



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“La expresión de la metiltransferasa Dam de *Escherichia coli* es letal en *Streptomyces coelicolor* y se debe a la presencia de una nucleasa adquirida por transferencia horizontal”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MARTI CADENA SANDOVAL

ASESOR DE TESIS:

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

MÉXICO, D. F.

JUNIO DE 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: “**La expresión de la metiltransferasa Dam de *Escherichia coli* es letal en *Streptomyces coelicolor* y se debe a la presencia de una nucleasa adquirida por transferencia horizontal**”, que presenta el alumno **MARTI CADENA SANDOVAL** con número de cuenta **307064202**, cumple con los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dra. María del Carmen del Socorro
Gómez Eichelmann

Dr. Luis Servín González

Dra. Bertha González Pedrajo

Dr. Luis David Alcaraz Peraza

Dra. Susana Brom Klanner

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la mejor educación, con instalaciones y profesores de punta que me llenaron de herramientas y conocimiento para seguir adelante.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Medicina por ser parte importante de mi desarrollo y formación académica durante la licenciatura.

Al Dr. Luis Servín González por todas sus enseñanzas desde mi primer día en la carrera y por permitirme formar parte de su gran equipo de investigación. Además, por su guía y asesoría en el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su apoyo técnico, enseñanzas, comentarios y sugerencias que mejoraron mi trabajo.

A los miembros de mi jurado la Dra. Carmen Gómez Eichelmann, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. Luis David Alcaraz Peraza y Dra. Susana Brom Klanner por sus comentarios, sugerencias, correcciones y preguntas para mejorar este trabajo, y para enriquecer mi conocimiento.

A la Dra. Gloria Soberón y a los integrantes de su laboratorio por sus comentarios a este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay Larios y Biól. Guadalupe Códiz Huerta de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por sus servicios y apoyo técnico.

Al PAPIIT por el apoyo y financiamiento del proyecto IN207212 “Caracterización del sistema de restricción de DNA metilado de *Streptomyces coelicolor*”.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Isaí, Gaby, Lalo, Tania, Eli, Kevin, Mauricio, Blanca, Erick, Monse, Angie, Jacqueline, Christian, Manuel, Julio, Dany, Anayeli y por supuesto a Laura (mi madre académica). A todos ellos por su cálida compañía, excelentes charlas y buenos seminarios; pero sobre todo, por hacer de mi estancia en el laboratorio de lo más agradable y divertida.

ÍNDICE

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	3
2.1	Características del género <i>Streptomyces</i>	3
2.2	Sistemas de modificación-restricción (M-R) de DNA	4
2.2.1	Sistemas de restricción metil-específicos (Tipo IV)	7
2.3	Sistemas de modificación y de restricción de DNA metilado de <i>E. coli</i>	7
2.4	La restricción de DNA modificado en <i>Streptomyces</i>	12
2.5	Movilidad genética de los sistemas de M-R	13
2.5.1	Elementos genéticos móviles en actinobacterias	14
2.6	La selección positiva de mutantes en el sistema de restricción de <i>Streptomyces coelicolor</i> mediante la expresión de metiltransferasas	16
3	Antecedentes.....	17
4	Justificación.....	19
5	Objetivos	20
6	Materiales y Métodos	21
6.1	Cepas.....	21
6.2	Plásmidos.....	22
6.3	Medios y condiciones de cultivo.....	23
6.4	Soluciones.....	25
6.5	Amplificación y clonación del gen <i>dam</i> de <i>E. coli</i>	25
6.6	Construcción del plásmido pIJ6902-Dam.....	28
6.7	Construcción del plásmido pIJ6021-Dam.....	29
6.8	Ensayos de incompatibilidad entre la metiltransferasa Dam y las nucleasas de <i>Streptomyces coelicolor</i>	31
6.9	Evaluación de la expresión y funcionalidad de la metiltransferasa Dam en <i>Streptomyces</i>	32
6.10	Subclonación del gen <i>sco5330</i> en un vector de expresión de <i>E. coli</i> que agrega una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal	33
6.11	Sobreproducción y purificación del producto del gen <i>sco5330</i> por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.....	34

6.12 Renaturalización del producto del gen <i>sco5330</i>	35
6.13 Determinación de la actividad <i>in vitro</i> de SCO5330	36
7 Resultados	37
7.1 Incompatibilidad de la metiltransferasa Dam con nucleasas individuales de <i>S. coelicolor</i> clonadas en <i>S. lividans</i>	37
7.2 Incompatibilidad de la metiltransferasa Dam con componentes del sistema de restricción de <i>S. coelicolor</i>	40
7.3 Análisis de las colonias que contienen el plásmido pIJ6021-Dam	41
7.4 Análisis de la restricción de las cepas que permitieron expresar Dam y que después perdieron el plásmido	44
7.5 El producto del gen <i>sco5330</i> como probable nucleasa metil-específica	47
7.6 Expresión del producto del gen <i>sco5330</i> y localización subcelular	50
7.7 Purificación del producto del gen <i>sco5330</i> en condiciones desnaturalizantes	52
8 Discusión.....	54
9 Conclusiones.....	63
10 Perspectivas.....	64
11 Bibliografía.....	65
12 Anexos.....	70

1. RESUMEN

Streptomyces es un género de bacterias Gram positivas que tienen una gran importancia científica y económica. *Streptomyces coelicolor* es la especie mejor caracterizada de este género a nivel molecular y genético. *S. coelicolor* cuenta con un fuerte sistema de restricción metil-específico (SRME), compuesto por varios genes que codifican diferentes nucleasas las cuales reconocen secuencias de DNA metilado tanto en citosinas como en adeninas, y que dificulta su manipulación genética. Se ha demostrado que algunos de los genes que codifican para dicho sistema están localizados en islas genómicas que han sido adquiridas por transferencia horizontal.

Previamente, en nuestro laboratorio, se obtuvieron mutantes que carecían de algunos de los genes que codifican para nucleasas del SRME; esas mutantes mostraron una disminución parcial de la restricción de DNA metilado. Así mismo, al introducir esos genes en *Streptomyces lividans* (especie sin un fuerte SRME) hubo un aumento en los niveles de restricción a DNA metilado. Aunque se lograron definir algunos de los genes involucrados en codificar esta importante barrera, es necesario definir su contribución específica, en particular las nucleasas involucradas en restringir DNA metilado en adeninas.

Para ello se amplificó el gen de la metiltransferasa en adeninas (Dam) de *E. coli* y se clonó tanto en un plásmido monocopia como en uno multicopia. El plásmido monocopia con Dam se empleó para buscar cuál de los genes previamente identificados como parte del SRME eran incompatibles con Dam. El gen *sco5330* resultó ser el único incompatible con Dam ya que introduciendo el plásmido con este gen mediante conjugación en la cepa de *S. lividans* este fue letal.

Se introdujo el plásmido multicopia con Dam en una cepa de *S. coelicolor* carente de *sco5330*, con el objetivo de que, aunque esta cepa sigue restringiendo DNA metilado y sea letal, alguna de las colonias sobrevivientes pudieran tener nuevas mutaciones en los genes involucrados en dicha restricción. Interesantemente, encontramos unas cuantas colonias de las cepas IB61 e IB72 (sin *sco5330*) que aceptaron la introducción del gen *dam*; comprobamos que su propio DNA se encontraba metilado; sin embargo, ninguna de estas colonias mostró disminución de la restricción a DNA metilado por Dam, lo que sugiere otro nivel de regulación diferente al genético.

Por otro lado, se intentó estudiar al producto del gen *sco5330 in vitro*. El gen que codifica para dicha proteína fue clonado y expresado en *E. coli* para tratar de purificarla y caracterizarla, ya que sería importante conocer su especificidad, uso de cofactores, o si requiere de iones como Mg^{2+} o Ca^{2+} , como ha sido reportado para otras nucleasas. Lamentablemente, dicho producto se localizó en la fracción insoluble, en cuerpos de inclusión; pero en condiciones desnaturalizantes logramos purificar la proteína. Sin embargo, al renaturalizarla no detectamos actividad alguna de restricción al probar la digestión de un plásmido previamente metilado.

Aunque el conocimiento sobre los SRME es poco, este estudio nos ayuda a entender la complejidad, diversidad y los mecanismos moleculares de su funcionamiento.

Además, provee información que facilitará la manipulación genética de *Streptomyces* y por tanto, su uso en la industria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características del género *Streptomyces*

Streptomyces es un género de bacterias que se encuentra dentro del grupo de las actinobacterias (orden Actinomycetales, familia Streptomycetaceae). Estas bacterias han sido muy estudiadas no solo por su importancia económica e industrial, sino también por su gran aplicación científica y biotecnológica, al ofrecer ventajas como hospedero para clonar y expresar genes de origen procariótico y eucariótico (Lammertyn & Anné, 1998). Antiguamente, se creía que eran organismos intermedios entre hongos y bacterias, pero ahora sabemos que son un grupo importante de bacterias Gram positivas. Entre las características de estas bacterias podemos mencionar que son organismos estrictamente aerobios, presenta un ciclo de vida complejo con varias etapas de diferenciación; son bacterias con crecimiento micelial y tienen uno de los genomas más grandes reportados en bacterias: 8,667,507 pares de bases (Bentley, *et al.*, 2002). Su cromosoma es lineal y tiene un alto contenido de guanina y citosina (aproximadamente 73%), característica que comparte con otras bacterias del mismo orden, como *Mycobacterium tuberculosis*. Habitan la mayoría de los ecosistemas del suelo, y son organismos sapróbios por lo que desarrollan un papel importante en el ciclo del carbono (Lewis, *et al.*, 2010).

El complejo ciclo de vida que presenta *Streptomyces*, inicia con la germinación de una espora, la cual produce uno o varios tubos germinales que se elongan mediante crecimiento apical (Flärdh, 2003). Dichos tubos dan lugar a hifas que forman divisiones a ciertos intervalos, donde inicia el crecimiento de nuevas hifas en ramificaciones laterales, permitiendo la colonización y el aumento en la biomasa de manera casi exponencial; a esto se le conoce como etapa de micelio vegetativo (Hopwood, 2006). Se cree que debido a la disminución de sustratos disponibles, el micelio vegetativo produce ramificaciones que se extienden hacia arriba, dando lugar a hifas aéreas que no están en contacto con el sustrato. Después de crecer, en las regiones distales de estas hifas aéreas se forman septos, dando lugar a compartimentos que se convertirán en esporas (Figura 1).

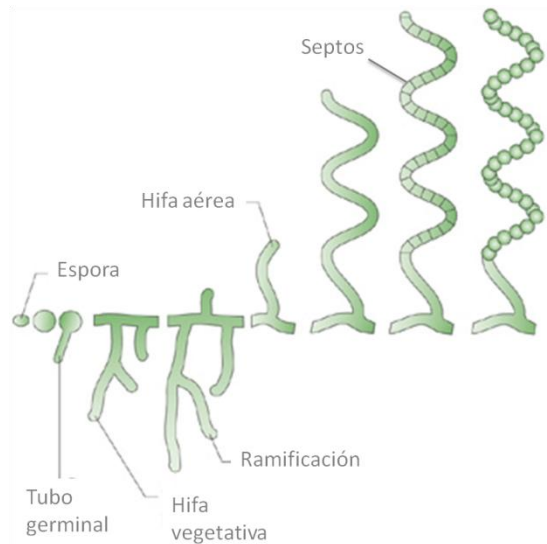


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Modificado de Klas Flärdh & Mark J. Buttner, 2009).

Actualmente se cuenta con el genoma secuenciado de *Streptomyces coelicolor* A3(2), esta cepa contiene dos plásmidos, uno lineal llamado SCP1 y otro circular denominado SCP2 (Bentley, *et al.* 2002). A pesar de ser la especie mejor estudiada a nivel molecular, *S. coelicolor* presenta una desventaja desde el punto de vista de su manipulación: contar con un fuerte sistema de restricción de DNA metilado o metil-específico (SRME).

2.2 Sistemas de modificación-restricción (M-R) de DNA

Los sistemas M-R representan la principal barrera de protección contra la entrada de DNA foráneo, y se piensa que su papel más importante es impedir la entrada de DNA por transformación o por bacteriófagos. Desde el descubrimiento de los sistemas de M-R estos fueron considerados el sistema inmune de las bacterias (Bertani, *et al.*, 1953).

A partir del descubrimiento de los sistemas de M-R presentes en bacterias se han dado de manera gradual análisis genéticos y bioquímicos que han contribuido de manera importante al avance del conocimiento de estos sistemas.

En bacterias existen principalmente dos grupos de sistemas M-R: aquellos en donde la modificación (metilación) se lleva cabo en las secuencias de reconocimiento del DNA para protegerlo de la acción de las enzimas de restricción (sistemas de tipo I, II y III) y aquellos dónde se restringe únicamente el DNA metilado exógeno y se protege el DNA celular no modificado (tipo IV). Se ilustra de manera general a estos dos tipos de sistemas en la Figura 2.

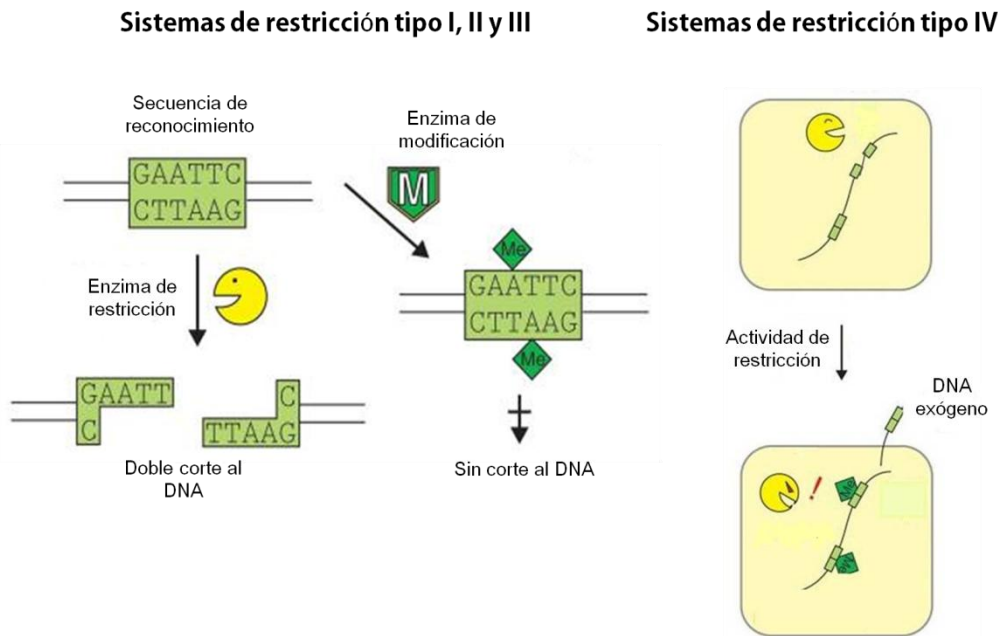


Figura 2. Tipos de sistemas de M-R existentes en bacterias. Los sistemas tipo I, II y III reconocen secuencias sin metilar y protegen su propio DNA por la acción de una metiltransferasa. En cambio, los sistemas tipo IV reconocen únicamente secuencias metiladas (Modificado de Ishikawa, *et al.*, 2010).

Sistemas de tipo I. Son proteínas hetero-oligoméricas conformadas por dos subunidades de endonucleasa de restricción (R), dos de metiltransferasa (M) y una de especificidad (S). Tienen actividad dual de restricción o de modificación dependiendo el estado del DNA. El DNA no metilado es sustrato de restricción, el DNA hemi-metilado es sustrato de modificación y el DNA completamente modificado está protegido de restricción. Requieren de ATP, Mg^{2+} y S-adenosilmetionina (SAM), este último como sustrato para metilar la posición N6 de las adeninas (Figura 3). El corte que realiza en el DNA es distante respecto a la

secuencia de reconocimiento; se ha visto que el corte es promovido al colisionar dos enzimas (Mark & Dryden, 2005; Murray, 2000).

Sistemas de tipo II. Son enzimas que reconocen secuencias específicas en el DNA, generalmente secuencias palindrómicas cortas de entre 4 y 8 pares de bases. La restricción y la modificación ocurren en posiciones constantes dentro de la misma secuencia de reconocimiento o muy cercana a ella. La endonucleasa de restricción y la metiltransferasa son proteínas independientes. Usualmente la endonucleasa requiere de iones Mg^{2+} como cofactor. La metiltransferasa usa a SAM como donador para modificar ya sea citosinas, en posición N4 o C5, como a adeninas en posición N6 (Figura 3), dependiendo del sistema que se trate. Son de gran importancia biotecnológica para las técnicas de recombinación de DNA y se han caracterizado más de 3500 enzimas de este tipo (Roberts, *et al.*, 2003; Mark & Dryden, 2005).

Sistemas de tipo III. Comparten muchas características con las de tipo I. Son hetero-oligómeros conformados por dos subunidades: “mod”, que reconoce al sustrato y se encarga de la modificación usando SAM como donador; y “res”, que se encarga de restringir pero únicamente está activa en una conformación res_2mod_2 . La actividad de restricción es dependiente de iones Mg^{2+} y ATP, además el complejo proteico debe interaccionar con dos copias inversamente orientadas de entre 5 y 6 pares de bases para su actividad. La subunidad “mod” puede actuar independiente de la otra metilando adeninas en posición N6 (Figura 3), y en una sola hebra para producir DNA hemimetilado; esta es protección suficiente pues la endonucleasa solo restringe DNA sin modificar (Desirazu, *et al.*, 2013).

Sistemas de tipo IV. Estos han sido los menos estudiados, ya que no están asociados a metiltransferasas que protejan su propio DNA pues el sustrato para la restricción es únicamente DNA modificado (metilado, hidroximetilado, glucosil-hidroximetilado, entre otras modificaciones). No ha sido posible definir, para la mayoría de ellas, una clara secuencia de reconocimiento, aunque sí se ha demostrado una alta especificidad por DNA modificado. Los sistemas mejor estudiados son McrA, McrBC y Mrr de *E. coli* (Mark & Dryden, 2005).

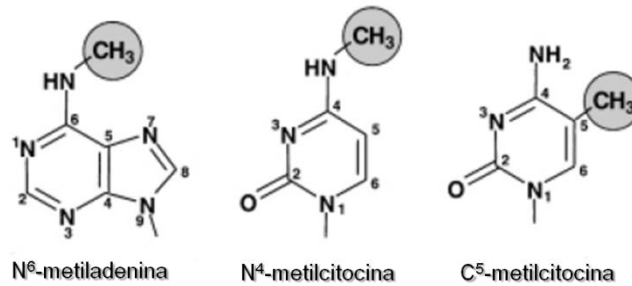


Figura 3. Estructuras químicas de las bases del DNA metiladas (Modificado de Albert Jeltsch, 2002).

2.2.1 Sistemas de restricción metil-específicos (tipo IV)

Como ya se mencionó existen endonucleasas que van en contra del paradigma de los sistemas de M-R, ya que cortan el DNA solamente cuando este se encuentra metilado. Por lo tanto, un sistema de restricción metil-específico se califica como aquel que depende de la modificación del DNA para poder restringirlo. Los organismos que presenten este tipo de sistemas tienen un patrón de modificación distinto al que reconocen sus enzimas de tipo IV o bien no modifican su propio DNA, de lo contrario estarían restringiendo su propio DNA.

Este tipo de sistemas han sido identificados además de en *E. coli*, en bacterias del género *Streptomyces*. La identificación de dichos sistemas surgió al intentar realizar experimentos de manipulación genética y ver que muchas de las especies de *Streptomyces* no permitían la introducción de DNA proveniente de *E. coli*, cuando este provenía de cepas que metilaban el DNA.

2.3 Sistemas de modificación y de restricción de DNA metilado de *E. coli*

El DNA de *E. coli* se encuentra metilado gracias a la participación de tres diferentes sistemas: el sistema Hsd, la metilasa Dcm y la metilasa Dam, y que a continuación se describen.

Sistema Hsd. Sistema M-R de tipo I, conformado por los genes *hsdR*, *hsdM* y *hsdS*. La secuencia de reconocimiento de la metilasa Hsd es AACNNNNNGTGC, y modifica la segunda adenina de esta secuencia en la

posición N6 y también la adenina complementaria a la T mostrada. La actividad principal de esta metilasa es sobre el DNA hemi-metilado que resulta de la replicación del DNA. Aproximadamente el 0.02% de las adeninas del genoma de *E. coli* son parte de secuencias de reconocimiento y de modificación para Hsd. El sistema Hsd también codifica para una enzima de restricción llamada EcoKI, cuyo blanco son los sitios Hsd no modificados, pero su secuencia de corte se encuentra fuera de la de reconocimiento. Cabe mencionar que la unión de dos HsdM y una HsdS forman el complejo M.EcoKI (Dryden, *et al.*, 1991; Powel, *et al.*, 1998).

