



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad del sistema de restricción de DNA modificado
de *Streptomyces coelicolor* contra la infección de fagos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Tania Verónica Omaña Guzmán



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Servín González

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Omaña
Guzmán
Tania Verónica
5548875489
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
408080756

2. Datos del asesor

Dr.
Luis
Servín
González

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Claudia
Segal
Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Gloria
Soberón
Chávez

3. datos del sinodal 3

Dra.
María del Carmen del Socorro
Gómez
Eichelmann

4. Datos del sinodal 4

Maestra en Ciencias
Gabriela
González
Cerón

5. Datos del trabajo escrito

Actividad del sistema de restricción de DNA modificado de *Streptomyces coelicolor* contra la infección de fagos

79

2015

Dedicatoria

*A mis padres, por todo el apoyo, sus enseñanzas y su amor.
A mis hermanos, por estar siempre conmigo.*

Agradecimientos:

A la UNAM, por haberme dado la mejor formación posible en lo académico y también en otros ámbitos, lo cual me ha permitido crecer y ser mejor persona. Por brindarme los mejores recursos y oportunidades a los que podía aspirar.

Al Dr. Luis Servín González, por permitirme formar parte de su excelente equipo de investigación, por todas sus enseñanzas desde el primer día en que llegué al laboratorio, por estar siempre pendiente de mi trabajo y por tener siempre la mejor disposición para ello. Por su enorme paciencia.

A la M. en C. Gabriela Gonzáles Cerón, por ayudarme en mi trabajo de laboratorio con los mejores consejos y ayudándome a resolver mis dudas. También por la amabilidad que siempre tuvo conmigo. Por las observaciones que realizó para mejorar este trabajo.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez y a su equipo por las observaciones que hicieron a mi trabajo.

A la Dra. Claudia Segal Kischinevsk y a la Dra. María del Carmen del Socorro Gómez Eichelmann por los comentarios y observaciones que le hicieron a este trabajo.

A la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología celular.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el financiamiento a esta tesis a través del proyecto de PAPIIT IN207212

A mis padres, sin ellos nada de esto sería posible y no hay espacio para hacerle justicia a ese agradecimiento ni agradecimiento que le haga justicia a todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Isabel y Valentino por ser geniales, por haberme apoyado siempre, por echarme porras, por hacer de todo el trayecto algo mucho mejor.

A toda mi familia, por que siempre estuvieron al pendiente de mi bienestar.

A todos mis amigos y mis amigas de la prepa y la universidad.

A Arturo.

Todos me han acompañado durante algún periodo de este tiempo y han hecho de mi vida y de mi persona alguien mejor y más feliz.

A todos mis compañeros y mis amigos del laboratorio, por que con ellos la estancia fue mucho mas agradable y divertida, por que son excelentes personas y por que me aconsejaron y a veces me pidieron consejo. Isaí, Daniela, Laurita, Jaqueline, Lalo, Eli, Manuel, Christian, Martí, Kevin, Mauricio, Angie, Montse, Auri, Yersain, Karen.

INDICE:

1. Resumen-----	1-2
2. Introducción-----	3-13
2.1 Generalidades del género <i>Streptomyces</i> .-----	3-4
2.2 Generalidades de los fagos de <i>Streptomyces</i> .-----	4-5
2.3 Sistemas de restricción.-----	5-8
2.4 Función de los sistemas de restricción-----	8-11
2.4.1 Sistemas de restricción como elementos genéticos egoístas-----	9-10
2.4.2 Sistemas de restricción como una defensa celular-----	10-11
2.4.3 Hipótesis de la variación-----	11
2.5 Modificaciones conocidas en el DNA de <i>Streptomyces</i> .-----	11-13
3. Antecedentes-----	14-15
3.1 <i>Streptomyces</i> y los sistemas de restricción metil-específicos--	14-15
4. Justificación-----	16
5. Objetivos-----	17
6. Métodos-----	18-28
6.1 Cepas utilizadas-----	18-19
6.2 Plásmidos utilizados-----	19-20
6.3 Oligonucleótidos utilizados-----	20
6.4 Obtención de fagos con sitios de metilación para M. <i>SacI</i> y/o M. <i>SaM</i> y/o M. <i>SphI</i> y su propagación en cepas que expresan las metilasas.--	21-23
6.4.1 Obtención de fagos-----	21-22
6.4.2 Prueba de sitios de reconocimiento para las metilasas M. <i>SacI</i> , M. <i>SaI</i> y M. <i>SphI</i> en el genoma de los diferentes fagos aislados.-----	22-23
6.4.3 Propagación de fagos en cepas que expresan metilasas.-----	23
6.5 Pruebas de restricción en cepas de <i>Streptomyces lividans</i> y <i>Streptomyces coelicolor</i> .-----	23-24
6.6 Pruebas de metilación del DNA de fagos-----	24
6.7 Pruebas de restricción en <i>S. lividans dnd</i> -----	24-25
6.7.1 Obtención de esporas de <i>S. lividans dnd</i> .-----	24-25
6.7.2 Pruebas de restricción-----	25
6.8 Clonación de los genes <i>saclM</i> , <i>salM</i> y <i>sphM</i> en el plásmido pIJ6902 en <i>Streptomyces lividans</i> 1326.-----	25-27
6.8.1 Obtención de los plásmidos pIJ6902 <i>saclM</i> , pIJ6902 <i>salM</i> , pIJ6902 <i>sphIM</i> .-----	27-28
6.8.2 Obtención de esporas de <i>S. lividans</i> con las construcciones pIJ6902 <i>saclM</i> , pIJ6902 <i>salM</i> y pIJ6902 <i>sphIM</i>).-----	27-28
6.9 Pruebas de infección de fagos aislados en <i>S. coelicolor</i> IB11--	28
7. Resultados-----	29-62
7.1 Obtención de actinofagos de <i>Streptomyces</i> con genomas metilados en sitios de reconocimiento de los sistemas de modificación-restricción <i>SacI</i> , <i>SaI</i> y <i>SphI</i> .-----	29-32
7.1.1 Metilación del DNA de los diferentes fagos-----	32

7.2 Pruebas del efecto de la metilación en la restricción por parte del sistema de restricción de DNA metilado.	32-36
7.2.1 Fagos que muestran un posible efecto de la fosforotioación	36-38
7.3 Pruebas de metilación en el DNA de los fagos.	39-43
7.3.1 Fagos cuyo DNA no fue metilado	40-41
7.3.2 Fagos cuyo DNA sí fue metilado	42-43
7.4 Pruebas de restricción en una cepa de <i>S. coelicolor</i> sin fosforotioación	44-47
7.5 Obtención de cepas con mayor expresión de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI utilizando el promotor inducible P _{tipA} .	47-53
7.6 Comprobación de la necesidad de un receptor glicosilado de los nuevos fagos para infectar.	54
8. Discusión de resultados.	55-62
9. Conclusiones	63
10. Perspectivas	64
11. Bibliografía	65-68
12. Anexos.	69-78

1. RESUMEN

Streptomyces coelicolor es una especie de bacteria Gram-positiva perteneciente a las actinobacterias. Esta especie tiene un sistema de restricción metil-específico, el cual consta de nucleasas que reconocen DNA modificado y lo degradan. Se sabe que los sistemas de modificación-restricción I, II, III así como los sistemas de restricción tipo IV (específicos de DNA modificado) están presentes en un amplio espectro de bacterias. Existen dos teorías que explican la evolución de estos sistemas de restricción: la primera sugiere que se han mantenido en las bacterias debido a que es una forma de protegerse contra DNA foráneo, como el de plásmidos o el de fagos. La otra teoría explica que estos sistemas se han mantenido en las bacterias debido a que han actuado como genes egoístas; esto quiere decir que al establecerse en una célula, impiden que otros se establezcan, además de que impiden que la bacteria los pierda. En el momento en que la bacteria los pierde, muere.

Se han estudiado los sistemas de modificación-restricción en diferentes bacterias, particularmente las de tipo II. En cuanto a los sistemas de tipo IV, su comportamiento también se ha analizado, aunque menos, y los estudios se han centrado particularmente en el comportamiento de las endonucleasas de DNA metilado. En algunos casos, se ha analizado si funcionan efectivamente como un sistema de defensa contra plásmidos o fagos, o si han actuado más bien como genes egoístas. Se han encontrado evidencias de ambas teorías. En *Streptomyces coelicolor* se estudió el comportamiento del sistema de restricción con plásmidos cuyo DNA estaba metilado. Los resultados mostraron que efectivamente, el sistema de restricción actuaba fuertemente contra la entrada de estos plásmidos. No obstante, las condiciones en que los plásmidos fueron metilados e introducidos no fue de una forma que asemejara lo que puede pasar naturalmente. En éste trabajo, estudiamos si el sistema tipo IV de *S. coelicolor* funcionaba efectivamente en contra de la infección de fagos cuyo DNA estuviese metilado en adeninas y citosinas, intentando recrear algo cercano a como podría ocurrir naturalmente en el suelo. Para ello aislamos fagos directamente de

muestras de suelo, e intentamos metilarlos en sitios de reconocimiento para metilasas que se encuentran en especies del género *Streptomyces*, propagándolos en cepas de *Streptomyces lividans* que las expresaban. Después se hicieron pruebas de infección en cepas de *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces coelicolor* IB61 (una cepa mutante múltiple carente de varias nucleasas de tipo IV) y *Streptomyces lividans* (que en forma natural carece de las nucleasas de tipo IV) y contamos eficiencia de la infección de los fagos en cada cepa, esperando que la primera fuera mucho menos permisiva que las otras dos. Además de esto, comprobamos si el DNA de cada fago se había metilado efectivamente. Para asegurar que las metilasas se expresaban de manera fuerte, hicimos construcciones para expresar las metilasas bajo el promotor fuerte inducible por tiosptreptón *P_{tipA}*. Interesantemente, aún después de propagar los fagos en las cepas con estas construcciones, el DNA de la mayoría de los fagos no se metiló. Por otro lado, las pruebas de restricción mostraron que había poca o ninguna restricción al DNA modificado, y que incluso, la poca restricción que se veía podía deberse a otra modificación causada por *S. lividans*: la fosforotioación del DNA. Para comprobar si esto sucedía, hicimos una mutante de *S. lividans* que carecía del cluster *dndA-E*, responsable de esta modificación y comprobamos que efectivamente el sistema de restricción podía reconocerla.

Todas estas pruebas se hicieron también con el fago Φ C31, el más estudiado de las actinobacterias. Finalmente, también comprobamos si los fagos que aislamos compartían con Φ C31 la necesidad de un receptor glicosilado para poder infectar a las células, así como sensibilidad al sistema Pgl (Phage grow limitation) de limitación, encontrando que ninguno de los fagos aislados compartían estas características.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades del género *Streptomyces*

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas que pertenecen al orden de los *Actinomycetales*, caracterizados por su alto contenido de guanina y citosina en el DNA (alrededor del 70%) (Keiser *et al.*, 2000; Hopwood, 2006). Los *Actinomycetales*, a su vez, están dentro de la clase *Actinobacteria* (Anderson y Wellington, 2001).

El género *Streptomyces* se define por características quimiotaxonómicas, fenotípicas, y principalmente por homologías en el RNA ribosomal 16S (Keiser *et al.*, 2000; Anderson y Wellington, 2001). Por otra parte, otra característica del género es su ciclo de vida complejo; producen un sustrato ramificado y un micelio aéreo. Las hifas carecen de paredes transversales durante la etapa vegetativa en la cual el crecimiento se da en el ápice de las hifas al mismo tiempo que se ramifican. Conforme la colonia envejece, el micelio aéreo se desarrolla y se transforma en cadenas de esporas mediante la formación de paredes transversales. A esto le sigue la separación de células individuales en esporas (Anderson y Wellington, 2001). Estas esporas están semi- inactivas, pueden durar durante largos periodos de tiempo en el suelo, son resistentes a condiciones con poca agua y nutrientes.

Debido a la producción de enzimas extracelulares los estreptomicetos son importantes para la biodegradación del suelo mediante el reciclaje de nutrientes (Keiser *et al.* 2000). Además producen grandes cantidades de metabolitos secundarios bioactivos tales como antifúngicos, antivirales, antitumorales, anti-hipertensivos, inmunosupresores y antibióticos. Actualmente, 80% de los antibióticos conocidos se originaron de las especies de éste genero (Lima-

Procópio *et. al*, 2012). Hasta el 2002 se estimaban 8700 antibióticos descubiertos producidos por especies de *Streptomyces* (Hopwood, 2006).

El arreglo del material genético de este género es, al menos en la mayoría, un cromosoma lineal (Keiser, et al. 2000). Su tamaño es de 8-9 Mb y contiene una región central (“core”) con los genes esenciales y a los extremos contiene otros genes adaptativos (Hopwood, 2006). Una característica particular del género que en su genoma suele haber grandes deleciones hasta de 1 Mb y amplificaciones en su cromosoma con una frecuencia alta de manera espontánea.

Actualmente se han secuenciado completamente los genomas de *S. catleya*, *S. scabiei*, *S. binchengensis*, *S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. coelicolor* (Lima Procópio *et. al*, 2012).

Streptomyces coelicolor A3(2) es una especie representativa del género *Streptomyces*, es una de las más estudiadas y la más conocida genéticamente. Su cromosoma mide alrededor de 8.7 Mb. Se han predicho 7825 genes con más de 20 grupos de genes que codifican para metabolitos secundarios (Bentley *et. al.*, 2002).

2.2 Generalidades de los fagos de *Streptomyces*

La morfología de la mayoría de los fagos de *Streptomyces* consta de una cabeza polihédrica, y una cola larga, sin ninguna estructura más compleja. Su genoma es una cadena doble de DNA (Lomovskaya *et. al.*, 1980). Pueden ser tanto líticos como atemperados y pueden tener un rango de hospederos muy amplio o muy específico, incluso fuera del género. Se ha observado que estos fagos están mayormente activos en esporas que ya contienen tubos germinales ó en micelio joven. Pueden identificarse por las placas que forman en agar suave, sin embargo tanto fagos líticos como fagos temperados pueden formar placas turbias, por lo que puede resultar ambiguo reconocer estos tipos de fagos por medio de las placas (Kesier *et. al.* 2000).

Los fagos de *Streptomyces* se encuentran en el hábitat natural de sus hospederos, es decir, mayormente en el suelo, y de los que han sido aislados. Los fagos que se han aislado tienen un amplio rango de hospederos.

ΦC31 es el fago de *Streptomyces* más estudiado (Lomovskaya, 1980), además de que su genoma está completamente secuenciado. A partir de este fago se han desarrollado diferentes herramientas genéticas para el estudio de *Streptomyces*, como vectores de clonación, vectores de integración sitio-específicos y cósmidos (Smith et. al., 1999).

Los fagos de *Streptomyces* se han utilizado en métodos de análisis tradicionales, como estudios de adsorción, curvas de crecimiento, aislamiento de fenotipos mutantes, transducción, mutagénesis dirigida, para estudiar los sistemas de modificación-restricción de su hospedero (como en el presente trabajo) y otros mecanismos de “resistencia”, como el sistema de limitación de crecimiento del fago (Pgl por sus siglas en inglés: phage growth limitation). Este último mecanismo se ha estudiado en *Streptomyces coelicolor*, ya que le confiere resistencia al fago ΦC31.

2.3 Sistemas de restricción:

El fenómeno de modificación-restricción fue descubierto en la década de los 50s y su explicación molecular se encontró 10 años después. Ahora se sabe que esta restricción se debe a la degradación de DNA (Krüger y Bickle, 1993).

Típicamente, un sistema de modificación-restricción (sistema R-M) se compone de enzimas con actividades distintas. Una de estas enzimas es una endonucleasa de restricción (REasa), la cual reconoce una secuencia de corte específica en el DNA. La otra enzima es una metiltransferasa (MTasa) que modifica al DNA en adeninas o citosinas dentro de la misma secuencia específica, por lo que protege

al DNA de la escisión. Las REasas reconocen DNA foráneo (fagos o plásmidos) que no ha sido modificado por la MTasa, mientras ésta modifica el DNA celular poco después de la replicación protegiéndolo así de la actividad de la REasa (Tock y Dryden, 2005).

Las enzimas DNA MTasa catalizan la transferencia de grupos metilo S-adenosil-L-metionina (SAM) al DNA (Bheemanaik, 2006; Gormley, 2005). La metilación puede ocurrir en el N⁴ o C⁵ de las citosinas o en el N⁶ de las adeninas (figura 1) (Bheemanaik, 2006).

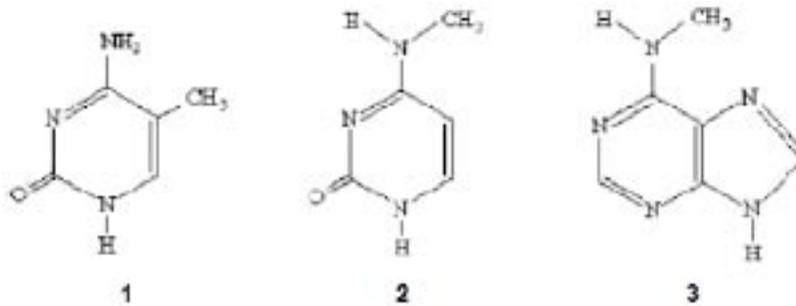


Figura 1: estructuras moleculares de bases nitrogenadas modificadas con un grupo metilo. 1: C⁵-metilcitosina. 2: N⁴-metilcitosina. 3: N⁶-metiladenina (Buryanov, et. al., 2005).

Por otro lado, las REasas requieren generalmente Mg²⁺ como cofactor, aunque pueden requerir de algunos otros, como ATP (Gormley, 2005).

Hay cuatro tipos de sistemas R-M, clasificados de acuerdo a las características estructurales de las enzimas, a los cofactores que utilizan y a las secuencias de reconocimiento dentro del DNA (Bickle y Krüger, 1993):

- Enzimas de restricción-modificación tipo I: las enzimas son complejos hetero-oligoméricos que se componen por dos subunidades de REasa, una subunidad para reconocer la secuencia de DNA, y dos subunidades de MTasa. La actividad de estos complejos depende del estado de metilación del DNA. Las MTasas utilizan SAM para metilar las adeninas

en la posición N⁶. Las REasas requieren SAM, ATP y Mg²⁺. El corte de DNA se da fuera de la secuencia de reconocimiento (Tock y Dryden, 2005).

- Enzimas de restricción modificación tipo II: estos sistemas generalmente están compuestos por una MTasa y una REasa separadas. La MTasa contiene varios motivos conservados y utiliza SAM como donador de grupos metilo. La REasa tiene una secuencia de aminoácidos muy variable y requiere de Mg²⁺ como cofactor. Ambas enzimas reconocen la misma secuencia, la cual generalmente es un palíndrome y su tamaño varía de 4 a 8 pares de bases. El corte que efectúa la REasa se da adyacente o entre la secuencia de reconocimiento (Tock y Dryden, 2005), en ambas hebras.
- Enzimas de restricción modificación tipo III: estas enzimas también forman hetero-oligómeros, los cuales contienen una subunidad de modificación y una de restricción; éstas sólo se activan al formar un complejo uniéndose a otro oligómero idéntico. La MTasa requiere SAM mientras que la REasa requiere ATP y Mg²⁺ (Tock y Dryden, 2005).
- Enzimas de restricción-modificación tipo IV: estos sistemas solo contienen enzimas REasas, las cuales reconocen secuencias de DNA modificado, ya sea por metilación, hidroximetilación o glucosil-hidroximetilación. La enzima más estudiada de este tipo, proveniente de *E. coli* es McrBC, la cual requiere Mg²⁺ y GTP. Esta enzima reconoce dos copias de una secuencia de dinucleótidos: una purina seguida de una citosina metilada en N⁴ o C⁵ separadas por 40-3000 nucleótidos. (Tock y Dryden, 2005).

El descubrimiento de las enzimas de restricción dependientes de DNA modificado (metilado, hidroximetilado o glucosil-hidroximetilado) es aún más reciente que el

de los otros tipos. Como se mencionó, estas enzimas reconocen y cortan el DNA modificado, y por lo tanto, no contienen una enzima de modificación asociada (Krüger y Bickle, 1993). Debido a esta diferencia, estos sistemas también han sido llamados sistemas dependientes de DNA modificado (MIDSs) (Bair y Black, 2007). En *E. coli* existen tres sistemas de este tipo: McrA, McrBC y Mrr, Además se han encontrado en otras bacterias como *Diplococcus pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii* y son comunes dentro del género *Streptomyces*, como en las especies *Streptomyces avermitilis* (MacNeil, 1988) y *Streptomyces coelicolor* (González-Cerón *et al.*, 2009).

