. Mapa del Plásmido pPcitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).	36
Figura 8. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4, y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPcitA (+).	37
Figura 9. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4, y 5 las digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPcitA (-).....	38
Figura 10. Mapa del Plásmido pPscitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).....	40
Figura 11. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 las digestiones de pPscitA (+).	41
Figura 12. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 las digestiones de pPscitA (-).....	41
Figura 13. Mapa del Plásmido pPocitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).....	42
Figura 14. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPocitA (+).	43

Figura 15. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPocitA (-).	43
Figura 16. Gel de Agarosa que muestra los productos de PCR de la amplificación del gen sacA. 1. Marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. 2. sacA sin DMSO 3. sacA con DMSO.....	45
Figura 17. Mapa del Plásmido pJsacA construido a partir del plásmido pJET1.2 y producto de PCR del gen sacA.....	46
Figura 18. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, y 4 las digestiones con enzimas de restricción.	46
Figura 19. Mapa del Plásmido pPsacA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).....	48
Figura 20. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder.. En los carriles 2, 3, 4 y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico de pPsacA (+).....	49
Figura 21. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPsacA (-).....	49
Figura 22. Mapa del plásmido pPssacA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).....	51
Figura 23. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 digestiones de pPssacA (+). ..	52
Figura 24. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 digestiones de pPssacA (-).	52
Figura 25. Mapa del Plásmido pPosacA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).....	53
Figura 26. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPosacA (+).	54
Figura 27. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPosacA (-).	54
Figura 28. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 6 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico integrativo con el casete de sobreexpresión.	56

Figura 29. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 6 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico integrativo con el casete de silenciamiento.	57
Figura 30. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 4 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico de replicación autónoma con el casete de sobreexpresión.	57
Figura 31. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 5 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico de replicación autónoma con el casete de silenciamiento.	58
Figura 32. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 6 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico integrativo con el casete de sobreexpresión.	59
Figura 33. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 5 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico integrativo con el casete de silenciamiento.	59
Figura 34. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 9 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico de replicación autónoma con el casete de sobreexpresión.	60
Figura 35. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 9 los productos de PCR de las clonas conjugantes de <i>S.coelicolor</i> con el vector plasmídico de replicación autónoma con casete de silenciamiento.	60
Figura 36. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.	61

Figura 37. Grafico de variación de pH de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.	62
Figura 38. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.	62
Figura 39. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.	63
Figura 40. Grafico de variación de pH de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.	64
Figura 41. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.	64
Figura 42. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.	65
Figura 43. Grafico de variación de pH de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.	66
Figura 44. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.	67
Figura 45. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.	68
Figura 46. Grafico de variación de pH de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.	69
Figura 47. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de los antibióticos empleados en este trabajo.	21
Tabla 2. Pares de oligos utilizados para amplificar secuencias de estudio.	24
Tabla 3. Pares de oligos utilizados para la comprobación de las cepas conjugantes.	55

GENERALIDADES

1. 1 Generalidades del Genero Streptomyces

El género Streptomyces pertenece a la familia Streptomycetaceae y al orden los Actinomycetales comprende a bacterias filamentosas Gram positivas aerobias con alto contenido de Guanina y Citosina (70 % G+C) en su genoma, y un complejo ciclo de vida, el cual involucra diferenciación morfológica (Woese, 1987). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el suelo su hábitad principal. Estos microorganismos viven en condiciones saprófitas degradando restos orgánicos, principalmente materia vegetal (Hodson, 2000). La capacidad de degradar este tipo de materia es por la capacidad de producir enzimas extracelulares, algunas de ellas son de interés para el sector industrial, entre las que destacan proteasas (Henderson et. al., 1987), celulasas, amilasas (Long *et. al.*, 1987), lipasas (Jiménez *et. al.*, 1987), quitinasas y xilanasas (Morosoli *et. al.*, 1986).

Por su versatilidad metabólica este género es de importancia industrial por su capacidad de generar metabolitos con actividad biológica. Se conoce que 23,000 metabolitos secundarios bioactivos producidos por microorganismos, solo 150, 000 de éstos son usados en farmacología, agricultura y otras aéreas. Pero más del 10,000 de estos compuestos son producidos por actinomicetos, representando así el 45% de todos los metabolitos secundarios bioactivos descubiertos. Entre los actinomicetos, alrededor de 7,600 compuestos son producidos por especies del genero Streptomyces (Bérdy, 2005). La importancia de estos metabolitos es su actividad biológica, como los son los antibióticos, compuestos antitumorales, inmunosupresores, antivirales, agentes antiparasitarios (Thompson *et al.*, 2002; Challis y Hopwood, 2003).

1.2 Ciclo de Vida de Streptomyces

El ciclo de desarrollo de los microorganismos del género Streptomyces es un proceso complejo a lo largo del cual se desarrollan estructuras diferenciadas. Este proceso es estudiado en medio sólido, debido principalmente a que en cultivos líquidos la mayoría de las cepas no son capaces de esporular. Las estructuras

diferenciadas en cultivos sólido son: un micelio sustrato, producto de la fase vegetativa del ciclo y un micelio aéreo o reproductivo, que culminará su desarrollo con la formación de esporas. Las esporas pueden permanecer latentes por un tiempo prolongado hasta que las condiciones ambientales proporcionen las entorno necesario (humedad y nutrientes) para que estas germinen.

Las células de *Streptomyces* permanecen asociados, formando largos filamentos. Estas hifas alargadas crecen de forma apical en las extremidades y al mismo tiempo generan una compleja red de micelio vegetativo. *Streptomyces* exhibe un patrón de crecimiento bifásico correlacionado con un interruptor del desarrollo. (Granozzi *et al*, 1990; Süssstrunk *et al*, 1998). Por lo tanto, una fase inicial de crecimiento es seguido por una breve interrupción, luego vuelve a la acumulación de biomasa, acompañado por la aparición de hifas aéreas y el inicio del metabolismo secundario.

1.3 Características Genéticas de *Streptomyces coelicolor* A3 (2)

Del género *Streptomyces*, se considera a *Streptomyces coelicolor* A3 (2) el organismo modelo de los actinomicetos (Hopwood, 1999). Siendo el primer genoma secuenciado de este género en el 2002. El genoma de *Streptomyces coelicolor* A3 (2) es un cromosoma lineal de 8,667,507 pb donde se han identificado 7,825 probables genes con un único origen de replicación (OriC) localizado en la región central. Se estima que 965 proteínas tienen una función reguladora, 819 proteínas son secretan (que incluyen numerosas enzimas hidrolíticas), 614 proteínas participan en el transporte, y 22 clústeres están involucrados en la producción de metabolitos secundarios (Bentley *et. al.* 2002).

Se puede distinguir una región central de 4,9 Mb en la que se encuentran mayoritariamente genes esenciales para el crecimiento. Entre estos genes destacan: genes implicados en división celular, en replicación del DNA, en transcripción, traducción y en la biosíntesis de aminoácidos. La región central o core está flanqueada por dos brazos, el izquierdo de 1,5 Mb y el derecho de 2,3 Mb. Estas regiones laterales del cromosoma contienen muchos genes que codifican

proteínas no esenciales como enzimas del metabolismo secundario y enzimas hidrolíticas (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003).

El alto grado de sintenia en la región central del cromosoma de los distintos *Streptomyces* (unos 3000 genes) es extensible a muchos actinomicetos. La comparación genómica entre distintos actinomicetos también pone de manifiesto la expansión cromosómica de *Streptomyces* y su riqueza en genes, destacando entre otros, los sistemas reguladores. Queda por tanto reflejado en el genoma de estas bacterias la capacidad de detectar y responder a gran variedad de estímulos extracelulares (Hsiao y Kirby, 2008).

Por ejemplo, en total 53% de los genes de *Streptomyces coelicolor* A3 (2) son secuencias conservadas con *Streptomyces avermitilis*, donde su posición relativa en el genoma se ha mantenido durante la evolución de estas dos especies de *Streptomyces*. El 35% de los genes ortólogos de *Streptomyces coelicolor* A3 (2) presentan una posición que no es conservada en *S. avermitilis*; y sólo el 12% de los genes no presenta homología en *S. avermitilis*. Fuera de 711 marcos de lectura abierta (ORFs) incluidos en *S. coelicolor*, el 78% son secuencias conservadas con *S. avermitilis*, lo que demuestra que hay un grado elevado de sintenia de genes metabólicos que para los otros genes. (Irina *et al.*, 2005).

La información proporcionada por el análisis de organismos secuenciados muestra que la distribución de genes en el genoma presenta distribuciones de genes esenciales en el interior del cromosoma, mientras que los genes implicados en el metabolismo secundario están en los brazos cromosomales (Redenbach *et al.*, 1996, Bentley *et al.*, 2002).

1.4 Metabolismo secundario en *Streptomyces coelicolor*.

Durante el desarrollo de *Streptomyces* se identifican dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo fin es el mantenimiento de los procesos

vitales y el incremento de la biomasa total. Por el contrario, en el metabolismo secundario se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del microorganismo. La síntesis de los metabolitos secundarios se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria, y se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica en *Streptomyces*.

El análisis de la secuencia del cromosoma de *S. coelicolor* ha permitido la identificación de al menos 23 clusters de genes (aproximadamente el 4,5 % del genoma) relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundario más estudiados y que se conocen algunos pasos de sus rutas biosintéticas son actinorrodina (ACT), undecilprodigiosina (RED) y antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés: Calcium Dependent Antibiotic). *S. coelicolor* A3 (2) produce además un cuarto antibiótico denominado metilenomicina cuyos genes biosintéticos están localizados en el plásmido SCP1.

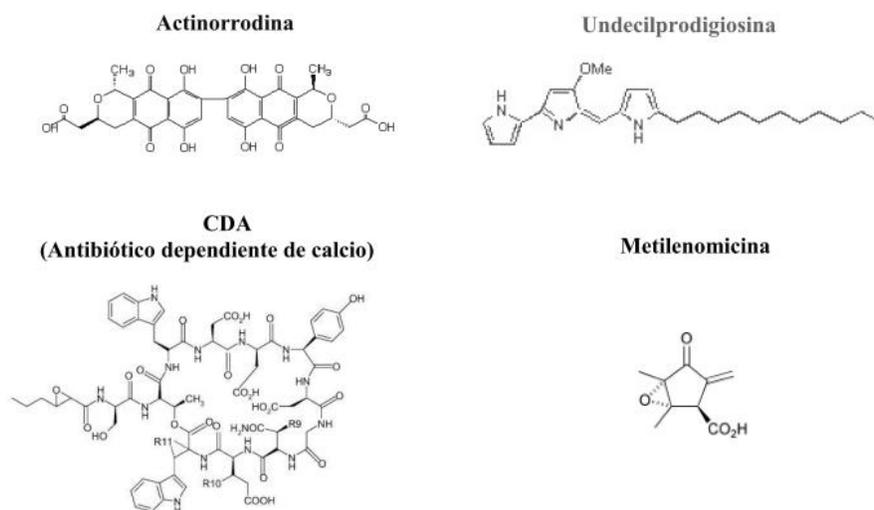


Figura 1. Metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*.

Los cuatro metabolitos producidos por *S. coelicolor* tienen distinta naturaleza química (Fig. 1). La actinorrodina es un policétido aromático pigmentado que sirve como indicador de pH. Es de color azul y soluble en agua en medio básico

(pH>7) y rojo e insoluble en agua en medio ácido. La undecilprodigiosina es un pigmento rojo con una estructura de tripirrol altamente hidrofóbica. El CDA es un lipopéptido cíclico y la metilenomicina es una ciclopentanona. El papel principal de estos antibióticos es defender la colonia de competidores al tiempo que se desarrolla el micelio aéreo y se lisa el micelio sustrato (Kieser *et al*, 2000). Todos ellos son activos frente a Gram positivas, aunque su actividad biológica permanece bastante inexplorada. La actinorrodina por su relación estructural con otros antibióticos como la kalafungina y nanomicina podría actuar como un agente alquilante biorreductor. La undecilprodigiosina pertenece al grupo de las prodigiosinas, las que actualmente tienen gran atractivo por su efecto inmunosupresor y anticancerígeno (Williamson *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2007). El CDA forma un ionóforo dependiente de calcio y actúa alterando la permeabilidad de la membrana plasmática de otros microorganismos (Lakey *et al.*, 1983).

1.5 Regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces coelicolor*.

Los metabolitos secundarios son producto de la una compleja red biosintética donde los precursores de éstos estarán localizados en productos del metabolismo primario. La agrupación de los genes involucrados en la producción de este metabolito secundario llamado “cluster” puede localizarse en el cromosoma, y en algunas excepciones en plásmidos.

La producción de antibióticos en *S. coelicolor* comienza cuando el cultivo entra en fase estacionaria y coincide temporalmente con los procesos de diferenciación morfológica. Cada “cluster” biosintético está sometido a una regulación específica que hace que un determinado antibiótico se sintetice en un momento concreto y bajo una serie de circunstancias. A su vez, la biosíntesis de varios o de todos los antibióticos está controlada coordinadamente por reguladores globales o pleiotrópicos. Hay reguladores que incluso afectan a procesos completamente diferentes como son la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica (Huang *et al.*, 2005). La expresión de ambos grupos de genes reguladores (específicos y globales) y consecuentemente el comienzo de la biosíntesis de

antibióticos, está determinado e influenciado por gran variedad de factores fisiológicos y medioambientales entre los que destacan: la tasa de crecimiento del microorganismo, moléculas de señalización, desequilibrio del metabolismo y varios tipos de estrés fisiológico (Bibb, 1996).

El mecanismo de regulación general de la biosíntesis de metabolitos secundarios es el que ejercen las fuentes nutricionales y los factores de estrés, como el choque térmico, las radiaciones, concentraciones de oxígeno demasiado bajas o altas y la acidificación del medio. Además de este control general existen otros grados de regulación mucho más específicos.

El metabolismo secundario en *S. coelicolor* A3(2) parece estar influenciado por sistemas reguladores independientes como los genes *bld* (Chater, 1993), *ppGpp* (Chakraborty y Bibb, 1997; Martínez-Costa y col., 1996), sistemas reguladores de dos componentes (Anderson y col., 2001; Ishizuka y col., 1992), reguladores del tipo γ -butirolactona (Onaka y col., 1998; Takano y col., 2001), AMPc (Horinouchi y col., 2001; Süssstrunk y col., 1998).

Estos sistemas detectan condiciones nutricionales como disponibilidad de carbono, nitrógeno y fosfato así como condiciones ambientales como temperatura, osmolaridad y otra serie de condiciones estresantes. Algunos de los estímulos detectados por estos sistemas son transmitidos a activadores específicos, como *actII-ORF4* y *redD*, viéndose afectada la producción de los metabolitos secundarios producidos por *S.coelicolor*.

1.6 Producción de actinorrodina en *Streptomyces coelicolor* A3 (2)

El malonil coenzima A (CoA) es un metabolito esencial en la mayoría de los organismos vivos. Se trata de un sustrato en la síntesis y sistemas de elongación de ácidos grasos y síntesis de policétidos en plantas, hongos y bacterias (Hopwood y Sherman, 1990). EL malonil-CoA es utilizado en la producción de muchos de los farmacéuticos tipo policétidos importantes producidos bacterias del genero

Streptomyces (Hopwood y Sherman, 1990). La biosíntesis de malonil-CoA se produce en la mayoría de las especies a través de la carboxilación de acetil-CoA por un acetil-CoA carboxilasa ATP-dependiente (ACCCase) (Toh, H. *et. al.*, 1993). La reacción catalizada por esta enzima es un proceso de dos etapas que involucra la formación de carboxibiotina dependiente de ATP, seguida de la transferencia de la fracción carboxilo al acetil-CoA. Los metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor* como lo es undecilprodigiosina (RED) y actinorrodina (ACT), se sintetizan durante estas fases de crecimiento y requieren malonil-CoA para su síntesis (Fig. 2) (Rodríguez *et. al.*, 2001).

El policétido aromático ACT es miembro de la clase de benzoisocromoquinonas (BIQs). El esqueleto cromóforo de los BIQs es derivado de la línea de policétidos de 16, 18 o 20 carbonos formados por la policétido sintasa (PKS). Análoga a la del ácido graso sintasa (FAS), PKSs catalizan la biosíntesis de los policétidos a través de repetidos enlaces C-C formados de las reacciones de selección entre los acil-CoA (Cane *et al.* 1998). Sin embargo, en contraste con la biosíntesis de ácidos grasos, la columna vertebral de la cadena de carbono de policétidos presenta mayor variedad con respecto a la elección de acil-CoA y del grado de reducción de β -cetona grupos funcionales que resultan después de cada elongación. Así para la biosíntesis de ACT la PKS sintetiza un octacetido (C16), columna vertebral de ocho malonil-CoA equivalentes, mientras que el tetracenomicina (TCM) PKS mínima sintetiza un decaacetido (C20), columna vertebral de diez equivalentes de malonil-CoA.

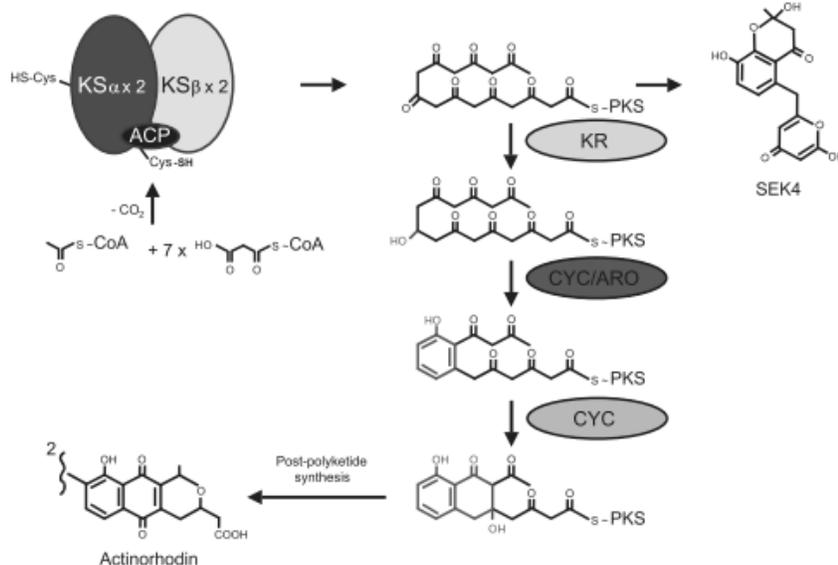


Figura 2. Representación esquemática de poliketido sintasa tipo II responsable de la producción de Actinorrodina.

El modelo incluye la biosíntesis de los antibióticos del tipo poliketidos como lo es actinorrodina (ACT) y antibióticos del tipo péptido ribosomales dependiente de calcio (CDA). La ruta de biosíntesis de undecilprodigiosina (RED) todavía no está completamente dilucidada (Thomas *et. al.* 2002), por lo tanto, sólo los pasos conocido por su biosíntesis se presentan en el modelo.

1.7 Metabolismo primario y secundario actinomicetos

La mayoría de los metabolitos secundarios son sintetizados a partir de precursores del metabolismo primario. Para la biosíntesis de metabolitos secundario, se ha buscado incansablemente la relación que existe entre metabolismo primario y precursores para incrementar la producción de éstos.

La vía de Embden-Meyerhof y pentosas fosfatos, son vías que están relacionadas entre sí para formar el metabolismo de *S. coelicolor* A3 (2) Las enzimas del metabolismo son las que regulan el flujo de carbono entre ellos. El primer intermediario en el catabolismo de la glucosa es la glucosa-6-fosfato (G6P), que es utilizada como sustrato común para fosfoglucosa isomerasa (Pgi), la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Zwf), y fosfoglucomutasa (PGM). Zwf es la enzima encargada de

hacer canal de conexión entre la vía de Embden-Meyerhof y pentosas fosfatos. PGM cataliza la reacción reversible de G6P y glucosa-1-fosfato (G1P), que podría dar lugar a la desviación de carbono para la biosíntesis de los polímeros de glucosa como glucógeno (Ryu *et al.*, 2006) o la biosíntesis de la 6-deoxyhexoses (6DOH) característica, pero no exclusiva, del metabolismo secundario y se encuentra en muchos los metabolitos secundarios bioactivos (Salas y Méndez, 2005). Pgi dirige el catabolismo de los hidratos de carbono a través de la vía de Embden-Meyerhof y posteriormente al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT).

Las deleciones realizadas en *Streptomyces lividans* en los genes *zwf1* y *zwf2* que codifican para isoenzimas de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, reduce el nivel de actividad *zwf* a aproximadamente a la mitad en comparación a la cepa parental. El presunto flujo de carbono más bajo a través del PPP en cada una de las mutantes Δzwf permitió la utilización de glucosa más eficiente a través de la glucólisis, que origino en niveles más altos en producción de antibióticos (Butler *et al*, 2002). En el caso de *S. coelicolor*, los genes de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*Zwf*) y fosfoglucomutasa (*Pgm*) fueron eliminados. Bajo las condiciones ensayadas, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada por *zwf2* juega un papel más importante que la codificada por *zwf1* en la determinación del flujo de carbono a ACT, mientras que la función de *Pgm* codificada por SC07443 no se defino claramente. Los mutantes Δpgm presentaron inesperadamente glucógeno sin verse afectado la producción de ACT (Ryu, *et al*, 2006).

