

### EFFECTO DEL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *rifP* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE RIFAMICINA EN *Amycolatopsis mediterranei*.

Angel E. Absalón<sup>1</sup>, Francisco J. Fernández-Perrino<sup>2</sup>, Diana V. Cortés-Espinosa<sup>1</sup> y Armando Mejía<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada – IPN. Carretera estatal santa Ines Tecuexcomac-Tepetitla km 1.5 Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala. Fax. +52 (248) 4870762 <sup>2</sup>Depto. de Biotecnología UAM-I aabsalon@ipn.mx

*Rifamicina, Amycolatopsis mediterranei, ARN antisentido.*

**Introducción.** Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas cuya importancia biotecnológica radica en su capacidad de producir un gran número de metabolitos secundarios. Un ejemplo de ellos es la rifamicina, producida por *A. mediterranei*, y utilizada para el tratamiento de tuberculosis y otras infecciones causadas por Micobacterias<sup>(1)</sup>. En el caso de los actinomicetos productores de antibacterianos, surge un problema al tener estos un efecto sobre el microorganismo que lo produce, pues puede presentarse un efecto tóxico debido a la actividad del antibiótico que sintetizan cuando las concentraciones del mismo son altas<sup>(2)</sup>. Cobra pues importancia el mecanismo de resistencia que tenga el microorganismo al antibiótico que produce. Se ha identificado en actinomicetos y otros microorganismos un mecanismo de resistencia basado en proteínas de membrana que funcionan como una bomba exportadora de antibiótico<sup>(3)</sup>. Para evaluar la importancia del mecanismos de resistencia/exportación de antibióticos en actinomicetos, nosotros bloqueamos la expresión del gen *rifP* que codifica para la proteína responsable de la exportación en *A. mediterranei*, usando una técnica basada en ARN antisentido y evaluamos el efecto que tiene sobre la producción.

**Metodología.** Para bloquear la expresión del gen *rifP*, se construyó un plásmido de replicación autónoma (fig. 1) que contiene el casete de expresión del gen *rifP* clonado en dirección opuesta a como se encuentra en el genoma, con el cual se transformó a *A. mediterranei* S699 por electroporación. Para evaluar el efecto del bloqueo del gen *rifP* sobre la producción de rifamicina, se utilizó medio de producción Lee inoculado con la cepa S699 y la cepa transformante ARNasRifP<sup>-</sup>.

**Resultados y discusión.** Para construcción del vector de de expresión antisentido del gen *rifP* se utilizó el promotor constitutivo de alta tasa de transcripción en actinomicetos del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea* (*PermE*) para obtener una cantidad alta de ARN antisentido que garantiza un bloqueo eficiente de la traducción “*in vivo*”. Como terminador se utilizó el del gen de la aspartato semialdehído deshidrogenasa de *Amycolatopsis lactamdurans* (*Tasd*). El vector obtenido pUAMAE5 de

replicación autónoma contiene dos orígenes de replicación *colE1* y *pA-rep* para *Amycolatopsis*; un gen de resistencia a kanamicina (selección en *E. coli*) y el gen de resistencia a eritromicina (selección en *A. mediterranei*)

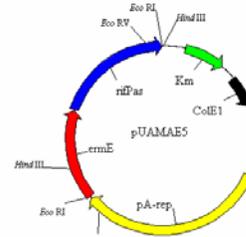


Fig. 1. Mapa del plásmido pUAMAE5 que contiene el casete *rifP* antisentido

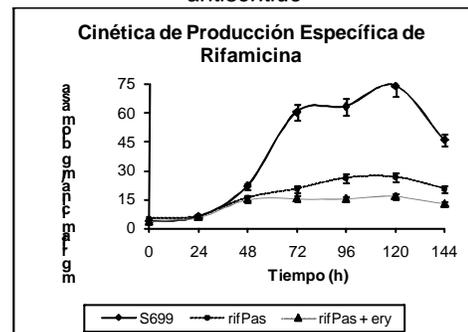


Fig. 2. Cinética de producción específica de rifamicina de las cepas S699 y *rifPas*

Para la fermentación la cepa S699 y *rifPas* se crecieron en medio de producción, y se agregó un control adicionado con eritromicina. Los resultados muestran que la cepa bloqueada en la expresión de *rifP* muestra una disminución del 70% en la productividad.

**Conclusiones.** El gen *rifP* tiene un efecto directo sobre la producción de rifamicina y el bloqueo de su expresión disminuye considerablemente la productividad.

**Bibliografía.** 1. Floss HG, Yu T-W (1999) Lessons from the rifamycinbiosynthesis gene cluster. *Curr Opin Chem Biol.* 3:592–597.  
2. Blanc V, Salah-bey K, (1995) Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol Microbiol* 17:989–999.  
3. Absalón A., Fernández (2007) RifP; a membrane protein involved in rifamycin export in *Amycolatopsis mediterranei*. *Biotechnol. Lett.* 29:951–958.