2.4 Función de los sistemas de restricción

Los sistemas de restricción están presentes en un amplio rango de las especies de procariotes conocidas (Zheng, *et.al.* 2010; Gormley 2005). Se han detectado mas de 3000 sistemas de restricción- modificación en más de un cuarto de las 10000 o más cepas examinadas de bacterias. Se distribuyen no solo en las bacterias, sino también dentro de las arqueas. Incluso las bacterias con los genomas mas pequeños, como los micoplasmas, contienen estos sistemas (Blumenthal y Cheng, 2002). La prevalencia de los sistemas R-M en estos organismos indica que participan en más de una función (Tock y Dryden, 2005). Existen tres hipótesis para explicar la preservación de estos sistemas, las cuales son contrastantes pero no excluyentes entre sí (Kobayashi, 2001):

- Los sistemas R-M actúan como elementos genéticos egoístas (Tock y Dryden, 2005; Blumenthal y Cheng, 2002; Kobashi, 2001; Fakuda, *et. al.*, 2008).
- Los sistemas de restricción participan en la defensa celular (González-Cerón, *et. al.*, 2009; Tock y Dryden, 2005; Rifat, *et. al.*, 2008; Blumenthal y Cheng, 2002; Kobayashi, 2001).

- Hipótesis de la variación (Kobayashi, 2001).

2.4.1 Sistemas de restricción como elementos genéticos egoístas

Se ha observado que algunos sistemas R-M permanecen en la mediante mecanismos que les permite mantenerse en las poblaciones de bacterias, los cuales pueden provocar consecuencias perjudiciales para su hospedero. Esto se observa cuando un plásmido que contiene uno de estos sistemas no puede ser desplazado fácilmente por otro plásmido que contenga otro complejo R-M. Esto se observa también en el cromosoma bacteriano cuando un fragmento con uno de estos sistemas no puede reemplazarse por un fragmento homólogo. La manifestación de esto es la muerte celular cuando el elemento R-M se pierde (Kobayashi, 2001). La muerte celular se da mediante un mecanismo llamado “muerte post-segregacional” o “adicción genética” (Fukuda, 2008). Esto ocurre cuando un complejo génico de un sistema R-M se pierde debido a la interacción con un complejo R-M competidor. Al suceder esto, los descendientes de la célula tendrán cada vez menos cantidad de la proteína MTasa (o proteína de modificación) hasta que, eventualmente, la capacidad de esta enzima de modificar y proteger los sitios de reconocimiento en los cromosomas que se sintetizan nuevamente con cada replicación será deficiente, de tal manera que la enzima de restricción podrá cortar el DNA cromosomal provocando la muerte celular (figura 2a). Aunque la cantidad de REasa también va disminuyendo, es capaz de provocar la muerte celular con pocas o una sola ruptura. En cambio, los cromosomas deben de estar modificados en cientos de sitios de reconocimiento para estar efectivamente protegidos. Se les llama genes egoístas debido a este comportamiento en el que el sistema R-M provocará la muerte celular si es eliminado por la célula. Asimismo, la competencia de este sistema con otros elementos genéticos incompatibles sirve para mantener su presencia en la población de células clonales (Kobayashi, 2001).

Hay evidencia de que REasas pertenecientes a los sistemas de restricción específicos de DNA modificado (por ejemplo, McrBC y sus homólogos) compiten con los sistemas que metilan DNA. Cuando estos últimos entran a la célula y promueven la metilación del DNA, McrBC reconoce esta modificación y degrada el DNA (Figura 2b) (Kobayashi, 2001). McrBC puede proteger a la célula de DNA metilado de plásmidos o fagos. Sin embargo, estos no son restringidos fuertemente por esta REasa.

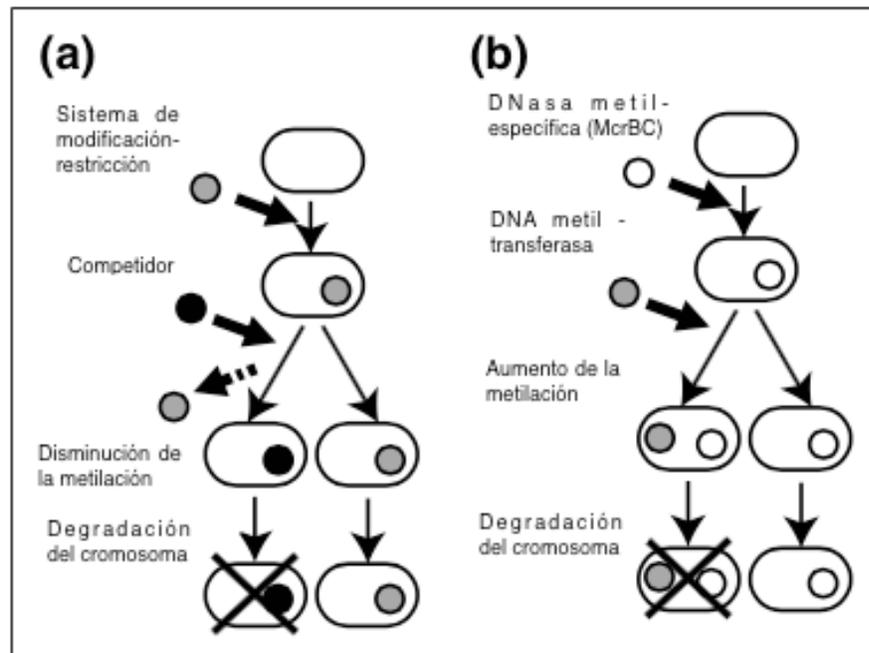


Figura 2: a) Mecanismo de muerte post-segregacional o adición genética . b) Competición de una enzima REasa específica de DNA modificado y un sistema de metilación del DNA (modificado de Fukuda, 2008).

2.4.2 Sistemas de restricción como una defensa celular:

Las REasas pueden cortar DNA que carezca de una modificación realizada por una metilasa. Este DNA puede ser de un plásmido o proveniente de un fago. Existen numerosos ejemplos que apoyan esta hipótesis en sistemas de metilación-restricción de tipo I, II y III. Se cree que éstos sistemas se han mantenido en las bacterias como una herramienta de defensa en contra de la infección de DNA

foráneo (Kobayashi, 2001). Este proceso se observa en la figura 3.

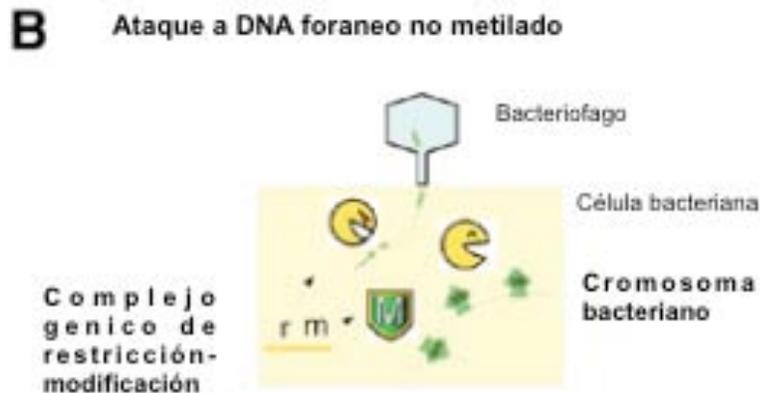


Figura 3: se muestra la actividad de los sistemas R-M como defensa celular contra el DNA foráneo: la MTasa metila el DNA bacteriano, protegiéndolo de la actividad de la REasa, que en cambio puede reconocer DNA foráneo no metilado y degradarlo (modificado de Kobayashi, 2001) .

2.4.3 Hipótesis de la variación

Esta hipótesis propone que los sistemas MR ayudan a generar diversidad entre las bacterias, promoviendo la recombinación homóloga (Kobayashi, 2001).

2.5 Modificaciones conocidas en el DNA en *Streptomyces*.

Metilación

Se han encontrado en *Streptomyces* diferentes sistemas de metilación-restricción de tipo II, como *Sal* I, *Sph* I y *Sac* I, entre otros (Alvarez *et. al.*, 1995), de los cuales al menos éstos ya han sido clonados en *E. coli*. Estos sistemas de modificación-restricción fueron encontrados en *Streptomyces albus*, *Streptomyces phaeochromogenes* y *Streptomyces achromogenes*, respectivamente.

Se ha observado que la metilasa *Sal* I protege al DNA genómico metilando las adeninas que se encuentran en la secuencia de reconocimiento 5'-GTCGAC-3'

(Rodicio y Chater, 1988). La modificación produce que ésta secuencia cambie a GTCGm6AC (Rodicio et. al., 1994).

Por otro lado, la secuencia de reconocimiento del sistema M-R Sac I reconoce la secuencia 5'-GAGCTC-3'. La secuencia de aminoácidos de la metilasa indica que contiene motivos característicos de las metilasas que agregan grupos metilo en el C5 de la citosina, obteniendo una C⁵-metilcitosina. De las dos citosinas en la secuencia de reconocimiento, solamente se metila la primera en cada cadena (5'-GAGmCTC-3') (Xu, 1998).

Sph I reconoce la secuencia 5'-GCATGC-3. La base específica que modifica la metilasa aún no ha sido determinada de manera experimental, pero estudios sugieren que metila N⁶-adeninas. Adicionalmente, la metilasa M.SphI muestra homología de secuencias con metilasas de adeninas (Guthrie, 1996).

Fosforotioación

S. lividans presenta un sistema de modificación del DNA, el cual no está relacionado con la metilación. Inicialmente se sabía que esta modificación lo hacía susceptible al rompimiento de doble cadena por escisión oxidativa (Kieser et. al., 2000; Zhou, 2004) debida al perácido Tris producido en el buffer durante la electroforesis de campo pulsado (Liu, et. al. 2010; Deng et. al., 2004). Al rededor de 1/6000 grupos fosfato en el DNA genómico contienen ésta modificación (Xu, et. al., 2009).

Esta modificación con azufre en el esqueleto de DNA, llamada fosforotioación, ocurre de manera específica entre dos nucleótidos de guanina dentro de ésta especie (Xu, et. al., 2009). La reacción consiste en intercambiar un oxígeno del esqueleto de DNA por un azufre (donado por una cisteína). De esta forma se forman dinucleótidos fosforotioados, y quedan con una configuración R (figura 4). Por ello se dice que la modificación también es estereoselectiva (Eckstein, 2007).

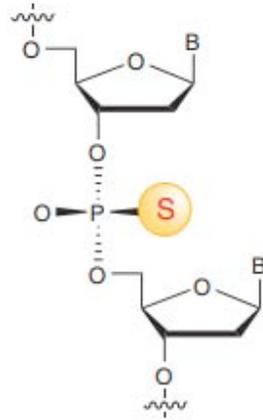


Figura 4: estructura molecular de un dinucleótido fosforotioado (con un azufre en lugar de un oxígeno unido al grupo fosfato del esqueleto del DNA) en su conformación R. (Ekstein, 2007).

Esta modificación se lleva a cabo por el grupo de genes *dnd*, el cual tiene 5 marcos de lectura abiertos *dndA-E*. (Xu, et. al., 2009) y se localizan en la isla genómica de 93 kb SLG. (Liu, et. al. 2010), la cual no parece tener una REasa emparentada. Existen mutantes de *S. lividans* que carecen de esta modificación (Dnd-) porque han perdido la isla genómica.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Streptomyces* y los sistemas de restricción metil-específicos.

Los sistemas de restricción tipo II se encuentran presentes en muchas especies del género *Streptomyces*. De igual manera, en este género se encuentran presentes los sistemas de restricción específicos de DNA modificado como se mencionó anteriormente (Kieser, et. al., 2000).

Se encontró que *S. avermitilis* restringe la entrada de DNA de plásmidos provenientes de una cepa de *E. coli* que contenía los sistemas de modificación de DNA Dam (metila adeninas en la posición N6 dentro de la secuencia GATC) y Dcm (metila la segunda citosina en la secuencia CCA/TGG en la posición C5). También se sabe que la magnitud de la restricción es proporcional al número de bases metiladas presentes en la molécula de DNA. Las bases que son reconocidas por este sistema de restricción son tanto 5- metilcitosina (mC) como N⁶-metiladenina, (mA) y aparentemente no tiene una secuencia específica (MacNeil, 1988). Este sistema de restricción es más fuerte que el sistema de *E. coli*.

Otras especies de *Streptomyces* fueron estudiadas por Mac Neil (1988), muchas de las cuales mostraron restricción, pero solo hacia de una de las bases modificadas.

El grupo del Dr. Luis Servín ha estudiado a detalle la presencia de un sistema de restricción metil-específico presente en *Streptomyces coelicolor*. Estos estudios han revelado que esta especie restringe fuertemente DNA proveniente de cepas de *E. coli* con los sistemas Dam, Dcm y Hsd (metila la segunda adenina en la posición N6 dentro de la secuencia AACNNNNNNGTGC), pero no el DNA proveniente de una cepa mutante que no metila DNA. Esto implica que este sistema también reconoce las modificaciones en 5-metilcitosina (mC) y N⁶-metiladenina. También se observó que la restricción actúa (disminuyendo la

eficiencia de transformación al menos 100 veces) con DNA de plásmidos modificado *in vitro* por metilasas como *Msp* I, *Sss* I, *Hha* I, *Alu* I etc. Asimismo, se encontró que la cantidad de restricción parece no estar relacionada con el número de bases modificadas (González-Cerón, et. al., 2009).

Esta investigación sugiere que estos sistemas de restricción actúan mediante la suma de actividades de más de una REasa, que varían en especificidad y fuerza (González-Cerón, et. al., 2009).

Aunque los genomas de *S. coelicolor* A3(2) y *S. lividans* presentan un alto grado de sintenia y comparten un 99.5% de identidad en la secuencia del rRNA 16S, *S. lividans* es preferido como hospedero para la expresión de proteínas heterólogas. Una de los motivos es que presenta un sistema R-M mucho más débil y es mucho más permisivo para la introducción de DNA (Jayapal, et. al., 2007). Por ello, se le a usado también como hospedero de DNA proveniente de *E. coli* K12 (Liu, et. al. 2010).

4. JUSTIFICACIÓN:

Los estudios de especies pertenecientes al género *Streptomyces* han cobrado gran importancia durante las últimas décadas, ya que son fácilmente manipulables genéticamente. No obstante, se ha demostrado que en algunas especies como *S. avermitilis* y *S. coelicolor* (entre otras) existen sistemas de modificación-restricción. A causa de este tipo de sistemas, la manipulación genética puede dificultarse, debido a que una de las posibles funciones de éstos es defenderse de DNA foráneo (González-Cerón, 2009). Por esto es importante conocer la función del sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor*, ya que, además, ésta es la especie más estudiada del género.

Por otro lado, existen diferentes propuestas sobre la evolución de estos sistemas de modificación-restricción. Aquellos que proponen que es una defensa de la célula sugieren que hay una co-evolución de mecanismos de restricción y anti-restricción entre fagos y bacterias (Bair et. al., 2007). A su vez, quienes defienden la postura de que han evolucionado como elementos genéticos egoístas proponen que los sistemas R-M a veces se comportan como unidades discretas de “vida” (como virus y transposones) (Kobayashi, 2001). Hay evidencias que prueban una teoría u otra tanto para plásmidos como para fagos. Sin embargo, nunca se habían hecho pruebas para observar si el sistema R-M en *S. coelicolor* funciona efectivamente contra la infección de fagos.

5. OBJETIVOS:

- Objetivo general: Comprobar si el sistema de restricción tipo IV de *S. coelicolor* funciona eficientemente como un sistema defensivo en contra de la infección de fagos con DNA metilado.

- Objetivos particulares:
 - Aislar fagos de *Streptomyces* cuyos genomas contengan múltiples sitios de reconocimiento para las metilasas M.Sac I, M.Sal I y M.SphI.
 - Propagar los fagos en cepas que expresen las metilasas M.Sac I, M.Sal I y M.Sph I, y hacer pruebas de restricción en *S. coelicolor* M145 e IB61 así como en *S. lividans* 1326.
 - Determinar el efecto de la fosforotioación del DNA llevada a cabo por *S. lividans* sobre la restricción de los fagos por el sistema tipo IV de *S. coelicolor*.
 - Obtener cepas de *S. lividans* con los genes *sacIM*, *salM* y *sphM* clonados bajo el control transcripcional del promotor inducible P_{tipA} y comprobar la metilación de DNA de fagos propagados en estas cepas.

6. METODOS:

6.1 Cepas utilizadas:

En este trabajo se utilizaron cepas de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces coelicolor* para realizar en ellas pruebas de restricción de diferentes fagos.

Asimismo, se utilizaron cepas de *S. lividans* que expresan los genes de las metilasas M.SacI, M.SalI o M.SphI ya sea bajo el control de su propio promotor (o bajo el control del promotor fuerte inducible por tioestrepton P_{tipA}).

También se utilizaron cepas de *Escherichia coli* para la clonación, clonación de diferentes fragmentos, propagación de plásmidos y la conjugación con *S. lividans*.

La descripción de cada una de estas cepas se incluye a continuación en la Tabla 1.

CEPA	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
<i>S. lividans</i> 1326	Silvestre	Kieser et. al 2000.
<i>S. lividans</i> IB91	Carece del cluster <i>dndA-E</i>	Este trabajo.
1326sacM	Expresa la metilasa SacIM bajo su propio promotor.	Martínez, A., et al. Datos no publicados.
1326 saIM	Expresa la metilasa SaIM bajo su propio promotor.	Martínez, A., et al. Datos no publicados.
1326sphM	Expresa la metilasa SphIM bajo su propio promotor.	Martínez, A., et al. Datos no publicados.
1326pIJsacM	Expresa la metilasa SacIM bajo el promotor P_{tipA} .	Este trabajo
1326pIJsaiM	Expresa la metilasa SaIM bajo el promotor P_{tipA} .	Este trabajo
1326pliJsphIM	Expresa la metilasa SphIM bajo el promotor P_{tipA} .	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> M145	Silvestre	Bentley, S. 2002.
<i>S. coelicolor</i> IB61	Δ SCO4631, Δ SCO1423, Δ SCO2863, Δ SCO4213, Δ SCO3261-SCO3262, Δ SCO5330, Δ SCO5333.	Laboratorio del Dr. Servín. Datos no publicados

<i>E. coli</i> DH5 α	F- endAI hsdRJ7 (r-, mit) supE44 thi-J ArecAI gyrA96 relAI deoR A(lacZYA- argF)- U169 480dlacZAM15	Grant, 1990.
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Contiene un plásmido conjugativo para transferir plásmidos por conjugación a <i>Streptomyces</i> . Dam-13::Tn9, dcm-6, hsd-M. Cloran ^R , Kan ^R .	McNeil, et. al., 1992.

Tabla 1: Cepas de *Streptomyces* y *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

6.2 Plásmidos utilizados:

Los plásmidos que se usaron para realizar construcciones y hacer clonaciones en *S. lividans* 1326 se enlistan en la tabla 2.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pMS81	Vector replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i> . Hgro ^R	Gregory, et al., 2003
pBluescript IISK+	Vector replicativo de clonación para <i>E. coli</i> . Amp ^R , gen reportero lacZ, Ori f1.	Strtagene, La Jolla, CA, USA.
pUC18	Amp ^R , gen reportero lacZ. Vector replicativo en <i>E. coli</i> .	Norrandar et al., 1983.
plJ6902	Vector de expresión integrativo para <i>Streptomyces</i> y replicativo en <i>E. coli</i> . Promotor PtipA inducible por thioestrepton, Apra ^R , sitio att de Φ C31.	Huang, et. al., 2005.
pTG1	Gen <i>sacIM</i> clonado en el vector pBluescriptII SK+.	Este trabajo
pTG2	Gen <i>salIM</i> clonado en el vector pBluescriptII SK+.	Este trabajo
pTG3	Gen <i>sphIM</i> clonado en el vector pUC18.	Este trabajo
pTG4	Gen <i>sacIM</i> clonado en el vector plJ6902 bajo el promotor PtipA.	Este trabajo
pTG5	Gen <i>salIM</i> clonado en el vector plJ6902 bajo el promotor PtipA.	Este trabajo
pTG6	Gen <i>sphIM</i> clonado en el vector plJ6902 bajo el promotor PtipA.	Este trabajo

pMS81+sco4631	Gen para la nucleasa metil-especifica SCO4631 clonada en el vector pMS81.	Laboratorio del Dr. Servín. Datos no publicados.
---------------	---	--

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

6.3 Oligonucleótidos utilizados:

Se usaron oligonucleótidos para realizar construcciones y para verificar la presencia de la región *dnd* en *S. lividans* 1326. (Tabla 3).