Metiltransferasa Dcm. El producto del gen *dcm* es una metiltransferasa huérfana (sin una endonucleasa que la acompañe). Dcm metila la segunda citosina en la secuencia CC(A/T)GG, en la posición C5 (Bhagwat, *et al.*, 1986). El papel de dicha enzima en *E. coli* no es muy claro. Originalmente el único fenotipo observado en las mutantes del gen *dcm* era la susceptibilidad a restricción por el sistema de la endonucleasa EcoRII (Palmer & Marinus, 1994). Aunque se ha propuesto que la contribución de la metilación por Dcm podría determinar la tasa de mutaciones y/o niveles de recombinación, y así participar en la evolución del genoma de *E. coli* (Gómez-Eichelmann & Ramírez-Santos, 1993). También, recientemente se describió el papel de la metilación en citosinas como un regulador de la expresión génica durante la fase estacionaria en *E. coli*; pues se observó que la mayoría de las secuencias blanco de Dcm (CmCWGG) estaban completamente metiladas en la fase estacionaria, mientras que muchos otros sitios blanco similares sólo se encontraban metilados parcialmente en la fase exponencial (Kahramanoglou, *et al.*, 2012).

Metiltransferasa Dam. Al igual que Dcm, Dam es una metiltransferasa huérfana. Esta metila las adeninas (de ahí su nombre *DNA adenine methyltransferase*, por sus siglas en inglés) de la secuencia palindrómica específica GATC, en la posición N6 (Schlagman & Hattman, 1983). El producto del gen *dam* tiene un papel muy importante en la célula, pues sabemos que la mutación de dicho gen produce una variedad de fenotipos, incluyendo hiper-recombinación, hipermutabilidad y la no viabilidad si se combina con una mutación en los genes *recA*, *recB* o *recC* (Palmer y Marinus, 1994). Aunque en *E. coli* la metilasa Dam es dispensable, en otros

organismos como *Vibrio cholerae* es necesaria para la viabilidad (Egan & Waldor, 2003).

A continuación se describen brevemente las múltiples funciones de la metiltransferasa Dam de *E. coli* (Figura 4) y de sus homólogos.

- Dam en la modulación de la expresión génica. La metilación de las secuencias GATC en la región promotora de un gen puede influir incrementando o disminuyendo su transcripción (Løbner-Olesen, *et al.* 2005). Otra forma de regulación ocurre cuando Dam compite con otras proteínas regulatorias como Cap o Lrp, pues sus sitios de unión se sobreponen cerca o en la misma secuencia promotora (Hernday, *et al.* 2003).
- Dam como factor de virulencia. Se ha reportado que Dam controla la expresión de numerosos genes de virulencia (Heithoff, *et al.*, 1999). La pérdida de Dam altera los patrones de metilación del DNA, lo cual altera la unión de proteínas reguladoras en el cromosoma (Low, *et al.* 2001). En otros estudios, la sobreproducción de Dam en *Yersinia pseudotuberculosis* causa la atenuación de la virulencia y confiere una respuesta inmune protectora pues hay una mayor secreción de proteínas (Julio, *et al.* 2002). Estos trabajos muestran la posible función moduladora de Dam en la patogénesis bacteriana.
- La participación de Dam en la replicación y segregación del DNA. En *E. coli*, el origen de replicación (*oriC*) del cromosoma contiene 11 sitios GATC. La replicación del cromosoma inicia cuando la proteína iniciadora DnaA se une al *oriC* y separa las dos hebras de la doble hélice. La unión de DnaA al *oriC* es únicamente posible si los sitios GATC se encuentran metilados por Dam. Durante la replicación del DNA los sitios GATC no se metilan inmediatamente debido al secuestro del origen por la proteína SeqA, dicho secuestro previene la acción de Dam. La hemimetilación del *oriC* provee de otra señal a la célula: la segregación de la estructura nucleoide. Los orígenes hemimetilados de los dos cromosomas recién obtenidos después de la replicación se unen a proteínas que dirigen la segregación y que se

encuentran localizadas en la membrana (revisado de Wion & Casadesús, 2006).

- Reparación de errores en el DNA dirigidos por Dam. Los errores de apareamiento o “mismatch” en el DNA son inevitables durante la replicación y deben ser corregidos en la célula para evitar posibles reacciones letales. La corrección de dichos errores ocurre en la cadena no metilada y recién sintetizada. Por ello, debe existir un mecanismo de distinción entre la cadena molde y la recién sintetizada; esta información está provista por la metilación transitoria en adeninas realizada por Dam. El complejo proteico encargado de reconocer y reparar el error está conformado por las proteínas MutS, MutL y MutH (revisado de Wion & Casadesús, 2006).

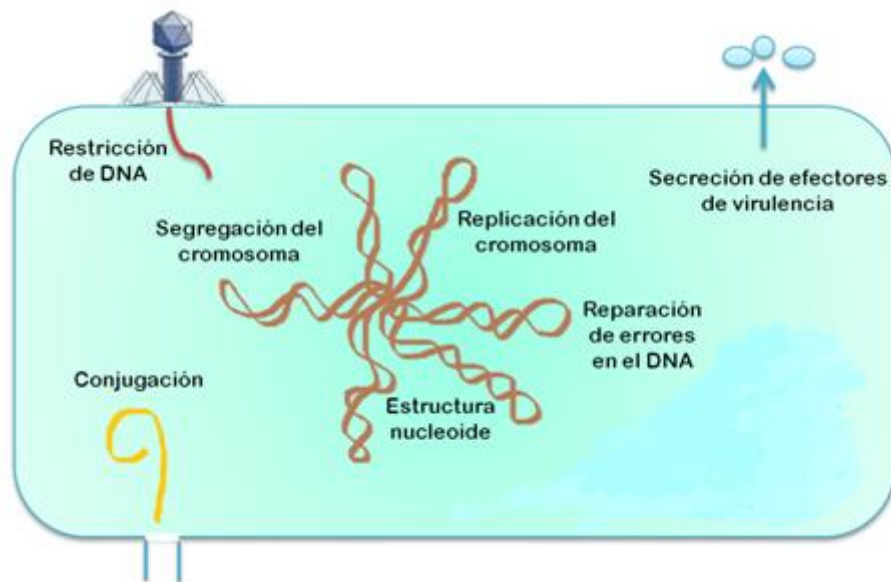


Figura 4. Descripción general de las funciones de la metilación N6 en adeninas por Dam en *E. coli*. La metilación por Dam tiene un papel relevante en muchos procesos celulares fundamentales: regulación de la replicación y segregación del cromosoma, reorganización del nucleoide; en la discriminación de las cadenas del DNA para la reparación de errores; en la regulación de transferencia de plásmidos mediante conjugación y en la regulación transcripcional y de secreción de ciertos factores de virulencia (Modificado de Wion & Casadesús, 2006).

En cuanto a la restricción *E. coli* presenta, además de EcoKI, otras tres enzimas de restricción huérfanas, que no están asociadas con alguna metiltransferasa, y

que tienen la característica de cortar solamente DNA metilado. Son endonucleasas de tipo IV. Y se describen brevemente a continuación.

McrA. Descrita en 1986 junto con McrB, esta enzima degrada DNA con citosinas metiladas (Raleigh & Wilson, 1986). La actividad de McrA tiene especificidad por ciertas secuencias, y aunque sus secuencias de reconocimiento no han sido completamente definidas se demostró que es capaz de restringir DNA modificado por las metilasa M.HpaII, ésta metila la segunda citosina de la secuencia CCGG (Mulligan, *et al.* 2008).

McrBC. Este sistema está compuesto de dos genes que expresan tres proteínas: McrB_L, la versión extensa del producto del gen *mcrB*; McrB_s, una versión más pequeña del producto del gen *mcrB* pues existe un sitio de inicio de la traducción interno; y McrC. McrBC tiene un proceso de regulación muy estricto para realizar los cortes en el DNA, y por lo tanto requiere que McrB_L y McrC se encuentren en una proporción específica. Para poder llevar a cabo su función de restricción requiere de GTP, y su sitio de corte es altamente flexible, normalmente consiste de dos secuencias metiladas separadas por un espacio variable, y dichas secuencias presentan citosinas metiladas precedidas por una purina (RmC), el corte ocurre a poca distancia de uno de los sitios (Stewart, *et al.* 2000).

Mrr. Se detectó su presencia al analizar cepas de *E. coli* que carecían tanto de McrA como de McrB y aún seguían exhibiendo un nivel de restricción significativo para DNA metilado en el dinucleótido CG (Kelleher & Raleigh, 1991). La enzima Mrr es capaz de cortar el DNA cuando está metilado tanto en adeninas como en citosinas, pero no ha sido posible definir una secuencia consenso de reconocimiento y de corte. Sin embargo se sabe que presenta especificidad, pues al expresar ciertas metilasas de sistemas tipo II, como HincII, HpaI, y TaqI, en *E. coli* se observó incompatibilidad, mientras que era compatible con otras (Waite-Rees, *et al.* 1991).

Gracias al estudio y caracterización de estos sistemas de restricción metil-específicos, aunado al uso de herramientas bioinformáticas, ha sido posible detectar la presencia de estos sistemas en otros organismos y empezar a definir su papel y sus mecanismos de funcionamiento.

2.4 La restricción de DNA modificado en *Streptomyces*

Por su importancia biotecnológica y la aplicación industrial de este organismo, el poder manipularlo genéticamente se convirtió en una necesidad. Dada la facilidad y enorme existencia de herramientas moleculares para *E. coli*, la mayor parte del trabajo molecular y genético primero se realiza en este organismo y después se traslada al modelo de interés. Fue por ello que desde los primeros experimentos e intentos por tratar de manipular genéticamente a *Streptomyces* estos fallaron o mostraron una muy baja frecuencia de transformantes.

La restricción en los miembros de este género ha sido reportada desde 1988. Primero con la caracterización del sistema de restricción metil-específico de *Streptomyces avermitilis* (MacNeil, 1988). Posteriormente fue descrita su presencia en *S. griseus*, *S. flavopersicus* y *S. coelicolor* (Kwak, *et al.* 2002; Lyutzkanova, *et al.* 2001; González-Cerón, *et al.* 2009). Dicha restricción se da en secuencias Dcm, Hsd y Dam, así como otras metiltransferasas de tipo II como M.TaqI, M.SssI, entre otras. Esto nos habla de una restricción tanto de adeninas metiladas como de citosinas metiladas. También nos habla de la participación de más de una enzima para dar lugar a tan variada restricción.

S. coelicolor, como ya se mencionó, es el organismo mejor entendido a nivel molecular y se tiene la ventaja de contar con su genoma secuenciado. Sin embargo, dado el fuerte sistema de restricción metil-específico que presenta, generalmente es relegado por su pariente cercano *S. lividans* para ser modelo de expresión de proteínas heterólogas pues no cuenta con un SRME tan fuerte y se obtiene un gran número de transformantes (González-Cerón, *et al.* 2009).

En 2007 se llevó a cabo la comparación genómica entre *S. coelicolor* y *S. lividans* mediante el uso de microarreglos de todo el genoma de ambas especies como herramienta genómica comparativa, y se lograron identificar diferencias sutiles entre estos dos genomas (Jayapal, *et al.* 2007).

Se identificaron 5 islas genómicas y 18 islotes genómicos ausentes en el cromosoma de *S. lividans*. El análisis de dichos segmentos, como el contenido de GC, y las características de su localización en el cromosoma (cercanía a genes de

tRNAs o flanqueados por secuencias repetidas) de *S. coelicolor* sugiere que es probable que hayan sido adquisiciones por transferencia horizontal (varias de estas regiones parecían estar asociadas con elementos genéticos móviles como transposones o plásmidos integrativos). Además, dentro de estos segmentos se hallaron genes que podrían codificar metiltransferasas, así como genes que podrían codificar endonucleasas de restricción metil-específicas. Esto explica la base genética de las diferencias fenotípicas entre estas dos especies. La ausencia de genes, como SCO4213, SCO4631 y SCO2863, en *S. lividans* explica potencialmente la relativa facilidad de ser transformado con DNA exógeno, a diferencia de *S. coelicolor* (Jayapal, *et al.*, 2007). Se propone que algunos de los genes que codifican para dicho SRME en *S. coelicolor* están localizados en estas islas genómicas que han sido adquiridas por transferencia horizontal.

2.5 Movilidad genética de los sistemas de M-R

Dado el beneficio de contar con una barrera que proteja a la célula de la entrada de DNA exógeno, se cree que los sistemas de M-R deben mantenerse en el genoma de las bacterias, pues le confiere cierta ventaja adaptativa.

La transferencia horizontal de genes facilita enormemente la rápida adaptación genética al cambiar de ciertas condiciones ambientales y también facilita la colonización de nuevos nichos pues permite adquirir en un solo paso nuevas funciones (Ghinet, *et al.* 2011). Los principales mecanismos para la transferencia horizontal de genes son la transformación, la transducción y la conjugación; éste último está mediado por plásmidos conjugativos y por Elementos Integrativos y Conjugativos (ICE, por sus siglas en inglés).

En el 2002 Burrus y colaboradores proponen el nombre de ICE para un grupo diverso de elementos genéticos móviles que contienen características similares tanto a las de los plásmidos como a la de los bacteriófagos. Los ICE están presentes en la mayoría de las bacterias. Una característica importante es su mantenimiento como lo haría un profago; es decir, que se replica a lo largo del cromosoma del huésped. Otra característica es su habilidad para salirse del

cromosoma, conjugar a un nuevo hospedero e integrarse en ese cromosoma mediante recombinación sitio específica (Burrus, *et al.* 2002).

Por lo tanto, un ICE debe contener al menos tres módulos involucrados en cada una de sus funciones: mantenimiento, conjugación y regulación. Pueden tener elementos genéticos adicionales como transposones y/o recombinasas, los cuales a su vez permiten adquirir módulos adicionales, como resistencia a antibióticos.

2.5.1 Elementos genéticos móviles en actinobacterias

En las actinobacterias existe una clase especial de ICE, llamados AICE (por su nombre en inglés, Actinomycete Integrative and Conjugative Elements), que a diferencia de los demás tienen la habilidad de replicarse autónomamente, como un plásmido que no necesita estar integrado al cromosoma. Aun y con esta característica, los AICE se mantienen integrados en genes específicos de tRNAs en el cromosoma del huésped.

Se han encontrado AICE presentes en diversos géneros de actinobacterias. En los últimos años la evaluación de base de datos de varios genomas ha revelado numerosos elementos AICE putativos. Estos se descubrieron al buscar genes de integrasas que flanquearan genes para tRNAs, la secuencia de las integrasas se tomaron de AICE previamente conocidos (te Poele, *et al.* 2007 y 2008).

Así, el análisis del genoma de *S. coelicolor* reveló que contiene seis inserciones similares a las de otro AICE llamado pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens*. De estas seis inserciones tres están integradas dentro de un gen para tRNA. Ahora bien, de esas tres inserciones dos de ellas parecen ser funcionales AICESco3250 y AICESco5349. El tercero parece ser un remanente de otro elemento (te Poele, Bolhuis & Dijkhuizen, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la organización modular de estos elementos parece estar conservada. Por ejemplo, el gen de la integrasa (*int* en Figura 5), que permite la recombinación sitio específica, está presente en los tres AICE; y para que ocurra la integración deben existir dos secuencias cortas idénticas: el sitio de

ataque en el elemento (*attP*) y el otro en el cromosoma (*attB*). Como se muestra en la Figura 5 el sitio *attP* está presente.

Otro elemento importante y conservado en los AICE es el de replicación. Aunque no se requiere replicar para mantener al elemento, ya que estos se mantienen gracias a que permanecen en el cromosoma.

En un plásmido la replicación se lleva a cabo gracias a la participación de una proteína iniciadora (Rep) que se une a una secuencia específica en el sitio ori y guía el ensamblaje del complejo de inicio de la replicación. Homólogos de dicha proteína iniciadora (RepSA) están presentes tanto en los AICE previamente conocidos como en los encontrados recientemente.

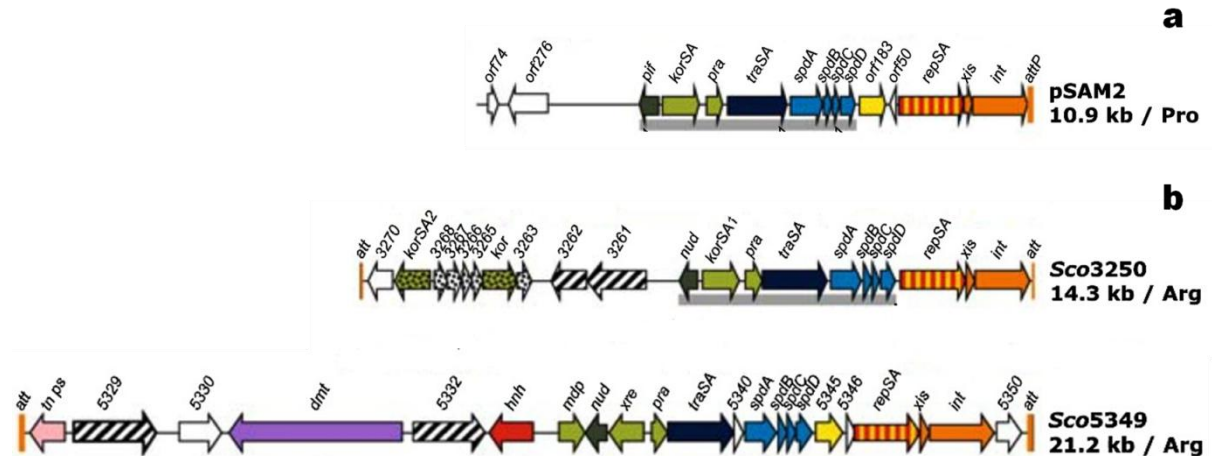


Figura 5. Organización estructural de AICE en *Streptomyces* (a) previamente caracterizados y secuenciados, y (b) encontrados recientemente. El AICE pSAM2 de *S. ambofaciens* y los AICE Sco3250 y Sco5349 de *S. coelicolor* (Modificado de te Poele, et al., 2008).

Aunado a otros elementos genéticos móviles como plásmidos y profagos, los AICE representan un grupo importante de catalizadores evolutivos para los genomas bacterianos, y además de las posibles ventajas adquiridas por el flujo de dichos elementos que falta por estudiar, los pocos trabajos realizados hasta ahora sugieren que los AICE juegan un papel importante en el establecimiento de nuevas bases para el estudio molecular y evolutivo de las actinobacterias.

2.6 La selección positiva de mutantes en el sistema de restricción de *S. coelicolor* mediante la expresión de metiltransferasas

Un hallazgo interesante sobre la función de los sistemas de restricción de DNA metilado es que estos presentan incompatibilidad con otros sistemas de modificación del DNA. Por ejemplo, recientemente se encontró que la expresión de la nucleasa de tipo IV Mrr de *Salmonella typhimurium* es también incompatible con el sistema de modificación-restricción tipo III de esta misma cepa. Lo anterior ha sido interpretado como evidencia de un antagonismo evolutivo entre los sistemas de restricción de DNA metilado y los sistemas de modificación del DNA (Tsfazgi, *et al.* 2011).

3. ANTECEDENTES

El grupo del Dr. Servín ha estudiado parte de los genes que conforman al SRME de *S. coelicolor*. En un trabajo realizado por González-Cerón, *et al.* (2009) encontraron que *S. coelicolor* no puede ser transformado con DNA purificado de cepas de *E. coli* que tuvieran alguno o los tres sistemas propios de dicha bacteria. Por el contrario, *S. coelicolor* puede ser transformado con DNA proveniente de una cepa sin los tres sistemas de modificación. Además, utilizando herramientas bioinformáticas, se detectaron genes putativos para nucleasas de restricción metil-específicas. En las islas genómicas descritas previamente (Jayapal, *et al.* 2007), se ubicaron los genes SCO4213, SCO2863, SCO4631 y el operón SCO3261-SCO3262, y se confirmó su participación en la restricción metil-específica. La mutante de *S. coelicolor* carente de estos genes mostró una disminución parcial de la restricción a DNA metilado; sin embargo, esta cepa continúa restringiendo (aunque en menor nivel que la silvestre) DNA metilado en sitios Dam, lo cual indica que existen otras nucleasas metil-específicas que no han sido identificadas. Por otra parte, al clonar los genes SCO4213, SCO2863, SCO4631 y el operón SCO3261-SCO3262 en *S. lividans* aumentó su restricción a DNA metilado.

A pesar de haber identificado a estos genes como parte del SRME fue claro que no toda la actividad restrictiva podía atribuirse únicamente a ellos; queda encontrar los elementos restantes.

