



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Expresión, purificación y evaluación de la actividad
del producto del gen SCO2863 de *Streptomyces*
coelicolor A3(2), como probable nucleasa específica
de DNA metilado

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ANAYELI SÁNCHEZ RUMBO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO: Profesor: Luis Servín González
1er SUPLENTE: Profesor: Luis Tonatihut Sánchez Linares
2do SUPLENTE: Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

En el laboratorio de Biología Molecular de *Streptomyces*, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Servín González

SUPERVISORA TÉCNICA:

M. en C. Gabriela González Cerón

SUSTENTANTE:

Anayeli Sánchez Rumbo

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A la UNAM, por darme el privilegio de formarme en sus aulas y por la educación que he recibido a través de sus profesores.

Al Dr. Luis Servín González, por haber sido mi asesor de tesis y brindarme confianza y apoyo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por su asesoría técnica, así como por su disponibilidad para enseñarme.

A la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio: Julio, Laurita, Marti, Isaí, Dany, Adair, Trini, Manuel, Jerry, Vale, Oralia, la Sra. Soco y de nuevo Gaby, por su valioso e incondicional apoyo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y principalmente por las buenas pláticas y las carcajadas.

A la Dra. Gloria Soberón y su equipo de trabajo, a quienes agradezco sus comentarios y recomendaciones durante los seminarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A los miembros del jurado, por su amable disposición para la revisión de este trabajo, así como sus observaciones y sugerencias.

DEDICATORIAS

Con mucho cariño dedico este logro:

A mi mamá Imelda Rumbo, por darme más de lo que tiene y por la libertad que me da para realizar mis sueños.

A mi papá Antonio Sánchez, por apoyar y confiar en mis decisiones. Por correr siempre a mi lado (en la vida y literalmente).

A mi hermano Omar, por su leal compañía, por la complicidad que tenemos, por los domingos y días festivos que me acompaño al laboratorio, TQM.

A toda mi familia, en especial a mi hermana Guadalupe, a mis hermanos Froilan y Francisco, a mis cuñadas y a todos mis sobrinos.

A Víctor Canseco, por su amistad y compañía. Y a la Luna de octubre porque en ella se reflejó la quietud de un milagro de todas horas.

A Rocío Cuevas y a Kenia Contreras, por ser mis hermanas a pesar de la distancia.

A mis amigos de la facultad, por todo y en especial por ese día en Xochimilco, siempre estará conmigo ese sentimiento de felicidad que tuve aquel día.

Y por supuesto a los amigos que la vida me ha regalado, por todos los momentos compartidos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Características generales de <i>Streptomyces</i> | 3 |
| 2.2 Sistemas de Modificación-Restricción..... | 4 |
| 2.2.2 Sistemas de restricción metil-específicos. | 12 |
| 2.3 Genes que codifican para probables nucleasas en el genoma de <i>S. coelicolor</i> | 13 |
| 2.4 El gen SCO2863: codifica para una probable nucleasa metil-específica. 15 | |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 17 |
| 4. OBJETIVOS | 18 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 5.1 Bacterias, plásmidos y procedimientos microbiológicos. | 19 |
| 5.2 Clonación del gen SCO2863(L) | 21 |
| 5.2.1 Clonación del gen SCO2863 (L) en el vector de expresión pET28a. 21 | |
| 5.3 Sobreexpresión de Sco2863 a pequeña escala..... | 22 |
| 5.3.1 En <i>E. coli</i> BL21(DE3) roseta | 22 |
| 5.3.2 En <i>S. lividans</i> 1326 | 23 |
| 5.4 Sobreexpresión de Sco2863 a gran escala | 24 |
| 5.4.1 En <i>E. coli</i> BL21(D3) roseta. | 24 |
| 5.5 Purificación de Sco2863 por cromatografía de afinidad..... | 24 |
| 5.6 Determinación de la actividad <i>in vitro</i> | 25 |
| 5.6.1 Digestión enzimática de DNA plasmídico por Sco2863 en presencia y ausencia de MgCl ₂ | 25 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 27 |
| 6.1 Clonación del gen SCO2863(L) | 27 |
| 6.1.1 Clonación del gen SCO2863 (L) en el vector de expresión pET28a. 27 | |
| 6.1.2 Clonación del gen SCO2863(L) en el vector de expresión pIJ4123 . 32 | |
| 6.2 Sobreexpresión de Sco2863 a pequeña escala..... | 35 |
| 6.2.1 En <i>E. coli</i> BL21(DE3) roseta | 35 |
| 6.2.2 En <i>S. lividans</i> 1326 | 36 |
| 6.3 Sobreexpresión a gran escala y purificación de Sco2863..... | 39 |
| 6.4 Determinación de la actividad <i>in vitro</i> | 42 |
| 6.4.1 Digestión enzimática de DNA plasmídico por Sco3863 en presencia de MgCl ₂ | 42 |
| 6.4.2 Digestión enzimática de DNA plasmídico por Sco2863 en ausencia de MgCl ₂ | 44 |

| | |
|------------------------------|----|
| 7. CONCLUSIONES | 47 |
| 8. REFERENCIAS | 48 |
| 9. ANEXO | 51 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| MSRS | Sistema de restricción metil-específico |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| 6xHis | Péptido con la secuencia (His) ₆ |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| DAP | Ácido diaminopimélico |
| M-R | Modificación-R restricción |
| REasa | Endonucleasa de restricción |
| MTasa | Metiltransferasa |
| SAM | S-adenosilmetionina |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| pb | Pares de bases |
| PEG | Polietilenglicol |
| PAGE-SDS | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| Ni-NTA | Níquel-ácidonitrilotriacético |
| IPTG | Isopropil- β -D-tio-galactósido |
| D.O. | Densidad óptica |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

1. RESUMEN

Streptomyces coelicolor presenta un fuerte sistema de restricción metil-específico (MSRS) por lo que no puede ser transformada con DNA metilado, lo que dificulta la manipulación genética de este microorganismo. Se piensa que los genes que codifican para este, complejo y poco estudiado MSRS, se encuentran en regiones del cromosoma adquiridas por transferencia horizontal, conocidas como islas genómicas.

El gen SCO2863, localizado en una de estas islas ha sido propuesto como un candidato para codificar una probable nucleasa de restricción metil-específica; ya que se observó que una mutante de *S. coelicolor* carente del gen SCO2863, mostró alivio parcial de la restricción de DNA metilado, mientras que la clonación del gen SCO2863 en *Streptomyces lividans*, cuyo MSRS es débil, aumentó la restricción de DNA metilado por esta especie. Además resulta de gran interés ya que a partir de un análisis bioinformático, se propuso que el producto del gen SCO2863 se conforma de un dominio de nucleasa fusionado a un dominio de helicasa, similar al de enzimas de restricción tipo I. El dominio nucleasa muestra homología con dos nucleasas (*Nuc* y *Bfil*), las cuales no requieren de cationes divalentes para su actividad (EDTA-resistentes), lo que sugirió que el producto del gen SCO2863 pertenece a este grupo.

En el presente trabajo, se clonó el gen SCO2863 en el vector de expresión pET28a de *Escherichia coli* y en el pIJ4123 vector de expresión de *Streptomyces lividans*; el uso de ambos vectores de expresión permitió fusionar en el extremo amino de la proteína una cadena de seis histidinas (6xHis).

Se determinaron los niveles de expresión y la localización de la proteína en ambos sistemas y se eligió sobreexpresar la proteína en *E. coli* BL21(DE3) roseta, por la estabilidad de la clonación y a partir de la fracción soluble del lisado celular para purificarla en condiciones nativas por cromatografía de afinidad, aprovechando la cadena de afinidad 6xHis fusionada a la proteína; para ello se utilizó una columna Ni-NTA.

Se evaluó su actividad de nucleasa contra DNA metilado y sin metilar, realizando un ensayo de digestión enzimática en presencia y ausencia de iones Mg^{2+} . Se encontró que la proteína presentó *in vitro* una actividad de endonucleasa, ya que hidrolizó los enlaces fosfodiéster de DNA plasmídico y

depende de la presencia de iones Mg^{2+} para llevar a cabo la catálisis. Sin embargo, no mostró fuerte especificidad por DNA metilado.

Aunque se encontró que requiere de iones Mg^{2+} para efectuar su actividad no se descarta la posibilidad de que la endonucleasa codificada por SCO2863 pertenezca a la misma familia que de las nucleasas EDTA-resistentes, ya que es probable que el dominio de helicasa no permita observar claramente el efecto que tiene la ausencia de iones Mg^{2+} . Será interesante estudiar sólo el dominio de nucleasa y determinar si este dominio se adoptó de *Nuc* y *BfiI* y ello signifique que represente un nuevo subtipo de enzimas de restricción.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de *Streptomyces*

El orden de los Actinomicetos es un grupo de bacterias Gram positivas con elevado contenido de citosina (C) y guanina (G) en su DNA, entre 60 y 77%. Dentro de este orden se encuentra el género de *Streptomyces*, formado por bacterias miceliales o filamentosas aerobias (Madigan y Martinko, 2006). Su forma de reproducción es a través de esporas dispuestas en pequeñas y grandes cadenas en forma de zarcillos. Su pared celular está constituida por derivados de ácido murámico y por ácido diaminopimérico (DAP; Bonifaz, 2000). Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, donde juegan un papel central en el reciclamiento del carbono al utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono (Bentley et al., 2006; Hopwood, 2000).

Asimismo, las especies del género *Streptomyces* se caracterizan por poseer un ciclo de vida complejo el cual inicia con la germinación de una spora que produce una o más hifas multigenómicas, las cuales se ramifican repetidamente, conforme se elongan, formando primero un micelio vegetativo, que crece profundamente dentro del substrato. Posteriormente, se forma el micelio aéreo que se desarrolla a expensas del micelio vegetativo, que al madurar se septa creando compartimentos unigenómicos para finalmente dar origen a una cadena de esporas las cuales fungen como la forma de resistencia y reproducción del microorganismo. Cada spora es capaz de iniciar de nuevo el ciclo de vida del microorganismo (Kieser et al., 2000; Hopwood, 2000)

El estudio de estas bacterias es de gran interés por este complejo ciclo de diferenciación morfológica que tienen, por su extraordinaria habilidad para producir antibióticos y enzimas extracelulares de gran aplicación en la medicina y la industria.

Recientemente, se ha logrado secuenciar en su totalidad los genomas de *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267, *Streptomyces scabies* 87.22, *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. La mayoría de las especies del género presenta un cromosoma lineal de aproximadamente 8 Mb, en el cual los genes esenciales y el origen de

replicación del cromosoma se localizan en el centro, mientras que los genes no esenciales se ubican en los extremos del cromosoma. Adicionalmente, presenta información genética en algunos plásmidos circulares y lineales (Kieser et al., 2000).

El estudio de las bacterias del género *Streptomyces* ha dado lugar a avances considerables en las últimas décadas, debido principalmente a la capacidad de llevar a cabo la manipulación genética de estos microorganismos. Sin embargo, esta manipulación genética llega a verse obstaculizada por la presencia de sistemas de restricción-modificación (R-M), que presentan las bacterias para protegerse contra la entrada de DNA (González-Cerón et al., 2009).

2.2 Sistemas de Modificación-Restricción.

Los sistemas de modificación-restricción (M-R) bacterianos se descubrieron por primera vez en 1950, funcionan como sistemas de defensa para las bacterias que les permite distinguir entre su DNA celular y cualquier DNA exógeno que ingrese a la célula, para atacarlo e inactivarlo (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

Los sistemas M-R funcionan a través de dos actividades enzimáticas: una endonucleasa de restricción (REasa), que reconoce una secuencia específica de DNA para llevar a cabo la hidrólisis, y una metiltransferasa (MTasa) que confiere protección frente a la restricción al añadir un grupo metilo a adeninas o citosinas, comprendidas en la misma secuencia de reconocimiento; es decir, modificando la secuencia de reconocimiento (Tock & Dryden, 2005; Furuta et al., 2010).

El DNA celular normalmente es metilado por la MTasa después de la replicación, mientras que el DNA exógeno, como fagos y plásmidos, al no estar modificado en la secuencia de reconocimiento, es inactivado por la REasa, lo inactiva por hidrólisis endonucleotífica, término que también se conoce como digestión, que consiste en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster presentes en el DNA (Tock & Dryden, 2005).

Las MTasas para llevar a cabo la metilación utilizan como donador de grupos metilo S-adenosilmetionina (SAM), produciendo S-adenosil-L-homocisteína

(SAHcy) y DNA metilado. Los sitios blanco de la metilación son sólo en ciertas posiciones de adeninas o citosinas (Bheemanaik et al., 2007). La metilación que ocurre en adeninas, se realiza sobre el grupo amino exocíclico en la posición 6 obteniendo N⁶-metiladenina (^{m6}A); mientras la que se da en citosinas puede ser tanto en el carbono 5 de la misma citosina, dando C⁵-metilcitosina (^{m5}C) , o en la posición 4 del grupo amino exocíclico, N⁴-metilcitosina (^{m4}C; Figura 1; Buryanov et al., 2005). Mientras que la mayoría de las REasas utilizan iones Mg²⁺ como cofactor, para digerir el DNA; hay otras que además necesitan de ATP, GTP y SAM (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

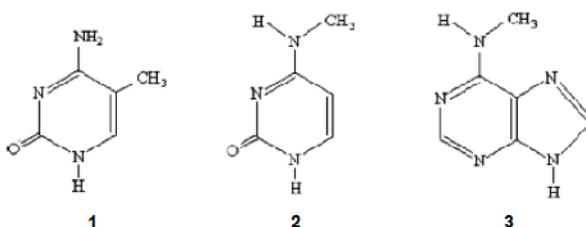


Figura 1. Estructuras químicas de bases nitrogenadas metiladas. 1: C⁵-metilcitosina. 2: N⁴-metilcitosina. 3: N⁶-metiladenina (Buryanov et al., 2005).

A partir del descubrimiento de los sistemas de M-R presentes en bacterias se han dado de manera gradual rigurosos análisis genéticos, bioquímicos y biofísicos que han contribuido de manera significativa al avance del conocimiento de estos sistemas (Tock y Dryden, 2005).

Actualmente, los sistemas de M-R se clasifican principalmente en cuatro grupos (Tabla 1), de acuerdo a la composición de sus enzimas, el sitio de reconocimiento, los cofactores que requieren, la posición de la restricción y la naturaleza de sus sustratos y productos (Gormley et al., 2005; Tock y Dryden, 2005). A continuación, se describen brevemente.