Nombre	Secuencia	Referencia
Lp1F (forward)	5' ATGGCGTTCACGGACTGG 3'	Zhou, 2004.
Ep1R (reverse)	5' CATCCACGACTGGGTCTACG 3'	Zhou, 2004.
SacIMHNUp (forward)	5' CCAAGCTT <u>CATATGA</u> ACCATGAGCTTCCTGTG A 3'	Laboratorio del Dr. Servín. Datos no publicados.
SacIMERIDown (reverse)	5' CGGAATTCTACGCCTTCCTCAAACCTG 3'	Laboratorio del Dr. Servín. Datos no publicados.
SalIMBHINup (forward)	CGGGATCCATATGCATAGCGAGGCGAGAGAG	Este trabajo
SALI-DOWN (reverse)	GACGAATTCAACACGAATGGCTAGGTTGG	Laboratorio del Dr. Servín. Datos no publicados.
SphIMXbaINup (forward)	CGTCTAGACATATGAATGACCGGATGCCCTGG	Este trabajo
SphIMEdown (reverse)	CGGAATTCGAATCGAGCCGACCCGTCT	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los sitios relevantes para la clonación se muestran subrayados (*NdeI*) o en itálicas (*EcoRI*).

6.4 Obtención de fagos con sitios de metilación para M.SacI y/o M.SaM y/o M.SphI y su propagación en cepas que expresan las metilasas.

6.4.1 Obtención de fagos.

Se analizaron 8 muestras de diferentes suelos (cada una conteniendo 10 g de tierra) y, mediante el protocolo para el aislamiento de fagos nuevos de *Streptomyces* (ver protocolo 1), lograron aislarse 12 nuevos fagos propagados en esporas de *S. lividans* 1326 (tabla 4). Se hicieron ensayos de placa (protocolo 2) mezclando 20 μ L de estas esporas con 100 μ L de diferentes diluciones de una suspensión de fagos en Buffer SM (ver anexo) obtenidos anteriormente y 2.5 ml de medio SNA (ver Anexo), y se plaquearon en una caja de Petri con medio DNA (ver Anexo) enriquecido con nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) 10mM, glucosa al 0.5% y sulfato de magnesio (MgSO_4) 10 mM . Debido a que en algunas muestras de tierra se encontró más de un tipo de placa diferente de fago, éstas se aislaron (protocolo 3) picando cada placa distinta con una pipeta Pasteur y dejándola en 1 ml de Buffer SM durante dos horas a temperatura ambiente, para después hacer diluciones 1:10, volver a hacer ensayos de placa, hasta obtener cajas con placas de una morfología única. De estas cajas se prepararon “stocks” de fagos con un título alto (protocolo 4), y se les hicieron ensayos de placa para obtener el título exacto de cada “stock”.

Nombre del fago	Muestra y sitio de la que se aisló.	Referencia	Descripción de las placas formadas en <i>S. lividans</i> 1326.
	Cuernavaca	Este trabajo.	Placas grandes y claras.
	Cuernavaca	Este trabajo.	Placas pequeñas y claras.
	Cd. Nezahualcoyotl	Este trabajo.	Placas grandes y turbias.
	Cd. Nezahualcoyotl	Este trabajo.	Placas pequeñas y claras
T01	Xochimilco	Este trabajo.	Placas grandes formando círculos concéntricos.

T02	Xochimilco	Este trabajo.	Placas pequeñas y claras.
	Xochimilco	Este trabajo.	Placas grandes y turbias
T03	Ciudad Universitaria	Este trabajo.	Placas grandes y turbias
T04	Ciudad Universitaria	Este trabajo.	Placas pequeñas y claras.
	Ciudad Universitaria	Este trabajo.	Placas pequeñas y turbias.
	Venustiano Carranza	Este trabajo.	Placas grandes y turbias.
	Venustiano Carranza	Este trabajo	Placas grandes y claras.
ΦC31			Placas grandes y claras.

Tabla 4: Fagos utilizados en este trabajo.

6.4.2 Prueba de sitios de reconocimiento para las metilasas *M.SacI*, *M.SalI* y *M.SphI* en el genoma de los diferentes fagos aislados.

Una vez obtenidos los “stocks” de cada fago, se hizo una purificación del DNA cada uno (protocolo 5), a partir de 6 cajas con fagos propagados en *S. lividans* 1326 en las que se observaran placas semiconfluentes (en donde hubiera la mayor cantidad de fagos posible). Después de haber obtenido el DNA de cada tipo de fago, este se resuspendió en un volumen mínimo de TE (ver anexo) y se cuantificó en el espectrofotómetro. Una vez cuantificado, se hicieron digestiones de cada DNA con las enzimas de restricción *SacI*, *SalI* y *SphI* de (Invitrogen®), dejándolas a 37°C toda la noche para después correr el DNA digerido en un gel de agarosa al 0.8% y teñirlo con bromuro de etidio.

Se seleccionaron los “stocks” de fagos que tuvieran alguno de los sitios de metilación previamente mencionados y que fueran más estables al almacenarse a 4°C (es decir, que conservaran su título durante el almacenamiento).

6.4.3 Propagación de fagos en cepas que expresan metilasas.

Se prepararon “stocks” de fagos con título alto (protocolo 4) usando esporas de *S. lividans* 1326saclM, 1326saIM o 1326sphIM, según los sitios de reconocimiento previamente detectados por las enzimas de restricción para metilar el DNA; aquellos fagos cuyo DNA fue digerido con *SaI*, se propagaron en la cepa con la metilasa correspondiente, los que se digirieron con *Sacl* se propagaron en la cepa con la metilasa *SaclM* y así sucesivamente. La propagación se realizó dos veces para asegurar la metilación del DNA.

6.5 Pruebas de restricción en cepas de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces coelicolor*.

Después de la obtención de los “stocks” de fagos propagados en las cepas que expresan las metilasas, se asumió que estos ya tendrían su DNA metilado en los sitios de reconocimiento. Por ello, se procedió a hacer ensayos de placa de cada stock en las cepas de *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61. Como control se utilizaron también las suspensiones de fagos sin metilar.

Cada fago, tanto el “stock” silvestre, como los obtenidos de cepas con expresión de metilasas, fueron propagados en *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61. Se hizo un conteo de las placas en las cajas donde podían verse y contarse de manera individual. Se registraron estos conteos según el fago, la metilación y la cepa. También se tuvo en cuenta la dilución a la que correspondía cada conteo para así obtener el título con el que el fago había infectado cada cepa.

Este experimento se hizo por triplicado, y con los tres resultados de cada prueba diferente se obtuvo un promedio. A partir de este promedio se pudieron sacar las relaciones entre los títulos de los fagos metilados entre las cepas de *S. coelicolor*

M145/ *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* IB61/*S. lividans* 1326, así como las diferencias de éstas y las relaciones en *S. coelicolor* M145/ *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* IB61/*S. lividans* 1326 en los títulos con fagos no metilados.

6.6 Pruebas de metilación del DNA de fagos

Estas pruebas se hicieron para verificar si el DNA de los fagos propagados en las cepas que expresan las metilasas estaban efectivamente metilados. Para ello se purificó el DNA, se resuspendió en TE y se cuantificó con el espectrofotómetro. Se hicieron digestiones de cada DNA; aquellos que se propagaron en la cepa que expresa *SacIM*, se digirieron con *SacI*, aquellos que se propagaron en la cepa que expresa *SaIIIM*, se digirieron con *SalI* y aquellos que se propagaron en 1326*sphIM* se digirieron con *SphI*. Se hicieron las digestiones y se dejaron incubando toda la noche a 37°C. Finalmente se corrieron las digestiones en un gel de agarosa al 0.8%, se tiñó con bromuro de etidio para comparar el patrón obtenido con DNA del fago sin metilar.

6.7 Pruebas de restricción en *S. lividans dnd-*

6.7.1 Obtención de esporas de *S. lividans dnd-*.

Se hicieron transformaciones en *E. coli* ET12587/pUZ8002 con los plásmidos pMS81 y pMS81+*sco4631* (proporcionado por la M. en C. Gabriela González Cerón) por electroporación (protocolo 6) y se plaquearon las células electroporadas en cajas con medio LB con higromicina, kanamicina y cloranfenicol. Una vez transformada la cepa de *E. coli*, se hicieron conjugaciones (protocolo 7) para introducir ambos plásmidos tanto a con *S. lividans* 1326 como a *S. coelicolor* M145.

Se tomaron 5 colonias sobrevivientes de la conjugación en la que se introdujo a *S. lividans* 1326 el plásmido pMS81+sco4631 para obtener stocks de esporas (protocolo 8). Con estas esporas se pusieron un cultivos para obtener micelio, el cual fue homogenizado posteriormente para extraer el DNA cromosómico (protocolo 9).

Usando estos DNA se hicieron reacciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) usando la DNA polimerasa *Taq* de Invitrogen® y los oligos Lp1F (forward) y Ep1R (reverse).

Se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% para verificar si estaba presente el fragmento esperado. Después se corrió un gel de agarosa LMP (bajo punto de fusión) al 7% con aquellos PCRs donde se encontró el fragmento esperado. A partir del gel LMP se purificó la banda (Protocolo 11) y se mandó secuenciar para verificar la pérdida de la región SLG.

6.7.2 Pruebas de restricción

Se propagaron los fagos no metilados en las esporas de *S. lividans* dnd- y se obtuvieron stocks. A partir de ellos se hicieron ensayos de placa en las cepas de *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61. Estos se realizaron por triplicado y se registraron como se indicó anteriormente.

6.8 Clonación de los genes *sacIM*, *salM* y *sphM* en el plásmido pIJ6902 en *Streptomyces lividans* 1326.

6.8.1 Obtención de los plásmidos pIJ6902*sacIM*, pIJ6902*salM*, pIJ6902*sphIM*

Se hicieron reacciones de amplificación por PCR de los genes de las metilasas, utilizando la polimerasa de alta fidelidad Pfu Ultra AD de Agilent Technologies.

Se utilizaron los oligonucleótidos SacIMHNUp (con sitios de *HindIII* y *NdeI*, que contiene el codón de inicio ATG) y SacIMERIDown (con un sitio *EcoRI*), y como templado un fragmento purificado de DNA con el gen de la metilasa para amplificar el gen *sacIM* por medio de un PCR. Posteriormente se digirió el producto de PCR, además del plásmido pBluescript IISK+ con *HindIII* y *EcoRI*, y se corrieron en un gel de agarosa LMP (bajo punto de fusión) al 0.7% para purificar las bandas (protocolo 10).

Asimismo, se realizó un PCR para amplificar el gen de *salIM* usando un fragmento purificado del gen como templado con los oligonucleótidos SalIMBHINup (con sitios *BamHI* y *NdeI*) y SALI-DOWN (con un sitio *EcoRI*). El producto de PCR se digirió con *BamHI* y *EcoRI*, se corrió en un gel de agarosa LMP y se purificó el fragmento (protocolo 10).

Además se diseñaron y utilizaron oligonucleótidos SphIMXbaINup (con sitios *XbaI* y *NdeI*) y SphIMEdown (con un sitio *EcoRI*) para amplificar por PCR el gen *sphIM* usando como templado un fragmento de DNA con el gen mencionado. El producto del PCR y el plásmido pBluescript IISK+ se digirieron con *XbaI* y *EcoRI*, y se purificaron de un gel de agarosa LMP (Protocolo 10).

Para cada gen de las metilasas se hicieron 3 reacciones de PCR de 50 μ L de cada una, se juntaron, se limpiaron y se resuspendieron en agua.

Una vez se obtuvieron los fragmentos purificados, se hicieron las ligaciones de *sacIM* y *sphIM* con pBluescript IISK+, y *salIM* con pUC18. Se precipitaron las ligaciones (protocolo 11) y se transformaron por electroporación (protocolo 6) en células competentes de *E. coli* DH5 α . Posteriormente se purificó el DNA plasmídico de las colonias transformadas (seleccionadas por el color blanco y ampicilina) haciendo minipreparaciones de DNA de plásmido (protocolo 12) las cuales se digirieron con las enzimas correspondientes para verificar la presencia del inserto. Para obtener mayor cantidad de plásmido, se hicieron midipreparaciones de

aquellas colonias que sí presentaron el inserto clonado. Se hicieron digestiones nuevamente con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* para liberar el inserto. Estos se corrieron en un gel LMP, se purificaron y se ligaron con el plásmido pIJ6902 previamente digerido con las mismas enzimas. Estas ligaciones se introdujeron por electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α seleccionando las transformantes con apramicina 50 $\mu\text{g/ml}$. Se tomaron colonias transformadas y se verificó la presencia del vector con el inserto mediante restricción. Los plásmidos con el patrón de restricción correcto se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* ET12567/PUZ8002, seleccionando nuevamente con apramicina 50 $\mu\text{g/mL}$, para posteriormente hacer conjugaciones (protocolo 7) con *S. lividans dnd-* obteniendo así las cepas de *S. lividans* 1326pIJ6902*saclM*, 1326pIJ6902*saIM* y 1326pIJ6902*sphIM*.

6.8.2 Obtención de esporas de *S. lividans* con las construcciones pIJ6902*saclM*, pIJ6902*saIM* y pIJ6902*sphIM*).

Se tomaron algunas colonias de esporas aisladas resultantes de la conjugación, se resuspendieron en agua, y se plaquearon en cajas de MS con apramicina 50 $\mu\text{g/mL}$, se incubaron durante 7 días. Posteriormente se cosecharon y se resuspendieron en glicerol al 20%. Una vez obtenidas las esporas, se hicieron cultivos con estas esporas en LB + sacarosa 25% (ver anexo) , dejándose incubar por 16 horas a 30°C. Después de este tiempo, se añadió thioestrepton 5 $\mu\text{g/mL}$ para inducir la expresión de los genes de las metilasas clonadas en el vector pIJ6902 y se volvió a dejar incubando a la misma temperatura de 16-24 horas más. Una vez que hubo crecido el micelio, se purificó DNA cromosómico a partir de éste (protocolo 9). Ya purificado el DNA, se probó la expresión de las metilasas *saclM*, *saIM* o *sphIM* con sus enzimas de restricción correspondientes. Una vez corroborado que las metilasas se expresaban efectivamente en el vector pIJ6902 y que eran funcionales, se propagaron todos los fagos en ellas, para metilarlos en sus sitios de reconocimiento, en cajas de DNA con tioestreptón 5 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo stocks con un título alto. Para verificar si el DNA de los fagos se

alcanzaba a metilar ahora en cepas en las que se estaba induciendo la expresión de las metilasas, se purificó el DNA de cada fago (protocolo 5) y se digirió con su enzima de restricción correspondiente. En aquellos fagos en que parecía que había mayor metilación, se repitieron las pruebas de restricción haciendo ensayos de placa (protocolo 2) nuevamente en las cepas *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61.

6.9 Pruebas de infección de fagos aislados en *S. coelicolor* IB11

Se propagaron los fagos TO1, TO2, TO3 y TO4, así como Φ C31 como control negativo, en la cepa de *S. coelicolor* IB11, la cual no es capaz de glucosilar sus proteínas. Las diluciones a partir del stock del fago se propagaron de tal manera que pudieran apreciarse claramente las placas para verificar si cada fago era capaz de infectar en ausencia de un receptor glucosilado, como se sabe que es necesario para la infección de Φ C31.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de actinofagos de *Streptomyces* con genomas metilados en sitios de reconocimiento de los sistemas de modificación-restricción *Sacl*, *Sall* y *SphI*.

Se colectaron 6 muestras de suelo de diferentes lugares para buscar la presencia de actinofagos, utilizando para el aislamiento a *S. lividans* 1326 como hospedero. Las muestras de suelo se obtuvieron mayoritariamente de tierra de jardines de distintas partes del Distrito Federal (Ciudad Universitaria, delegación Xochimilco, delegación Venustiano Carranza), Edo. de México (Ciudad Nezahualcóyotl) y una de Cuernavaca, Morelos. Solamente de una de las muestras no se obtuvieron fagos. De las otras cinco muestras se lograron aislar 12 fagos (tabla 4 en Métodos).

De cada uno de estos 12 fagos se obtuvo un lisado con alto título. Sin embargo, la mayoría de los fagos mostró ser inestable ya que el título de los lisados disminuía rápidamente, por lo que se continuó trabajando solamente con los cuatro fagos que resultaron estables.

Posteriormente se purificó el DNA de estos fagos para determinar si tenían sitios de reconocimiento para las enzimas de modificación/restricción *Sacl*, *Sall* y *SphI* (figura 6). Solamente uno de los fagos no mostró sitios de reconocimiento para ninguna de las enzimas. Debido a esto, finalmente se continuó sólo con cuatro de los fagos aislados que resultaron estables y tenían en su genoma sitios de reconocimiento para al menos una de las enzimas, además del fago ya conocido Φ C31. En la figura 5 se observan las placas de cada uno de los stocks de fagos obtenidos, con las cuales fueron identificados y aislados, además de las placas del fago Φ C31.

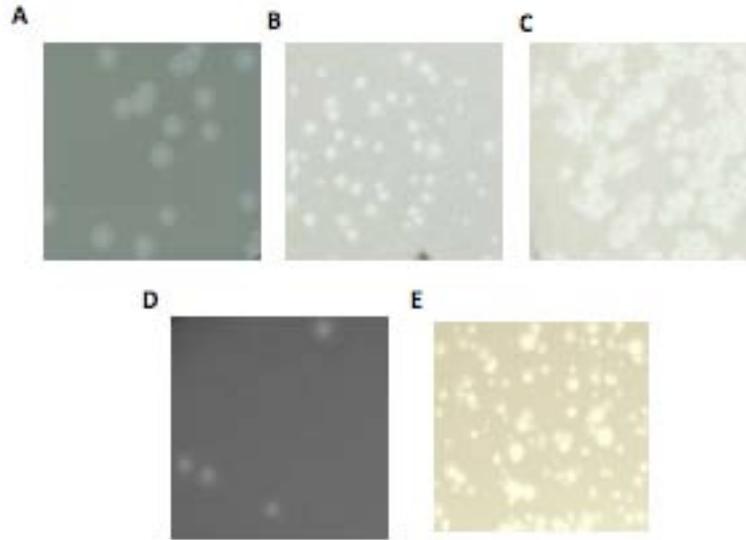


Figura 5: Placas de los diferentes fagos sobre un tapete micelar de *S. lividans* 1326. Cada muestra contiene un solo fago. **A**: placas del fago TO1. **B**: placas del fago TO2. **C**: placas del fago TO3. **D**: placas del fago TO4. **E**: placas del fago Φ C31.

Las digestiones con las respectivas enzimas de restricción mostraron finalmente tres fagos con sitios *SacI* y *SalI* y uno con sitios *SalI* y *SphI*, además de que el conocido fago Φ C31 tiene sitios *SalI* y *SphI* (figura 6).

El fago TO1, presentó en su genoma ≥ 17 sitios *SalI* y ≥ 13 sitios *SphI* (figura 6**A**), el Fago TO2 ≥ 15 sitios de *SacI* y ≥ 13 *SalI* (figura 6**B**), el fago TO3 ≥ 14 sitios *SacI* y ≥ 11 sitios *SalI* (figura 6**C**) y el fago TO4 ≥ 14 sitios *SacI* y ≥ 14 sitios *SalI* (figura 6**D**). Finalmente, se sabe que el fago Φ C31, que contiene 49 sitios de *SalI* y 9 sitios *SphI*.

