

186
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
ACTINOFAGOS Y POSIBLE DESARROLLO DE Cyph
COMO VECTOR DE CLONACION**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
CYNTHIA YASCHINE ARROYO



MEXICO, D. F.

ENERO 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
Actinomicetos	1
<i>Streptomyces</i>	2
Sistemas de Restricción -Modificación	4
Bacteriófagos	7
Actinofagos	10
OBJETIVO	13
MATERIAL Y METODOS	14
Aislamiento de fagos	14
Titulación de fagos	14
Aislamiento de cepas lisógenas	15
Mini preparaciones de DNA de fagos	16
Purificación de DNA de fago	17
Determinación de extremos cohesivos	17
Selección de mutantes resistentes a agentes quelantes	17
Transformación y transfección de protoplastos de <i>Streptomyces</i>	18
Transformación de <i>Escherichia coli</i>	19
Elaboración del mapa de restricción	20
Sub-clonación del gen de melanina en ϕ CYph Δ 9	21
Transposición de Tn5096 a ϕ CYph Δ 9	21
Purificación de plásmidos de <i>Streptomyces</i>	23
Caracterización morfológica del fago ϕ CYph	25
Medios, cepas y plásmidos	26

RESULTADOS Y DISCUSION	28
Aislamiento de fagos en <i>S. lividans</i>	28
Aislamiento de fagos en <i>S. phaeochromogenes</i>	30
Caracterización del DNA de ϕ CYph	30
Determinación de la capacidad lisogénica de ϕ CYph	30
Aislamiento de derivados de ϕ CYph con deleciones	34
Mapa de restricción	34
Rango de hospederos	34
Sub-clonación del gen de melanina	40
Transposición de Tn5096	40
Caracterización morfológica del fago	43
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas que poseen un alto contenido de G+C en su genoma (mayor a 55%). Estos se han relacionado filogenéticamente por la evidencia dada por las secuencias del rRNA 16S y por estudios de apareamiento DNA:rRNA (Chater & Hopwood, 1983).

Se conocen desde hace más de 100 años e inicialmente se creía que eran hongos por su crecimiento filamentosos, y fue hasta los años 50's que se confirmó que eran procariotes.

Son de gran importancia pues producen una gran cantidad de enzimas, vitaminas y antibióticos de uso industrial, médico, veterinario y para la investigación básica, además de que algunas especies son importantes patógenos de plantas, animales y del hombre; muchas otras constituyen importantes modelos para la investigación.

Los actinomicetos son un componente significativo de la población microbiana de casi todos los suelos, y se llegan a encontrar hasta más de un millón por gramo. También se han encontrado en medios acuáticos, tanto en agua dulce como marina.

Las esporas se dispersan por medio de artrópodos, corrientes de agua, lluvia y viento. Su crecimiento óptimo se da entre los 25 y 30°C, a un pH de entre 5 y 9.

En el suelo contribuyen a la degradación de polímeros complejos insolubles como lignocelulosa, hemicelulosa, pectina, queratina y quitina; y hay evidencia de que pueden degradar compuestos hechos por el hombre

que contaminan los suelos (Goodfellow & Williams, 1983).

Entre los patógenos de humanos más importantes se encuentra *Mycobacterium leprae* que produce lepra; *Corynebacterium diphtheriae*, difteria; *M. tuberculosis*, tuberculosis; *Actinomyces*, actinomicosis; y *Nocardia*, nocardiosis.

También hay fitopatógenos importantes, en especial algunas especies de *Streptomyces* y de *Corynebacterium*.

Se han aislado más de 30 géneros, siendo el género *Streptomyces* el más abundantes y ubicuo.

STREPTOMYCES

El género *Streptomyces* (Waksman & Henrici, 1943) pertenece al orden Actinomycetales. Su nombre significa "hongo doblado" (del griego: *Streptos* -doblado, *myces* -fungus), aunque ahora es claro que pertenecen al reino Prokaryota.

Crecen en condiciones aerobias, con las fases lag, log y estacionaria, típicas en bacterias. En medio sólido se diferencian en micelio vegetativo y aéreo, y este último se fragmenta dando lugar a cadenas de esporas (Fig. 1). La formación de micelio aéreo va acompañada de lisis parcial del micelio vegetativo el cual provee al primero de nutrientes (Mendez et al., 1985).

El micelio vegetativo penetra y solubiliza a materia orgánica secretando enzimas hidrolíticas, como proteasas, lipasas, amilasas, nucleasas, etc. También producen una gran cantidad de antibióticos, de los 6,000 (aprox.) que se conocen de origen microbiano, el 60% lo producen miembros del género *Streptomyces*.

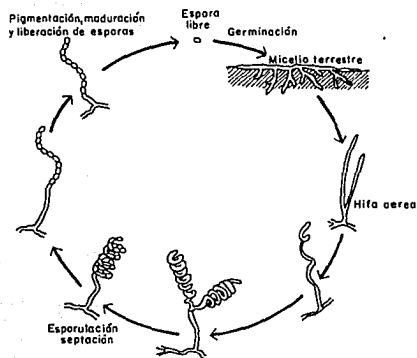


Fig. 1. — CICLO DE VIDA DE *S. coelicolor*
 (Chater y Merrick, 1979).

Su contenido de G + C es muy alto, en promedio de 74%
La especie tipo es *S. albus* ATCC 3004 (IMRU 3004) (Pridham & Lyons, 1962), pero la más estudiada a nivel genético es *S. coelicolor* A3(2), para la cual se ha establecido un mapa genético con más de 100 marcadores (Hopwood & Chater, 1974).

La especie más usada en ingeniería genética es *S. lividans* pues presenta una serie de ventajas muy importantes. Se ha convertido en un hospedero alternativo a *E. coli* para clonar genes ricos en G+C difíciles de expresar en ésta última. Secreta proteínas y antibióticos eficientemente. Reconoce un gran número de promotores, incluso de Gram-negativas (Ali & Dale, 1986; Horinouchi et al., 1987). Al parecer carece de sistemas de restricción -modificación (RM).

SISTEMAS DE RESTRICION -MODIFICACION (RM)

Los sistemas RM son mecanismos enzimáticos que protegen a la célula de DNA exógeno que pueda penetrar a ella, como plásmidos y DNA de fagos.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias nucleotídicas en el DNA de doble cadena, cortando ambas cadenas. La mayoría de éstas se presentan junto con una enzima de modificación cuya función es la de proteger el DNA de la bacteria que las produce. A esto se le conoce como sistemas RM y pueden ser de tres tipos. El tipo I consiste de un polipéptido con tres subunidades: endonucleasa, metilasa y una de reconocimiento. El tipo II consiste de una enzima de restricción y otra de modificación. Y el tipo III de un polipéptido con dos

subunidades: endonucleasa y otra de reconocimiento y modificación.

Tanto el tipo I como el III requieren de ATP y S-adenosilmetionina (SAM), y cortan en sitios lejanos al sitio de reconocimiento (hasta a más de 1000pb de distancia) y sin mucha especificidad. El tipo II, en cambio, reconoce secuencias palindrómicas específicas de entre 4 y 7pb, cortando y modificando en ese mismo sitio. Por estas características es que las endonucleasas de restricción tipo II se han convertido en una herramienta invaluable para mapear, secuenciar y clonar ácidos nucleicos. Además de ser los más comunes pues se han encontrado en 1/3 de las cepas en las que se ha buscado (Lewin, 1990).

Se conocen más de 600 diferentes enzimas de restricción, de las cuales algunas son producidas por especies del género *Streptomyces* tales como: *SacI*, *SacII*, *SacIII*, *SacIV*, *SacV*, *SacVI*, *SacVII*, *SacVIII*, etc. Sus sitios blanco son ricos en G+C, por lo que se requiere de un sistema de modificación muy eficiente (Peczynska & Mordarski, 1988).

El primer sistema RM que se clonó completo en *E. coli* fue el *HhaI* (Mann et al., 1978). Para 1988 se habían clonado 60 sistemas completos y 40 parciales.

Se han desarrollado varias estrategias para clonar los sistemas RM. Los bacteriofagos han resultado ser una herramienta muy importante para su detección, estudio y clonación. Gracias a ellos se detectaron por primera vez.

En algunos casos ambos genes pueden clonarse juntos. En *E. coli* se han clonado varios sistemas completos sin problema pues hay un sistema que repara eficientemente los cortes en el DNA bacteriano producidos por la enzima de restricción (Lunnen et al., 1988). Incluso se han detectado clones que llevan sólo el gen de restricción.