Tabla 1. Características principales de los sistemas M-R (Tock & Dryden, 2005).

| | Tipo I | Tipo II | Tipo III | Tipo IV |
|--|--|--|--|--|
| Ejemplo | <i>EcoKI</i> | <i>EcoRI</i> | <i>EcoP1I</i> | <i>EcoMcrBC</i> |
| Genes | <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i> | <i>ecorIR</i> , <i>ecorIM</i> | <i>mod</i> , <i>res</i> | <i>mcrB</i> , <i>mcrC</i> |
| Estructura cuaternaria | Tres diferentes subunidades (R, M y S). Se combinan para formar R ₂ M ₂ S ₁ y M ₂ S ₁ | Dos diferentes subunidades (R y M) Se combinan para formar R ₂ o M ₁ | Dos diferentes subunidades (Mod o Res) se combinan para formar mod ₂ res ₂ | Dos diferentes subunidades, McrB y McrC |
| Actividades enzimáticas | REasa, MTasa y ATPasa | REasa o MTasa | REasa, MTasa y ATPasa. | REasa y GTPasa |
| Cofactores requeridos para la hidrólisis de DNA. | ATP, SAM, Mg ²⁺ | Mg ²⁺ | ATP, Mg ²⁺ (SAM) | GTP, Mg ²⁺ |
| Cofactores requeridos para la metilación. | SAM | SAM | SAM | SAM |
| Secuencia de reconocimiento | Asimétrica y bipartida, e.j. <i>EcoKI</i> , 5'AAC(N ₆)GTGC | En su mayoría simétrica, e.j. <i>EcoRI</i> 5'GAATTC | Asimétrica, e.j. <i>EcoP1I</i> 5'AGACC | Bipartida y metilada, e.j. <i>EcoMcrBC</i> , 5'RmC(N ₃₀₋₄₀₀₀)RmC |
| Sitio de restricción | Variable, 1000pb del sitio de reconocimiento. | En un lugar fijo en o cerca de la sitio de reconocimiento | En un lugar fijo 25-27 pb del sitio de reconocimiento | Entre bases metiladas en sitios múltiples |
| Translocación de DNA | si | no | si | si |

Sistemas de M-R Tipo I

En los sistemas tipo I, una proteína con múltiples subunidades posee ambas actividades (restricción y modificación); ésta conformada por dos subunidades REasa (R) encargadas de la restricción, una subunidad de especificidad (S), que reconoce la secuencia específica de DNA, y dos subunidades MTasa (M), que catalizan la reacción de metilación. El símbolo de los sistemas de tipo I es *hsd*, por lo que los genes son *hsdR*, *hsdM* y *hsdS* y sus productos proteicos son HsdR, HsdM y HsdS, respectivamente. Los productos proteicos pueden ser designados en forma abreviada omitiendo Hsd (Roberts et al., 2003; Tock & Dryden, 2005).

El sitio de reconocimiento en el DNA es una secuencia bipartida y asimétrica; consiste en dos secuencias pequeñas de 3 y 4 bases separadas por una no específica de longitud conservada. Dependiendo del estado de metilación en este sitio, el complejo multimérico puede funcionar como una REasa o una MTasa. El DNA completamente metilado es inmune a la restricción; sin embargo, cuando sólo una cadena del DNA está metilada, la MTasa se estimula y metila la cadena faltante. El DNA no metilado es blanco de restricción (Figura 2; Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

La MTasa requiere de SAM para metilar la posición N⁶ de la adenina comprendida en la secuencia de reconocimiento, además de ATP y Mg²⁺.

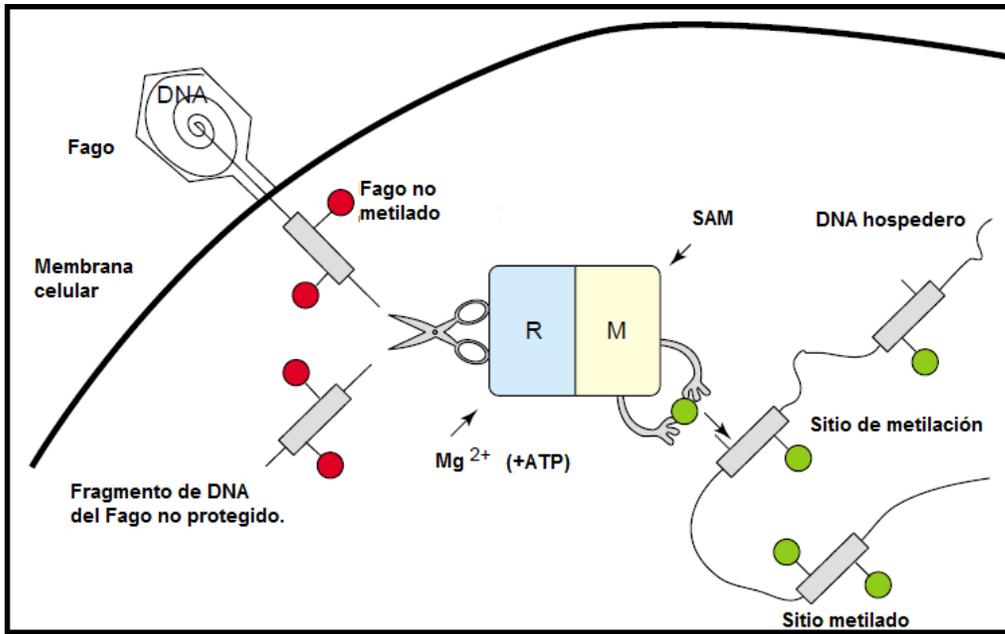


Figura 2. Función de las enzimas del sistema de R-M tipo I. Estas enzimas reconocen el estado de metilación de la secuencia específica. El DNA completamente metilado (que se muestra como dos círculos verdes en la secuencia del DNA hospedero) es reconocido como parte del genoma de la bacteria. El DNA hemimetilado (un solo círculo verde en la secuencia del hospedero) es reconocido como DNA recién replicado, y la MTasa (M) modifica la otra cadena por metilación, usando el SAM como cofactor. Sin embargo, el DNA exógeno, por ejemplo, DNA de un fago, por lo general carece de modificación específica (círculos rojos en la secuencia específica de DNA del fago) y es reconocida por la REasa (R) para digerirlo en fragmentos inofensivos (Tock & Dryden, 2005).

La restricción ocurre en un sitio lejano a la secuencia de reconocimiento, incluso a cientos o miles de pares de bases de dicha secuencia. Se ha propuesto que la REasa se une a la secuencia de reconocimiento y a una secuencia no específica cercana a esta. Aunque sigue unido al sitio de reconocimiento, se transloca a lo largo del DNA no específico en un proceso ATP-dependiente, desplazando al DNA adyacente en un "bucle" que se expande a medida que avanza. La REasa digiere el DNA cuando la translocación es detenida. Esto puede ocurrir cuando dos translocaciones de enzimas, inicialmente ubicadas en diferentes sitios colisionan entre sí (Gormley et al., 2005).

Las subunidades R de la REasa poseen motivos, conocidos como cajas DEAD, altamente conservadas en muchas helicasas ATP-dependientes. Esto plantea

la posibilidad de que tales motivos estén implicados en la unión e hidrólisis del ATP necesarios para la translocación del DNA por una REasa, además de que este proceso sea similar al realizado por DNA-helicadas, aunque todavía no hay evidencia de separación de cadenas del DNA por las REasas tipo I (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

Criterios como la complementación genética, hibridación DNA-DNA, homología de proteínas y reactividad cruzada de anticuerpos, son usados para clasificar a los miembros de este sistema, hasta la fecha se dividen en cinco familias (IA-IE). Los miembros de la familia IC generalmente se encuentran codificados en plásmidos mientras que los de las familias IA, IB, ID, IE se codifican en el cromosoma bacteriano. La familia IE se diferencia en que la subunidad de especificidad (S) no presenta el mismo grado de homología que muestran las demás familias. Se han descrito una serie de enzimas híbridas creadas de forma artificial, que frecuentemente presentan nuevas especificidades (Titheradge et al., 2001; Roberts et al., 2003; Chin et al., 2004).

Sistemas de M-R Tipo II

La mayoría de los sistemas tipo II están conformados por dos proteínas independientes que realizan la actividad de restricción (REasa) y modificación (MTasa), respectivamente. Tales proteínas no presentan homología a pesar de que reconocen la misma secuencia de DNA (Gormley et al., 2005).

Algunas REasas tipo II son activas como homodímeros, aunque también pueden actuar como monómeros o tetrámeros; son clasificadas dentro de 11 subgrupos (Tabla 2). Mientras que las MTasas tipo II suelen actuar como monómeros (Tock & Dryden, 2005).

LA REasa y la MTasa, como se mencionó, reconocen la misma secuencia de DNA, la cual es generalmente palindrómica entre 4 y 8 pares de bases (pb). Todas las REasas digieren dentro o cerca de esta secuencia específica de DNA. Aunque las REasas clasificadas como tipo IIs reconocen secuencias asimétricas y restringen el DNA a distancias cortas del sitio de reconocimiento (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

Es importante resaltar que a diferencia de los diferentes subtipos, el IIm reconoce una secuencia específica de DNA metilado y restringe en un sitio definido (Tabla 2).

En presencia de Mg^{2+} , la restricción de DNA por las REasas tipo II es extraordinariamente específica. La MTasa requiere SAM.

Tabla 2. Subtipos de Rasas tipos II (Roberts et al., 2003).

| Subtipo ^a | Característica | Ejemplos | Secuencia de reconocimiento |
|----------------------|--|---|---|
| A | Secuencia de reconocimiento asimétrica (palindrómica) | <i>FokI</i> <i>AcI</i> | GGATG(9/13) ^b CCGC(-3/-1) |
| B | Corta en ambos lados de la secuencia de reconocimiento en ambas cadenas | <i>BcgI</i> | (10/12) CGANNNNNNTGC (12/10) |
| C | Secuencia de reconocimiento simétrica y asimétrica R y M funcionan como un solo polipéptido. | <i>GsuI</i> <i>HaeIV</i> | CTGGAG (16/14) (7/13) GAYNNNNNRTC(14/9) |
| E | Dos secuencias de reconocimiento, sólo una es restringida. | <i>EcoRII</i> <i>NaeI</i> | ↓CCWGG GCC↓GGC |
| F | Dos secuencias de reconocimiento ambas son restringidas. | <i>SfiI</i> <i>SgrAI</i> | GGCCNNNN↓NGGCC CR↓CCGGYG |
| G | Secuencia de reconocimiento simétrica y asimétrica. Afectada por SAM | <i>BsgI</i> <i>Eco57I</i> | GTGCAG(16/14) GTGAAG(16/14) |
| H | Secuencia de reconocimiento simétrica y asimétrica. Similar a la estructura de los genes de tipo I | <i>AhdI</i> | GACNNN↓NNGTC |
| M | Subtipo IIP o IIA. Requiere que la secuencia de reconocimiento este metilada | <i>DpnI</i> | Gm6A↓TC |
| P | Secuencia de reconocimiento y sitios de corte simétricos. | <i>EcoRI</i> <i>PpuMI</i> <i>BsII</i> | G↓AATTC RG↓GWCCY CCNNNNN↓NNGG |
| S | Secuencia de reconocimiento y sitios de corte asimétricos. | <i>MmeI</i> | TCCRAC(20/18) |
| T | Secuencia de reconocimiento simétrica y asimétrica. Los genes R son heterodímeros | <i>Bpu10I</i> <i>BsII</i> | CCTNAGC (-5/-2) CCNNNNN↓NNGG |

a. No todos los subtipos son mutuamente excluyentes. Por ejemplo *BsII* es del subtipo P y T. ; b. El primer número entre paréntesis indica el sitio de restricción en la cadena escrita y el segundo número indica la posición del sitio de restricción en la cadena complementaria. ; el símbolo ↓ indica el sitio de corte

Sistemas de M-R tipo III

Estos sistemas se encuentran formados por un complejo hetero-oligomérico conformado por una subunidad “Mod” encargada del reconocimiento del sustrato y de la modificación, y una subunidad de restricción “Res”, que sólo se activa cuando se asocia en un complejo res_2mod_2 (Tock & Dryden, 2005).

La secuencia de reconocimiento tiene de cinco a seis pb asimétricas, la metilación se produce en sólo una de las adeninas presentes en la secuencia y, únicamente de un lado de la cadena, generando una molécula de DNA hemimetilado. En todos los casos la subunidad Mod es capaz de actuar independientemente de su subunidad Res (Tock & Dryden, 2005).

Mientras que la restricción involucra dos complejos de enzima Mod-Res unidos a dos sitios de DNA en cadenas opuestas (de 5 -6 pb de su secuencia de reconocimiento), al igual que con la enzimas de M-R tipo 1, la restricción es precedida por la translocación del DNA en la que los dos complejos Mod-Res se mantienen unidos a su secuencia de reconocimiento. Cuando es bloqueada la translocación de DNA, o bien, cuando los dos complejos colisionan inicia la restricción en cada una de las cadenas de DNA por cada complejo Mod-Res, aproximadamente a 25 ó 27 pares de bases después del sitio de reconocimiento (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

Para la modificación se requiere SAM y la restricción depende de la presencia de Mg^{2+} y ATP.

Este tipo de sistema de M-R ha sido descrito recientemente, se han identificado exclusivamente en fagos y en bacterias Gram negativas, los ejemplos mejor estudiados son *EcoP1I* y *EcoP15I* (Gormley et al., 2005; Tock & Dryden, 2005).

Enzimas de restricción tipo IV.

Estos sistemas se componen de uno o dos genes que codifican para REasas que restringen sólo DNA modificado. Sus secuencias de reconocimiento no ha sido bien definidas, excepto para *McrBC* de *E. coli* K12, la cual reconoce dos copias de una secuencia de dinucleótidos: una adenina seguida de una citosina metilada en la posición N4 ó C5, las cuales están separadas por entre 40 y

3000 nucleótidos. La restricción se da a 30 pb de distancia de la secuencia de reconocimiento. No se consideró conveniente incluir a esta enzima en las enzimas IIm, porque no se tiene bien definido la secuencia de reconocimiento y sitios de corte, que es la base de esta clasificación (Roberts et al., 2003).

Al igual que en los sistemas de tipo I M-R la McrBC sigue estando unido a su secuencia de reconocimiento durante la translocación, el bloqueo de dicha translocación inicia la restricción, requiriendo Mg^{2+} , GTP y, probablemente, SAM (Tock & Dryden, 2005).

2.2.2 Sistemas de restricción metil-específicos.

A partir de la descripción anterior de los tipos de sistemas de M-R presentes en bacterias podemos concluir que existen principalmente dos diferentes grupos de sistemas de M-R: aquellos en los que el DNA celular es protegido de la restricción por la modificación de adeninas o citosinas dentro de las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción (sistemas tipo I, II, III) y los que restringen sólo DNA modificado, mientras que el DNA celular evita la restricción al no modificarse (sistemas tipo IIm, IV).

De esta forma, se define un sistema de restricción metil-específico (MSRS), como aquel que depende de la modificación del DNA para realizar la restricción. Principalmente, se ha identificado este sistema en bacterias como *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, en micoplasmas como *Acholeplasma laidlawii* y en varias especies del género *Streptomyces* como *Streptomyces avermitilis* (MacNeil 1988., Bickle & Kruger, 1993).