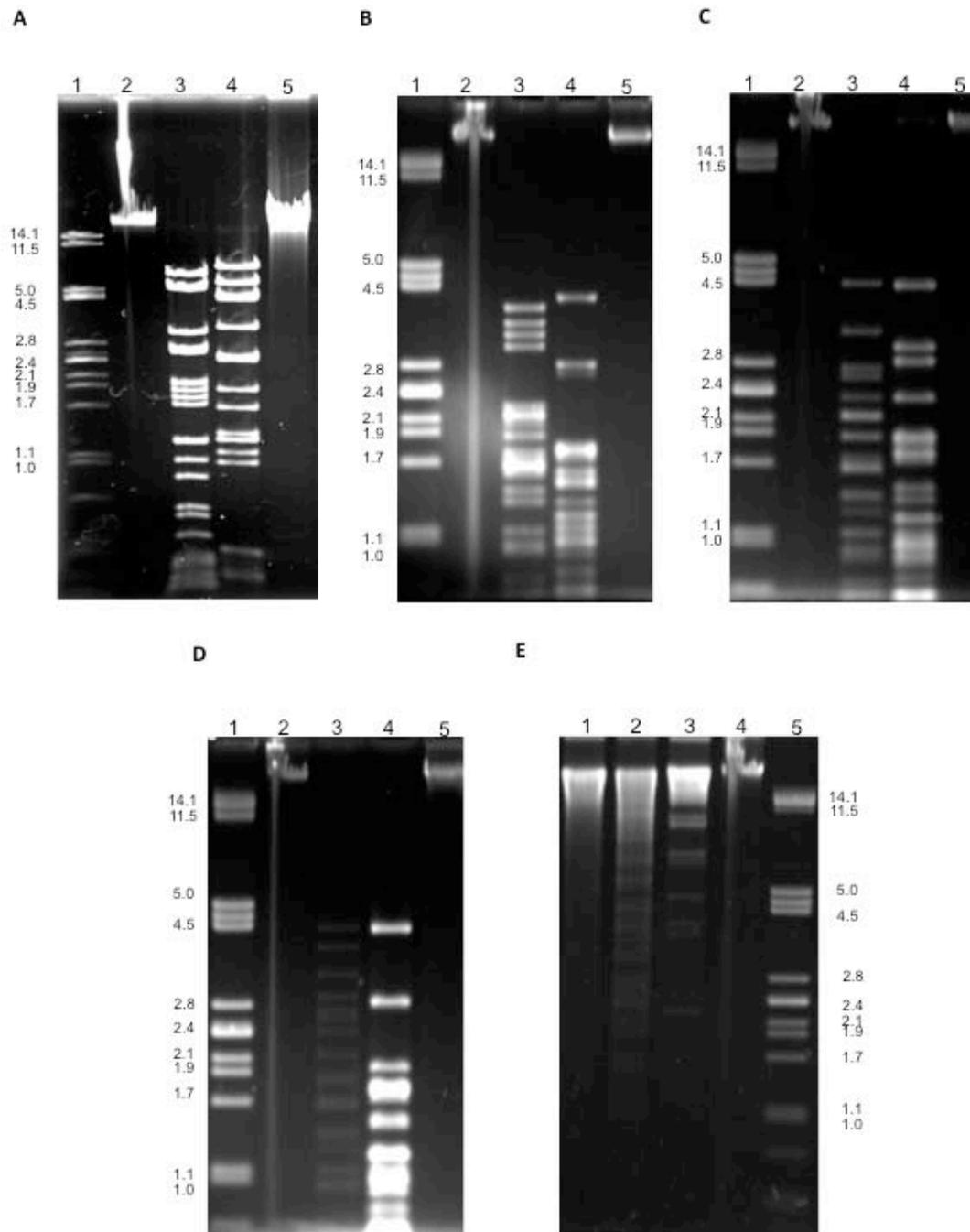


Figura 6: Se muestran las digestiones del DNA de los fagos TO1(A), TO2(B), TO3(C), TO4(D) y ϕ C31 (E) con *Sacl*, *SalI* y *SphI*.. En los gels A, B, C y D, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular (DNA del fago lambda digerido con *PstI*). Los carriles del 2-5 corresponden el DNA del fago sin digerir, digerido con *Sacl*, *SalI* y *SphI*, respectivamente (indicado sobre los carriles). En el caso del gel E los carriles 1-4 corresponden al DNA del fago digerido con *Sacl*, *SalI*, *SphI* y sin digerir respectivamente. El carril 5 corresponde al marcador de peso molecular.

7.1.1 Metilación del DNA de los diferentes fagos

Una vez obtenidos estos resultados, sabíamos que las metilasas M.SacI y/o M.SalI y/o M.SphI podían ser capaces de modificar (metilar) el DNA de estos fagos, según sus sitios de reconocimiento. Con el propósito de que estos sitios estuvieran metilados, se propagaron los fagos en cepas de *S. lividans* obtenidas en el laboratorio que expresaban cada metilasa (1326sacM, 1326saIM y 1326sphM) las cuales eran capaces de metilar el genoma de la cepa de *S. lividans* en las que se expresaron (ver tabla 1).

De esta forma, los fagos Φ C31 y TO1 se propagaron en las cepas 1326saIM y 1326sphM (en cada una por separado). TO2, TO3 y TO4 en 1326sacM y 1326saIM (por separado). Se recuperaron stocks de cada uno, y, para aumentar la probabilidad de que todos los sitios de reconocimiento de las metilasas estuvieran modificados, se hizo este proceso de propagación dos veces.

7.2 Pruebas del efecto de la metilación en la restricción por parte del sistema de restricción de DNA metilado.

Con el fin de determinar el efecto de la metilación en la restricción ejercido por el sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor*, se hicieron ensayos de titulación de los diferentes fagos (sin metilar y metilados), en las cepas de *S. lividans* 1326, en la cepa de *S. coelicolor* M145, la cual lleva el sistema de restricción de DNA metilado intacto, y en la cepa *S. coelicolor* IB61 (a la cual se le han eliminado la mayor parte de los genes de restricción).

El conteo de placas se realizó en las cajas de cada dilución y se registró en unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro. Finalmente, se hicieron tres repeticiones para cada uno de los fagos, cada repetición iniciándose desde la realización de las diluciones a partir de cada lisado.

Para poder observar el efecto de la posible metilación en la restricción según la cepa en la que los fagos se propagaran, se hicieron las relaciones de la cantidad de UFP/ml de la siguiente manera: *S. coelicolor* M145/ *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* IB61/ *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* M145/ *S. coelicolor* IB61. Si, como esperábamos, la metilación del DNA del fago provocaba que *S. coelicolor* M145 restringiera su entrada a la célula debido al sistema de restricción de DNA metilado, la relación entre la cantidad de UFP/mL de los fagos obtenida en *S. coelicolor* M145 y la obtenida *S. lividans* 1326 debía de ser, por lo menos, menor a 1, en el caso de los fagos con DNA metilado. Y si era una restricción fuerte (como se había demostrado en el trabajo de González-Cerón et. al. 2009), esta relación debía ser varios órdenes de magnitud menor a 1. En el caso de los fagos con DNA no metilado, esperábamos que la relación de PFU/mL presentes al propagarse en *S. coelicolor* M145 y *S. lividans* 1326, debía de ser muy cercana al 1, ya que el sistema de restricción no actuaría sobre DNA no modificado, es decir, que *S. coelicolor* M145 sería igual de permisivo en la entrada e infección de fagos que *S. lividans* 1326. También esperábamos que *S. coelicolor* IB61 tuviera un comportamiento muy similar a *S. lividans* 1326 debido a las mutaciones que contiene a los genes responsables de la restricción, y que aún con fagos propagados en cepas con metilasas, la relación de PFU/mL entre IB61 y 1326 fuera cercana al 1, o al menos mayor a la obtenida con M145, es decir que presentara mayor permisividad a la infección de los fagos que M145. Por lo mismo, esperábamos que la relación de UFP/mL entre *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61, fuera menor a 1 y similar a la de M145/1326.

Sólo en el caso de Φ C31 se utilizaron nada más las cepas *S. lividans* 1326 y *S. coelicolor* J1928, ya que *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* IB61 presentan un sistema limitante del crecimiento de fago (Pgl por Phage grow limitation) que les protege de la infección de Φ C31, y *S. coelicolor* J1928 no presenta el sistema Pgl pero sí el sistema de restricción específico de DNA metilado.

En primer lugar se muestran los resultados del fago TO4 (tabla 5) ya que es en el que se observó un efecto menor de la metilación. Las relaciones entre el número de UFPs/mL en *S. coelicolor* M145 y *S. lividans* 1326 tanto del fago sin metilar, como propagado por cepas con expresión de metilasas, son muy cercanas a 1. Esto quiere decir que los números de UFP/mL fueron prácticamente los mismos ya que en ambos hubo la misma permisividad a la infección y propagación de fagos. Esto se esperaba en los fagos silvestres, pero no en los que propagamos en las cepas que expresaban metilasas, ya que pensábamos que, si estaba metilado el DNA del fago, *S. coelicolor* M145 lo restringiría fuertemente y esto se vería reflejado en un número mucho menor de UFP/mL, es decir, en una relación M145/1326 varios ordenes de magnitud menor a 1. Como esperábamos, la relación IB61/1326 fue muy similar, aunque de todas formas parecía que la metilación no tenía efecto. A su vez, en la relación M145/IB61 se esperaba que fuera muy similar a M145/1326.

Fago TO4	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Sin metilar	$7 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$	$9 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$	$9 \times 10^{-1} \pm 8 \times 10^{-1}$
Propagado en 1326saM	$1 \pm 3 \times 10^{-1}$	$1 \pm 5 \times 10^{-1}$	$1 \pm 2 \times 10^{-1}$
Propagado en 1326saC	$1 \pm 7 \times 10^{-2}$	$8 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$	$1 \pm 3 \times 10^{-1}$

Tabla 5: Promedios de las relaciones obtenidas a partir de tres pruebas de restricción con el fago TO4 silvestre (sin metilar), propagado en la cepa 1326saM y propagados en la cepa 1326saC en las tres diferentes cepas: *S. lividans* 1326 (tiene un sistema de restricción mucho mas débil que *S. coelicolor*), *S. coelicolor* M145 (tiene un sistema de restricción fuerte, por lo que se esperaba que fuera menos permisivo en la propagación del fago en caso de tener el DNA modificado) y *S. coelicolor* IB61 (tiene mutados varios genes responsables de la restricción, por lo que se esperaba una permisividad a la propagación de fagos similar a la de 1326, en caso de tener el DNA metilado).

Por otro lado, el fago ϕ C31, mostró una disminución en la cantidad de UFP/mL cuando se propagó en cepas con expresión de metilasas. La relación J1928/1326 en el caso de fagos sin metilar, mostró un resultado cercano a 1, como se esperaba. Al ser propagado en cepas 1326saM sí hubo restricción de al menos

dos órdenes de magnitud. De la misma manera, los resultados de las pruebas de restricción con el fago propagado en la cepa 1326sphM mostraron que hay menor infección en *S. coelicolor* J1928 que en *S. lividans* 1326, según la relación J1928/1326, en la cual parece que la diferencia es de más de un orden de magnitud. Es decir, aunque hay restricción por parte de *S. coelicolor* J1928, ésta no es fuerte. Como se mencionó previamente, sólo en caso de éste fago se hizo la prueba con *S. coelicolor* J1928 debido a la presencia del sistema Pgl en la cepa *S. coelicolor* M145 el cual impide la reinfección de fagos y, por lo tanto, confiere a ésta cepa protección del ϕ C31 (Tabla 6).

Fago ϕ C31	Relaciones
	J1928/1326
Sin metilar	1.45 \pm 1
Propagado en 1326saM	1.42x10 ⁻² \pm 1x10 ⁻²
Propagado en 1326sphM	8.43x10 ⁻² \pm 8x10 ⁻²

Tabla 6: Resultados de la prueba de restricción del fago ϕ C31. Los fagos que no se propagaron por ninguna cepa con expresión de las metilasas (*SaII* o *SphI*) se propagaron tanto en *S. lividans* como en *S. coelicolor* J1928.

En el caso de TO3, la relación M145/1326 mostró una ligera restricción aún usando los fagos sin metilar. Aunque, como se esperaba, la relación IB61/1326 es cercana a 1, la relación M145/IB61 también es muy cercana, aunque esperábamos que fuera más similar a M145/1326. En cuanto a los fagos propagados en la cepa 1326saM hubo una restricción un poco menor a la observada en el fago silvestre, de hecho la relación fue cercana a 1. Con el fago que se propagó en la cepa 1326sacM, la relación M145/1326 mostró una restricción de hasta 2 órdenes de magnitud. Esto sugería que éstos fagos probablemente se encontraban metilados y un poco de la restricción observada se debía a la metilación. Sólo con los fagos propagados en la cepa 1326sacM se observa algo de restricción, aunque es menor que en M145/1326. En la relación

M145/IB61, se esperaban resultados similares a los obtenidos en M145/1326, sin embargo parece que hay una disminución de restricción (tabla 7).

Fago TO3	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Sin metilar	$3 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$	$8 \times 10^{-1} \pm 7 \times 10^{-1}$	$9 \times 10^{-1} \pm 3 \times 10^{-1}$
Metilado con 1326saM	$8 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-1}$	$9 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$	$1 \pm 7 \times 10^{-1}$
Metilado con 1326sacM	$2 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	$3 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$	$7 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-2}$

Tabla 7: Resultados de las pruebas de restricción del fago TO3.

7.2.1 Fagos que muestran un posible efecto de la fosforotioación

De los fagos estudiados, TO2 y TO1 mostraron un fenómeno particular ya que en las pruebas de restricción, éstos fagos mostraron un número de UFPs/mL menor en *S. coelicolor* M145 que en *S. lividans* 1326 (a pesar de que esta cepa no restringe tan fuerte el DNA metilado). En la relación M145/1326 de éstos dos fagos, utilizando el stock de fagos sin modificar, observamos una diferencia de dos ordenes de magnitud. Esto fue inesperado, ya que al ser fagos que no se habían propagado en cepas con expresión de metilasas, no esperábamos que estuvieran modificados, y por lo tanto el número de UFPs/mL debía ser muy similar, por lo que se esperaba una relación M145/1326 fuera muy cercana a 1 (tablas 8 y 9). Esto podría atribuirse a una modificación al DNA en *S. lividans* llamado fosforotioación. Se ha visto en otros trabajos (Liu, et. al., 2010) que el sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor* también reconoce esta modificación, y restringe el DNA que la tiene. En particular se ha demostrado que la nucleasa producto del gen *sco4631* es capaz de restringir DNA con esta modificación.

Al comparar las UFPs de los fagos que sí habían sido propagados en cepas con expresión de metilasas, también observamos una disminución en las UFPs/mL en *S. coelicolor* M145 con respecto *S. lividans* 1326, tanto en los fagos propagados en 1326saM, como en los que se propagaron 1326sacM (en el caso de TO1 los que se propagaron es la cepa en 1326sphM). De acuerdo a esto, en la relación M145/1326, se esperaba que al menos fuera igual que la relación observada con los fagos no metilados. Esto quiere decir, que si bien la metilación no tenía efecto, la modificación que incorporó *S. lividans* 1326 debía de estar presente en estos fagos, y la restricción sería al menos igual a la observada para los fagos no metilados.

El fago TO2 también mostró este fenómeno en el que, al propagar los fagos silvestres, parecía haber una menor permisividad a su infección (aunque no estuvieran modificados) en *S. coelicolor* M145 comparándolo con *S. lividans* 1326. Esta diferencia era de hasta dos órdenes de magnitud. Para los fagos propagados en 1326saM, inesperadamente la diferencia en la relación M145/1326 fue menor. En cambio, en los fagos propagados en la cepa 1326sacM, sí se observa que la diferencia en UFP/mL es muy parecida a la observada con los fagos silvestres. Por ello, parece que toda la restricción se debe a lo mismo que en los fagos no metilados. La relación de IB61/1326 muestra que *S. coelicolor* IB61 es más permisivo a la entrada de fagos propagados en cepas que expresan la metilasa, que *S. coelicolor* M145 ya que al compararlo con 1326, la diferencia es sólo de un orden de magnitud. Esto también se demuestra en la relación M145/IB61, en donde se ve que hay mayor infección en IB61 que en M145 (tabla 8).

Fago TO2	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Sin metilar	$3.8 \times 10^{-2} \pm 7.7 \times 10^{-2}$	$5.5 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$	$9.3 \times 10^{-2} \pm 8.8 \times 10^{-2}$
Propagado en 1326saM	$1.7 \times 10^{-1} \pm 1.4 \times 10^{-1}$	$1.1 \pm 6.3 \times 10^{-1}$	$2 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$
Propagado en 1326sacM	$3.2 \times 10^{-2} \pm 4.7 \times 10^{-2}$	$2.3 \times 10^{-1} \pm 2.1$	$1.9 \times 10^{-1} \pm 1.6 \times 10^{-1}$

Tabla 8: Resultados de la prueba de restricción del fago TO2.

Finalmente, el fago TO1 fue el que exhibió una mayor diferencia en la permisividad de la propagación del fago silvestre en las cepa de *S. coelicolor* con respecto *S. lividans*. La relación de M145/1326 utilizando los fagos silvestres, muestra que esta diferencia es de 2 órdenes de magnitud, es decir que hubo 100 veces menos UFPs/ml formados en *S. coelicolor* M145 que en *S. lividans* 1326, aunque el fago no estuviera metilado. Como en el caso anterior, esto se debía probablemente a que el sistema de restricción de *S. coelicolor* M145 también reconoce la fosforotioación. También se observa que en *S. coelicolor* IB61 no hay restricción de hecho la relación es cercana a 1, es decir, que el posible efecto de la restricción de M145 sobre la fosforotioación, desaparece en la cepa de IB61. Como se esperaba, la restricción también se observa en M145/IB61, ya que M145 si restringe, e IB61 lo hace en menor medida (por tener eliminados varios genes de restricción, entre ellos *sco4631*). Esto también se deduce de la relación M145/IB61, ya que también se ve que este fago produce menos UFPs/mL en *S. coelicolor* M145 que en *S. coelicolor* IB61. Sin embargo, la relación se debería de mantener al menos de 10^{-2} en todos los casos (fago silvestre y propagado en cepa con expresión de la metilasa) (tabla 9).

Fago TO1	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Sin metilar	$1 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-2}$	$7 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-2}$
Propagado en 1326saM	$5 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-2}$	$8 \times 10^{-1} \pm 1$	$3 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-1}$
Propagado en 1326sacM	$4 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-2}$	1 ± 1	$1 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-1}$

Tabla 9: Resultados de la prueba de restricción del fago TO1.

La restricción observada en este caso parece ser provocada por la fosforotioación y no por la metilación.

7.3 Pruebas de metilación en el DNA de los fagos.

Debido a que haberlos propagado en cepas que expresaban metilasas (cuyos sitios de reconocimiento se encontraron en el DNA de los fagos) parecía no tener el efecto esperado por lo que se verificó si su DNA se había metilado efectivamente. Como ya se mencionó, los fagos se propagaron dos veces en las cepas que expresan las metilasas cuyos sitios de reconocimiento se encontraba en su propio DNA. Para obtener los fagos que se utilizarían para extraerles el DNA, se propagaron una tercera vez en estas cepas. De esta manera, esperábamos que el DNA de los fagos se metilara efectivamente.

Para hacer estas pruebas, se purificó el DNA del fago silvestre (para usarlo como control negativo de metilación), y el de los fagos propagados por las cepas que expresaban las metilasas. Todos los fagos se incubaron con las enzimas de restricción que correspondían a los sitios de reconocimiento de los sitios de metilación que contenía cada uno. Es decir, aquellos que tenían sitios *Sall* y *Sacl* se incubaron con *SallR* y *SaclR*, por separado. Como todos los fagos tenían al menos dos sitios de reconocimiento para estas enzimas de modificación-restricción (en caso de dos fagos de *Sall* y *SphI*, y en caso de tres fagos *Sall* y *Sacl*), todos se pusieron a digerir con ambas enzimas. Esto se hizo como un control, para ver si el DNA estaba lo suficientemente limpio, y que en caso de estar metilado el sitio de reconocimiento de una metilasa, su respectiva enzima de restricción no pudiera cortar debido a esto y no a otro factor.

De esta forma pudimos observar en qué fagos las metilasas que se expresaban en las cepas en las que fueron propagados habían modificado el DNA. Si los fagos que fueron propagados en las cepas que expresaban *SaII*M eran digeridos con *SaclR* pero no por *SaIR*, era prueba de que los sitios modificados impedían que la enzima de restricción reconociera la misma secuencia. Esto mismo aplicaba para todas las secuencias de reconocimiento de las enzimas de modificación-restricción.

7.3.1 Fagos cuyo DNA no fue metilado

Como se esperaba, al analizar el DNA del fago TO4 (figura 7A) se encontró que no fue significativamente metilado ni por *M.SacI* ni por *M.SalI*. Esto fue consistente con nuestros resultados de las pruebas de restricción, ya que no hubo ninguna indicación de que hubiera restricción debida a la metilación del DNA. Los carriles 3 y 7 muestran los controles del DNA del fago sin metilar digeridos con *SacI* y *SalI*, respectivamente. En el carril 6 se muestra en DNA del fago propagado por la cepa que expresaba la metilasa *M.SacI* y digerido con *SacI*. En el carril 10 se observa el DNA del fago propagado en la cepa que expresaba la metilasa *M.SalI* y digerido con *SalI*. Estos resultados nos indicaron que el DNA de los fagos no estaba metilado.

