



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Clonación, expresión, purificación y análisis de la
actividad *in vitro* de las metilasas M.SalI, M.SacI y
M.SphI**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Diana Elizabeth Gómez Ruiz

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Gabriela González Cerón

2015

Ciudad Universitaria, D. F.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado:

1. Datos del alumno

Gómez

Ruiz

Diana Elizabeth

53 38 65 27

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307106504

2. Datos del tutor

M. en C.

Gabriela

González

Cerón

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Víctor Manuel

Valdés

López

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Rosa Laura

Camarena

Mejía

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Luis

Servín

González

7. Datos del trabajo escrito

Clonación, expresión, purificación y análisis de la actividad *in vitro* de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI

83 p

2015.

A Francisco y Alejandra

Por el apoyo incondicional que me han ofrecido siempre, por brindarme un excelente ejemplo de perseverancia, constancia y valor, por todas sus enseñanzas, por el amor que me han dado, por ser mi soporte, pilar esencial de mi vida y por el inmenso amor que les profeso, no sólo esta tesis sino mi vida. ¡LOS AMO PAPÁS!

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de ella y brindarme la mejor educación y formación.

Al Doctor Luis Servín por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ser parte de su equipo. Por sus enseñanzas, confianza, asesoría, paciencia y excelente guía en el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por haberme brindado su apoyo desde el primer día en el laboratorio, por sus enseñanzas, explicaciones, su disponibilidad de tiempo para ayudarme, su paciencia y sobre todo su grata compañía en este camino.

Al Dr. Víctor Valdés, la Dra. Laura Camarena y la Dra. Claudia Segal por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y por sus aportaciones al mismo.

A la Dra. Gloria Soberón y a su equipo de trabajo por sus observaciones y sugerencias para este trabajo en los seminarios.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, a cargo de la Dra. Laura Ongay-Larios y Biol. Guadalupe Códiz Huerta; por sus servicios de secuenciación para este trabajo.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por el financiamiento al proyecto IN207212 del PAPIIT.

A todos mis compañeros de mi segundo hogar, el laboratorio, a Kevín, Erick, Mauricio, Blanca, Angie, Monse por su compañía; a Martí, Lalo, Isaí, Tania por todas esas pláticas, las horas de comida, su apoyo en el laboratorio, por amenizar esas tarde-noches de trabajo.

A mis compañeros y amigos de la Facultad, Ivonne, Hugo, Janete, por estar compartiendo esta aventura de la Biología desde el inicio de la carrera.

A mis amigos Gerardo, Xarly, Abraham, Sheyla, Andrés, Jenny por todas las locuras que hemos compartido, las risas, los momentos de show, por su apoyo en momentos importantes de mi vida, por escucharme y por distraerme un rato, los quiero mucho. A Orlando, por el apoyo y ánimo que me has brindado siempre, por estar ahí cuando hace falta, por mantenerme despierta cuando me tenía que desvelar haciendo tarea (distrayéndome jaja) y por todos estos años de amistad, ¡te quiero!

A mi orientadora Lourdes, por ser un ejemplo de disciplina, por la guía que nos brindó a mí y a mis demás compañeros, y por su perseverancia y dedicación en su trabajo.

A mi hermana por estar conmigo, por las pláticas, por su apoyo y por ser de las personas más importantes en mi vida, ¡te quiero mucho Gaby! A mi tío Juan por el apoyo, por irnos juntos en las mañanas, por tus regaños también. Tío Fernando por interesarte en cómo iba en la escuela y por tu apoyo. A mi familia en general (Dani, Celia, Roberto, David, abuelitos, primos) por todo su cariño y ejemplos. A Mauricio por el apoyo que me brindó, su compañía y su amor, y el camino que comenzamos. Y a todas las personas que han sido una pieza clave para que yo llegara hasta aquí.

Y a ti... A ti Constanza por ser a quien más amo en este mundo, mi mayor motivación y mi todo de ahora en adelante.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1 Características generales de <i>Streptomyces</i> | 5 |
| 2.2 Sistemas de modificación-restricción (M-R) | 6 |
| 2.3 Sistemas M-R tipo I | 8 |
| 2.4 Sistemas M-R tipo II | 9 |
| 2.5 Sistemas M-R tipo III | 11 |
| 2.6 Sistemas M-R tipo IV | 12 |
| 2.7 Sistemas de restricción metil-específicos | 13 |
| 2.8 En <i>Streptomyces</i> spp | 13 |
| 2.9 Importancia de las metiltransferasas | 16 |
| 3. ANTECEDENTES | 19 |
| 4. OBJETIVOS | 21 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 5.1 Cepas, plásmidos y genes empleados en este trabajo. | 22 |
| 5.2 Clonación de los genes <i>sphIM</i> , <i>sacIM</i> y <i>sallM</i> en el vector de expresión pET28a | 23 |
| 5.3 Experimentos de inducción de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.Sall en pequeña escala. | 26 |
| 5.4 Experimentos de inducción de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.Sall en gran escala. | 27 |
| 5.5 Purificación de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.Sall. | 28 |
| 5.6 Almacenamiento de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.Sall | 29 |
| 5.7 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.Sall | 31 |
| 5.8 Optimización de la actividad <i>in vitro</i> de la metilasa M.Sall | 33 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 Experimentos de inducción de los genes para las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI en pequeña escala..... | 34 |
| 6.2 Purificación de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI..... | 36 |
| 6.3 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI..... | 41 |
| 6.4 Optimización de la actividad <i>in vitro</i> de la metilasa M.SalI..... | 46 |
| 6.5 Ensayos de actividad <i>in vitro</i> de la metilasa M.SalI con las condiciones óptimas..... | 56 |
| 6.6 Análisis de las secuencias de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI..... | 59 |
| 7. CONCLUSIONES | 69 |
| 8. PERSPECTIVAS | 70 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 71 |
| ANEXOS | 74 |