Un caso exitoso de producción de metabolitos secundarios tipo policétido es *S. rimousus* M4018, productor de antibióticos policétidos aromáticos (OTC), por medio de la deleción de los genes *zwf1* y *zwf2*. La producción máxima fue de 170 y 180 mg/L de las cepas mutantes $\Delta zwf1$ y $\Delta zwf2$ respectivamente, donde la cepa parental produce 140 mg/L. Demostrando que la deleción de *zwf1* y *zwf2* puede incremental la producción de OTC, debido a que la concentración de acetyl-CoA de las cepas mutantes son menores en comparación de la cepa parental, lo cual explicar que la

mayor cantidad de acetil-CoA es transformado a malonil-CoA, precursor de la producción de OTC (Tang Z. *et al*, 2011)

La principal enzima reguladora de la glucólisis es la fosfofructoquinasa, la cual cataliza la fosforilación de la fructosa-6-fosfato con gasto de una molécula de ATP para formar fructosa 1,6-bisfosfato y ADP. Este paso está sujeto a una regulación extensiva ya que no solamente es irreversible, sino que también el sustrato original está forzado a proceder hacia la ruta glicolítica luego de este paso. La supresión de fosfofructoquinasa (glucolisis) que es codificada por el gen *pfKA2* en *S.coelicolor* se convirtió en una mayor producción de la pigmentación de actinorrodina (ACT) y undecilprodigiosina (RED). También, un mayor flujo de carbono por la vía pentosas fosfato, monitoreado con carbono no.13. El aumento de la vía de pentosas fosfato es debido en gran parte a la acumulación de la glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato, como fue observado experimentalmente en cepas mutantes. (Irina Borodina, *et al*, 2008).

El catabolismo de glucosa se genera un compuesto clave que es gliceraldehído-3P (G3P). El resultado neto de la primera fase de la vía glucolítica es la conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de gliceraldehído-trifosfato; la segunda fase comienza con la oxidación del gliceraldehído-trifosfato en lo que, desde el punto de vista energético, es una de las etapas más importantes de la vía glucolítica, ya que conserva la energía de oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído-trifosfato en su producto el 1,3-bisfosfoglicerato. La oxidación del gliceraldehído-trifosfato impulsa tanto la reducción de la coenzima NAD⁺ como la posterior fosforilación del ADP.

Estudios realizados *S. clavuligerus* con la delección del gen *gap1* que codifica para gliceraldehído-3P deshidrogenasa incrementa la producción de ácido clavulánico por el incremento del precursor G3P. El aumento de la concentración intracelular G3P bloquea parcialmente el flujo de carbono en la vía glucolítica que compite con la biosíntesis de ácido clavulánico. Así, el flujo que normalmente habría ido a través de la glucólisis en vez sería desviado hacia la biosíntesis de ácido clavulánico, lo que

representó un incremento global en la producción de ácido clavulánico en la cepa mutante. Los resultados demuestran claramente que la producción de ácido clavulánico en la cepa mutante se ha mejorado hasta 282 mg/L (210% de la cepa de tipo salvaje) en cultivos discontinuos en ausencia de aditivos y sin cambios en ninguno de los componentes en el medio de fermentación. Un rendimiento aún mayor de 422 mg/L (310% de la cepa de tipo salvaje) se alcanzó en cultivos de lote alimentado. (Li and Townsend, 2006)

La producción de acetil-CoA es precursor de la biosíntesis de antibióticos del tipo policétidos. La enzima acetil-CoA-carboxilasa (ACCase) pertenece a la clase liasa. La enzima colabora con la biotina por medio de la cual la acetil-CoA fija el CO₂ para la producción de malonil-CoA el cual interviene en la síntesis de los ácidos grasos y en la biosíntesis de metabolitos secundarios tipo policetido. La sobreexpresión de acetyl-CoA carboxilasa que es codificado por el gen *acc* en *S. coelicolor* mejora el rendimiento de ACT, dando lugar a una utilización más rápida de la glucosa y aumentado considerablemente la eficiencia de su conversión en ACT, que utiliza el ACC como producto, malonil-CoA reductasa como un precursor para la biosíntesis de ACT (Ryu, *et al*, 2006).

El ciclo de los ácido tricarboxílicos (CAT) es una vía central del metabolismo. Su principal función catalizadora es proporcionar los equivalentes de reducción a los complejos de las vías respiratorias a través de la descarboxilación oxidativa del acetil coenzima A (acetil-CoA). También funciona como precursor biosintético, principalmente en la síntesis de aminoácidos, y la glucosa. El glutamato y el aspartato se sintetizan a partir de α -cetoglutarato y oxalacetato, respectivamente, a través de transaminación. La asimilación de las dos moléculas de carbono, como el etanol y el acetato, a través del ciclo del glioxilato para la síntesis de los hidratos de carbono depende en parte del ciclo del CAT. Las reacciones anapleróticas, como la piruvato carboxilasa, reponen los intermediarios del ciclo del CAT que se utilizan en otras vías metabólicas, donde otros precursores generan la formación de metabolitos secundarios. Estas redes se extienden por todo el metabolismo de la célula de esta vía

central (Mark T. McCammon *et al.*, 2009). La oxidación de los ácidos orgánicos generados a partir del catabolismo de glucosa son acarreados al ciclo del CAT y/o al ciclo del glioxilato, en donde citrato sintasa participa en la condensación de oxalacetato y Acetil-CoA para producir citrato.

Estudios realizados en citrato sintasa para investigar su papel en el desarrollo morfológico y de biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*, donde el gen correspondiente *citA* fue clonado y secuenciado, permitió la construcción de una mutante *citA* BZ2 (BZ2). BZ2 es auxotrofa a glutamato, lo que indicó que *citA* codifica a citrato sintetasa, enzima que permite el flujo de acetil-CoA en el ciclo del CAT. En mutantes “bald” y BZ2 se presentó la acumulación de ácidos orgánicos que reflejan un desequilibrio entre el flujo glucolítico y el ciclo del CAT. Esto puede evitarse durante el desarrollo normal de la conversión de productos menos ácidos, como los lípidos o policétidos, disminuyendo el flujo glucolítico, o el aumento de flujo del ciclo del CAT. El hecho de que los mutantes no puedan hacer esto refleja una alteración del metabolismo de la glucosa-dependiente y una función importante del micelio aéreo para la captación de oxígeno. Por lo cual la interrupción del ciclo del CAT en el metabolismo aerobio da como resultado la acidificación del medio y los defectos en la diferenciación morfológica y la no biosíntesis de antibióticos. (Viollier *et al* 2001).

La segunda enzima del ciclo del CAT, aconitasa cataliza la isomerización reversible de citrato de isocitrato (a través de cis-aconitato). En los procariotas, aconitasa han sido más estudiado en las bacterias Gram-negativas, donde definen dos principales familias (AcnA y AcnB) (Gruer y Guest, 1994). Los estudios de aconitasa se llevaron a cabo para investigar el papel del CAT en el desarrollo de *Streptomyces coelicolor*, donde la secuencia de aminoácidos deducida del gen clonado *acoA* constituía la secuencia de AcoA. El hecho de que una limitación de la mutante AcoA (BZ4) no creciera en medios mínimos de glucosa en ausencia de glutamato confirmó que este gen codifica a la enzima aconitasa que cataliza el flujo a través del ciclo del CAT. BZ4 presentó defectos en el crecimiento, la biosíntesis de antibióticos, y la formación de hifas aéreas, en parte debido a la acidificación del medio y la acumulación de citrato. Los efectos

inhibitorios de los ácidos y el citrato de BZ4 fueron reprimidos por la introducción de una mutación de citrato sintasa, lo que demuestra el papel de las enzimas del ciclo del CAT en el mantenimiento del equilibrio metabólico, apoyando no sólo el crecimiento sino también en el desarrollo morfológico y el metabolismo secundario (Viollier *et. al.*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Las características únicas de desarrollo de los miembros del género *Streptomyces* han generado un considerable interés en su genética y fisiología. El interés biotecnológico radica en que varias especies de éste género tiene la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con uso farmacológico, como los son los antibióticos. Pueden destacarse antibióticos como tetraciclinas, oleandomicina, eritromicina A, granaticina y actinorrodina. El suministro y disponibilidad de los productos intermedios o precursores del metabolitos primario es un requisito para la biosíntesis de metabolitos secundarios como factores claves que determinaran la productividad. Para hacer frente a esta particularidad es necesario conocer la ruta biosintética, enzimas que participan, disponibilidad de sustratos y afinidad enzimática por los mismos; que garantizan que el flujo de carbono de metabolismo primario se oriente al metabolismo secundario. Para el caso de la producción de actinorrodina (ACT), producida por *Streptomyces coelicolor* A3 (2), microorganismo modelo de los actinomicetos, se requiere siete moléculas de acetil-CoA y una molécula malonil-CoA, con una enzima policétido sintasa tipo II para generar una molecular de ACT.

La diversidad de técnicas para aumentar la producción de metabolitos secundarios, como lo es el ADN recombinante e ingeniería metabólica, tienen como objetivo a) aprender la síntesis de nuevos o conocidos antibióticos en un organismo predispuesto a producir otros antibióticos o que no lo producía en ningún momento; y b) cambiar la distribución del flujo de compuestos involucrados en la biosíntesis del antibiótico para incrementar los rendimientos o productividad. En el caso de *Streptomyces coelicolor*, la creación de cepas mutantes por delección de genes involucrados en el metabolismo primario provoca trastornos en el crecimiento, y dependiendo de la ruta metabólica (anabólica o catabólica y de producción de equivalentes de reducción) inducen a) aumento de la producción de ACT o b) la nula producción de ACT hasta generación de fenotipos letales. Por lo cual se propone la modulación de la expresión genética por medio del silenciamiento de con la técnica de ARN antisentido y sobreexpresión de la enzimas citrato sintasa y aconitasa de ciclo del ácidos tricarboxílicos, para favorecer la producción de actinorrodina en *S.coelicolor* M510.

OBJETIVO

Objetivo General

Regular el flujo de carbono del metabolismo primario al secundario por medio de la modulación de la expresión genética de *citA* y *sacA* en *S. coelicolor*.

Objetivos Particulares

1. Amplificación del gen *citA* y *sacA* que codifican para citrato sintasa y aconitasa respectivamente, en *Streptomyces coelicolor* M510.
2. Construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar los genes *citA* y *sacA*.
3. Conjugación de *Streptomyces coelicolor* M510 utilizando a *E. coli* ET12567/pUZ8002 de los plásmidos que contengan los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar los genes *citA* y *sacA*.
4. Evaluación de la producción de actinorrodina en cepas conjugantes.

MATERIALES Y METODOS

4.1 Microorganismos

E.coli XL1-blue. Es la cepa que fue utilizada para la transformación y clonación de ADN plasmídico. Fue cultivado en medio LB, a una temperatura de incubación a 37°C cuando se requerían colonias aisladas y con agitación a 250 rpm cuando se trato de medio líquido. Para seleccionar las colonias transformantes se adiciono al medio, el antibiótico según el plásmido utilizado.

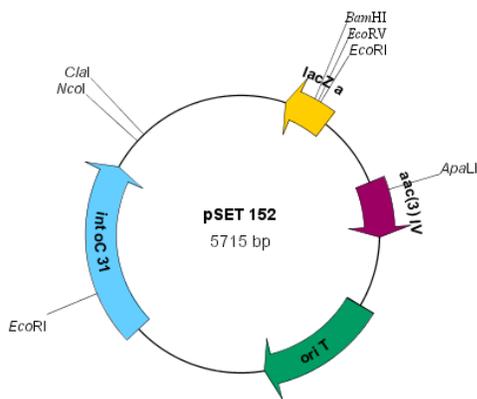
E.coli ET12567/pUZ8002. Esta fue utilizada para la conjugación de *S.coelicolor* debido a que no puede metilar el ADN, además de que contiene el plásmido puz8002 que se caracteriza por permitir la movilización del ADN plasmídico que contenga un *oriT*, sin ser transferido durante el proceso. La cepa es resistente a kamanicina y cloranfenicol.

Las cepas de *E.coli* fueron conservadas en placas de LB y en glicerol. Cuando se trato de tiempos cortos (hasta un mes) las cajas petri fueron selladas con parafilm y almacenadas a 4°. Para tiempos más largos (hasta 2 años) se conservo en glicerol al 20% a -20°C.

S. coelicolor M510. Esta cepa deriva de *S. coelicolor* M145 y presenta la carencia de los plásmidos SCB1 y SCB2. (genotipo SCP1⁻ SCP2⁻) y $\Delta redD$ (Kieser *et. al.*, 2000).

Los cultivos de *S.coelicolor* en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de vidrio ocupando 1/10 del volumen total del matraz con medio de cultivo. La incubación se realizó a 30°C y a 150 r.p.m. en una incubadora orbital. Los cultivos sólidos de *S.coelicolor* se incubaron en placas Petri en estufa a 30°C.

Para la conservación de *S.coelicolor* se recuperaron esporas de 12 días de crecimiento en medio solido, posteriormente centrifugadas a 11000 rpm por 15 min, se elimino el



El pSET152 es un plásmido de replicación autónoma el cual tiene la capacidad de replicarse de manera independiente al genoma bacteriano. Es un plásmido que puede replicarse en *E. coli*, y ser transferido por conjugación en *S.coelicolor*, integrarse manera eficiente y estable en el cromosoma por el sitio de inserción ΦC31 del profago, con *oriTRK2* que contiene *aac(3)IV* gen de resistencia a apramicina. (Kieser *et. al.*, 2000)

4.3 Medios de Cultivo

4.3.1 Medios de Cultivo para *E.coli*

Medio Luria-Bertani (LB). Este medio de cultivo se utilizo de forma habitual para el crecimiento de *E.coli*. Se utilizo como de forma líquida o sólida, cuya composición consiste en agregar:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	Hasta 1 L
pH	7.5 con NaOH

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

Medio SOB. Medio empleado para la preparación de células competentes de *E. coli*

Extracto de levadura	5.0 g
Peptona	20.0 g
NaCl	0.5 g
Agua desionizada hasta	1000 ml
pH con 2 N KOH	7.5

Se agregan 5 mL de una solución estéril (por filtración) de MgSO₄ 2M

4.3.2 Medios de cultivo para *S. coelicolor*

Medio MS. Este medio fue utilizado para el crecimiento de *S. coelicolor* (Kieser *et. al.*, 2000).

D- manitol	20g
Harina de soya	20g
Agar bacteriológico	20g
Agua destilada	Hasta 1 L

Este medio fue adicionado con MgCl₂ a una concentración final de 10 mM cuando se utilizó para la conjugación.

Medio YEME. Este medio se utilizó cuando se requería un crecimiento masivo de *S. coelicolor* para la extracción de ADN. (Kieser *et. al.*, 2000).

Glucosa	10 g
Sacarosa	103 g
Extracto de levadura	3 g
Bacto peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Agua destilda	Hasta 1 L

Después de esterilizar se agregó 2 mL de una solución estéril de MgCl₂ 6H₂O 2.5 M.

Medio 2XYT. Este medio de cultivo se utilizo para el proceso de conjugación de *S. coelicolor* (Kieser *et. al.*, 2000).

Bacto triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Medio mineral suplementado solido (SMMS). Este medio preferente para la producción de antibióticos por *S.coelicolor* (Kieser *et. al.*, 2000).

Difco casaminoacidos	2 g
----------------------	-----

Buffer TES	5.73 g (25mM final)
Agua destilada	Hasta 1 L
pH 7.2 con NaOH 5N	

Para 200 mL de la solución anterior agregar 3 g de agar bacteriológico. Esterilizar por autoclave. En el momento de uso, desgelificar y agregar:

NaH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ (50mM cada uno)	2 mL (1mM final)
MgSO ₄ (1M)	1 mL (5mM final)
Glucosa (50%w/v)	3.6 mL (50mM final)
Elementos trazas*	0.2 mL

Medio mineral suplementado liquido (SMM). Este medio preferente para la producción de antibióticos por *S.coelicolor* (Kieser *et. al.*, 2000).

PEG 6000 (BDH 6.1% w/v agua destilada)	81.9 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O (24g/L)	2.5 mL (5 mM final)
Buffer TES (0.25M pH 7.2)	10 mL (25mM final)
NaH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ (50mM cada uno)	1 mL (1mM final)
Glucosa (50%w/v)	2 mL
Antiespumante 289 (1% w/v)	1mL
Elementos trazas*	0.1 mL
Difco casaminoacidos (20% w/v)	1 mL
Total	100 mL
Glicina (20%)	25 mL/L (0.5% final)

Cada solución es esterilizada por autoclave por separado, y es mezclado por el orden mencionado.

*Elementos trazas. 0.1 g/L de ZnSO₄ 7H₂O, FeSO₄ 7H₂O, MnCl₂ 4H₂O, CaCl₂ 6H₂O, NaCl. Almacenar 4°C y es utilizable por 2-4 semanas.

4.4 Antibióticos y suplementos

Cuando se sembró una cepa transformada de acuerdo al plásmido se utilizó un antibiótico de selección. La concentración de los antibióticos se presenta en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Concentración de los antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico solución stock (mg/mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>E.coli</i>	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$) <i>Streptomyces</i>
Ampicilina (100)	100	-
Kanamicina (100)	50	-
Apramicina (100)	100	50
Cloranfenicol (25)	25	-

4.5 Técnicas Experimentales

4.5.1 Obtención de ADN

Aislamiento de ADN plasmídico.

Para aislar ADN plasmídico se siguieron los siguientes protocolos.

4.5.1.1 MiniPreparaciones

Este protocolo se siguió cuando se deseaba obtener ADN plasmídico en pequeña escala para analizar plásmidos recombinantes. (Holmes y Quigley, 1981). Se incubaron 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección, una colonia de células de *E. coli* XL1-blue transformada con un palillo estéril. La incubación fue a 37°C a 250 rpm durante 12 horas, después del tiempo transcurrido las células se colectaron por centrifugación a 3600 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se re suspendió en 350 μL de STET¹, posteriormente se añadieron 20 μL

de una solución de lisozima² a una concentración de 10 mg/ mL en agua para una concentración final de 500 µg/mL.

A continuación los tubos se mezclaron durante 1 min e inmediatamente se hirvieron en un baño de agua hirviendo durante 90 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 re suspendió en 20 µL de TE³ ó ddH₂O estéril.

4.5.1.2 MiniPreparaciones por kit⁴

El kit para minipreparaciones utilizado fue *GeneJet Plasmid Miniprep* de la marca Fermentas el protocolo es el siguiente.

Se incubaron 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección, una colonia de células de *E. coli* XL1-blue transformada con un palillo estéril.

La incubación fue a 37°C a 250 rpm durante 12 horas, después del tiempo transcurrido las células se colectaron por centrifugación a 3600 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se re suspendió en 250 µL de solución de re suspensión, y se colecto en tubos eppendorf añadiendo 250 µL de solución de lisis y 350 µL de solución neutralizante.

El lisado resultante se neutraliza para crear condiciones adecuadas para la unión de ADN plásmido en la membrana de sílice en la columna.

1. 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)

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

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

4. Se desconoce la composición de las soluciones utilizada en el kit

Los desechos de la célula se precipitan por la centrifugación y el sobrenadante contiene el ADN del plásmido se carga en la columna e inmediatamente se centrifugación a 14 000 rpm durante 1 min.

El lavado se realiza dos veces con 500 µL con la solución de lavado. Se traspasa la columna a un tubo eppendorf y añadiendo 50 µL de buffer de elución a la columna y para colectar el ADN plasmídico es necesario centrifugar a 14 000 rpm durante 1 min.

4.5.2 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Este método fue utilizado para amplificar las secuencias de ADN de citrato sintetasa y aconitasa de *S. coelicolor*.

Esta técnica se basa en la actividad de la ADN polimerasa, cuya función es sintetizar en dirección 5'→ 3' una cadena de ADN a partir de una cadena molde, iniciadores y desoxinucleótidos. La ADN polimerasa *Taq* polimerasa proveniente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus* 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 iniciadores diseñados para tal efecto, mediante la repetición de tres pasos:

- i)* Desnaturalización del ADN molde,
- ii)* Hibridación de los iniciadores a cada una de las cadenas molde,
- iii)* Polimerización a partir es de los iniciadores.

i) La desnaturalización del ADN molde es el primer paso para amplificar el ADN; este proceso se debe realizar a temperaturas entre 93º y 95ºC, 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.

ii) La hibridación de los cebadores a cada una de las cadenas molde, se realiza a una temperatura de entre 40º y 60ºC. A ésta temperatura el ADN se renaturaliza, pero al

estar presentes los iniciadores 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.

iii) Finalmente, en el paso de polimerización a partir de los iniciadores 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 iniciadores.