Pero en otros casos hay problemas para clonar los dos genes juntos, ya que a menos que la enzima de modificación actúe antes que la de restricción, el genoma celular puede ser restringido. Este fue el caso de *Bam*HI y *Dde*I, entre otros, en donde se requirieron 2 pasos para clonar los sistemas completos (Howard et al., 1986; Brooks et al., 1988). Primero se clonó el gen de modificación y después, una vez modificado el genoma bacteriano, el de restricción.

En cuanto a *Streptomyces*, se han clonado los genes del sistema RM de *S. albus* G (*saR* y *saM*) en *S. lividans* (Rodicio & Chater, 1988). Esto se logró haciendo un banco genómico de *S. albus* G en *S. lividans*, y seleccionando por resistencia a la infección del fago ϕ C31 que tiene muchos sitios para *Sa*I.

Hasta ahora en todos los sistemas estudiados se ha encontrado que los genes se encuentran ligados en el cromosoma, y se cree que esto es para asegurar que los genes se segreguen juntos.

La clonación de sistemas RM se lleva a cabo para estudiarlos genéticamente, para poder sobreproducir las enzimas facilitando así su purificación, etc.

Aún es importante seguir buscando nuevos sistemas RM cuyas enzimas reconozcan secuencias nuevas aportando así más herramientas para la biología molecular. En *Streptomyces* hace falta no sólo buscar nuevos sistemas, sino también estudiar los que ya se conocen. Un ejemplo de éstos es el sistema *Sph*I de *S. phaeochromogenes*, descubierto hace más de 10 años (Fuchs et al., 1980) sin que se haya clonado ni estudiado en detalle.

BACTERIOFAGOS

El estudio de los fagos es de gran interés por varias razones: causan problemas en la industria pues lisan los cultivos bacterianos provocando grandes pérdidas, se usan para hacer estudios taxonómicos y son herramientas para estudios genéticos y moleculares. En esto último, su uso ha sido invaluable para la detección y estudio de los sistemas RM.

La clasificación de los fagos siempre ha sido conflictiva, pero en general se basa en el tipo de ácidos nucleicos que contienen, en su morfología y en el rango de hospederos que infectan (Ackerman & Eisenstark, 1974). En 1967 Bradley propuso seis tipos morfológicos básicos para clasificar a los fagos (Fig.2). Hasta la fecha siguen siendo utilizados y clasificaciones posteriores se han basado en ésta.

El proceso infectivo de un fago se puede dividir en cuatro fases; primero, la adsorción, que implica el reconocimiento de receptores bacterianos; segundo, la inyección del material genético del fago al interior de la célula; tercero, la multiplicación intracelular del fago, y por último la lisis celular en la que se liberan los fagos nuevos. Las dos últimas fases varían dependiendo de si el fago es lítico o lisogénico.

La mayoría de los fagos se adsorben a la pared celular, pero hay casos en los que los fagos reconocen receptores en los *pili* o en el flagelo (Crawford & Gesteland, 1964; Meynell, 1961).

Las bacterias han desarrollado mecanismos de defensa contra la infección de los fagos bloqueando cualquier fase de su ciclo. Para evitar la adsorción hay bacterias que secretan sustancias que forman una barrera física, y también son frecuentes las mutaciones en los receptores celulares. Existen otros mecanismos que impiden la inyección del material genético.

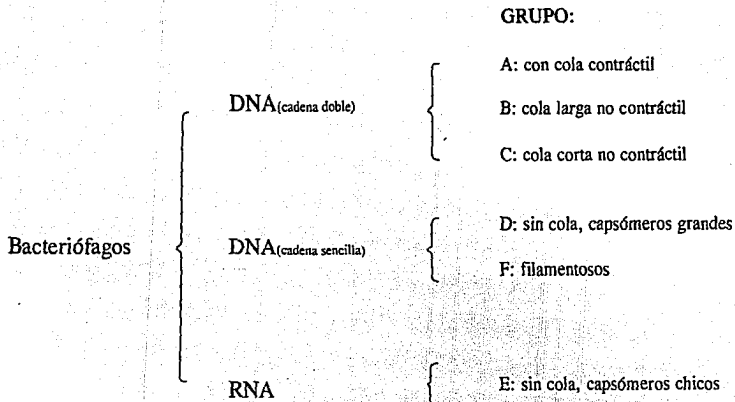


Figura 2.- Clasificación de los bacteriófagos según Bradley (Bradley, D.E., 1967).

Finalmente, en caso de que penetre DNA fágico, muchas bacterias poseen enzimas de restricción que lo destruyen. A su vez los fagos han respondido a esto con mutaciones en sus receptores, aprovechándose de la modificación del hospedero o por mecanismos de antirrestricción (Kruger & Bickle, 1983).

Como se mencionó antes, los fagos pueden ser de dos tipos: líticos (virulentos) ó lisogénicos (temperados).

Si el fago es lítico, el genoma inyectado es expresado siguiendo un programa secuencial de desarrollo haciendo uso del aparato transcripcional de la célula hospedera. El fago posee genes cuya función es la de asegurar que su propio DNA se replique preferencialmente, y de igual forma que se transcriban sus mRNAs. Esto resulta en la síntesis de muchas copias del genoma viral y cápsides. Finalmente los nuevos fagos se empaquetan, lisan a la célula y así son liberados.

Los fagos lisogénicos pueden seguir dos caminos alternativos. Uno, la lisis para producir muchos fagos rápidamente. El otro es la lisogenia, en la cual el genoma viral (profago) se integra al genoma bacteriano. Esto le da inmunidad a la bacteria contra la infección de fagos iguales o muy cercanos. La lisogenia es una forma pasiva de propagación del profago, ya que éste se hereda como parte del genoma bacteriano, y puede permanecer ahí por muchas generaciones. El establecimiento y mantenimiento de la lisogenia depende de la interacción de un represor codificado por el fago con un operador. Si no hay represor el profago es inducido a seguir una vía lítica. De esta manera, el balance entre lisis y lisogenia depende de la concentración intracelular de represor que haya.

Muchos fagos pueden ser líticos o lisogénicos dependiendo de la cepa a la que infecten.

Existen dos mecanismos de empaquetamiento de DNA en fagos. En uno, el DNA concatamérico se corta al llenarse la cabeza (headfuls). Si se produce una deleción, la cantidad de DNA que se empaqueta no varía. En el otro mecanismo (como en el fago λ), el DNA es cortado por una endonucleasa que reconoce una secuencia específica. De esta manera, si hay una deleción en el genoma, el resultado será el empaquetamiento de un fragmento menor. El resultado de un DNA más relajado incrementa la estabilidad de los fagos al calor y a agentes quelantes (Lomovskaya *et al.*, 1980). Al seleccionar fagos resistentes a estos tratamientos, se han obtenido mutantes viables de λ con deleciones de hasta el 23% de su genoma (Parkinson & Husky, 1971).

La infección de un cultivo bacteriano se detecta por la formación de placas. Estas son placas de lisis y, en general, pueden ser claras si se trata de un fago lítico; o turbias, si se trata de uno lisogénico (son turbias pues contienen células lisogenizadas).

ACTINOFAGOS

Los actinofagos son todos aquellos bacteriofagos que infectan a los actinomicetes, entre éstos a *Streptomyces*.

El interés por estos fagos empezó por la enorme preocupación que tenían industrias y laboratorios al ver que sus cultivos para producción de antibióticos eran destruidos por ellos. A partir de eso se han seguido estudiando, transformándose en herramientas importantes para el estudio de *Streptomyces*.

Los fagos de *Streptomyces* se aíslan fácilmente de casi todos los

suelos de pH > 5.0, plaqueándolos con una cubierta de agar suave con esporas. Se requieren de cationes divalentes durante la adsorción por lo que se agrega Ca^{2+} , al igual que Mg^{2+} para incrementar la eficiencia de plaqueo (EOP) y el tamaño de las placas (Lomovskaya et al., 1980).

Su rango de hospederos es variable, dependiendo de la especificidad de adsorción, ó de barreras intracelulares como PGL (phage growth limitation) y sistemas de restricción.

La adsorción se da mediante la cola, y es más eficiente en micelio vegetativo joven (Chater, 1986).

De éstos el más estudiado es el fago ϕC31 , aislado por Lomovskaya et al. en 1972. Es un fago lisogénico que lisa a un 70% de las células de las que infecta y lisogeniza al resto (Lomovskaya et al., 1980). Es un fago de rango de hospederos amplio que infecta aproximadamente a la mitad de las 137 cepas en las que se ha probado (Chater, 1986).