1. RESUMEN

Streptomyces es uno de los géneros del phylum actinobacteria que se caracterizan por presentar un ciclo de vida complejo y un alto contenido de guanina y citosina en su DNA. Las especies de este género son capaces de sintetizar antibióticos y otros metabolitos secundarios, lo que ha hecho que *Streptomyces* cobre una gran importancia biotecnológica; sin embargo, su uso en la industria se ha visto obstaculizado por la presencia de sistemas de restricción metil-específicos los cuales dificultan su manipulación genética.

Actualmente se cuenta con los genomas secuenciados de varias especies del género; *Streptomyces coelicolor* A3 (2) es la especie más conocida y estudiada a nivel genético y molecular. Datos obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que el sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor* es incompatible con otros sistemas de metilación. Diversos análisis bioinformáticos permitieron identificar genes que codifican para probables nucleasas que podrían estar involucradas en la restricción del DNA metilado. Algunos de estos genes fueron mutagenizados y las cepas resultantes mostraron una disminución parcial de la restricción de ciertos DNAs. Entre estos genes se encuentra el sco5330, el cual mostró incompatibilidad con las metilasas Dam, M.SphI y M.SalI; y el gen sco5333 que mostró incompatibilidad con la metilasa M.SacI.

La obtención de DNA metilado *in vitro* con las metilasas, M.SacI, M.SalI y M.SphI resulta importante para el análisis del sistema de restricción metil específico de *S. coelicolor*, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron lograr la expresión, purificación y evaluación de la actividad *in vitro* de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI; para ello se clonaron los genes de estas metilasas en el vector de expresión pET28a y se determinaron las condiciones de expresión y purificación de estas metilasas en *Escherichia coli*.

Las metilasas M.SalI y M.SphI se obtuvieron en la fracción soluble, es decir, en su estado nativo; sin embargo, se obtuvo una cantidad muy baja de M.SphI y no mostró actividad *in vitro* en los ensayos, contrario a M.SalI. La metilasa M.SacI no

se obtuvo en su estado nativo y fue sometida a un proceso de desnaturalización y renaturalización para poder ser purificada, y tampoco mostró actividad *in vitro*.

Se determinaron las condiciones de reacción óptimas para M.Sall mediante ensayos en los que se variaron las condiciones de pH y la concentración de S-adenosilmetionina, entre otras, hasta llegar a las condiciones óptimas para su actividad, que fueron pH 8, KCl 20 mM y SAM 1mM.

Finalmente se realizó un análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos de las tres metilasas y se identificaron las regiones conservadas de éstas.

A pesar de que los sistemas de modificación-restricción han sido ampliamente estudiados, los sistemas de restricción metil-específicos no son muy conocidos y con el DNA metilado *in vitro* se puede indagar más al respecto. Por otro lado, aunque las metilasas M.SphI y M.SacI no hayan mostrado actividad *in vitro*, en el presente trabajo se detalla información de las mismas, ya que a pesar de haber sido identificadas hace tiempo, no se cuenta con una caracterización detallada de éstas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características generales del género *Streptomyces*

El género bacteriano *Streptomyces* fue propuesto por Waksman y Henrici (1943), clasificado dentro de la familia *Streptomycetaceae*. Su ciclo de vida es análogo al ciclo de vida asexual de los hongos filamentosos. Se trata de bacterias Gram-positivas pertenecientes a las actinobacterias y viven como organismos saprófitos en el suelo; sin embargo, algunas especies del género *Streptomyces* han tenido éxito al habitar otros nichos, acuáticos y terrestres, e incluso algunos como patógenos de animales y plantas (Flärdh & Buttner, 2009).

Estas bacterias se caracterizan, entre otras cosas, por presentar un alto contenido de G+C en su DNA. Varias especies de este género han sido fuente de una gran cantidad de proteínas que son importantes comercial e industrialmente, pero fundamentalmente son fuente de metabolitos secundarios que han sido útiles en el tratamiento de varias enfermedades. Aspectos como los anteriores, un complejo ciclo de vida, producción de un gran número de antibióticos, entre otros, han hecho de *Streptomyces* un importante modelo de estudio en diversos campos de la ciencia.