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.

4.5.2.1 Diseño de cebadores para PCR

Con el objetivo de amplificar y aislar los genes que codifican para citrato sintetasa y aconitasa del genoma de *S. coelicolor*, el diseño de los iniciadores se realizaron a partir de las secuencias nucleotídicas reportada en la base de dato de *StrepDB - The Streptomyces Annotation Server*, identificadas como SCO 2736 y SCO 5999 respectivamente. Los cebadores diseñados se presentan en la tabla 2. La secuencia marcada en gris corresponde al sitio de reconocimiento para enzima BamHI que se utilizara para ligar el producto de PCR al plásmido pAEPT1.

Tabla 2. Pares de oligos utilizados para amplificar secuencias de estudio.

StrepDB	Oligonucleotidos	Secuencias
SCO 2736	citAF1	5' AAGGATCCATGAGCGCAACTCTGTAGT 3'
	citAR1	5' AAGGATCCTCAGCGCTCCTCGACGGGGA 3'
SCO 5999	acoF1	5' AAGGATCCGTGTCGGCGAACAGCTTCGA 3'
	acoR1	5' AAGGATCCCTACTTGCGGATCAGGCTGC 3'

4.5.2.2 Condiciones de reacción y amplificación.

Antes de realizar la mezcla de reacción todos los componentes, con excepción al ADN y *Taq* ADN polimerasa, se homogenizaron por agitación en vortex durante 30 s. Realizada la mezcla se centrifugaron los tubos a 14, 000 rpm durante 10 s.

La mezcla de reacción consistió en los siguientes componentes y se agregaron en el orden que son mencionados:

	<i>citA</i>	<i>sacA</i>
ddH ₂ O	34.5 µL	32 µL
DMSO (5%)	0 µL	2.5 µL
Tampón ⁵ 10×	5 µL	5 µL
Mezcla de dNTP's ⁶	1 µL	1 µL
Cebador F (20 µM)	2 µL	2 µL
Cebador R (20 µM)	2 µL	2 µL
ADN	5 µL	5 µL
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL	0.5 µL

Los tubos se colocaron en un termociclador con las siguientes condiciones:

	<i>citA</i>	<i>sacA</i>
Desnaturalización	94°C 5 min	94 °C 5 min
<i>30 ciclos de:</i>		
Desnaturalización	94°C 1 min	94 °C 1 min
Hibridación	55°C 1 min	57 °C 1 min
Polimerización	68°C 1.2 min	68 °C 3 min
<i>Después de 30 ciclos:</i>		
Polimerización	72°C 10 min	72°C 10 min

Las condiciones de amplificación variaron según las T_m de los iniciadores utilizados.

Los productos de PCR amplificados fueron purificados y ligados a un plásmido pJET1.2 de la marca Fermentas, el cual está diseñado para clonar productos de PCR.

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

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

4.5.3 Plásmido utilizado para la clonación del producto de PCR

El plásmido pJET1.2 (fig. 3) de la marca fermentas está diseñado para la clonación de productos de PCR de un tamaño de 6 pb a 10 kb. Este vector linealizado presenta un tamaño de 2974 kb, el cual tiene un gen letal el cual es interrumpido por la ligación del inserto de ADN en el sitio de clonación dando como resultado que sólo las células que contengan el plásmido recombinante serán capaces de crecer.

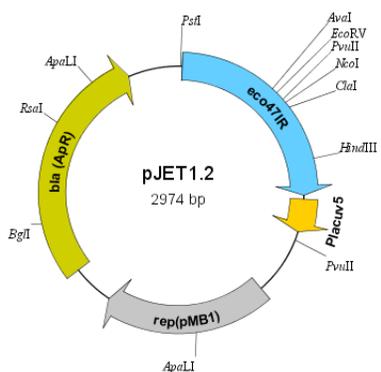


Figura 3. Plásmido pJET1.2. Vector de clonación para productos de PCR. Tiene un gen de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para E.coli y un gen letal que impide el crecimiento de colonias que no hayan integrado un inserto.

4.5.4 Clonación de productos de PCR

4.5.4.1 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 Qiaquick⁷ de la marca QIAGEN. La técnica consistió en cortar el trozo de gel que contenía el fragmento de ADN de interés y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Se le agregaron 3 volúmenes de solución QG y se mezcló. 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. En este paso se permite que la agarosa se degrade y el ADN que de manera libre. Se añadió 1 volumen de isopropanol a la mezcla.

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 750 µL de solución PE.

7. Se desconoce la composición de las soluciones utilizada en el kit.

Se centrifugo nuevamente durante 1 minuto y el filtrado fue desechado. La columna se centrifugo una vez más a 13,000 rpm durante 1 minuto para eliminar los restos de tampón PE. Posteriormente se eluyó el ADN por adición de 50 µL de solución EB (1:10) y posterior centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto.

4.5.4.2 Reacción de ligación

Cuando la ligación se llevó a cabo pJET 1.2 de la marca fermentas para los productos de PCR la mezcla de reacción fue la siguiente:

Buffer de reacción 2X	10 µL
Producto de PCR	1-2 µL
Enzima <i>DNA blunting</i>	1 µL
H ₂ O	Lo necesario para alcanzar el volumen total.
Volumen total	18 µL

La mezcla se centrifuga por 3 a 5 segundos, y a continuación se incubaba a 70°C por 5 minutos e inmediatamente la mezcla se enfrió en hielo. Obtenida la mezcla de reacción se añade el vector de clonación y la enzima de ligación en las siguientes proporciones:

pJET 1.2	1 µL
ADN Ligasa T4	1 µL
Volumen total	20 µL

La mezcla final se homogenizó y se incubó a una temperatura ambiente por 5 minutos o hasta 30 minutos para aumentar la eficiencia.

Transcurrido el tiempo necesario de incubación, se continúa al proceso de transformación en células competentes de *E.coli* XL-blue por electroporación.

Cuando la ligación se llevo en plásmidos subsecuentes se preparo la siguiente mezcla:

Vector	20 a 100 ng
Inserto	En relación molar de 1:1 a 1:5
Buffer (10X)	2 µL
Enzima ADN ligasa T4	1 µL

H2O	Restante para alcanzar volumen total.
Volumen total	20 μ L

Esta mezcla se mantuvo a 4°C por 18 hrs, transcurrido el tiempo la mezcla de ligación se continuó con la transformación en células competentes de *E.coli* por electroporación. Al medio de cultivo fue necesario agregarle el antibiótico para realizar la selección las colonias transformantes.

En ambos casos, el ADN plasmídico fue purificado por minipreparaciones, los casos que presentaban el plásmido de interés fueron purificados y digeridos con enzimas de restricción para realizar la identificación de los fragmentos y plásmidos de interés.

4.5.5 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, donde el ADN migra de ánodo hacia cátodo en dependencia a su tamaño, forma y carga eléctrica. Los fragmentos de ADN son separados por electroforesis en geles de agarosa a distintas concentraciones dependiendo del tamaño del fragmento a separar, utilizando como disolvente a TAE 1X. Fué necesario calentar para disolver la agarosa, debe estar incolora e uniforme. Fue necesario dejar enfriar para verter en la bandeja (con el peine en posición para determinar los pocillos) y dejar polimerizar a temperatura ambiente. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se cubre con TAE 1X. Las muestras se prepararon en la una relación 1/10 de tampón de carga antes de colocarle en los pocillos del gel con el objetivo de aumentar la densidad de la muestra para facilitar su aplicación y colorear la muestra para permitir el seguimiento de la corrida.

Como referencia de los pesos de moleculares de los fragmentos a separar se utilizaron marcadores de peso molecular: el ADN del fago λ digerido con enzimas de restricción y generando fragmentos de distintos tamaños, que a continuación se muestran.

Enzima	Tamaño del Fragmento (pb)
Hind III y EcoRI	24756, 5148, 4973, 4268, 2027, 1904, 1709, 1375, 947, 831 y 564

GenRule 1Kb	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000,
DNA Ladder⁸	1500, 1000, 750, 500, 250

Después de la separación por electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para poder visualizar en ADN.

Los geles se observaron bajo la radiación UV con ayuda de un transiluminador de la marca BioRad e integrado con digitalizador de imágenes (programa *Quantity One*).

4.6 Preparación de células electrocompetentes

Se inocularon 50 ml de medio SOB en un matraz de 250 ml con una colonia de *E. coli* XL1-Blue aislada y se incubó durante 12-14 h a 37 °C a 200 rpm. Una alícuota de 20 ml de este cultivo se utilizó para inocular 500 ml del mismo medio en matraz de 3600 ml y se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una DO de 0.4 a 600 nm (Sambrook y Russel, 2001).

Cuando el cultivo alcanzó 0.4 de DO a 600 nm, el matraz se mantuvo a 4 °C durante 30 minutos, a partir de este punto se mantuvieron las células siempre a 4 °C y todo se realizó en condiciones de esterilidad. Las células se centrifugaron a 3800 rpm durante 15 minutos (a 4 °C), se retiró el sobrenadante y las células se re suspendieron y lavaron con 100 ml de H₂O desionizada estéril fría. El proceso de lavado se repitió tres veces más. Las células se lavaron una última vez con glicerol al 10% (v/v) estéril y frío y finalmente se resuspendieron en solución GYT estéril fría. Se repartieron alícuotas de 55 µl de células y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta que fueron utilizadas.

4.7 Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Descongelar las células en un baño de hielo, y se mezcló 50 µL de células competentes a las cuales se les agrega 1 a 2 µL del ADN en solución, la mezcla siempre se mantuvo en el hielo.

8. Marcador de peso molecular de la marca Fermantas.

Posteriormente se colocó en una cubeta de electroporación y se dio un pulso usando un voltaje de 2.5 kV con el equipo *Gene Pulser II system* de la marca BioRad. Las bacterias transformadas se agregaron 1 mL de caldo LB e incubaron a 37°C en agitación constante a 250 rpm por 45 minutos. Luego fueron cultivadas en placas de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente e incubadas a 37°C.

4.8 Conjugación de *S. coelicolor* (Kieser et. al., 2000)

La conjugación entre especies se ha utilizado como una alternativa para insertar ADN exógeno a una célula, utilizando otra especie celular como vector; en el caso que se presenta en este documento, la transferencia del plásmido se da de *E. coli* a *Streptomyces* (Flett et. al, 1997).

Para llevar a cabo la conjugación, la cepa donadora debe poseer los genes requeridos para la transferencia de material genético. Las más utilizadas son: la cepa ET12567/pUZ8002, en la que los genes de transferencia están codificados en el plásmido de replicación autónoma pUZ8002; y la cepa S-17 en las que las características de transferencia están integradas en el cromosoma. Otra de las características que posee la cepa ET 12567 es que no posee los sistemas de metilación *dam* y *dcm*, por lo que la carencia de marcas de metilación en el ADN plasmídico evade los sistemas de restricción de *Streptomyces*. Aunado a las cepas, los plásmidos utilizados en esta técnica deben tener un origen de transferencia (*tra*) que sea reconocido por las enzimas de transferencia, para que se lleve a cabo la movilización de material genético de una célula a otra. En éste trabajo, la conjugación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Flett et. al., en 1997.-

Se utilizó como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002, la cual fue previamente preparada para electroporación, con el objetivo de obtener transformantes que posean el plásmido que se desea conjugar. Una vez obtenida la cepa transformada con el plásmido conjugativo, se inoculó una colonia en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio LB suplementado con kanamicina, cloranfenicol y el marcador de selección del plásmido a conjugar. Se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a

600 nm de 0.4-0.6, y posteriormente se recuperaron las células por centrifugación a 4,000 rpm durante 5 min. Las células se lavaron 3 veces con medio LB y posteriormente se re suspendieron en 1/10 del volumen original de LB.

De forma paralela a la preparación de células de *E. coli* se preparó un stock de esporas de *Streptomyces coelicolor*, en una concentración de 1×10^8 esporas/mL en medio 2×YT. Para iniciar la conjugación se tomaron 500 µL del stock de esporas y se incubaron a 50°C durante 10 min, con el objeto de inactivar temporalmente los sistemas de restricción de *S. coelicolor*. Posteriormente, a la suspensión de esporas se le agregaron 500 µL de células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 conteniendo el plásmido a conjugar. La mezcla se agitó suavemente durante 60 s y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min. Posteriormente se eliminaron 800 µL del sobrenadante y la mezcla de esporas y *E. coli* se re suspendió en los 200 µL restantes.

Finalmente, 50 µL de la mezcla de células de *E. coli* y esporas se sembraron en placas de Petri con medio SFM y se incubaron a 30°C durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se agregó 1 mL de una solución que contenía ácido nalidixico, en una concentración de 0.5 mg/mL para inhibir el crecimiento de *E. coli*, más la cantidad adecuada del antibiótico de selección del plásmido en *Streptomyces*. Después de la evaporación de la fase acuosa, se continuó la incubación a 30°C durante 36-48 horas más para el crecimiento de las conjugantes de *Streptomyces*.

4.9 Evaluación de la producción de actinorrodina (Kieser *et. al.*, 2000).

Para observar la producción de ACT en medio solido se empleo el medio SMMS. La cuantificación de ACT en medio líquido se empleo el medio SMM. Se realizaron cultivos por duplicado de cada cepa. Se emplearon matraces de 250 ml los cuales se inocularon con 25 ml de medio de cultivo con una concentración final de 1×10^{10} esporas/mL por cada cepa. Se tomaron matraces por duplicado a intervalos de tiempo de 24 hrs.

Para cuantificar la producción de actinorrodina (ACT) total se procedió a utilizar tanto el sobrenadante como la biomasa. Se agrega KOH para que la concentración final fuera de 1 N. La mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada a 3500 X g por 5 minutos. El sobrenadante es medido a una longitud de onda de 640 nm en el espectrofotómetro Jenway Genova UV-visible.

A continuación, conociendo el coeficiente de extinción molar para actinorrodina $\epsilon_{640} = 25320$, y aplicando la ley de Lambert-Beer se obtiene la concentración de ACT.

4.10 Cuantificación de la producción de Biomasa

La biomasa del medio de producción líquido se cuantifico por peso seco. Fue necesario separar la biomasa del medio empleando filtración por gravedad. La biomasa obtenida se secó en una estufa a 60°C, posteriormente se registró su peso hasta obtener peso constante en la muestra.

4.11. Evaluación del pH

El potencial de hidrogeno (pH) se determino con el potenciómetro Deaver instrument UB-10 de cada tiempo establecido en la fermentación. Se procedió a la calibración del equipo con los amortiguadores de referencia y enjuagar cuidadosamente el electrodo. Se transfirió una porción de la muestras a un recipiente limpio de tamaño apropiado. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se sumergió el electrodo en la muestra durante 1 min, de ser posible, agitar suavemente. Esperar que la lectura de pH se estabilice (variación de lectura menor que 0,02 unidad de pH en un lapso no mayor de 1 min). Retirar los electrodos de la disolución, secarlos con papel absorbente, sin enjuagarlos y sin tallar.

RESULTADOS

5.1. Construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar citrato sintasa en *Streptomyces coelicolor* M510

5.1.1 Amplificación de productos de PCR.

De acuerdo a las secuencias nucleótídicas reportadas por *StrepDB - The Streptomyces Annotation Server*, con número de identificación SCO 2736 para el gen *citA* de citrato sintasa se diseñaron cebadores para ambos extremos del gen a amplificar. Los cebadores en el extremo 5' contienen 6 nucleótidos extras que no pertenecen a las secuencias de los genes de estudio, son sitios de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI, con el objetivo de facilitar el clonaje de los productos de PCR.

Para amplificar el gen *citA* se utilizó ADN de *S. coelicolor*, el aislamiento del ADN total y las condiciones de amplificación por PCR se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Posterior a la amplificación por PCR del gen *citA*, se separaron los fragmentos amplificados en un gel de agarosa (Fig. 4).

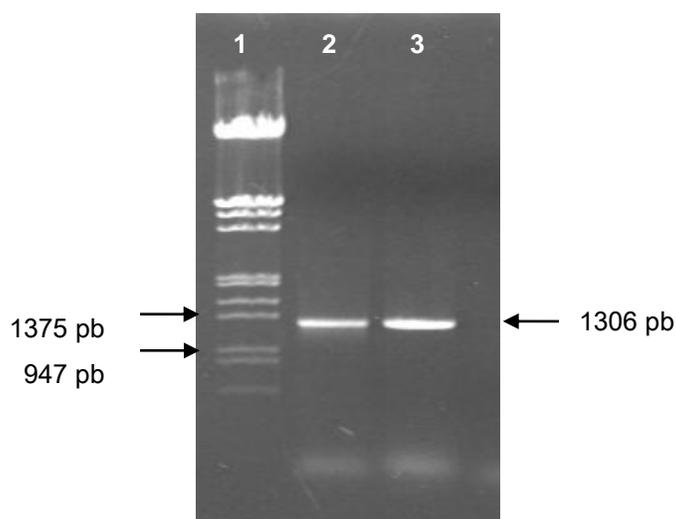


Figura 4. Gel de Agarosa que muestra los productos de PCR de la amplificación del gen *citA*. Carril 1. Marcador de peso molecular ADN λ digerido HindIII/EcoRI. Carril 2. *citA* con DMSO. Carril 3. *citA* sin DMSO.

El gel de agarosa en los carriles 2 y 3 se observa los fragmentos amplificados por PCR con las condiciones reportadas en Materiales y Métodos. El amplificado de se encuentra entre las bandas de 1375 pb y 947 pb del marcador de peso molecular λ HindIII/EcoRI (carril 1) que corresponde a un tamaño de 1306 pb del gen de citrato sintasa con la adición del sitio de restricción BamHI.

5.1.2 Clonación de productos de PCR en el plásmido pJet1.2

El fragmento de PCR amplificado del gen *citA* se aisló y purificó a partir de un gel de agarosa, como se describe en materiales y métodos. El producto de PCR se ligó al plásmido pJET1.2 (fermentas) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. La mezcla de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* XL-blue.

En la figura 5 se muestra el plásmido pJcitA producto de la ligación del gen *citA* presentando en los extremos con sitio de restricción BamHI.

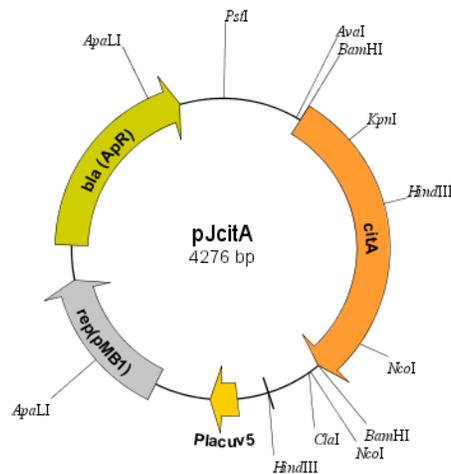


Figura 5. Mapa del Plásmido pJcitA construido a partir del plásmido pJET1.2 y producto de PCR de *citA*.

Para la confirmación de la construcción del plásmido pJcitA se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencia nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas fueron BamHI, NcoI y BglII. Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa (Fig. 6).

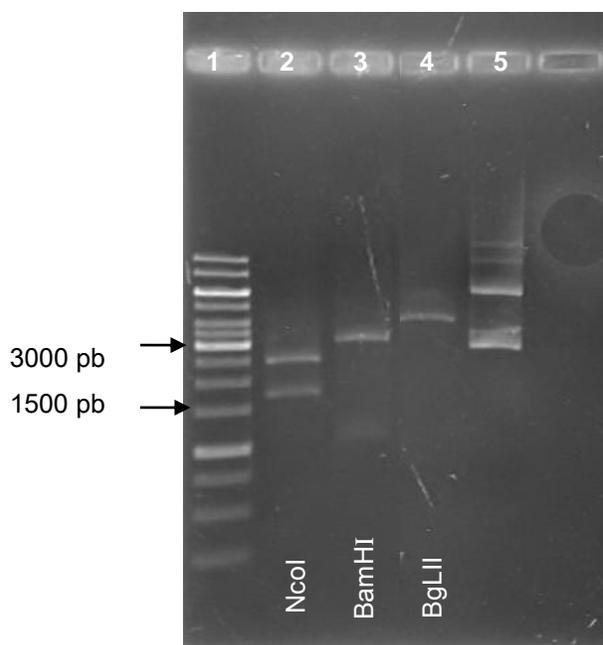


Figura 6. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, y 4 las digestiones con enzimas de restricción. En el carril 5 el ADN plasmídico pJcitA.