Como todos los fagos de *Streptomyces* estudiados, pertenece al grupo B de Bradley. Tiene una cabeza polidélica de 53nm de ancho, una cola no -contráctil de entre 100 y 123nm de largo, y una placa basal de 15nm de ancho. Su genoma es una molécula lineal de DNA de doble cadena de 41.5kb y tiene extremos cohesivos. Al entrar el DNA a la bacteria éste se circulariza uniendo sus extremos cohesivos. En caso de lisogenizar, se integra al sitio *attB* del cromosoma bacteriano mediante su sitio *attP*. El establecimiento y mantenimiento de la lisogenia depende de un represor, producto del gen *c*, cuya secuencia predice una proteína de 683 aa (Sinclair & Bibb, 1988).

Su contenido de G+C es alto (63%, Chater, 1980). La cápside está compuesta por 17 polipéptidos diferentes, aunque sólo cuatro de ellos componen el 84% de la proteína total (Suarez et al. 1984).

El genoma de ϕ C31 ha sido mapeado física y genéticamente, transfecta protoplastos eficientemente, y se han obtenido mutantes con deleciones. Se sabe que al menos 10kb son dispensables para formar placas, pero genomas de 34.2kb ó menos no son viables. A partir de este fago varios vectores de clonación se han construido y utilizado con éxito.

También ha sido de gran utilidad en la detección de sistemas de restricción (Rodicio & Chater, 1988).

Así, los fagos ofrecen un enorme potencial como vectores de clonación por su amplio rango de hospederos, facilidad de detección, posibilidad de hibridar *in situ* (en placa), introducción de DNA estable en profagos y la posibilidad de inducirlos a una forma multicopia.

OBJETIVO

Aislar un fago capaz de infectar a *S. phaeochromogenes* y a *S. lividans* que tenga varios sitios *SphI*, lo cual nos permitiría detectar clonas que lleven los genes RM. Asimismo, dicho fago sería útil en el aislamiento de cepas mutantes de *S. phaeochromogenes* deficientes en restricción.

MATERIAL Y METODOS

AISLAMIENTO DE FAGOS (Hopwood *et al.*,1985)

-Se pusieron 5-10g de tierra en frascos estériles con 20ml de Difco Nutrient Broth (DNB) adicionado de $MgSO_4$ 10mM, $CaCl_2$ 10mM, glucosa 0.5% y esporas de la cepa en la que cual se querían aislar los fagos. Se incubó 2 días a 29°C.

-Se tomaron 5ml y se centrifugó 10 minutos a 3,000rpm; se tomaron 3ml del sobrenadante, se pasaron a otro tubo agregándose 0.3ml de cloroformo. Se agitó en el vortex 1 minuto y se volvió a centrifugar 10 minutos.

-Se tomó el sobrenadante, se hicieron diluciones y se titularon para ver si había fagos (se deben observar placas).

-Se tomó una placa aislada de cada fago la cual se volvió a titular (2 pases) para asegurarse que proviniera de un solo fago, y entonces ya obtener un lisado confluyente que nos diera fago puro muy concentrado.

Inicialmente se diferenciaba a un fago de otro por el fenotipo de las placas, pero esto se comprobaba purificando DNA y comparando patrones de restricción.

TITULACION DE FAGOS (Hopwood *et al.*,1985)

Todos los fagos se diluyeron y almacenaron en buffer SM, y se titularon en cajas Petri pequeñas (5cm diámetro) con medio TL agregando a cada una 0.64ml de TL suave, 15 μ l de esporas y 0.1 ml fago. Se incubaron 1 día a 29°C.

Las placas aisladas se sacaron con una pipeta Pasteur y se pusieron a

difundir en 1ml de SM. Para obtener una solución concentrada se pusieron 2.5ml de SM sobre un lisado confluyente, se dejó a temperatura ambiente al menos 2 horas, se filtró con un filtro Millipore de 0.45 μ m y se guardaron a 4°C.

AISLAMIENTO DE CEPAS LISÓGENAS (Hopwood *et al.*, 1985)

- Se pusieron 0.1ml de esporas en una caja con medio R5, y se dejó secar.
- En un área marcada se pusieron 20 μ l de fago y se dejó secar.
- Se incubó a 29°C hasta que el área marcada esporuló.
- Se cosecharon las esporas del área marcada en 1ml de pirofosfato de sodio 25mM y se dejó a temperatura ambiente 30 minutos.
- Se agitó en vórtex 30 segundos y se filtraron por un tapón de algodón en una pipeta Pasteur.
- Se pasaron por un filtro Millipore de 0.45 μ m para coleccionar las esporas.
- Se lavó el filtro 2 veces con 5ml de pirofosfato de sodio 25mM.
- Se pasó el filtro a una botella de rosca de 20ml y se agregó 1ml de agua destilada estéril, se agitó en vórtex.
- Se diluyeron 0.1ml de la suspensión de esporas en agua destilada estéril hasta 10⁻⁴.

Se puso 0.1ml del concentrado y 0.1ml de cada dilución en cajas con medio R5 y se incubaron a 29°C hasta que esporularon.

Se replicaron las cajas que tuvieran aproximadamente 100 colonias en cajas de DNB, con agar suave y esporas de *S. lividans*.

Se incubaron durante la noche y se identificaron lisógenas como aquellas colonias que liberaran fago.

MINI-PREPARACIONES DE DNA DE FAGOS (Hopwood *et al.*, 1985)

- Se creció fago en 6 cajas Petri con medio TL, agregando a cada una 2.5ml de TL blando, 50 μ l de esporas y 0.1ml de fago. Debe haber alrededor de 10⁴ fagos. Se incubó una noche a 29°C.
- Se raspó el agar blando con un asa de vidrio y se echó en 25ml de DNB. Se trituró con una pipeta de 10ml y se dejó reposar 2 horas.
- Se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C, 10 minutos para quitar agar.
- Se centrifugó el sobrenadante en tubos de 30ml a 4°C, 2 horas a 20,000 rpm.
- Se tiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1ml de solución de RNAsa (50 μ g/ml en SM), se incubó a 37°C al menos 30 minutos.
- Se pasó a 2 tubos Eppendorf y se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm.
- Se pasó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf y se extrajo con 0.5ml de fenol saturado. Se centrifugó 2 minutos a 14,000rpm.
- Se pasó el sobrenadante a otro tubo con 0.5ml de fenol/cloroformo (1:1) y se centrifugó 2 minutos.
- Se pasó el sobrenadante a otro tubo con 0.5ml de cloroformo y se centrifugó 2 minutos.
- Se pasó el sobrenadante a otro tubo añadiendo 20 μ l de NaCl 5M y 0.5ml de isopropanol. Se dejó 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm, se sacó todo el sobrenadante y se resuspendió en 250 μ l de TE. Se añadieron 10 μ l de NaCl 5M y 600 μ l de etanol absoluto. Se pasó el DNA con una pipeta Pasteur a otro tubo con 100 μ l de TE y se disolvió completamente a 50°C.

PURIFICACION DE DNA DE FAGO

Se realizó según Hopwood *et al.* (1985), con las siguientes modificaciones en los pasos 8-9 al hacer el gradiente de CsCl, tomadas de Maniatis *et al.* (1982).

8-9. A la suspensión de fago se le pusieron 0.5g/ml de CsCl. Se hizo el gradiente de CsCl añadiendo las diferentes concentraciones con una pipeta Gilson de 1ml para que quedara de la siguiente manera:

Se centrifugó a 4°C, 2 horas a 22,000 rpm. El fago quedó en la interfase entre la banda de 1.45 y la de 1.5g/ml, observándose como una pequeña banda azul.

DETERMINACION DE EXTREMOS COHESIVOS

La existencia de extremos cohesivos se determinó comparando en un gel de agarosa el patrón de bandas del DNA digerido con alguna enzima de restricción, tanto previamente ligado como sin ligar. Justo antes de correrse, el DNA no-ligado se calentó 5 minutos a 60°C para separar los extremos cohesivos que se hubieran unido espontáneamente.

SELECCION DE MUTANTES RESISTENTES A AGENTES QUELANTES

Varios autores han reportado el aislamiento de fagos con deleciones en su DNA al tratarlos con agentes quelantes y/o con calor (Parkinson & Husky, 1971; Dowding, 1973; Lomovskaya *et al.*, 1980; Chater *et al.*,

1981; etc.).

Esto sólo funciona para fagos que se empaquetan reconociendo sitios *cos* (cohesivos), como el caso de lambda, por lo que primero se determinó que el fago fuera de este tipo.

Después escogimos pirofosfato de sodio 25mM para aislar los mutantes de la siguiente manera:

Se pusieron 0.1ml de fago concentrado en 0.9ml de pirofosfato de sodio 25mM, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 0.2ml a los 5, 10, 20 y 40 minutos las cuales se diluyeron y se titularon.