S. avermitilis es la especie mejor estudiada del género *Streptomyces* en cuanto a la presencia de este MSRS. Restringe DNA purificado de cepas de *E. coli* que expresan los sistemas de modificación Dam y Dcm (Dam metila la adenina de la secuencia GATC. Dcm metila la segunda citosina de la secuencia CC(A/T)GG). A diferencia de los sistemas de restricción metil-específicos de *E. coli* y de *A. laidlawii*, el que presenta *S. evermitilis* es más restrictivo (MacNeil, 1988; Bickle & Kruger, 1993; González-Cerón et al., 2009).

S. lividans también presenta un MSRS, sin embargo es laxo, ya que sólo restringe parcialmente DNA metilado en adeninas (MacNeil, 1988; González-Cerón, et. al., 2009).

2.2.3 En *Streptomyces coelicolor*

Los estudios reportados sobre el MSRS presente en varias especies de *Streptomyces*, no incluyen a *Streptomyces coelicolor* A3(2), la cepa modelo del género y la mejor conocida a nivel genético y molecular (Bentley et al., 2002).

Recientemente, el grupo del Dr. Servín, analizó las características de la restricción de DNA metilado por esta especie. Se observó que *S. coelicolor* A3(2) no puede ser transformada con DNA metilado. En particular, el DNA purificado de cepas de *E. coli* es fuertemente restringido, ya que como se mencionó *E. coli* cuenta con tres sistemas de metilación de DNA: el sistema Dam, el sistema Dcm y el sistema Hsd. Los sistemas Dam y Hsd metilan adeninas en secuencias específicas: Dam metila en adeninas en secuencias GATC y Hsd metila adeninas presentes en la secuencia AAC(N)₆GTGC. En contraste, *S. coelicolor* puede ser transformada con DNA proveniente de cepas que no cuentan con sistemas de modificación (González-Cerón et al., 2009).

También, en este estudio se analizó la participación de genes que recientemente han sido propuestos como posibles candidatos para codificar nucleasas involucradas en el MSRS de *S. coelicolor*, los resultados obtenidos apoyan la idea de que el MSRS de *S. coelicolor* es un sistema complejo y que la restricción resulta de la suma de actividades de diversas nucleasas de variada fuerza y especificidad (González-Cerón et al., 2009).

2.3 Genes que codifican para probables nucleasas en el genoma de *S. coelicolor*.

La secuencia del genoma de *S. coelicolor* reveló información sobre las adaptaciones de este microorganismo para vivir en un ambiente tan complejo como el suelo. El cromosoma derivado de un ancestro común entre actinomicetos, probablemente se expandió al incorporar secuencias que le beneficiaban por transferencia horizontal. El conjunto de genes adquiridos le

permitió presentar un ciclo de vida complejo, adaptarse a diversas condiciones del medio ambiente, a utilizar diversas fuentes de nutrientes (Bentley et al., 2002) y, probablemente, al desarrollo de sistemas restricción metil específicos (González-Cerón et al., 2009).

Recientemente, se realizó una comparación de los genomas de *S. coelicolor* y *S. lividans*. Este estudio confirmó que el cromosoma de *S. coelicolor* contiene segmentos genómicos adquiridos por transferencia horizontal. Se identificaron distintos grupos de genes conocidos como islas o islotes genómicos, que proporcionan diferencias fenotípicas como es el MSRS diferente en ambas especies a pesar de ser estrechamente relacionadas (Jayapal et al., 2007).

Específicamente, *S. coelicolor* presenta cinco islas genómicas (GIs) (>25kb) y 18 islotes genómicos (Gis) (<25kb), ausentes en *S. lividans* que como se mencionó presenta un MSRS muy débil. Por lo tanto, genes ubicados en estas islas probablemente codifican para el fuerte MSRS de *S. coelicolor* (González-Cerón et al., 2009).

Los genes SCO4213, SCO4631 y SCO2863, así como el operón SCO3261-SCO3262, ubicados en estas islas genómicas, se identificaron como posibles candidatos para codificar nucleasas de restricción metil-específicas. En el estudio del MSRS de *S. coelicolor* realizado por el grupo del Dr. Servin ya mencionado (González-Cerón et al., 2009), se confirmó la participación de estos genes en el MSRS: una mutante de *S. coelicolor* carente de estos genes identificados, mostró alivio parcial de la restricción de DNA metilado, mientras que la clonación de estos genes en *S. lividans* aumentó la restricción de DNA metilado por esta especie (Jayapal et al., 2007; González-Cerón et al., 2009).

Sin embargo, como se mencionó el MSRS de *S. coelicolor* es muy complejo y se piensa que no toda la actividad de restricción puede atribuirse a estos genes y que nucleasas hasta el momento no identificadas participan en la restricción de DNA metilado por este microorganismo (González-Cerón et al., 2009).

2.4 El gen SCO2863: codifica para una probable nucleasa metil-específica.

El estudio de la restricción de DNA metilado *in vivo* por *S. lividans* llevando clonados los genes SCO4213, SCO4631 y SCO2863, SCO3261-SCO3262, el gen SCO2863 presentó el efecto más fuerte en la restricción de DNA metilado (metilado en citosinas; González-Cerón et al., 2009).

Este gen ubicado en el islote genómico Gi-3 es de especial interés ya que un análisis bioinformático reveló que el extremo-carboxilo de la proteína para la que codifica es homólogo al dominio de helicasa de la enzimas de restricción tipo I (hdsR) además de poseer motivos conservados en las helicasas tipo DEx(D/H) (Figura 3). Mientras que en el extremo amino, el producto del gen mostró similitud con la endonucleasa EDTA-resistente *Nuc* de *Salmonella typhimurium* y con el dominio de nucleasa de *Bfil* de *Bacillus firmus* (González-Cerón et al., 2009).

| | | I | | Ia | | II | | III | |
|---------|-----|----------|------|-----------|------|-----------|------|------------|-------|
| SCO2863 | 246 | AATGTGKT | (25) | HRKEIL | (57) | DEFH | (22) | TAT | (92) |
| HsdR | 489 | MATGTGKT | (23) | DRRSLG | (66) | DEAH | (23) | SAY | (124) |
| Motif | | AxTGoGKT | | PTRELA | | DEAD | | SAT | |

| | | IV | | V | | VI | |
|---------|--|-----------|------|-----------|------|-----------|-----|
| SCO2863 | | LGFCVTKAH | (44) | VDLFNEGLD | (20) | QQIGRGIR | 552 |
| HsdR | | LVFCVTNAH | (56) | VDLLTTGVD | (20) | QMKGRATR | 847 |
| Motif | | IIFhxT+cx | | TDVuARGID | | HRIGRTGR | |

Figura 3. Alineamiento de motivos de helicasas en el producto del gen SCO2863. Alineamiento de la regiones en SCO2863 y HsdR que corresponde a la motivos conservados presentes en la familia de helicasas DEx(D/H). Los aminoácidos idénticos en cualquier secuencia de las proteínas y motivos conservados se muestran en fondo negro. Los números en paréntesis indican el número de aminoácidos entre los motivos. X= algún aminoácido; c=D, E, H, K, R; o=S, T; h=A, F, G, I, L, M, P, V, W, Y; + = H, K,R; u=A, G .(González-Cerón et al., 2009).

La nucleasa *Nuc* de *S. typhimurium* es inespecífica y requiere de cationes divalentes para efectuar su catálisis, como las REAsas de los diferentes sistemas de restricción, sin embargo, conserva (en menor grado) su actividad en presencia de EDTA; es decir, presenta una actividad de endonucleasa

EDTA-resistente (Pohlman et al., 1993). Asimismo, *Bfil* no requiere de cationes divalentes para la catálisis, aunque a diferencia de *Nuc*, reconoce una secuencia específica de DNA y corta en la cadena complementaria de DNA, 5 ó 4 nucleótidos después de la secuencia de reconocimiento. Probablemente, representa un nuevo subtipo de REasas tipo IIs, y quizás se originó de la fusión de la nucleasa *Nuc* con un dominio de reconocimiento de DNA (Sapranaukas et al., 2000).

Además, el producto del gen SCO2863 mantiene 82% de identidad con el producto del gen SAV5202 de *S. avermitilis* especie que como se mencionó presenta un sistema de restricción metil-específico. Ambas proteínas contienen aminoácidos homólogos a los involucrados en el sitio activo de *Nuc*, que se conservan también en *Bfil*. (Figura 4).

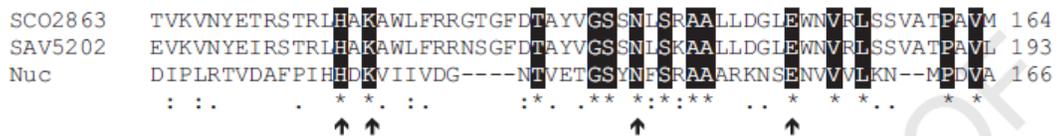


Figura 4. Alineamiento de nucleasas en el producto del gen SCO2863. El amino-terminal del gen SCO863 de *S. coelicolor* y el producto del gen SAV5202 de *S. avermitilis* se alinéó con la región del sitio activo de la proteína Nuc de *S. typhimurium*. Aminoácidos idénticos se muestran en fondo negro, la flecha y los puntos indica los aminoácidos implicados en sitio activo de *Nuc*.(González-Cerón et al., 2009).

Por lo anterior, el producto del gen SCO2863 aparenta ser un nuevo tipo de nucleasa metil-específica en el que un dominio *Nuc* está fusionado a un dominio de helicasa de las enzimas de restricción tipo I (*hsdR*), que probablemente, no requiera de cationes divalentes para su actividad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos en el laboratorio de investigación del Dr. Luis Servín enfocados en analizar el sistema de restricción metil específico (MSRS) de *S. coelicolor* A3(2) mostraron que *S. coelicolor* presenta un fuerte MSRS; el DNA purificado de cepas de *E. coli* que metilan en sitios *dam*, *dcm* y *hsd* es fuertemente restringido (González-Cerón et al, 2009). Mientras *S. lividans*, una especie estrechamente relacionada a *S. coelicolor*, presenta un débil MSRS, sólo cortando parcialmente DNA metilado en adeninas (MacNeil, 1998).

Además, se identificó y confirmó la participación del gen SCO2863 en el MSRS de *S. coelicolor*; una mutante de *S. coelicolor* carente del gen SCO2863, mostró alivio parcial de la restricción de DNA metilado, mientras que la clonación del gen SCO2863 en *S. lividans* aumentó la restricción de DNA metilado por esta especie.

Un análisis bioinformático reveló que el producto del gen SCO2863 aparenta ser un nuevo tipo de nucleasa conformada por un dominio de helicasa similar al de las enzimas de restricción tipo I (*hdsR*) fusionado a un dominio *Nuc* similar a los dominios de dos nucleasas (*Nuc* y *Bfil*); los cuales presentan actividad en ausencia de cationes divalentes, esto es muy interesante ya que la mayoría de las enzimas con actividad de nucleasa requieren de cationes divalentes para efectuar su catálisis.

El presente trabajo tiene como finalidad determinar si el producto del gen SCO2863 es una nucleasa específica de DNA metilado *in vitro*, así como establecer si pertenece al grupo de nucleasas que no requieren cationes divalentes para su catálisis (EDTA-resistentes). Todo con el fin de aportar evidencia de manera más directa, sobre la participación de esta proteína en el MSRS de *S. coelicolor*.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si el producto del gen SCO2863 es una nucleasa metil-específica *in vitro*, así como establecer si requiere de iones Mg^{2+} para su catálisis.

Objetivos particulares

1. Clonar el gen SCO2863 en los vectores de expresión pET28a y pIJ4123.
2. Sobreexpresar el producto del gen SCO2863 en *E. coli* BL21(DE3) roseta y *S. lividans*.
3. Purificar la probable nucleasa por cromatografía de afinidad Ni-NTA.
4. Evaluar su probable actividad de nucleasa contra DNA metilado y sin metilar, en presencia y ausencia de iones Mg^{2+} .

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bacterias, plásmidos y procedimientos microbiológicos.

Las cepas de *E. coli* y de *Streptomyces*, así como los plásmidos utilizados en el presente trabajo se muestran en la tablas 3 y 4.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en los medios de cultivo YT2X y Luria-Bertani a 37°C. La transformación con DNA plasmídico y la purificación de plásmidos se realizó bajo procedimientos estándar (ver anexo; Sambrook et al, 2001; Inoue et al., 1990).

Los medios y condiciones de crecimiento de las cepas de *Streptomyces*, la preparación de esporas y protoplastos, así como la transformación con polietilenglicol (PEG) se realizó de acuerdo al método de Kieser et al (2000; ver anexo), excepto que la regeneración de los protoplastos se llevó a cabo cubriéndolos con una capa de agar suave hipertónico.

Tabla 3. Cepas empleadas.

| Cepa | Descripción | Referencia |
|---------------------------|--|-----------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5α | <i>F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁻</i>) | Grant, 1990 |
| BL21(DE3) roseta | Para sobreexpresar proteínas, Crn ^R | Novagen |
| BW25113 | <i>lacI^qrrnB_{T14}ΔlacZ_{WJ16}hsdR514ΔaraBAD_{AH33}ΔrhaBAD_{LD78}</i> . Para obtener DNA plasmídico metilado completamente | Baba et al., 2006 |
| IBEC55 | Δ <i>dcm</i> Δ <i>hsdRMS</i> derivada de BW25113. Para obtener DNA plasmídico metilado sólo en sitios <i>dam</i> (Dam+) | González-Cerón et al., 2009 |
| IBEC56 | Δ <i>dam</i> Δ <i>hsdRMS</i> derivada de BW25113. Para obtener DNA plasmídico metilado sólo en sitios <i>dcm</i> (Dcm+) | González-Cerón et al., 2009 |
| IBEC57 | Δ <i>dam</i> Δ <i>dcm</i> derivada de BW25113. Para obtener DNA plasmídico metilado solo en sitios <i>hsd</i> (Hsd+) | González-Cerón et al., 2009 |
| IBEC58 | Δ <i>dam</i> Δ <i>dcm</i> Δ <i>hsdRMS</i> derivada de BW25113. Para obtener DNA plasmídico no metilado. | González-Cerón et al., 2009 |
| <i>S. lividans</i> | | |
| 1326 | Silvestre | John Innes Centre |

Tabla 4. Plásmidos empleados en el presente trabajo.