Como se mencionó anteriormente, *Streptomyces* cuenta con un ciclo de vida complejo en lo que a diferenciación morfológica se refiere; éste comienza con la germinación de una spora de la cual emergen uno o más tubos germinativos, los cuales dan lugar a la formación de hifas. Estos tubos germinativos presentan crecimiento apical y se ramifican formando un extenso micelio vegetativo que coloniza una mayor superficie del sustrato. Posteriormente y, probablemente debido a la falta de nutrientes, comienzan a formarse hifas aéreas las cuales continúan creciendo formando compartimentos en los que se desarrollarán las nuevas esporas (Flärdh, 2009).

Actualmente se cuenta con el genoma secuenciado de múltiples especies de *Streptomyces*, entre los que se encuentra *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley, *et al*, 2002), que constituye el modelo más estudiado a nivel genético y molecular de este género; sin embargo, la presencia de sistemas de modificación-restricción, especialmente los de restricción metil-específicos, representan un obstáculo para la manipulación genética de estos microorganismos (González-Cerón, *et al*, 2009).

2.2 Sistemas de modificación-restricción (M-R)

Los sistemas de modificación-restricción (M-R) han evolucionado como una estrategia que provee a las bacterias la capacidad de distinguir el DNA propio de aquel que es extraño, el cual puede ingresar a la célula ya sea por infección mediada por bacteriófagos o por transformación. Es por ello que desde su descubrimiento en los años 50s se les considera como un simil de sistema inmune de las bacterias. Están conformados por dos actividades enzimáticas (figura 1): una endonucleasa de restricción que corta secuencias de DNA en sitios específicos y una metiltransferasa que transfiere un grupo metilo a la misma secuencia de DNA para protegerla de la actividad de la endonucleasa respectiva (Bertani, *et al*, 1953; Vasu, *et al*, 2013).

Su diversidad y alta incidencia entre las bacterias no solamente los señalan como una exitosa barrera contra la entrada de DNA exógeno, sino que además indican que los sistemas de modificación-restricción podrían tener alguna función adicional (Tock, *et al*, 2005; Vasu, *et al*, 2013).

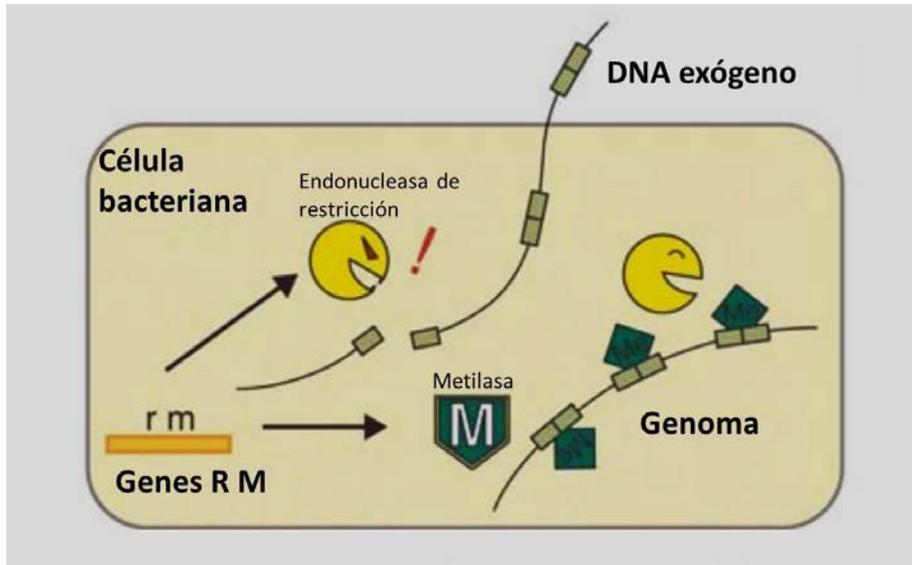


Figura 1. Sistema de modificación-restricción atacando DNA exógeno. La endonucleasa de restricción detecta y degrada al DNA exógeno que ingresa a la célula, mientras que la metilasa protege al DNA genómico agregando grupos metilo en los sitios de reconocimiento, protegiéndolo así del corte por la endonucleasa de restricción (modificado de Ishikawa, *et al*, 2010).

Los sistemas M-R se encuentran clasificados en cuatro tipos (I, II, III y IV), los cuales se diferencian por la estructura de las enzimas, las secuencias de reconocimiento y la distancia entre las secuencias de reconocimiento y la posición del corte (dentro de estas secuencias o fuera de ellas), así como por los cofactores requeridos por las enzimas; estos tipos de sistemas M-R se dividen en dos grupos (figura 2), el primero formado por los sistemas M-R tipos I, II y III, los cuales restringen DNA no modificado y el segundo grupo por los sistemas M-R tipo IV que restringen DNA modificado (Vasu, *et al*, 2013; Tock & Dryden, 2005).