Los fagos sobrevivientes se volvieron a tratar hasta que la fracción sobreviviente se estabilizó.

De entre los sobrevivientes se escogieron algunas placas aisladas y se hicieron mini-preparaciones de cada una para determinar si hubo deleciones.

TRANSFORMACION Y TRANSFECCION DE PROTOPLASTOS DE

***Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985)**

-Se preparó una botella de buffer P, se separaron 5ml en un tubo para protoplastos y a éste se agregaron 5mg de lisozima.

-Se filtró con una jeringa nueva de 20ml el buffer P a una botella estéril y la lisozima a otro tubo para protoplastos.

-Se añadió la lisozima a un tubo con micelio de *Streptomyces*, dejando que se formen los protoplastos a 29°C, 1 hora aproximadamente (se checaron al microscopio desde los 40 minutos).

-Se filtraron en un filtro de esporas (con el algodón apretado) y se enjuagaron con 3ml de buffer P.

- Se centrifugaron 8 minutos a 3,000 rpm.
- Se quitó el sobrenadante y se resuspendió el pellet suavemente en la gota que queda.
- Se lavó con 5ml de buffer P, se centrifugó 8 minutos a 3,000rpm, se quitó el sobrenadante y se resuspendió el pellet suavemente.
- Se agregaron 5ml de buffer P, se dividieron en 2 tubos y se agregaron 2.5ml de buffer P a cada uno.
- Se centrifugaron 10 minutos a 3,000 rpm.
- Se preparó lo siguiente para cuando salieran:
- Se agregaron 3ml de buffer P a una botellita con 1g de PEG.
- Se pusieron 0.5ml de PEG a un tubo para protoplastos y se tomó el PEG con una pipeta Pasteur nueva con bulbo.
- DNA con el que se va a transformar listo.
- Al salir los protoplastos se tiró el sobrenadante, se agregó el DNA y en seguida el PEG subiendo y bajando todo con la pipeta Pasteur 3 ó 4 veces.
- Se enjuagó rápido con 5ml de buffer P y se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm.
- Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 0.5ml de buffer P.
- Se hicieron diluciones en buffer P y se plaquearon 100 μ l en cajas con medio R2YE con 2.5ml de agar suave para transformaciones. En caso de transfección se agregaron también esporas.

TRANSFORMACION DE *E. coli* (Hanahan, 1985)

- Se puso un cultivo de JM101 en 2ml de YT2X y se dejó 4 horas a 37°C con agitación.
- Se tomaron 0.1ml para inocular un matraz con 10ml de YT2X, se incubó a

37°C, 2 horas con agitación.

-Se pasaron los 10ml a un tubo para protoplastos y se dejaron en hielo 10 minutos.

-Se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm.

-Se tiró todo el sobrenadante y se resuspendió en 3.3ml de TFB. Se dejó en hielo 10 minutos.

-Se centrifugó 10 minutos a 3,000 rpm.

-Se decantó y se resuspendió en 0.8ml de TFB.

-Se pasaron 210µl a un tubo frío para protoplastos.

-Se agregó DNA (100ng, aprox.), subiéndolo y bajándolo con la pipeta. Se dejó en hielo 30 minutos.

-Se pasó el tubo 90 segundos a 42°C y se regresó a hielo 2 minutos.

-Se agregaron 0.8ml de LB y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación.

-Se hicieron diluciones y se plaquearon en cajas de medio LB con carbenicilina (Cb).

ELABORACION DEL MAPA DE RESTRICCION

El DNA de fago se digirió con 22 enzimas de restricción. Para hacer el mapa se escogieron aquellas para las cuales existía el menor número de sitios. Sólo utilizamos 3 enzimas: *EcoRI*, *EcoRV*, y *KpnI*. Con éstas se hicieron digestiones totales simples y dobles para conocer el número de fragmentos que cada una generaba y por que otra enzima era cortado o si no había sitios internos. Para ubicar los extremos se ligaba DNA y posteriormente se digería de todas las formas posibles.

También fue necesario purificar bandas generadas por *EcoRV* y digerirlas por separado con las otras enzimas.

La purificación de las bandas se hizo por electroelución o extrayendo

de geles de agarosa de bajo punto de fusión, ambos descritos por Hopwood *et al.* (1985).

SUB-CLONACION DEL GEN DE MELANINA EN ϕ CYph Δ 9

El gen de melanina se escogió para meter sitios de clonación al vector, además de que posee un sitio *Sph*I. La producción de pigmento nos permitiría la fácil detección de fagos con inserto.

El gen *mel* se sacó del plásmido pIJ702 con *Bcl*I y se ligó al plásmido pIJ2925 linealizado con *Bam*HI. Con ésto se transformó *E. coli* y se seleccionaron las colonias blancas (con inserto).

De éstas se purificó el plásmido y se digirió con *Kpn*I para intentar meterlo en algún sitio *Kpn*I del fago.

Por otro lado se ligaron los extremos *cos* del fago y después se digirió parcialmente con *Kpn*I de manera que sólo se cortara un sitio por molécula.

Se ligaron el fago y el inserto, y con ésto se transfectaron protoplastos de *S. lividans*.

La selección se hizo buscando placas pigmentadas.

TRANSPOSICION DE *Tn*5096 a ϕ CYph Δ 9

Escogimos este transpósón ya que potencialmente podía transponer a cualquier sitio del profago, expresándose sólo aquellas inserciones que no interrumpieran regiones esenciales. Una vez insertado se podrían meter sitios únicos de clonación, además de ya poseer uno de *Sph*I.

El transpósón *Tn*5096 es un derivado de la secuencia de inserción IS493 (Fig. 3) aislada de *S. lividans*, la cual se encuentra en el genoma de esta especie repetida tres veces (Solenberg & Burgett, 1989).

El transpósón lo obtuvimos en el plásmido pCZA168 (Solenberg &

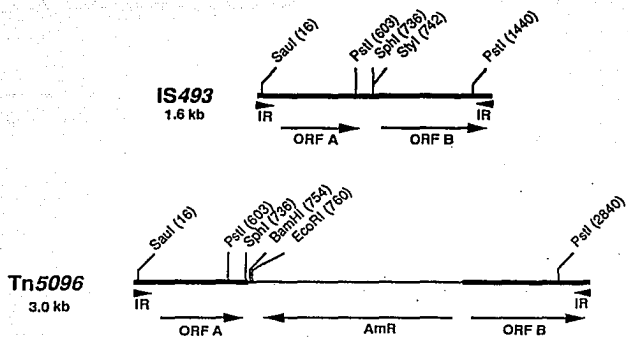


Figura 3. Secuencia de inserción IS493 y su derivado Tn5096.

Baltz, 1991) (Fig. 4), derivado del plásmido pGM160 (Muth *et al.*, 1989) que se pierde fácilmente a 34°C ó más.

Sabíamos que con este plásmido se había logrado la transposición de Tn5096 en *S. coelicolor* (Solénberg, comunicación personal), por lo que decidimos usar una cepa de ésta para los experimentos.

De esta manera la estrategia a seguir fue la siguiente:

Encontrar una cepa de *S. coelicolor* que pueda ser transformada por pCZA168 e infectada por ϕ CYph Δ 9.

Transformarla con pCZA168 y obtener esporas.

Infectar a las anteriores con ϕ CYph Δ 9 (aquí debe darse la transposición).

Recuperar fagos y con éstos infectar a la cepa sin el plásmido.

Replicar lisógenas en apramicina (Am).

Purificar fago liberado por las lisógenas resistentes checar la presencia del transposon.

Ya que hubo muchos problemas para transformar con pCZA168 (ver resultados y discusión), se decidió cambiar de plásmido y repetir con éste el procedimiento. El plásmido escogido fue un derivado del pJ702 al cual se le insertó el transposon en el sitio único de *Bgl*I.

PURIFICACION DE PLASMIDOS DE *Streptomyces* (Hopwood *et al.*,1985)

-Se inoculó con las esporas deseadas un matraz con resorte con 20ml de LB + 34% de azúcar y el antibiótico necesario. Se incubó 2 días a 29°C con agitación.

-Se pasó el cultivo a un tubo y se centrifugó 5 minutos a 5,000 rpm.

-Se lavó con 10ml TE 25mM y se centrifugó 5 minutos a 5,000 rpm.