| Plásmido | Descripción. | Referencia |
|----------|---|---------------------|
| pGS1 | Clona original que lleva el gen SCO2863 flanqueado por dos fragmentos de 2kpb del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> | Este trabajo |
| pGS2 | Versión corta (S) del gen SCO2863 proveniente de pGS1, clonado en un pUC18 con los sitios <i>XbaI</i> y <i>HindIII</i> , para realizar subclonación. | Este trabajo |
| pGS3(S) | Gen SCO2863 (S) de pGS2 clonado en el vector de expresión pET28a con los sitios <i>NdeI HindIII</i> , Kan ^R | Este trabajo |
| pGSS1 | Fragmento de 442 pb <i>XbaI</i> - <i>EcoR1</i> proveniente del pGS1 clonado en pUC18 necesario para la construcción de versión larga (L) del gen SCO2863. | Este trabajo |
| pGSS2(L) | Versión larga (L) del gen SCO2863: fragmento <i>NdeI-EcoR1</i> del pGSS1 clonado en pGS3(S) | Este trabajo |
| pGSS3 | Gen SCO2863 (S) de pGS3(S) clonado en el pIJ6021 en los sitios <i>NdeI-HindIII</i> para realizar subclonación | Este trabajo |
| pGSS4 | Gen SCO2863 (L) de pGSS2 clonado en el pIJ6021 en los sitios <i>NdeI-HindIII</i> para realizar subclonación. | Este trabajo |
| pGSS5(S) | Gen SCO2863 (S) clonado en el vector de expresión pIJ4123 en los sitios <i>NdeI-BamI</i> | Este trabajo |
| pGSS6(L) | Gen SCO2863 (L) clonado en el vector de expresión pIJ4123 en los sitios <i>NdeI-BamI</i> | Este trabajo |
| pET28a | Vector de expresión, 6xHis, Kan ^R | Novagen. |
| pIJ6021 | Derivado del pIJ101, vector de expresión Kan ^R , contiene el promotor inducible con tioestrepiton <i>tipA</i> | Takano et al., 1995 |
| pIJ4123 | Derivado del pIJ6021, vector de expresión Kan ^R , que contiene en una secuencia que codifica una cadena 6xHis en el N-terminal, permitiendo la producción de proteínas de fusión que pueden ser purificadas con una columna de afinidad Ni con promotor inducible <i>tipA</i> seguido de un sitio múltiple de clonación. | Takano et al., 1995 |

5.2 Clonación del gen SCO2863(L)

5.2.1 Clonación del gen SCO2863 (L) en el vector de expresión pET28a

El gen SCO2863 contiene dos sitios de inicio potenciales, por lo que existen dos versiones del gen: versión corta SCO2863(S) y versión larga SCO2863(L). Previamente, en el laboratorio se logró clonar la versión corta del gen en el vector de expresión pET28a, dando origen al plásmido pGS3(S). Por lo que el presente trabajo inició con la clonación de la versión larga del gen en el vector de expresión pET28a. Para ello, se utilizó el plásmido pGS1 como fuente del fragmento del gen SCO2863 (470-pb) que se requería.

- 1) Se amplificó por PCR el fragmento de 470pb, con los oligonucleótidos: forward (5'GATCTAGACATATGCCCGCCGCCT-3') y reverse (5'-CCGAATTCGCGCACGAAT-3'). Los cuales se diseñaron a partir del análisis de la secuencia río-arriba del inicio de la proteína reportado. Con estos se logró introducir los sitios de restricción *NdeI*, *XbaI* y *EcoRI* (subrayados). La amplificación se realizó con DNA polimerasa *Pfu Ultra*.
- 2) El producto de PCR se digirió con *XbaI* y *EcoRI* y se clonó en pUC18 para obtener el plásmido pGSS1.
- 3) Se transformó a *E. coli* DH5 α con este plásmido, por electroporación.
- 4) Se seleccionó una colonia que contenía el plásmido correcto, dicho plásmido se amplificó y se purificó y se mandó a secuenciar, a la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología con la Dra. Laura Ongay.
- 5) Se digirió con *NdeI* y *EcoRI*, el fragmento *NdeI-EcoRI* se subclonó en pGS3(S), generando al plásmido pGSS2(L)
- 6) Se transformó el plásmido pGSS2(L) en *E. coli* BL21 (DE3) roseta en medio LB-agar, se seleccionó una colonia que contenía el plásmido, se creció y se preservó en glicerol al 20% para su posterior uso en los experimentos de sobreexpresión.

El uso del vector de expresión pET28a en esta construcción (pGSS2(L)), permitió colocar en el extremo amino de la proteína una cadena 6xHis, ésta actuó como una cadena de afinidad específica que facilitó la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.

5.2.2 Clonación del gen SCO2863(L) en el vector de expresión pIJ4123

- 1) Se transformó *E. coli* IBEC58 con el plásmido pGSS2(L).
- 2) Se seleccionó una colonia que contenía el plásmido correcto, se amplificó y se purificó el plásmido, de esta manera se obtuvo el pGSS2(L) no metilado (así se facilitó la transformación en *Streptomyces*).
- 3) El pGSS2(L) no metilado se digirió con *NdeI* y *HindIII*, el fragmento originado se clonó en el pIJ6021, generando el plásmido pGSS4.
- 4) El pGSS4 se digirió *NdeI-BamHI* y se subclonó en el pIJ4123, formando el pGSS6(L). Este último plásmido se transformó en *S. lividans* 1326, se seleccionó una colonia que contenía el plásmido, se obtuvieron esporas de dicha colonia y se preservaron en glicerol al 20% para su posterior uso en los experimentos de sobreexpresión.

El uso del vector de expresión pIJ4123 también permitió fusionar una cadena 6xHis a la secuencia de la proteína en el extremo amino que facilitó su purificación mediante cromatografía de afinidad.

5.3 Sobreexpresión de Sco2863 a pequeña escala

5.3.1 En *E. coli* BL21(DE3) roseta

Para determinar los niveles de expresión del gen en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) roseta que contiene el pGSS2(L) y la fracción en la que se ubica la proteína:

- 1) Se inoculó una colonia de esta cepa en 5mL de YT2X, con kanamicina 25 µg/mL y cloranfenicol 50µg/mL y se incubó a 37°C hasta saturación, como precultivo.
- 2) Se inoculó con 0.3 mL de precultivo 5mL de medio y se incubó a 37°C hasta D.O de 0.6.
- 3) Se indujo la expresión agregando isopropiltiogalactósido (IPTG) 0.1 mM y se incubó a 18°C durante 6h.
- 4) Se colectaron muestras a las 2h y 6h. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5min. El *pellet* de células se lavó y se resuspendió en 500 µL de buffer de fosfatos (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, pH=8) y se lisó por sonicación.

- 5) El extracto celular obtenido se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, para separar las fracciones soluble e insoluble. La fracción insoluble se lavó y se solubilizó en 500µL de buffer de fosfatos-urea (NaH₂PO₄ 100mM, urea 8M pH= 6.3)
- 6) A ambas fracciones se les agregó buffer de tratamiento 2x (0.125M Tris-HCl pH= 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%) y se realizó un análisis por PAGE-SDS para verificar la presencia de la proteína. Se utilizó un gel separador al 7%. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford, con albúmina sérica bovina como estándar.

Como control se realizó el mismo procedimiento sin inducir el cultivo.

5.3.2 En *S. lividans* 1326

Para determinar los niveles de expresión del gen en la cepa de *S. lividans* que contiene el pGSS6(L) y la fracción en la que se ubica la proteína:

- 1) Se inoculó con esporas de esta cepa un cultivo de 25 mL de medio LB con sacarosa al 34% y kanamicina 25µg/µL a D.O. inicial de 0.2 a 450nm. Se incubó a 30°C con agitación constante hasta una D.O de 0.7.
- 2) Se indujo la expresión agregando tioestreptón 20µg/mL y se incubó a 30°C.
- 3) Se colectaron muestras de 1 mL a diferentes tiempos (4h-48h). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos. El *pellet* de células se lavó y se resuspendió en 500 µL de buffer de fosfatos (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, pH=8) y se lisó por sonicación.
- 4) El extracto celular obtenido se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min para separar las fracciones soluble e insoluble. La fracción insoluble se lavó y se solubilizó en 500µL de buffer de fosfatos-urea (NaH₂PO₄ 100mM, urea 8M pH= 6.3).

A ambas fracciones se les agregó buffer de tratamiento 2x (0.125M Tris-HCl pH= 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%) y se realizó un análisis por PAGE-SDS, para verificar la presencia de la proteína. Se utilizó un gel separador al 7%, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie. La

concentración de proteína se determinó con el método de Bradford, con albúmina sérica bovina como estándar.

Como control se realizó el mismo procedimiento sin inducir el la expresión del gen recombinante.

5.4 Sobreexpresión de Sco2863 a gran escala

5.4.1 En *E. coli* BL21(D3) roseta.

Una vez observado que la proteína se expresó correctamente se eligieron las condiciones óptimas para sobreexpresar una adecuada cantidad de proteína en fracción soluble.

- 1) Se cultivó una colonia de la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta con el plásmido pGSS2(L) en 5 mL de YT2X con kanamicina 25 µg/mL de y cloranfenicol 50µg/mL hasta saturación, como precultivo.
- 2) Se inocularon con 2.5 mL del precultivo dos matraces de 300mL con YT2X cada uno. Se incubaron a 37°C, hasta que la DO 600nm llegó a 0.6 .
- 3) Se indujo la expresión añadiendo a cada matraz IPTG 0.1 mM y se incubaron a 18°C, durante 5h.
- 4) Se centrifugaron los cultivos a 7500 rpm, por 10 minutos a 4°C. El *pellet* de células se lavó y se resuspendieron en 4 mL de Buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH=8)
- 5) El extracto celular obtenido se centrifugó a 7500 rpm, por 10 minutos, a 4°C, para separar la fracción soluble en la que se encontró la proteína para continuar con el proceso de purificación.

5.5 Purificación de Sco2863 por cromatografía de afinidad

La cadena 6xHis fusionada en la proteína, permitió la purificación por cromatografía de afinidad usando la columna cargada con Ni-NTA. Los anillos de imidazol en los residuos de la histidina se unen a los iones de níquel inmovilizados por los grupos NTA (ácido nitrilotriacético) sobre la matriz (The QIAexpressionist, 2003).

- 1) Se empacó la columna con 2mL de resina Ni.NTA.
- 2) Se equilibró la columna con 10 mL de Buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH=8) a un flujo no mayor a 2mL/ min.
- 3) Se aplicó lentamente la fracción soluble del lisado celular en la columna y se dejó fluir a 0.5-1 mL/ min, se recolectó la muestra.
- 4) Se lavó dos veces con 8 mL Buffer de lavado A (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH=8), se recolectaron las fracciones.
- 5) Se lavó cuatro veces con 8 mL de Buffer de lavado B (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, pH=8). Se recolectaron las fracciones.
- 6) Se eluyó la proteína 4 veces con 1 mL Buffer de elución (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH=8). Se recolectaron las fracciones
- 7) Se analizaron las fracciones por PAGE-SDS en un gel separador al 7%. Se empleó una tinción con azul brillante de Coomassie. La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford, con albúmina sérica bovina como estándar.
- 8) La fracción donde se encontró la proteína purificada se dializó en buffer de almacenamiento (Tris-HCl 50mM pH 7.4, KCl 50mM, NaCl 50mM, 2-mercaptoetanol 5mM, glicerol 50%) durante 24h y se preservó a -20 °C, para prevenir la degradación de la proteína se trabajó a 4°C.

5.6 Determinación de la actividad *in vitro*

5.6.1 Digestión enzimática de DNA plasmídico por *Sco2863* en presencia y ausencia de MgCl₂

Con el fin de evaluar la actividad de la proteína purificada, se realizó una digestión enzimática en presencia y ausencia de MgCl₂, como sustrato se utilizó el plásmido pSET152 metilado y no metilado.

- 1) Se purificó el pSET152 metilado *in vivo* en sitios *dam* y *hsd* (metilado en adeninas) y en sitios *dcm* (metilado en citosinas) de las cepas IBEC55, IBEC57 y IBEC56, respectivamente (tabla 3). Mientras que el pSET152 no metilado se purificó de la cepa IBEC58.

2) Se determinó la concentración y pureza del pSET152 espectrofotométricamente midiendo la abasorbancia a 260 nm y mediante el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Se realizó la dilución correspondiente del plásmido para una concentración de 500ng/ μ L

3) Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

1 μ L de DNA (pSET152, 500ng)
1 μ L de Buffer de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 50mM y KCl 50mM)
1 μ L de la proteína purificada (Sco2863, 10ng)
7 μ L de Agua desionizada estéril.

Volumen total de la reacción: 10 μ L. Cuando se requirió se añadió MgCl₂ 10mM, ajustando el volumen final a 10 μ L

4) Se efectuó la reacción enzimática durante 1h a 37°C. La reacción se paró calentando las muestras a 65°C, durante 10 min.

5) Se realizó una separación de los productos de la reacción mediante electroforesis. Las muestras se mezclaron con solución amortiguadora de carga, se corrieron a 75 Volts en un gel de agarosa al 0.8% durante 1h. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con luz UV. Se tomaron fotografías de los geles.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Clonación del gen SCO2863(L)

El gen SCO2863 de *S. coelicolor* está ubicado en una isla genómica adquirida por transferencia horizontal y participa en el fuerte sistema de restricción metil-específico, que presenta este microorganismo. Es probable que este gen codifique para un enzima de restricción metil-específica. El estudio de esta enzima putativa resulta importante ya que se determinó que presentó una alta identidad (i) con el dominio de helicasas de las enzimas de restricción tipo 1 (hsdR) (ii) y con dos enzimas con actividad de nucleasa: *Nuc* y *Bfil* que cortan DNA en ausencia de iones metálicos. Por lo mismo, se sugirió que esta enzima se conforma de un dominio *Nuc* de nucleasa y uno de helicasa, que probablemente restringe DNA en ausencia de iones Mg^{2+} .

Lo anterior hace interesante la determinación de la actividad *in vitro* de esta proteína, para lograrlo el primer paso fue clonar y expresar el gen en dos sistemas de expresión para seleccionar el óptimo.

6.1.1 Clonación del gen SCO2863 (L) en el vector de expresión pET28a

El gen SCO2863 contiene dos sitios de inicio probables, por lo que existe dos versiones del gen: versión corta SCO2863(S) y versión larga SCO2863(L).

El codón de inicio de la versión SCO2863(S) codifica para una leucina y es el que se indica en la base de datos de *S. coelicolor* (StrepDB, <http://strepdb.streptomyces.org.uk/cgi>). Mientras que el codón de inicio propuesto en este trabajo de la versión SCO2863(L) se ubica río-arriba del sitio de inicio de la versión corta y codifica para una valina.