Otros datos interesantes que se han encontrado en el laboratorio del Dr. Servín están relacionados con la incompatibilidad del sistema de restricción de *S. coelicolor* con otros sistemas de metilación. El gen de la metilasa del sistema de restricción tipo II de *Streptomyces phaeochromogenes* (*sphM*) se clonó en *S. lividans* y se observó que efectivamente en esta cepa se expresaba y modificaba su propio DNA, de forma que ya no era posible digerirlo con la enzima de restricción SphI. Sin embargo, fue imposible introducir el gen *sphM* en *S. coelicolor*, sospechamos que la causa era por incompatibilidad con el SRME, ocasionando la muerte celular. Presumiblemente, solo las cepas mutantes de *S. coelicolor* que perdieran los elementos restrictivos a DNA metilado podrían sobrevivir. De esa manera se logró aislar una cepa mutante que permitía la

expresión de *sphM* y que presentaba una disminución significativa de la restricción a DNA metilado. Al mapear esta mutación se logró determinar que el fenotipo observado que permitía la expresión de M.SphI se debía a la pérdida o escisión del elemento integrativo y conjugativo AICESco5349 (Figura 5), y que algunos de los genes importantes del sistema de restricción se encontraban inmersos en dicho elemento.

Al analizar la secuencia y los genes putativos del elemento AICESco5349 se encontró que presentaba una probable nucleasa con dominio HNH en el extremo C-terminal (gen *sco5333*, marcado con una flecha roja “hnh” en la figura 5b) y otro dominio de reconocimiento para metilcitosinas en el extremo N-terminal; pero al eliminar dicho gen de *S. coelicolor* y probar la frecuencia de transformación con un plásmido proveniente de *E. coli* se observó que únicamente disminuía la restricción con el plásmido metilado por el sistema Dcm. Esta cepa continúa restringiendo parcialmente DNA metilado por el sistema Hsd y Dam. También se observó incompatibilidad del producto del gen *sco5333* al expresarse junto con la metilasa SacI (*sacM*, reconoce y metila la última citosina en la secuencia GAGCTC) en *S. lividans*.

Otro de los genes putativos que se encontraba dentro del AICE Sco5349 y que podía tener función restrictiva era el *sco5330* (marcado con una flecha blanca en la figura 5b), ya que presenta un dominio HNH de muy baja calidad. El único trabajo realizado hasta la fecha en el laboratorio del Dr. Servín con este gen fue expresarlo en *S. lividans* con las metiltransferasas en adeninas: Sall (*salM*, que reconoce y metila la adenina en la secuencia GTCGAC) y SphI (*sphM*, que reconoce y metila la adenina en la secuencia GCATGC). El producto del gen *sco5330* fue el único que mostró incompatibilidad con ellas (Martínez-Morales, datos no publicados).

De aquí surge este trabajo que pretende determinar los elementos restantes en *S. coelicolor* que participan en la restricción del DNA modificado por el sistema Dam y conocer el papel del producto del gen *sco5330* en el establecimiento de esta importante barrera.

4. JUSTIFICACIÓN

Streptomyces tiene una gran importancia como hospedero para la expresión de proteínas heterólogas, además de ser el principal organismo productor de metabolitos secundarios como antibióticos. La barrera de restricción a DNA metilado con la que cuenta este organismo ha contribuido a que su manipulación y mejoramiento biotecnológico quede rezagado por otros modelos. Son pocos los estudios realizados sobre los sistemas de restricción tipo IV, y que están presentes en una gran cantidad de actinobacterias.

Este trabajo aporta conocimiento que ayudará a entender el fenómeno de la restricción metil-específica presente en *S. coelicolor* y en otras especies. Además, por sus características, las enzimas de restricción tipo IV representan una nueva herramienta biotecnológica novedosa y atractiva. Al conocer mejor estos sistemas, sabremos qué endonucleasas se deben eliminar con el fin de mejorar las actinobacterias con potencial biotecnológico. También nos ayudará a identificar aquellas con posible aplicación biotecnológica.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los elementos del sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor* responsables de restringir DNA modificado por la metiltransferasa Dam de *E. coli*.

Objetivos particulares

- Comprobar cuál de los genes de *S. coelicolor* descritos hasta ahora presenta incompatibilidad con la metiltransferasa Dam.
- Expresar el gen de la metiltransferasa Dam en *S. coelicolor* para que permita aislar nuevas mutantes y encontrar los elementos faltantes del sistema de restricción.
- Clonar, expresar y purificar el producto del gen *sco5330* que codifica para una probable nucleasa metil-específica.
- Evaluar la actividad y condiciones necesarias para la actividad *in vitro* del producto del gen *sco5330*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas

Las especificaciones de las cepas de *Escherichia coli* empleadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* empleadas.

Cepa	Características	Fuente
DH5α	<i>F⁻ endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR λ (ϕ80dlacZΔM15)</i>	Grant, et al., 1990
IBEC58	<i>Δdam Δdcm Δhsd.</i> Cepa derivada de la BW25113 que no metila el DNA.	González-Cerón et. al., 2009
ET12567/pUZ8002	<i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsd-M.</i> Plásmido con los elementos necesarios para la conjugación con <i>Streptomyces</i> .	McNeil et. al., 1992
BL21 (DE3) Rosetta 2	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm(DE3) pRARE2 (Cam^R).</i> El plásmido Rosetta 2 favorece la expresión de proteínas recombinantes con codones raros para <i>E. coli</i> .	Novagen

Las especificaciones de las cepas de *Streptomyces* empleadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *Streptomyces* empleadas.

Cepa	Características	Fuente
1326	<i>S. lividans</i> silvestre.	Kieser et al., 2005
M145	<i>S. coelicolor</i> silvestre. SCP1-,SCP2-	Bentley S. D., 2002
IB61	<i>S. coelicolor</i> Δ SCO4631,	Laboratorio del Dr. Servín

	Δ SCO1423, Δ SCO2863, Δ SCO4213, Δ SCO3261-SCO3262, Δ SCO5330, Δ SCO5333.	
IB72	<i>S. coelicolor</i> Δ SCO4631, Δ SCO1423, Δ SCO2863, Δ SCO4213, Δ SCO3261-SCO3262, Δ SCO5330, Δ SCO5333, Δ SCO2655, Δ SCO1785	Laboratorio del Dr. Servín

6.2 Plásmidos

Se utilizaron plásmidos replicativos en *E. coli* e integrativos y no integrativos en *Streptomyces*. Las especificaciones de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente
pIJ6902	Vector replicativo en <i>E. coli</i> y con resistencia a apramicina. Vector de expresión integrativo monocopia inducible por tioestrepton en <i>Streptomyces</i> .	Huang et al., 2005
pIJ6021	Plásmido multicopia con el promotor inducible con tioestrepton P_{tipA} y con un sitio múltiple de clonación. Resistencia a kanamicina.	Takano et al., 1995
pBlueScript IISK	Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i> . Resistencia a ampicilina.	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pUC18	Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i> . Con un sitio múltiple de clonación en la región del gen <i>lacZ</i> , permite selección positiva con IPTG y X-Gal. Resistencia a ampicilina.	Norrander et al., 1983
pUC18-Dam	Gen completo de la metiltransferasa (Dam) de <i>E. coli</i> clonado en el pUC18.	Este trabajo
pIJ6902-Dam	Gen completo de la metiltransferasa (Dam) de <i>E. coli</i> clonado en el pIJ6902 bajo el promotor P_{tipA} .	Este trabajo
pIJ6021-Dam	Gen completo de la metiltransferasa (Dam) de <i>E. coli</i> clonado en el pIJ6021 bajo el promotor P_{tipA} .	Este trabajo
pET28a	Vector de expresión en <i>E. coli</i> y que agrega una	Novagen

	etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal. Resistencia a Kanamicina.	
pET28-SCO5330	Gen de la nucleasa <i>sco5330</i> clonado en el vector de expresión pET28a.	Este trabajo
pIJ486	Vector multicopia y replicable en <i>Streptomyces</i> . Resistencia a tiostrepton. Con tres sitios de reconocimiento de Sall y cuatro para SphI.	Hopwood et al., 1987
pSET152	<i>aac(3)IV/ApR</i> , <i>lacZ</i> , <i>rep^{pUC}</i> , <i>att^{φC31}</i> , <i>int^{φC31}</i> , <i>oriT</i> . Plásmido replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i> .	Bierman, et al., 1992
pSET152+saIM	El plásmido pSET152 que tiene clonado el gen de la metilasa Sall de <i>Streptomyces albus</i>	Laboratorio del Dr. Servín
pSET152+sphM	El plásmido pSET152 que tiene clonado el gen de la metilasa SphI de <i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81	<i>oriT</i> , Φ BT1 <i>attB-int</i> , <i>Hyg^R</i> , derivado del pSET152 Plásmido replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i>	Gregory, et al., 2003
pMS81+SCO5330	Gen de la nucleasa metil específica <i>sco5330</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81+SCO5333	Gen de la nucleasa metil específica <i>sco5333</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81+SCO2863	Gen de la nucleasa metil específica <i>sco2863</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81+SCO4213	Gen de la nucleasa metil específica <i>sco4213</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81+SCO4631	Gen de la nucleasa metil específica <i>sco4631</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín
pMS81+SCO3261-62	Gen del operón <i>sco3261-62</i> de <i>S. coelicolor</i> clonado en el pMS81	Laboratorio del Dr. Servín

6.3 Medios y condiciones de cultivo

Para *Escherichia coli* se emplearon los siguientes medios de cultivo y se creció a 37°C, a menos que el protocolo indicara otra temperatura.

- YT2X: Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH=7.2. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C.
- SOB: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5mM, pH=7.2. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C.

- LB: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH=7.0. Se esterilizó en autoclave 15 minutos por 121°C. Se agregó 1.5% de Select Agar (Gibco BRL) en caso de ser LB sólido.

Para *Streptomyces* se utilizaron los siguientes medios de cultivo y se creció generalmente a 30°C, a menos que el protocolo indicara otra temperatura.

- MS: Manitol 10g, harina de soya 10g, agua de la llave 500 ml, se autoclaveó a 115°C por 15 minutos. Posteriormente se hicieron alícuotas de 50 ml y se volvieron a esterilizar a 115°C por 15 minutos. El agar 4% se pone en alícuotas apartadas de 50 ml y se esterilizan también a 115°C por 15 minutos y se mezcla con una alícuota de harina de soya y manitol antes de verter en cajas de Petri.
- YEME: Se utilizó para crecer micelio para preparar protoplastos. Extracto de levadura 0.3%, Peptona 0.5%, Extracto de malta 0.3%, Glucosa 1%, Sacarosa 34%, pH=7. A 25 mL de medio se le adicionó 0.125mL de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (1M) y 1.25mL de Glicina (10%).
- R2YE: Se utilizó para regenerar protoplastos. Solución base: Sacarosa 103g, K_2SO_4 0.25g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.12g, Glucosa 10g, Casaminoácidos 0.1g, aforar a 800mL. Colocar 2.2g de Bacto-Agar (Difco) en botellas y añadir 80mL de la solución base. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. Para preparar las cajas, se fundió la alícuota de 80mL y se añadió lo siguiente: KH_2PO_4 (0.5%) 1mL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%) 8mL, L-prolina (20%) 1.5mL, Tris•Cl (3%, pH=7.2) 10mL, Trazas R5 0.2mL, $CuSO_4$ (2mM) 0.2mL, NaOH (1N) 0.2mL, Extracto de levadura (10%) 5mL. Se dejaron secar las cajas por 3 horas en la campana de flujo laminar.
- Agar suave: Se empleó para las transformaciones. Sacarosa 10.3g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.012g, Tris•HCl (3%, pH=7.2) 10mL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5M) 0.4mL, Agar 0.65g. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se esterilizó en la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- LB-Sacarosa: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Sacarosa 34%, pH=7.0. Se esterilizó en autoclave 15 minutos por 121°C.

6.4 Soluciones

- Amortiguador P: Sacarosa 25.75g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5g, K_2SO_4 0.062g, aforar a 200mL con agua desionizada. Distribuir en botellas con 40mL y esterilizar en la autoclave. Antes de usar se añade Trazas R5 100 μ L, KH_2PO_4 (0.5%) 0.5mL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68%) 5mL, Tris•Cl(3%) 5mL.
- TBE 5X: Tris base 54g, ácido bórico 27.5g, EDTA(0.5M) 20mL, pH=8 y se aforó con agua desionizada a 1L.

6.5 Amplificación y clonación del gen *dam* de *E. coli*

El gen que codifica para la metiltransferasa Dam de *E. coli* K12 se encuentra anotado en la base de datos GenBank con ID 12932866 y cuenta con 837 pares de bases. Se tomó esta secuencia como referencia para poder diseñar los oligonucleótidos DamFw-XBND (5'-GCTCTAGACATATGAAG AAAAATCGCGCTT TTTTGAAGTG-3') y DamRev-ER1 (5'-GGAATTCTTATTTTTT CGCGGGTGAAA CGACTCC-3') para amplificar e insertar los sitios de clonación mediante PCR (Figura 6). Cabe mencionar que dicha secuencia amplificada excluyó la región promotora, ya que los oligonucleótidos se diseñaron para posteriormente clonar el gen bajo el promotor P_{tipA} de *S. coelicolor*, el cual es inducible por tioestrepón (Murakami, *et al.*, 1989). Se empleó como molde DNA cromosómico de la cepa BW25113. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la enzima de alta fidelidad *Pfu Ultra AD* (Agilent Technologies), en un termociclador Techne® TC-312 con el siguiente programa: desnaturalización de 2 minutos a 95° C; 30 ciclos de 45 segundos a 95° C, alineamiento de 45 segundos a 55° C, extensión de 1 minuto a 72° C; y por último una extensión final de 5 minutos a 72° C.

```

1      GCTCTAGACA TATGAAGAAA AATCGCGCTT TTTTGAAGTG GGCAGGGGGC
51     AAGTATCCCC TGCTTGATGA TATTAAACGG CATTTGCCCA AGGGCGAATG
101    TCTGGTTGAG CCTTTTGTAG GTGCCGGGTC GGTGTTTCTC AACACCGACT
151    TTTCTCGTTA TATCCTTGCC GATATCAATA GCGACCTGAT CAGTCTCTAT
201    AACATTGTGA AGATGCGTAC TGATGAGTAC GTACAGGCCG CACGCGAGCT
251    GTTTGTTCCT GAAACAAATT GCGCCGAGGT TTACTATCAG TTCCGCGAAG
301    AGTTCAACAA AAGCCAGGAT CCGTTCCGTC GGGCGGTACT GTTTTTATAT
351    TTGAACCGCT ACGGTTACAA CGGCCTGTGT CGTTACAATC TGCGCGGTGA
401    GTTTAACGTG CCGTTCGGCC GCTACAAAAA ACCCTATTTT CCGGAAGCAG
451    AGTTGTATCA CTTTCGCTGAA AAAGCGCAGA ATGCCTTTTT CTATTGTGAG
501    TCTTACGCCG ATAGCATGGC GCGCGCAGAT GATGCATCCG TCGTCTATTG
551    CGATCCGCCCT TATGCACCGC TGTCTGCGAC CGCCAACTTT ACGGCGTATC
601    ACACAAACAG TTTTACGCTT GAACAACAAG CGCATCTGGC GGAGATCGCC
651    GAAGGTCTGG TTGAGCGCCA TATTCCAGTG CTGATCTCCA ATCAGGATAC
701    GATGTTAACG CGTGAGTGGT ATCAGCGCGC AAAATTGCAT GTCGTCAAAG
751    TTCGACGCAG TATAAGCAGC AACGGCGGCA CACGTAAAAA GGTGGACGAA
801    CTGCTGGCTT TGTACAAACC AGGAGTCGTT TCACCCGCGA AAAAATAAGA
851    ATTCC

```

Figura 6. Secuencia del producto de la PCR que contiene al gen *dam* con los sitios de clonación. En azul el sitio XbaI, en rojo el sitio NdeI que abarca también el codón de inicio de traducción (subrayado), y en verde el sitio EcoRI. Los sitios NdeI y EcoRI permiten subclonar el gen *dam* bajo el promotor *P_{tipA}*.

Una vez terminada la reacción, el producto de PCR y el plásmido pUC18 se digirieron con las enzimas XbaI y EcoRI. Posteriormente se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (ver anexos y Figura 7).

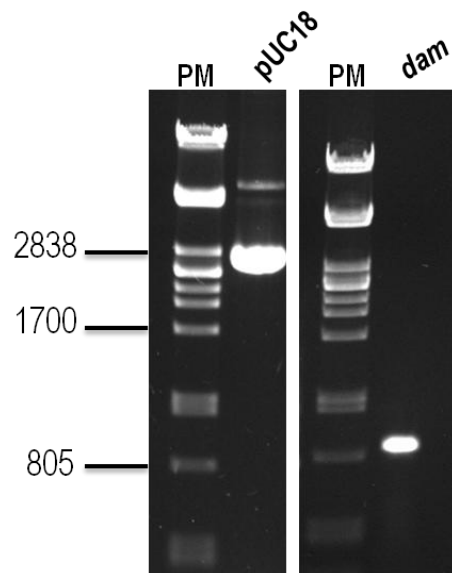


Figura 7. Plásmido pUC18 y PCR de *dam* digerido con las enzimas XbaI y EcoRI. Producto de PCR del gen *dam* y digerido con las mismas enzimas, XbaI y EcoRI, para poder ligar. PM: marcador de peso molecular (DNA del fago λ digerido con PstI).

Se clonaron los fragmentos mediante una reacción de ligación (ver anexos y Figura 8A). El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α por electroporación, plaqueando en medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), X-Gal (200 μ g/mL) e IPTG (0.1 mM). Las colonias transformantes se seleccionaron para extracción de DNA plasmídico en pequeña escala (Miniprep, ver anexos) y posteriormente hacer una doble digestión con las mismas enzimas que se utilizaron para la clonación, XbaI y EcoRI; esto nos permitió observar aquellas construcciones que efectivamente contenían el inserto *dam*. Posteriormente se decidió hacer una digestión sencilla con la enzima PvuII, se eligió esta enzima ya que al ligarse el gen *dam* generaría una banda de mayor tamaño y con un patrón de 2364 y 1141 pb (Figura 8B).

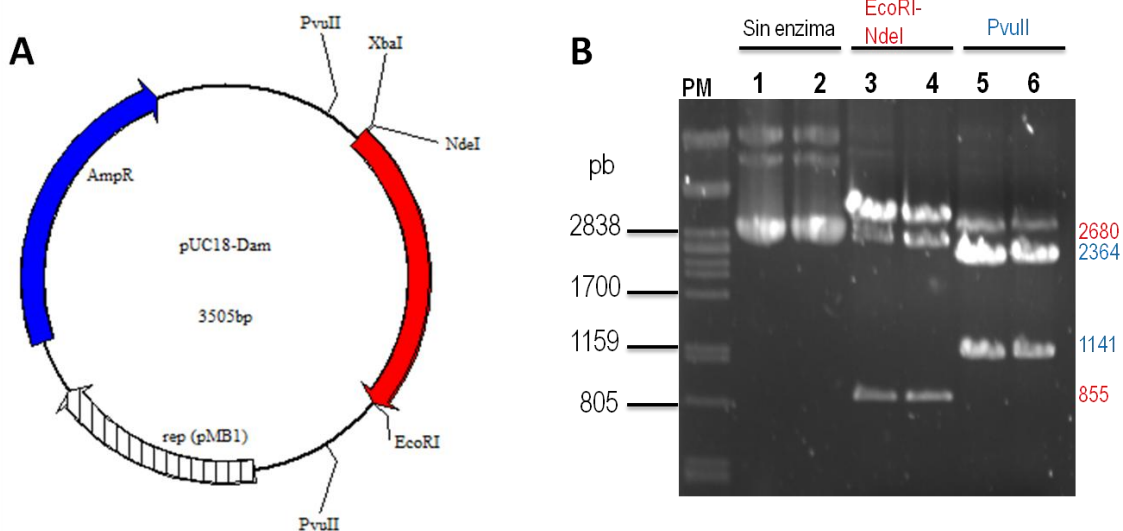


Figura 8. Clonación del gen *dam* en el plásmido pUC18 y su verificación mediante patrón de restricción. (A) Plásmido pUC18-Dam, resultado de la ligación dentro de los sitios XbaI y EcoRI de un fragmento de 855 pb que corresponde a la secuencia del gen *dam* (rojo), dentro del vector pUC18. Este vector contiene el gen de resistencia a ampicilina (azul). (B) Comprobación de la clonación y correcta orientación mediante patrón de digestión con las enzimas EcoRI-NdeI y PvuII; carril 1 y 2 son dos diferentes minipreparaciones de plásmido sin digerir, carril 3 y 4 es la digestión de ambas minipreparaciones con EcoRI-NdeI, y carril 5 y 6 la digestión con PvuII. Es posible observar que las digestiones resultaron parciales.

Las colonias cuya miniprep dio el patrón correcto se volvieron a crecer para extraer el DNA plasmídico a mediana escala (Midiprep, ver anexos) y se mandó secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia reportada en GenBank y se obtuvo un 100% de identidad, indicando que no había ocurrido ninguna mutación durante la amplificación por PCR.

Una vez revisadas las secuencias y el patrón de restricción, el gen *dam* se subclonó en los vectores de expresión pIJ6902 y pIJ6021.