Lo mismo sucedió en los casos de los fagos TO2 y TO3 (figuras 7B y 7C). En éstos, también concuerda con las pruebas de restricción que realizamos ya que, a pesar de que se observaba una restricción escasa, ésta parecía deberse a la fosforotioación. En las imágenes de los geles donde se observa el DNA digerido de TO2 (figura 7B) y TO3 (figura 7C), en los carriles 6 y 10 también se muestran los DNAs propagados en las cepas 1326*sacM* y 1326*salIM* digeridas con sus respectivas enzimas de restricción

Esto demuestra que estas cepas, a pesar de que se sabe que metilan su propio DNA, no fueron capaces de metilar el DNA de ninguno de estos fagos, y que la restricción que observamos fue por otro tipo de modificación al DNA.

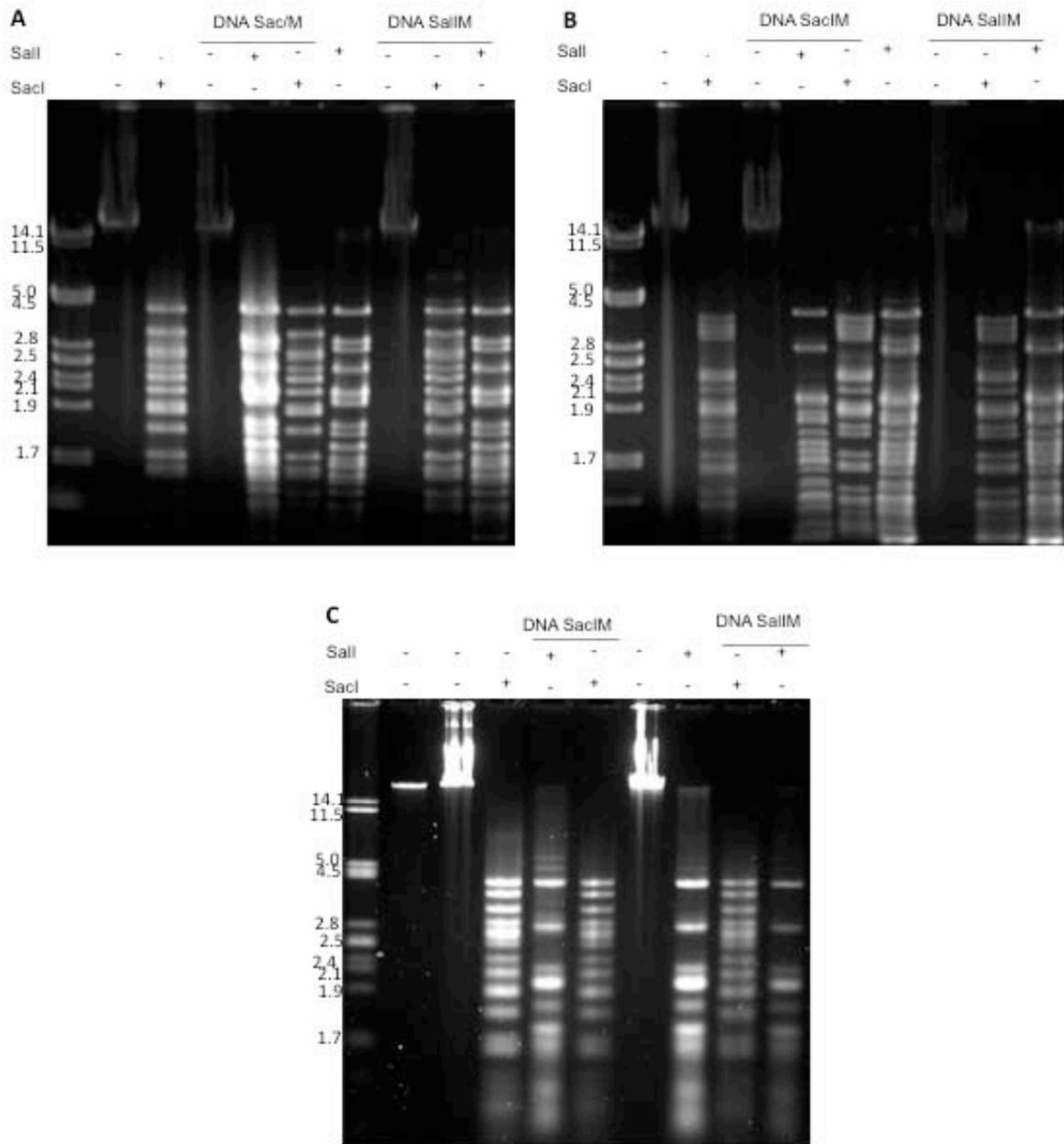


Figura 7: Gel con las digestiones del DNA del fago TO4 (A) TO2 y (B) TO3. (C) Para los geles, A y B el orden de los carriles es como sigue: En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular que corresponde al DNA del fago λ digerido con *Pst*I. El segundo carril es el DNA del fago silvestre, sin digerir. En el tercer carril se muestra el DNA del fago sin metilar digerido con *Sac*I. Carril 4: DNA del fago propagado en la cepa con la metilasa *Sac*IM sin digerir. Carril 5: DNA del fago propagado en la cepa que expresaba *Sac*IM y digerido con *Sal*IR. Carril 6: DNA del fago propagado en la cepa que expresaba *Sac*IM y digerido con *Sac*IR. Carril 7: DNA del fago silvestre digerido con *Sal*IM. Carril 8: DNA del fago que fue propagado en la cepa que expresaba *Sa*IM sin digerir. Carril 9: DNA del fago que fue propagado en la cepa que expresaba *Sa*IM digerido con *Sac*IM. Carril 10: DNA del fago que fue propagado en la cepa que expresaba *Sa*IM, digerido con *Sa*II. En el gel C el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, los carriles 2, 3 y 7 corresponden al DNA del fago silvestre, propagado en 1326*sac*IM y propagado en 1326*sa*IM sin digerir. Los carriles 4 y 8 contienen DNA del fago silvestre digerido con *Sac*I y *Sa*II respectivamente. Los carriles 5 y 6 contienen DNA del fago propagado en 1326*sac*IM digerido con *Sa*II y *Sac*I respectivamente. Los carriles 9 y 10 corresponden al DNA del fago propagado en 1326*sa*IM y digerido con *Sac*I y *Sa*II respectivamente.

7.3.2 Fagos cuyo DNA sí fue metilado

En el caso del fago TO1 se observó que la metilación había sido efectiva (figura 8). Los carriles 6 y 10 corresponden a el DNA del fago metilado con *M.SalI* y digerido con *SalI*, y metilado con *M.SphI* y digerido con *SphI*. En el caso del primero, se observa que el DNA está casi completamente protegido de la restricción por la metilación de *M.SalI*. También en el carril 10 se muestra que, aunque hay un poco de digestión, la mayoría del DNA no se digirió por la metilación del mismo sitio. La digestión parcial observada en los carriles 6 y 10 puede compararse con los carriles 3 y 7, respectivamente, donde se ve el DNA del fago sin metilar digerido por las mismas enzimas.

En el caso del DNA del fago ϕ C31, se puede observar el carril 6, muestra que el DNA del fago propagado en 1326salM y digerido con *SalI*, hay muy poca digestión. Esto quiere decir que los sitios de *SalI* fueron metilados. Por otro lado, en el carril 10 se muestra el DNA del fago ϕ C31 propagado en 1326sphM y digerido con *SphI*. Al mostrarse una total digestión, nos dimos cuenta que no se estaba metilando el DNA de éste fago en los sitios *SphI*.

Aunque en este fago habíamos observado restricción, es posible que ésta se deba a la fosforotioación, y no a la metilación.

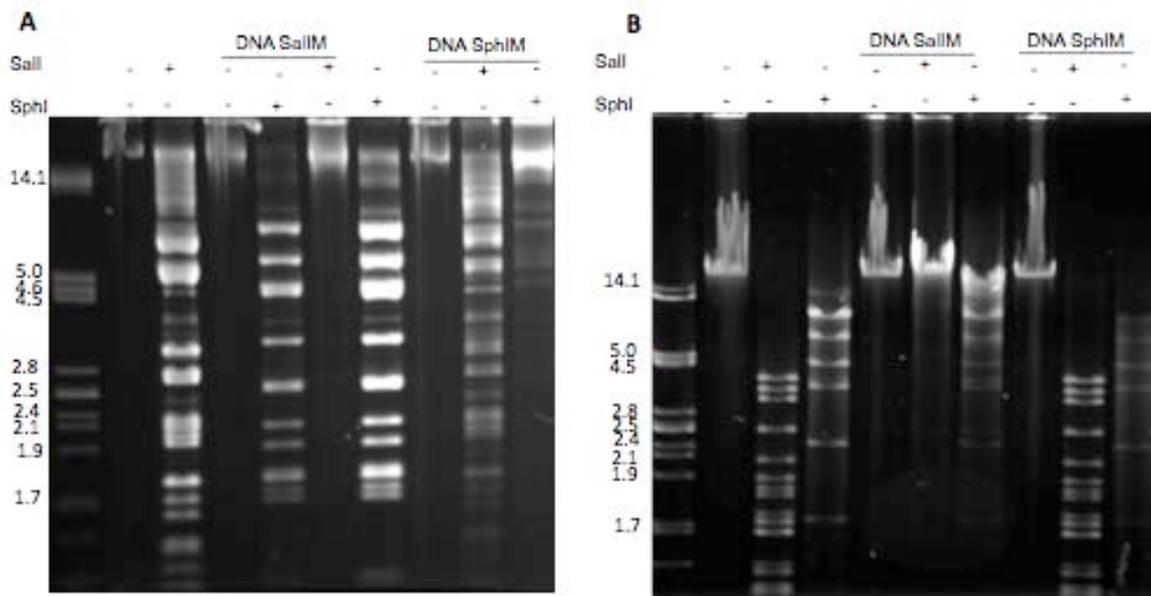


Figura 8: Gel de electroforesis donde se muestra que el DNA del fago TO1 fue el único que se metiló tanto en los sitios *Sa*II como en los *Sph*I (A) mientras que ϕ C31 sólo en los sitios *Sa*II (B). En el gel A se muestra: carril 1: marcador de peso molecular que corresponde al DNA del fago λ digerido con *Pst*I. Carril 2: DNA del fago sin metilar, sin digerir. Carril 3: DNA del fago sin metilar digerido con *Sa*II. Carril 4: DNA del fago propagado en la cepa 1326saIM sin digerir. Carril 5: DNA del fago propagado en la cepa 1326saIM y digerido con *Sph*I. Carril 6: DNA del fago propagado en la cepa 1326saIM y digerido con *Sa*II. Carril 7: DNA del fago sin metilar digerido con *Sph*I. Carril 8: DNA del fago que fue propagado en la cepa 1326sphM sin digerir. Carril 9: DNA del fago que fue propagado en la cepa 1326sphM digerido con *Sa*II. Carril 10: DNA del fago que fue propagado en la cepa 1326sphM *Sph*I. En el gel B se muestra lo siguiente: primer carril, el marcador de peso molecular. Los carriles 2-4 contienen DNA del fago silvestre sin digerir, digerido con *Sa*II y digerido con *Sph*I, respectivamente. Los carriles 5-7 contienen el DNA del fago propagado en 1326saIM sin digerir, digerido con *Sa*II y digerido con *Sph*I, respectivamente. A su vez, los carriles 8-10 contienen el DNA del fago propagado en la cepa 1326sphIM sin digerir, digerido con *Sa*II y digerido con *Sph*I, respectivamente.

Estos resultados nos mostraron que hay algunos fagos cuyo DNA sí se modificó al ser propagados en cepas que expresan las metilasas y otros que no. También, los resultados obtenidos hasta aquí con los fagos TO1 y ϕ C31, parecen indicar que aunque haya metilación, no provoca una restricción fuerte por parte de *S. coelicolor* M145.

7.4 Pruebas de restricción en una cepa de *S. coelicolor* sin fosforotioación

Para verificar si, efectivamente en el caso de los fagos TO1 y TO2 la poca restricción que se observaba era debido a la fosforotioación, decidimos obtener una cepa de *S. lividans* que careciera del cluster *dndA-E*, que codifica las enzimas responsables de esta modificación. Para ello, introdujimos el gen *sco4631* el cual codifica una nucleasa de restricción de DNA metilado y fosforotioado en *S. lividans* 1326. Lo anterior se realizó introduciendo por medio de una conjugación el plásmido *pMS81+sco4631* a partir de la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. En un estudio previo se observó que el sistema de fosforotioación es incompatible con la nucleasa codificada por *sco4631* y que, al introducir este gen, las colonias sobrevivientes habían perdido el cluster *dndA-E* debido a la incompatibilidad y a que el cluster *dndA-E* se localiza dentro de un elemento ICE que puede perderse con relativa facilidad. Observamos que, al introducir el plásmido *pMS81+sco4631*, sólo había unas pocas colonias exconjugantes, en comparación con una conjugación control en la que se introdujo solamente el vector *pMS81* (figura 9B).

Para confirmar si efectivamente las colonias sobrevivientes a la introducción del gen *sco4631* habían perdido el cluster *dndA-E* responsable de la fosforotioación, se analizaron mediante PCR utilizando un par de oligonucleótidos (Lp1F y Ep1R) (He X. et. al. 2007) que amplifican un fragmento de 725 pares de bases solamente en el caso de que ya no se encuentre presente el cluster. Para eso obtuvimos DNA genómico de varias colonias que habían sobrevivido y realizamos las reacciones de PCR para verificar que se amplificara ese fragmento. En la figura 9A, en el carril 5 observamos que una de las cepas que probamos, efectivamente amplificaba el fragmento esperado de 725 pb (figura 9B).

Posteriormente, una vez que aseguramos que esta cepa de *S. lividans* (a la que llamamos IB91) no tenía el cluster *dndA-E*, propagamos los fagos para que su

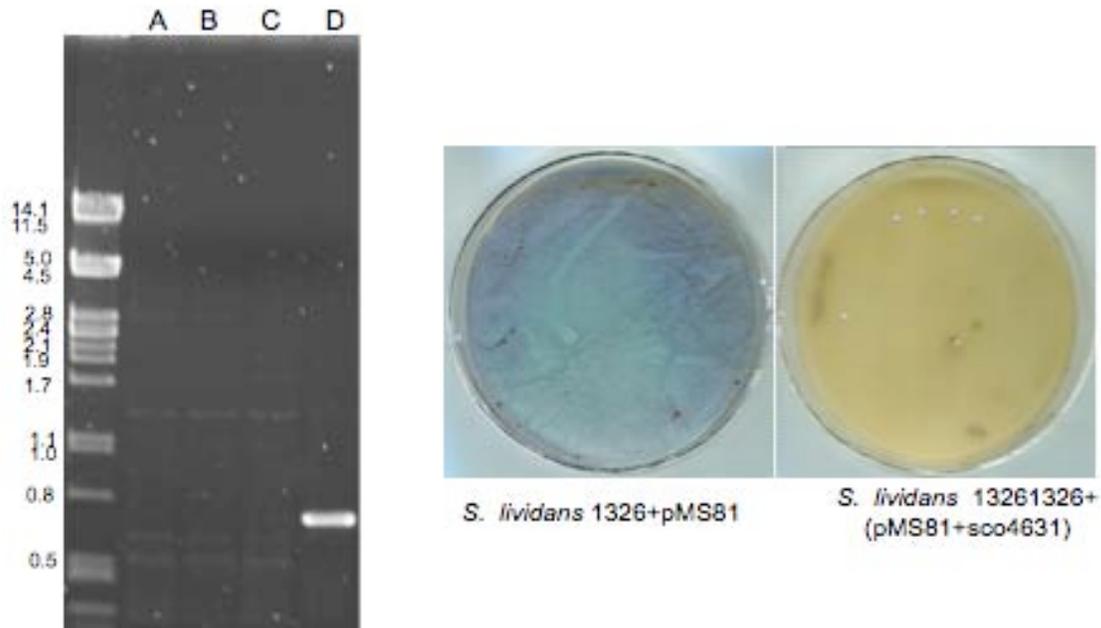


Figura 9: **A:** Reacciones de PCR para demostrar la pérdida del cluster *dndA-E*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular que corresponde al DNA del fago λ digerido con *Pst*I. Los carriles A-D muestran las reacciones de PCR realizadas a cuatro diferentes colonias exconjugantes; se puede observar que solamente la colonia del carril D amplificó el fragmento esperado con un tamaño de 125 pb. **B:** se muestra la incompatibilidad de *S. lividans* 1326 con el gen de la endonucleasa *sco4631*. A la izquierda se muestra el crecimiento de *S. lividans* 1326 al introducir el vector vacío. A la derecha se muestra el crecimiento al introducirse *sco4631*. Las pocas colonias que sobreviven probablemente es porque perdieron el cluster *dndA-E* o al gen *sco4631*.

DNA no presentara fosforotioación, y finalmente hicimos pruebas de restricción sólo con los fagos propagados en la cepa IB91.

Mediante éstas pruebas, pretendíamos observar si la relación M145/1326 mantenía una diferencia de hasta dos órdenes de magnitud, como ya habíamos observado. Si la restricción que causaba esta diferencia efectivamente se debía a que el DNA de los fagos estaba fosforotioado, los fagos propagados en la cepa IB91 infectarían de manera muy similar a *S. coelicolor* M145 y a *S. lividans* 1326, obteniendo una relación cercana a 1. Al igual que en las demás pruebas, también esperábamos que la relación IB61/1326 diera como resultado un número cercano a 1 y que la relación M145/IB61, IB61 se comportara muy similar a 1326.

En el fago TO1 habíamos visto que la relación M145/1326 daba una diferencia en la cantidad de UFPs/mL de hasta dos órdenes de magnitud. Según lo que observamos en la tabla 10, esta diferencia se redujo un orden de magnitud. La relación M145/IB61, como se esperaba, presentó una relación similar a la de M145/1326. Finalmente, la relación IB61/1326, muestra el resultado más cercano a 1.

Fago TO1	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Propagado en IB91	$2 \times 10^{-1} \pm 8 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$

Tabla 10: Se muestran las relaciones obtenidas a partir de los resultados de las pruebas de restricción utilizando al fagos sin metilar propagado en IB91.

En el caso de TO2, observamos algo muy similar. Anteriormente, habíamos visto que en la relación M145/1326 se podía ver que los fagos silvestres infectaban más (por una mayor cantidad de UFP/mL) a M145 que a 1326, y esta diferencia era de hasta dos órdenes de magnitud. Cuando utilizamos los fagos que se propagaron en la cepa IB91, la diferencia en UFPs se redujo a un orden de magnitud, como se ve en la tabla 11: la relación M145/1326 muestra esto último. Además, como se esperaba, la relación IB61/1326 fue muy cercana a 1, lo cual quiere decir que ambas cepas son igual de permisivas (no hay efecto de la restricción en IB61). También se puede observar que la relación M145/IB61 es muy similar a M145/1326, lo cual corrobora que el sistema de restricción no actúa en IB61.

Fago TO2	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Propagado en IB91	$2.48 \times 10^{-1} \pm 3.4 \times 10^{-1}$	1.62 ± 1.32	$3 \times 10^{-1} \pm 9.14 \times 10^{-2}$

Tabla 11: Se muestran las relaciones obtenidas a partir de los resultados de las pruebas de restricción utilizando el fago sin metilar y sin fosforotioar TO2 propagado en IB91

Estos resultados nos demostraban que la restricción de dos órdenes de magnitud observada en los fagos TO1 y TO2 se debía sólo en parte a la fosforotioación, pues la restricción sólo se alivió un orden de magnitud.

7.5 Obtención de cepas con mayor expresión de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI utilizando el promotor inducible P_{tipA} .

Después de probar si el DNA de los fagos se estaba metilando efectivamente, observar que en la mayoría de los casos esto no ocurría, se decidió obtener cepas que expresaran las metilasas *sacM*, *salM* y *sphM* bajo un promotor fuerte e inducible, el promotor P_{tipA} . Para ello, los genes se clonaron en el vector de expresión pIJ6902 (tabla 2).

Los fragmentos que contenían al gen de cada metilasa se obtuvieron mediante PCR utilizando fragmentos de DNA con los que ya se contaba en el laboratorio; en todos los casos se introdujo un sitio de *NdeI* que contiene el codón de inicio, para poder clonarlos bajo el control del promotor fuerte P_{tipA} . Inicialmente los productos se clonaron en pBluescript IISK+, y posteriormente los fragmentos se transfirieron al plásmido pIJ6902. Finalmente, los diferentes derivados de pIJ6902 con las genes de las metilasas clonadas se introdujeron por medio de conjugación a partir de *E. coli* ET12567/pUZ8002 en *S. lividans* IB91. Esto se hizo con el fin de que las cepas que expresaran las metilasas no fosforotioaran el DNA de los fagos, y sólo se observara el efecto de la metilación.