Si bien varios genes de *Streptomyces* utilizan ATG como codón de inicio de la traducción también utilizan GTG, el cual codifica para una valina. En *Streptomyces* la valina como codón de inicio es mas frecuente que leucina, como lo demuestra un análisis de 1735 secuencias que codifican para proteínas presentes en el genoma de *S. coelicolor* el cual reveló que el 61% inicia con ATG, 36% con GTG y 3% con TTG. Los codones ATG, GTG y TTG codifican para formilmetionina si ellos están en inicio de la región codificadora, pero si ellos están dentro de la secuencia codificadora codifican para

CCGAATTCGCGCACGAAT-3'), los cuales lograron introducir los sitios de restricción *Xba*I, *Nde*I, y *Eco*RI. El producto de PCR fue digerido con *Xba*I y *Eco*RI y clonado en los sitios correspondientes del plásmido pUC18 obteniendo el plásmido pGSS1, el cual se secuenció y se confirmó que el fragmento no presentó ninguna modificación. Posteriormente, se transformó *E. coli* DH5 α con este plásmido por electroporación, se seleccionó una transformante que contenía el plásmido correcto, para poder amplificarlo y purificarlo, ya que para lograr una eficiente digestión con *Nde*I se necesita que el plásmido esté limpio. El pGSS1 se digirió *Nde*I-*Eco*RI, el fragmento generado se subclonó en el pGS3(S) para obtener finalmente el pGSS2(L), el cual se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) roseta

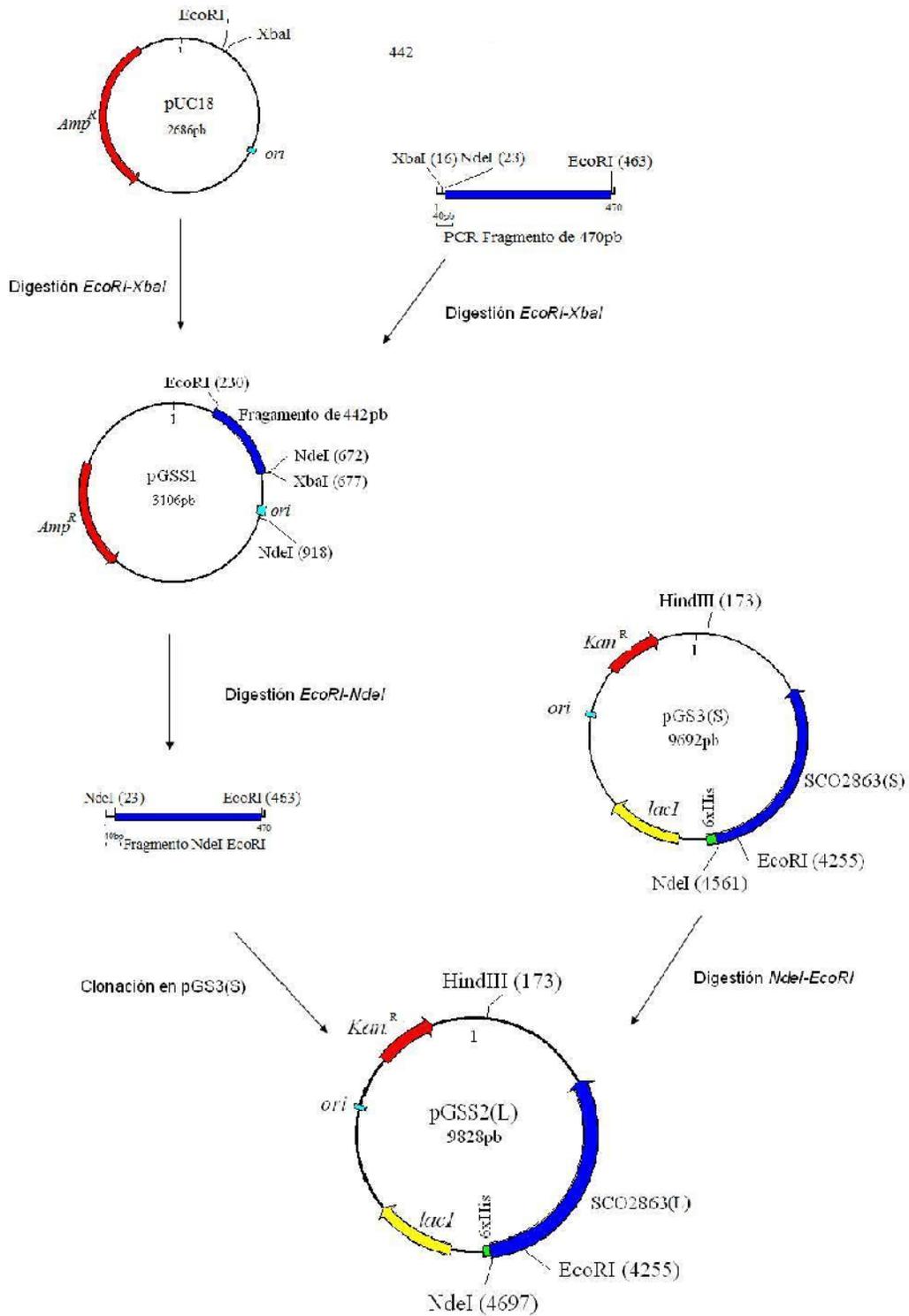


Figura 6. Obtención del plásmido pGSS2(L). Se subclonó un fragmento de 442pb en el plásmido pSS3(S) para formar la versión SCO2863(L), obteniéndose el plásmido pGSS2(L), el cual se transformó a *E. coli* BL21(D3) roseta.

Para identificar la colonia de *E. coli* BL21(D3) roseta que se pudo transformar con el plásmido pGSS2(L), se seleccionaron seis colonias al azar y se purificó el plásmido de cada una de ellas mediante minipreparaciones. Posteriormente, los plásmidos se sometieron a una digestión enzimática con las enzimas *Xba*I y *Hind*III. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 7). EL plásmido del carril No. 6 presentó los fragmentos de 4.6 kb y 5.2 kb esperados. La colonia de donde se purificó este plásmido se creció y se preservó en glicerol al 20% para su posterior uso.

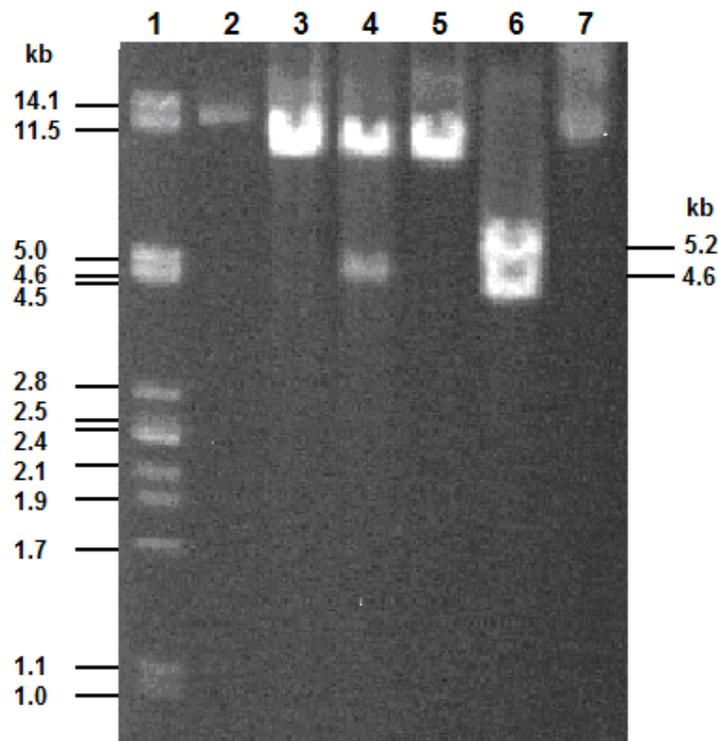


Figura 7. Identificación de la colonia de *E. coli* BL21(D3) roseta que contiene el plásmido pGSS2(L). Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con *Pst*I). Carriles 2-7: plásmidos purificados de seis colonias candidatas a contener el plásmido pGSS2(L), digeridos con las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III, los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Se encontró que el plásmido del carril No.6 presentó el patrón de restricción esperado.

6.1.2 Clonación del gen SCO2863(L) en el vector de expresión pIJ4123

También, se consideró desde un inicio sobreexpresar la proteína en *S. lividans* 1326 partiendo de que es una especie estrechamente relacionada y que presenta una organización genética estructuralmente similar a *S. coelicolor*, pero a diferencia de éste es considerada como el hospedero preferido entre los *Streptomyces* para la clonación de DNA y la expresión de proteínas heterólogas, por su baja actividad de proteasa extracelular además de su MSRS atenuado (Jayapal et al., 2007)

Por lo anterior, se clonó el gen en el vector de expresión pIJ4123, el cual es de alto número de copias, tiene un promotor *tipA* inducible con tioestrepión y, también, permitió la producción de la proteína fusionada a una etiqueta 6xHis, en el extremo amino. Para realizar esta construcción, primero se pensó que *S. lividans* 1326 a pesar de tener MSRS muy débil, podría interferir en la eficiencia de la transformación ya que podría restringir el plásmido. Para solucionar este problema y obtener el plásmido no metilado se transformó el plásmido pGSS2(L) en *E. coli* IBEC58 la cual no cuenta con sistemas de modificación, se amplificó y purificó.

El pGSS2(L) no metilado se digirió con *NdeI* y *HindIII*, el fragmento originado se clonó en el pIJ6021, generando el plásmido pGSS4. Posteriormente, el pGSS4 se digirió *NdeI-BamHI* y se subclonó en el pIJ4123, formando finalmente el pGSS6(L). Este último plásmido se transformó en *S. lividans* 1326. El esquema general de esta construcción se muestra en la Figura 8.

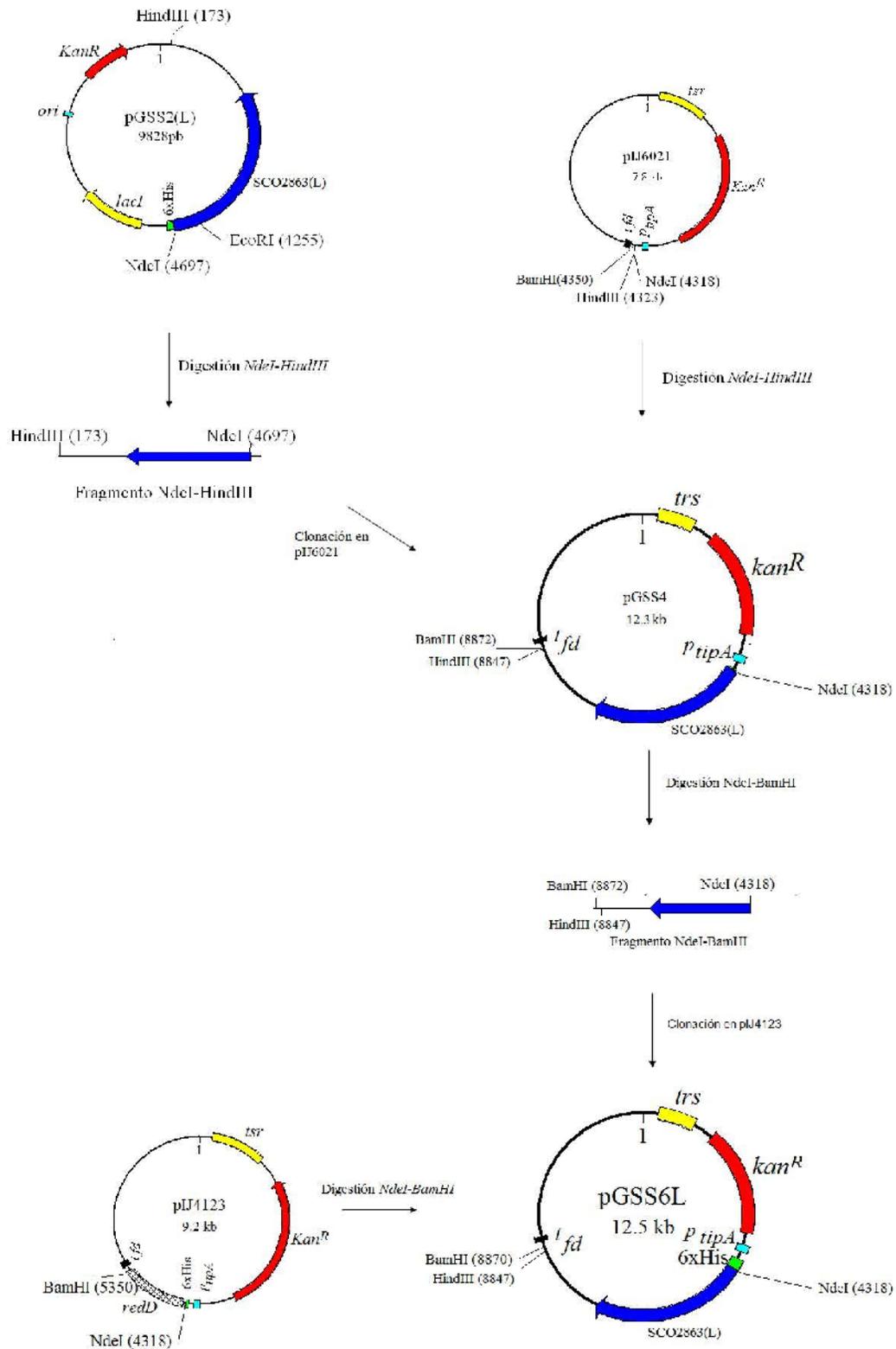


Figura 8. Obtención del plásmido pGSS6(L). El pGSS2(L) se digirió *NdeI*-*HindIII*, el fragmento originado se clonó en el pI6021, generando el plásmido pGSS4, el cual se digirió *NdeI*-*BamHI* y se subclonó en el pIJ4123, formando finalmente el pGSS6(L). Este último plásmido se transformó en *S. lividans* 1326.

Se eligieron seis colonias al azar para identificar aquellas que adquirieron el plásmido pGSS6(L). Para esto, se purificó el plásmido de las colonias mediante minipreparaciones y posteriormente, los plásmidos se sometieron a una digestión enzimática con la enzima de restricción *EcoRI*. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 9). Los plásmidos de los carriles No. 3, 4, 5, 6, 7 presentaron los fragmentos 4.1 kb y 8.4 kb esperados. Se obtuvo esporas de la colonia cuyo plásmido corresponde al carril No.3, se preservaron en glicerol al 20 % para su posterior uso.