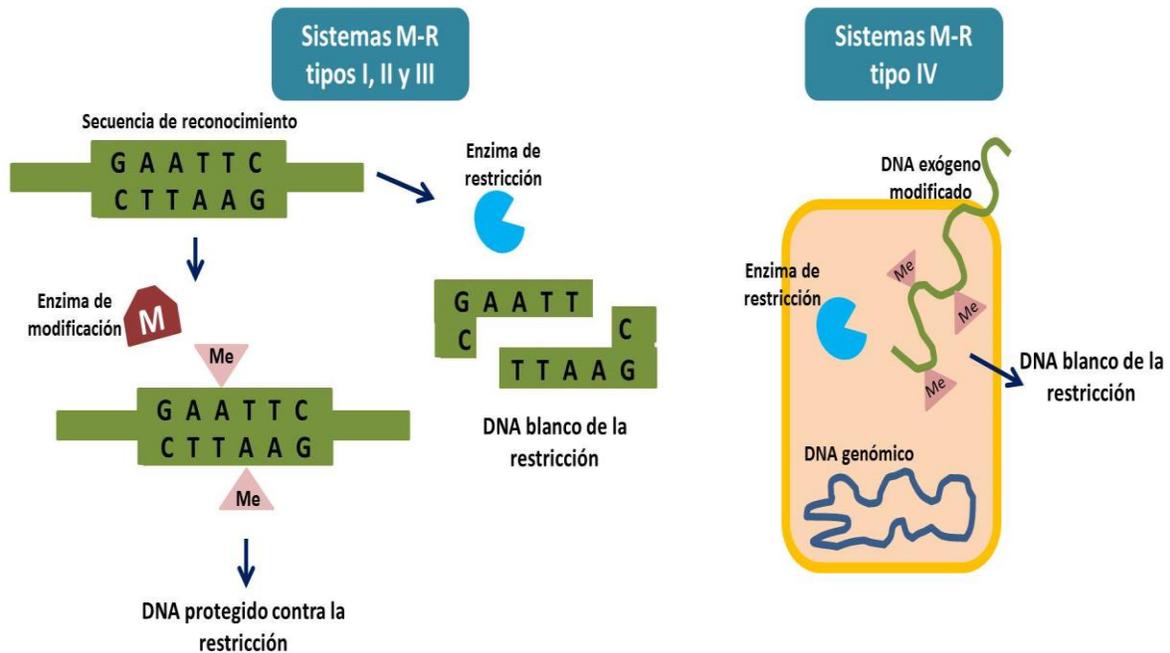


Figura 2. Grupos de Sistemas de modificación-restricción. Se observan los dos grupos de sistemas M-R en bacterias: en el grupo correspondiente a los sistemas de los tipos I, II y III hay protección del DNA genómico gracias a una enzima de modificación; el grupo de los sistemas M-R tipo IV reconocen secuencias de DNA modificadas.

Desde su descubrimiento, estos sistemas han sido objeto de diversos análisis bioquímicos, genéticos, bioinformáticos, etc., lo cual ha contribuido gradualmente no solo al conocimiento de los mismos sino al enfoque de nuevos estudios en diferentes aspectos de estos sistemas y a su utilización como herramientas biotecnológicas (Tock & Dryden, 2005).

2.3 Sistemas M-R tipo I

Están conformados por enzimas multifuncionales que pueden catalizar ambas reacciones: restricción y metilación. Estas enzimas poseen varias subunidades que les confieren no sólo la capacidad de restricción y metilación sino además de especificidad. Comúnmente son cinco subunidades en total, dos necesarias para

el corte de DNA, dos para la metilación y una que especifica la secuencia de DNA que se reconoce (Tock, *et al*, 2005; Murray, 2000).

La reacción de metilación requiere S-adenosilmetionina (SAM) como cofactor y donador de grupos metilo. Para la restricción se requiere de ATP, SAM, así como iones Mg^{2+} . La función de la enzima depende del estado del DNA, es decir, el DNA no metilado es digerido por la endonucleasa, el DNA hemi-metilado es metilado y el DNA metilado está protegido contra la restricción (Tock, *et al*, 2005).

Las secuencias de reconocimiento de estos sistemas son asimétricas y poseen dos elementos separados por un espacio inespecífico de 6 a 8 pares de bases. El corte sobre el DNA sucede alejado del sitio de reconocimiento, es precedido por una translocación de DNA dependiente de ATP y, se sugiere, es promovido por la colisión de dos enzimas (Tock, *et al*, 2005; Murray, 2000).