Para verificar que las metilasas se estuvieran expresando eficientemente en las cepas 1326pIJsacM, 1326pIJsalM y 1326sphM, se obtuvieron cultivos de cada cepa y se indujo la expresión del promotor P_{tipA} con tioestrepton. Finalmente se obtuvo el DNA genómico para verificar si las cepas podían metilar su propio DNA.

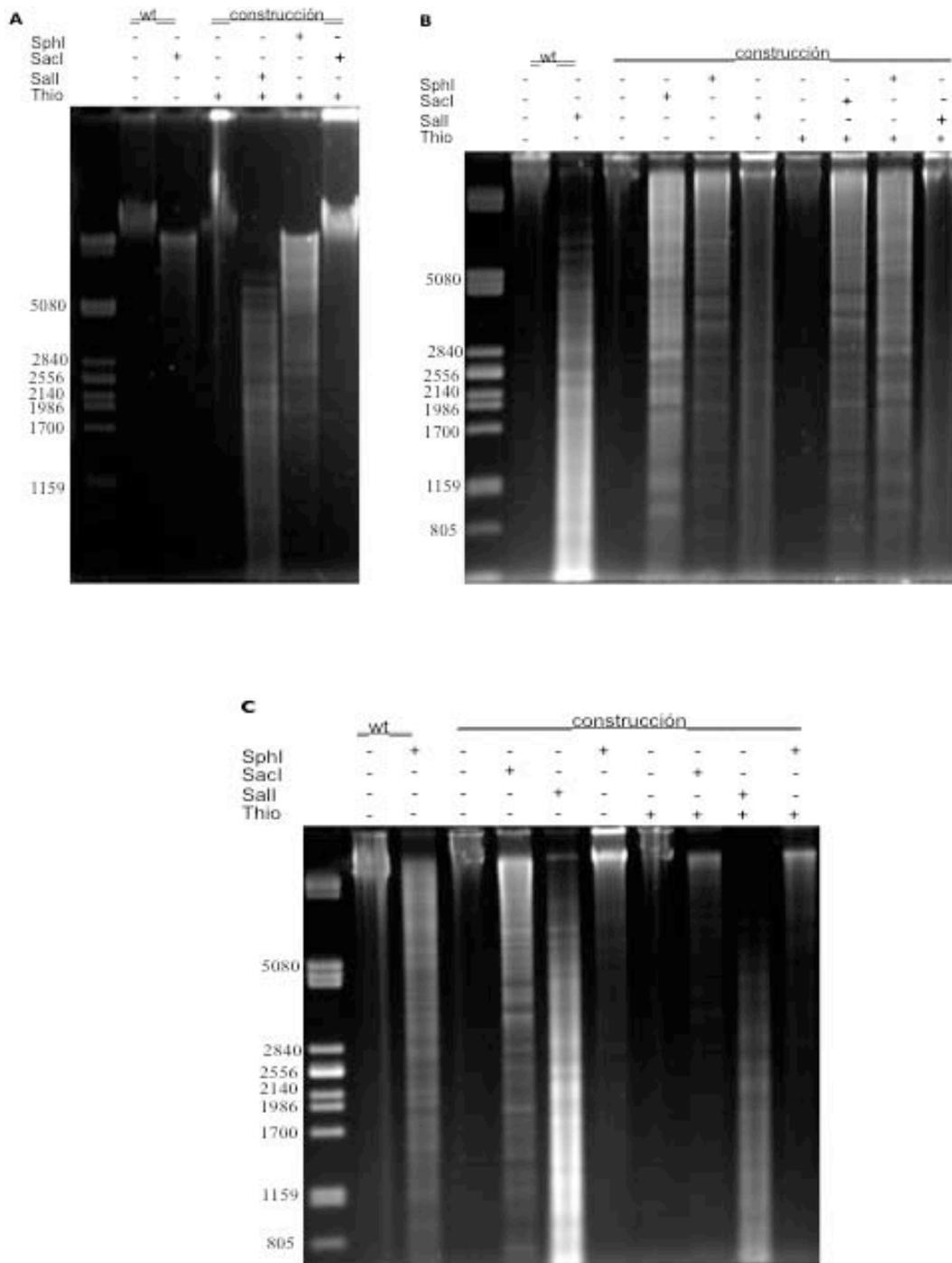


Figura 10: DNA genómico de cepas de *S. lividans* IB91 los plásmidos pIJ6902saM, pIJ6902sacM y pIJ6902sphM. **A:** El primer carril contiene el DNA del fago λ digerido con *Pst*I. El segundo y el tercer carril (wt) contienen en DNA de *S. lividans* 1326, sin digerir y digerido con *Sac*I, respectivamente. Los carriles del 4-7 contienen el DNA de IN91pIJsacIM obtenido después de la inducción con tioestrepón (Thio), digerido con las enzimas que se muestran en la parte superior. **B:** Igual que en **A** pero con DNA de la cepa IB91pIJsallM. **C:** igual en **A** pero con DNA de la cepa IB91pIJsphIM. En el caso de **B** y **C** se purificó también el DNA de las cepas sin inducción de tioestrepón (Thio).

Como se puede observar en la figura 10, prácticamente no hay digestión de DNA genómico con una determinada enzima de restricción, en el caso de la inducción del gen de la metilasa correspondiente, en comparación con el DNA de la cepa silvestre, o de la digestión con las otras enzimas. Lo anterior indica una buena metilación del DNA genómico al inducir los genes de las metilasas. Curiosamente en el caso de las metilasas *M.SalI* y *M.SphI* las metilasas parecen estar expresándose aún sin la inducción con tioestrepton, como si el promotor tuviera una expresión basal significativa.

Una vez comprobado que los genes de las metilasas se estaban expresando adecuadamente en estas cepas se propagaron los fagos en ellas, en condiciones donde dichos genes estaban completamente inducidos (es decir con tioestrepton 5µg/mL). Para comprobar si el DNA de los fagos se había metilado eficientemente, se purificó el DNA de los fagos propagados en las diferentes cepas, y se hicieron digestiones con las enzimas correspondientes. Los resultados se pueden observar en las figuras 11 y 12.

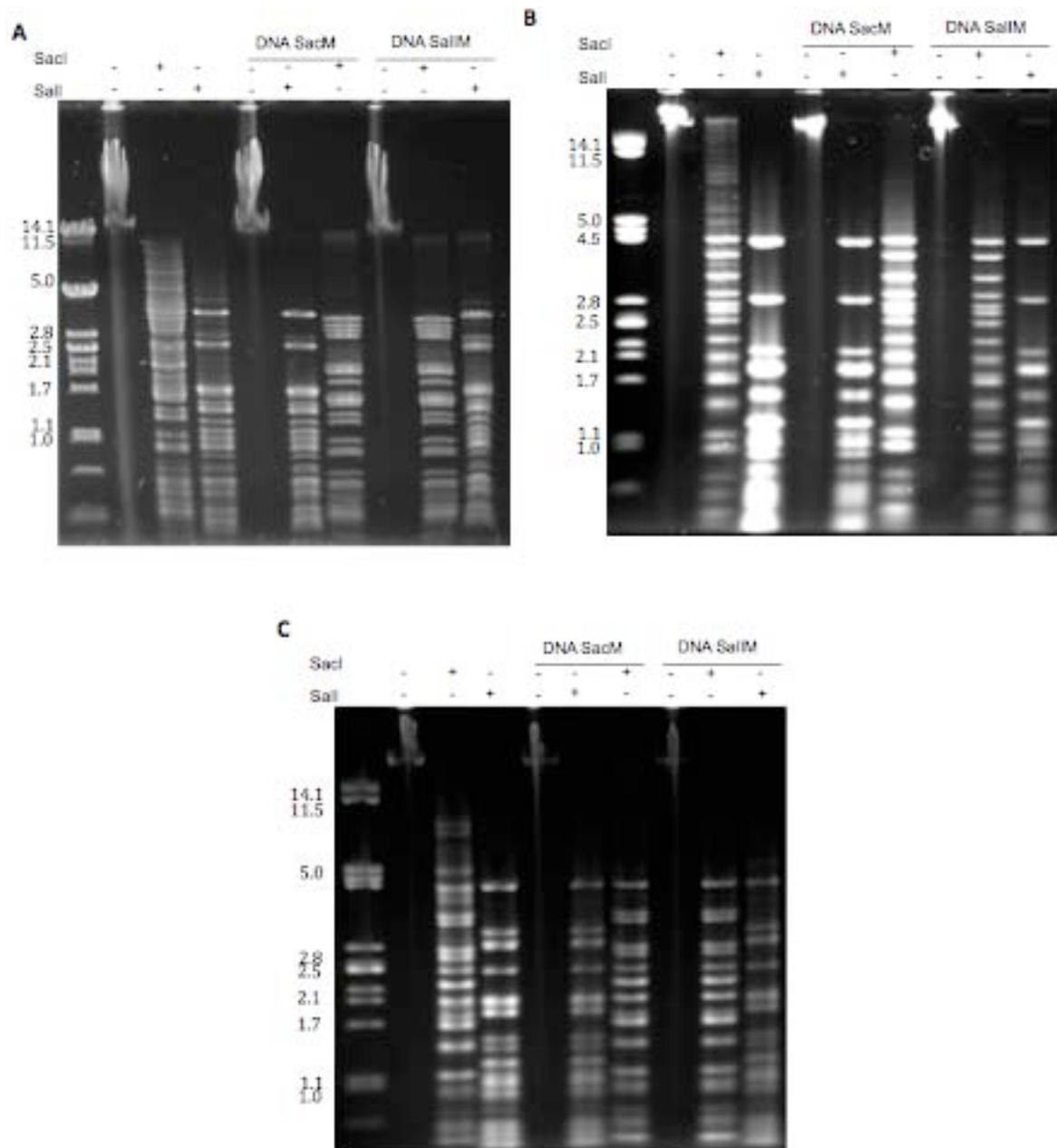


Figura 11: se muestran los resultados de las digestiones del DNA de los fagos propagados en las cepas que expresaban las metilasas bajo el promotor fuerte P_{tipA} . El gel **A** corresponde al fago TO2, el gel **B** al fago TO3 y el gel **C** al fago TO4. El orden de los carriles en todos los casos es: Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: DNA de los fagos no metilados sin digerir, digerido con *Sacl* y *SalI* respectivamente. Los carriles 5, 6 y 7 contienen DNA purificado de los fagos que se propagaron en 1326pJsaclM sin digerir, digerido con *SalI* y digerido con *Sacl*, respectivamente. Los carriles 8, 9 y 10 contienen DNA purificado de fagos propagados en la cepa 1326pJSalIM sin digerir, digerido con *Sacl* y digerido con *SalI*, respectivamente. Como se puede ver en los carriles 7 y 10 de todos los geles, el DNA, aunque esté propagado en las cepas que metilan, se digiere con su respectiva enzima de restricción.

Los carriles 7 y 10 de cada gel muestran el DNA propagado por la cepa que expresa la metilasa Sac IM y SaIM digeridas con su respectiva enzima de restricción. Esperábamos que, al expresarse la metilasa, el DNA de los fagos con los sitios de reconocimiento para cada enzima se metilaría y la enzima de restricción no podría digerirlo. Sin embargo, en estos carriles se muestra que aunque las metilasas se expresen en gran cantidad, el DNA de estos fagos no puede ser protegido. Las digestiones de los carriles 7 y 10, presentan el mismo patrón que el DNA del fago silvestre digerido con las mismas enzimas (carriles 3 y 4). Los carriles 6 y 9 muestran que el DNA purificado de los fagos propagados en las cepas que expresan las metilasas están limpios y pueden ser digeridos con la otra enzima. Los fagos que se metilaron fueron el TO1 y Φ C31 (figura 12). Esto ya lo habíamos visto utilizando las cepas que expresan las metilasas bajo su propio promotor. Sin embargo, como se observa en el carril 7, el DNA de TO1 propagado por 1326pIJsalM se digiere con *SaI*. Esto fue inesperado, pues esperábamos que el DNA no se digiriera por la metilación. En el caso de Φ C31, también se observa algo de digestión, pero no completa. Esto quiere decir que con *SaIM* expresada bajo su propio promotor sí puede metilar en DNA de éste fago, pero con la metilasa *SaIM* bajo el promotor P_{tipA} , el DNA parece metilar menos. En cambio, en el carril 10 en el gel **A** y 9 en el **B**, en el que el DNA del fago propagado en 1326pIJsphIM y digerido con *SphI* prácticamente no hay digestión. De hecho, con el DNA del fago propagado por 1326sphIM el DNA parecía digerirse muy poco o nada, pero más que el DNA propagado en 1326pIJsphIM. Esto quería decir que en esta última cepa, la metilación del DNA parecía ser más efectiva. Los resultados anteriores muestran que la falta de metilación del DNA de los fagos no se debió a una pobre expresión de los genes de las metilasas, sino que es una característica intrínseca de cada fago.

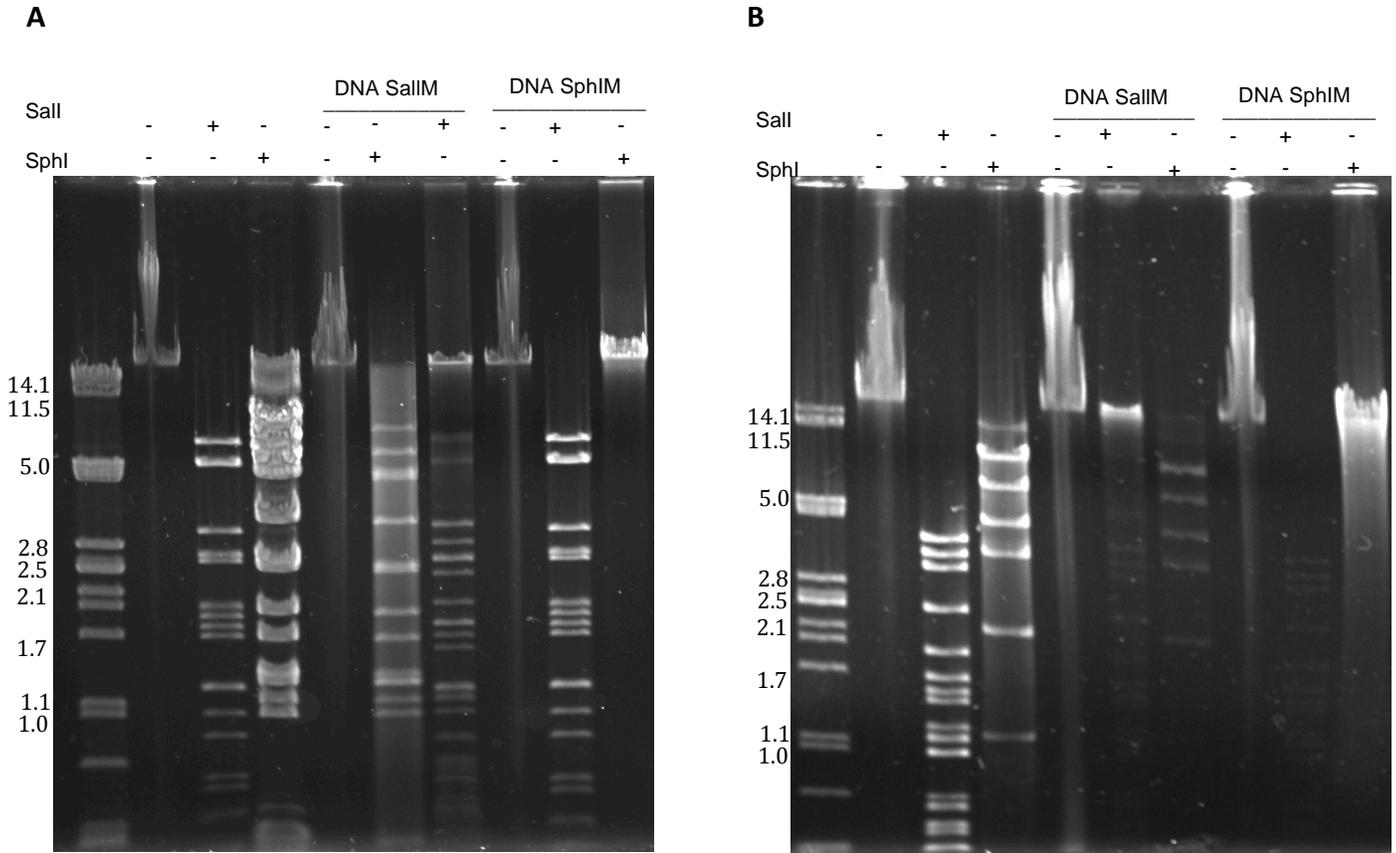


Figura 12: se muestran los resultados de las digestiones del DNA TO1 (**A**) y Φ C31 (**B**) propagados en las cepas que expresaban la metilasa bajo el promotor P_{tipA} : Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4: DNA de los fagos silvestres sin digerir, digeridos con *Sall* y *SphI*, respectivamente. Los carriles 5, 6 y 7 contienen DNA purificado de los fagos que se propagaron en 1326pIJsallM sin digerir, digerido con *SphI* y *Sall*, respectivamente. Los carriles 8, 9 y 10 contienen DNA purificado de fagos propagados en la cepa 1326pIJSphIM sin digerir, digerido con *Sall* y *SphI*, respectivamente. En el gel **B** solo cambian los carriles 6 y 7, en los que hay DNA del fago propagado en 1326pIJsallM y digerido con *Sall* y *SphI*, respectivamente.

A partir de la última observación, se volvieron a hacer pruebas de restricción utilizando sólo a los fagos que se propagaron en 1326pIJsphM, los cuales parecían tener el DNA mejor metilado que los que se propagaron en 1326pIJsallM. Esto se hizo con el fin de ver si la restricción a estos fagos cambiaba en *S. coelicolor*M145. Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 13 y 14.

Fago TO1	Relaciones		
	M145/1326	IB61/1326	M145/IB61
Sin metilar	$1 \times 10^{-1} \pm 6 \times 10^{-2}$	$7 \times 10^{-1} \pm 6 \times 10^{-1}$	$2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$
Propagado el 1326pJspH	$1 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-2}$	$6 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$	$2 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$

Tabla 13: En esta tabla se muestran los promedios de tres repeticiones de las pruebas de restricción utilizando al fago TO1 propagado en la cepa 1326pJspHIM. Se muestra en la relación M145/1326 que prácticamente no hay ninguna restricción, ya que el resultado de las relaciones usando el fago sin metilar y el fago metilado, dan lo mismo.

Lo que pudimos observar fue que prácticamente no hay restricción. Ya habíamos visto que aunque el fago no tuviera en su DNA modificaciones causadas por la fosforotioación, se veía una restricción de un orden de magnitud mayor aproximadamente al propagar el fago sin metilar. Lo mismo sucedió con esta prueba, y al propagar el fago que ya habíamos comprobado que tenía los sitios de SphI metilados, no hubo ninguna diferencia. A su vez, en la relación IB61/1326, como se esperaba, obtuvimos resultados cercanos a 1. Finalmente, la relación M145/IB61 fue muy similar a la de M145/1326 ya que el sistema de restricción de IB61 se comporta de manera muy similar al de 1326.

Fago ϕ C31	Relaciones
	J1928/1326
Sin metilar	$3.139 \pm 1.2 \times 10^{-1}$
Propagado en 1326pJspH	3.18 ± 2.6

Tabla 14: En esta tabla se muestran los promedios de tres repeticiones de las pruebas de restricción utilizando al fago ϕ C31 propagado en la cepa 1326pJspHIM.

En la tabla 14 podemos observar los resultados al propagar el fago con el DNA metilado en *S. coelicolor* J1928 y *S. lividans* 1326. Al compararlos con los resultados obtenidos utilizando el fago sin metilar, podemos ver que no hay ningún efecto debido a la metilación.

7.6 Comprobación de la necesidad de un receptor glicosilado de los nuevos fagos para infectar.

El fago Φ C31, el más conocido de los actinofagos, necesita de un receptor glicosilado para poder infectar a sus hospederos. Para verificar si esta característica la presentaban los fagos aislados en este trabajo, se hizo una prueba de infección en *S. coelicolor* IB11, la cual es una cepa mutante carente de la enzima responsable de la glicosilación de proteínas (la proteín-manosil transferasa, o Pmt). Si observábamos placas en las cajas donde se propagaron los fagos con ésta cepa, quería decir que no era necesaria la glicosilación para la infección. En cambio, si no se observaban placas, quería decir que sin glicosilación, los fagos no eran capaces de infectar. Como se ve en la figura 13 todos los fagos aislados en éste trabajo fueron capaces de infectar a *S. coelicolor* IB11. Φ C31 en cambio, no fue capaz de hacerlo, como era de esperarse.