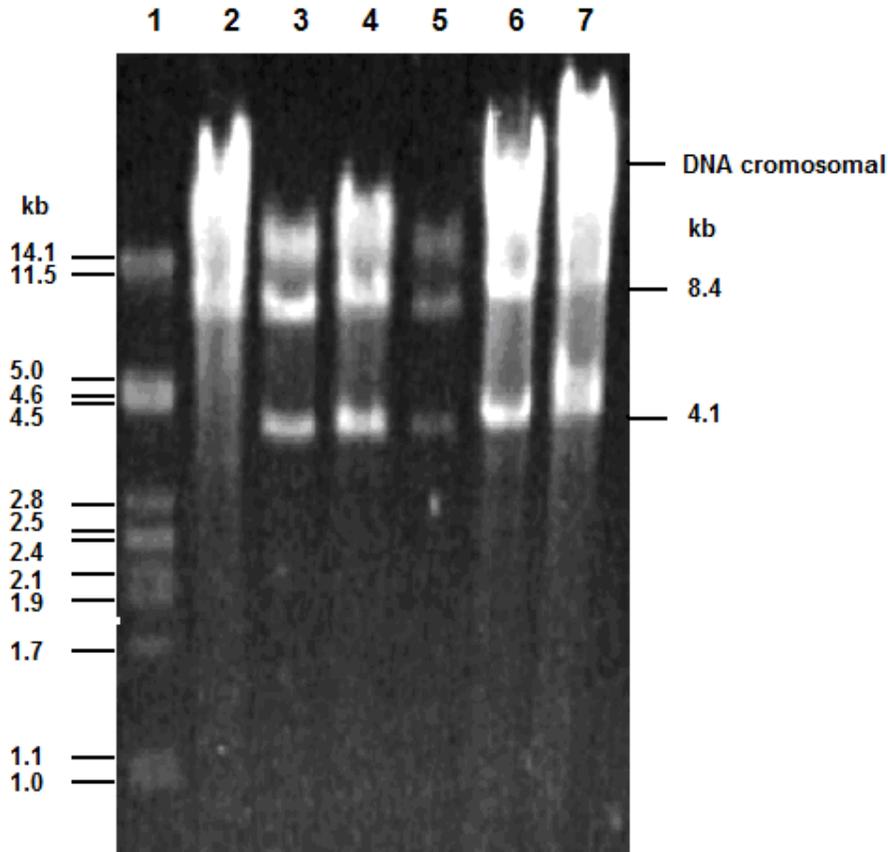


Figura 9. Identificación de la colonia de *Streptomyces lividans* 1326 que contiene el plásmido pGSS6(L). Carril 1: marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con *Pst*I). Carriles 2-6: plásmidos purificados de seis colonias candidatas a contener el plásmido pGSS6(L), digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*, los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Se encontró que los plásmidos de los carriles No. 3, 4, 5, 6, 7 presentaron el patrón de restricción esperado.

6.2 Sobreexpresión de Sco2863 a pequeña escala

Una vez que se logró identificar a las células *E. coli* BL21(DE3) roseta/pGSS2(L) y *S.lividans* 1326/pGSS6(L), el siguiente paso consistió en el crecimiento de las células huésped y la inducción de la expresión.

6.2.1 En *E. coli* BL21(DE3) roseta

Se realizaron ensayos preliminares en cultivos a pequeña escala para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y expresión que permitieran ubicar a la proteína en la fracción soluble del extracto celular, antes de realizar la sobreexpresión en un cultivo a gran escala. Sin embargo, en los ensayos realizados con diferentes condiciones, se observó que una gran cantidad de proteína no permanecía soluble en la célula, encontrándose en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (agregados insolubles).

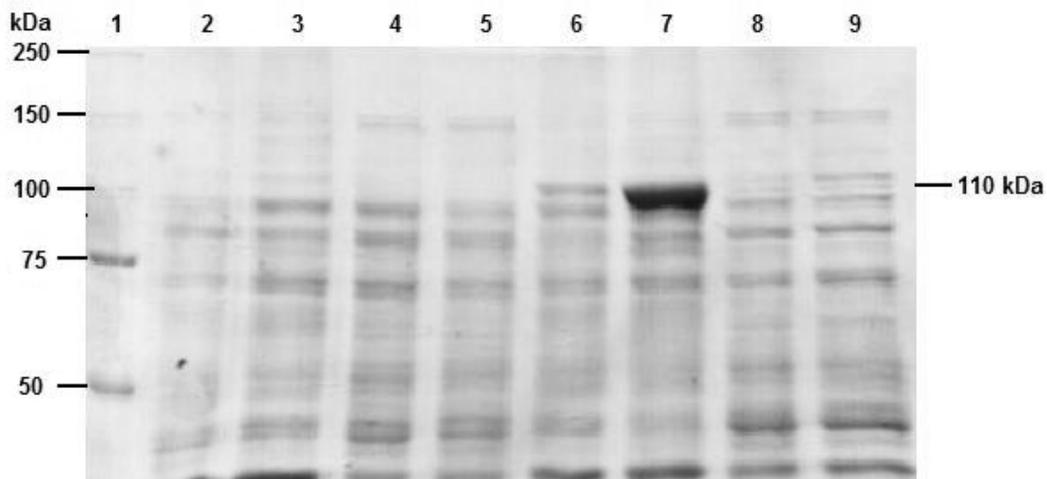


Figura 10. Sobreexpresión de la proteína Sco2863 en *E. coli* BL21(D3) roseta/pGSS2(L). Las muestras se separaron en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 7% y se tiñó con Azul de Coomasie brillante R250. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: Fracción insoluble del extracto crudo sin inducir a las 2h; Carril 3, Fracción insoluble inducido con IPTG 0.1 mM durante 2h. Carril 4: Fracción soluble sin inducir a las 2h. Carril 5: Fracción soluble inducido durante 2h. Carril 6: Fracción insoluble sin inducir a las 6h. Carril 7: Fracción insoluble inducido durante 6h. Carril 8: Fracción soluble sin inducir a las 6h. Carril 9: Fracción soluble inducido durante 6h.

Como es el caso del perfil de expresión mostrado en la Figura 10 donde se observó que la fracción insoluble del extracto crudo de BL21 (DE3) roseta/ pGSS2(L), inducido con IPTG 0.1mM durante 6h (carril 6), presenta una banda de 110 kDa , lo cual concuerda con el peso molecular del producto del SCO2863(L) deducido de la secuencia de aminoácidos, que no se observa en la fracción insoluble sin inducir (carril 5) ni en la fracción soluble de células inducidas durante 6h (carril 7) y no inducidas (carril 8). De tal manera, un gran porcentaje de la proteína Sco2863 expresada en estas condiciones se encontró como cuerpos de inclusión, probablemente no logra plegarse en su estructura nativa, plegándose parcialmente y dejando regiones expuestas que interactúan con otras proteínas similares, formando los agregados insolubles (The QIAexpressionist, 2003).

En las condiciones en la que se expresó se esperaba que la proteína permaneciera en el citoplasma en su conformación nativa para disminuir la formación de agregados insolubles y aumentar la cantidad de proteína en fracción soluble, como lo fue (i) utilizar la concentración de IPTG 0.1mM para reducir el nivel de expresión (en los primeros ensayos se utilizó 1mM de IPTG), (ii) realizar la inducción de la expresión a 18°C, ya que creciendo a *E. coli* por debajo de la temperatura de crecimiento normal de 37 °C, la transcripción y la traducción son más lentas, por lo que la proteína tiene mayor tiempo para plegarse en su estructura nativa, disminuyendo los cuerpos de inclusión. (iii) También, los cuerpos de inclusión se forman cuando la proteína expresada le resulta tóxica a la célula huésped (The QIAexpressionist, 2003), así que la estrategia fue inducir por periodos cortos, con la finalidad de que una baja concentración de la proteína no le resultara tóxica a la célula. Sin embargo, como se observa en la Figura 10 no se encontró una banda correspondiente al peso de la proteína en la fracción soluble inducido durante 2h (carril 4).

6.2.2 En *S. lividans* 1326

Debido a que, los perfiles de expresión en *E. coli* BL21(DE3) roseta con diferentes condiciones (concentración del inductor, temperatura, inducción por periodos cortos) no permitieron la expresión óptima de la proteína en la

fracción soluble, se analizaron los niveles de expresión y la localización de la proteína utilizando como célula huésped *S. lividans* 1326.

S. lividans es una especie estrechamente relacionada a *S. coelicolor*, las secuencias de las subunidades 16S de sus RNAs ribosomales mantienen un 99.5% de identidad, sin embargo la presencia de islas genómicas en *S. coelicolor* ausentes en *S. lividans* generan ciertas diferencias fenotípicas, que hacen a *S. lividans* sea el hospedero preferido entre los *Streptomyces* para la expresión de proteínas heterólogas (Jayapal et al., 2007). Se sugirió que al expresar el producto de gen SCO2863 en *S. lividans* al ser una especie muy relacionada podría disponer de una ambiente celular y una maquinaria de transcripción y traducción similar al *S. coelicolor*, lo cual permitiera que la proteína expresada permaneciera en el citoplasma en su conformación nativa.

En los ensayos realizados para determinar los niveles de expresión se observó un lento crecimiento celular al inducir, probablemente esto se debió a que:

- 1.- El tioestreptón además de ser un inductor del promotor *tipA* en este sistema, es un antibiótico (Kieser, 2000) interfiriendo en el crecimiento óptimo de las células, este problema se trató de solucionar variando diferentes concentraciones de inductor (20µg/mL, 50 µg/mL) e induciendo los cultivos a una mayor densidad celular (D.O. 0.5, 0.7).
- 2.- Por tratarse de una proteína con probable actividad de nucleasa, le resulte tóxica a *S. lividans* 1326 al dañar su material genético, traduciéndose en un crecimiento lento. Aunque se suponía que al expresarla en este microorganismo se evitarían los problemas de toxicidad celular.
- 3.-También, es factible que no se logrará observar la presencia de la proteína en los PAGE-SDS ya que a pesar de la baja actividad proteolítica de *S. lividans* 1326, es probable que la proteína se degrade en cultivos viejos, es por ello que se probó diferentes tiempos de inducción (4h ,8h, 16h, 32h, 48h).

A pesar de que, se realizaron diferentes ensayos empleando las condiciones ya mencionadas, no se logró una expresión óptima de la proteína. Lo anterior llevó a considerar que posiblemente el plásmido sea inestable generando rearrreglos, provocando una transcripción o traducción ineficiente o bien que la construcción no permanezca en las células durante el crecimiento, debido a

que los plásmidos de alto número de copias, como los son los derivados de pIJ101 (pIJ6021, pIJ4123) son estructuralmente inestables, más aún cuando el inserto clonado es un fragmento grande de DNA (Kieser, 2000), como es el caso del plásmido aquí construido (pGSS6(L)) para la expresión de la proteína en *S. lividans* 1326, el cual presenta 12.5 kb. Lo anterior, se confirmó al realizar una purificación del plásmido pGSS6(L) a partir del lote de esporas empleadas en los ensayos de expresión. Con el plásmido purificado se realizó una digestión enzimática con *EcoRI* los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 11), se esperaba observar dos bandas de 4.1 kb y 8.4 kb, sin embargo como se muestra en el carril 2 no se observó el patrón de restricción esperado.

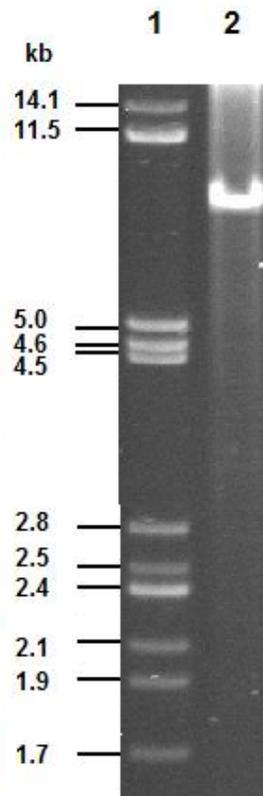


Figura 11. Digestión enzimática del plásmido purificado a partir de *S. lividans* 1326/pGSS6(L). Carril 1: Marcador de DNA (DNA del fago λ digerido con *Pst*I). Carril 2: plásmido digerido con *Eco*RI, se encontró que no presentó el patrón de restricción esperado.

6.3 Sobreexpresión a gran escala y purificación de Sco2863

En un inicio al no encontrar las condiciones óptimas que lograran la expresión de la proteína en fracción soluble en ambos sistemas, se decidió trabajar con la fracción insoluble de *E. coli* BL21(D3) roseta/pGSS2(L). Se solubilizaron los cuerpos de inclusión con urea 8M y se purificó la proteína por cromatografía de afinidad Ni-NTA en condiciones desnaturizantes, posteriormente se renaturalizó mediante la disminución de la concentración de urea 8 M hasta 0 M a intervalos de 0.5 M a una temperatura de 4°C durante 1 hora entre cada cambio de concentración. Sin embargo, a pesar de contar con una alta cantidad de proteína recombinante, no se logró obtener proteína plegada correctamente pues la proteína carecía de actividad funcional.

Aunque, la evidencia experimental mostró que la expresión en *E.coli* BL21(D3) roseta/pGSS2(L) generó una gran cantidad de agregados insolubles de proteína, se creyó que una pequeña cantidad de proteína permanecía soluble en el citoplasma, por lo que se realizó la expresión en un cultivo a gran escala con el fin recuperar una cantidad manejable de proteína en la fracción soluble para purificar en condiciones nativas y evitar así los problemas de renaturalización que se encontró al purificar en forma desnaturizada.

Se indujo un cultivo de 600mL con IPTG 0.1mM durante 5 horas a 18°C. Por sonicación se obtuvo el extracto crudo y se separó la fracción soluble. La proteína recombinante fusionada a una cadena de 6xHis, se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones nativas. Se realizaron eluciones con un gradiente de imidazol de 20mM a 250 mM como se indica en la sección materiales y métodos.

La solución de imidazol de 20 y 50 mM permitió la eliminación de proteínas endógenas con residuos de histidina que interactuaron con los grupos Ni-NTA. Debido a que la proteína en el lisado estaba presente en una concentración muy baja se puso especial atención en los pasos de lavado, es por ello que primero se utilizó el buffer de imidazol 20mM y se aumentó a 50mM para hacer el lavado más eficaz.

Las eluciones con el buffer de imidazol 250mM permitieron la disociación de la proteína de interés debido a que a esta concentración de imidazol no puede competir por los sitios de unión sobre la resina Ni-NTA.

Una alícuota de 15 μ L de cada fracción recolectada se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% y se tiñó con azul de Coomassie. Como se observa en la Figura 12a las eluciones con el buffer de imidazol 250 mM (carriles 7-10) presentaron una sola banda de 110 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína. Las fracciones con la proteína purificada se dializaron en buffer de almacenamiento y se preservaron a -20 °C, las muestras dializadas se analizaron también por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% y se tiñó con azul de Coomassie (Figura 12b). La concentración de la proteína se determinó con el método de Bradford, con albúmina sérica bovina como estándar.

Con lo anterior se comprobó que al inducir la expresión de la proteína en *E. coli* BL21(D3) roseta/pGSS2(L), una cantidad baja de proteína permaneció en forma soluble aunque en los ensayos a pequeña escala no se alcanzó a observar la presencia de la proteína en fracción soluble.