6.6 Construcción del plásmido pIJ6902-Dam

El sitio NdeI en el extremo 5' y el sitio EcoRI en el extremo 3' del producto de PCR sirvieron para subclonarlo en el vector de expresión pIJ6902. Este vector es replicativo en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces*. Para subclonar el inserto que codifica para Dam en este vector se digirieron los plásmidos pUC18-Dam y pIJ6902 con las enzimas NdeI y EcoRI. Se purificaron ambos fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión, y se sometieron a una reacción de ligación (Figura 9A). Con esta ligación se transformaron células de *E. coli* IB58 mediante electroporación (ver anexos) y se plaquearon en medio LB con apramicina (50 µg/mL). Se tomaron algunas transformantes para extraer DNA plasmídico a pequeña escala y revisar la correcta estructura de la construcción por patrón de digestión con EcoRV. Tanto el vector como el inserto contienen este sitio y esperábamos ver dos fragmentos de 3181 y 4942 pb. Todas las transformantes probadas dieron este patrón (Figura 9B).

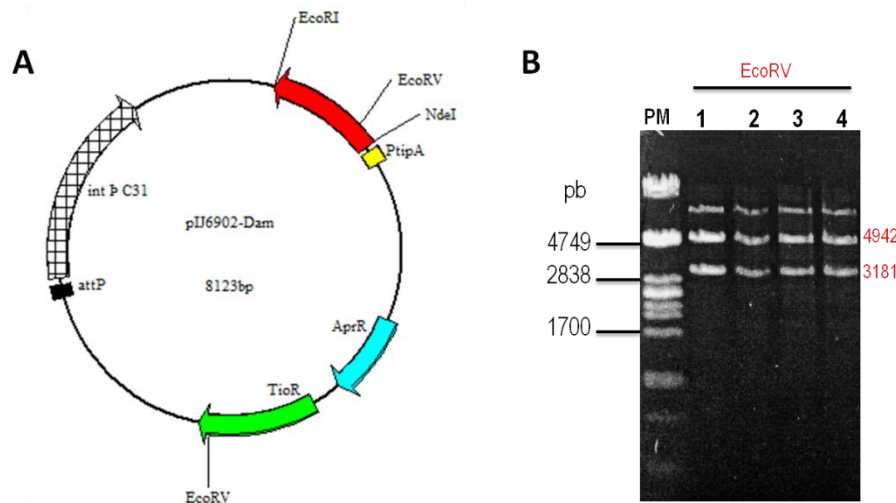


Figura 9. Subclonación del gen *dam* en un plásmido integrativo y su verificación mediante patrón de digestión. (A) Plásmido pIJ6902-Dam, resultado de la ligación del gen *dam* en los sitios NdeI y EcoRI, dentro del plásmido pIJ6902, el cual es integrativo en *Streptomyces* ya que lleva la integrasa y el *attP* del fago ϕ C31. Este plásmido confiere resistencia a apramicina (cian) y a tioestreptón (verde). Además de contar con el promotor *P_{tipA}* inducible con tioestreptón (amarillo). (B) Patrón de digestión de las minipreps 1, 2, 3 y 4 con la enzima EcoRV (se puede observar que la digestión es parcial).

La construcción correcta se introdujo por electroporación a la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002, la cual puede conjugarse con *Streptomyces*, seleccionando en medio LB con apramicina (50 μ g/mL). A partir de una transformante se realizaron las respectivas conjugaciones con las distintas cepas de *Streptomyces*. Las colonias exconjugantes de *Streptomyces* se seleccionaron, crecieron y evaluaron para determinar si Dam estaba siendo expresada mediante una prueba funcional al extraer DNA cromosómico de las exconjugantes y digerir con las enzimas MboI y Sau3A (ver más adelante).

6.7 Construcción del plásmido pIJ6021-Dam

Una construcción similar a la anterior se realizó en el vector pIJ6021. El plásmido pUC18-Dam extraído de la cepa IB58 se sometió a una doble digestión con NdeI y EcoRI y se purificó mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de

fusión. Para hacer la reacción de ligación se usó el vector pIJ6021 previamente digerido con NdeI y EcoRI (Figura 10A).

A diferencia del pIJ6902, el plásmido pIJ6021 no es replicativo en *E. coli*, por lo que se introdujo directamente en *S. lividans* mediante transformación de protoplastos (Kieser *et al.*, 2005; ver anexos).

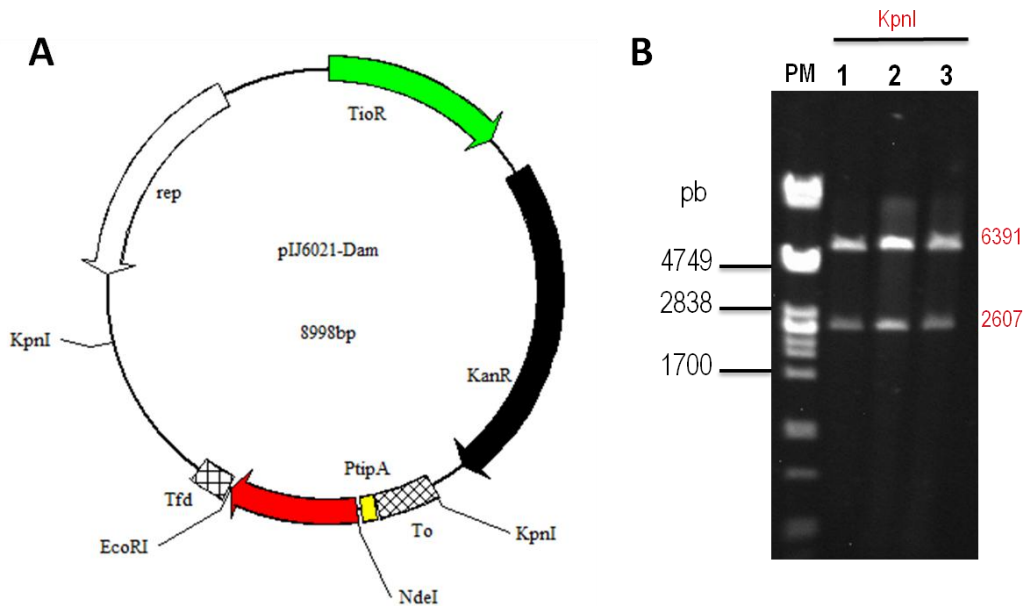


Figura 10. Plásmido pIJ6021-Dam. (A) Resultado de la ligación dentro de los sitios NdeI y EcoRI del fragmento del gen *dam*, dentro del vector multicopia pIJ6021. Este plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina (negro) y a tioestreptón (verde). El promotor *PtipA* inducible con tioestreptón (amarillo), el gen *rep* de replicación (blanco) y los terminadores transcripcionales *To* (del fago λ) y el *Tfd* (del fago fd). (B) Patrón de digestión de las minipreparaciones 1 (carril 1), 11 (carril 2) y 18 (carril 3) con la enzima *KpnI*.

Pasadas 18 horas de regeneración se agregó kanamicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar a las transformantes. Se tomaron colonias y se plaquearon en medio MS con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para obtener esporas que después nos permitieran hacer cultivos para la extracción de DNA plasmídico y corroborar las construcciones mediante patrón de digestión con y con *KpnI* (Figura 10B).

También se realizó la prueba funcional de la construcción al extraer DNA cromosómico de las transformantes y digerir con las enzimas Mbol y Sau3A.

6.8 Ensayos de incompatibilidad entre la metiltransferasa Dam y las nucleasas de *Streptomyces coelicolor*

Para conocer si alguna de las nucleasas metil-específicas de *S. coelicolor* identificadas previamente en nuestro laboratorio reconocían y restringían los sitios *dam* metilados por la metiltransferasa de *E. coli* se hicieron conjugaciones con cepas de *S. lividans* que tienen integrado en su cromosoma el vector pMS81 que tiene clonado cada uno de los genes que codifican las nucleasas (SCO4631, SCO2863, SCO3261-62, SCO4213, SCO5333 y SCO5330) y como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido pJ6902-Dam, el cual es compatible con el vector pMS81 y sus derivados, pues se integra en otro sitio en el cromosoma. La hipótesis es que si alguna de estas nucleasas reconoce los sitios *dam* metilados, entonces esa cepa no crecerá ya que estaría restringiendo su propio DNA (a esto le llamamos “incompatibilidad” entre una metilasa y una nucleasa; ver Figura 11). El protocolo general de conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces* (Kieser, *et al.*, 2005) se describe a continuación:

1. Se creció un precultivo de la cepa donadora ET12567/pUZ8002 que contiene el plásmido a conjugar en *Streptomyces* en 3 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios a 37°C y agitación de 200 rpm, durante toda la noche.
2. Se inocularon 30 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios con todo el volumen del precultivo y se dejó creciendo a 37°C y agitación de 200 rpm.
3. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de entre 0.6 y 0.8, se centrifugó todo el cultivo a 6000 rpm/10 minutos/4°C en un rotor JA20 y se retiró el sobrenadante.
4. Se repitieron los pasos de centrifugación dos veces lavando con un mismo volumen de medio YT2X sin antibióticos; al final el paquete de células se

resuspendió en 2-4 mL (dependiendo del número de conjugaciones a realizar) de medio YT2X sin antibióticos.

5. Se tomó un volumen adecuado de una preparación densa de esporas (ver anexos) de la cepa receptora de *Streptomcyes* (entre 40-150 μ L, dependiendo de la densidad de la preparación) y se pasó a un tubo eppendorf estéril. Se centrifugaron las esporas a 6000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se agregó el mismo volumen de agua estéril para lavar y quitar el exceso de glicerol y se volvió a centrifugar 5 minutos a 6000 rpm.
7. Se agregaron 500 μ L de medio YT2X y se dio un choque térmico a las esporas de 10 minutos a 50°C en baño maría.
8. Se dejaron enfriar las esporas a temperatura ambiente y posteriormente se les agregó un mismo volumen de células ET12567/pUZ8002 recién lavadas. Se mezclaron perfectamente y se centrifugaron por 3 minutos a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 200 μ L de YT2X.
9. Se hicieron diluciones de 10^{-1} y/o 10^{-2} y se plaquearon las células en medio MS sólido suplementado con 10mM de $MgCl_2$. Se incubaron las cajas de 16 a 20 horas a 30°C. Posteriormente se agregó a cada caja 1 mL de agua estéril con los antibióticos necesarios para seleccionar las exconjugantes de *Streptomyces* el cual se repartió de manera homogénea en toda la superficie de la caja hasta absorberse completamente.
10. Las cajas se incubaron a 30°C hasta la aparición de las exconjugantes.

Las modificaciones a este protocolo para la conjugación con micelio vegetativo en lugar de esporas germinadas se hizo siguiendo las recomendaciones de Baltz (Baltz, 1978). Dichas modificaciones se describen en los **Anexos**.

6.9 Evaluación de la expresión y funcionalidad de la metiltransferasa Dam en *Streptomyces*

Además de haber corroborado la construcción de los plásmidos que contienen al gen *dam* clonado bajo el promotor inducible P_{tipA} , era necesario tener una prueba

confiable de su expresión y funcionalidad en *Streptomyces*. Para ello se hicieron ensayos de digestión del DNA cromosomal de las cepas que acarrean el gen *dam* (ya sea en el vector integrativo o en el multicopia) con las enzimas MboI y Sau3A. Estas enzimas de restricción tienen la característica de identificar como sitio de corte el mismo sitio de metilación de Dam, pero la función de restricción de MboI se ve bloqueada si la adenina está metilada, mientras que Sau3A restringe el DNA aun estando metilado.

6.10 Subclonación del gen *sco5330* en un vector de expresión de *E. coli* que agrega una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal

El plásmido pGEX-SCO5330 (previamente clonado y secuenciado por la M. en C. Gabriela González) se digirió con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. El fragmento que contiene el gen *sco5330* se purificó mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. Con las mismas enzimas se digirió el plásmido pET28a y se purificó el fragmento. Ambos fragmentos se unieron mediante una reacción de ligación, la cual se introdujo en *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Se analizaron los plásmidos mediante la realización de minipreps y la revisión del patrón de digestión con la enzima de restricción ApaI (Figura 19B).

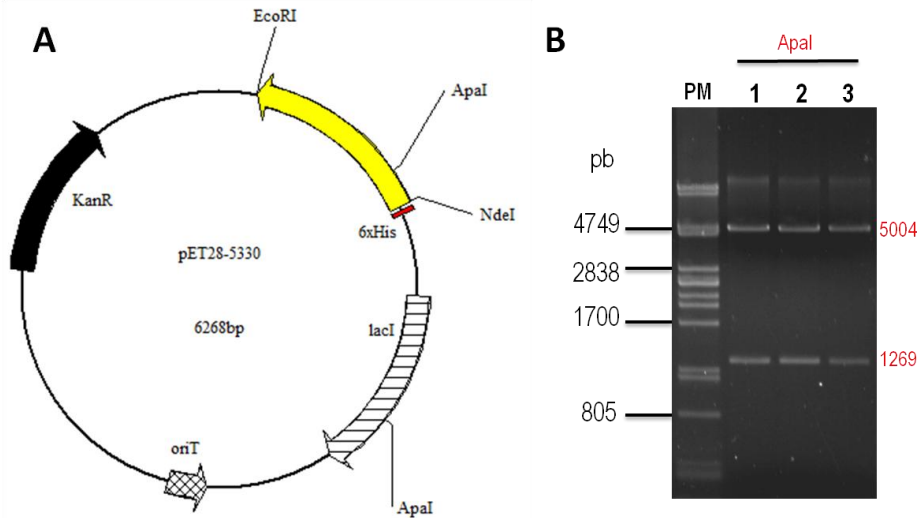


Figura 19. Construcción del pET28-SCO5330. (A) Mapa de la construcción pET28-5330, el gen *sco5330* (amarillo) y la etiqueta de histidinas (rojo). (B) Mediante patrón de digestión con la enzima *Apal* observamos que las tres muestras 1, 2 y 3 presentaron el patrón esperado de 5004 y 1269 pb.

Una vez comprobada la construcción se decidió tomar una de las minepreparaciones y utilizarla para retransformar en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 para la sobreexpresión de la proteína.

6.11 Sobreproducción y purificación del producto del gen *sco5330* por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 que contienen el plásmido pET28-SCO5330 se crecieron en medio YT2X con kanamicina (25 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/mL) toda la noche a 37° C. Un mililitro del precultivo se usó para inocular 100 ml del mismo medio. Cuando la DO 600 nm llegó a 0.6-0.8, se agregó IPTG a una concentración de 1 mM para inducir la síntesis del producto del gen *sco5330*. Se recuperaron las células, después de 5 horas de inducción a 18°C, mediante centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH=8) y se lisaron mediante sonicación. La solución se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm. Se apartó el sobrenadante para su

posterior análisis. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en el amortiguador de solubilización (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M hidrocloreuro de guanidino, pH=8) y se clarificó por centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se retuvo para su análisis.

El producto del gen *sco5330* se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una columna cargada con resina de agarosa-Ni-NTA (Qiagen).

Primero, se empacó la columna con 2 mL de resina y se equilibró con el amortiguador de solubilización. Después de pasar los cuerpos de inclusión resuspendidos a un flujo no mayor a 1 mL/min, la columna se lavó primero con 8 mL de amortiguador de lavado 1 (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M hidrocloreuro de guanidino, imidazol 10 mM, pH=8), después con 8 mL de amortiguador de lavado 2 (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M hidrocloreuro de guanidino, imidazol 20 mM, pH=8) y un tercer lavado con amortiguador de lavado 3 (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M hidrocloreuro de guanidino, imidazol 50 mM, pH=8).

La proteína retenida se eluyó con el amortiguador de elución (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M hidrocloreuro de guanidino, pH=8). Todas las fracciones se recolectaron para su posterior análisis.

6.12 Renaturalización del producto del gen *sco5330*

La renaturalización del producto del gen *sco5330* se realizó de acuerdo a Di Xiang et al., con algunas modificaciones. La fracción que contenía la mayor cantidad de proteína extraída de los cuerpos de inclusión y solubilizada con hidrocloreuro de guanidino se tomó para renaturalizar. El agente desnaturante fue removido mediante diafiltración discontinua utilizando tubos Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units 10-KDa, en donde la concentración de hidrocloreuro de guanidino disminuía rápidamente en intervalos de 3 M, a 4° C.

Las proteínas, tanto de la fracción soluble como de la fracción insoluble, así como la proteínas renaturalizada, fueron visualizadas por electroforesis en geles de

poliacrilamida al 10 % y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Posteriormente los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie R-250 (ver anexos).

6.13 Determinación de la actividad *in vitro* de SCO5330

Para saber si la proteína purificada y renaturalizada era activa se llevaron a cabo varios ensayos de actividad de endonucleasa.

Primero, era necesario obtener el sustrato para las pruebas. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron especificidad e incompatibilidad entre *sco5330* y las metiltransferasas M.Sall y M.SphI. Por ello se decidió purificar el plásmido de alto número de copias pIJ486, el cual tiene sitios para dichas enzimas. Como actualmente no se cuenta con dichas metiltransferasas puras que puedan realizar la metilación *in vitro*, se introdujo por transformación el plásmido pIJ486 a dos cepas de *S. lividans* que tienen clonados en un vector integrativo los genes *salm* y *sphM*. Se purificó el pIJ486 de estas dos cepas y se determinó la concentración, pureza y grado de metilación (digiriendo con las enzimas de restricción Sall y SphI, respectivamente)

Cada reacción de ensayo de actividad estaba compuesta por: 1 µg de plásmido, y 10 µl de amortiguador de reacción (Tris-HCl 20 mM pH= 8, NaCl 50 mM, KCl 50 mM). La cantidad de proteína se trató de estandarizar diluyendo la concentración de proteína inicial (10 µg) a la mitad y así sucesivamente, hasta 0.125 de concentración de proteína respecto a la inicial. Cuando se requirió añadir algún ion como MgCl₂ o CaCl₂, se ajustó a 10 mM. La reacción enzimática se incubó a 37° C por 2 horas. La separación de los productos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, los cuales se corrieron a 14 Volts por aproximadamente 12 horas. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

7. RESULTADOS

7.1 Incompatibilidad de la metiltransferasa Dam con nucleasas individuales de *S. coelicolor* clonadas en *S. lividans*

Dados los trabajos anteriores de nuestro laboratorio en donde se logró la identificación de algunas de las nucleasas que conforman al sistema de restricción de *Streptomyces coelicolor* (González-Cerón, *et al.*, 2009), se decidió probar cuáles de ellas eran incompatibles con la metiltransferasa Dam.

Para poder determinar esto, se introdujo el plásmido pIJ6902-Dam tanto en la cepa silvestre de *S. lividans*, como en una colección de cepas de *S. lividans* las cuales tienen integrado en su cromosoma al vector pMS81 con los diferentes genes previamente identificados, que codifican nucleasas metil-específicas (SCO2863, SCO4213, SCO4631, SCO3261- SCO3262, SCO5330, SCO5333). Si alguna de estas nucleasas restringe DNA metilado por Dam, se espera que la expresión de ambos genes juntos en la célula sea letal, ya que Dam metilaría el DNA propio de la célula y la nucleasa realizaría cortes en el mismo, generando tanto daño que muy probablemente la expresión de ambos cause la muerte de las células (Figura 11).

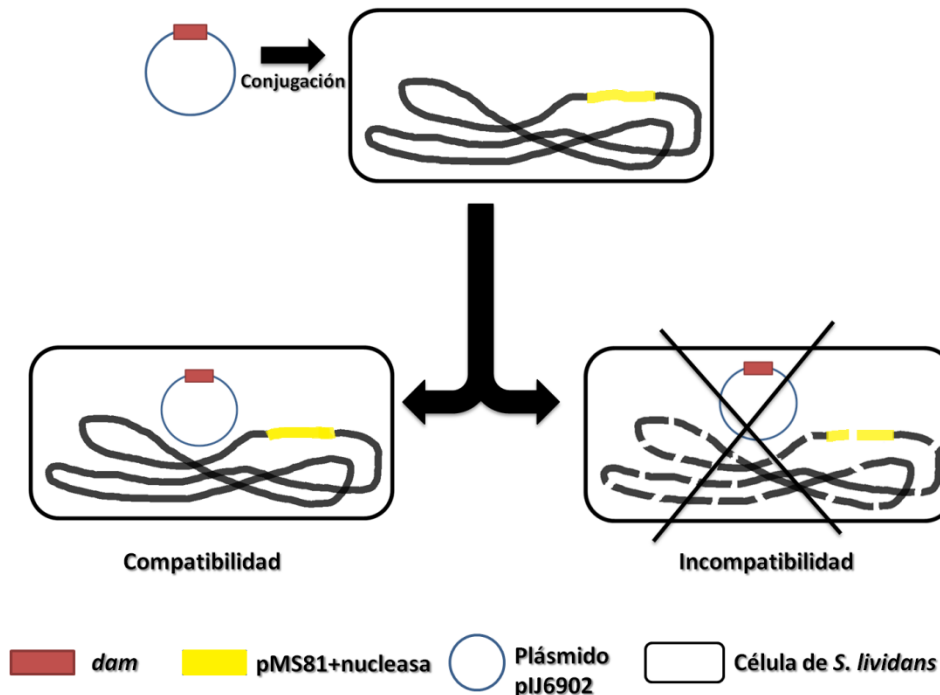


Figura 11. Efecto de la presencia de Dam con las nucleasas metil-específicas de *S. coelicolor* en *S. lividans*. Al conugar el plásmido pIJ6902-Dam con la colección de cepas de *S. lividans* que tienen integrado en su cromosoma al vector pMS81 clonado con las diferentes nucleasas metil-específicas hay dos efectos que se pueden obtener: i) Compatibilidad si la nucleasa no reconoce los mismos sitios que metila Dam, ii) Incompatibilidad si reconocen la misma secuencia tanto Dam como la nucleasa, generando tanto daño al DNA que sería letal para la célula.