El carril 2 corresponde a la enzima de restricción NcoI que libera dos fragmentos un de 1781 pb de corresponde al corte ubicado dentro del marco de lectura de citrato sintasa y otro de 2495 pb al corte ubicado en el plásmido pJET1.2. El carril 3 corresponde a la enzima de restricción BamHI que libera dos fragmentos un de 1296 pb de corresponde al marco de lectura de citrato sintasa y otro de 2984 pb que corresponde al resto del plásmido. El carril 5 corresponde a la enzima BglII corte único ubicado en el marco de lectura de citrato sintasa, linealizando el plásmido a una banda de 4276 pb. El patrón de restricción esperado indica que se cuenta con el ADN plasmídico de pJcitA.

5.1.3 Clonación del gen *citA* en el plásmido pAEPT1 en dirección sentido y antisentido.

La construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar se realizó usando como vehículo el plásmido pAEPT1 (reportado en materiales y métodos), y como donador del inserto el plásmido pJcitA. Para hacer la

subclonación fue necesario liberar el fragmento del marco de lectura de citrato sintasa que estaban en el plásmido pJcitA, para lo cual fue necesario hacer digestiones con la enzima BamHI. El fragmento correspondiente al marco de lectura de 1296 pb. Por otro lado, el plásmido pAEPT1 se digirió con la enzima BamHI para quedar linealizado entre el promotor *PermE** y terminador *Tasd* de un tamaño de 3173 pb. Los productos de las digestiones se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.65%. Los fragmentos fueron purificados de acuerdo a materiales y métodos.

La mezcla de ligación se realizo de acuerdo a materiales y métodos en proporción 1:3 de pAEPT1 y el marco de lectura de citrato sintasa. Se incubo a 4°C durante 16 hrs y posteriormente se transformo en células competentes de *E.coli*. XL-blue. La transformación se sembró en medio LB con el antibiótico de selección.

En la figura 7 se muestra el plásmido pPcitA producto de la ligación del marco de lectura del gen *citA* y el plásmido pAEPT1.

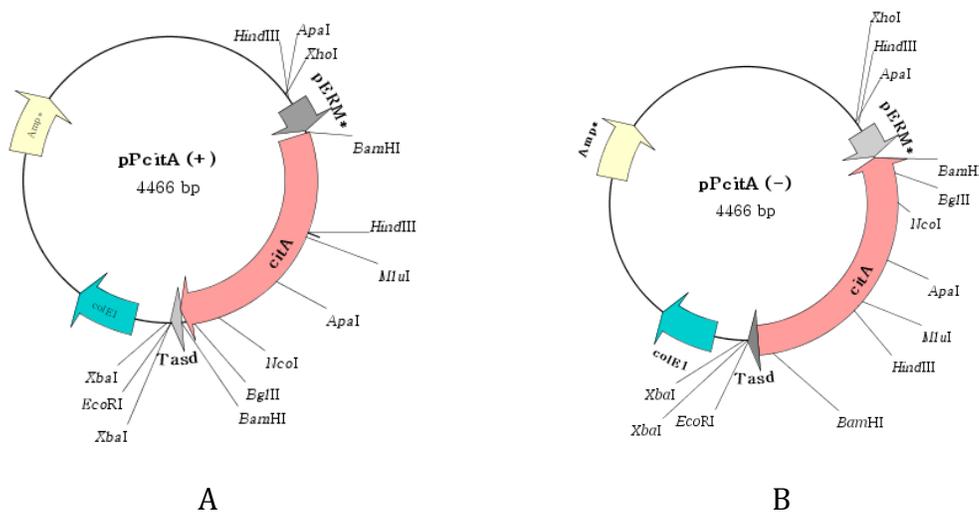


Figura 7. Mapa del Plásmido pPcitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).

De las colonias transformantes se purificó el plásmido y se buscó un incremento en proporción al tamaño del inserto. Para la construcción de los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de citrato sintasa se evaluó la posición de los marcos de lectura con respecto al promotor *PermE**, para lo cual se seleccionaron colonias que se digirieron con enzimas de restricción.

Para la confirmación de la construcción del plásmido pPcitA (+) y pPcitA (-) se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencias nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas en el gen *citA* fueron *Apal*, *BamHI*, doble digestión de *MluI-EcoRI* y *MluI-NcoI* para la identificación de los plásmidos de casetes de sobreexpresión y silenciamiento (Fig.8). Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa.

La figura 8 y 9 se muestran el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción para los plásmido pPcitA (+) y pPcitA (-) respectivamente.

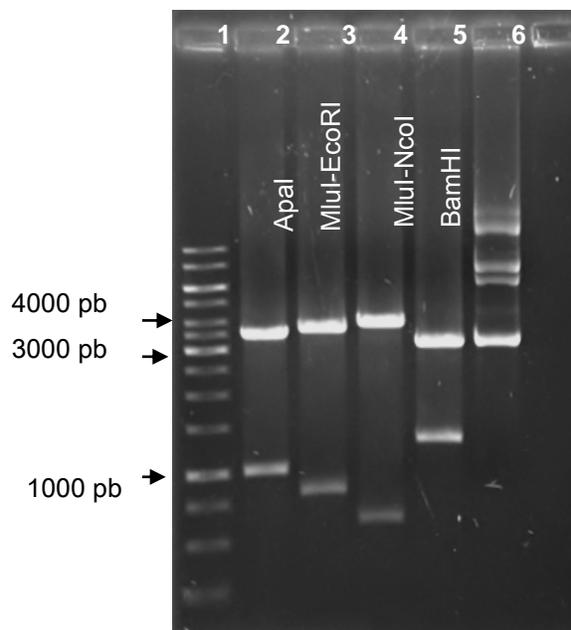


Figura 8. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4, y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPcitA (+).

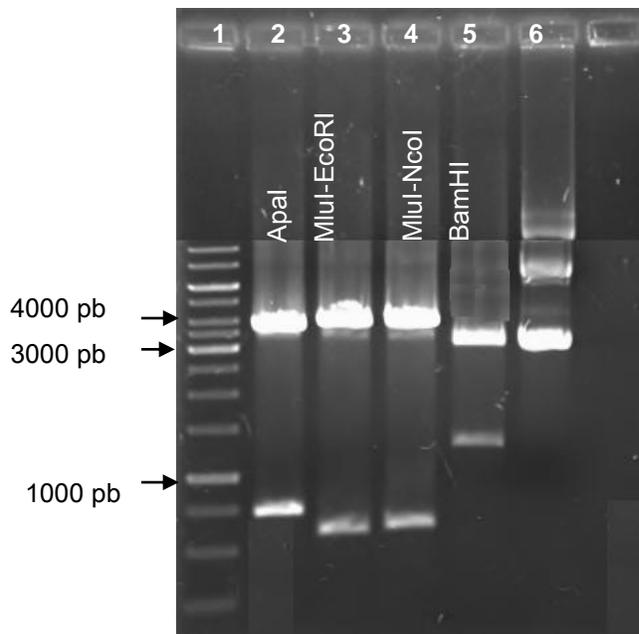


Figura 9. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4, y 5 las digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPcitA (-).

La digestión de los plásmidos con la enzima BamHI sirvió para comprobar que el inserto del marco de lectura de citrato sintasa (de 1296 pb) estuviera en el plásmido pAEPT1 (de 3170 pb). La digestión de los plásmidos con la enzima ApaI sirvió para comprobar que el gen citA se insertó en dirección sentido y antisentido con respecto al promotor. De acuerdo con los sitios de restricción de la enzima ApaI un corte está localizado corriente arriba del promotor (fijo) en la posición 663, y un segundo (varía de acuerdo a la posición en que se orientó el inserto del gen) de haberse insertado el gen citA en dirección sentido se encontrara en la posición de 1666 pb y en antisentido en 1386 pb.

A partir de este momento se generaron los casetes de sobreexpresión que corresponden a los marcos de lectura en dirección al promotor PermE*; y casetes de silenciamiento que hace referencia al marco de lectura en dirección opuesta al promotor PermE* de citrato sintasa.

5.1.4 Clonación de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento en vectores plásmidos para *S. coelicolor*.

Los plásmidos utilizados fueron pSET152 y pOJ446 (reportados en materiales y métodos) como vehículo y como donador del inserto los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de los plásmidos pPcitA.

Para hacer la subclonación fue necesario liberar el fragmento de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento de citrato sintasa que estaban en los plásmidos pPcitA (+) y pPcitA (-), para lo cual fue necesario hacer una digestión sencilla con la enzima SwaI. El fragmento correspondiente a los casetes fue de 1577 pb. Por otro lado, los plásmido pSET152 y pOJ446 se digirió con la enzima EcoRI para quedar linealizados con un tamaño de 5.5 kb y 10.4 kb respectivamente. Los productos de las digestiones se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.65%. Los fragmentos fueron purificados de acuerdo a materiales y métodos.

La mezcla de ligación se realizo de acuerdo a materiales y métodos en proporción 1:3 de pSET152, pOJ446 y los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de citrato sintasa. Se incubo a 4°C durante 16 hrs y posteriormente se transformo en células competentes de *E.coli* XL-blue. La transformación se sembró en medio LB con el antibiótico de selección. De las colonias transformantes se purificó el plásmido y se buscó un incremento en proporción al tamaño de los insertos.

El casete de sobreexpresión y silenciamiento de citrato sintasa en el plásmido integrativo pSET152 se denominaron pPscitA (+) y pPscitA (-) (Figura 10).

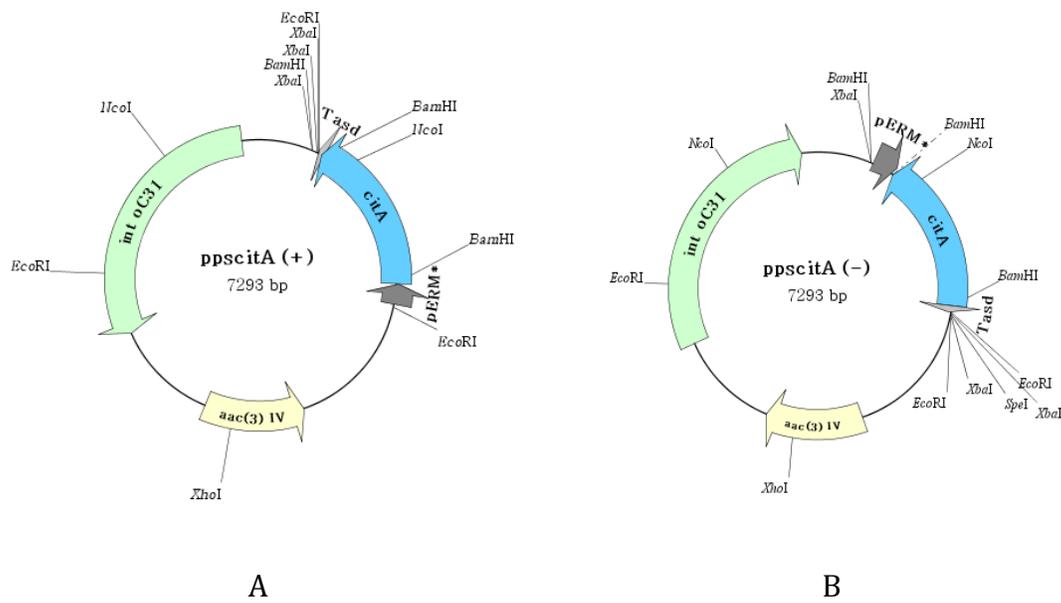


Figura 10. Mapa del Plásmido pPscitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B)

Para la confirmación de la construcción del plásmido pPscitA (+) y pPscitA (-) se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencias nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas fueron BamHI, NcoI, PvuII y ScaI para la identificación de los plásmidos de casetes de sobreexpresión y silenciamiento (Fig.10). Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa. La figura 11 y 12 se muestra el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción para los plásmido pPscitA (+) y pPscitA (-) respectivamente.

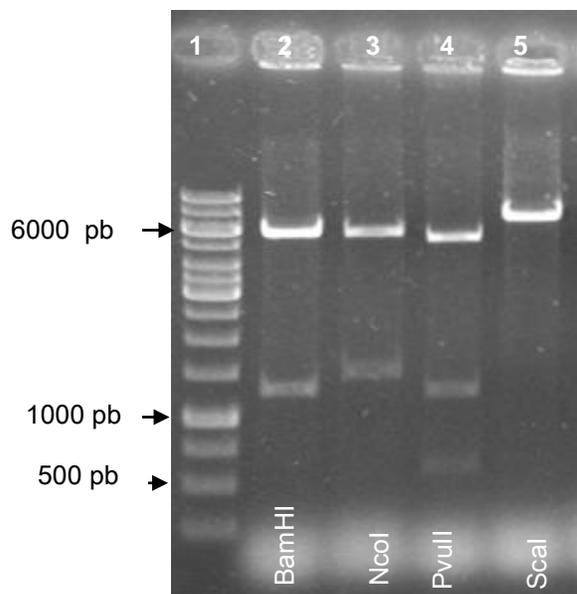


Figura 11. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 las digestiones de pPscitA (+).

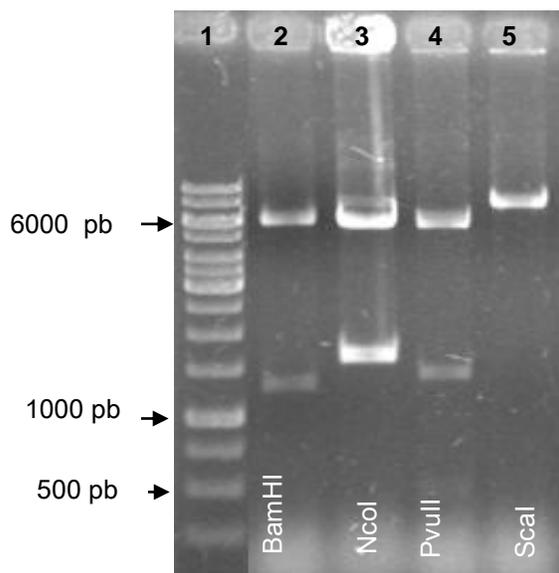


Figura 12. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 las digestiones de pPscitA (-).

La digestión de los plásmidos con la enzima BamHI presenta tres corte , dos de ellos liberan una fragmento de 1296 pb correspondiente al marco de lectura de citrato

sintasa, y un corte presente en el plásmido pSET152 liberando un fragmento de 5891 pb y 212 pb (no observado en el gel). La digestión de los plásmidos con la enzima NcoI libera dos fragmentos de 4835 pb y 2458 pb generados a partir de un corte localizado en el casete de citrato sintasa (posición 1805) y en el plásmido pSET152 (posición 6534). La digestión con la enzima de restricción PvuII presenta un corte en la posición 915 localizado dentro del marco de lectura de citrato sintasa, y otros dos cortes en la posición 352 y 2251 localizados en el plásmido pSET152 generando tres bandas de 5394, 1442 y 457 pb, respectivamente. La digestión de los plásmidos con la enzima de restricción ScaI presenta un corte único generando una banda de 7293 pb correspondiente al tamaño del plásmido linealizado.

Para los plásmidos de replicación autónoma generados a partir del plásmido pOJ466 y plásmidos pPcitA (+) y pPcitA (-), se denominaron pPocitA (+) y pPocitA (-) (Figura 13).

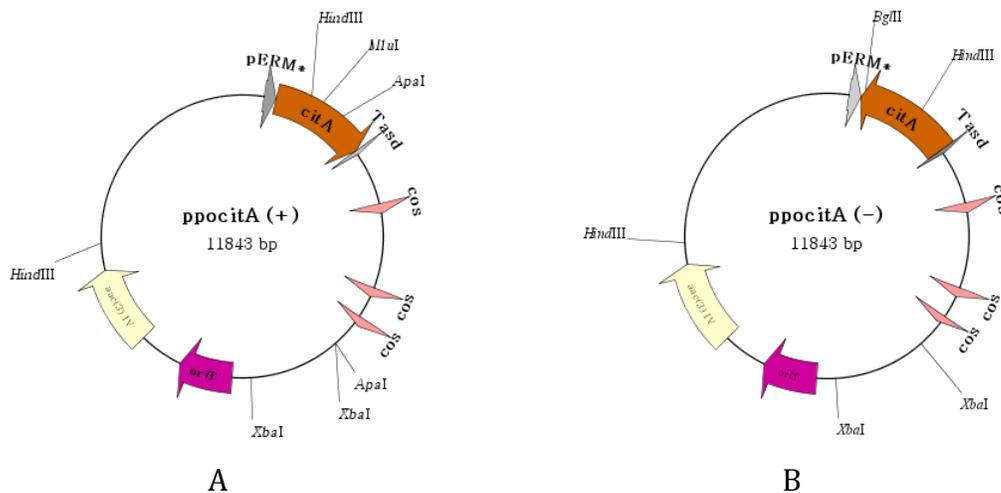


Figura 13. Mapa del Plásmido pPocitA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).

La confirmación de la construcción del plásmido pPocitA (+) y pPocitA (-) se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencias nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas fueron PvuII, BglII y HindII para la identificación de los plásmidos de casetes de sobreexpresión y silenciamiento (Fig.13). Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de

agarosa. La figura 14 y 15 se muestra el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción para los plásmido pPocitA (+) y pPocitA (-).

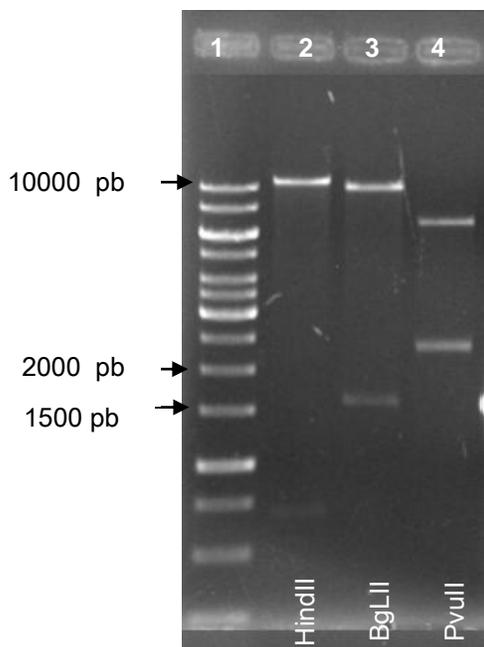


Figura 14. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPocitA (+).

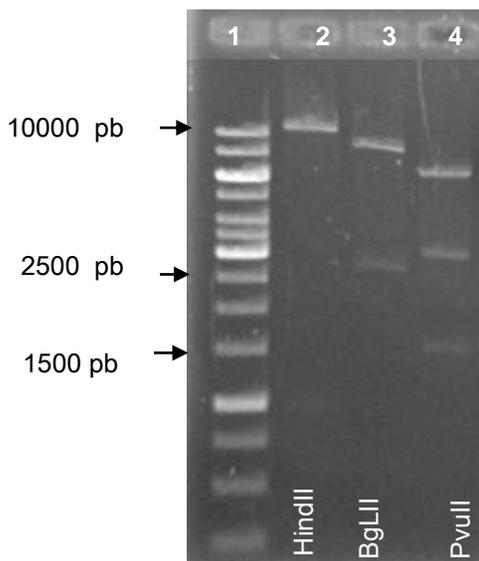


Figura 15. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPocitA (-).

La digestión de los plásmidos con la enzima HindIII presenta dos cortes liberando un fragmento de 11133 y 710 pb en el plásmido de sobreexpresión y de 110843 y 1000 pb para el de silenciamiento; en ambos casos localizados los cortes en el marco de lectura de citrato sintasa y promotor *PerME**. La digestión de los plásmidos con la enzima BglII libera dos fragmentos de 1620 y 10223 pb para el casete de sobreexpresión y en el caso del casete de silenciamiento las bandas corresponden a 3000 y 8843 pb; cortes localizados en el gen citrato sintasa y en el plásmido pOJ446. La digestión de los plásmidos con la enzima PvuII para el casete de sobreexpresión genera bandas de 2396 y 2410 pb (empalmadas en el gel de electroforesis) y 7037 pb; localizados los cortes en el marco de lectura del citrato sintasa y el plásmido pOJ446. La digestión de los plásmidos con la enzima PvuII para el casete de silenciamiento los cortes están localizados en el gen *citA* y el plásmido pOJ446 generando banda de 1505, 3112 y 7226 pb.

A partir de este momento ya se cuenta con los vectores plasmídico con los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de replicación autónoma e integrativo de citrato sintasa para ser utilizados en *S. coelicolor* M510.

5.2 Construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar aconitasa en *Streptomyces coelicolor* M510

5.2.1 Amplificación de productos de PCR.

De acuerdo a las secuencias nucleótidas reportadas por *StrepDB - The Streptomyces Annotation Server*, con número de identificación SCO 5999 para el gen *sacA* de aconitasa se diseñaron cebadores para ambos extremos del gen a amplificar. Los cebadores en el extremo 5' contienen 6 nucleótidos extras que no pertenecen a las secuencias de los genes de estudio, son sitios de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI, con el objetivo de facilitar el clonaje de los productos de PCR.

Para amplificar el gen *sacA* se utilizó ADN de *S. coelicolor*, el aislamiento del ADN total y las condiciones de amplificación por PCR se realizó como se describe en Materiales y

Métodos. Posterior a la amplificación por PCR del gen *sacA*, se separaron los fragmentos amplificados en un gel de agarosa (Fig. 16).