2.4 Sistemas M-R tipo II

Son los más simples y abundantes de los sistemas de modificación-restricción conocidos. Se conforman por dos enzimas que funcionan independientemente, una endonucleasa de restricción y una metiltransferasa. Las endonucleasas del tipo II pueden actuar como monómeros, dímeros e incluso tetrámeros, mientras que las metiltransferasas actúan como monómeros. Ambas enzimas reconocen la misma secuencia palindrómica de DNA que puede ir de 4 a 8 pares de bases. Algunos subtipos de los sistemas de modificación-restricción del tipo II, como el II-B, II-G, II-L, contienen ambos dominios, de restricción y modificación, dentro de la misma proteína (Roberts, *et al*, 2003; Srikhanta, *et al*, 2010; Tock, *et al*, 2005; Oliveira, *et al*, 2014).

La reacción de restricción generalmente es dependiente de iones Mg^{2+} pero no requiere ATP, y la metilación requiere SAM como donador de grupos metilo. El corte del DNA ocurre dentro o cerca de la secuencia de reconocimiento, generando fragmentos con extremos 5'-PO₄ y 3'-OH; por otro lado la metilación

sucede en una base específica en ambas cadenas de la secuencia de DNA. Usualmente las enzimas de restricción del tipo II reconocen secuencias palindrómicas y hacen un corte simétrico dentro de ellas; sin embargo, algunas cortan fuera de su secuencia de reconocimiento y otras cortan a ambos lados de ésta, las características anteriores y otras adicionales han hecho que se consideren diferentes grupos de enzimas, generando así subdivisiones dentro de las enzimas del tipo II (tabla 1). Algunos de los criterios de nomenclatura se basan en la secuencia de corte y otros en las estructuras de las enzimas, por lo que hay enzimas que se encuentran en más de una subdivisión (Tock, *et al*, 2005; Roberts, *et al*, 2003).

Tabla 1. Subdivisiones de las enzimas de restricción tipo II (Roberts, *et al*, 2003).

| Subdivisión | Descripción |
|--------------------|---|
| IIA | Designación genérica para cualquier enzima del tipo II que reconozca secuencias asimétricas. |
| IIB | Enzimas que cortan a ambos lados de la secuencia de reconocimiento. |
| IIC | Enzimas con estructura híbrida, es decir, tienen ambos dominios (de restricción y modificación) en el mismo polipéptido. |
| IIE | Interaccionan con dos copias de la secuencia de reconocimiento, una es el objetivo del corte y la otra el efector alostérico. |
| IIF | Enzimas que interaccionan y cortan coordinadamente dos copias de su secuencia de reconocimiento. |
| IIG | Enzimas con ambos dominios (restricción y |

modificación) fusionados en un solo polipéptido y pueden ser estimuladas o inhibidas por S-adenosilmetionina.

| | |
|------------|---|
| IIH | Enzimas con características genéticas semejantes a las enzimas del tipo I, pero bioquímicamente se comportan como enzimas de tipo II. |
| IIM | Enzimas que reconocen una secuencia específica metilada en el DNA y cortan en un sitio fijo. |
| IIP | Todas las enzimas con secuencias de reconocimiento simétricas y cortan en sitios simétricos fijos. |
| IIS | Enzimas de la subdivisión IIA que cortan al menos una cadena de DNA fuera de su secuencia de reconocimiento. |
| IIT | Enzimas compuestas de subunidades heterodiméricas. |

Las enzimas de los sistemas de modificación-restricción tipo II, especialmente las endonucleasas de restricción, tienen gran importancia biotecnológica debido a su aplicación en la tecnología del DNA recombinante, por lo que se han caracterizado más de 3500 enzimas de este tipo (Roberts, *et al*, 2003).

2.5 Sistemas M-R tipo III

Se encuentran principalmente en bacterias gram negativas y en fagos. Se han identificado alrededor de 140 sistemas M-R tipo III y pocas de estas enzimas han

sido estudiadas, dentro de las cuales están *EcoP1I*, *HinfIII*, *EcoP15I*, entre otras, como los principales ejemplos (Rao, et al, 2013; Srikhanta, et al, 2010)

Estos sistemas están conformados por una metiltransferasa (subunidad *mod*) encargada del reconocimiento y modificación del sustrato utilizando SAM como donador de grupos metilo y una endonucleasa de restricción (subunidad *res*); esta última es activa siempre y cuando se encuentre el complejo res_2mod_2 y se requieren iones Mg^{2+} y ATP para que realice el corte en el DNA, además de una interacción de dos copias de 5 a 6 pares de bases de la secuencia asimétrica de reconocimiento orientadas inversamente. El corte es precedido por una translocación de DNA dependiente de ATP y, las enzimas cortan a una distancia específica de una de las dos copias de la secuencia de reconocimiento. Las subunidades *mod* de estos sistemas metilan la posición N⁶ en adeninas en una sola de las cadenas, produciendo DNA hemi-metilado y son capaces de actuar independientemente de la subunidad *res* (Roberts, et al, 2003; Tock, et al, 2005; Srikhanta, et al, 2010).

Los sistemas M-R putativos tipo III pueden reconocerse fácilmente debido a su similitud a nivel de secuencia (Roberts, et al, 2003).