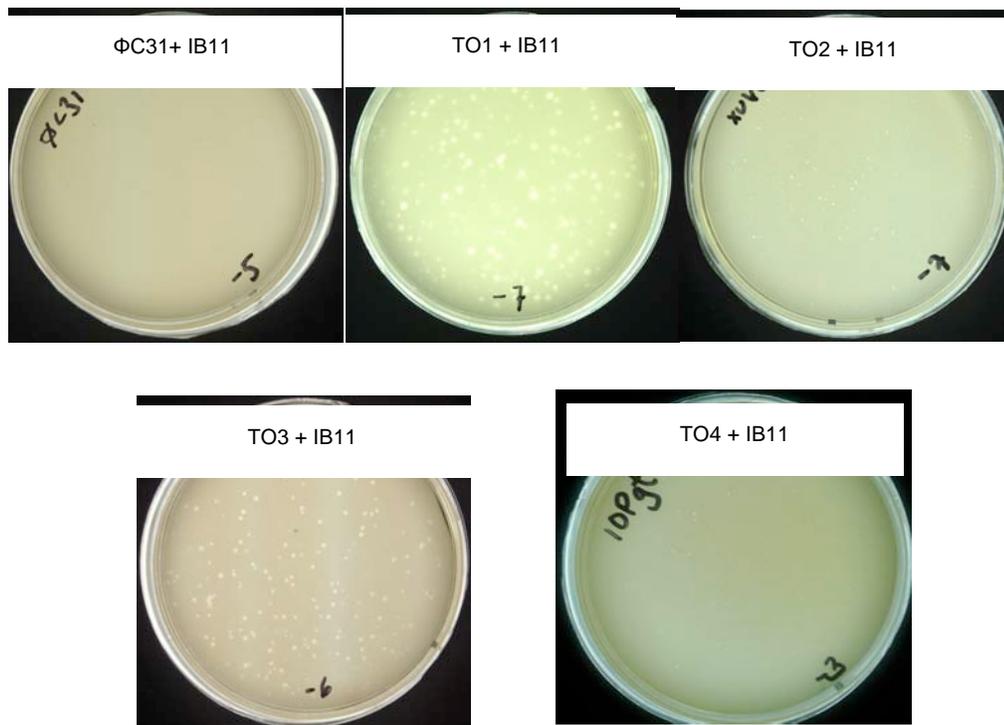


Figura 13: se muestra que todos los fagos fueron capaces de infectar la cepa *S. coelicolor* IB11, la cual no es capaz de glicosilar, excepto el control negativo Φ C31.

8. Discusión de resultados

El objetivo de este trabajo consistió en determinar si el sistema de restricción de DNA metilado (es decir de tipo IV) de *S. coelicolor* es un sistema eficiente para contener la infección de fagos cuando estos contienen DNA metilado. Para resolver esta pregunta, se aislaron diversos fagos capaces de infectar a esta especie y que contenían en su genoma múltiples sitios para diferentes sistemas de metilación, con el fin de contar con estos fagos tanto con su genoma metilado como sin metilar.

Una de las observaciones que los resultados de este trabajo nos permitió realizar, fue que el DNA de los actinofagos con los que trabajamos no se metilaba eficientemente *in vivo* con las metilasas de tipo II M.SacI, M.SalI y M.SphI. Estos son sistemas provenientes de otras especies del género *Streptomyces* por lo que es posible que dichos fagos puedan de forma natural adquirir estas modificaciones. Esto es importante, pues los trabajos previos sobre el sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor* se muestran el efecto de la restricción sobre plásmidos, los cuales fueron modificados eficientemente *in vivo* por los sistemas de metilación de *Escherichia coli* Dam, Dcm y Hsd. En este caso se demostró que *S. coelicolor* restringe fuertemente el DNA metilado de estos plásmidos (González-Cerón et. al., 2009).

Una de las diferencias al metilar el DNA plasmídico y el DNA del fago es el tiempo en el que ambos materiales genéticos se encuentran en contacto con las metilasas expresadas dentro de las bacterias; en el caso de los plásmidos, éstos permanecen dentro de su hospedero, y se replican al mismo tiempo que éste replica su genoma, de tal manera que están constantemente en contacto con las metilasas expresadas, por lo que es más probable que éstas metilen sus sitios de reconocimiento. Por otro lado, el DNA del fago, después de ser introducido en la célula, se replica y es posteriormente encapsulado dentro de la cápside para

formar un nuevo fago maduro, el cual posteriormente saldrá del hospedero (ciclo lítico). Esto quiere decir que el tiempo en el que el DNA del fago recién duplicado puede estar en contacto con las metilasas celulares, es mucho más limitado.

Una posible explicación para la falta de metilación eficiente del DNA fágico era la baja expresión de los genes que codifican las metilasas *M.SacI*, *M.SalI* y *M.SphI* especialmente en las cepas construidas inicialmente, en las que la expresión depende de los propios promotores de los genes. Una baja expresión ocasionaría que los niveles de estas enzimas fueran limitantes. Para eliminar esta posibilidad, se hicieron las construcciones en las que la expresión de los genes de las metilasas depende de un promotor muy fuerte e inducible, el promotor P_{tipA} . De esta forma obtuvimos las cepas 1326pJsaclIM, 1326pJsalIM y 1326pJsphIM. A partir de éstas, pudimos observar que sólo la cepa que expresa la metilasa *M.SphI* tiene una actividad aparentemente mayor al expresarse bajo el promotor inducible P_{TipA} , pues los genomas de los fagos TO1 y Φ C31 se metilaron mejor al propagarse en la cepa 1326pJsphIM. En cambio, la expresión de la metilasa *M.SalI* bajo ese promotor pareció resultar menor que en la cepa en la que el gen para esta metilasa se expresaba de su propio promotor ya que el fago TO1 se metiló completamente al propagarse en la cepa 1326salIM, pero no al propagarse en 1326pJsaIM. Por otra parte, la metilasa *M.SacI* en ningún caso pudo metilar sus sitios de reconocimiento en el DNA de los fagos. Como control se observó que en todos los casos el DNA genómico de estas cepas se metilaba casi en su totalidad, ya que era prácticamente resistente a la digestión por las enzimas de restricción correspondientes. Es decir, que la incapacidad de las cepas de metilar ineficientemente al DNA, solamente se presentaba sobre el DNA fágico.

Aunque la expresión de las metilasas en las cepas 1326saclIM, 1326salIM, 1326sphIM, 1326pJsalIM, 1326pJsaclIM y 1326pJsphIM metilaron efectivamente el DNA del hospedero, en la mayoría de los casos salIM y saclIM no metilaron el DNA de los fagos. Una posibilidad para explicar la diferencia entre la metilación completa del DNA genómico y la metilación incompleta del de los fagos, es que el

DNA de las cepas estuvo constantemente en contacto con las metilasas mientras que el DNA de los fagos estuvo en contacto con dichas enzimas solamente el tiempo en que su DNA se replica activamente hasta el momento de su empaquetamiento dentro de las cápsides. Es decir, que dentro de las células en un tiempo muy corto se sintetiza una gran cantidad de DNA fágico, que se replica activamente y las metilasas podrían no alcanzar a metilarlo en todo ese tiempo. Esto podría también explicar por qué algunos de los genomas de los fagos sí se metilaron, ya sea con las metilasas bajo su propio promotor o bajo el promotor inducible P_{tipA} ya que es probable que no todos los fagos tengan el mismo tipo de propagación. Esto querría decir que los fagos que sí se metilaron probablemente tienen un tiempo de replicación mayor y/o un tiempo de maduración mayor que aquellos que no se metilaron.

Se han hecho estudios en el fago T4 de *E. coli*, por lo que se sabe que la síntesis de DNA de éste fago comienza 6 minutos después de la infección a 30°C. El número de equivalentes del genoma en la célula aumenta de 40-80 veces en 12 minutos, que es cuando empieza la maduración (Birge, E. 2006). Por otro lado, un estudio con el actinofago Φ C31 muestra que la síntesis de DNA aumenta alrededor de 10 minutos después de que este es inducido por temperatura (Rodríguez, A. et al. 1986), pero no se sabe cuánto tiempo dura ésta etapa hasta la maduración. No obstante, no se han hecho estudios comparando la velocidad de la replicación del DNA entre diferentes fagos que puedan confirmar que hay algunos cuyo DNA pueda estar más tiempo en contacto con las metilasas expresadas por el hospedero. De cualquier manera, en todos los casos el ciclo de replicación de los genomas de los fagos se presenta durante un tiempo muy corto, en el que se sintetiza una cantidad muy grande de DNA.

Otra posibilidad que podría provocar que algunos fagos se metilen y otros no, es el tamaño del genoma del fago. Aunque éstos se repliquen a la misma velocidad, si el genoma de uno es más grande que el de otro, posiblemente no sea metilado efectivamente. Adicionalmente, una posibilidad para explicar las diferencias en

metilación podría ser en número de copias de cada fago que se produce en cada ciclo, ya que un fago que sintetice menos copias de su genoma tendrá una mayor posibilidad de ser metilado que un fago que sintetice muchas más copias. Sin embargo, estas dos posibilidades son poco probables ya que los fagos que no se metilaron, mostraron digestiones completas de su DNA, y no parciales (como sería en el caso de no estuvieran completamente metilados), y los que si se metilaron lo hicieron casi en su totalidad, por lo que es probable que haya otra explicación para la falta de metilación del genoma de los fagos

Algunos estudios en los fagos T7 y T3 de *E. coli* han revelado que codifican en su genoma proteínas que evitan la metilación. En el caso de T7 la proteína Ocr impide que el DNA del fago sea metilado por metilasas tipo I. Por otro lado, el fago T3 tiene la proteína Ocr con un dominio de S-adenosilmetionina hidrolasa que también bloquea la actividad de las metilasas tipo I. Sin embargo, también se sabe que el fago T7 contiene sitios *dam* y *dcm* que no son metilados o que apenas son metilados. No se sabe cuál es la causa de esto último. (Krüger et. al., 1988). De acuerdo con esto, otra posible causa de que el DNA de los fagos TO2, TO3 y TO4 de éste estudio no se metilen, es que contengan algún mecanismo para evitar la metilación, como pudiera ser una proteína que interfiriera con la actividad de las metilasas. Esto sería interesante ya que hay pocos reportes de que esto suceda, y también hay poca información sobre qué mecanismos podrían ser los que actúan para evitar la metilación de DNA en los fagos.

A pesar de las dificultades para obtener fagos con DNA metilado, sí fue posible en el caso de los fagos TO1 y Φ C31, lo que nos permitió observar cuál era el efecto del sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor* sobre los mismos, lo cual era el objetivo principal de este trabajo. Estos experimentos nos mostraron que *S. coelicolor* no fue capaz de restringir fuertemente la entrada de los fagos TO1 y Φ C31 cuando su DNA fue metilado, en comparación con los mismos cuando su DNA no se encontraba metilado. Esta observación fue inesperada y contrasta con estudios anteriores que demuestran que *S. coelicolor* restringe muy

fuertemente la entrada de plásmidos que han sido metilados *in vivo* por los sistemas Dam, Dcm y Hsd, o *in vitro* por diferentes metilasas de tipo II comerciales (González-Cerón et al., 2009). Por otro lado, también hay evidencia de que hay enzimas de restricción tipo IV que son capaces de restringir la infección de fagos con DNA modificado (Xu, S. et. al. 2011.) Sin embargo, los resultados de las pruebas de restricción en este caso, nos mostraron que al menos para estos dos fagos, el sistema de *S. coelicolor* no actúa eficientemente. Además, en el caso de TO1, parte de la restricción observada se debe a otra modificación realizada por *S. lividans*, como es la fosforotioación, más que a la metilación. La actividad de restricción sobre DNA modificado por fosforotioación ya había sido reportada en una de las endonucleasas metil-específicas de *S. coelicolor*, la ScoA3McrA, que es capaz de reconocer sitios fosforotioados en el DNA y cortarlos. (Liu G. et. al., 2010). Aunque esto no había sido reportado para fagos, nuestro trabajo demuestra que el sistema de restricción de *S. coelicolor* también es capaz de restringir DNA fosforotioado *in vivo*. Aún así, la restricción que ejerce sobre éste tipo de modificación es débil, como en el caso de la metilación.

Debido a la escasa restricción que se observó hacia los fagos con DNA metilado, podemos decir que en esta bacteria, el sistema de restricción no funciona como un sistema de defensa eficiente contra la infección por fagos. La mayor restricción que vimos fue de un orden de magnitud. Adicionalmente, la desviación estándar en las pruebas de infección fue alta, lo cual pudo deberse, entre otras cosas, a que se usaron diferentes stocks de esporas y, en algunos casos, de fagos. Sin embargo, lo que en ningún caso observamos fue una restricción fuerte debida exclusivamente a la metilación.

Se reportó que la actividad del sistema de restricción de *S. coelicolor* con la enzima de restricción SauUSI de *Staphylococcus aureus* sobre el DNA del fago λ modificado por Dcm es de al menos 4 órdenes de magnitud (Xu, S., 2011). Por otro lado, al compararlo con la actividad de las enzimas de restricción tipo I, II y III,

estos pueden restringir el DNA de fagos hasta 5 órdenes de magnitud (Blumenthal y Cheng, 2002).

Hay que resaltar que los experimentos realizados en este trabajo se hicieron de tal manera que pudiéramos observar fenómenos que pueden ocurrir naturalmente en el suelo, durante la interacción de la bacteria con los fagos, ya que se utilizaron sistemas de metilación presentes en especies de *Streptomyces*. Por esto, creemos que es muy probable que pueda haber en el suelo fagos metilados en sitios *SaII*, *SaI* y *SphI* infectando a *S. coelicolor* de forma natural. En el caso de estudio con plásmidos metilados (González-Cerón et al., 2009) éstos fueron introducidos en forma artificial mediante transformación de protoplastos, utilizando sistema de metilación de *E. coli*. Estas diferencias entre infección con fagos y transformación artificial con plásmidos pudiera contribuir a las diferencias observadas en cuanto a la fuerza de la restricción ejercida por *S. coelicolor*.

La fuerte restricción que el sistema tipo IV de *S. coelicolor* ejerció contra el plásmido pSET152 metilado pero no contra el DNA fágico metilado podría deberse a una diferencia fundamental entre el comportamiento de ambos DNAs una vez que están dentro de la célula. El plásmido pSET152 es un vector integrativo, que no se replica en *Streptomyces*, el cual contiene el gen *int* para la integrasa proveniente del fago Φ C31, y además contiene el sitio de recombinación *attP* del fago. Por su parte, varias especies de *Streptomyces* contienen un locus *attB* en su genoma (Combes P. et al. 2002), lo cual quiere decir que este plásmido se integra en el genoma de *S. coelicolor* y, por lo tanto, se replica junto con él. Al entrar el plásmido pSET152 a la célula, primero debe expresarse el gen *int* que codifica la integrasa que provoca la recombinación entre el *attP* del plásmido y el *attB* del cromosoma. Una vez integrado, el plásmido debe de ser replicado junto con el cromosoma, por lo que hasta ese momento se mantiene metilado. La duración de este proceso podría permitir que, mientras se expresa la integrasa, el plásmido es integrado al genoma y se replica, las enzimas de restricción específicas de DNA metilado podrían actuar cortándolo y por esto se puede

observar un efecto fuerte del sistema de restricción. Por otra parte, como se mencionó previamente, se ha observado que el DNA fágico comienza a replicarse rápidamente al entrar a la célula y aumenta el número de genomas fágicos 10 minutos después de la infección. Esto quiere decir que hay un margen de tiempo mucho menor en el que las enzimas de restricción del hospedero pueden actuar sobre el DNA del fago metilado después de que éste infecta a la célula. Una vez que el DNA fágico se replica, aunque sólo sea una vez, el DNA ya no estaría metilado y por lo tanto el sistema de restricción ya no podría degradarlo.

Otra diferencia que podemos resaltar entre las pruebas con fagos y plásmidos, es el número de sitios de reconocimiento dentro de plásmidos (pSET152) como de los fagos, y la diferencia de éstos sitios (en el trabajo de plásmidos *Dam*, *Dcm* y *Hsd* y en fagos *SacI*, *SalI* y *SphI*). No obstante, según el trabajo de González-Cerón et al. (2009), la cantidad de sitios metilados en plásmidos no está relacionada con la fuerza de la restricción.

También se ha encontrado que el fago T4 tiene un gen que codifica para la proteína IPI, la cual se une a la proteína GmrSD (encargada de degradar DNA con citosinas hidroximetiladas) e impide que ésta degrade el DNA fágico modificado (Rifat, D., et al. 2008). Esto abre la posibilidad de que los fagos utilizados en este trabajo, cuyo DNA se encuentra metilado, puedan contener algún gen que codifique para una proteína que impida el reconocimiento o la degradación de su DNA.

Hay evidencia de que los sistemas de restricción contra DNA metilado provocan una fuerte incompatibilidad con distintos sistemas de metilación, lo que ha llevado a algunos autores a plantear que se trata de elementos genéticos “egoístas”, que evitan el establecimiento de sistemas de metilación en las células en las que se expresan (Fukuda et al. 2008., Liu et al. 2010., Raleigh y Wilson, 1986.) En el laboratorio del Dr. Luis Servín se han hecho estudios que demuestran la incompatibilidad del sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor* con

metilasas de sistemas de modificación-restricción de tipo II, ya que al intentar introducir el gen *sphM* (que codifica M.SphI) en *S. coelicolor* se observó que esto era imposible, ya que la células morían. En cambio, al introducir la misma metilasa en *S. lividans*, ésta podía expresarse y modificar el DNA genómico. También se observó incompatibilidad al introducir el gen de *S. coelicolor* *sco5333* (el cual codifica una enzima de restricción específica de DNA metilado), en *S. lividans* junto con el gen *sacIM* (Martínez-Morales, A., datos no publicados). Recientemente también se encontró que el gen *sco5330* es incompatible con la expresión de la metilasa Dam (la cual metila adeninas) (Cadena-Sandoval, 2014), y con la expresión de la metilasa M.SaII (la cual también metila adeninas) (Martínez-Morales, datos no publicados). Asimismo, la expresión de la metilasa Dam en *S. coelicolor* es letal debido nuevamente a la incompatibilidad con la metilasa codificada por el gen *sco5330* (Cadena-Sandoval, 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que efectivamente el papel de las enzimas pertenecientes al sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor* no constituyen una defensa eficiente contra el ingreso de fagos con DNA metilado. Sin embargo, hace falta estudiar con mayor profundidad el comportamiento del sistema de restricción de *S. coelicolor*, antes de definir si se comporta más como un sistema genético egoísta que como un sistema de defensa

9. CONCLUSIONES

- El sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor* restringe pobremente la infección de fagos con DNA metilado en sitios *Sall* y *SphI*. Esto quiere decir que no funciona de manera efectiva como una defensa en contra de la infección por fagos.
- El sistema de restricción de *S. coelicolor* reconoce y restringe la fosforotioación en el DNA de fagos.
- La permisividad a la metilación de su DNA es fago-específica.
- Parece que algunos fagos tienen un mecanismo intrínseco que impide que su DNA sea metilado en sitios *Sall* y *Sacl*.

10. PERSPECTIVAS:

- Analizar el genoma de los fagos que no pudieron ser metilados para compararlo con la secuencia del gen *ocr*, y ver la posibilidad de que estos fagos tengan una proteína homóloga.
- Analizar el genoma de los fagos que no fueron efectivamente restringidos, para estudiar la posibilidad de que contengan un gen homólogo a *ip1*.
- Aislar una mayor cantidad de actinofagos para determinar si la evasión de la metilación es un fenómeno generalizado.

12. BIOBLOGRAFÍA:

- Alvarez M, Gomez A., Gomez P., Rodicio M. 1995. Expression of the Sall restriction-modification system of *Streptomyces albus* G in *Escherichia coli*. *Gene*.157(2):231-232.
- Anderson A., Wellington E. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.* 51: 797-814.
- Bair C. y Black L. 2007. A type IV modification dependent restriction endonuclease that targets Glucosylates Hydroxymethyl Cytocine modified DNAs. *J. Mol. Biol.* 366:768-778.
- Bair C., Rifat D., Blak L. 2006. Exclusion of Glucosyl-hydroxymethylcytocine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein IPI. *J. Mol. Biol.* 366:779-789.
- Bheemanaik S., Reddy Y., Rao D. 2006. Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochem. J.* 399:177-190.
- Bentley S. *et al.* 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *S. coelicolor*. A3(2). *Nature.* 417(6885)141-147.
- Birge E. 2006. *Bacterial and Bacteriophage genetics*. 5th edition Springer. USA.
- Blumenthal R. y Cheng X (2002). *Restriction-Modification Systems*. *Modern Microbial Genetics*.
- Cadena, M. 2014. La expresión de la metil –transferasa Dam de *Escherichia coli* es letal en *Streptomyces coelicolor* y se debe a la presencia de una nucleasa adquirida por transferencia horizontal. Licenciatura. UNAM, México.
- Dalin R., Wright N., Varney K., Weber D. y Black L. 2007. Restriction endonuclease inhibitor IPI of bacteriophage T4: a novel structure for a dedicated target. *J. Mol. Biol.* 375: 720-734.
- Combes P., Till R., Bee S., Smith M. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo attB sites for the phiC31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* 184(20): 5746-5752.