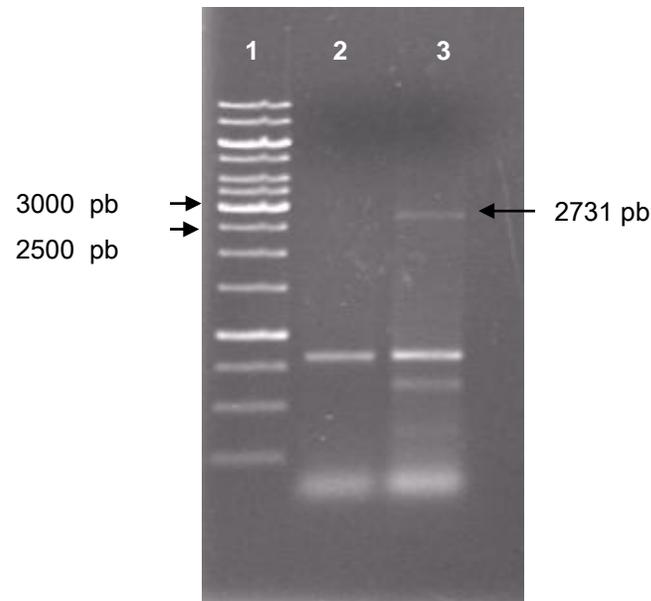


Figura 16. Gel de Agarosa que muestra los productos de PCR de la amplificación del gen *sacA*. 1. Marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder. 2. *sacA* sin DMSO 3. *sacA* con DMSO.

El gel de agarosa en el carril 3 se observa una banda de 2731 pb correspondiente al gen de aconitasa con la adición del sitio de restricción BamHI a amplificar en presencia de DMSO que se encuentre entre las bandas de 2500 pb y 3000 pb del marcador de peso molecular Gene Rule 1 kb de ADN Ladder.

5.2.2 Clonación de productos de PCR en el plásmido pJet1.2

El fragmento de PCR amplificado del gen *sacA* se aisló y purificó a partir de un gel de agarosa, como se describe en materiales y métodos. El producto de PCR se ligó al plásmido pJET1.2 (fermentas) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. La mezcla de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* XL-blue. La figura 17 muestra el plásmido pJsacA, producto de la ligación realizada.

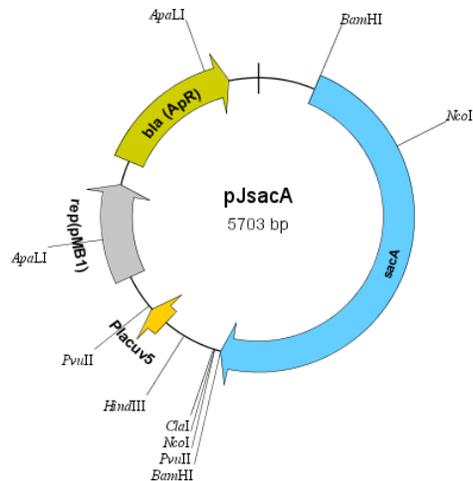


Figura 17. Mapa del Plásmido pJsacA construido a partir del plásmido pJET1.2 y producto de PCR del gen *sacA*.

La confirmación de la clona del plásmido pJsacA se realizó con el análisis por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencias nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas fueron BamHI, SmaI y NcoI. Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa (Fig. 18).

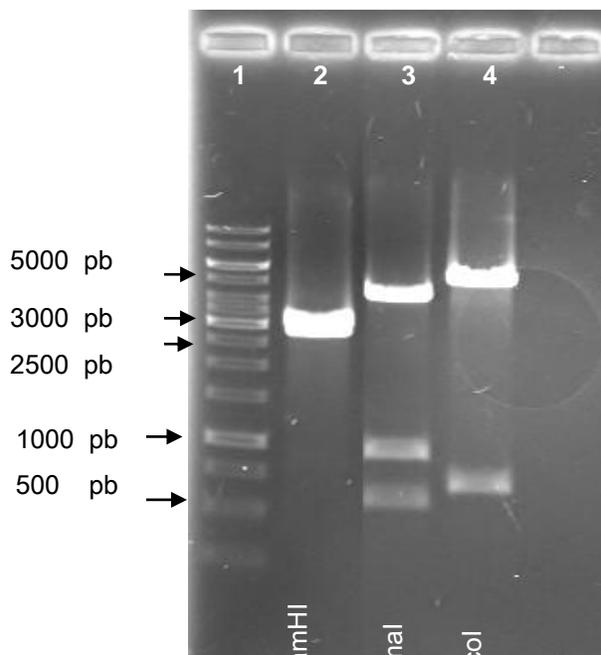


Figura 18. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, y 4 las digestiones con enzimas de restricción.

La digestión con la enzima BamHI presenta dos cortes presentes en la secuencia del marco de lectura de aconitasa que fueron añadidos en los cebadores para facilitar el clonaje, dando como resultado dos bandas de 2984 pb correspondiente al gen *citA* y otra de 2721 pb perteneciente al resto del plásmido. La digestión con la enzima de restricción SmaI libera tres fragmentos de 4194, 933 y 578 pb cortes localizados en el marco de lectura del aconitasa (posiciones 1074, 1652 y 2585). La digestión con la enzima de restricción NcoI genera dos fragmentos de 5036 y 669 pb correspondientes a un corte localizado en la posición 2470 ubicado en el marco de lectura de aconitasa y otro en la posición 3139 ubicado en el vector pJET1.2 El patrón de restricción esperado indica que se cuenta con el ADN plasmídico de pJsacA.

5.2.3 Clonación del gen *sacA* en el plásmido pAEPT1 en dirección sentido y antisentido.

La construcción de los vectores plasmídico con los casetes para sobreexpresar y silenciar se realizó usando como vehículo el plásmido pAEPT1 (reportado en materiales y métodos), y como donador del inserto el plásmido pJsacA.

Para hacer la subclonación fue necesario liberar el fragmento del marco de lectura de aconitasa que estaban en el plásmido pJsacA, para lo cual fue necesario hacer digestiones con la enzima BamHI. El fragmento correspondiente al marco de lectura de 2721 pb. Por otro lado, el plásmido pAEPT1 se digirió con la enzima *BamHI* para quedar linealizado entre el promotor *PermE** y terminador *Tasd* de un tamaño de 3173 pb. Los productos de las digestiones se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.65%. Los fragmentos fueron purificados de acuerdo a materiales y métodos.

La mezcla de ligación se realizo de acuerdo a materiales y métodos proporción 1:3 de pAEPT1 y el marco de lectura de aconitasa. Se incubo a 4°C durante 16 hrs y posteriormente se transformo en células competentes de *E.coli*. XL-blue. La transformación se sembró en medio LB con el antibiótico de selección.

De las colonias transformantes se purificó el plásmido y se buscó un incremento en proporción al tamaño de los insertos. Para la construcción de los casetes de

sobreexpresión y silenciamiento de cada uno de los genes de este proyecto. Se evaluó la posición de los marcos de lectura con respecto al promotor *PerME**, para lo cual se seleccionaron colonias que se digirieron con enzimas de restricción. En la figura 19 se muestra el plásmido pPsacA producto de la ligación del marco de lectura del gen *sacA* y el plásmido pAEPT1.

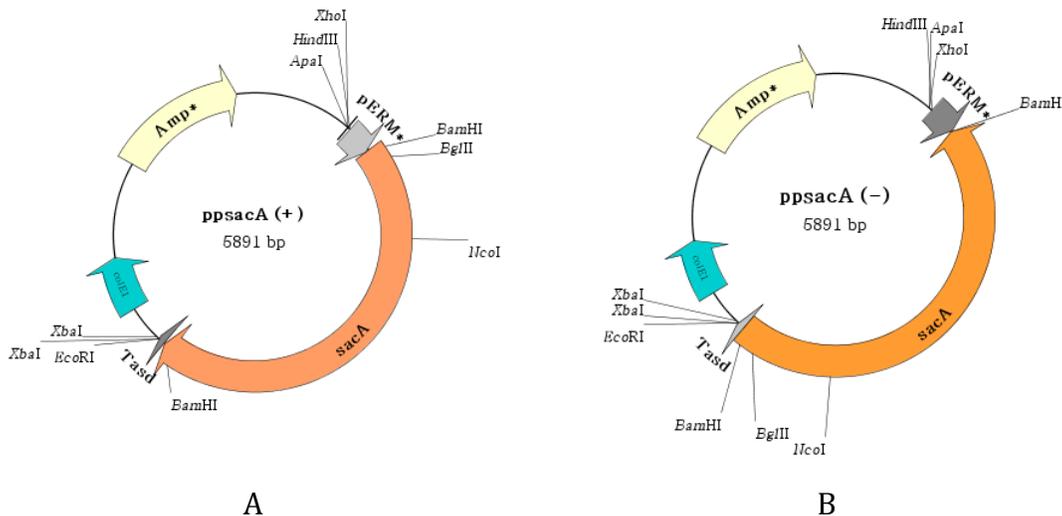


Figura 19. Mapa del Plásmido pPsacA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B).

De las colonias transformantes se purificó el plásmido y se buscó un incremento en proporción al tamaño del inserto. Para la construcción de los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de aconitasa se evaluó la posición de los marcos de lectura con respecto al promotor *PerME**, para lo cual se seleccionaron colonias que se digirieron con enzimas de restricción. Para la confirmación de la construcción del plásmido pPsacA (+) y pPsacA (-) se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de las secuencias nucleotídicas las enzimas de restricción utilizadas en el gen *sacA* fueron BamHI, doble digestión de NcoI-ApaI, NcoI-HindIII y NcoI-EcoRI para la identificación de los plásmidos de casetes de sobreexpresión y silenciamiento (Fig.19). Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa. La figura 20 y 21 se muestran el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción para los plásmidos pPsacA (+) y pPsacA (-) respectivamente.

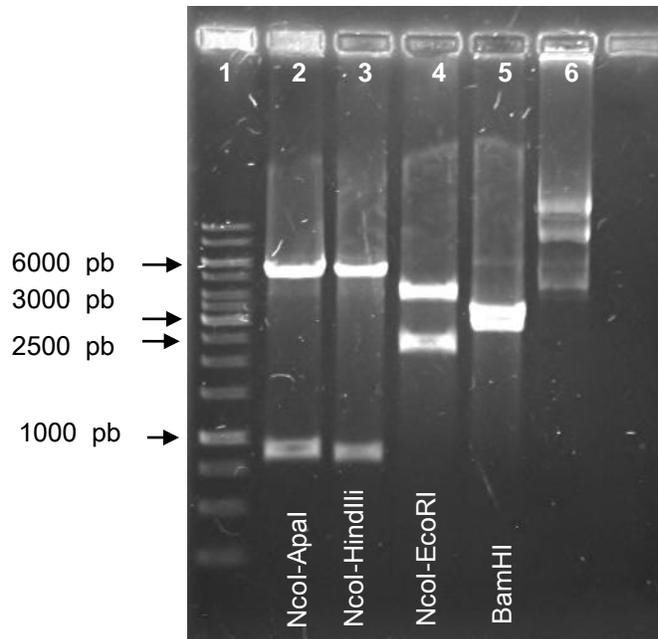


Figura 20. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder.. En los carriles 2, 3, 4 y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico de pPsacA (+).

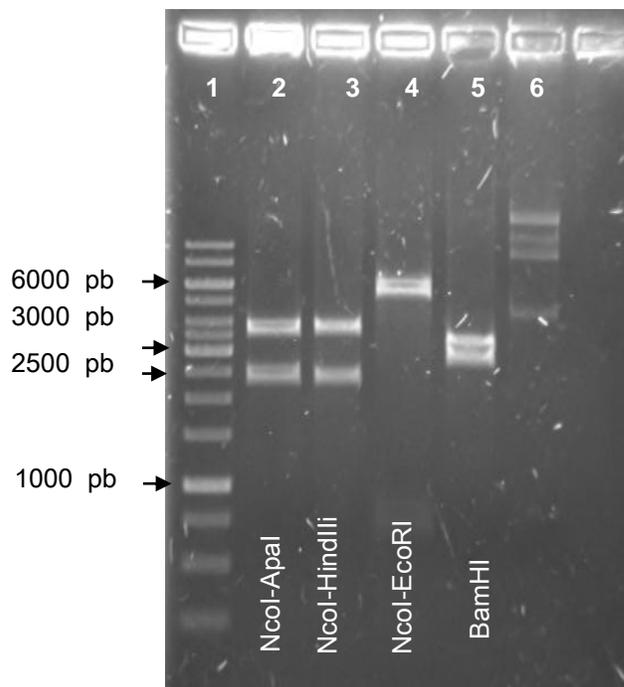


Figura 21. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3, 4 y 5 digestiones. En el carril 6 el ADN plasmídico pPsacA (-).

La digestión de los plásmidos con la enzima NcoI-ApaI sirvió para comprobar que el gen *sacA* se insertó en dirección sentido y antisentido con respecto al promotor. De acuerdo con los sitios de restricción de la enzima *ApaI* un corte está localizado corriente arriba del promotor (fijo) en la posición 663, y *NcoI* varía de acuerdo a la posición en que se oriento el insertó del gen, en dirección sentido se encontrara en la posición de 1499 pb y en antisentido en 2079 pb.

A partir de este momento se generaron los casetes de sobreexpresión que corresponden a los marcos de lectura en dirección al promotor PermE*; y casetes de silenciamiento que hace referencia al marco de lectura en dirección opuesta al promotor PermE*.

5.2.4 Clonación de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento en vectores plásmidos para *S. coelicolor*.

Los plásmidos utilizados fueron pSET152 y pOJ446 (reportados en materiales y métodos) como vehículo y como donador del inserto los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de los plásmidos pPsacA.

Para hacer la subclonación fue necesario liberar el fragmento de los casetes de sobreexpresión y casetes de silenciamiento de aconitasa que estaban en los plásmidos pPsacA (+) y pPsacA (-), para lo cual fue necesario hacer una digestión sencilla con la enzima PvuII. El fragmento correspondiente a los casetes fue de 3381 pb. Por otro lado, los plásmido pSET152 y pOJ446 se digirió con la enzima *EcoRI* para quedar linealizados con un tamaño de 5.5 kb y 10.4 kb respectivamente. Los productos de las digestiones se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.65%. Los fragmentos fueron purificados de acuerdo a materiales y métodos.

La mezcla de ligación se realizo de acuerdo a materiales y métodos en proporción 1:3 de pSET152, pOJ446 y los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de aconitasa. Se incubo a 4°C durante 16 hrs y posteriormente se transformo en células competentes

de *E.coli* XL-blue. La transformación se sembró en medio LB con el antibiótico de selección.

El casete de sobreexpresión y silenciamiento de aconitasa en el plásmido integrativo pSET152 se denominaron pPssacA (+) y pPssacA (-) (Figura 22).

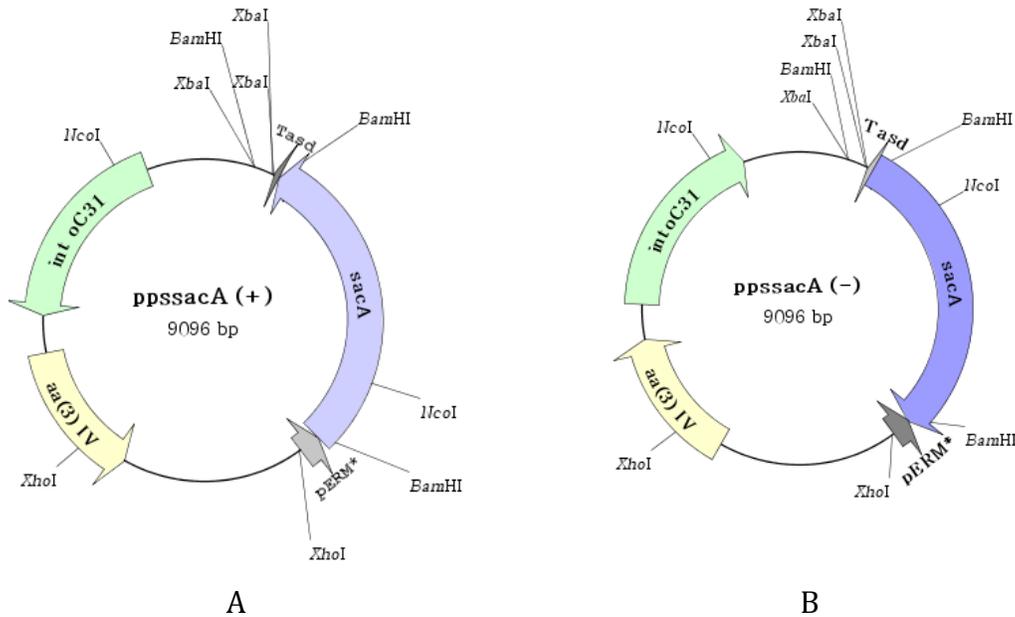


Figura 22. Mapa del plásmido pPssacA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B)

De las colonias transformantes se purificó el plásmido y se buscó un incremento en proporción al tamaño de los insertos, para lo cual se seleccionaron colonias que se digirieron con enzimas de restricción. La confirmación de la construcción del plásmido pPssacA (+) y pPssacA (-) se realizó un análisis de ADN por enzimas de restricción. De un análisis previo de la secuencias nucleotídica las enzimas de restricción utilizadas fueron *NcoI*, *PvuII* y *NcoI-MluI* para la identificación de los plásmidos de casetes de sobreexpresión y silenciamiento (Fig. 22). Posterior al ensayo de restricción se separaron los fragmentos en un gel de agarosa. La figura 23 y 24 se muestra el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción para los plásmido pPssacA (+) y pPssacA (-) respectivamente.

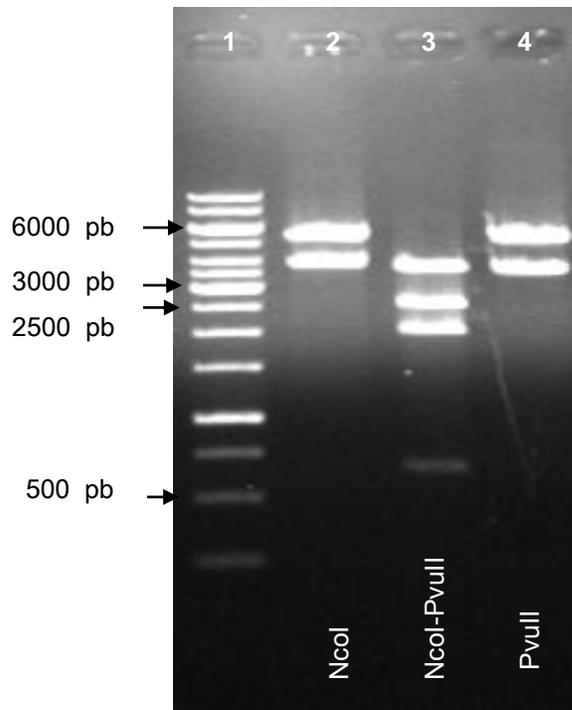


Figura 23. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 digestiones de pPssacA (+).

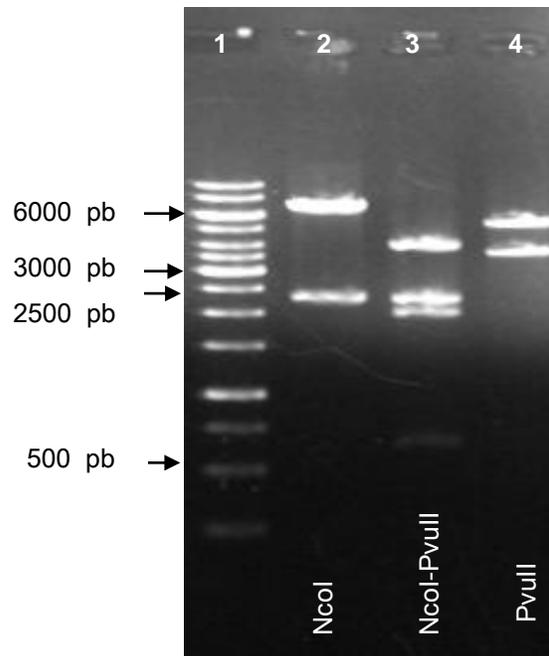


Figura 24. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 digestiones de ppssacA (-).

De acuerdo con los sitios de restricción de la enzima MluI presenta dos cortes (fijos) localizados en plásmido pSET152 en las posiciones 7677 y 5646 pb, y NcoI varía de acuerdo a la posición en que se insertó el casetes de transcripción, en dirección sentido se encontraba en la posición de 1382 pb y en antisentido en 1322 pb.

Para el plásmido de replicación autónoma pOJ466 la identificación de las clonas transformantes del gen de aconitasa se realizó un ensayo de enzimas de restricción. Los plásmidos generados se denominaron pPosacaA (+) y pPosacaA (-) (Figura 25).