2.6 Sistemas M-R tipo IV

Opuesto a los demás, los sistemas M-R tipo IV consisten de uno o dos genes que codifican para enzimas de restricción metil-específicas, es decir, que cortan solamente DNA que ha sido metilado, incluyendo bases hidroximetiladas y glucosil-hidroximetiladas (Roberts, et al, 2003).

Es el tipo menos estudiado de los sistemas M-R, se han identificado alrededor de 227 enzimas que probablemente pertenecen a esta clase. Las secuencias de reconocimiento no han sido bien definidas (Tock, et al, 2005).

La enzima McrBC de *Escherichia coli* K-12 es la más estudiada, requiere iones Mg^{2+} para su actividad y es la única nucleasa reportada que requiere GTP para el corte y la translocación de DNA (Tock, *et al*, 2005).

2.7 Sistemas de restricción metil-específicos

Tal y como se describió anteriormente, los sistemas M-R del tipo IV, reconocen secuencias de DNA modificadas, es decir, son metil-específicos ya que la actividad de restricción depende de que el DNA se encuentre metilado. Estos sistemas están presentes en diversas bacterias como lo son *E. coli*, diferentes especies del género *Streptomyces*, entre otras.

La presencia de estos sistemas en bacterias que puedan ser de uso biotecnológico representa un obstáculo para su manipulación genética, ya que en ocasiones la transformación con DNA proveniente de cepas que metilan el DNA (como *E. coli*) no resulta exitosa debido a la restricción por parte de estos sistemas.

Otro punto característico de estos sistemas, es que las bacterias que cuentan con ellos deben de tener un patrón de metilación diferente al reconocido por cualquier sistema de restricción de tipo I, II o III presente en ellas, o en su caso, que su propio DNA no se encuentre metilado.

2.8 Sistemas de restricción metil-específicos en *Streptomyces spp.*

Además de los sistemas M-R clásicos, se han identificado en varios estreptomicetos sistemas de restricción metil-específicos, los cuales restringen DNA con N⁶-metiladeninas o 5-metilcitosinas, principalmente, lo cual se ha deducido por las secuencias que reconocen (Zotchev, *et al*, 1995; MacNeil, 1988).

La presencia de estos sistemas ha dificultado la manipulación genética de estas bacterias, ya que varias bacterias del género *Streptomyces* no pueden ser transformadas con DNA proveniente de cepas que metilen DNA; sin embargo, MacNeil (1988) encontró que estas cepas pueden ser transformadas eficientemente si el DNA es purificado de cepas deficientes de sistemas de metilación.

Streptomyces coelicolor A3(2) es la especie mejor caracterizada del género ya que se cuenta con su genoma secuenciado (Bentley, *et al*, 2002) y existe un gran número de estudios relacionados a diferentes aspectos de esta especie. Sin embargo, una desventaja de esta cepa es que muestra una fuerte restricción al ser transformada con DNA aislado de cepas estándares de *E. coli*, a diferencia de *Streptomyces lividans* 66, otra especie muy relacionada a nivel genómico con *S. coelicolor*, la cual no presenta una restricción tan fuerte (Flett, *et al*, 1997).

Algunas de las especies de *Streptomyces* que se sabe cuentan con sistemas de restricción metil-específicos son: *S. griseus*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. bambergiensis*, entre otras (Zotchev, *et al*, 1995; Flett, *et al*, 1997; MacNeil, 1988; González-Cerón, *et al*, 2009).

Además de los sistemas metil-específicos, los sistemas de modificación-restricción se encuentran ampliamente distribuidos en *Streptomyces* spp. Varias cepas bacterianas poseen los clásicos sistemas de modificación-restricción, que se conforman típicamente de una endonucleasa de restricción y una metiltransferasa (Zotchev, *et al*, 1995).

Se conoce una gran cantidad de enzimas pertenecientes a los sistemas de modificación-restricción; *Streptomyces* spp. son fuente de varias endonucleasas de restricción comerciales ampliamente utilizadas como R.SphI, R.SacI, R.SacII, R.SnoI y R.SalI, que como ya se mencionó anteriormente, son una herramienta útil en la manipulación del DNA (Rodicio & Chater, 1988).

El estudio de los sistemas de modificación-restricción en *Streptomyces* es factible ya que las técnicas de genética molecular se encuentran bien estandarizadas para

muchas de las especies del género. Los estudios y análisis realizados sobre este tema contribuyen a:

- Ampliar nuestro entendimiento de la regulación y funcionamiento de los sistemas M-R.
- Mejorar la producción de enzimas importantes comercialmente.
- Favorecer la explotación de *Streptomyces* spp. para aplicaciones farmacéuticas, biotecnológicas, entre otras (Rodicio & Chater, 1988).

Las metilasas estudiadas en el presente trabajo pertenecen a sistemas los M-R de bacterias del género *Streptomyces*: y son: la metilasa M.SacI (*Streptomyces achromogenes*); la metilasa M.SalI (*Streptomyces albus*) y la metilasa M.SphI (*Streptomyces phaeochromogenes*).