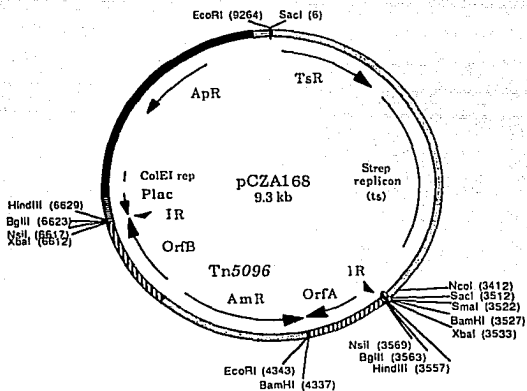


Figura 4. Plásmido pCZA168 que incluye al transposón *Tn5096*
(Solenberg & Baltz, 1991).

- Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 5ml TE con lisozima (1.5mg/ml), incubándolo a 37°C 30 minutos.
- Se agregaron 2.5ml de NaOH 0.3M y SDS a 2%. Se mezcló subiendo y bajando con una pipeta. Se incubó a 55°C 30 minutos.
- Se enfrió a temperatura ambiente 5 minutos y se agregó 1ml de fenol/cloroformo ácido. Se agitó con vortex.
- Se centrifugó 5 minutos a 5,000 rpm.
- Se pasó la fase acuosa a 2 tubos de vidrio (3.5ml c/u).
- Se añadieron 0.35ml de acetato de sodio 3M pH 8.0 y 3ml isopropanol a cada tubo.
- Se pasó a hielo 10 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 3,500 rpm.
- Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 250 μ l de TE.
- Se juntaron los 500 μ l en un Eppendorf. Se añadieron 50 μ l de acetato de sodio 3M pH 8 y 250 μ l fenol/cloroformo pH 8.0
- Se centrifugó 2 minutos. Se pasó la fase acuosa a otro Eppendorf y se añadieron 500 μ l de cloroformo.
- Se centrifugó 2 minutos, se pasó el sobrenadante a otro Eppendorf y se agregaron 500 μ l de isopropanol. Se dejó en hielo 10 minutos.
- Se centrifugó 10 minutos, se tiró todo el sobrenadante y se resuspendió en 50 μ l de TE.

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DEL FAGO ϕ CYph

Para observar los fagos al microscopio se usó una tinción negativa de fosfotungstato de sodio (PTA) al 2% pH 7.0, y se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100B de 80kv. De aquí se tomaron fotografías y se hicieron ampliaciones para caracterizarlos.

MEDIOS, CEPAS Y PLASMIDOS

Todos los medios de cultivo y soluciones empleadas se hicieron como descritas por Hopwood et al. (1985), Hanahan (1985), y Maniatis et al. (1982).

Las cepas y plásmidos usados se muestran en la tabla 1.

Tabla I. Cepas y plásmidos utilizados.

CEPA O PLASMIDO	REFERENCIA
<i>S. lividans</i> 1326	Hopwood <i>et al.</i> 1983
<i>S. phaeochromogenes</i> NRRL B3559	Fuchs <i>et al.</i> 1980
<i>S. albus</i> G J1074	Chater and Wilde 1980
<i>S. parvulus</i> 2283	
<i>S. coelicolor</i> M145	Hopwood <i>et al.</i> 1985
<i>S. coelicolor</i> J1501	Chater <i>et al.</i> 1982
<i>S. coelicolor</i> J1508	
<i>S. coelicolor</i> J801	
<i>E. coli</i> JM101	Messing 1979
pIJ702	Katz <i>et al.</i> 1983
pJJ2925	Janssen (datos no publicados)
pCZA168	Solenberg and Baltz 1991

RESULTADOS Y DISCUSION

AISLAMIENTO DE FAGOS EN *S. lividans*

Inicialmente se querían clonar los genes de restricción y modificación de *S. phaeochromogenes* en *S. lividans* como fue descrito por Rodicio y Chater (1988) para *SaI*.

Para ésto aislamos fagos en *S. lividans* y analizamos su DNA para ver si tenían sitios SphI (tabla 2).

Como se ve en la tabla 2, sólo dos fagos tienen sitios SphI: $\phi 1$ tiene un solo sitio y ϕB nueve sitios. Ya que un sitio no es suficiente (puede modificarse muy fácilmente y nunca detectar la presencia de un gen de restricción), se escogió a ϕB para seleccionar de un banco genómico de *S. phaeochromogenes* construido en *S. lividans* las clonas que portaran los genes de RM.

Este método no dió resultado ya que nunca se pudo detectar una clona que llevara los genes RM. Esto pudo deberse a varias causas, como que al entrar los genes a *S. lividans* se expresara la enzima de restricción antes que todos los sitios del genoma se alcanzaran a modificar por lo que estas células ya no serían viables. O que la enzima de modificación se expresara más rápido que la de restricción de manera que al entrar el DNA del fago se modificaran los sitios antes de poder ser cortados. El primer caso es el más factible y se ha observado antes, en cuyo caso se deben clonar los genes por separado -primero el de modificación para proteger el genoma de la bacteria y posteriormente el de restricción.

De los fagos aislados en *S. lividans* ninguno infectaba a *S. phaeochromogenes* bien, ya fuera que no se formaran placas sino sólo manchas difusas ó que se obtuviera un título muy bajo que no se pudiera

Tabla 2. Fagos aislados en *S. lividans*

FAGO	TITULO ^a (<i>S. lividans</i>)	TITULO ^a (<i>S. phaeochromogenes</i>)	SITIOS <i>Sph</i>
φ1	7x10 ⁹	n.p. ^b	1
φ2	2x10 ¹⁰	5x10 ²	0
φA	3x10 ¹⁰	5x10 ³	0
φB	2x10 ⁹	n.p.	9
φC	2x10 ⁸	n.p.	0
φE	5x10 ⁸	n.p.	0
φA2	4x10 ¹⁰	9x10 ⁴	0

^apfu/ml

^bno había placas bien definidas

elevar (tabla 2), lo cual indica que probablemente haya problemas para infectar. Por lo anterior se decidió aislar fagos directamente en *S. phaeochromogenes*.

AISLAMIENTO DE FAGOS EN *S. phaeochromogenes*

Se aislaron 10 fagos y se obtuvieron confluentes puros (tabla 3). La morfología de las placas variaba en turbidez y tamaño; de esta manera se determinó que los fagos eran distintos.

Con éstos se probó infectar otras especies, entre ellas *S. lividans* (tabla 4). Sólo un fago, ϕ CYph, fue capaz de infectar a *S. lividans*, además de también infectar a *S. albus* G y a *S. parvulus*.

Por lo anterior se escogió a ϕ CYph para seguir caracterizándolo.

CARACTERIZACION DEL DNA DE CYph

Se purificó DNA de ϕ CYph en gran escala para tenerlo muy limpio y en gran cantidad.

Se digirió con 22 enzimas de restricción (tabla 5), entre ellas *Sph*I y como se esperaba no se encontraron sitios para ésta, por lo que se decidió desarrollar al fago como vector y meterle sitios *Sph*I *in vitro*.

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD LISOGENICA DE ϕ CYph

Por la morfología de las placas (muy turbias), creíamos que ϕ CYph era un fago lisogénico. Para asegurarnos de esto preparamos cepas lisogenizadas de *S. lividans*, las infectamos con ϕ CYph nuevamente y no se formaron placas. La inmunidad a ϕ CYph confirma que el fago es lisogénico, además de que estas colonias posteriormente liberaron fagos.

Tabla 3. Fagos aislados en *S. phaeochromogenes*.

FAGO	TITULO ^a	FENOTIPO DE LAS PLACAS ^b
φSph 1	8x10 ⁹	medianas -casi claras
φSph 3	8x10 ⁸	grandes -turbias
φSph 4	2x10 ⁸	medianas -turbias barridas
φSph 9	2x10 ⁹	chicas -casi claras
φSph A	1x10 ¹⁰	medianas -claras
φSph C	1x10 ¹⁰	medianas y chicas -claras
φSph IC	5x10 ⁷	medianas -muy turbias
φSph O	1x10 ⁹	muy chicas -claras
φSph R	5x10 ⁸	chicas -claras
φSph Y	2x10 ⁷	muy chicas -claras

^a pfu/ml

^b el tamaño y turbidez son relativos entre sí

^c φSph I se renombró φCYph para evitar confusión con la enzima

Tabla 4. Rango de hospederos de los fagos aislados en *S. phaeochromogenes*

FAGO	<i>S. lividans</i>	<i>S. albus</i>	<i>S. parvulus</i>
φSph 1	no	no	no
φSph 3	no	sí	sí
φSph 4	no	sí	sí
φSph 9	no	no	no
φSph A	no	no	no
φSph C	no	no	no
φCYph	sí	sí	sí
φSph O	no	no	no
φSph R	no	no	no
φSph Y	no	no	no