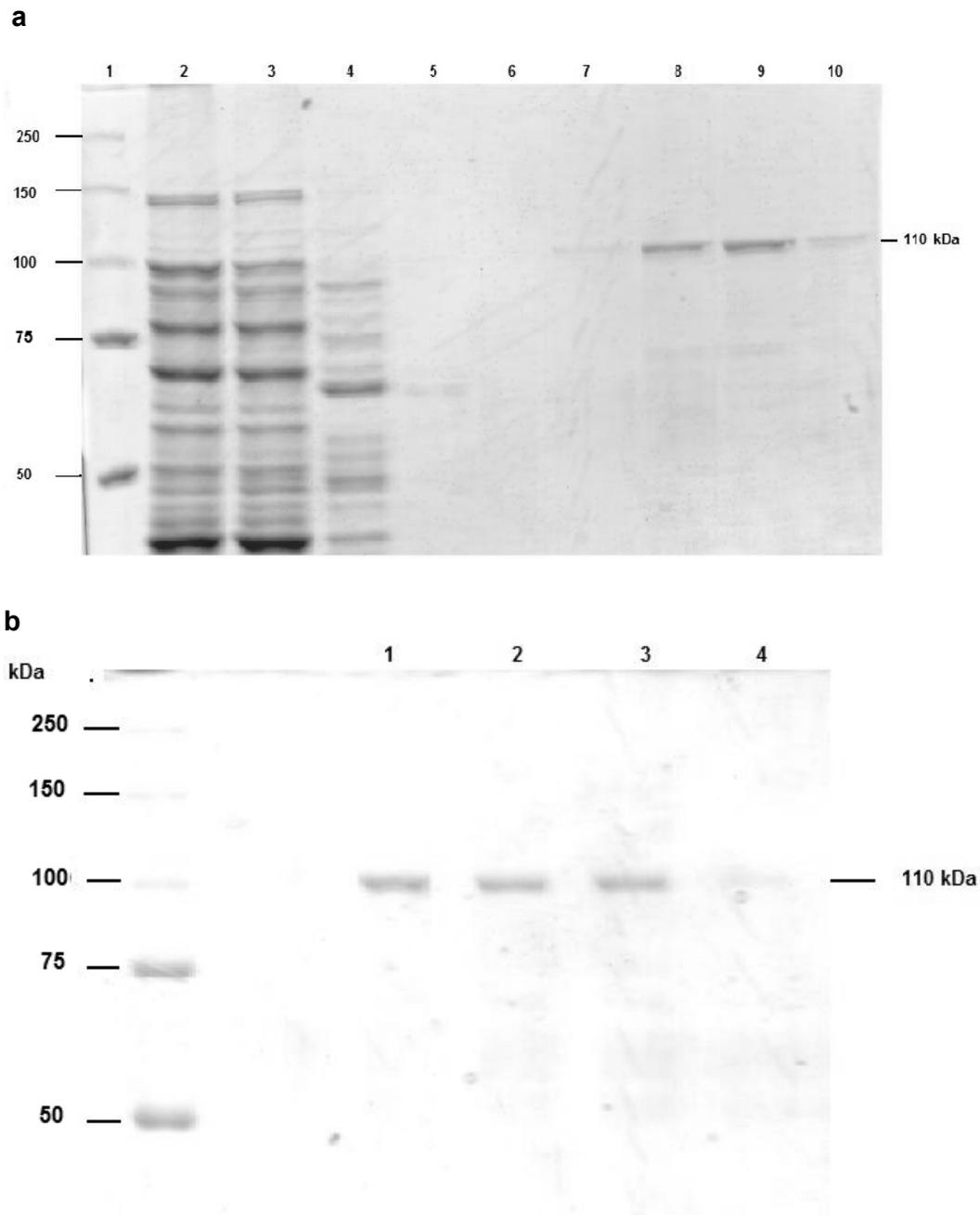


Figura 10. Purificación de la proteína codificada por SCO2863. (a) Purificación de la proteína 1: Marcador de peso molecular, 2: Extracto crudo celular, 3: Fracción que no se une a la columna, 4-6: Lavados con imidazol 20mM y 50mM, 7-10: Eluciones con imidazol 250 mM. (b) Proteína purificada preservada en un buffer de almacenamiento. Carriles 1-4: eluciones donde se observó la proteína purificada, dializadas en el buffer de almacenamiento.

6.4 Determinación de la actividad *in vitro*.

6.4.1 Digestión enzimática de DNA plasmídico por Sco3863 en presencia de MgCl₂

Con el fin de determinar si la proteína codificada en el gen SCO2863 de *S. coelicolor* purificada era funcional y evaluar de manera general su actividad de nucleasa metil-específica, se realizaron ensayos de digestión enzimática, como sustrato se utilizó DNA plasmídico metilado, no metilado y metilado en citosinas.

- Para obtener el DNA plasmídico metilado se utilizó el pSET152, se introdujo en la cepa BW25113 la cual cuenta con tres sistemas de metilación de DNA: el sistema Dam, el sistema Dcm, y el sistema Hsd. Los sistemas Dam y Hsd metilan adeninas en secuencias específicas, mientras que el sistema Dcm metila citosinas, también en secuencias específicas. Se purificó el pSET152 a partir de esta cepa, para obtener el DNA plasmídico metilado.
- Como en estudios previos se determinó que *S. coelicolor* restringió fuertemente pSET152 metilado sólo en sitios *dcm* (18 sitios), en comparación con plásmido metilado sólo en sitios *dam* (37 sitios) y en plásmido metilado en sitios *hsd* (2 sitios) (González-Cerón et al., 2009), se requirió DNA metilado en sitios *dcm* para evaluar si el grado de metilación del pSET152 interfería en la restricción, para ello se purificó el plásmido pSET152 a partir de la cepa IBC56 la cual es una mutante derivada de la cepa BW25113, que sólo cuenta con el sistema de metilación Dcm.
- Para evaluar si era incapaz de restringir DNA no metilado, el pSET152 que se utilizó en el ensayo de digestión enzimática se obtuvo a partir de la cepa IBEC58, la cual carece de los tres sistemas de metilación Dam, Dcm y Hsd.

La mezcla de reacción se realizó en presencia de un buffer que contiene Tris-HCl 50 mM pH7.4, NaCl 50mM, KCl 50m, MgCl₂ 10mM, y se preparó como se indica en material y métodos. La reacción se incubó a 37°C durante 1h, y se detuvo calentando las muestras a 65°C durante 10 min. Como control se preparó una mezcla de reacción sin la proteína purificada que recibió el mismo tratamiento. Se realizó una separación de los productos de la reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Como se observa en la Figura 13, la enzima purificada es capaz de cortar DNA plasmídico metilado completamente (metilado en sitios *dam*, *dcm* y *hsd*) (carril 5) en presencia de MgCl₂. Además restringió en igual magnitud DNA metilado sólo en sitios *dcm* (carril 7). Lo anterior confirmó que la metilación sólo de sitios *dcm* es suficiente para ser restringido, y que probablemente los tres sistemas de metilación contribuyen significativamente a la incapacidad de *S. coelicolor* de aceptar DNA metilado *in vivo* por *E. coli* BW25113

Sin embargo, al contrario de lo que se esperaba, se encontró que Sco2863 digirió DNA plasmídico no metilado (carril 3) aunque la actividad fue menor que sobre el DNA metilado. Los resultados anteriores podrían indicar:

- 1.- Que no existe una marcada especificidad de DNA metilado por parte de esta enzima en las condiciones realizadas, es probable que si bien participe en el sistema de restricción de DNA metilado dependa de la participación de otros elementos presentes en la célula para lograr un efecto fuerte de restricción de DNA metilado
- 2.- Que la purificación haya sido parcial, arrastrando alguna nucleasa endógena de *E. coli* BL21(D3) roseta capaz de degradar DNA no metilado.

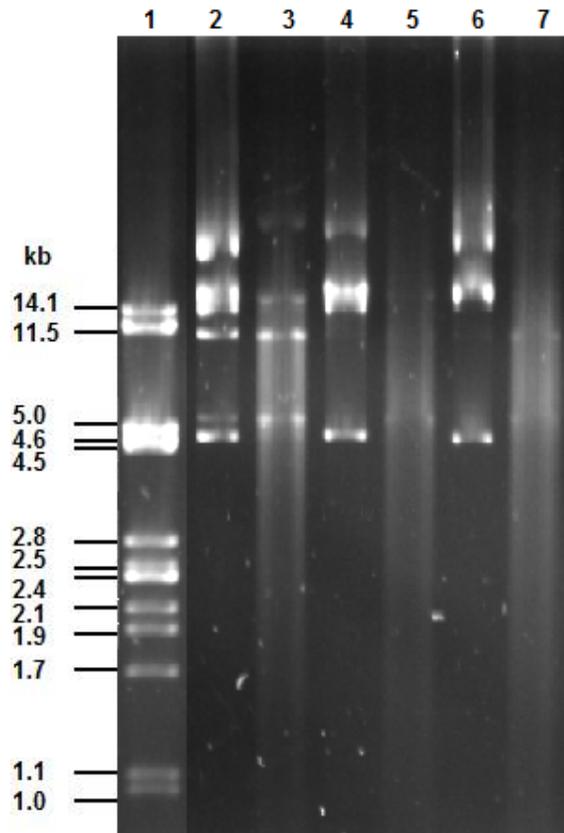


Figura 13. Determinación de la probable actividad de Sco2863 mediante un ensayo de digestión enzimática del pSET152 en presencia de $MgCl_2$. Carril 1: marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con *Pst*I). Carril 2: control, pSET152 no metilado. Carril 3: pSET152 no metilado en presencia de Sco2863. Carril 4: control, pSET152 metilado. Carril 5: pSET152 metilado en presencia de Sco2863. Carril 6: control pSET152 metilado sólo en sitios *dcm*. Carril 7: pSET152 metilado sólo en sitios *dcm* en presencia de Sco2863.

6.4.2 Digestión enzimática de DNA plasmídico por Sco2863 en ausencia de $MgCl_2$

Las REasas estudiadas hasta la fecha necesitan cationes divalentes como el Mg^{2+} para hidrolizar los enlaces fosfodiéster presentes en el DNA. A diferencia de las REasas, la nucleasa *Nuc* codificada en el plásmido pKM102 de *S. typhimurium*, restringe DNA en ausencia de cationes divalentes (Pohlman et al., 1993). La nucleasa *Bfil* de *B. firmus*, también restringe DNA en ausencia de cationes divalentes, pero en contraste con *Nuc*, reconoce la secuencia 5'-ACTGGG-3' y corta en la cadena complementaria 5 o 4 nucleótidos río-abajo del sitio de reconocimiento (Sapranaukas et al., 2000).

Debido a la homología que presenta el amino terminal de la proteína Sco2863 con las dos nucleasas *Nuc* y con *BfiI*, resultó interesante estudiar si los iones Mg^{2+} son necesarios para su catálisis. Para ello, se realizó un ensayo de digestión enzimática con el procedimiento ya descrito, pero en la mezcla de reacción se empleó un buffer carente de $MgCl_2$.

Como se observa en la Figura 14, la enzima aparentemente es incapaz de restringir DNA metilado y no metilado en ausencia de iones Mg^{2+} , ya que las muestras incubadas con la enzima mostraron un patrón electroforético igual al de su respectivo control.

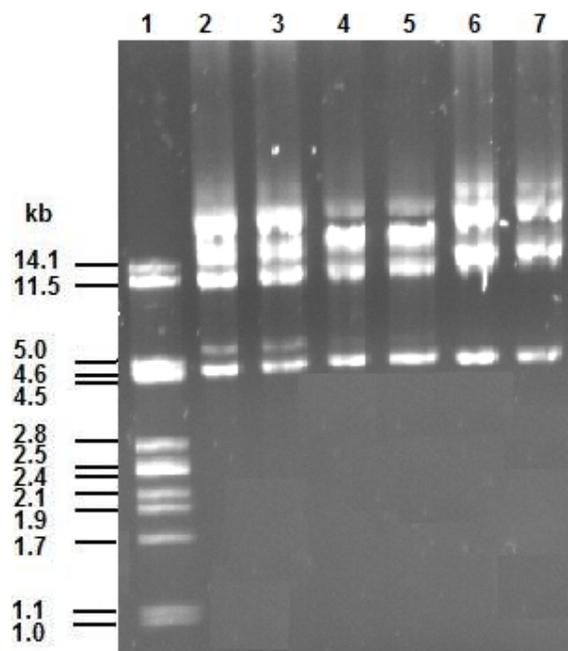


Figura 14. Determinación de la probable actividad de Sco2863 mediante un ensayo de digestión enzimática del pSET152 en ausencia de $MgCl_2$. Carril 1 marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con *PstI*). Carril 2: control, plásmido pSET152 no metilado. Carril 3: pSET152 no metilado en presencia de Sco2863. Carril 4: control, pSET152 metilado. Carril 5: pSET152 metilado en presencia de Sco2863. Carril 6: control, pSET152 metilado sólo en sitios *dcm*. Carril 7: pSET152 metilado sólo en sitios *dcm* en presencia de Sco2863.

Aunque, no se descarta que la nucleasa pertenezca al grupo de la nucleasas EDTA-resistentes, ya que es probable que el dominio de helicasa impida observar con claridad el efecto que produce la ausencia de iones Mg^{2+} en la catálisis de sólo el dominio de nucleasa.

Resultaría interesante realizar más ensayos que apoyen la hipótesis de que esta proteína posee un dominio catalítico similar al de *Nuc* y *Bfil*, como lo es evaluar la actividad sólo del dominio de nucleasa *in vitro*. Los resultados podrán esclarecer las especulaciones de que la enzima de restricción Sco2863 evolucionó del dominio de helicasas de las enzimas de restricción tipo 1 fusionado a un dominio *Nuc*, que corta DNA metilado y en menor magnitud DNA no metilado. Y así resolver si Sco2863 representa un nuevo subtipo de enzima de restricción que difiere en el dominio de restricción.

7. CONCLUSIONES

Los datos aquí presentados apoyan la propuesta de que el gen SCO2863 codifica para un nucleasa involucrada en el sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor*. Sin embargo, se necesitan más ensayos para esclarecer si representa un nuevo subtipo de enzima de restricción que deriva de las nucleasas EDTA-resistentes.

8. REFERENCIAS

- Bheemanaik S., Reddy Y., Rao D. 2006. Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochem. J.* 399:177-190.
- Bickle T. A. y Kruger D. H., 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol. Revi.* 57:434-450.
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno A. M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Che C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J. & Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147.
- Bonifaz, A. 2000. *Micología Médica Básica*, 2da ed. Méndez Editores, México. pp 29-31.
- Buryanov Y., Shevchuk T. 2005. The use of prokaryotic DNA methyltransferase as experimental and analytical tools in modern biology, *Anal. Biochem.* 338:1-11.
- Chin V., Valinluck V., Magaki S., Ryu J. 2004. KpnBI is the prototype of a new family (IE) of bacterial type I restriction-modification system. *Nucl. Acids Res.* 32:e138
- Futura Y., Abe K., Kobayashi I. 2010. Genome comparison and context analysis reveals putative mobile forms of restriction-modification system and related rearrangements. *Nucl Acids Res.* 38:2428-2443
- González-Cerón G., Miranda-Olivares OJ., Servín-González L. 2009. Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol. Lett.* 301:35-43.