Metilasa M.SphI

El sistema de modificación-restricción SphI pertenece a la bacteria *Streptomyces phaeochromogenes* y es un sistema M-R del tipo II. Se conforma por los genes *sphM* y *sphR* los cuales codifican para la metilasa M.SphI y la enzima de restricción R.SphI respectivamente, estas enzimas reconocen la secuencia 5'-GCATGC-3' (Guthrie, *et al*, 1996).

La metilasa M.SphI se compone de 316 residuos de aminoácidos y tiene un peso aproximado de 35 kDa, el gen *sphM* fue clonado en *E. coli* por Guthrie y colaboradores (1996).

La secuencia de M.SphI muestra similitud con muchas metiltransferasas de adeninas, especialmente alrededor de los motivos conservados FxG y DPPY (Guthrie, *et al*, 1996).

Metilasa M.SalI

Pertenciente a *Streptomyces albus* G, el sistema de modificación-restricción tipo II SalI, está formado por los genes *salR* y *salM* que codifican para la

endonucleasa de restricción R.SalI y la metiltransferasa M.SalI respectivamente. Los genes se encuentran en el orden *salR* seguido de *salM* ambos orientados en la misma dirección (Álvarez, *et al*, 1995; Rodicio, *et al*, 1994).

El sistema M-R SalI ha sido clonado en *Escherichia coli* y en *Streptomyces lividans*. De los experimentos en *S. lividans*, se determinaron la posición y orientación de los genes *salR* y *salM* (Rodicio & Chater 1988; Lunnen, *et al*, 1988).

La metilasa M.SalI se compone de 587 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 64 kDa. Esta enzima modifica adeninas en la secuencia 5'-GTCGAC-3'.

Metilasa M.SacI

Compuesto por los genes *sacIM* y *sacIR*, el sistema de modificación-restricción SacI de *Streptomyces achromogenes* es un sistema del tipo II. El gen que codifica para la endonucleasa de restricción (*sacR*) es de 1077 pb, y se encuentra separado por 17 pb del gen *sacM* el cual es de 1173 pb y codifica para la metilasa M.SacI (Xu, *et al*, 1998).

Esta metilasa modifica la segunda citosina en la secuencia 5'-GAGCTC-3' y está compuesta por 390 residuos de aminoácidos (Xu, *et al*, 1998).

2.9 Importancia de las DNA metiltransferasas

Las metiltransferasas de DNA actúan transfiriendo un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) que actúa como donador de grupos metilo, para modificar su base objetivo, adeninas o citosinas, formando C5-metilcitosina (m⁵C), N⁴-metilcitosina (m⁴C) o N⁶-metiladenina (m⁶A) (figura 3). Los productos resultantes de la reacción son DNA metilado y S-adenosilhomocisteína (Buryanov & Shevchuk, 2005).

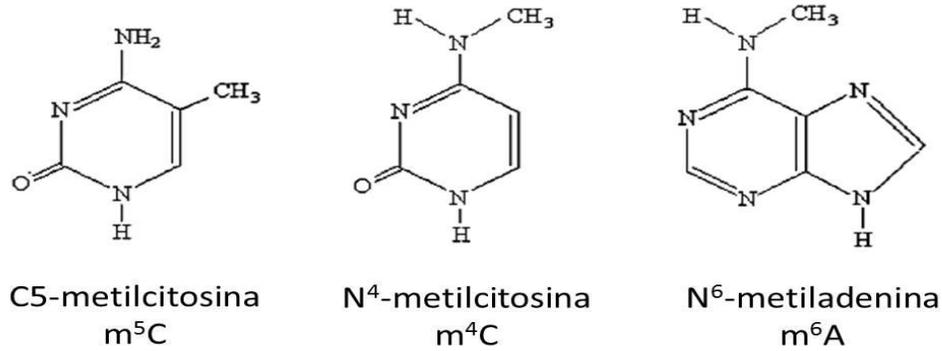


Figura 3. Estructuras de las bases nitrogenadas metiladas. Modificado de Buryanov & Shevchuk, 2005.

En las bacterias, las DNA metiltransferasas tienen diferentes funciones biológicas, algunas de ellas se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Algunas funciones de las DNA metiltransferasas (Jeltsch, *et al*, 2007).

| Función | Ejemplo |
|---|--|
| Coordinación de la expresión génica y el ciclo celular. | El sistema CcrM de <i>Caulobacter crescentus</i> metila DNA en la secuencia GANTC, en estas bacterias la conversión replicativa en sitios 5'-GANTC-3' hemimetilados activa el promotor del gen <i>ctrA</i> , que es un importante regulador del ciclo celular. |
| Reparación de DNA. | Sistema de reparación MutHLS en <i>E. coli</i> . MutS reconoce errores y recluta a MutL y MutH, los cuales se moverán a un sitio 5'-GATC-3'. MutH corta la cadena no metilada y la cadena hija es |

| | |
|---------------------------------------|---|
| | retirada. La reparación del error se finaliza con la síntesis de una nueva cadena de DNA. |
| Expresión génica y variación de fase. | Sistema Dam en <i>E. coli</i> . La metilación de los sitios blanco de la metiltransferasa puede influenciar la unión de factores de transcripción bacterianos al DNA y por lo tanto regular la expresión génica. |
| Control de la entrada de DNA. | Sistemas de modificación-restricción. |