Tabla 5. Sitios de restricción en el genoma de ϕ CYph

ENZIMA	SECUENCIA DE CORTE	No. DE SITIOS
<i>AccI</i>	GT/(A ₂) ⁹ AC	> 15
<i>BamHI</i>	G/GATCC	0
<i>BclI</i>	T/GATCA	> 15
<i>BglII</i>	A/GATCT	0
<i>BstEII</i>	G/GTNACC	> 15
<i>DraI</i>	TTT/AAA	0
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	4
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC	2
<i>HincII</i>	GTPy/PuAC	> 15
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	> 15
<i>HinII</i>	G/ANTC	> 15
<i>HpaI</i>	GTT/AAC	0
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	5
<i>PstI</i>	CTGCA/G	0
<i>PvuII</i>	CAG/CTG	0
<i>SaI</i>	G/TCGAC	> 15
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	> 15
<i>SphI</i>	GCATG/C	0
<i>SstI</i>	GAGCT/C	0
<i>SstII</i>	CCGC/GG	1
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	0
<i>XhoI</i>	C/TCAG	0

ASLAMIENTO DE DERIVADOS DE ϕ CYph CON DELECCIONES

Se determinó que el fago tiene extremos cohesivos (Fig. 5), por lo que debe empaquetarse reconociéndolos. Así, se procedió a aislar fagos mutantes con deleciones mediante el tratamiento a agentes quelantes.

Como se ve en la gráfica 1, fue hasta el sexto ciclo de tratamiento que se estabilizó la fracción sobreviviente. De aquí se escogieron 6 placas aisladas, se volvieron a titular para asegurarnos que realmente provinieran de un fago, se sacaron confluentes e hicimos mini-preparaciones de DNA. Se digirieron con *SaI* y encontramos que todos tenían deleciones (Fig. 6). Al menos hay tres fagos diferentes y de éstos escogimos el que tenía la mayor deleción ϕ CYph Δ 9. Se purificó DNA para seguirlo analizando y determinar el tamaño de la deleción.

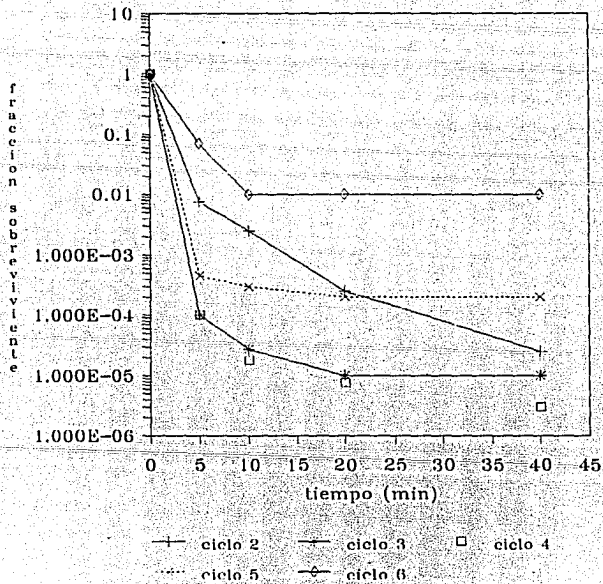
Por otro lado comparamos la sensibilidad a pirofosfato de sodio 25mM de ϕ CYph Δ 9 con la del silvestre. Como se ve en la gráfica 2, ϕ CYph es muy sensible mientras que ϕ CYph Δ 9 es casi completamente resistente.

MAPA DE RESTRICCIÓN

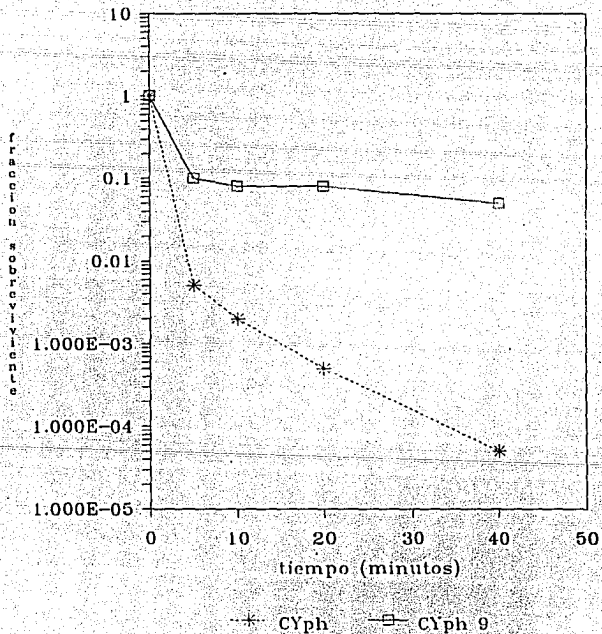
Se hizo el mapa de restricción de ϕ CYph y se ubicó la deleción de ϕ CYph Δ 9 determinando que ésta era de 4.3Kb (Fig. 7). Esto indica que ϕ CYph Δ 9 tiene potencialmente la capacidad de integrar alrededor de 4.3 kb de DNA externo a su genoma y empaquetarlo sin problemas.

RANGO DE HOSPEDEROS

Tanto ϕ CYph como su derivado ϕ CYph Δ 9 infectaron a las siguientes cepas con la misma eficiencia : *S. lividans* 1326, *S. albus* G J1074, *S. coelicolor* M145, J1501, J801, y por supuesto *S. phaeochromogenes*. Hubo problemas con ambos fagos al infectar *S. coelicolor* J1508 en la cual se



Grafica 1. Fraccion sobreviviente de cada ciclo de tratamiento a PPI 25mM.



Grafica 2. Sensibilidad a pirofosfato de sodio 25 mM de ϕ CYph y de ϕ CYph Δ 9

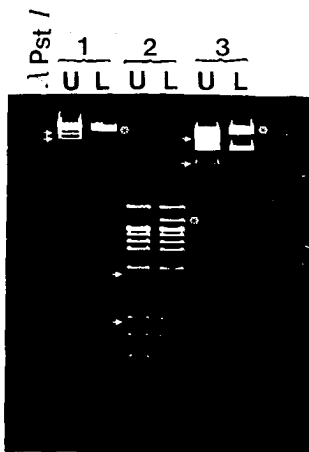


Figura 5. Determinación de extremos cohesivos.

Carril 1: DNA de ϕ CYph digerido con *Sst*I ligado (L) y sin ligar (U).

Carril 2: Lo mismo pero digerido con *Hind*III. Carril 3: Lo mismo

digerido con *Eco*RI. Las flechas señalan los fragmentos que contienen los extremos cohesivos y los asteriscos al fragmento producto de la unión de ambos.

λ 2 3 4 5 6 7 8

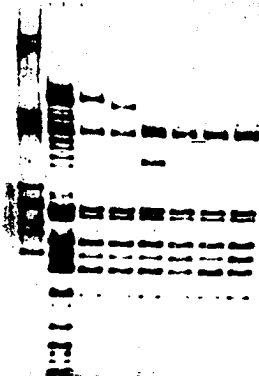


Figura 6. Mini-preparaciones de DNA de fagos aislados después de seis ciclos de tratamiento con PPI 25mM (carriles 2,3,4,6,7 y 8). El carril 2 es una digestión parcial. El carril 5 es el control (fago silvestre). En todos los demás desaparece la banda de 3.5-4 kb.

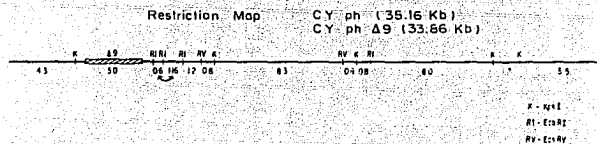


Figura 7. Mapa de restricción de ϕ CYph mostrando la delección de ϕ CYph Δ 9.

formaban muy pocas placas y no muy definidas.

En el caso particular de *S. parvulus* 2283, ésta puede ser infectada por ϕ CYph pero no por ϕ CYph Δ 9, lo que posiblemente indique que la delación se llevó algo relacionado con el reconocimiento de receptores en esta cepa.

SUB-CLONACION DEL GEN DE MELANINA

El gen de melanina de *S. antibioticus* se ligó al pIJ2925 dando lugar a un plásmido de 4.2 kb (tamaño ideal para integrar al fago), el cual se linearizó con *Kpn*I y se ligó a DNA de ϕ CYph Δ 9 digerido parcialmente con *Kpn*I. Con esta ligación se transfectaron protoplastos de *S. lividans* y se obtuvieron muchas placas, pero nunca se pudo detectar producción de melanina.

Lo más probable es que esto se deba a que todos los sitios *Kpn*I estén interrumpiendo regiones esenciales del fago, de manera que sería imposible clonar cualquier cosa en dichos sitios.

