

POSIBLE PROTEÍNA DE TRANSPORTE DE AVERMECTINA EN *S. avermitilis*

Victoria Sicairos, Javier Barrios y Armando Mejía, UAM-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa 09340, México, D.F., 58044712, ama@xanum.com.mx

Palabras clave: proteínas de transporte, *S. avermitilis*, avermectina.

Introducción. El mecanismo de resistencia a antibióticos más frecuentemente encontrado en actinomicetos productores de antibióticos es el que está mediado por proteínas integrales de membrana⁽¹⁾. Este mecanismo, además, funciona como un sistema de excreción del antibiótico producido⁽²⁾. Se han identificado en muchos actinomicetos proteínas de membrana que funcionan como una bomba exportadora de antibiótico⁽³⁾. Este sistema de transporte abre la posibilidad de ser usado como blanco dentro de un programa de mejoramiento genético, ya que consideramos que este transporte podría ser determinante en la concentración intracelular del metabolito, lo cual a su vez podría retroregular la biosíntesis. Este podría ser el caso de *S. avermitilis* el cual produce avermectinas, metabolito utilizado como un excelente antiparasítico en la ganadería, bioinsecticida en la agricultura⁽⁴⁾ y además en seres humanos como tratamiento de enfermedades causadas por parásitos. Por otro lado, el genoma de *S. avermitilis* muestra varias secuencias con similitud con proteínas de transporte, tal es el caso del gen SAV4194.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la interrupción del gen SAV4194 sobre la exportación de avermectina u oligomicina en *Streptomyces avermitilis*.

Metodología. Se amplificó el gen SAV4194 mediante PCR. Se amplificaron y purificaron los plásmidos pME6 y pQM5062. Se digirió el plásmido pQM5062 para la extracción del transposon Tn5062. Se clonó el gen en el plásmido pME6. Se interrumpió el gen contenido en el plásmido pME6 con el transposon Tn5062. Se transformó mediante biobalística a *S. avermitilis* con el plásmido pME6 que contiene el gen interrumpido por el transposon. Se seleccionó la transformante con resistencia a la Apm. Se comprobó la mutación por PCR.

Resultados y discusión.

El producto de PCR se secuenció y mostró 99.8% de similitud con el gen reportado (fig 1). Se llevó a cabo la construcción de un vector para transformar a *S. avermitilis* el cual contiene el gen SAV4194 interrumpido por el transposón Tn5062 Apm^R (figura 2). Para la interrupción del gen, se eligió el uso del transposón debido a que en actinomicetos, la mutación obtenida es más estable. Se transformó *S. avermitilis* mediante la técnica de biobalística ya que algunos actinomicetos son muy difíciles de transformar por las técnicas

convencionales, especialmente los de interés industrial; por lo tanto, fue necesario adaptar la técnica para transformar actinomicetos (resultados no publicados). Se confirmó la identidad de las transformantes obtenidas mediante PCR, usando oligonucleótidos complementarios al gen y al transposón.

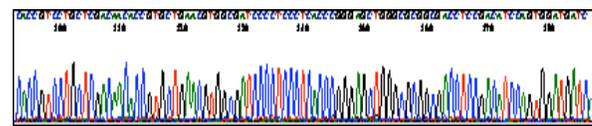


Figura 1. Secuenciación del gen sav4194

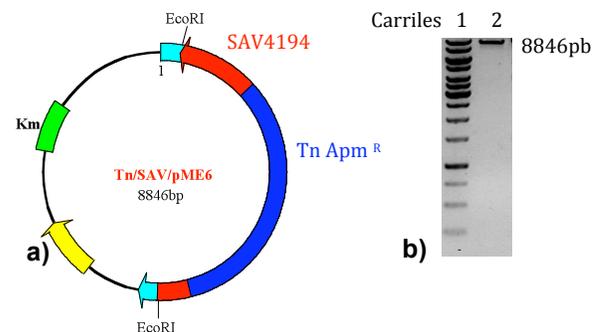


Figura2. a) mapa del vector con el que se transformó a *S. avermitilis*. b) en el carril 2 se observa el vector linealizado.

Conclusiones. Se interrumpió el gen SAV4194 de *S. avermitilis*, con el transposón Tn5062 y resistencia a apramicina. Con las transformantes obtenidas se está estudiando su función.

Agradecimientos. Unión Europea (Ref. II-0313-FA-FCD)

Bibliografía.

- Putman, M., Van Veen, H. y Konings, W. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4): 672-693.
- Absalón, A., Fernández, F., Olivares, P., González, J., Mejía, A. (2007). RiffP; a membrana protein involved in rifamycin export in *Amiclatopsis mediterranei*. *Biotechnol Lett.*
- Folcher M., Morris R., Dale G., Salah-Bey-Hocini K., Viollier P. y Thompson C. (2001). A transcriptional regulator of apristinamycin resistance gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 276 (2): 1479-1485.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Skaki Y., Hattori M. y Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotech.* 21(5): 526-31.