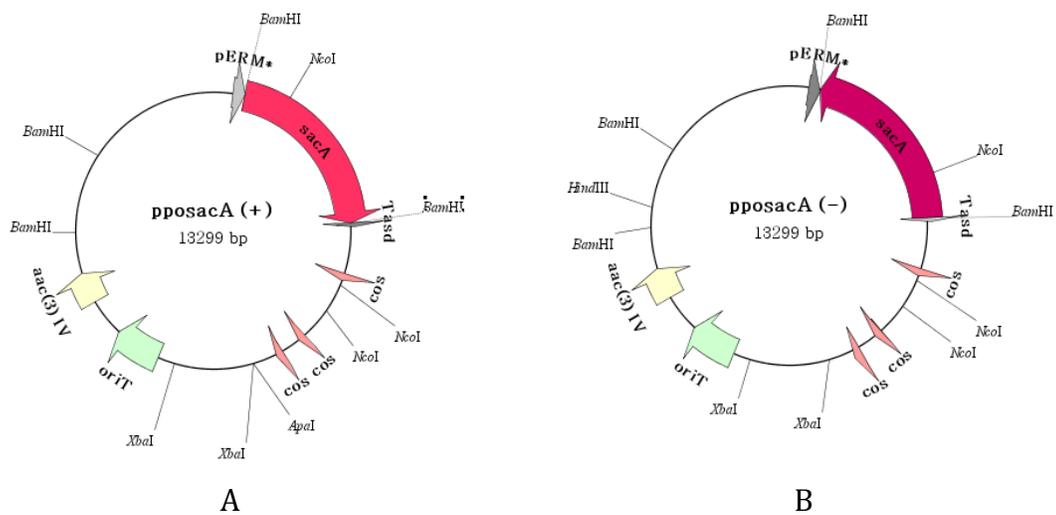


Figura 25. Mapa del Plásmido pPosacaA con casete de sobreexpresión (A) y silenciamiento (B)

Los plásmidos pposacaA (+) y (-) fueron digeridos con las enzimas de restricción doble de NcoI-PvuII, NcoI-DraI, y digestión sencilla con BgLI. La figura 26 y 27 se muestra el gel de electroforesis de agarosa que presenta los patrones de restricción.

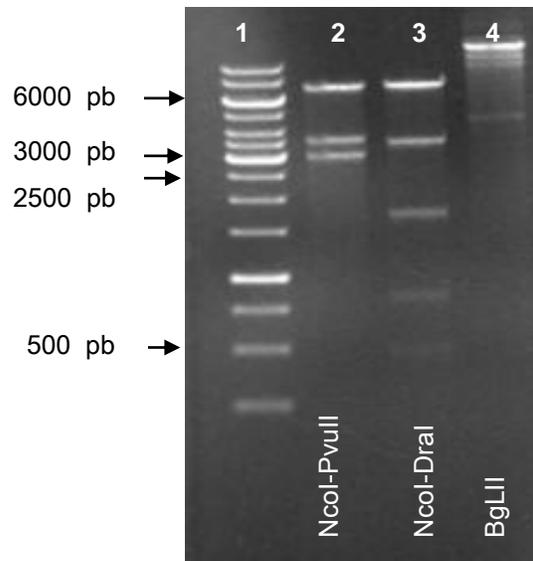


Figura 26. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPosacA (+).

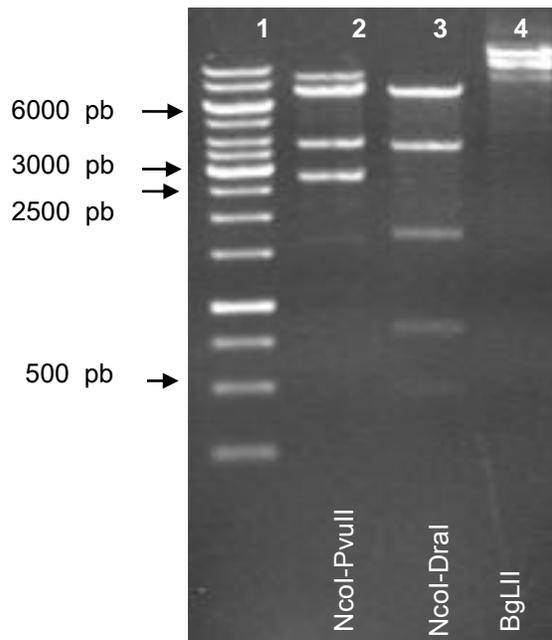


Figura 27. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. En los carriles 2, 3 y 4 las digestiones de pPosacA (-).

Tanto para los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de replicación autónoma de aconitasa la digestión de los plásmidos con la enzima BgLI presenta un corte único ubicado en el casete clonado localizado en el marco de lectura del gen *sacA* generando una banda de 13299 pb tanto en el caso de los casetes de sobreexpresión y silenciamiento. La digestión doble de NcoI-PvuII generando tres fragmentos de 7610, 3315 y 2810 pb ubicando los cortes el casete clonado en el plásmido pOJ446. La doble digestión NcoI-DraI genera fragmentos de 510, 825, 1575, 3409, 7610 pb generando cortes en gen *sacA* correspondiente al casetes clonado en el plásmido pOJ466 y cortes ubicados en el gen de resistencia a apramicina localizado en el plásmido pOJ466.

A partir de este momento ya se cuenta con los vectores plasmídico con los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de replicación autónoma e integrativo de aconitasa para ser utilizados en *S. coelicolor* M510.

5.3 Confirmación de la conjugación de *Streptomyces coelicolor* M510 utilizando a *E. coli* ET12567/pUZ8002.

La generación de las cepas conjugantes de *S.coelicolor* M510 consiste en traspasar por conjugación *E.coli* - *Streptomyces* los vectores plasmídico de sobreexpresión y silenciamiento de replicación autónoma e integrativo de los genes *citA* y *sacA*, de acuerdo a materiales y métodos.

La comprobación de las clonas conjugantes de para cada uno de los vectores plasmidicos se realizo por PCR. Los oligonucleótidos utilizados son los que se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Pares de oligos utilizados para la comprobación de las cepas conjugantes.

Oligonucleotidos	Secuencias
citAF1	5' AAGGATCCATGAGCGACAACCTCTGTAGT 3'
citAR1	5' AAGGATCCTCAGCGCTCCTCGACGGGGA 3'
acoF1	5' AAGGATCCGTGTCGGCGAACAGCTTCGA 3'

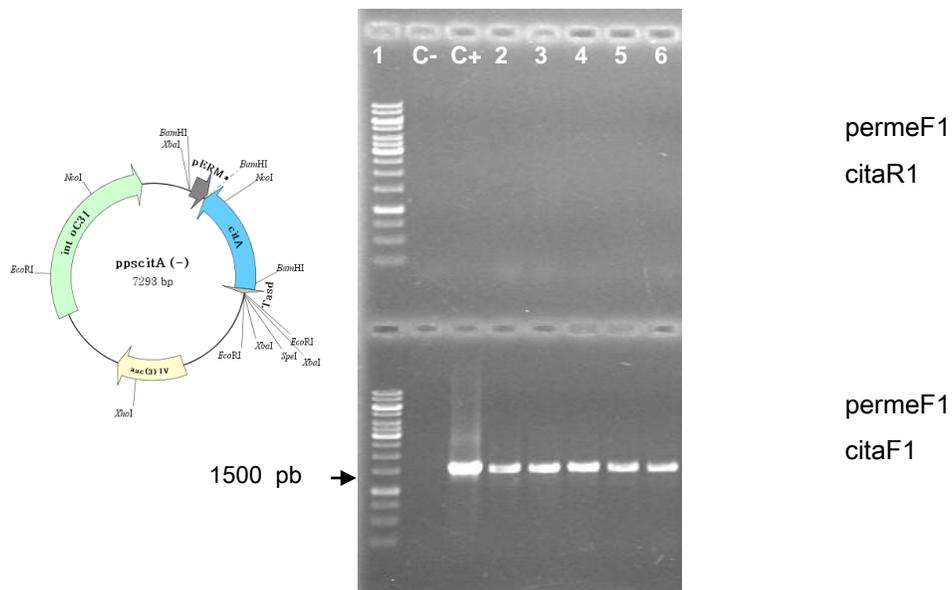


Figura 29. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 6 los productos de PCR de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* con el vector plasmídico integrativo con el casete de silenciamiento.

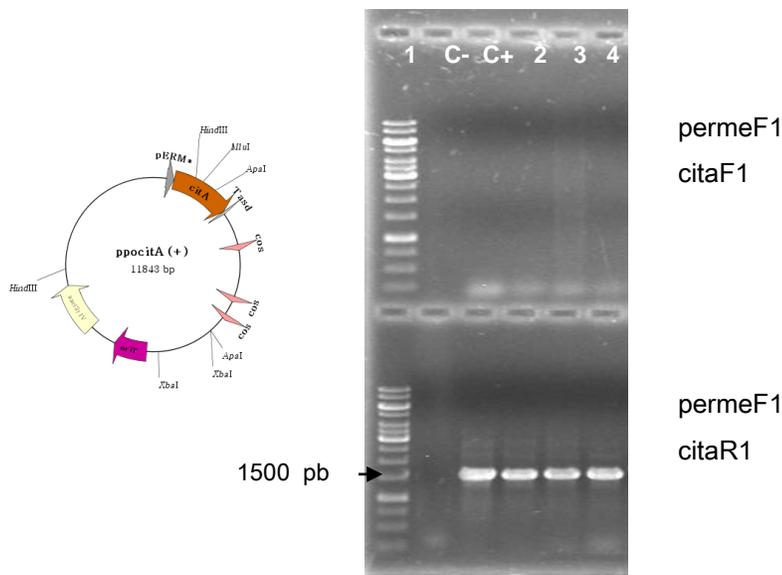


Figura 30. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 4 los productos de PCR de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* con el vector plasmídico de replicación autónoma con el casete de sobreexpresión.

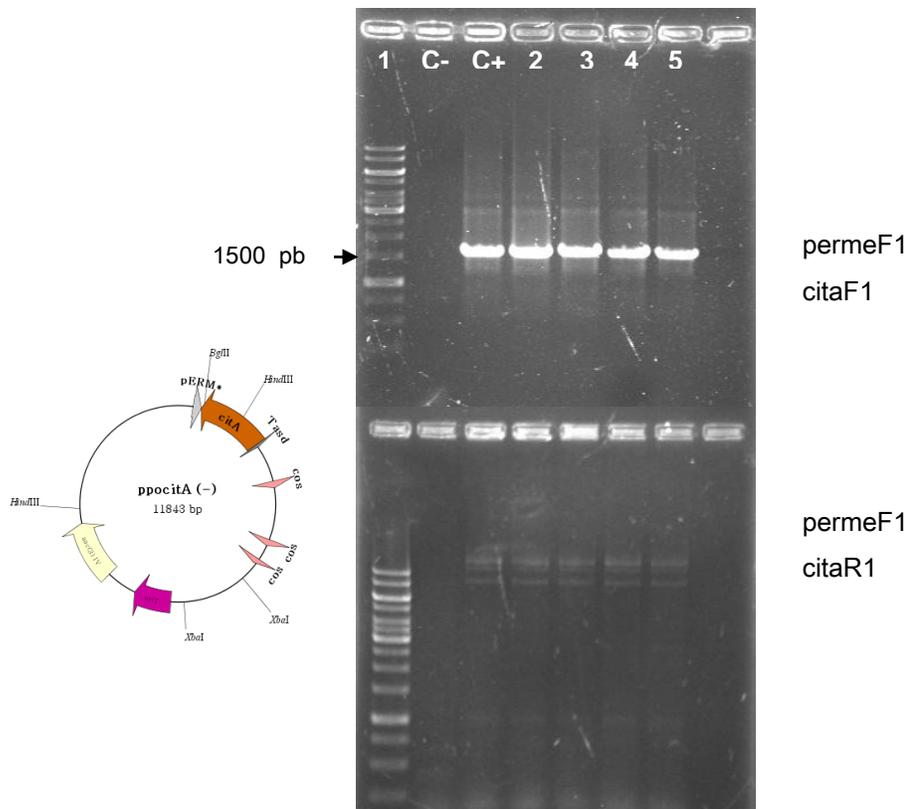


Figura 31. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 5 los productos de PCR de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* con el vector plasmídico de replicación autónoma con el casete de silenciamiento.

En las figura 32 a 35 se muestra los geles de electroforesis para las conjugantes del los casetes de sobreexpresión y silenciamiento de replicación autónoma e integrativo del gen aconitasa.

Las clonas conjugantes de aconitasa positivas para los casetes de sobreexpresión corresponden a los marcos de lectura en dirección al promotor *PermeE** donde los oligos de *permeF1-acoR1* amplifican una banda de 3000 pb; y el casetes de silenciamiento donde el marco de lectura está localizado en dirección opuesta al promotor *PermeE** la combinación de oligos de *permeF1-acoF1* amplifican una banda de 3000 pb que corresponde al tamaño del casete.

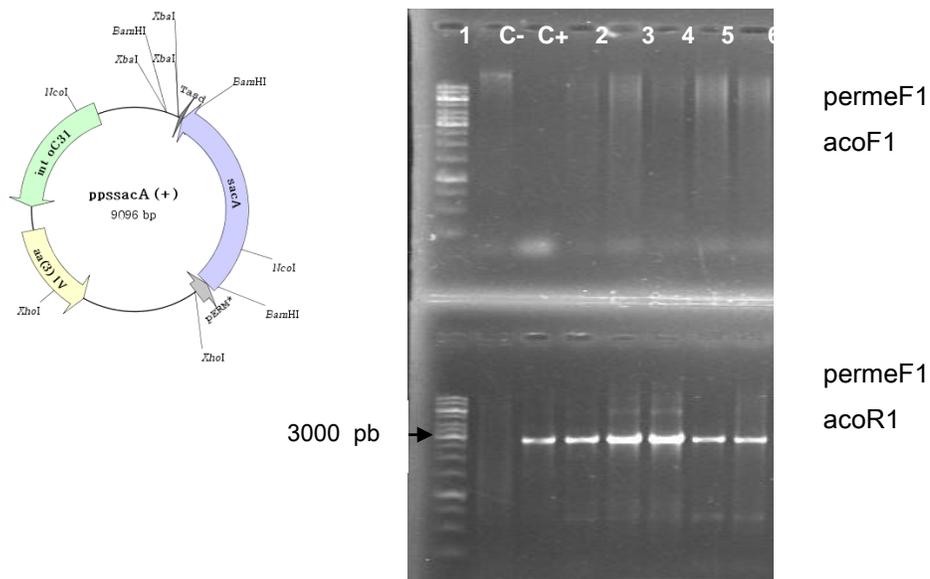


Figura 32. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 6 los productos de PCR de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* con el vector plasmídico integrativo con el casete de sobreexpresión.

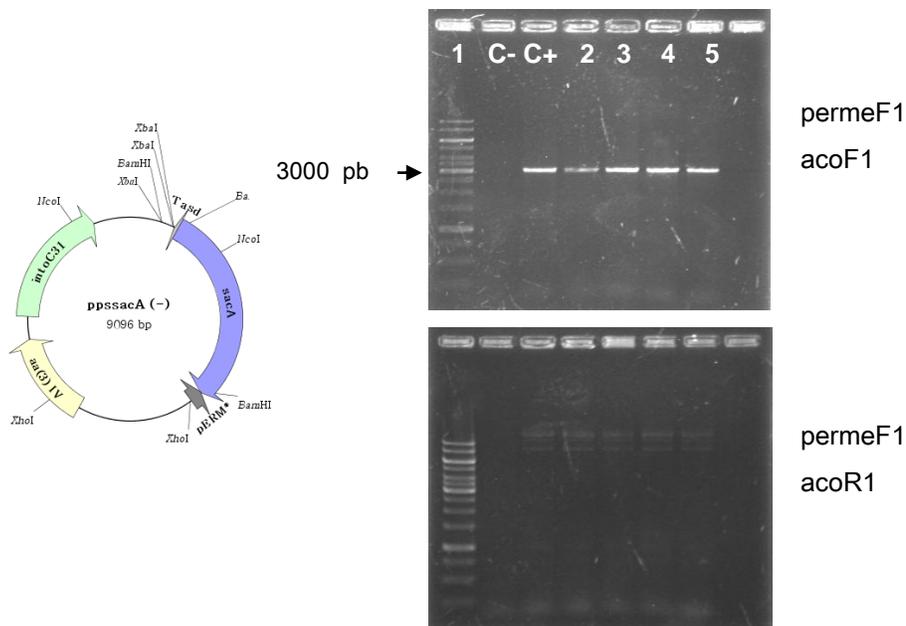


Figura 33. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 es el marcador de peso molecular GenRule 1Kb DNA Ladder. El control (-) corresponde a la cepa parental M510. El control (+) corresponde al ADN plasmídico. En los carriles 2 al 5 los productos de PCR de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* con el vector plasmídico integrativo con el casete de silenciamiento.

Con la identificación de las clonas conjugantes de *S.coelicolor* M510 que contienen los casetes de sobreexpresión y silenciamiento para los genes de citrato sintasa y aconitasa se procedió a evaluar la producción de actinorrodina en medio SMM.

5.4 Evaluación del silenciamiento y sobreexpresión del gen citrato sintasa sobre la producción de actinorrodina en cultivo líquido.

Para evaluar el efecto de citrato sintasa en la producción de actinorrodina se realizó una fermentación en medio SMM (ver materiales y métodos), utilizando la cepa parental M510, la cepa sobreexpresada (RA (+) cita) y silenciada (RA (-) cita) de replicación autónoma. Cada tratamiento se utilizó por duplicado y las medidas realizadas fueron de pH, biomasa y actinorrodina, que se grafican a continuación.

En la figura 36 se grafica la producción de actinorrodina de la cepa parental M510, la cepa RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.

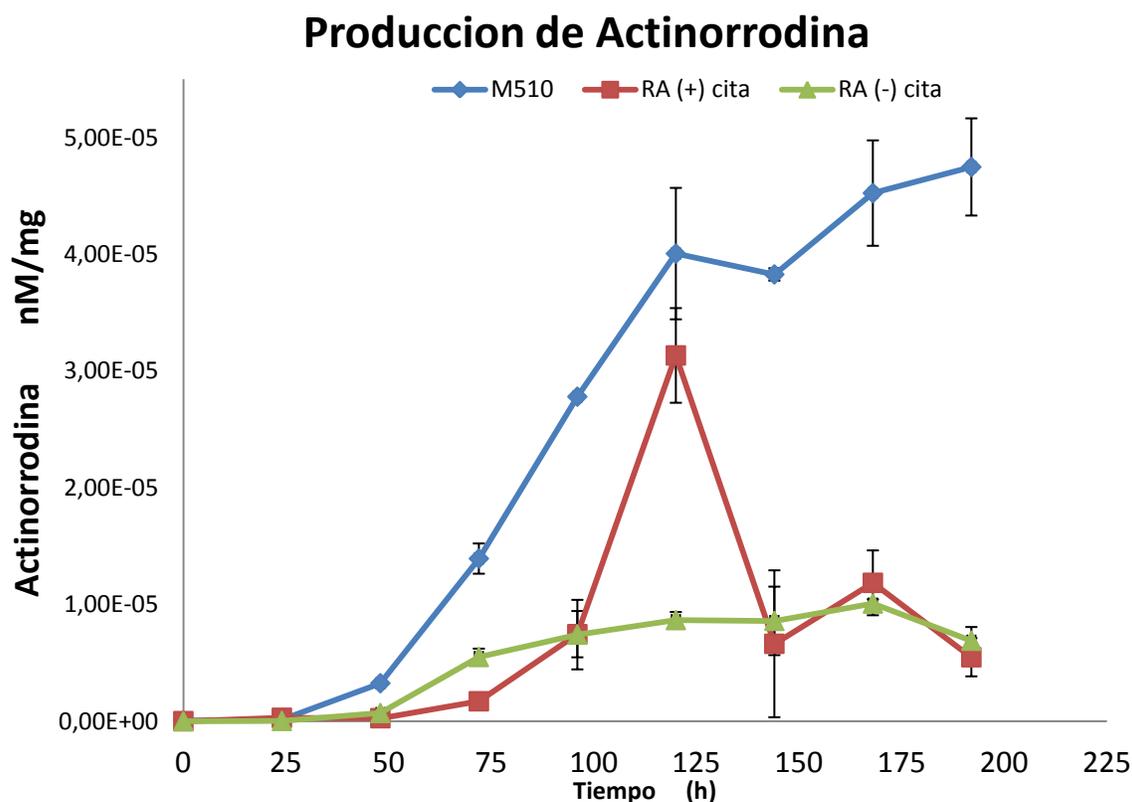


Figura 36. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.

De igual forma se evaluó la variación de pH y cantidad de biomasa producida durante la cinética de producción de las cepas conjugantes de replicación autónoma y parental (Fig. 37 y Fig.38).