Se realizaron conjugaciones para introducir tanto el vector pIJ6902 vacío, como el plásmido pIJ6902-Dam. En el primer caso se seleccionaron las colonias exconjugantes con los antibióticos higromicina (resistencia otorgada por el vector pMS81), apramicina (resistencia otorgada por el plásmido pIJ6902) y ácido nalidíxico (resistencia propia de *S. lividans* y que se utiliza para detener el crecimiento de *E. coli*). En el segundo caso se añadieron los mismos antibióticos higromicina, apramicina y ácido nalidíxico, además de tioestreptón para inducir la expresión del gen *dam* a partir del promotor P_{tipA} (Figura 12).

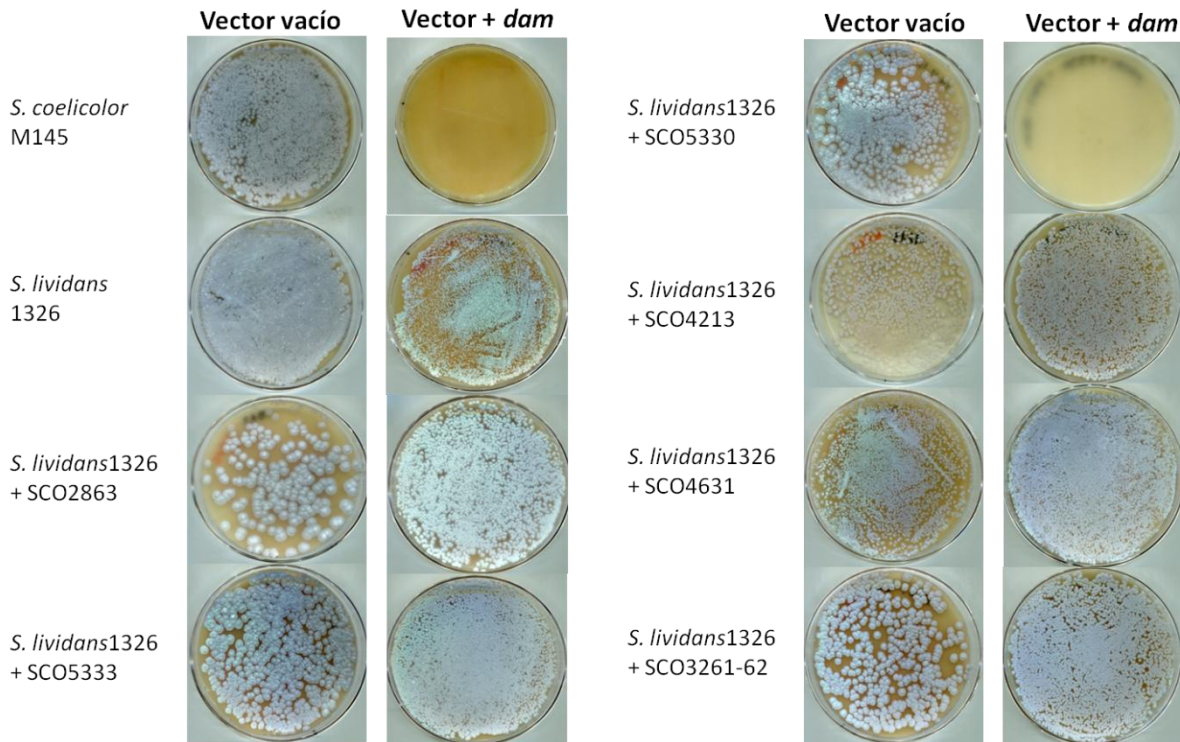


Figura 12. Incompatibilidad de la metiltransferasa Dam con nucleasas individuales. Como control se hicieron las conjugaciones con *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* silvestre M145. Las cajas restantes son el resultado de las conjugaciones con las endonucleasas 4213, 2863, 4631, 5330, 3261-62 y 5333.

Como se puede observar, la nucleasa producto del gen *sco5330* fue la única incompatible, pues no hubo crecimiento en esa caja Petri. La otra caja que no presentó crecimiento alguno fue la del control con *S. coelicolor* silvestre ya que esa cepa también contiene a la nucleasa producto del gen *sco5330* y posiblemente otras nucleasas que no hemos podido identificar pero que también restringen DNA metilado en sitios Dam.

La obtención de estos resultados nos permitió seleccionar la cepa que utilizaríamos para la estrategia de aislamiento de nuevas mutantes afectadas en el sistema de restricción de DNA metilado por Dam. Tanto la cepa IB61 como la cepa IB72 contienen una serie de deleciones en genes que codifican probables nucleasas. Uno de los genes eliminados en estas cepas es el SCO5330.

Proponemos que utilizando estas cepas, la tasa de selección de transformantes y probables mutantes será mayor.

7.2 Incompatibilidad de la metiltransferasa Dam con componentes del sistema de restricción de *S. coelicolor*

Como se mencionó anteriormente, las cepas IB61 e IB72 carecen de los genes que codifican nucleasas de restricción metil-específicas que ya han sido identificadas en nuestro laboratorio. Con el experimento de incompatibilidad en *S. lividans*, demostramos que la única nucleasa que participa en la restricción de DNA metilado por Dam es SCO5330. Sin embargo, las cepas IB61 e IB72 siguen mostrando un nivel bajo de restricción hacia DNA metilado en adeninas (González-Cerón, comunicación personal). Es decir que la carencia de estos genes no suprime por completo la restricción. Por lo tanto, debe haber otros genes en el genoma que actúan sobre DNA metilado en sitios Dam. Entonces es posible que, a pesar de no tener ya el gen *sco5330* en su genoma, exista incompatibilidad con alguna otra nucleasa aún no identificada, causando letalidad al introducir el gen *dam* en estas cepas.

Con el fin de determinar esta incompatibilidad se introdujo mediante transformación por protoplastos en las cepas IB61 e IB72 el plásmido pIJ6021-Dam. La selección de transformantes se hizo con el antibiótico kanamicina, pues el vector pIJ6021 tiene el gen de resistencia (Figura 10). También se agregó tioestreptón para inducir la expresión de la metiltransferasa Dam que se encuentra bajo el promotor P_{tipA} . No se observó ningún crecimiento en la cepa M145 a diferencia de la cepa 1326 de *S. lividans* (Figura 13), pues es la silvestre y contiene todos los genes que forman parte del SRME. Este resultado confirma la letalidad de la expresión de Dam en *S. coelicolor*. Al introducir Dam a las cepas IB61 e IB72 se observó que su expresión también impide el crecimiento en estas, a pesar de que ambas carecen del gen *sco5330*, lo cual indica que hay al menos un gen adicional aún no identificado que codifica una probable nucleasa incompatible con esta metilasa. Una observación interesante es que, a diferencia de la falta total de crecimiento en la cepa M145, en el caso de las cepas IB61 e

IB72 se observó el crecimiento de algunas colonias en las cajas de transformación. Nuestra hipótesis es que la introducción de Dam a estas cepas podría establecer una estrategia para aislar mutantes afectadas en los genes aún no identificados responsables de la restricción de DNA metilado por Dam.

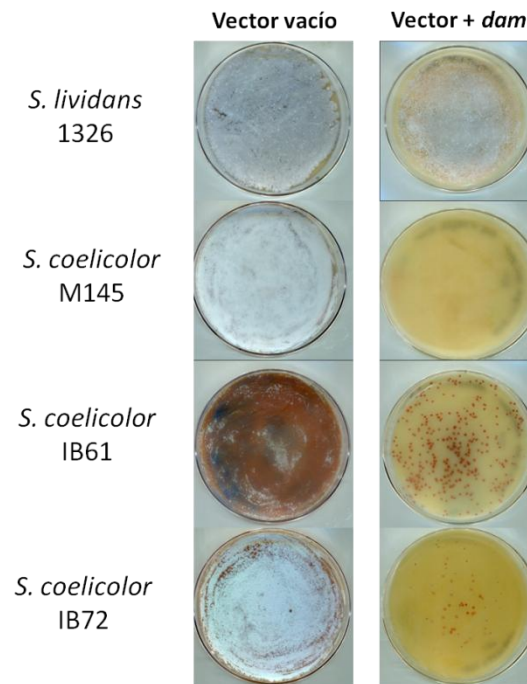


Figura 13. Resultado de la transformación en las cepas IB61 e IB72 carentes de genes del SRME y de las cepas silvestres de *S. lividans* y *S. coelicolor*. El número de colonias obtenidas fue mucho menor al introducir el vector que contiene el gen de la metiltransferasa Dam, respecto a la transformación con el vector vacío.

7.3 Análisis de las colonias que contienen el plásmido pIJ6021-Dam

Teníamos dos explicaciones para la supervivencia de las colonias de IB61 e IB72 transformadas con el plásmido pIJ6021-Dam: primero, la pérdida o mutación del gen *dam* y segundo alguna mutación en el sistema de restricción que todavía presentan estas cepas. Para descartar la primera explicación se decidió hacer un análisis de expresión y funcionalidad de la metiltransferasa.

Para ello se extrajo el DNA genómico de las colonias que crecieron con el plásmido pIJ6021-Dam y se hicieron digestiones con las enzimas MboI y Sau3A

(ver Materiales y Métodos). Si la metiltransferasa se expresa y es funcional, entonces el DNA genómico de la propia bacteria debería estar metilado en sitios Dam (5'-GATC) y protegerse de la enzima MboI, más no de Sau3A. Los resultados de las digestiones de dos de las colonias que crecieron se muestran en la figura 14. Es posible observar que en ambas se está expresando y es funcional la metilasa Dam, pues su DNA genómico es resistente a la digestión por la enzima MboI; resultados similares se obtuvieron con otras colonias analizadas (datos no mostrados).

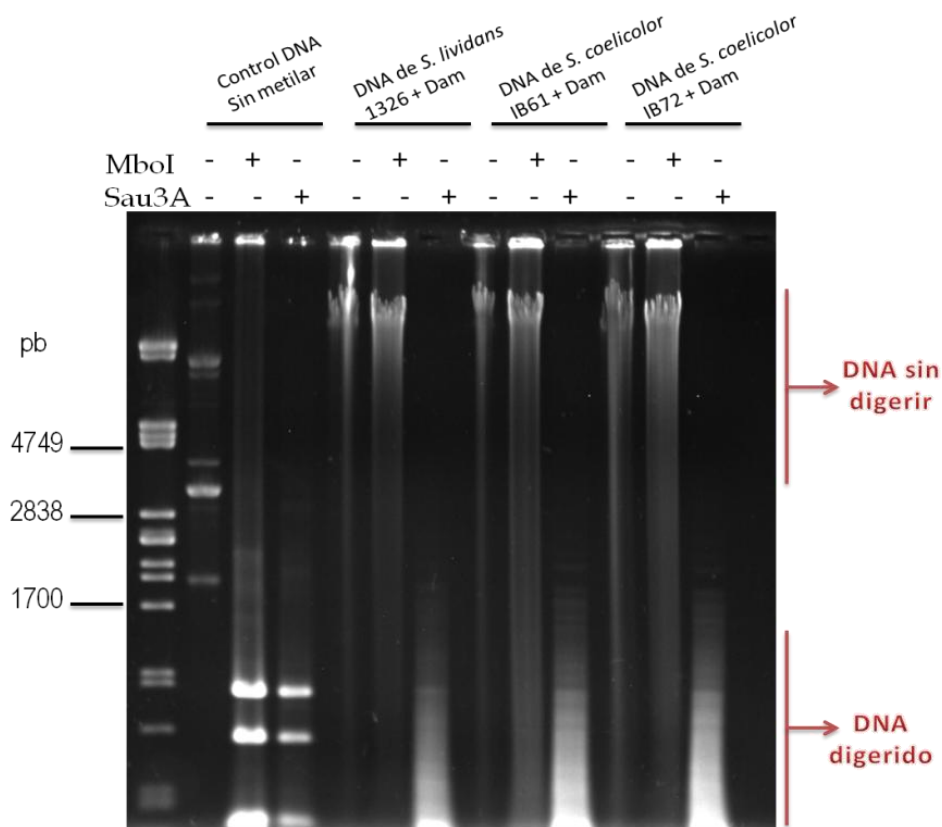


Figura 14. Análisis de la expresión de Dam en *Streptomyces*. Colonias compatibles y funcionales de la metiltransferasa Dam, pues se protegen de la restricción con la enzima MboI. Sabemos que tanto MboI como Sau3A funcionan correctamente ya que ambas digieren el control de plásmido sin metilar.

De acuerdo con nuestra hipótesis las colonias que pudieron crecer y expresar Dam deberían contener mutaciones en un(os) gen(es) que codificaran nucleasas

capaces de restringir DNA metilado en sitios Dam. Estas cepas ya no deberían presentar restricción de DNA metilado por Dam.

Para poder observar dicha pérdida de la restricción primero era necesario curar el plásmido pIJ6021-Dam y después verificar si ya no restringían DNA metilado por Dam. Después de varios ciclos de crecimiento no selectivo para provocar la pérdida del plásmido, las colonias que ya no pudieron crecer con kanamicina se pusieron a esporular para extraer su DNA genómico y validar si efectivamente habían perdido el pIJ6021-Dam (Figura 15).

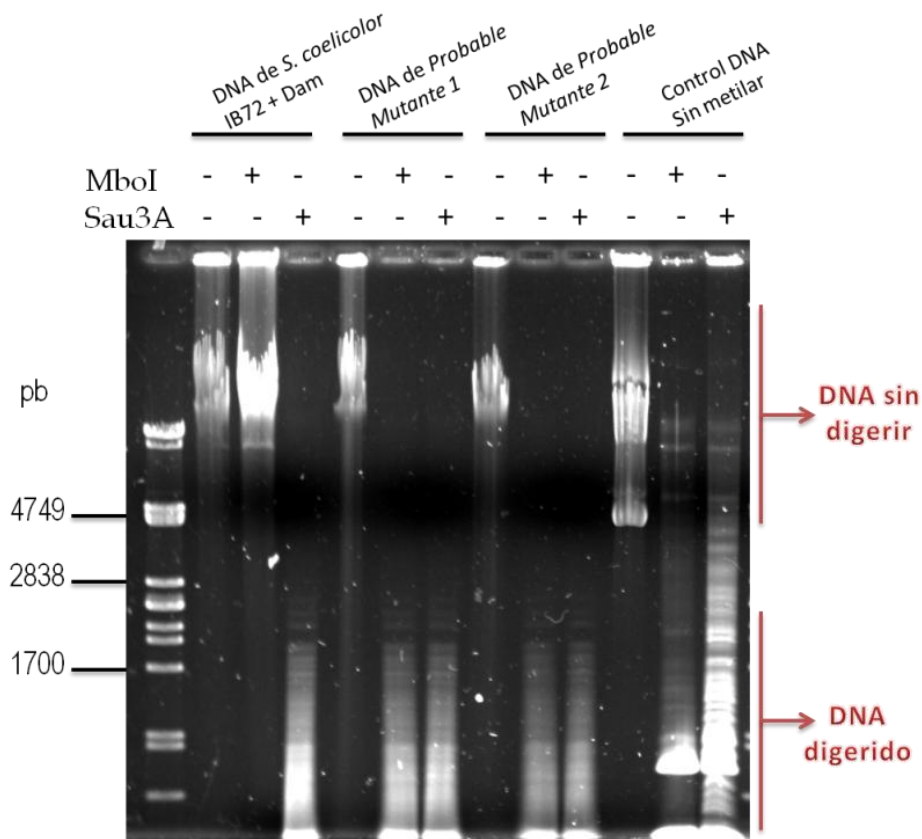


Figura 15. Análisis de la expresión de Dam en las posibles mutantes curadas del pIJ6021-Dam. Se purificó DNA de colonias sensibles a kanamicina y que perdieron el plásmido pIJ6021-Dam, pues ya no se protegen de la restricción con la enzima MboI. Sabemos que tanto MboI como Sau3A funcionan correctamente ya que ambas digieren el control de plásmido sin metilar.

7.4 Análisis de la restricción de las cepas que permitieron expresar Dam y que después perdieron el plásmido

A estas nuevas posibles mutantes se les realizó una segunda evaluación para demostrar que efectivamente habían adquirido una o varias mutaciones, y si estas nuevas mutaciones permitían la expresión de la metilasa Dam. Para esto se introdujo el plásmido pIJ6902-Dam mediante conjugación, esperando encontrar un número de exconjugantes en las nuevas mutantes igual al obtenido al introducir el vector vacío, a diferencia de la cepa silvestre de *S. coelicolor* o de las cepas IB61 y/o IB72, en donde habría solamente unas cuantas colonias.

Se realizaron las conjugaciones para introducir tanto el plásmido vacío pIJ6902 como control, y el plásmido pIJ6902-Dam. En el primer caso se seleccionaron las colonias exconjugantes con los antibióticos apramicina (resistencia otorgada por el plásmido pIJ6902) y ácido nalidíxico (resistencia propia de *S. lividans* y que se utiliza para detener el crecimiento de *E. coli*). En el segundo caso se añadieron los mismos antibióticos apramicina y ácido nalidíxico, además de tioestreptón para inducir la expresión del gen *dam* a partir del promotor P_{tipA} (Figura 16).

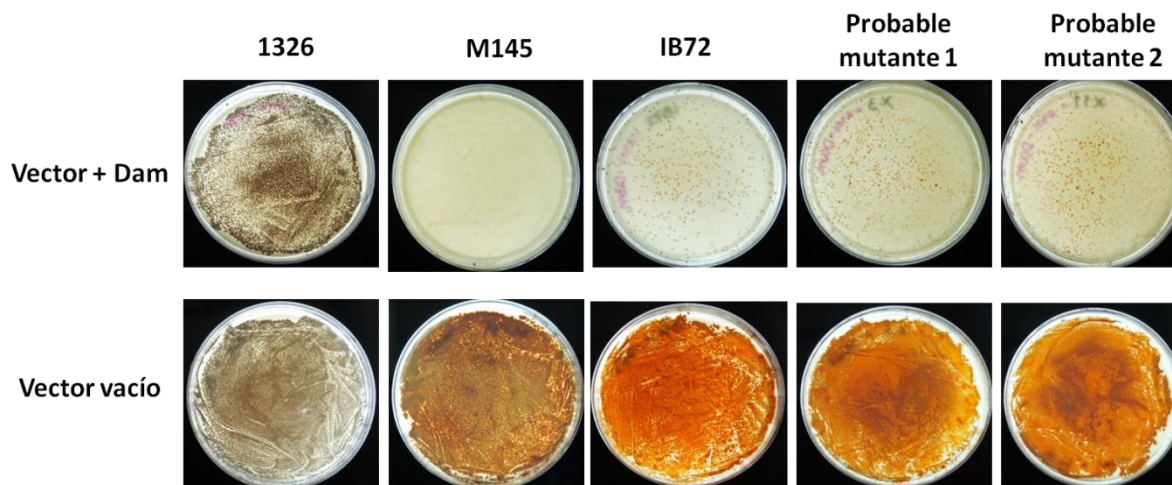


Figura 16. Introducción mediante conjugación del vector vacío pIJ6902 y del plásmido pIJ6902-Dam para demostrar la adquisición de nuevas mutaciones en el SRME de *S. coelicolor*. Las colonias que perdieron el plásmido pIJ6021-Dam (Probables mutantes 1 y 2) se conjugaron con *E. coli* con el plásmido integrativo pIJ6902 vacío y con el pIJ6902-Dam. La cepa IB72 fue de donde se aislaron estas colonias. Control positivo *S. lividans* silvestre (1326) y control negativo *S. coelicolor* silvestre (M145).

Todas las cepas conjugaron de manera exitosa con *E. coli* pues el vector vacío permitió que crecieran todas las cepas. En cambio, al introducir el gen *dam* observamos un decremento en el número de exconjugantes obtenidas. Las nuevas probables mutantes 1 y 2 no mostraron una disminución de la restricción respecto a la cepa de la que provenían, la IB72. *S. lividans* (1326) al no tener un fuerte SRME crece aún con el gen *dam*, y *S. coelicolor* silvestre (M145) no mostró ningún crecimiento pues contiene todos los elementos del SRME. Se probaron cuatro posibles mutantes más, pero todas dieron el mismo resultado (datos no mostrados). Este resultado mostró que, contrario a nuestra hipótesis, la razón de la obtención de algunas colonias sobrevivientes al expresar la metilasa Dam en las cepas IB61 e IB72 no era la presencia de mutaciones en genes para nucleasas, pues al reintroducir la metilasa se obtenía la misma incompatibilidad. Por lo tanto nos preguntamos cuál sería la razón de obtener algunas colonias sobrevivientes al introducir la metilasa Dam por conjugación.

