

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CINCO POSIBLES GENES DE CITOCROMO P450 DEL CLUSTER DE BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA DE *Amycolatopsis mediterranei*.

Angel E. Absalón, Pedro Cortés, Francisco J. Fernández, Javier Barrios-Gonzalez y Armando Mejía\*.

Depto. de Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Av. Michoacán y purísima s/n Col. Vicentina C.P. 09640 México, D.F., México.

Fax: (5) 804 4712 ext. 6453, e-mail: ama@xanum.uam.mx

Palabras clave: Rifamicina, citocromo P450, *Amycolatopsis mediterranei*

**Introducción.** La rifamicina es un antibiótico producido por el actinomiceto *Amycolatopsis mediterranei*, importante por tener actividad contra microorganismos causantes de enfermedades como la tuberculosis y la lepra. (1)

En 1998 se reportó la secuencia completa de nucleótidos del cluster de biosíntesis de rifamicina, el cual está formado por casi 100 kb. Actualmente se conocen las enzimas involucradas directamente en la biosíntesis de rifamicina, todas ellas codificadas dentro de este cluster. En este grupo de genes se encuentran también cinco marcos de lectura abiertos (*orf 0*, *orf 4*, *orf 5*, *orf 13* y *orf 16*) que tienen alta homología con genes reportados de citocromos P450 en otros actinomicetos productores de antibióticos (2). Sin embargo, se desconoce su función específica en el metabolismo de este microorganismo, o incluso si tienen algún papel durante la biosíntesis del antibiótico.

Así pues, el objetivo del presente trabajo fue evaluar cuantitativamente la expresión de los cinco *orf*s en *A. mediterranei* durante la etapa de producción y de esta forma evaluar la posible función durante la biosíntesis de rifamicina.

**Metodología.** Se construyeron 10 oligonucleótidos con las secuencias de inicio y fin de los 5 *orf*s para amplificar los fragmentos por la técnica de PCR a partir de ADN total de *A. mediterranei* M18 (ATCC 21789). En ambos lados de los oligonucleótidos se adicionó una secuencia de corte para enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN amplificados de los cinco *orf*s se ligaron en la región múltiple de clonaje del plásmido pBLUESCRIPT KS+ y posteriormente se transformó *E. coli* XL1-Blue. Las células transformadas se crecieron en placas con medio LA adicionado con ampicilina como marcador de selección y con Isopropil  $\beta$ -D-tiogalacto-piranosido (IPTG) y 5 bromo-4-cloro-3-indolil-B-D galactosido (X-GAL) para diferenciar las transformantes que contenían inserto de las que no por la disrupción de la subunidad *lac Z* del operon *lac*.

Se aisló ARN mensajero de cultivos de *A. mediterranei* M18 (ATCC 21789) y *A. mediterranei* Msb en condiciones de producción a las 48, 72 y 96 horas.

Se realizó una transferencia de Northern Blot y una hibridación del RNA usando como sonda los fragmentos amplificados por PCR del los *orf*s.

amplificados por PCR con RNAm, aislado de micelio a los tiempos antes mencionados, en condiciones de producción.

**Conclusiones.** Se cuenta con dos sondas de los citocromos P450, actualmente se está realizando el análisis de la transcripción de estos genes durante la etapa de producción del antibiótico.

**Agradecimientos.** Agradecemos a CONACyT el apoyo económico otorgado mediante el proyecto No. 28675-B.

### Bibliografía.

- Hartmann G., Honikel K., Knusel F. y Nuesch J. (1967) Biochem. Biophys. Acta. 145:843.
- August, P., Tang, Li., Yoon, Y., Ning, S., Muller, R., Yu, T., Taylor, M., Hoffman, D., Kim, C., Zhang, X., Hudchinson, R., Floss, H. (1998) Biosynthesis of ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chemistry & Biology* (5) 9: 69-79.
- Mejía A., Barrios J., y Viniestra G. (1997) Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *J. Antibiotic* 51: 58-64.

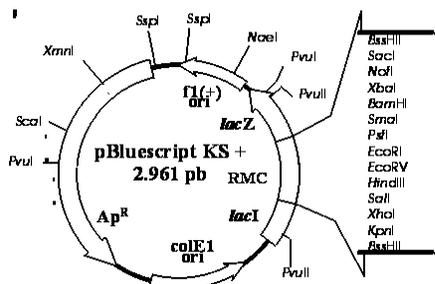


Fig. 1 Plásmido pBLUESCRIPT KS+ utilizado para clonar los fragmentos amplificados de los citocromos P450.

**Resultados y Discusión.** Se amplificaron cuatro de los fragmentos por PCR, y se ha logrado insertar el *orf 4* y *orf 5* dentro del plásmido pBLUESCRIPT KS+. Los fragmentos insertados fueron comprobados mediante un análisis de restricción con las enzimas *Bam* HI, *Hind* III y *Pst* I. Actualmente se realiza la hibridación de los fragmentos