- Diaz L., Hardisson C. y Rodicio R. (1989). Isolation and Characterization of Actinophages infecting *Streptomyces* species and their interaction with host restriction-modification. *Journal of General Microbiology*. 135:1847-1856.
- Eckstein F. 2007. Phosphorylation of DNA in bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 3(11): 689-690.
- Fukuda E., Kaminska K., Bujnicki J. y Kobayashi I. 2008. Cell death upon genome methylation: a novel function of methyl-specific deoxyribonuclease. *Genome Biology*. 9:R163.
- Gonzalez-Ceron G., Miranda-Olivares O., Servín-González L. 2009. Characterization of methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol. Lett.* 301(1):35-43.
- Gormley N., Watson M., Halford S. 2005. Bacterial restriction-modification systems. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Gregort M., Till R., Smith M. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.* 185(17):5320-5323.
- Honda N. y Kobayashi I. (1999). Post-segregational killing by restriction-modification gene complexes: observations of individual cell deaths. *Biochimie*. 81:931-938.
- Hopwood D. 2006. Soil to genomics. The *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* c10:1-23.
- Huang J. *et. al.* Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 58(5):1276-1287.
- Ishikawa K., Fukuda E. y Kobayashi I. (2010). Conflicts targeting epigenetic systems on their resolution by cell death: novel concepts for methyl-specific on other restriction systems. *DNA Research*. 17:325-342.
- Jayapal, K., Lian W., Glod I., Sbermal D., Hu W. 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic island in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics*. 8: 229.

- Kieser T., Bibb M. *Et al.* 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwhich , JhonnINNES.
- Kobayashi I. (2001). Behaviour of Restriction-Modification Systems as Selfish Mobile Elements and their Impacto on Genome Evolution. Oxford University Press. 18:3742-3756.
- Krüger D. y Bickle T. (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* 57(2): 434-450.
- Krüger D., Schroeder S., Sanibanez-Koref M., Reuter M. 1988. Avoidance of DNA methylation. 15:87-95.
- Liu G., Ou H., Wang T., Tan., Zhou X., Rajakumar K., Deng Z., y He X. 2010. Cleavage of phosphorothioated DNA and Methylated DNA by type IV restriction endonuclease ScoMcrA. *PLoS Genetics.* 6.
- Lomovskaya N., Chater K., Mkrtumian N. 1980 Genetics and molecular biology of *Streptomyces* phages. *Microbiol Rev.* 44: 206- 229.
- MacNeil D. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 170(12): 5607-56012.
- Mark R., Dryden T. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Current opinión in microbiology.* 8:466-472.
- MacNeil D., Gewain K., OcciJ., Foor F. 1992. Vectors of generating nested deletions and facilitating subcloning G+C-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. *Gene* 119(1):159-150.
- Norrander J., Kempet T., Messing J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis. *Gene.* 26(1):101-106.
- Lima-Procopio R., Silva I., Martins M., Azevedo J. y Araujo J. 2012. Antibiotic produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect Dis.* 16(5): 466-471.
- Cadena, M. 2014.
- Raleigh E., Wilson G. 1986. *Escherichia coli* K12 restrictis DNA containing 5-methylcytocine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9070-9074.

- Rifat D., Wright N., Varney K., Weber D., Black L. 2008. Restriction endonuclease inhibitor IPI of bacteriophage T4: a novel structure for a dedicated target. *Journal of Molecular Biology*. 375: 720-734.
- Rodicio M., Chater K. 1988. The Sall (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Gene* 74(1): 39-42.
- Rodicio M., Quinton-Jager T., Moron L., Slatko B., Wilson G. 1944. Organization and sequence of the Sall restriction-modification system. *Gene*. 151:167-172.
- Rodriguez A., Caso J., Hardisson C., Juárez J. 1985. Characteristics of the developmental cycle of Actinophage fiC31. *Journal of General Microbiology*. 132:1695- 1701.
- Smith M., Burns R., Wilson S., Gregory M. 1999. The complete genome sequence of the *Streptomyces* temperate phage phiC31: evolutionary relationships to other viruses.
- Tock M., Dryden D. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Current opinion in Microbiology*. 8:466-472.
- Wong L., Chen S., Xu T., Taghizadeh J., Wishnok J., Zhou X., You D., Deng Z., Dedon P. 2007. Phosphorotioation of DNA in bacteria by dnd genes. *Nature Chemical Biology*. 3(11): 709-710.
- Xu X., Corvaglia A., Chan S., Sheng I. y Linder P. 2011. A type IV modification dependent restriction enzyme SasUSI from *Staphilococcus aureus* subs. *aureus* USA 300. *Nuclei Acids Research*. 39(13): 5597-5610.
- Xu *et. al.* 2009. DNA phosphorothyoation in *Streptomyces lividans*: mutation analysis of the dnd locus. *BMC Microbiol.* 9:41.
- Zheng Y., Coher-Karni D., Chin H., Wilson G., Pradhon S. Roberts R. 2010. A unique family of Mrr-like modification-dependent restriction endonucleases. *Nuclei Acids Research*. 36(16): 5527-5534.
- Zhou X., He X., Li A., Lei F. Kieser T., Deng Z. 2004. *Streptomyces coelicolor* A3(2) lacks a genomic island present in the chromosome of *Streptomyces lividans* 66. *Applied and Enviromental Microbiology*. 70(12): 7110-7118.

12. ANEXOS:

1. Medios de cultivo y Buffer

DNA (Difco Nutrient Agar)

DNA	2.3 g
Agua desionizada	100 mL

SNA (Soft Nutrient Agar)

DNB	0.8 g
Agar	0.5 g

Aforar en 100 mL con agua Milli-Q

DNB

DNB	0.8
-----	-----

En 100 mL de agua Milli-Q

MS

Manitol	2 g
Harina de Soya	2 g
Agar	0.2 g

Aforado a 100 mL agua Milli-Q

YT2X

Bacto triptona	1.6 g
Extracto de levadura	1 g
NaCl	0.5 g

Aforado a 100 mL agua Milli-Q

LB + sacarosa 25%

Bacto triptona	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	1 g
Sacarosa	25 g
Aforado a 100 mL agua Milli-Q	

Buffer SM

Tris-HCl (1M, pH 7.5)	2 mL
Mg ₂ SO ₄ (1M)	0.1 mL
NaCl (5M)	2 mL
Gelatina	0.1 g
Aforado a 100 mL agua Milli-Q	

Buffer TE

Tris-HCl (10 mM, pH8)	0.5 mL
EDTA-Sodio (1 mM, pH8)	0.4 mL
Aforar a 100 mL agua Milli-Q	

2. Protocolos utilizados

Protocolo 1: Aislamiento de fagos nuevos de *Streptomyces*

1. Mezclar en un matraz una pequeña cantidad de suelo (10 g) con 20 ml de DNB, 100 μ L de esporas de *Streptomyces*, glucosa 0.5% y Ca(NO₃)₂ 4 mM.
2. Incubar toda la noche a 30°C en agitación.
3. Vaciar el contenido del matraz en tubos de centrifuga de 20 mL.
4. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min.
5. Transferir el sobrenadante a otro tubo de 20 mL y filtrarlo a través de un filtro estéril de 0.45 μ m, usando una jeringa de 10 mL, dentro de un tubo con tapa de rosca
6. Diluir 0.1 mL del filtrado hasta 10⁻² en SM.

7. Plaquear 0.1 mL de las muestras diluidas y sin diluir con 20 μ L de esporas en 2.5 ml de SNA.
8. Incubar toda la noche.

Protocolo 2: Ensayos de placa

1. Diluir la suspensión de fagos (stock) en series de 10 en buffer SM.
2. Tomar 0.1 mL de cada dilución y mezclarlas con las esporas de la cepa indicadora y SNA.
3. Verter ésta mezcla en cajas de Petri con medio DNA (Difco Nutrient Agar) y remover hasta que cubra toda la superficie.
4. Dejar reposando durante 5-10 min.
5. Invertir las cajas y dejar incubando toda la noche a 30°C.
6. Contar las placas al siguiente día.

Protocolo 3: Aislamiento de placa

1. Se toma una placa que esté perfectamente aislada y se succiona con una pipeta Pasteur estéril. Se transfiere a 1 ml de buffer SM. Se deja reposando durante 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar, el SM se utiliza para un segundo round de aislamiento usando el sistema de ensayo de placa.

Protocolo 4: Obtención de stocks con un título alto

1. Diluir 0.1 mL de una suspensión de fagos en series de 10 hasta llegar a 10^{-5} usando Buffer SM.
2. Mezclar 0.1 ml de cada muestra con esporas y SNA.
3. Verter ésta mezcla en cajas Petri con DNA y remover hasta que cubra uniformemente la superficie.
4. Dejar reposando de 5.10 min.

5. Incubar toda la noche a 30°C.
6. Al día siguiente inundar con 2.5 mL de Buffer SM las dos cajas que contengan las placas casi confluentes.
7. Dejar reposar 2 horas a temperatura ambiente.
8. Pipetear el Buffer de las cajas y filtrarlo a través de un filtro estéril de 0.45 µm usando una jeringa de 10 mL, dentro de un tubo de rosca.
9. Guardar a 4°C.

Protocolo 5: Purificación de DNA de fago

1. Crecer fagos durante toda la noche en capas de SNA con las esporas hospederas en 6 cajas inoculadas con 0.1 ml de una dilución del stock de fago en Buffer SM que de placas casi confluentes.
2. Usando una espátula, raspar la capa de SNA y colocarla en 25 mL de DNB en tubos de centrifuga de plástico. Succionar con una pipeta de 10 mL varias veces. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 horas.
3. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min para remover el agar.
4. Verter el sobrenadante en tubos de ultracentrifuga de 30 mL y centrifugar a 50,000 rpm durante 30 min para sedimentar los fagos.
5. Descartar el sobrenadante y agregar 2 mL de SM con RNAasa 40 µg/mL incubar el una incubadora orbital por 20 min.
6. Transferir a un tubo de vidrio y agregar 400 µL de mezcla SDS; incubar a 70°C durante 30 min.
7. Inmediatamente agregar 500 µL de acetato de potasio 8M y dejar en hielo durante 15 min.
8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 30 min.
9. Decantar el sobrenadante en un tubo de vidrio.
10. Agregar 7 mL de TE.
11. Agregar 10 ml de isopropanol y mezclar.
12. Pasar la malla de DNA a un tubo ependorff y resuspender en 1 mL de TE.
13. Agregar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M.

14. Agregar un volumen de fenol cloroformo de tal forma que quede una relación 1:1.
15. Agitar en el vórtex y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min. Sacar la fase superior sin la interfase. Repetir hasta que la interfase quede limpia.
16. Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M.
17. Agregar 1 volumen de isopropanol y mezclar. Sacar todo el líquido.
18. Lavar en DNA precipitado con etanol 70%.
19. Remover el etanol y secar.
20. Resuspender en 20-100 μ L de buffer TE según la cantidad de DNA. Guardar a -20 °C.

Protocolo 6: Transfromación de *E. coli* por electroporación

1. Se preparan células de *E. coli* electrocompetente creciendo un precultivo de la cepa en un tubo de ensaye estéril con 3 mL de medio YT2X con los antibióticos necesarios durante toda la noche a 37 °C.
2. Posteriormente se inocula con 0.3 mL del precultivo a 20 mL de medio SOB en un matraz Erlenmeyer con los antibióticos necesarios. Se deja crecer hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6.
3. Se centrifuga en un tubo estéril durante 10 min a 6,000 rpm.
4. Se descarta el sobrenadante y las células se lavan con 10 ml de glicerol al 10%.
5. Se repiten 2 veces los pasos 3 y 4.
6. En el ultimo lavado se deja una pequeña cantidad de glicerol para resuspender las células.
7. Se hacen alícuotas de 50 μ L. Se toma una y el resto se almacenan -70 °C.
8. A la alícuota se le agrega la cantidad de DNA necesario, se agita y se pasa a una celda de electroporación previamente enfriada en hielo.
9. Se da un pulso con el programa Ec1 en el electroporador Biolabs.
10. Se le agrega 1mL de YT2X a la celda, se mezcla y se pasa a un tubo de ensaye estéril. Se incuba a 37 °C durante 1 hora con agitación.

11. Se trasladan las células a un tubo eppendorff y se centrifuga durante 10 min a 6000 rpm.
12. La pastilla de células se resuspende en 0.3 ml de YT2X.
13. Se hacen diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} . Se plaquean en cajas de LB con los antibióticos necesarios.

Protocolo 7: Conjugación de *E. coli* – *Streptomyces*

1. Hacer un pre cultivo de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene el vector a transferir, en 3ml de medio líquido YT2X con de apramicina 50µg/mL, cloranfenicol 25µg/mL y kanamicina 50µg/mL. Incubar toda la noche a 37°C en agitación.
2. Inocular con el precultivo un matraz con 20mL de medio YT2Xy los mismos antibióticos a las concentraciones arriba descritas Incubar de 4-5 horas a 37°C en agitación hasta una DO de 600 nm.
3. Centrifugar el cultivo a 6000rpm 10 min a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante.
4. Lavar tres veces con 20 mL de YT2X a 6,000rpm 10 min a temperatura ambiente.
5. Resuspender el pellet en 0.3ml de YT2X.
6. Aparte, a 50µL de una preparación concentrada de esporas de *S. lividans* 1326, dar un choque térmico a 50°C por 10 min.
7. Juntar las esporas de *S. lividans* con *E. coli* resuspendida en YT2X. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .
8. Plaquear en medio MS con MgCl₂ 10mM.
9. Incubar a 30°C y a las 18-20 horas inundar la superficie de las cajas de conjugación con 1 mL de agua estéril que contiene 25µL de ácido nalidíxico y 20µL de apramicina.

Protocolo 8: Obtención de stocks de esporas de *Streptomyces*

1. Se inocula en cajas petri con medio MS y antibiótico de ser necesario, esporas de manera confluyente y se dejan incubar a 30°C durante una semana o hasta que hayan esporulado perfectamente.
2. A cada caja se le agregan 5 ml de agua estéril y se cosechan las esporas con el asa bacteriológica.
3. Se recupera el agua con las esporas y se pasa por un filtro. De ser necesario se añade agua al filtro para recuperar todas las esporas.
4. El filtrado se centrifuga en un tubo estéril a 3500 rpm durante 10 min.
5. Se elimina el sobrenadante y se repite el paso 4.
6. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las esporas en un volumen adecuado de glicerol al 20%. Se almacena en un vial a -20°C.

Protocolo 9: Purificación de DNA genómico de *Streptomyces*.

1. Inocular un tubo con 3 ml de medio LB-sacarosa con 15 μ l de esporas. Se deja incubar durante 36-40 horas a 30°C.
2. Se centrifuga 10 min. a 13200 rpm. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 500 μ L de una solución de lisozima (2.5 mg/mL) entre 25mM.
3. Se incuba a 37°C hasta que se observe viscoso y translúcido.
4. Se añaden 200 μ L de solución de Kirby 2x y se agita vigorosamente.
5. Se añade 1 volumen de fenol/cloroformo y se agita. Se centrifuga 10 min. a 13200 rpm.
6. Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio sin interfase.
7. Repetir los pasos 5 y 6 las veces que sea necesario hasta que la interfase se vea limpia.
8. Tomar la fase acuosa en un tubo limpio y añadir 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol.

9. Recolectar el DNA y eliminar el sobrenadante.
10. Resuspender el DNA en TE 10mM pH=8 y agregar RNAsa a una concentración final de 40 µg/mL. Dejar incubando 1 hora a 37°C.
11. Una vez resuspendido repetir los pasos 5 y 6 hasta obtener una interfase limpia.
12. Precipitar agregando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
13. Recolectar el DNA y eliminar el sobrenadante. Resuspender en un volumen adecuado de TE.

Protocolo 10: Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión.

1. Correr un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.6 % durante toda la noche y teñir con bromuro de etidio 1 µg/mL. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas procurando ser lo más preciso posible.
2. Se funde el fragmento del gel en un tubo ependorff a 65-70 °C durante 10 min. Se calcula el volumen y se añade 1/10 de NaCl 5M. Se mezcla y se deja 5 min más a la misma temperatura.
3. Saturar fenol con NaCl de la siguiente manera: mezclar en un ependorff 100 µL de NaCl 5M, 400 µl de agua y 500 µL de fenol. Centrifugar 1 min, retirar la fase acuosa y dejar el fenol a 37 °C.
4. Colocar la agarosa a 37 °C durante 5 minutos. Añadirle el fenol saturado 2/3 de su volumen e inmediatamente agitar en el vortex. Centrifugar en la microfuga 5 minutos y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
5. Añadir al fenol 90 µL de TE y 10 µL de NaCl 5M. Agitar en el vortex.
6. Centrifugar 2 minutos y transferir la fase acuosa a la anterior.
7. Añadir un volumen de fenol cloroformo a la fase acuosa, agitar en el vortex y centrifugar durante 2 min.

8. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y repetir el paso anterior pero sólo con cloroformo.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y agregar 1 volumen de isopropanol. Para aumentar la cantidad de DNA recuperado añadir 1 μL de glucógeno. Mantener a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 2 horas.
10. Centrifugar en la microfuga a 14,000 rpm durante 10 min, y extraer el sobrenadante cuidadosamente. Secar la pastilla.
11. Resuspender en un volumen adecuado de TE.

Protocolo 11: reacción de ligación:

1. En un tubo eppendorf se agregan: 2 μL de amortiguador de ligasa t4 5X, el vector, el inserto, 1 μL de Ligasa T4HC y se lleva a un volumen final de 10 μL con agua desionizada.
2. Se agita y se da un pulso en la microfuga y se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente.
3. Para transformar *E. coli* se precipita agregando 1 μL de glucógeno, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
4. Se deja reposar 2 horas a -20°C .
5. Se centrifuga 10 min a 13200 rpm y se deshecha el sobrenadante.
6. Se deja secando el pellet 5 min. a 50°C y se resuspende en un volumen adecuado de agua desionizada.
7. Se procede con la transformación.

Protocolo 12: Minipreparaciones de DNA plasmídico

1. De un cultivo de toda la noche se toman 1.5 ml y se pasa a un tubo eppendorf estéril, para centrifugarlo 5 min. a 6000 rpm.
2. Resuspender el pellet de células en 200 μ L de Tris 25mM, EDTA 25mM pH=8 y, para *Streptomyces*, 2mg/mL de lisozima.
3. Para *E. coli* se incuba 5 min. a temperatura ambiente, y para *Streptomyces* se incuba a 37°C hasta que la suspensión se vea translúcida y viscosa.
4. Se agregan 400 μ L de NaOH 0.2N, SDS 1%. Se mezcla perfectamente hasta que se vea transparente y viscoso. Se incuba por 10 min.
5. Se agregan 300 μ L de acetato de potasio 3M pH=4.8 y se mezcla muy bien. Debe de observarse un precipitado blanco y debe perder la viscosidad.
6. Para *Streptomyces* se centrifuga 5 min a 13200 rpm y el pellet se descarta. Se agrega posteriormente 400 μ L de fenol/cloroformo. En el caso de *E. coli* se agrega directamente el fenol/cloroformo, se agita en el vortex y se centrifuga 3 min a 13200 rpm.
7. La fase acuosa se pasa a otro tubo y se le agrega 1mL de etanol absoluto frío. Se deja 5 minutos precipitando.
8. Se centrifuga 10 min a 13200 rpm. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 50 μ L de TE (10mM tris, 10mM EDTA a ph=8) y se le agregan 150 μ L de acetato de sodio 4M pH=6. Se mezcla y se deja al menos una hora a -20°C.
9. Se centrifuga durante 10 min a 13200 rpm. El sobrenadante se pasa a un tubo limpio y se resuspende en 45 μ L de TE 10mM. Se añaden 200 μ l de isopropanol y se deja precipitar por 10 min.
10. Se centrifuga 10 min a 13200 rpm. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 45 μ L de TE 10mM. Se agregan 5 μ L de acetato de sodio M pH=6 y 125 μ L de etanol absoluto frío. Se deja 10 min precipitando.
11. Se centrifuga por 10 min a 13200 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 25 μ L de TE 10 mM.