Los experimentos de conjugación para introducir la metilasa Dam, se llevaron a cabo con esporas recién germinadas, que es el método usualmente utilizado para introducir DNA a partir de *E. coli* (Kieser, *et al.*, 2005). Normalmente las preparaciones de esporas se obtienen raspando la superficie del micelio esporulado en cultivos en medio sólido y es probable que dichas esporas contengan pequeñas cantidades de micelio maduro, el cual se encuentra en un estado fisiológico distinto al de la espora recién germinada y es por ello que tal vez este micelio pueda permitir la expresión de Dam.

Para descartar o probar esta hipótesis decidimos hacer otras conjugaciones para introducir tanto el vector vacío pIJ6902, como el plásmido pIJ6902-Dam pero ahora con micelio vegetativo en lugar de esporas germinadas. Se realizaron las conjugaciones modificando el protocolo (ver Anexos) con las recomendaciones de Baltz (Baltz, 1978) y posteriormente se agregaron los antibióticos correspondientes. En el caso del vector vacío se seleccionaron las colonias exconjugantes con los antibióticos apramicina (resistencia otorgada por el plásmido pIJ6902) y ácido nalidíxico (resistencia propia de *S. lividans* y que se

utiliza para detener el crecimiento de *E. coli*). En el caso del pJ6902-Dam se añadieron los mismos antibióticos apramicina y ácido nalidíxico, además de tioestreptón para inducir la expresión del gen *dam* a partir del promotor P_{tipA} .

El resultado de dichas conjugaciones se muestra en la figura 17. La morfología o estructura del micelio no impide la transferencia por conjugación del plásmido pues todos los controles con el vector vacío crecieron. En cambio, al introducir el plásmido pJ6902-Dam no se obtuvieron colonias en la cepa silvestre de *S. coelicolor* (M145), ni en la mutante múltiple (IB61) o en las colonias aisladas de esta que habían permitido la expresión de Dam. El hecho de haber podido introducir Dam en las esporas recién germinadas o en el micelio vegetativo y observar que éste impide el crecimiento de las posibles mutantes, descartó nuestra hipótesis ya que indica que no es el estado de diferenciación lo que determina la supervivencia de estas colonias.

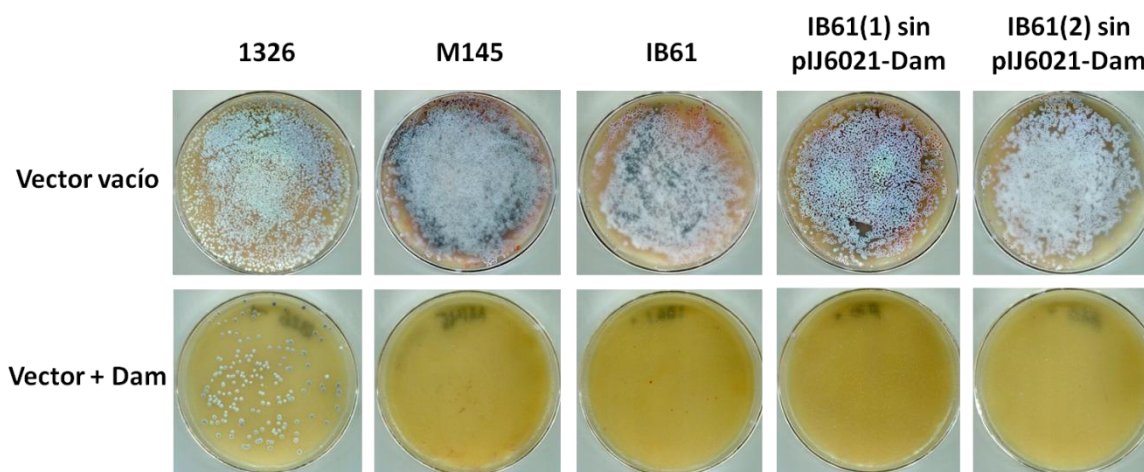


Figura 17. Efecto del estado de diferenciación de *Streptomyces* al permitir la expresión de Dam. El micelio vegetativo de las colonias que perdieron el plásmido pJ6021-Dam (sin pJ6021-Dam 1 y 2) se conjugaron con *E. coli* que contienen el plásmido pJ6902 vacío o con Dam. La cepa IB61 fue de donde se aislaron estas colonias. Control positivo *S. lividans* silvestre (1326) y control negativo *S. coelicolor* silvestre (M145).

7.5 El producto del gen *sco5330* como probable nucleasa metil-específica

Otro de los objetivos de este trabajo fue purificar y caracterizar *in vitro* a la nucleasa producto del gen *sco5330*, ya que se ha demostrado que esta sí es incompatible con la expresión de la metilasa Dam.

Primero, llevamos a cabo un análisis bioinformático. El gen *sco5330* de *S. coelicolor* se encuentra anotado en la base de datos GeneBank con ID 1100770 y solo se menciona como una proteína hipotética. El producto de dicho gen predice tener un tamaño de 300 aminoácidos.

Con el fin de identificar la existencia de dominios conservados característicos de endonucleasas metil-específicas se realizó una búsqueda por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) desde el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la secuencia de la proteína producto del gen *sco5330*.

Del análisis encontramos que el extremo C-terminal del producto del gen *sco5330* presenta cierta similitud con el motivo HNH de otras proteínas. Las endonucleasas con el motivo HNH adquieren este nombre debido a los aminoácidos conservados: Histidina (H), Asparagina (N) e Histidina (H), en donde la última Histidina puede cambiar por otra Asparagina (N). Dicho motivo presenta propiedades bioquímicas variables, pues su actividad catalítica puede ser para cortar una o ambas cadenas del DNA en una región específica o no.

Con la finalidad de delimitar los aminoácidos característicos del motivo HNH presentes en el producto del gen *sco5330* se realizó un alineamiento entre la región denominada para endonucleasas HNH y el extremo carboxilo de una proteína HNH característica de *E. coli*, McrA, con el extremo carboxilo del producto del gen *sco5330*. El resultado de dicho alineamiento mostró un considerable número de aminoácidos presentes que son característicos de este motivo. Se observa que están presentes los aminoácidos que se han reportado como indispensables para la clasificación de dicho motivo (Figura 18). Interesantemente, SCO5330 presenta el cambio de la última histidina por asparagina (letras en color

rojo) y la cantidad de aminoácidos que separa a la asparagina y la primera histidina es mayor. Una vez más, este resultado confirma que el producto del gen *sco5330* cuenta en la secuencia con las características para calificarla como endonucleasa HNH.

7.6 Expresión del producto del gen *sco5330* y localización subcelular

Para tratar de demostrar la actividad de endonucleasa *in vitro* nos propusimos clonar, expresar y purificar el producto del gen *sco5330* de manera heteróloga. Se obtuvo la construcción pET28-SCO5330, con el gen *sco5330* fusionado a una etiqueta de seis histidinas y se utilizó como hospedero de expresión a *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2.

Para conocer las condiciones óptimas de inducción de la expresión del producto del gen *sco5330* en la célula hospedera, primero se realizaron ensayos a pequeña escala, siguiendo el protocolo de expresión (ver Métodos). Esto también nos permitió determinar si la proteína se estaba sobreproduciendo en forma soluble o en cuerpos de inclusión.

En todos los ensayos realizados a diferentes temperaturas y tiempos de inducción se observó que no se podía detectar la presencia de la proteína en la fracción soluble; pero sí pudimos detectar que la proteína se encontraba en la fracción insoluble, muy probablemente en forma de cuerpos de inclusión o agregados insolubles. Un ejemplo de un experimento de expresión se muestra en la Figura 20, en donde se observa que la fracción insoluble del extracto obtenido del cultivo, inducido con 1 mM de IPTG a 18° C por 5 horas (carril 3) y 3 horas (carril 5) es la que contiene una proteína de aproximadamente 34 kDa, lo cual concuerda con el peso molecular predicho *in silico*. En el control sin inducir (carriles 1 y 2) no se observó la presencia de una proteína con este tamaño.

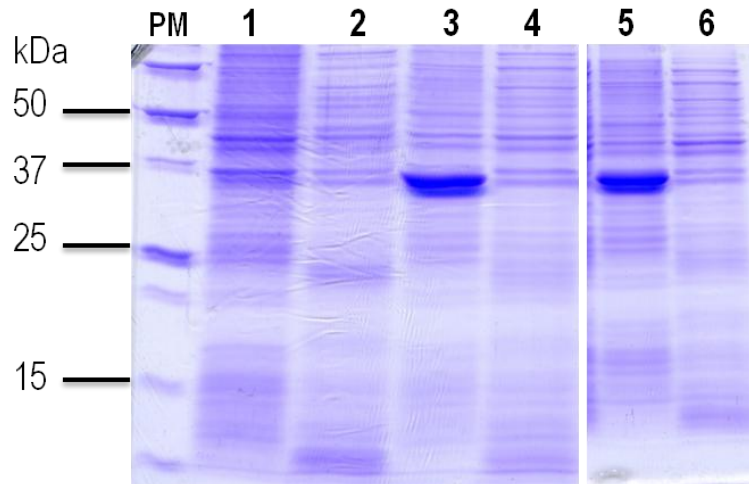


Figura 20. Expresión de la proteína SCO5330 en *E. coli* BL21 Rosetta 2. La proteína se localizó en los cuerpos de inclusión en la fracción insoluble de la misma manera a las 5 horas (carril 3) o 3 horas (carril 5) de inducción; no hubo detección en la fracción soluble (carriles 4 y 6). Control sin inducir de la fracción insoluble (carril 1) y de la fracción soluble (carril 2).

Está reportado que el uso de detergentes en bajas concentraciones favorece la solubilización de ciertas proteínas (Hjertén & Johansson, 1972; Nicholson & McMurray, 1986). Por ello, se probaron condiciones de solubilización utilizando los detergentes Tritón X-100, Tween 20 y Tween 80, pero ninguno permitió que se observara la banda de 34 kDa en la fracción soluble. Un ejemplo de estos ensayos se muestra en la Figura 21 donde se observa que el tratamiento del extracto crudo de la célula con 0.5% de Tween 80 no hace un cambio visible de la solubilización de la proteína, y la banda de 34 kDa sigue localizándose en la fracción insoluble (carril 4).

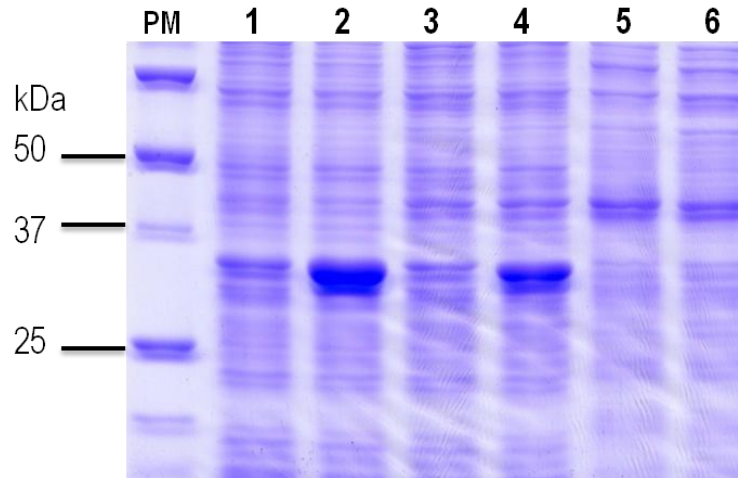


Figura 21. Solubilización de la proteína SCO5330 expresada en *E. coli* usando el detergente Tween 80. La proteína se localizó en los cuerpos de inclusión en la fracción insoluble de la misma manera con (carril 2) o sin (carril 4) Tween 80; no hubo detección en la fracción soluble (carriles 5 y 6). Control sin inducir de la fracción insoluble (carril 1 y 3).

7.7 Purificación del producto del gen *sco5330* en condiciones desnaturalizantes

Dados los resultados observados de la expresión del producto del gen *sco5330* decidimos continuar con la purificación del mismo en condiciones desnaturalizantes a partir de la fracción insoluble. Existen reportes de éxito en purificación de proteínas a partir de los cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes con agentes caotrópicos y su posterior renaturalización. El agente caotrópico empleado en nuestro caso fue hidrocloreuro de guanidino, ya que previamente había sido reportado su uso para la recuperación y renaturalización de proteínas (Xiang, et al., 2010).

Siguiendo el mismo protocolo de expresión (ver Métodos) pero a una mayor escala, los cuerpos de inclusión se solubilizaron con hidrocloreuro de guanidino 6M. La proteína solubilizada se purificó por cromatografía de afinidad a níquel, y posteriormente se renaturalizó disminuyendo la concentración de hidrocloreuro de guanidino de 6 M hasta 0 M (ver Métodos). Sin embargo, a pesar de tener una gran cantidad de proteína recombinante, no se logró obtener proteína plegada en

su estructura nativa o correcta, ya que no presentó actividad funcional al realizar ensayos de digestión de plásmido metilado y no metilado (Figura 22).

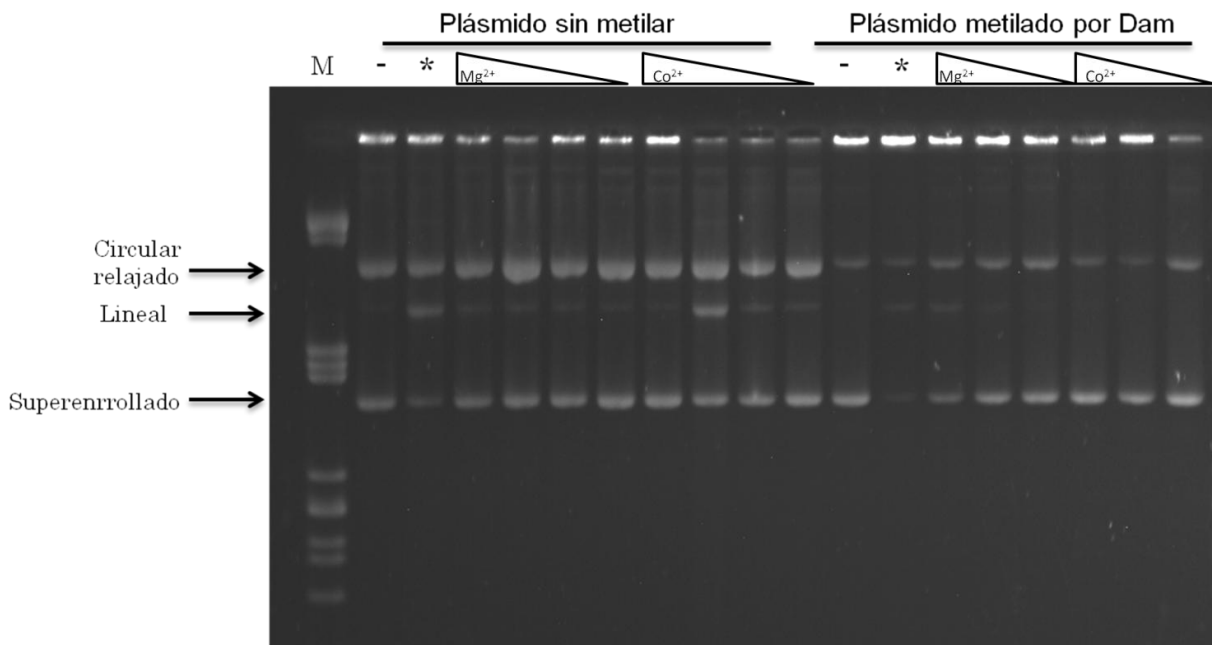


Figura 22. Ensayo de actividad del producto del gen SCO5330 renaturalizado. Como control plásmido sin enzima (-) y plásmido sin buffer (*). El resto de los carriles representan diferentes concentraciones de enzima y buffer con distintos cationes (Mg^{2+} y Co^{2+}).

Finalmente, para determinar la posibilidad de que al menos una pequeña fracción mínima de la proteína permaneciera en el citoplasma en su conformación nativa, se realizó un ensayo de cromatografía de afinidad a níquel en condiciones nativas. Los lavados de la columna se realizaron con 10, 20 y 50 mM de imidazol. Las eluciones se hicieron con 250 mM de imidazol, y se corrieron en un gel de policarilamida al 10% alícuotas de 15 μ L de todas las fracciones, lavados y eluciones, y se tiñó con azul de Coomassie. En el gel no fue posible observar ninguna recuperación de la proteína SCO5330 en estas condiciones, ya que no se distingue alguna banda del peso esperado de 34 kDa (datos no mostrados).

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran datos relevantes e interesantes sobre *S. coelicolor* y su sistema de restricción de DNA metilado por la metiltransferasa Dam de *E. coli*. La presencia de un sistema de restricción de DNA metilado en *S. coelicolor* fue descrita desde los inicios de la manipulación de este organismo por técnicas de biología molecular (MacNeil, 1988). En el primer trabajo realizado sobre las características genéticas y moleculares de este sistema González-Cerón et al. (2009) lograron identificar algunos de los genes que componen dicho sistema, y que presumiblemente codifican endonucleasas que restringen DNA metilado. No se conocían los patrones específicos de restricción de cada una de ellas; sin embargo González-Cerón (2009) determinaron que los genes *sco4213*, *sco4631* y *sco3261-sco3262* incrementan la restricción de DNA metilado por Dam en *S. lividans*, ya que al ser introducidos cada uno de estos genes en un plásmido integrativo y posteriormente transformarlas con un plásmido metilado, el número de transformantes es menor.

En este trabajo analizamos si esos mismos genes mostraban incompatibilidad con Dam *in vivo*. Al clonar el gen *dam* bajo el promotor P_{tipA} (Figura 9) y expresarlo en las cepas de *S. lividans* con los plásmidos pMS81+SCO4213, pMS81+SCO4631 y pMS81+SCO3261-SCO3262 encontramos que ninguna de las endonucleasas identificadas por González-Cerón (2009) son incompatibles con la expresión de Dam (Figura 12), a pesar de restringir en bajos niveles (entre 1 y 2 órdenes de magnitud) el DNA metilado por esta enzima e introducido mediante transformación.

Posteriormente se identificaron en nuestro laboratorio dos genes que codifican endonucleasas involucradas en la restricción de DNA metilado. Por las características de la secuencia de estas nucleasas, no esperábamos incompatibilidad del producto del gen *sco5333* con la metilasa Dam, pues esta presenta un dominio de reconocimiento para metilcitosinas en el extremo N-terminal (datos en proceso de publicación); los resultados en la figura 12 corroboran la ausencia de incompatibilidad de este gen con Dam.

Por otro lado logramos determinar que el único gen incompatible con la expresión de *dam* es *sco5330* (Figura 12). Recordemos que la metiltransferasa Dam metila adeninas, por lo tanto la nucleasa SCO5330 debe reconocer y restringir una secuencia que contenga adeninas metiladas. Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que las metiltransferasas en adeninas M.Sall y M.SphI eran también incompatibles con el producto del gen *sco5330* (Martínez-Morales, datos no publicados).

Los datos de incompatibilidad *in vivo* sugieren que la nucleasa SCO5330 es específica de diferentes secuencias metiladas en adeninas. Con los datos de las tres metilasas estudiadas que son incompatibles se podría generar la secuencia consenso S^{m6}AY, donde S representa guanina o citosina, e Y representa cualquier pirimidina (Figura 23).

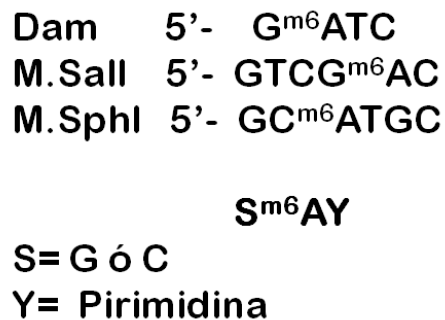


Figura 23. Secuencia consenso de reconocimiento de la nucleasa SCO5330.
 Basados en los resultados de incompatibilidad con las tres metilasas: Dam, M.Sall y M.SphI, se propone la secuencia consenso S^{m6}AY.

Para poder validar esta secuencia de reconocimiento consenso es necesario llevar a cabo más análisis de incompatibilidad, expresando otras metilasas de adeninas. Si esas metilasas reconocen esta misma secuencia u otra(s) base(s) adyacente(s) nos ayudaría a restringir o delimitar mejor la secuencia de reconocimiento de SCO5330. Por otro lado, si otras metilasas no reconocen la secuencia consenso propuesta pero presentan incompatibilidad con SCO5330, esto refutaría nuestra hipótesis y abriría la posibilidad de que esta enzima sea capaz de reconocer cualquier adenina metilada, más no de reconocer las bases contiguas a esta. Esto nos hablaría de que SCO5330 presenta cierta “promiscuidad” de reconocimiento.