- Gormley N. A., Watson M. A., Halford S. E. 2005. Bacterial restriction-modification system. Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons, Ltd: Bristol. URL: <http://www.els.net/>
- Hoopwood D.P. 2002. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. Annu. Revi. on Gene. 40:1-23.
- Hopwood D.A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. Microbiology 145:2183-2202.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96:23-28.
- Jayapal K. P., Lian W., Glod F., Sherman D.H., Hu W.S. 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. BMS Genomics 8:229.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F. & Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich.
- Lepikhov K., Thernov A., Zheleznaja L., Matvienko N., Walter J. y Trautner T. A. 2001. Characterization of the type IV restriction modification system BspLU11III from *Bacillus* sp. LU11. Nucl. Acids Res. 29:4691-4698.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock. Biology of Microorganisms, 11th ed. Pearson Prentice Hall, USA. pp 386,391.
- Pohlman R. F., Liu F., Wang L., Moré M. I. & Winans S. C. 1993. Genetic and biochemical analysis of an endonuclease encoded by the IncN plasmid pKM101. Nucl. Acids Res. 21:4867-4872.
- Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A. S., Bickle T.A., Bitinaite J., Blumenthal R.M., Degtyarev S.K., Dryden D. T., Dybvig K. K., Gromova E. S., Gumpert, R. I., Halford S. E., Hattman S., Heitman J., Hornby D. P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T. R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D. H., Lacks S., Marinus M. G., Miyahara M., Morgan R.D., Murray N. E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D. N., Reich N., Repin V. E., Selker E. U., Shaw P. C., Daniel S.C., Stoddard B. L., Szybalski W., Trautner T. A., Van Etten J. L., Vitor J. M., Wilson G. G. & Xu S. 2003. A

nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucl. Acids Res.* 31: 1805–1812.

- Sambrook, J. y D.W Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sapranaukas R., Sasnauskas G., Lagunavicius A., Vilkaitis G., Lubys A. & Siksnys V. 2000. Novel subtype of type IIs restriction enzymes. *BfiI* endonuclease exhibits similarities to the EDTA-resistant nuclease Nuc of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 275:30878–30885.
- Takano E., White J., Thompson C.J., Bibb M.J. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene*.166: 133-137.
- Titheradge A. J., King J. Ryu J. & Murray N. E. 2001. Families of restriction enzymes: an analysis prompted by molecular and genetic data for type ID restriction and modification systems. *Nucl. Acids Res.* 29:4195-4205
- Tock M.R. y Dryden D.T. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Current. Opini. Microbiol.* 8:466–472.
- The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 2003. Fifth Edition. QIAGEN.

9. ANEXO

9.1 Medios de cultivo

9.1.1 Para *E. coli*

Para *E. coli* se utilizaron los siguientes medios y se incubaron a 37°C, a menos que se especifique lo contrario.

LB(Luria-Bertani) : Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0.

En caso ser LB sólido , se agrega 1.5% de Select Agar, Gibco BRL. Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

SOB: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5mM, pH7.2.

Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos

YT2X: Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH7.2. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min.

9.1.2 Para *Streptomyces*

Para *Streptomyces* se utilizaron los siguientes medios y se incubaron a 30°C.

MS (Mannitol soya fluor medium): Agar 20g, manitol 20g, harina de soya 20g .

Ajustar el volumen a 1L con agua desionizada. Se esteriliza en autoclave a 105 °C durante 15 minutos.

R2YE: Sacarosa 103g, K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂-H₂O, glucosa 10g , casaminoácidos 0.1g. Ajustar el volumen a 800mL dividir en alícuotas de 80 mL com 22g de Agar Ca uma con água desionizada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Para prepara cinco cajas petri : a una alícuota de 80mL se agregar 2.2g de agar , se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min, y se agrega KH₂PO₄ (0.5%) 1 mL, CaCl₂-H₂O(3.68%) 8 mL, L-prolina (20%) 1.5 mL, Tris-HCl pH 7.2 (3%) 10 mL , trazas R5 o.2 mL , NaOH 1N 0.2mL, extracto de levadura (10%) 5 mL.

Agar suave: Sacarosa 10.3g, MgCl₂-6H₂O 1.012g, Tris-HCl (3%) 10mL , CaCl₂-2H₂O (5M) 0.4 mL, Bacto-Agar 0.65g . Ajustar el volumen a 100mL. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15min.

YEME (Yeast extract-malt extract): Extracto de levadura 3g , tristona 5 g , extracto de malta 3 g, glucosa 10g , sacarosa 340g , se ajusta el volumen a 1L con agua desionizada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

LB-sacarora (Luria-Bertani,sacarosa): Triptona 10 g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, sacarosa 34g, pH 7.0 .Ajustar el volumen a 100mL . Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15min.

Amortiguador P: Sacarosa 51.5g, MgCl₂-H₂O 1.01g, K₂SO₄ 0.125g. Se ajusta el volumen a 400mL. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20min. Se suplementa con trazas R5 0.1mL, KH₂PO₄ (0.5%) 0.5 mL, CaCl₂-H₂O(3.68%) 5mL y Tris-HCl pH 7.2 (3%) 5 mL

9.2 Soluciones.

TBE 5x: Tris base 54g, ácido bórico 27.5g, EDTA (0.5M) 20 mL , pH 8.0. Se ajusta el volumen a 1L con agua desionizada.

9.3 Manejo y purificación de DNA.

9.3.1 Protocolo para mini preparaciones de DNA plasmídico (minipreps).

Se inocula un tubo con 3mL de YT2X con una colonia de *E. coli* y se crece toda la noche hasta su saturación.

1. Recuperar el paquete de células o micelio por centrifugación a 7 500 rpm por 10 minutos.
2. Resuspender el paquete celular o el micelio en 100 µL de TE 25 mM (Tris 25mM, EDTA 25mM, pH 8). En el caso de *Streptomyces* el TE 25 mM debe contener lisozima 2mg/mL.
3. Para *E .coli* colocar 10 minutos en hielo y en el caso de *Streptomyces* al menos 30 minutos a 37°C ó hasta que el micelio esté visiblemente lisado (debe ponerse translúcido y viscoso).
4. Añadir 200 µL de una solución fresca de NAOH 0.2 N- SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Incubar 10 minutos en hielo.

5. Añadir al tubo 150 μ L de acetato de potasio 3 M pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta perder viscosidad y observar un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
6. Añadir al tubo 400 μ L de fenol-cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos a 13200 rpm.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8.-Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Retirar todo el sobrenadante.
- 9 Resuspender el *pellet* en 50 μ L de TE 10mM (Tris 10mM, EDTA 0.1mM pH 8). Añadir 150 μ L de acetato de sodio 4M pH 6. Mezclar e incubar una hora a -20°C .
10. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ L de TE 10mM, añadir 5 μ L de acetato de sodio 3M pH6 y 125 μ L de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
12. Centrifugar 10 minutos a 13 200 rpm . Eliminar todo el sobrenadante. Secar la pastilla y resuspenderla en 25 μ L de TE 10 mM.

9.3.2 Protocolo para preparar DNA plasmídico (midipreps).

Se inoculan 30 mL de YT2X contenidos en un matraz de 125 mL y se creció a 37°C toda la noche.

1. Resuspender el paquete de células o el micelio en 1 mL de TE 25 mM (Tris 25mM, EDTA 25mM, pH 8). En el caso de *Streptomyces* el TE 25 mM debe contener lisozima 2mg/mL.
2. Para *E. coli* incubar 10 minutos en hielo. Para *Streptomyces* al menos 30 minutos a 37°C o hasta que el micelio estuviera visiblemente lisado.
3. Añadir 2 mL de una solución fresca de NaOH 0.2 N- SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Incubar 15 minutos en hielo.
4. Añadir 1.5 mL de acetato de potasio 3 M pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta que se observe un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
5. Añadir al tubo 4 mL de fenol-cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 5 minutos a 7500 rpm.

- 6.-Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 10 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 minutos a 7 500 rpm, retirar todo el sobrenadante.
8. Resuspender en 500 μ L de TE 10 mM, añadir 5 μ L de RNAsa (10 mg/ μ L) e incubar 1 hora a 37 °C).
9. Agregar 500 μ L de fenol-cloroformo, agitar y centrifugar 5 minutos a 13 200 rpm.
10. Separar la fase acuosa en otro tubo y añadir 500 μ L de cloroformo, agitar y centrifugar 5 minutos a 13 200 rpm.
11. Separar la fase acuosa en otro tubo y añadir 50 μ L de acetato de sodio 3 M pH 6, mezclar y agregar 1 volumen de isopropanol. Precipitar 10 minutos a -20°C.
12. Centrifugar 10 minutos y retirar el sobrenadante y retirar el sobrenadante hasta dejar seco. Si el sobrenadante se observa turbio repetir las precipitaciones con isopropanol.
13. Finalmente resuspende el *pellet* en 50 μ L de TE 10 mM, añadir 5 μ L de acetato de sodio 3 M pH 6, y lentamente añadir 125 μ L de etanol absoluto. Precipitar 10 minutos
14. Centrifugar 10 minutos a 13 200 rpm, retirar el sobrenadante y dejar secar el *pellet* . Resuspender en TE 10 m.

9.3.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP).

1. Preparar un gal de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.6 ó 0.8%.
2. Se pesa la agarosa y se disuelve TBE caliente.
3. Se funde la agarosa y se vierte en una charola para geles y se deja solidificar a 4°C durante 30 minutos.
4. Se cargan las muestras en el gel y se deja correr a 10 volts toda la noche.
5. Al día siguiente se tiñe con bromuro de etidio (1 μ g/mL) y se cortan las bandas deseadas procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada.

6. Poner a fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65-70°C durante 10 minutos. Calcular el volumen de la agarosa fundida y añadir 1/10 del volumen de NaCl 5M. Mezclar bien y dejar 5 minutos en el baño.
7. Saturar fenol con NaCl de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf mezclar 100 µL de NaCl 5 M , 400 µL de agua y 500 µL de fenol. Centrifugar 1 minuto y retirar la fase acuosa. Colocar el fenol a 37 °C
8. Colocar la agarosa fundida 5 minutos a 37 °C
9. Añadir al tubo de la agarosa 2/3 de volumen de fenol saturado e inmediatamente agitar en vórtex durante 30 segundos. Trabajar lo más rápido posible para evitar que la agarosa se melifique.
- 10.- Centrifugar 5 minutos en la Microfusa y pasar la fase acuosa en un tubo limpio.
- 11.-Añadir al fenol 45 µL de TE 10 mM y 5 µL de NaCl 5 M. Agitar en vórtex.
12. Centrifugar 2 minutos y mezclar la fase acuosa con la anterior.
13. Añadir 1 volumen de fenol-cloroformo a la fase acuosa, agitar 5 segundos en vórtex y centrifugar.
14. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el paso anterior , pero solamente con cloroformo.
15. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio. Añadir 1 µL de glucógeno (20 mg/mL) y 1 volumen de isopropanol. Mantener a -20°C durante al menos 2 horas.
16. Centrifugar el DNA durante 10 minutos a 13200 rpm. Retirar todo el sobrenadante, secar el *pellet* y resuspender en un volumen adecuado de Te 10 mM .

9.4 Digestiones de DNA.

Se prepara la mezcla de reacción formada por: agua desionizada estéril 7.5µL, muestra de DNA 1 µL, amortiguador de reacción 1 µL (invitrogen), enzima de restricción 0.5 (10 U), para obtener un volumen final de 10µL. Colocar la mezcla en un tubo Eppendorf, agitar y dar un pulso en la Microfusa. Incubar las muestras a la temperatura adecuada para la enzima y según el tiempo de reacción de la misma (Catálogo Gibco- Life Technologies). Para poder observar la digestión de la muestra de DNA, se pone a correr un gel de agarosa 0.8% y

se tiñe con bromuro de etidio para observarse en un transiluminador de luz ultravioleta.

9.5 Manipulación de microorganismos

9.5.1 Transformación por electroporación.

1. Incubar 3 mL de medio SOB con *E. coli* y dejar toda la noche creciendo.
2. Pasar 100 μ L de precultivo a un matraz con 25 mL de medio SOB, dejar crecer hasta un a D.O.₆₀₀ de 0.6.
3. Pasar a un tubo y centrifugar 5 minutos a 5000 rpm. Decantar el sobrenadante y agitar para resuspender.
4. Colocar 15 mL de glicerol al 10% estéril y a 4 °C , agitar bien y centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.
5. Decantar el sobrenadante y agregar nuevamente 15 mL de glicerol al 10% y volver a centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.
6. Decantar y resuspender el *pellet* con una micropipeta.
7. Pasar 50 μ L de células a un tubo Eppendorf y colocar 2 μ L de DNA y mezclar perfectamente.
8. Colocarlo en las cubetas para electroporación estériles, las cuales previamente fueron enfriadas en hielo. Dar un pulso de 1820 volts en el electroporador.

Recuperar las células de la cubeta añadiendo 1 mL de medio SOB y con la micropipeta resuspender y pasar a un tubo chico con tapón de metal. Dejar recuperando en agitación por 1 hora.

9. Pasar la muestra a un Eppendorf y centrifugarla a 5000 rpm durante 5 minutos.

Decantar el sobrenadante y resuspender en vórtex y agregar 200 μ L de medio SOB.

10. Sembrar en cajas con LB y sus antibióticos correspondientes, colocando 100 μ L de muestra en cada caja, e incubar toda la noche.

9.5.2 Transformación de protoplastos de *Streptomyces* con PEG.

1. Inocular con esporas 25mL de YEME suplementado con MgCl₂ 10mM y glicina al 0.5 y crecer durante 36 h a 30°C con agitación.

2. Centrifugar 5min a 3500rpm y eliminar el sobrenadante, lavar el micelio con sacarosa 10.3%.
3. Resuspender en 25 mL de sacarosa 10.3% y distribuir en 5 tubos, centrifugar 10 minutos a 3500 rpm , eliminar el sobrenadante y congelar el micelio a -20°C.
4. Suplementar el amortiguador P y dejar reposar 30 min. Tomar 5mL de éste y disolver 7.5mg de lisozima. Filtrar el amortiguador P y después los 5mL de amortiguador P con lisozima.
5. Descongelar el micelio y agregarle la solución de lisozima, mezclar e incubar a 30°C por 1 h agitando suavemente cada 15 min.
6. Tomar una muestra para ver al microscopio y asegurarse de que se hayan formado los protoplastos.
7. Filtrar los protoplastos por un filtro de esporas, en ese mismo filtro agregar 5mL de amortiguador P y centrifugar 10min a 3500rpm.
8. Eliminar el sobrenadante completamente y resuspender la pastilla. Agregar el DNA e inmediatamente después agregar 0.6mL de PEG (polietilenglicol 1500, Sigma) al 25% (p/V) en amortiguador P, con una pipeta pasteur mezclar 4 ó 5 veces. Agregar 5 mL de amortiguador P y centrifugar 10 min a 3500 rpm.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender para luego agregarle 0.3mL de amortiguador P.
10. Hacer diluciones a partir de 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
11. Poner 0.1 mL de la dilución en cada caja de R2YE suplementado y 2.5 mL de agar suave. Cubrir completamente la superficie, dejar melificar e incubar a 30°C entre 18 y 20 h.
12. Agregar el antibiótico correspondiente e incubar nuevamente a 30°C hasta que las colonias crezcan lo suficiente para poder cuantificarlas.