Decidimos entonces cambiar a otra estrategia más interesante, la transposición de *Tn*5096.

TRANSPOSICION DE *Tn*5096

Hubo muchos problemas para transformar con pCZA168, ya que o no transformaba (como en el caso de *S. albus*) o era muy inestable.

Logramos transformar *S. lividans*, las transformantes fueron resistentes estables a thioestreptona (Th) y a apramicina (Am), pero al hacer mini preparaciones encontrábamos que el plásmido había sufrido todo tipo de rearrreglos (Fig. 8). Tomamos el único que parecía no haber sufrido rearrreglos y con éste transformamos a *S. coelicolor*. Se obtuvieron muchas

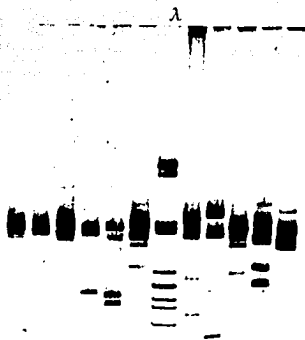


Figura 8. Mini-preparaciones de pCZA168 digeridas con *EcoRI*.

transformantes las cuales fueron infectadas con ϕ CYph Δ 9, se probaron las lisógenas pero nunca se detectó transposición.

Al analizar con más detalle los plásmidos vimos que habían sufrido deleciones en el polilinker y en un extremo del ORF B del transposon, razón por la cual nunca lograría transponer.

Por todo ésto fue que se decidió cambiar de plásmido y se ligó entonces el *Tn5096* al pIJ702. Al transformar *S. lividans* se obtuvieron transformantes estables, y todos los plásmidos analizados eran iguales y sin rearrreglos aparentes. Con ésto se transformaron varias cepas de *S. coelicolor*, se infectaron, se probaron las lisógenas, pero nuevamente no se detectó ningún evento de transposición.

Por este tiempo supimos (M.J. Bibb, comunicación personal) que varias personas habían intentado experimentos de transposición con *Tn5096* sin éxito, al igual que nosotros.

Por alguna razón *Tn5096* no transpone en *S. lividans* ni en *S. coelicolor*. Hasta ahora sólo se ha demostrado que lo haga en *S. griseofuscus* (Solenberg & Baltz, 1991). Quizá esto se deba a que el transposon por sí sólo no pueda transponer y que haya algo en *S. griseofuscus* que auxilie este evento.

Se sabe que las ISs pueden requerir componentes no codificados por ellas para transponer, por ejemplo girasas (*Tn5*), Dam metilasas, DNA polimerasa I, etc. (Galas & Chandler, 1989). Esto hace que la transposición en cierta medida dependa de la célula en la que se lleve a cabo y de los sitios de reconocimiento que tenga la IS. Los extremos de las ISs son esenciales para la transposición no sólo por el reconocimiento de la transposasa, sino también por constituir sitios de unión a proteínas, como las antes mencionadas. También hay sitios cercanos a los ORFs que

podrían estar involucrados en la regulación de su expresión.

De esta manera, la inserción del gen de resistencia a Am entre los ORFs A y B pudo haber interferido en la expresión de la transposasa ó bloqueado el reconocimiento de algún factor externo auxiliar, necesario para transponer en estas cepas.

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DEL FAGO

Se observaron ϕ CYph y ϕ CYph Δ 9 al microscopio electrónico (Fig. 9). Los fagos son básicamente iguales a todos los fagos de *Streptomyces* descritos anteriormente, perteneciendo así al grupo B de Bradley. Tienen una cabeza poliédrica, una cola larga no contráctil y una placa basal.

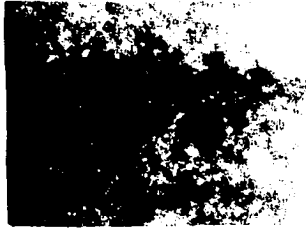


Figura 9. Actínofago ϕ CYph.

CONCLUSIONES

-Los fagos aislados en *S. lividans* que poseen sitios *SphI* no pueden infectar a *S. phaeochromogenes*.

-Los fagos aislados en *S. phaeochromogenes* parecen no tener un amplio rango de hospederos, a excepción de ϕ CYph.

- ϕ CYph pertenece al grupo B de Bradley, al igual que todos los fagos de *Streptomyces* anteriormente descritos.

-Muy probablemente los sitios *KpnI* del genoma de ϕ CYph se encuentran en regiones esenciales, por lo que es imposible usarlos como sitios de clonación.

-El plásmido pCZA168 es muy inestable en *S. lividans* y en *S. coelicolor*.

-El transposon *Tn5096* no transpone a ϕ CYph Δ 9 en *S. coelicolor*.

PERSPECTIVAS

-Para lograr meter sitios de clonación a ϕ CYph habría que intentar las siguientes estrategias:

1. Clonar el gen de melanina de la misma forma en la que se hizo pero en los sitios de *EcoRI* o *EcoRV*.
2. Clonar el gen de resistencia a algún antibiótico en los distintos sitios por si el problema fuera la expresión del gen de melanina particularmente, aunque esto sería muy raro.
3. Intentar la transposición de algún otro transposon de *Streptomyces* al fago.
4. Intentar que algún transposon de *E. coli* transponga al genoma del fago en *E. coli*.

BIBLIOGRAFIA

Ackermann, H.W. and Eisenstark, A. 1974. The Present State of Phage Taxonomy. *Intervirology* 3:201-219.

Ali, N.A. and Dale, J.W. 1986. Secretion by *Streptomyces lividans* of a cloned gram-negative beta-lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 277.

Anné, J., Wohleben, W., Burkardt, H.J., Springer, R., and Puhler, A. 1984. Morphological and Molecular Characterization of Several Actinophages Isolated from Soil Which Lyse *Streptomyces cattleya* or *S. venezuelae*. *J. Gen. Microbiol.* 130:2639-2649.

Anné, J., Verheyen, P., Volckaert, G., and Eyssen, H. 1985. A restriction endonuclease map of *Streptomyces* phage VWB. *Mol. Gen. Genet.* 200:506-507.

Berg, D.E. and Howe, M.M. 1989. Mobile DNA. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Berg, C.M. and Berg, D.E. 1981. Bacterial Transposons. In: "Microbiology-1981". Schlessinger, D. (ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 107-116.

Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31:230-314.

Brooks, J.E., Benner, J.S., Siber, K.R., Heiter, D.F., Szynter, L.A., Jager-Quinton, T., Wilson, G.G., Moran, L.S., Slatko, B.E., and Nwankwo, D.O. 1988. Cloning and characterization of the *Bam*HI restriction -modification system. *Gene* 74: 13.

Chater, K.F. and Carter, A.T. 1979. A New, Wide Host-range, Temperate Bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its Interaction with some Restriction-Modification Systems. *J. Gen. Microbiol.* 115:431-442.

Chater, K.F. and Merrick, M.J. 1979. Streptomycetes. In: Developmental Biology of Prokaryotes, Vol. 1 Parish, J.H. (ed.) University of California Press, Berkeley pp. 93.

Chater, K.F. 1980. Actinophage DNA. *Dev. Ind. Microbiol.* 21:65-74.

Chater, K.F. and Wilde, L.C. 1980. *Streptomyces albus* G mutants defective in the *Sa*GI restriction -modification system. *J. Gen. Microbiol.* 116: 323-334.

Chater, K.F., Bruton, C.J., King, A.A., and Suarez, J.E. 1982. The expression of *Streptomyces* and *Escherichia coli* drug resistance determinants cloned into the *Streptomyces* phage ϕ C31. *Gene* 19: 21-32.

Chater, K.F., Bruton, C.J., Springer, W., and Suarez, J.E. 1981. Dispensable sequences and packaging constraints of DNA from the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31. *Gene*. 15:249-256.

Chater, K.F., Bruton, C.J., Suarez, J.E., and Springer, W. 1981. *Streptomyces* Phages and Their Applications in Deoxyribonucleic Acid Cloning. In: "Microbiology -1981" Schlessinger, D. (ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 380-383.

Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 1983. *Streptomyces* Genetics. In: The Biology of Actinomycetes. Goodfellow, M., Mordarski, M., and Williams, S.T. (eds.) pp. 229-278.

Chater, K.F. 1986. *Streptomyces* Phages and Their Applications to *Streptomyces* Genetics. In: The Bacteria: A Treatise on Structure and Function, vol. IX, Antibiotic -producing *Streptomyces*, Queener, S.W. and Day, L.E. (eds.) pp. 119-158.

Cox, K.L. and Baltz, R.H. 1984. Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. J. Bacteriol. 159: 499-504.