La heterogeneidad o “promiscuidad” de reconocimiento en las secuencias del DNA ha sido reportado en otras nucleasas (Chandrashekar, *et al.*, 2004). Desde muchos años atrás se sabe que las enzimas muestran flexibilidad al reconocimiento de su sustrato (Hult & Berglund, 2007); sin embargo, la alta especificidad siempre ha sido considerada una piedra angular de la catálisis enzimática. Tanto así, que muchos han sido los intentos por incrementar la fidelidad *in vitro* por mutagénesis sitio-dirigida u otras técnicas (Yoshikuni, *et al.*, 2006). Sigue siendo una paradoja si la promiscuidad juega un papel relevante o no en la célula; por un lado se sostiene que la promiscuidad permite la divergencia de funciones enzimáticas, por otro se observa en la naturaleza la retención de numerosas enzimas con una alta especificidad.

Trabajos recientes han examinado la manifestación de la promiscuidad de los sistemas de restricción de DNA *in vivo*. Observando que dicha promiscuidad confiere cierta ventaja, a través de una protección adicional contra la invasión de su genoma. Dado que los elementos invasores con frecuencia desarrollan estrategias protectoras anti-restrictivas que favorecen el decremento de los sitios de reconocimiento por los sistemas de restricción, al mantener la promiscuidad se asegura una mayor posibilidad de contender en esta carrera armamentista entre las bacterias y sus invasores (Vasu, *et al.*, 2012). Aunque contamos hoy en día con un gran número de herramientas bioinformáticas, no ha sido fácil predecir la especificidad de las nucleasas. El extremo N-terminal de la nucleasa SCO5330 no presenta alta similitud con algún dominio previamente descrito para endonucleasas metil-específicas. Sin embargo, el extremo C-terminal sí presenta características interesantes que son descritas más adelante.

Fue interesante observar que la única endonucleasa incompatible con Dam se encontrara en un elemento genético móvil (Sco5349, Figura 5), pues sugiere que estos sistemas juegan un papel importante en la defensa contra la entrada de DNA exógeno (como sucede en la naturaleza cuando un fago intenta ingresar en la célula) ya que al poder transferirse de manera horizontal con otras bacterias facilitaría enormemente la rápida adaptación genética al permitir la adquisición de

nuevas funciones en un solo paso (Ghinet, *et al.*, 2011). Este resultado también añade información a lo propuesto por el grupo de Te Poele (2008) de que las inserciones similares a las de otro AICE (pSAM2) parecen ser. El gen *sco5330* localizado dentro de dicho elemento confiere a la célula actividad restrictiva contra DNA metilado en adeninas por Dam (Figura 4 y 11).

En el laboratorio se logró construir una cepa, IB61, que carece de los genes involucrados en la restricción de DNA metilado descritos por González-Cerón (2009) así como los presentes en el AICESco5349 (incluyendo a *sco5330*). Esta cepa tiene suprimida por completo la restricción por DNA con citosinas metiladas, lo que significa que todos los genes involucrados en esta restricción ya han sido identificados y eliminados; esta cepa continúa restringiendo (aunque en menor nivel que la silvestre) DNA metilado en sitios Dam, lo cual indica que existen otras nucleasas específicas para adeninas metiladas que no han sido identificadas. La cepa IB72 carece adicionalmente de dos nucleasas cuyos genes fueron identificados posteriormente y eliminados del cromosoma (Nava-Kopp, Santos-Medellín, *et al.*, datos no publicados). Estos genes son *sco2655* y *sco1785*, que demostraron no estar involucrados en la restricción. Como se muestra en este trabajo estas dos cepas, IB61 e IB72, siguieron manifestando incompatibilidad con la expresión de la metilasa Dam, lo cual significa que existen (aparte del gen *sco5330*) uno o varios genes adicionales involucrados en la restricción de DNA con sitios Dam metilados. Como estas cepas siguen siendo restrictivas, esperábamos encontrar colonias sobrevivientes que permitieran la expresión de Dam al haber mutado este o estos genes. Lo primero que observamos al introducir el plásmido pIJ6021-Dam (Figura 10) fue que la expresión de Dam es letal para la cepa silvestre de *S. coelicolor*, más no así para *S. lividans* (Figura 13). Aunque *S. lividans* restringe de manera parcial, tiene la capacidad de reparar o contender ante dichos cortes. Esto nos habla de la diferencia fenotípica respecto al SRME entre estas dos especies, y que *S. lividans* carece de ciertos elementos responsables de restringir DNA metilado (Jayapal, 2007). Segundo, el número de colonias obtenidas al introducir Dam en las cepas IB61 e IB72 fue mucho menor respecto al control *S. lividans*, y mucho menor que al introducir el vector vacío. Sin

embargo, a diferencia de la cepa silvestre de *S. coelicolor*, sí fue posible obtener colonias.

Puesto que la supervivencia de dichas colonias podría ser el resultado de la pérdida del gen *dam* o de su funcionalidad, los ensayos de digestión con las enzimas Mbol y Sau3A nos permitieron evaluar y seleccionar aquellas probables mutantes en las que el DNA estuviera metilado en sitios Dam sin que esto fuera letal (Figura 14). La mayoría de las colonias evaluadas presentó protección al digerir con Mbol, a excepción de una colonia proveniente de la IB61 cuyo DNA sí se digirió con esta enzima (datos no mostrados). Esto demostró una alta frecuencia de aceptación de la metiltransferasa, y nos sugirió que probablemente se habían aislado mutantes que carecían de algún gen responsable de la restricción de DNA metilado por Dam, y por lo tanto responsables de la incompatibilidad.

Al verificar estas probables mutantes, mediante la curación del pIJ6021-Dam y la reintroducción del gen *dam* clonado en el plásmido pIJ6902, fue posible determinar que no eran capaces de aceptar a la metilasa Dam con alta frecuencia, como se esperaba en el caso de las mutantes que buscábamos. Esto nos sugirió que no fue la pérdida de un gen involucrado en la restricción de sitios Dam metilados el responsable de la supervivencia de las colonias obtenidas. De haber sido así, el número de exconjugantes habría sido casi similar al del control positivo con el vector vacío, o al obtenido con *S. lividans*, la cual es capaz de aceptar al pIJ6902-Dam.

Quisimos saber si las colonias que sobrevivieron habían sido resultado de la entrada del plásmido pIJ6902-Dam a una pequeña proporción de micelio que se encuentra normalmente en las preparaciones de esporas que se utilizan para realizar las conjugaciones, ya que en esta etapa la célula podría tener completamente activos sus mecanismos de reparación de daño al DNA. Como se mencionó anteriormente, *S. coelicolor* tiene un ciclo de vida complejo, era probable que la restricción fuera mayor al introducir Dam en las esporas recién activadas para germinar (Figura 16) que en micelio recién formado (Figura 17) el

cual podría tener ahora una mayor oportunidad de contender con Dam. Sin embargo, al repetir las conjugaciones e introducir el plásmido pIJ6902-Dam en micelio germinado de las nuevas posibles mutantes no observamos un incremento en la frecuencia de exconjugantes, la frecuencia fue tan baja y muy similar a la de la cepa IB72. Lo realmente evidente fue la letalidad de Dam en la cepa silvestre, ya que contiene todos los genes que codifican para las nucleasas, incluido el gen *sco5330* (Figura 17).

Dada la supervivencia de las colonias obtenidas al transformar con el plásmido pIJ6021-Dam proponemos otras posibles explicaciones, que son:

- i. La eficiencia de metilación por la metilasa Dam expresada en estas colonias es menor a la que tendría una nativa, probablemente por una mutación que ahora la hiciera menos activa y por ello podemos ver un nivel de protección al digerir con Mbol.
- ii. La generación de cortes al DNA por alguna endonucleasa metil-específica no identificada promueve la activación de los sistemas de reparación de la célula, el cual puede contender con dicho daño y permitir el crecimiento de estas colonias.
- iii. Podría disminuir la participación directa de más endonucleasas, debido a un cambio fisiológico en la célula que permita la regulación y activación de mecanismos protectores, por ejemplo un aumento en la actividad proteolítica o expresión de genes para proteínas de unión a DNA que impidan la acción de las endonucleasas.

En la primera explicación, al hacer las digestiones con Mbol y Sau3A no detectamos diferencias significativas entre el DNA genómico proveniente de las nuevas posibles mutantes y las demás cepas control que permitían la expresión de Dam (Figura 14). En ninguna de las digestiones observamos una digestión parcial y en el control positivo vimos que ambas enzimas de restricción funcionaban bien. Cabe recalcar que este nivel de análisis no es muy sensible, pues si no estaban metilados todos los sitios, y Mbol podía realizar algunos cortes al DNA, estos serían difíciles de detectar con este análisis.

Segundo, cualquier evento que genere un cambio en la estructura de la doble hélice del DNA llevará a un cambio mismo en la célula. El daño ocasionado al DNA, siempre que sea posible, será minimizado por sistemas celulares que reconocen y corrigen ese daño. Los sistemas de reparación son de vital importancia, así como complejos (Lewin, 2006). Estos pueden reconocer un amplio rango de modificaciones en el DNA y podrían ser los responsables de las observaciones en este trabajo. Estudios en *E. coli* mostraron los cambios transcripcionales ocurridos al perder un sistema de M-R (Asakura & Kobayashi, 2009). La pérdida de dicho sistema ocasiona un proceso llamado muerte post-segregacional, esto es que al no haber más metiltransferasa que proteja al DNA y al segregarse la célula acarrea una cantidad remanente de endonucleasa que corta y lleva a la muerte. En este estudio se observó que la actividad post-segregacional de la endonucleasa del sistema PaeR71 eleva la expresión de varios genes del sistema SOS (cuyos productos actúan en numerosas funciones de reparación). También hubo un aumento en la expresión de genes involucrados en reparación de DNA por recombinación, algunos de estos genes sobrelapados con los del sistema SOS, lo que nos habla de cambios celulares que intentan corregir el daño ocasionado por la endonucleasa que permiten sobrevivir a las células. Eso mismo podría estar sucediendo en las cepas de *S. coelicolor* que permiten la expresión de Dam (Figura 12). En este caso la presencia de Dam promueve la restricción del DNA propio de la célula, lo que genera la activación de los sistemas de reparación (sistema SOS o los sistemas de reparación por recombinación) que corrigen dicho daño y permiten la supervivencia. Diferentes estudios en *S. lividans*, *S. coelicolor* y *S. ambofaciens* han mostrado la presencia e importancia de homólogos y/u ortólogos de algunos de los componentes de los sistemas de reparación de DNA. Por ejemplo, la proteína RecA la cual lleva a cabo un paso crucial en el apareamiento homólogo común en todas las vías bacterianas de recombinación (Huang, *et al.*, 2006; Vierling, *et al.*, 2001). RecA también es responsable de la activación de la respuesta SOS al degradar al represor LexA, dicha degradación permite la expresión de muchos genes reparadores de daño al DNA (Lewis, 2006).

Y la última explicación, pero no la menos importante, es que podría haber expresión y/o activación de proteínas reguladoras de la actividad de restricción. Por ejemplo, la actividad proteolítica de alguna enzima podría controlar la actividad de las endonucleasas que intenten restringir el DNA propio de la bacteria. En *E. coli* existe dicha manera de regulación, ya que la actividad de EcoKI está regulada por la degradación dependiente de ClpXP (Doronina & Murray, 2001). Otra forma de regulación es mediante el bloqueo de la enzima de restricción por la unión al DNA de otras proteínas, como se sugirió que se protegía *Klebsiella pneumoniae* de la promiscuidad de su enzima de restricción KpnI (Vasu, *et al.*, 2012).

Por otra parte, el análisis de la secuencia del producto del gen *sco5330* reveló que esta proteína podría ser una endonucleasa HNH, aunque de baja calidad, debido a los cambios de ciertos aminoácidos y a las distancias entre los aminoácidos esenciales que forman el sitio activo. Mediante PSI-BLAST detectamos que la región C-terminal era altamente reconocida como motivo HNH, y al realizar un alineamiento de dicha región con la secuencia consenso de las endonucleasas HNH y con el dominio HNH de la endonucleasa McrA de *E. coli* vimos que ciertos aminoácidos característicos del dominio HNH están presentes. Primero, está presente el residuo de asparagina central y los residuos conservados de histidina; aunque a una mayor distancia la histidina del extremo amino y la del extremo carboxilo cambia por otra asparagina. Un número considerable de proteínas con dominios HNH también presentan un motivo CX₂C en cualquier lado del residuo central de asparagina (Mehta, *et al.*, 2004); ésta característica se encontró en la secuencia del producto del gen *sco5330* (Figura 17).

Siguiendo con la parte experimental del estudio del producto del gen *sco5330*, se clonó de manera exitosa el gen de dicha proteína en el plásmido pET28a, el cual agrega una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal (Figura 18A). Mediante patrón de digestión con la enzima Apal pudimos comprobar que la orientación y ligación habían sido exitosas (Figura 18B).

La construcción pET28-5330 se introdujo a *E. coli* BL21 Rosetta 2 para inducir la expresión al crecer con IPTG. Posteriormente, la etiqueta de histidinas actuó como una cadena de afinidad específica que facilitó la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel. La proteína se localizó siempre en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (Figura 19). La proteína en la fracción insoluble se siguió observando aún cambiando distintas variables como el tiempo de inducción, la temperatura de inducción, la concentración del inductor y el uso de detergentes que favorecieran la solubilización de la proteína (Figura 20). Esto se debió seguramente a que la proteína no logra expresarse en su estructura nativa y deja regiones expuestas que interactúan con otras proteínas similares. Los detergentes no pueden deshacer dichas interacciones y se continúan formando los agregados insolubles. También, los cuerpos de inclusión se forman cuando la proteína expresada le resulta tóxica a la célula huésped (The QIAexpressionist, 2003). Con la finalidad de reducir la cantidad de proteína que le resultara tóxica a la célula, los cultivos se indujeron por periodos más cortos de tiempo o con menor cantidad de inductor. Sin embargo, no se logró observar la banda del tamaño predicho (34 kDa) en dichas condiciones (Figura 20, otros datos no mostrados).

Se decidió purificar el producto del gen *sco5330* en condiciones desnaturalizantes con hidrocloreuro de guanidino. Posteriormente se llevó a cabo su renaturalización y se evaluó la actividad del mismo. Lamentablemente no detectamos actividad alguna de restricción al probar la digestión de un plásmido previamente metilado (Figura 21). En algunos geles lográbamos observar una banda que correspondería al plásmido linearizado, esto si la proteína realizaba satisfactoriamente un doble corte a la hebra del DNA, pero dicho resultado no fue reproducible. Esto no descarta la posibilidad de que la proteína esté en condiciones nativas y que la falta de actividad se deba a no contar con las condiciones óptimas.

9. CONCLUSIONES

- La expresión de la metilasa Dam de *E. coli* en *S. coelicolor* es letal.
- La expresión de la metilasa Dam en las cepas IB61 e IB72 permitió aislar colonias que aceptaron la introducción del gen *dam*; comprobamos que su propio DNA se encontraba metilado; sin embargo, ninguna de estas colonias mostró disminución de la restricción a DNA metilado por Dam, lo que sugiere que no es la pérdida de restricción la responsable de su sobrevivencia.
- El gen *sco5330* resultó ser el único incompatible con Dam.
- El producto del gen *sco5330* cuenta en la secuencia con las características para calificarla como endonucleasa HNH.
- Los datos de incompatibilidad *in vivo* sugieren que la nucleasa SCO5330 es específica para diferentes secuencias metiladas en adeninas.
- A pesar de tener una enzima SCO5330 purificada no hemos podido determinar su actividad y especificidad *in vitro*, probablemente por un mal plegamiento al renaturalizar.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar los elementos o cambios fisiológicos en la bacteria responsables de la supervivencia de las colonias que permiten la expresión de Dam y así probar las otras posibles explicaciones que proponemos.
- Validar la secuencia consenso propuesta para SCO5330 por los datos de incompatibilidad *in vivo*, al llevar a cabo más análisis de incompatibilidad expresando otras metilasas de adeninas.
- Utilizar otra estrategia para la expresión y evaluación de la actividad *in vitro* del producto del gen *sco5330*. Por ejemplo, la utilización de otro modelo de expresión, como *Streptomyces venezuelae* que al ser una especie cercana a *S. coelicolor* creemos que la expresaría con mayor facilidad y probablemente no sería tóxico para la célula; por lo tanto, no se formarían cuerpos de inclusión o agregados insolubles.

11. BIBLIOGRAFÍA

Bentley SD, *et al.* 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *S. coelicolor* A3(2). *Nature*. 417(6885):141-7.

Bertani G, Weigle JJ. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol.* Feb;65(2):113-21.

Bhagwat AS, Sohail A, Roberts RJ. 1986. Cloning and characterization of the dcm locus of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* Jun;166(3):751-5.

Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*. 116(1):43-9.

Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guedon G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol.* 46: 601-610.

Chandrashekar S, Saravanan M, Radha DR, Nagaraja V. 2004. Ca²⁺-mediated site-specific DNA cleavage and suppression of promiscuous activity of KpnI restriction endonuclease. *J Biol Chem.* 26;279(48):49736-40.

Desirazu NR, Dryden TF & Bheemanaik S. 2013. Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective. *Nucleic Acids Research*, 1–11.

Doronina Victoria & Murray Noreen. 2001. The proteolytic control of restriction activity in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 39(2):416-28.

Dryden DT, Cooper LP, Murray NE. 1991. Purification and characterization of the methyltransferase from the type 1 restriction and modification system of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem.* 268(18):13228-36.

Egan ES, Waldor MK. 2003. Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell.* 114(4):521-30.

Flärdh K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 6(6):564-71.

Flärdh K & Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* Jan;7(1):36-49.

Ghinet MG, Bordeleau E, Beaudin J, Brzezinski R, Roy S, Burrus V. 2011. Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria. *PLoS One.* 6(11):e27846.

Gómez-Eichelmann MC, Ramírez-Santos J. 1993. Methylated cytosine at Dcm (CCATGG) sites in *Escherichia coli*: possible function and evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* 37: 11-24.

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(1): 35-43.

Gregory MA, Till R, Smith MC. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol.* 185(17):5320-3.

Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ. 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science.* 284(5416):967-70.

Hernday AD, Braaten BA, Low DA. 2003. The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the pap epigenetic switch. *Mol Cell.* 12(4):947-57.

Hjertén S, Johansson KE. 1972. Selective solubilization with Tween 20 of membrane proteins from *Acholeplasma laidlawii*. *Biochim Biophys Acta.* 288(2):312-25.

Hopwood D. 2006. Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annu. Rev. Genet.* 40: 1-23.

Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater and T. Kieser. 1987. Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. *Methods Enzymol.* 153:116-166.

Hult K, Berglund P. 2007. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* 25(5):231-8.

Huang J, *et al.*, 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5): 1276-1287.

Huang Tzu-Wen & Chen Carton. 2006. A *recA* Null Mutation May Be Generated in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 188(19): 6771–6779.

Ishikawa K, Fukuda E, Kobayashi I. 2010. Conflicts targeting epigenetic systems and their resolution by cell death: novel concepts for methyl-specific and other restriction systems. *DNA Res.* 17(6):325-42.

Jayapal KP, Lian W, Glod F, Sherman DH, Hu WS. 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics*. 8:229.

Julio SM, Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ. 2002. DNA adenine methylase overproduction in *Yersinia pseudotuberculosis* alters YopE expression and secretion and host immune responses to infection. *Infect Immun*. 70(2):1006-9.

Kahramanoglou C, et al. 2012. Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription. *Nature Communications*. 3: 886.

Kelleher JE, Raleigh EA. 1991. A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides. *J Bacteriol*. 173(16):5220-3.

Kieser T, Bibb M, et al. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich, John INNES.

Kwak J, Jiang H, Kendrick KE. 2002. Transformation using in vivo and in vitro methylation in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett*. 209(2):243-8.

Lammertyn E & Anné J. 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol. Lett*. 160: 1-10.

Lewis RA, Laing E, Smith CP, et al. 2010. Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization. *BMC Genomics*. 11:682.

Løbner-Olesen A, Skovgaard O, Marinus MG. 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol*. 8(2):154-60.

Low DA, Weyand NJ, Mahan MJ. 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun*. 69(12):7197-204.

Lyutskanova D, Stoilova-Disheva M, Peltekova V. 2001. The restriction-modification system in *Streptomyces flavopersicus*. *Folia Microbiol (Praha)*. 46(2):119-22.

MacNeil DJ. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol*. 170(12):5607-12.

MacNeil DJ, Gewain KM, Occi JL, Foor F. 1992. Vectors for generating nested deletions and facilitating subcloning G+C-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. *Gene*. 119(1):149-50.

Mark R & Dryden TF. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 466-472.

Mazodier P, et al. 1989. Intergeneric Conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* Species. *Journal of Bacteriology*, p. 3583-3585 Vol. 171, No. 6.