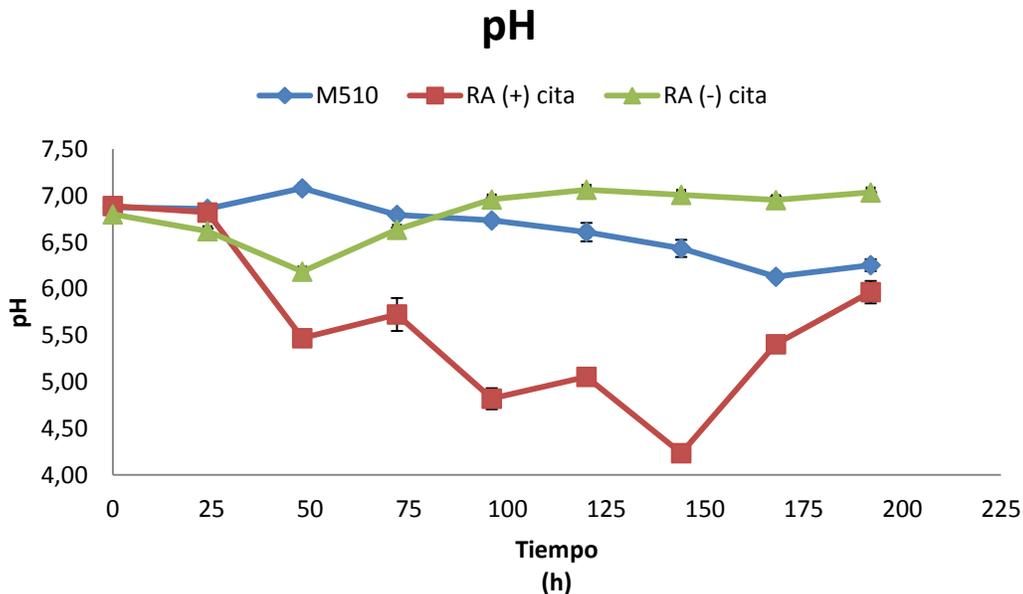


Figura 37. Grafico de variación de pH de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.

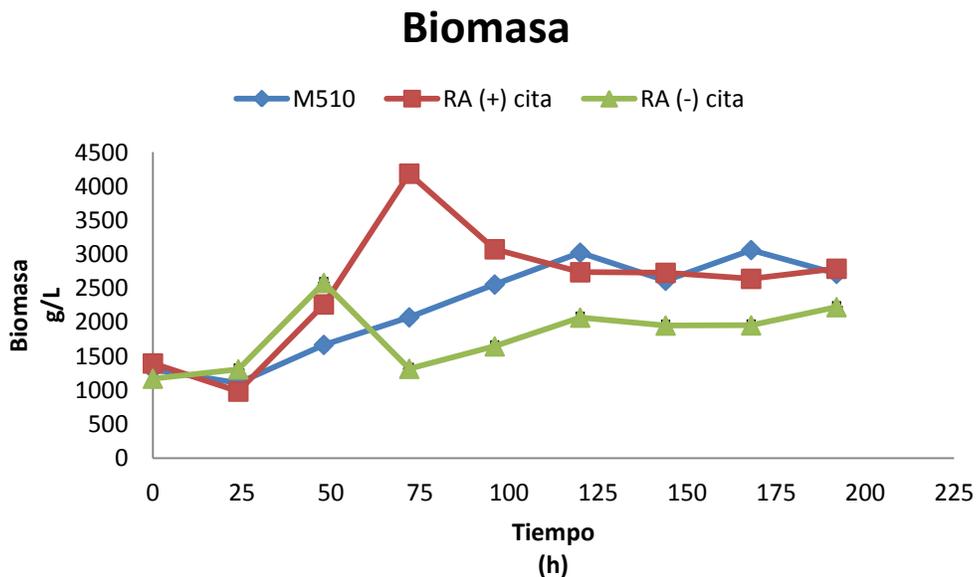


Figura 38. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, RA (+) cita y RA (-) cita en medio SMM.

De igual forma se evaluó el efecto de citrato sintasa en la producción de actinorrodina en medio SMM (ver materiales y métodos), utilizando la cepa parental M510, la cepa sobreexpresada (I (+) cita) y silenciada (I (-) cita) de carácter integrativo. Cada tratamiento se utilizó por duplicado y las medidas realizadas fueron de pH, biomasa y actinorrodina, que se grafican a continuación.

En la figura 39 se grafica la producción de actinorrodina de la cepa parental M510, la cepa I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.

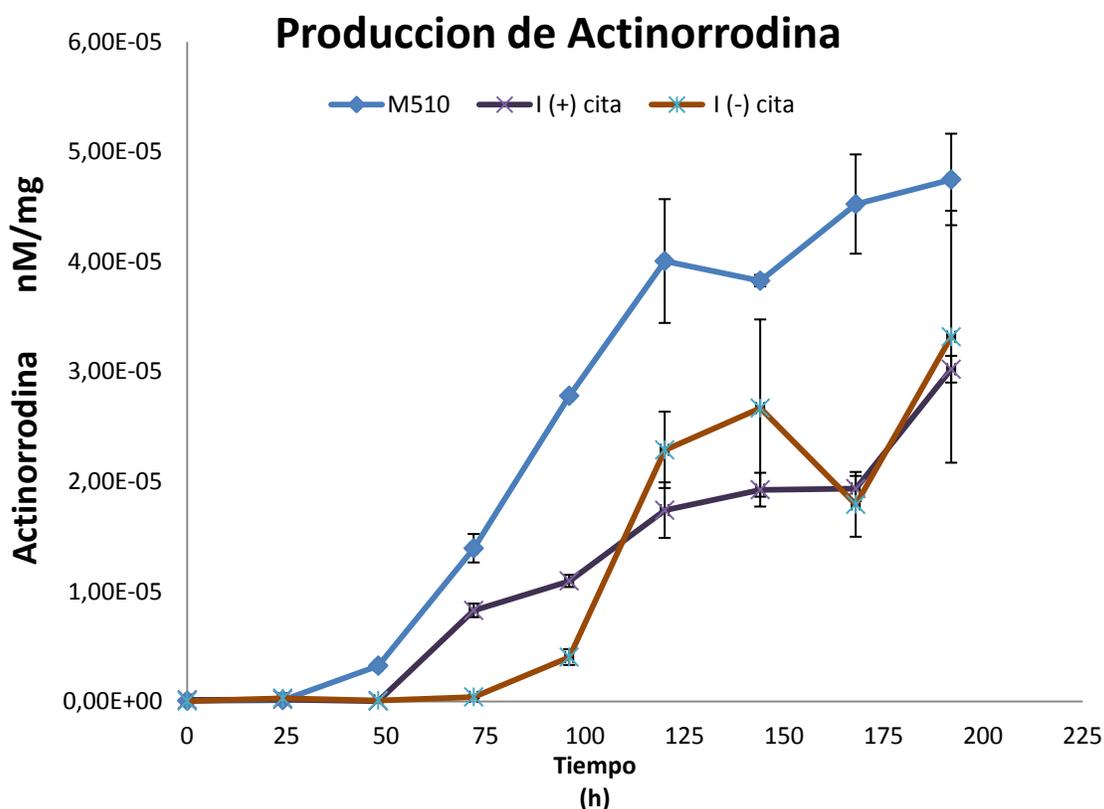


Figura 39. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.

De igual forma se evaluó la variación de pH y cantidad de biomasa producida durante la cinética de producción de las cepas conjugantes de carácter integrativo y parental (Fig. 40 y Fig. 41)

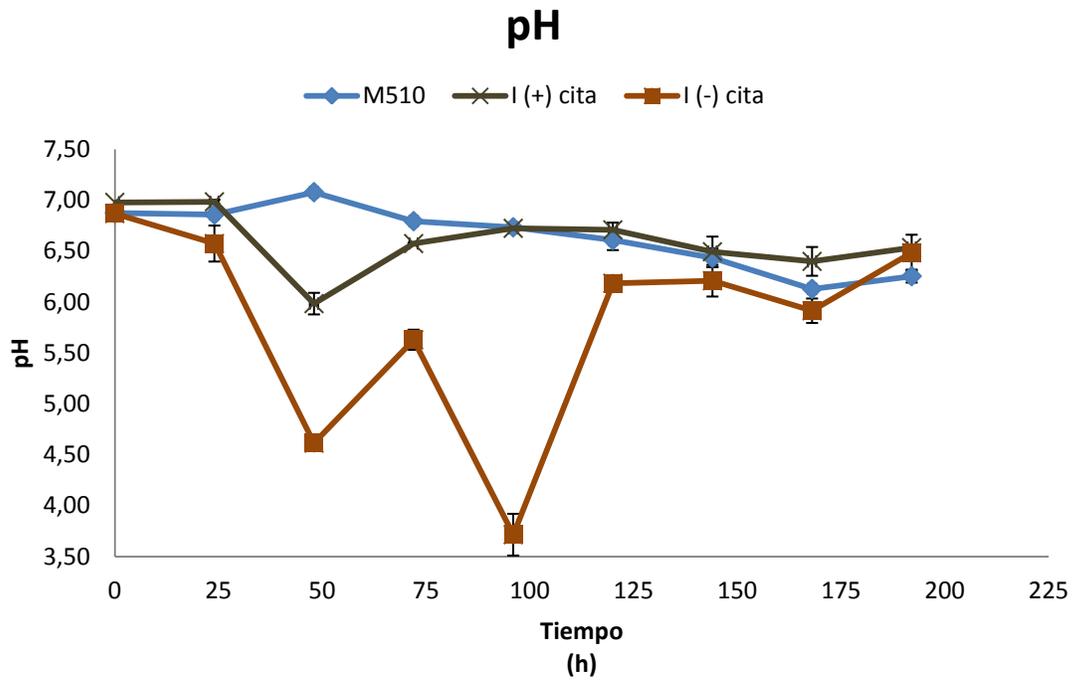


Figura 40. Grafico de variación de pH de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.

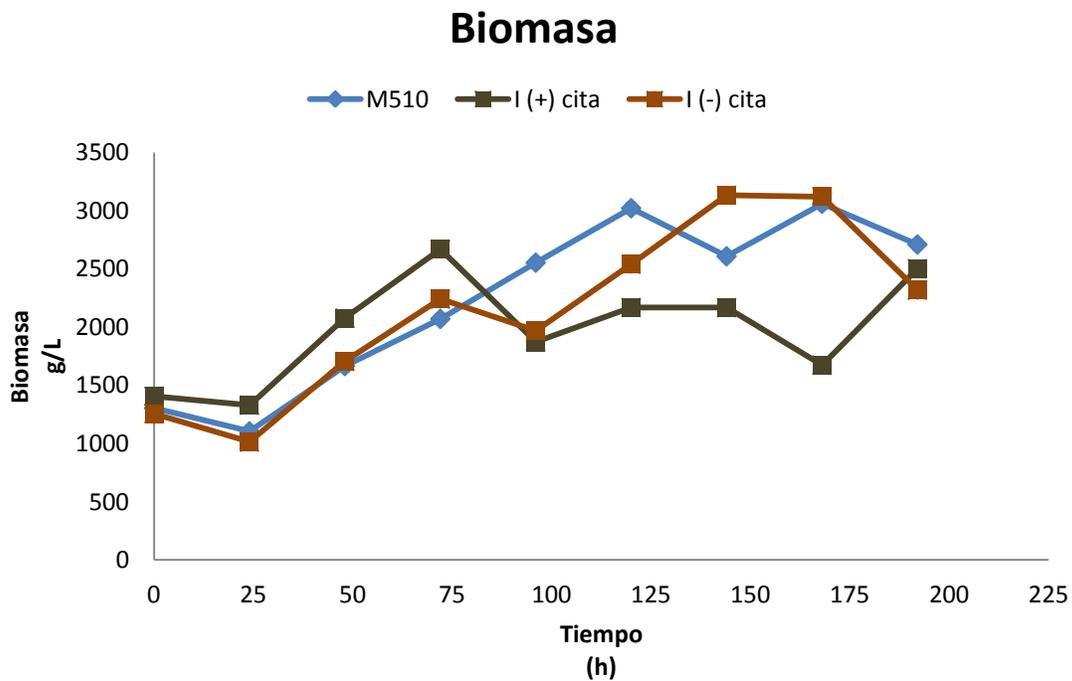


Figura 41. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, I (+) cita y I (-) cita en medio SMM.

5.5 Evaluación del silenciamiento y sobreexpresión del gen aconitasa sobre la producción de actinorrodina en cultivo líquido.

Para evaluar el efecto de aconitasa en la producción de actinorrodina se realizó una fermentación en medio SMM (ver materiales y métodos), utilizando la cepa parental M510, la cepa sobreexpresada (RA (+) saca) y silenciada (RA (-) saca) de replicación autónoma. Cada tratamiento se utilizó por duplicado y las medidas realizadas fueron de pH, biomasa y actinorrodina, que se grafican a continuación. En la figura 42 se grafica la producción de actinorrodina de la cepa parental M510, la cepa RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.

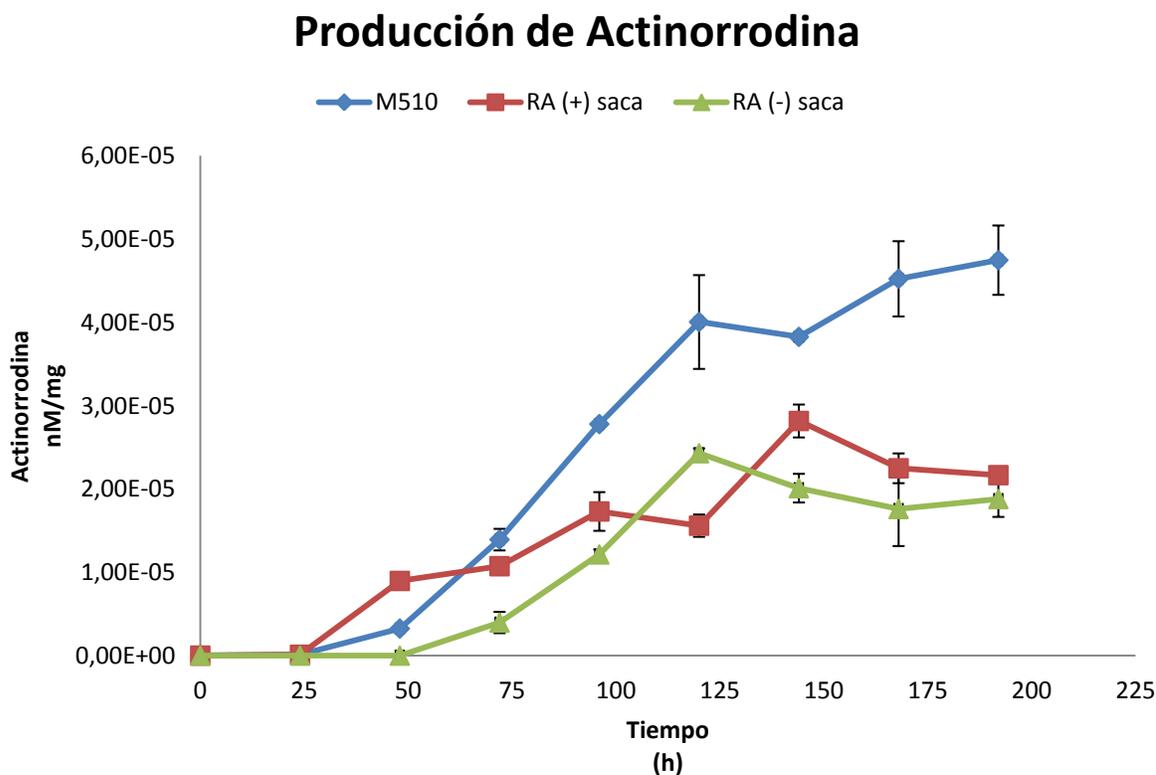


Figura 42. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.

De igual forma se evaluó la variación de pH y cantidad de biomasa producida durante la cinética de producción de las cepas conjugantes de replicación autónoma y parental (Fig. 43 y Fig. 44).

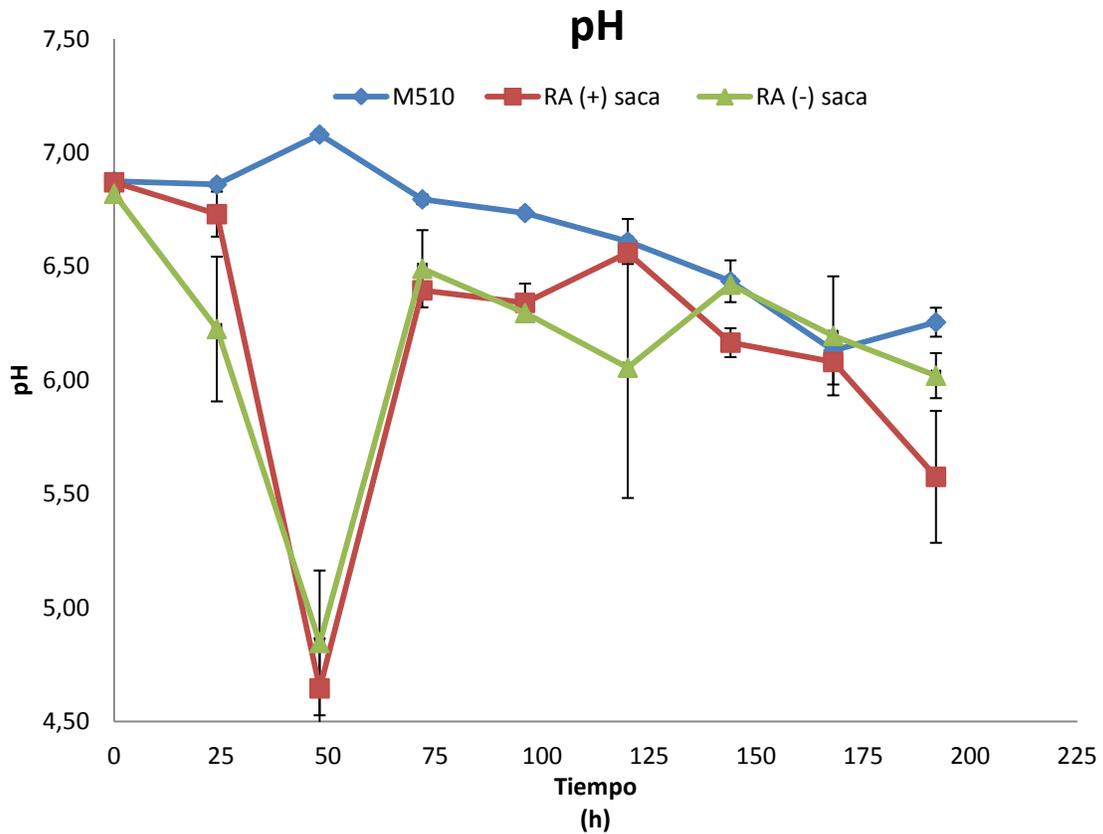


Figura 43. Grafico de variación de pH de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.

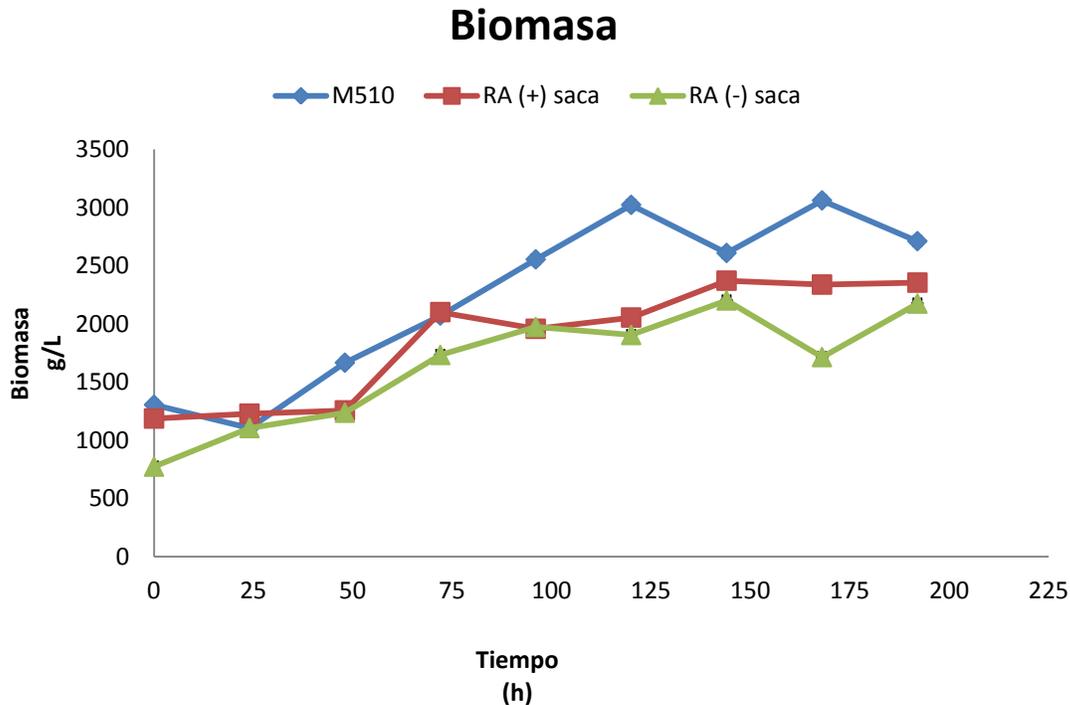


Figura 44. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, RA (+) saca y RA (-) saca en medio SMM.