Crawford, E.M. and Gestland, R.F. 1964. The adsorption of bacteriophage R17. Virology 22: 165-167.

Díaz, L.A., Hardisson, C., and Rodicio, M.R. 1989. Isolation and Characterization of Actinophages Infecting *Streptomyces* Species and Their Interaction with Host Restriction -Modification Systems. J. Gen. Microbiol. 135: 1847-1856.

Dowding, J.E. 1973. Characterisation of a bacteriophage virulent for *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 76: 163-176.

Fuchs, L.Y., Covarrubias, L., Escalante, L., Sanchez, S., and Bolivar, F. 1980. Characterization of a site -specific restriction endonuclease *SphI* from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Gene* 10: 39-46.

Galas, D.J. and Chandler, M. 1989. Bacterial Insertion Sequences. In: Mobile DNA. Berg, D.E. and Howe, M.M. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 109-162.

Goodfellow, M. and Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.

Greene, J. and Goldberg, R.B. 1985. Isolation and Preliminary Characterization of Lytic and Lysogenic Phages with Wide Host Range within the Streptomyces. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2459-2465.

Gusek, T.W. and Kinsella, J.E. 1992. Review of the *Streptomyces lividans*/ Vector pIJ702 System for Gene Cloning. *Critical Reviews in Microbiology.* 18: 247-260.

Hahn, D.R., Solenberg, P.J., and Baltz, R.H. 1991. Tn5099, a *xyE* Promoter Probe Transposon for *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* 173: 5573-5577.

Hanahan, D. 1985. Techniques for Transformation of *E. coli*. In: *DNA cloning*, vol.1 Glover, D.M. (ed.) IRL Press, Oxford. pp. 109-135.

Harris, J.E., Chater, K.F., Bruton, C.J., and Piret, J.M. 1983. The restriction mapping of *c* gene deletions in *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 and their

use in cloning vector development. *Gene* 22: 167-174.

Hopwood, D.A., Kieser, T., and Bibb, M.J. 1983. Plasmids, recombination and chromosomal mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2257-2269.

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.

Horinouchi, S., Nishiyama, M., Nakamura, A., and Beppu, T. 1987. Construction and characterization of multicopy expression-vectors in *Streptomyces* spp. *Mol. Gen. Genet.* 210: 468.

Howard, K.A., Card, C., Benner, J.S., Callahan, H.I., Manus, R., Silber, K., Wilson, G., and Brooks, J.F. 1986. Cloning the *DdeI* restriction -modification system using a two -step method. *Nucleic Acids Res.* 14: 7939-7951.

Ishihara, H., Nakano, M.M., and Ogawara, H. 1982. Restriction Enzyme Mapping of the DNA of *Streptomyces* Bacteriophage B and Its Deletion Derivatives. *J. Bacteriol.* 152: 1288-1291.

Katz, E., Thompson, C.J., and Hopwood, D.A. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714.

Keppel, F., Fayet, O., and Georgopoulos, C. 1988. Strategies of Bacteriophage DNA Replication. In: The Bacteriophages vol. 2 Calendar, R. (ed.) Plenum Press, New York pp. 145-262.

Kruger, D.H. and Bickle, T.A. 1983. Bacteriophage Survival: Multiple Mechanisms for Avoiding the Deoxyribonucleic Acid Restriction Systems of Their Hosts. *Microbiol. Rev.* 47: 345-360.

Kuhstoss, S., Richardson, M.A., and Rao, N. 1991. Plasmid cloning vectors that integrate site -specifically in *Streptomyces* spp. *Gene* 97: 143-146.

Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford University Press, New York. 857 pp.

Lomovskaya, N.D., Mkrumian, N.M., Gostimskaya, N.L., and Danilenko, V.N. 1972. Characterization of temperate actinophage ϕ C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Virology* 9: 258-262.

Lomovskaya, N.D., Chater, K.F., and Mkrumian, N.M. 1980. Genetics and Molecular Biology of *Streptomyces* Bacteriophages. *Microbiol. Rev.* 44: 206-229.

Lomovskaya, N.D., Sladkova, I., Klochkova, O., Orekhov, A., Chinenova, T., and Mkrumian, N. 198 . Genetic Approaches to the Development of Phage Cloning Vectors in *Streptomyces*.

Lunnen, K.D., Barsomian, J.M., Camp, R.R., Card, C.O., Chen, S.Z., Croft,

R., Looney, M.C., Meda, M.M., Moran, L.S., Nwankwo, D.O., Slatko, B.E., Van Cott, E.M., and Wilson, G.G. 1988. Cloning type -II restriction and modification genes. *Gene* 74: 25-32.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Mann, M.B., Rao, R.N., and Smith, H.O. 1978. Cloning of restriction and modification genes in *E. coli*: The *HhaI* system from *Haemophilus haemolyticus*. *Gene* 3: 97-112.

Mendez, C., Brana, A.F., Manzanal, M.B., and Hardisson, C. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* 31: 446.

Messing, J. 1979. A multipurpose cloning system based on the single - stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2: 43-48.

Meynell, E.W. 1961. A bacteriophage for motile bacteria. *Nature* 190: 564.

Muth, G., NuBbaumer, B., Wohlleben, W., and Puhler, A. 1989. A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Mol. Gen. Genet.* 219: 341-348.

Parkinson, J.S. and Husky, R.J. 1971. Deletion Mutants of Bacteriophage Lambda. *J. Mol. Biol.* 56: 369-384.

Peczynska-Czoch, W. and Mordarski, M. 1988. Actinomycete Enzymes. In: Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds.) Academic Press, USA. pp.234-236.

Pridham, T.G. and Lyons, A.J. 1962. Proposal to designate strain ATCC 3004 (IMRU 3004) as the neotype strain of *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman et Henrici. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 12: 123-126.

Rodicio, M.R., Bruton, C.J., and Chater, K.F. 1985. New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31 useful for the cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA. Gene 34: 283-292.

Rodicio, M.R. and Chater, K.F. 1988. Cloning and expression of the *Sal* I restriction -modification genes of *Streptomyces albus* G Mol. Gen. Genet. 213: 346-353.

Rodicio, M.R., Alvarez, M.A., and Chater, K.F. 1991. Isolation and genetic structure of IS112, an insertion sequence responsible for the inactivation of the *Sal* I restriction -modification system of *Streptomyces albus* G. Mol. Gen. Genet. 225: 142-147.

Sinclair, R.B. and Bibb, M.J. 1988. The repressor gene (c) of the *Streptomyces* temperate phage ϕ c31: Nucleotide sequence, analysis and functional cloning. Mol. Gen. Genet. 213:269-277.

Solenberg, P.J. and Burgett, S.G. 1989. Method for Selection of Transposable DNA and Characterization of a New Insertion Sequence, IS493, from *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 171: 4807-4813.

Solenberg, P.J. and Baltz, R.H. 1991. Transposition of Tn5096 and Other IS493 Derivatives in *Streptomyces griseofuscus*. J. Bacteriol. 173: 1096-1104.

Stuttard, C. 1989. Generalized Transduction in *Streptomyces* Species. In: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Hershberger, C.L., Queener, S.W., and Hegeman, G. (eds.) pp. 157-162 American Society for Microbiology, USA.

Suarez, J.E. and Chater, K.F. 1980. DNA cloning in *Streptomyces*: a bifunctional replicon comprising pBR322 inserted into a *Streptomyces* phage. Nature 286: 527-529.

Suarez, J.E. and Chater, K.F. 1980. Polyethylene glycol assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts. J. Bacteriol. 142: 8-14

Suarez, J.E., Caso, J.L., Rodriguez, A., and Hardisson, C. 1984. Structural characteristics of the *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 FEMS Microbiol. Lett. 22: 113-117.

Takahashi, H., Isogai, T., Morino, T., Kojima, H., and Saito, H. 1983. Development of Phage Vector Systems in *Streptomyces*. In: Genetics of

Industrial Microorganisms. Ikeda, Y. and Bappu, T. (eds.) Kodansha Ltd., Tokyo. pp. 61-65.

Wildy, P. 1971. Classification and Nomenclature of Viruses. First Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. "Monographs in Virology" No.5 Karger, Basel.

Wilson, G.G. 1988. Cloned restriction -modification systems -a review. Gene 74: 281-289.

Wright, F. and Bibb, M.J. 1992. Codon usage in the G+C -rich *Streptomyces* genome. Gene 113: 55-65.

Young, F.E., Graham, S., Yoneda, Y., and Wilson, G.A. 1980. Cloning DNA in Bacteriophage. Dev. Ind. Microbiol. 21: 13-20.