Mulligan EA, Dunn JJ. 2008. Cloning, purification and initial characterization of *E. coli* McrA, a putative 5-methylcytosine-specific nuclease. *Protein Expr Purif*. Nov;62(1):98-103.

Murakami T, Holt TG, Thompson CJ. 1989. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*. 171(3):1459-66.

Murray NE. 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev*. Jun;64(2):412-34.

Nicholson DW, McMurray WC. 1986. Triton solubilization of proteins from pig liver mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*. 856(3):515-25.

Norlander J, Kempe T, Messing J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. 26(1):101-6.

Palmer BR, Marinus MG. 1994. The dam and dcm strains of *Escherichia coli* - a review. *Gene*. 143: 1-12.

Powell LM, Dryden DT, Murray NE. 1998. Sequence-specific DNA binding by EcoKI, a type IA DNA restriction enzyme. *J Mol Biol*. 283(5):963-76.

Raleigh EA, Wilson G. 1986. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83, pp. 9070-9074

Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. 2003. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 1.

Sambrook J, Russell DW, et al. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3a. Ed. Nueva York, EU. Vol. 3.

Schlagman SL, Hattman S. 1983. Molecular cloning of a functional dam+ gene coding for phage T4 DNA adenine methylase. *Gene*. 22(2-3):139-56.

Stewart FJ, *et al.* 2000. Methyl-specific DNA Binding by McrBC, a Modification-dependent Restriction Enzyme. *J. Mol. Biol.* 298, 611-622.

Takano E., *et al.* 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene.* 166: 133-137.

Tesfazgi Mebrhatu, M., Wywiał, E., Ghosh, A., Michiels, C.W., Lindner, A.B., Taddei, F., Bujnicki, J.M., Van Melderen, L., Aertsen, A. 2011. Evidence for an evolutionary antagonism between Mrr and Type III modification systems. *Nucleic Acids Res.* 39: 5991-6001.

te Poele EM, Habets MN, Tan GY, Ward AC, Goodfellow M, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2007. Prevalence and distribution of nucleotide sequences typical for pMEA-like accessory genetic elements in the genus *Amycolatopsis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 61:285–294.

te Poele EM, Samborsky M, Oliynyk M, Leadlay PF, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2008. Actinomycete integrative and conjugative pMEA-like elements of *Amycolatopsis* and *Saccharopolyspora* decoded. *Plasmid.* 59:202–216.

The QIAexpressionist. A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 2003. Fifth Edition. QIAGEN.

Vasu K, *et al.*, 2012. Promiscuous restriction is a cellular defense strategy that confers fitness advantage to bacteria. *PNAS.* E1287–E1293.

Vierling, S., T. Weber, W. Wohlleben, G. Muth. 2001. Evidence that an additional mutation is required to tolerate insertional inactivation of the *Streptomyces lividans* *recA* gene. *J. Bacteriol.* 183:4374–4381.

Waite-Rees PA, Keating CJ, Moran LS, Slatko BE, Hornstra LJ, Benner JS. 1991. Characterization and expression of the *Escherichia coli* Mrr restriction system. *J Bacteriol.* 173(16):5207-19.

Ward JM., *et al.* 1986. Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces*. *Mol Gen Genet.* 203(3):468-78.

Xiang D, *et al.*, 2010. Expressions and purification of a mature form of recombinant human Chemerin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 69(2):153-8.

Wion D, Casadesús J. 2006. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol.* 4(3):183-92.

Yoshikuni Y, Ferrin TE, Keasling JD. 2006. Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature.* 440(7087):1078-82.

12. ANEXOS

12.1 Técnicas para la manipulación de DNA

Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

1. Se toma 1.5mL de un cultivo de toda la noche y se pasa a un tubo eppendorf estéril, se forma el paquete de células centrifugando 5 minutos a 6000 rpm.
2. Resuspender el paquete de células o el micelio en 200µL de Tris 25mM, EDTA 25mM pH=8. Para *Streptomyces* el TE debe contener lisozima 2mg/mL.
3. Para *E. coli* se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Para *Streptomyces* se incuba a 37°C hasta que el micelio se vea translúcido y viscoso.
4. Se agregan 400µL de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta ver transparente y muy viscoso. Incubar por 10 minutos.
5. Se agregan 300µL de acetato de potasio 3M pH=4.8 y se mezcla bien hasta perder la viscosidad y ver un precipitado blanco. Se incuba por 15 minutos.
6. En el caso de *Streptomyces* se centrifuga por 5 minutos a 13200 rpm y el sobrenadante se pasó a otro tubo. Posteriormente se agregó 400µL de fenol/cloroformo. Para *E. coli* se agrega directamente el fenol/cloroformo. Se agita en vórtex y se centrifuga 3 minutos a 13200 rpm.
7. Se pasa la fase acuosa a otro tubo y se añade 1 mL de etanol absoluto frío. Se deja precipitar por 5 minutos.
8. Se centrifuga 10 minutos a 13200 rpm. Se retira todo el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 50µL de TE (10mM de Tris, 10mM de EDTA, pH=8). Después, se agregan 150µL de acetato de sodio 4M pH=6. Se mezcla y se deja incubando por al menos una hora a -20°C.
9. Se centrifuga por 10 minutos a 13200 rpm. Se toma el sobrenadante y se pasa a un tubo limpio. Añadir 200µL de isopropanol y dejar precipitando por 10 minutos.
10. Se centrifuga durante 10 minutos a 13200 rpm. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 45µL de TE 10mM. Se agregan 5µL de acetato de sodio 3M pH=6 y 125µL de etanol absoluto frío. Se deja precipitar por 10 minutos.
11. Finalmente, se centrifuga por 10 minutos a 13200 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón en 25µL de TE 10mM.

Preparación de DNA plasmídico a mediana escala (Midiprep)

1. El paquete de células se resuspende en TE 25mM y se deja reposar 5 minutos. En el caso de *Streptomyces* el TE contenía lisozima 7mg/mL y se deja a 37°C hasta verse translúcido y viscoso.
2. Se agregan 40mL de una solución fresca de NaOH 0.2N y SDS 1%. Se revuelve bien hasta verse transparente y viscoso. Para *Streptomyces* es recomendable homogenizar con una jeringa.
3. Después de 10 minutos se añaden 30mL de acetato de potasio 3M pH=4.8. Se agita hasta formar un precipitado blanco y se deja reposar 15 minutos.
4. En el caso de *Streptomyces* se centrifuga por 5 minutos a 7500 rpm y el sobrenadante se pasa a otro tubo. Posteriormente se agregan 40mL de fenol/cloroformo. Para *E. coli* se agrega directamente el fenol/cloroformo. Se agita en vórtex y se centrifuga 5 minutos a 7500 rpm.
5. La fase acuosa se pasa a otro tubo limpio y se le agregan 100mL de etanol absoluto frío. Se deja precipitando 10 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 7500 rpm. Se retira el sobrenadante.
7. El precipitado que se forma en el fondo del tubo se resuspende en 2 mL de TE 10mM. Y posteriormente se agregan 3 volúmenes (6 mL) de acetato de sodio 4M. Dejar a -20°C por una hora.
8. Pasada la hora, se centrifuga por 10 minutos a 7500 rpm. Se toma el sobrenadante y se pasa a otro tubo limpio. Al sobrenadante se le agrega 1 volumen (8 mL) de isopropanol y se deja reposar 10 minutos.
9. Centrifugar 10 minutos a 7500 rpm y retirar el sobrenadante. El botón se resuspende en 500 µL de TE 10mM y se pasa a un tubo eppendorf.
10. Agregar 5 µL de RNAsa y dejar a 37°C por al menos una hora.
11. El siguiente paso es añadir 500 µL de fenol/cloroformo, vortexear y centrifugar a 13200 rpm durante 5 minutos.
12. La fase acuosa se pasa a un tubo eppendorf nuevo y se le agregó 500 µL de cloroformo, se vortexea y se centrifuga 5 minutos a 13200 rpm.
13. Tomar la fase acuosa y pasar a un tubo eppendorf nuevo y se agrega primero 1/10 volumen (50 µL) de acetato de sodio 3M, se agita y luego se agrega 1 volumen (550 µL) de isopropanol.
14. Debe formarse una malla blanca, esa se queda en el tubo. El sobrenadante se desecha.
15. Se seca durante 5 minutos la malla blanca a 50°C y se resuspende en el volumen adecuado de TE 10mM.
16. Se repiten los pasos 13 al 15 hasta ver completamente transparente el sobrenadante (spooling).
17. Se cuantifica y se verifica la pureza al medir en el espectrofotómetro.

Purificación de fragmentos de DNA mediante agarosa de bajo punto de fusión (LMP)

1. Preparar un gel al 0.6% con TBE 1X. Se deja gelificar a 4°C por 30 minutos.
2. El gel se corre a un voltaje constante de 11 V durante toda la noche.
3. Al otro día, se tiñe con bromuro de etidio (10µg/mL). Se corta la banda usando la lámpara UV de baja intensidad. Y se pasa a un tubo nuevo.
4. Fundir a 70°C por 10 minutos.
5. Agregar 1/10 del volumen de NaCl 5M, se mezcla y se deja otros 5 minutos a 70°C.
6. Se prepara fenol saturado mezclando 100µL de NaCl 5M, 400µL de agua y 500µL de fenol, se vortexea y centrifuga 1 minuto a 13200 rpm. Se retira fase acuosa. El fenol saturado entonces se agrega a la agarosa fundida, 2/3 de su volumen. Se mezcla con ayuda del vórtex y se centrifuga 5 minutos a 13200 rpm.
7. La fase acuosa se pasa a otro tubo. Posteriormente, se agrega 1 volumen de fenol/cloroformo, se agita y se centrifuga por 3 minutos a 13200 rpm.
8. Se pasa la fase acuosa a otro tubo y se añade 1 volumen de cloroformo. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm.
9. La fase acuosa se pasa a otro tubo y se le agrega 1µL de glucógeno y 1 volumen de isopropanol. Se mezcla y se deja precipitar a -20°C por al menos 2 horas.
10. Pasadas las 2 horas se centrifuga 10 minutos a 13200 rpm, se retira absolutamente todo el sobrenadante.
11. Se resuspende el botón en 10µL de TE 10mM.

Reacción de ligación

1. En un tubo eppendorf se agrega: 2 μL de amortiguador de ligasa T4 5X, vector (dependiendo de la concentración), inserto (dependiendo de la concentración), 1 μL de Ligasa T4 HC, la cantidad de agua estéril desionizada necesaria para llevar a 10 μL de volumen final.
2. Se agita un poco y se da un pulso en la centrífuga.
3. Se deja toda la noche a temperatura ambiente.
4. Para transformar en *Streptomyces*, simplemente se utiliza la cantidad necesaria como lo indique el protocolo.
5. Para transformar en *E. coli*, al siguiente día se precipita agregando al mismo tubo de la ligación 1 μL de glucógeno, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
6. Se deja a -20°C , 2 horas.
7. Se centrifuga 10 minutos a 13200 rpm. Se desecha el sobrenadante.
8. El pellet se seca 5 minutos a 50°C y se resuspende en la cantidad necesaria de agua estéril desionizada (5-10 μL).
9. Se transforma como lo indica el protocolo de electroporación en *E. coli*.

12.2 Manipulación de microorganismos

Conjugación entre micelio de *Streptomyces* y *E. coli*

Preparación del micelio

1. Para crecer el micelio vegetativo el volumen adecuado de una preparación densa de esporas se inoculó en 30 mL de LB más sacarosa al 25% suplementado con los antibióticos necesarios.
2. Se creció a 30°C por 16 horas aproximadamente, o hasta observar parte del cultivo al microscopio y verificar la presencia de micelio.
3. Para recuperar el micelio, todo el volumen del cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos, en un rotor JA20 y se retiró el sobrenadante.
4. Se lavó el micelio con 20 mL de sacarosa 10.3% para retirar el resto de los antibióticos.
5. El botón de micelio se resuspendió en 4 mL de medio YT2X.
6. Para dispersar y fragmentar el micelio, éste fue tratado en un homogenizador (TRI-R STIR-R Modelo K41) a una velocidad baja (nivel 4), procurando que la muestra no se calentara.
7. La muestra homogenizada se pasó a un tubo de vidrio.

Preparación de la cepa donadora

8. Se creció un precultivo de la cepa donadora de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene el plásmido a conjugar en *Streptomyces* en 3 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios a 37°C y agitación de 200 rpm, durante toda la noche.
9. Se inocularon 30 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios con todo el volumen del precultivo y se dejó creciendo a 37°C y agitación de 200 rpm.
10. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de entre 0.6 y 0.8, se centrifugó todo el cultivo a 6000 rpm/10 minutos/4°C en un rotor JA20 y se retiró el sobrenadante.
11. Se repitieron los pasos de centrifugación dos veces lavando con un mismo volumen de medio YT2X sin antibióticos; al final el paquete de células se resuspendió en 4-12 mL (dependiendo del número de conjugaciones a realizar) de medio YT2X sin antibióticos.

Conjugación

12. Se agregó el mismo volumen de la cepa donadora de *E. coli* al tubo de vidrio que contiene el micelio preparado y homogenizado (paso 7).

13. Se mezclaron perfectamente y se centrifugaron por 3 minutos a 3500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500 μ L de YT2X.
14. Se hicieron diluciones de 10^{-1} y/o 10^{-2} y se plaquearon en medio MS sólido suplementado con 10mM de $MgCl_2$. Se incubaron las cajas de 16 a 20 horas a 30°C. Posteriormente se agregó a cada caja 1 mL de agua estéril con los antibióticos necesarios para seleccionar las exconjugantes de *Streptomyces* el cual se repartió de manera homogénea en toda la superficie de la caja hasta absorberse completamente.
15. Las cajas se incubaron a 30°C hasta la aparición de las exconjugantes.

Electroporación en *E. coli*

1. Para preparar las células de *E. coli* transformables por electroporación se crece un precultivo de la respectiva cepa en un tubo de ensaye estéril con 3 mL de medio YT2X y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos toda la noche a 37°C.
2. Al día siguiente, se toman 0.3 mL del precultivo para inocular un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio SOB y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos. Se deja crecer hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6.
3. Centrifugar en un tubo estéril durante 10 minutos a 6000 rpm para recuperar las células.
4. Se tira el sobrenadante y las células se lavan con 10 mL de glicerol al 10%. De ser necesario se utiliza el vórtex.
5. Se repiten 2 lavados más, iguales al paso 3 y 4.
6. En el último lavado se dejó una pequeña cantidad de glicerol, y en eso se resuspenden las células.
7. Para transformar se toma una alícuota de 50 μ L. El resto se almacena en alícuotas de la misma cantidad en tubos eppendorf y se guardaron a -70°C hasta su posterior uso.
8. A la alícuota de células se le agrega la cantidad de DNA necesario, se agita con el dedo y se pasa a una celda para electroporación Biolabs, previamente enfriada en hielo.
9. Se da un pulso con el programa Ec1 previamente establecido en el electroporador Biolabs.
10. Después, se agrega 1 mL de medio YT2X a la celda y las células se pasan a un tubo de ensaye estéril para poner a incubar a 37°C durante 1 hora con agitación de 200 rpm.
11. Tras la recuperación de las células, éstas se pasan a un tubo eppendorf estéril y se centrifugan a 6000 rpm por 10 minutos.
12. Se descarta el sobrenadante y el botón de células se resuspende en 0.3 mL de medio YT2X.
13. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y plaquear en cajas de LB más los respectivos antibióticos.

Transformación de *Streptomyces* por protoplastos

1. En un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con resorte conteniendo medio YEME suplementado con 125 μL de MgCl_2 y 1.25 mL de glicina 10% se inocula 50-100 μL de una preparación densa de esporas.
2. Se deja incubar durante 36-40 horas a 30°C y con agitación de 200 rpm.
3. Pasado el tiempo, se recupera el micelio centrifugando 10 minutos a 7000 rpm. Si quedan restos de micelio en el matraz, este se lava con 10 mL de sacarosa 10.3%.
4. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el micelio en 15-20 mL de sacarosa 10.3%, dependiendo de la cantidad de micelio.
5. Una vez resuspendido, se divide en alícuotas de 5 mL en tubos de vidrio para centrifuga estériles.
6. Las alícuotas de 5 mL se centrifugan 10 minutos a 3500 rpm. Se retira todo el sobrenadante y estas alícuotas se pueden almacenar a -20°C hasta su posterior uso.
7. Se suplementa una alícuota de buffer P de 40 mL con lo siguiente: 100 μL de trazas R2, 0.5 mL de KH_2PO_4 (0.8%), 5 mL de $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) y 5 mL de Tric-Cl (3%).
8. El amortiguador P suplementado se filtra con ayuda de un filtro Millipore 0.45 μm , y se coloca en un recipiente estéril.
9. Se preparan 7.5 mg de lisozima en 5 mL de buffer P filtrado. Se revuelve con ayuda del vórtex y se filtra sobre uno de los tubos de vidrio con la alícuota de micelio usando un filtro Millipore 0.45 μm .
10. Se mezcla por inversión suave y se deja incubando por máximo 1 hora. Cada 15 minutos se repite la inversión suave. Para estar seguro de que se han formado los protoplastos, se puede observar un poco de la muestra al microscopio.
11. Habiéndose formado los protoplastos, estos se filtran con ayuda de un filtro para esporas, los protoplastos filtrados se transfieren a un tubo de vidrio y se centrifuga 10 minutos a 3500 rpm y 25°C.
12. Mientras se centrifugan los protoplastos se prepara la solución de polietilenglicol (PEG), disolviendo 0.5 g de PEG en 1.5 mL de buffer P filtrado. Esta mezcla se filtra con un filtro Millipore 0.45 μm .
13. Terminada la centrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspende sin usar vórtex, sólo golpes con el dedo y se le agrega el DNA con el que se transformará, e inmediatamente se agrega 0.6 mL de la solución de PEG con una pipeta Pateur. Con el bulbo se succiona un par de veces y se le agrega 5 mL de amortiguador P filtrado.

14. Se centrifuga 10 minutos a 3500 rpm. Se quita todo el sobrenadante y se resuspende el pellet con los nudillos. Se agregan 0.3 mL de buffer P y se hacen diluciones 10^{-1} y/o 10^{-2} .
15. En cajas de medio R2* suplementado y secado, se ponen 100 μ L de cada dilución, y para dispersar los protoplastos se utilizan 3 mL de agar suave fundido pero no tan caliente. Y se dispersa todo en la superficie de la caja.
16. Incubar de 18 a 20 horas a 30°C y después agregar los antibióticos respectivos mezclándolos en agua y dispersando bien en toda la caja 1 mL de la mezcla.

*Se recomienda preparar las cajas de este medio un día antes o antes de iniciar la transformación, ya que se deben dejar secar por al menos 3 horas en la campana de extracción.

Preparación densa de esporas de *Streptomyces*

1. En cajas Petri suplementadas con extracto de levadura, y con el antibiótico necesario, se inoculan con esporas de manera confluyente y se dejan incubando a 30°C por una semana o hasta ver que ha esporulado perfectamente.
2. A cada caja se le agregan 5 mL de agua estéril y con un asa bacteriológica se raspa la superficie para separar las esporas del micelio.
3. Se recupera el agua y se pasa a un filtro de esporas. De ser necesario se agregan otros 5 mL de agua a la caja y se recuperan bien todas las esporas.
4. Para quedarse con lo más posible de esporas y limpiar el filtro, en el último filtrado se agregan 5 mL de agua estéril.
5. El filtrado se raciona en tubos de vidrio y se centrifuga 10 minutos a 3500 rpm.
6. Se elimina el sobrenadante y se agregan 10 mL de agua para dar un lavado. Se repite el centrifugado.
7. Se descarta el sobrenadante y las esporas se resuspenden en el volumen adecuado de glicerol 20% (0.5-1 mL) y se pasa a un pequeño vial etiquetado. El vial se puede guardar a -20°C.

12.3 Tinción con Azul de Coomassie

1. Preparar las siguientes soluciones:
 - a. Solución stock de Coomassie (1%): Azul de Coomassie R-250 2 g y aforar a 200 mL con agua desionizada. Filtrar y almacenar en frasco cubierto con papel aluminio.
 - b. Solución para teñir: 62.5 mL de la solución stock de Coomassie (1%), 250 mL de metanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.
 - c. Solución para desteñir 1: 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético y aforar a 100 mL con agua desionizada.
 - d. Solución para desteñir 2: 7 mL de ácido acético, 5 mL de metanol y aforar a 100 mL con agua desionizada.
2. Una vez corrido el gel, se pasa a un refractario y se le agrega la solución para teñir, y se deja incubando por media hora con un poco de agitación.
3. Se desecha la solución para teñir y después se hace un lavado rápido con agua destilada. Posteriormente se agrega la solución para desteñir 1, y se deja incubando por media hora con un poco de agitación.
4. Finalmente se retira la solución para desteñir 1, se da un lavado rápido con agua destilada. Se le agrega la solución para desteñir 2 y se deja con un poco de agitación hasta que se diferencien las bandas.