De igual forma se evaluó el efecto de aconitasa en la producción de actinorrodina en medio SMM (ver materiales y métodos), utilizando la cepa parental M510, la cepa sobreexpresada (I (+) cita) y silenciada (I (-) cita) de carácter integrativo. Cada tratamiento se utilizó por duplicado y las medidas realizadas fueron de pH, biomasa y actinorrodina, que se grafican a continuación.

En la figura 45 se grafica la producción de actinorrodina de la cepa parental M510, la cepa I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.

Producción de Actinorrodina

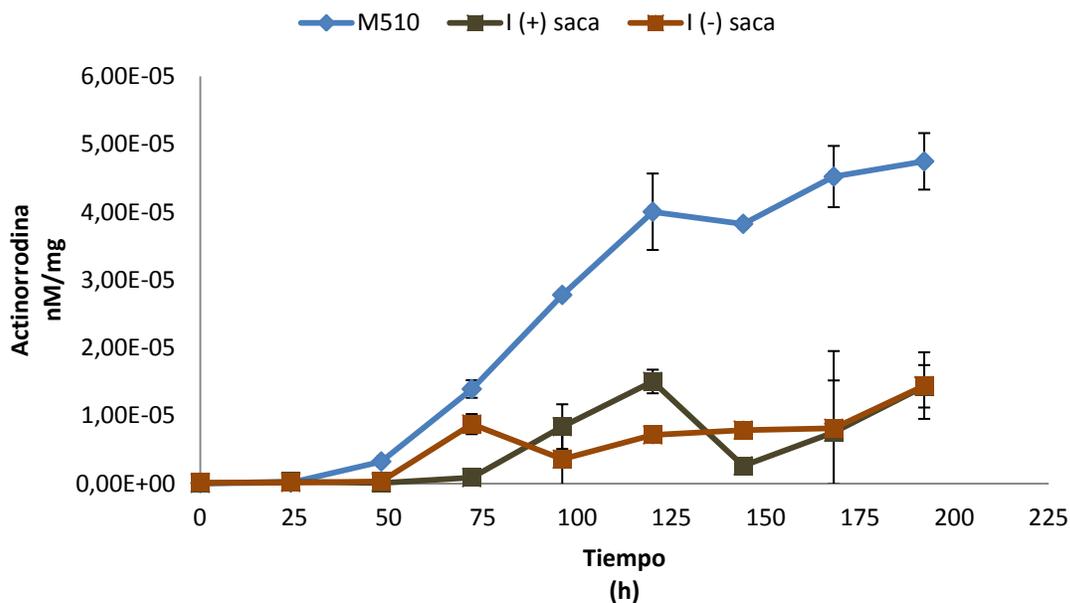


Figura 45. Grafico de la producción de actinorrodina de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.

De igual forma se evaluó la variación de pH y cantidad de biomasa producida durante la cinética de producción de las cepas conjugantes de carácter integrativo y parental (Fig. 46 y Fig. 47).

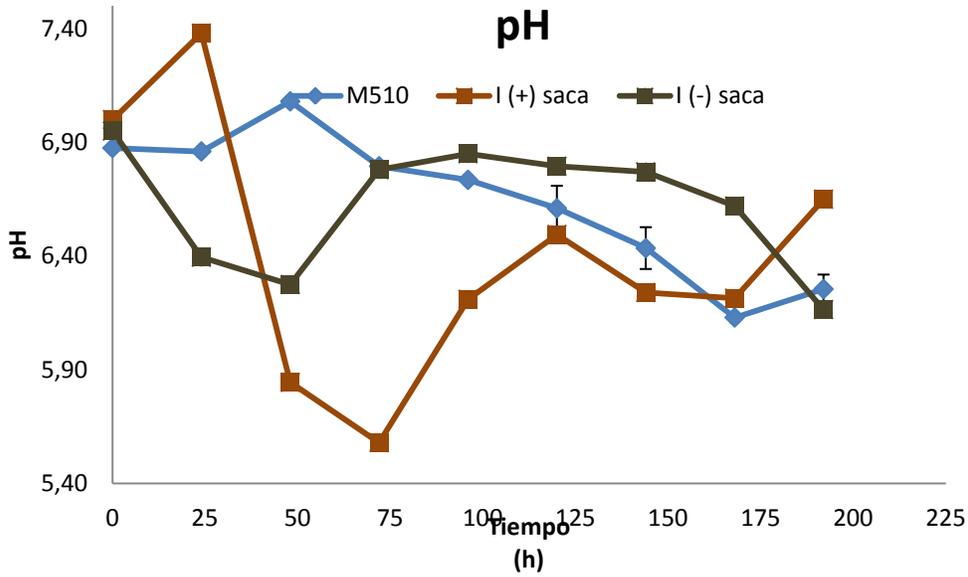


Figura 46. Grafico de variación de pH de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.

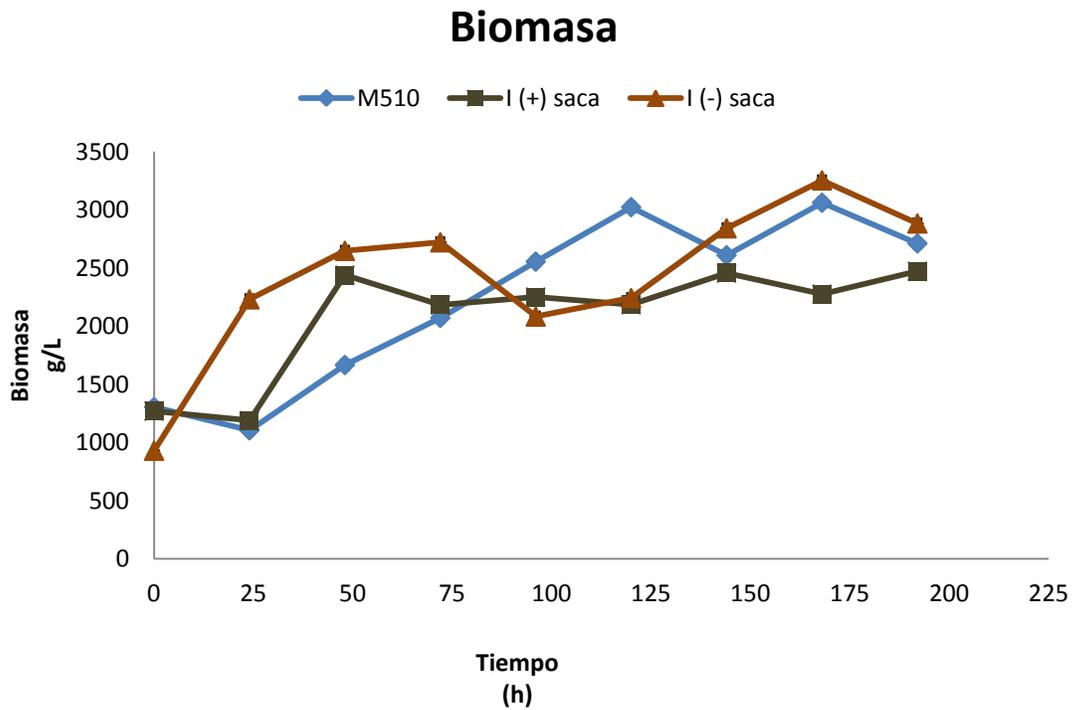


Figura 47. Grafico de variación de biomasa de la cepa M510, I (+) saca y I (-) saca en medio SMM.

DISCUSION DE RESULTADOS

Una de las fuentes de metabolitos secundarios para la industria farmacéutica proviene en su gran mayoría de actinomicetos. Por esta razón, los estudios se han enfocado en investigar el metabolismo y genética de la producción y regulación del metabolismo secundario, con el objetivo de ver incrementado la producción de éstos (Olano C, *et al.*, 2008). En este estudio se evalúa el efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor* M510, dos de las primeras enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílico, sobre la producción de actinorrodina.

Citrato sintasa es la primera enzima del ciclo de ácidos tricarboxílicos encargada de la condensación de acetyl-CoA y oxalacetato. Esta reacción inicial del ciclo es el punto de entrada de los átomos de carbono, como el acetyl CoA. Para *S. coelicolor*, acetyl-CoA es el principal precursor para producción de actinorrodina (ACT) (D. Hranueli, *et. al.*, 2010). En resultados obtenidos es el trabajo con los casetes de replicación autónoma la producción de ACT (Fig. 36) se observa que la cepa sobreexpresada "RA (+) cita" es menor la producción que la cepa M510, fenómeno observado también en la cepa "RA (-) cita" que contiene el casete de silenciamiento. Esta disminución está influenciada por los cambios de pH presentados durante la fermentación (Fig. 37) donde podemos observar que la cepa "RA (+) cita" a partir de las 48 hrs el pH desciende a 5.47, presentando el menor valor a las 144 hrs con 4.24; donde la cepa M510 mantiene su rango de pH 6.86 a 6.13. La cepa silenciada "RA (-) cita" a las 48 hrs presenta un pH 6.19 donde a partir de este momento los valores de pH están en un rango de 7.04 a 6.96 El producción de biomasa de la cepa sobreexpresada "RA (+) cita" presenta una tendencia de mayor crecimiento hasta las 72 hrs, donde el numero de transcritos es mayor que la cepa M510 por ser el casete de replicación autónoma; pero a partir de las 96 hasta las 192 hrs donde el pH empieza a variar en un rango de 4.24 a 5.97 el crecimiento celular se ve afectado presentando una constante. Caso contrario para la cepa silenciada "RA (-) cita" donde el crecimiento celular desciende a partir de las 24 hrs a causa de un resultado más marcado del efecto de los transcritos en sentido 3'-5', donde el crecimiento celular es inferior a la cepa M510 hasta las 192 hrs.

Para el caso de los casetes de carácter integrativo para cepas sobreexpresadas y silenciada de citrato sintasa el comportamiento de producción de ACT en ambos caso es menor que la cepa M510. La cepa sobreexpresada "I (+) cita" presenta un perfil de producción semejante a la cepa M510 aunque no se obtiene mayor producción de ACT (Fig. 39), donde a las 24 hrs presenta un descenso de pH a 5.99 (Fig. 40), sin afectar la cantidad de biomasa a esté tiempo (Fig. 41). Después de este descenso de pH la fermentación se mantiene en un rango de 6.40 a 6.71 hasta las 192 hrs, donde el crecimiento celular presenta un ascenso hasta las 72 hrs, y al tiempo 108 hrs presenta un descenso en el crecimiento, aunque el pH y producción de ACT se mantiene constante. En el caso de la cepa silenciada "I (-) cita" presenta variaciones en valores de pH de 4.62 y 3.72 a las 48 y 96 hrs respectivamente (Fig. 40), donde la cantidad de biomasa producida presenta un descenso sólo a las 96 hrs (Fig. 41). Aun que la producción de ACT es menor que la cepa M510 (Fig. 39) presenta una producción mayor que la cepa "I (+) cita" a las 120 hrs, aun que a las 168 hrs la producción de ACT desciende a causa de presentar un pH de 5.92

La segunda enzima del ciclo del los ácidos tricarbóxicos es aconitasa que es la encargada de cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a isocitrato a través de cis-aconitato. La aconitasa tiene un centro activo $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, que puede convertirse a una forma inactiva $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^+$. El centro hierro-azufre de la aconitasa reacciona directamente con el sustrato de la enzima. En resultados obtenidos en el trabajo con los casetes de replicación autónoma en las cepas silenciada y sobreexpresada de aconitasa se observaron cambios en la producción de actinorrodina (ACT) en comparación con la cepa M510. La cepa "RA (+) saca" que contiene el casete de sobreexpresión de aconitasa a las 48 hrs presento un incremento en la producción de ACT en comparación de la cepa M510 (Fig. 42), pero en el mismo tiempo el pH descendió a 4.6; provocando un descenso en la producción de ACT durante el resto del tiempo de la fermentación hasta las 192 hrs; obteniendo una producción de ACT menor que la cepa M510. El descenso de pH a 4.6 afecto el crecimiento celular (Fig. 44) colocándolo por debajo de la cepa M510. Las variaciones de pH después 48 hrs (Fig. 43), se encontraron en un intervalo de 5.58 a 6.56, donde

la producción de biomasa se mantuvo constante, pero por debajo de los valores obtenidos por la cepa M510. La cepa “RA (-) saca” que contiene el casete de silenciamiento de aconitasa de replicación autónoma presentó menor producción de ACT y biomasa que la cepa M510 y “RA (+) saca” (Fig. 42 y Fig. 44), y el pH de esta cepa a las 48 hrs es de 4.85 siendo semejante a la cepa “RA (+) saca” pero si menor a la cepa M510 (Fig. 43).

La cepa “RA (+) saca” que contiene los casetes de carácter integrativo de sobreexpresión de aconitasa la producción de ACT es menor que la cepa M510 (Fig. 45). Por el caso del pH durante las 48 y 72 hrs se presenta un descenso hasta 5.58, pero en el transcurso de la fermentación hasta 192 hrs el pH oscila en un rango de 6.21-6.65 donde el crecimiento celular no presenta cambios (Fig. 46 y Fig. 47). La cepa silenciada “I (-) saca” presenta un descenso de pH hasta 6.28 en las primeras 48 hrs (Fig. 46), donde la biomasa no presenta cambios siendo hasta en mayor proporción que la cepa “I (+) saca” y M510 (Fig. 47), pero la producción no se ve favorecida presentando su rango en menor que la cepa M510 (Fig. 39).

REFERENCIAS

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58,1-26.

Cane DE, Walsh CT, Khosla C (1998). Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science* 282: 63–68.

D. Hranueli, N. Peric, B. Borovicka, S. Bogdan, J. Cullum, P. G. Waterman, I. S. Hunter, (2001). Molecular biology of polyketide biosynthesis; *Food Technology and Biotechnolog.* 39 (3): 203-213.

Butler, M. J., P. Bruheim, S. Jovetic, F. Marinelli, P. W. Postma, and M. J. Bibb. 2002. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4731-4739

Challis, G.L. and D.A. Hopwood. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 2:14555-14561

Craig, J. E., M. J. Ford, D. C. Blaydon, and A. L. Sonenshein (1997). A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate- dependent gene expression. *J. Bacteriol.* 179:7351–7359.

DS Holmes and M Quigley, (1981), A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114(1): 193–197.

Flett F, Mersinas V. y Smith C. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters.* 155:223-229

Fortnagel, P., and E. Freese (1968). Analysis of sporulation mutants. II. Mutants blocked in the citric acid cycle. *J. Bacteriol.* 95:1431-1438.

Granozzi, C., R. Billetta, R. Passantino, M. Sollazzo, and A. M. Puglia (1990). A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 136:713-716.

Gruer, J. M., and J. R. Guest (1994). Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* 140:2531-2541.

Henderson, G., P. Krygsman, et al. (1987). "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*." *J. Bacteriol.* 169(8): 3778-3784.

Holmes RK, Jobling MG (1996). Genetics: Conjugation. in: *Baron's Medical Microbiology* (Baron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch.

Hopwood, D. A., and D. H. Sherman (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24:37-66.

Ho, T.F., C.J. Ma, C.H. Lu, Y.T. Tsai, Y.H. Wei, J.S. Chang, J.K. Lai, P.J. Cheuh, C.T. Yeh, P.C. Tang, J. Tsai Chang, J.L. Ko, F.S. Liu, H.E. Yen and C.C. Chang. (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 225:318-328.

Hodgson, D.A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42:238-247.

Hsiao, N.H. and R. Kirby, (2008). Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and

Kitasatospora aureofaciens using a Streptomyces coelicolor microarray system. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93:1-25.

Ireton, K., S. Jin, A. D. Grossman, and A. L. Sonenshein (1995). Krebs cycle function is required for activation of the Spo0A transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2845–2849.

Irina Borodina, Preben Krabben, and Jens Nielsen (2005). Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res.*; 15(6): 820–829.

Irina Borodina, Jeroen Siebring, Jie Zhang, Colin P. Smith, Geertje van Keulen, Lubbert Dijkhuizen, and Jens Nielsen, Antibiotic Overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Mediated by Phosphofructokinase Deletion *J. Biol. Chem.* 2008 283: 25186-25199. First Published on July 7, 2008, doi:10.1074/jbc.M803105200

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

J N Mol, A R van der Krol, A J van Tunen, R van Blokland, P de Lange, and A R Stuitje (1990). Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.* 268 (2): 427-430

Jaon Y H Kim and Hyung Joon Cha (2003). Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: improved foreign protein production. *Biotechnol Bioeng.* 83(7): 841–853.

Ji, Y., Woodnutt, G., Rosenberg, M., Burnham, M.K. (2002). Identification of essential genes in *Staphylococcus aureus* using inducible antisense RNA. *Methods Enzymol.* 358, 123–128.

Jiménez, A., M. Zalacaín, et al. (1987). "Clonación y análisis de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos." *Nuevas tendencias. Ingeniería genética* (Renard, J. y Vicente, M.,ed.): 496-502.

Kauffman, K.J., Prakash, P., Edwards, J.S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 491–496.

Khannapho C., Zhao H., Bonde B.K., Kierzek A.M., Avignone-Rossa C.A., Bushell M.E. (2008). Selection of objective function in genome scale flux balance analysis for process feed development in antibiotic production. *Metabolic Engineering.* 10 (5): 227-233.

Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood (2000). *Practical Streptomyces genetics.* John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

Lakey, J.H., E.J. Lea, B.A. Rudd, H.M. Wright and D.A. Hopwood. 1983. A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol.* 129:3565-73.

Long, C.M., M.J. Virolle, et al. (1987). "Alpha-amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases." *J. Bacteriol.* 169(12): 5745-5754.

Li, R., and C. A. Townsend. 2006. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab. Eng.* 8:240-252

Mark T. McCammon, Charles B. Epstein, Beata Przybyla-Zawislak, Lee McAlister-Henn, and Ronald A. Butow (2003). Global Transcription Analysis of Krebs Tricarboxylic Acid Cycle Mutants Reveals an Alternating Pattern of Gene Expression and Effects on Hypoxic and Oxidative Genes. *Mol Biol Cell.* 14(3): 958–972.

Morosoli R., J.L. Bertrand, et al. (1986). "Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*." *J. Biochem.* 239: 587-592.

Olano C, Lombó F, Méndez C, José AS. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab. Eng.*; 10:281–292.

Parish, T., Stoker, N.G. (1997). Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 151–157.

Redenbahr, M. Kieser, H., Cullum, J., Kinashi y Hopwood. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb coelicolor A3 (2) chromosome. *Molecular microbiology.* 21 (1): 76-96.

Rodríguez E., Banchio C., Diacovich L., Bibb M. J., and Gramajo H. (2001). Role of an Essential Acyl Coenzyme A Carboxylase in the Primary and Secondary Metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl Environ Microbiol.* 67(9):4166–4176.

Ryu, Y.G., Butler, M.J., Chater, K.F., Lee, K.J. (2006). Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7132–7139.

Salas, J.A., Méndez, C. (2005). Biosynthesis pathways for deoxysugars in antibiotic-producing actinomycetes: isolation, characterization and generation of novel glycosylated derivatives. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 77–85.

Süsstrunk, U., J. Pidoux, S. Taubert, A. Ullmann, and C. J. Thompson. (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis, and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 30: 33–46.

Tang Z.; Xio C.; Zhuang Y.; Chu J.; Zhang S.; Herron R.P.; Hunter S.I.; Guo H. 2011. Improved oxytetracycline production in *Streptomyces ramous* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. *Enzyme and Microbial Technology*. Article in press.

Thompson, C.J., D. Fink and L.D. Nguyen. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol.* 3:REVIEWS1020.

Thomas, M.G., Burkart, M.D., and Walsh, C.T. (2002). Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chem. Biol.* 9: 171-184.

Toh,H., H. Kondo, and T. Tanabe (1993). Molecular evolution of biotin-dependent carboxylases. *Eur. J. Biochem.* 215:687–696.

Viollier, P. H., Nguyen K. T, W. Minas, M. Folcher, G. E. Dale, and C. J. Thompson (2001). Roles of Aconitase in Growth, Metabolism, and Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 183:3193–3203.

Viollier, P. H., W. Minas, G. E. Dale, M. Folcher, and C. J. Thompson (2001). Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological development and antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* 183:3184–3192.

Williamson, N.R., P.C. Fineran, F.J. Leeper and G.P. Salmond (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol.* 4:887-99.

Woese, D. (1987). "Bacterial evolution." *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

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.