Gran parte del progreso de la biología molecular moderna se puede atribuir al uso de enzimas de restricción, principalmente a las del tipo II; sin embargo, las metiltransferasas también resultan útiles en este campo en estudios enfocados en la metilación misma (Buryanov & Shevchuk, 2005).

La reacción de metilación se realiza directamente sin ningún impacto enzimático preliminar sobre el DNA, por lo que es posible obtener ya sea *in vitro* o *in vivo* DNA metilado sin rupturas en su estructura primaria y manteniendo su actividad biológica, por lo que puede ser utilizado posteriormente en otros experimentos (Buryanov & Shevchuk, 2005).

3. ANTECEDENTES

A pesar de contar con el genoma secuenciado de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley, *et al*, 2002), y de que ésta sea una especie muy conocida a nivel genético y molecular, la presencia de sistemas de restricción metil-específicos es un obstáculo para su manipulación genética, lo cual ha hecho que su uso se rezague reemplazándola por otros modelos de estudio. Trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Luis Servín se han enfocado en el análisis del sistema de restricción metil-específico de *Streptomyces coelicolor*.

Un trabajo realizado por González-Ceron, *et al*, (2009) demostró que resultaba imposible la transformación de *Streptomyces coelicolor* al utilizar DNA purificado de cepas de *E. coli* que tuvieran el sistema Hsd o las metiltransferasas Dcm o Dam; sin embargo, al utilizar DNA purificado de cepas de *E. coli* carentes de estos tres sistemas, se observaron altas frecuencias de transformación.

Varios datos obtenidos en trabajos realizados por el grupo del Dr. Luis Servín muestran que el sistema de restricción de *S. coelicolor* es incompatible con otros sistemas de metilación, como Dam, o la metilasa M.SphI, ya que al expresarlos en *S. coelicolor* el resultado era la muerte celular. La expresión de estos sistemas era posible solamente en cepas mutantes, lo cual llevó al análisis de las mismas y se determinó que la pérdida del elemento AICESco5349 hacía posible la expresión de estas metilasas en *S. coelicolor*.

Gracias a análisis bioinformáticos, ha sido posible la identificación de genes que probablemente codifiquen para endonucleasas; dos de estos genes son sco5333 y sco5330, los cuales se encuentran en el elemento AICESco5349 antes mencionado. Un trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Luis Servín que consistió en expresar el gen sco5330 en *Streptomyces lividans* con las metiltransferasas de adeninas M.SphI y M.SalI, demostró que el producto de este gen es incompatible con estas metiltransferasas, además de que el gen sco5333 mostró ser incompatible con la metilasa de citosinas M.SacI al ser expresados ambos en *S. lividans* (Martínez-Morales, datos no publicados).

Posteriormente, se determinó que el producto del gen *sco5330* es incompatible con la metilación mediada por Dam, además de que datos obtenidos de la incompatibilidad *in vivo* sugieren que esta nucleasa putativa es específica para diversas secuencias metiladas en adeninas (Cadena-Sandoval, 2014).

Es por ello que es de gran interés obtener DNA metilado *in vitro* con las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI para su posterior aplicación en el análisis del sistema de restricción metil-específico de *Streptomyces coelicolor* por lo que los objetivos del presente trabajo fueron:

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Expresar, purificar y evaluar la actividad *in vitro* de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI.

Objetivos particulares

- Clonar los genes *sacIM*, *salIM* y *sphIM* en vectores de expresión de *Escherichia coli*.
- Determinar las condiciones para la expresión y purificación de las metilasas a partir de células de *E. coli*.
- Purificar las metilasas y determinar las condiciones necesarias para optimizar su actividad *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Cepas, plásmidos y genes empleados en este trabajo.

Las cepas empleadas en este trabajo se describen en la tabla 3, mientras que los plásmidos empleados se describen en la tabla 4. Los medios de cultivo empleados para las cepas de *Streptomyces* y *E. coli* se describen en el anexo 2.

Tabla 3. Cepas empleadas en este trabajo.

| Cepa | Características | Referencia |
|--|---|-------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α | <i>F</i> ⁻ <i>endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> λ (ϕ80<i>dlacZ</i>ΔM15).</i> | Grant, <i>et al.</i> , 1990. |
| | Desarrollada para su uso en clonación. | |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta 2 | <i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE⁶ (Cm^R)</i> | Novagen. |
| | Hospedero de expresión, favorece la expresión de proteínas recombinantes ya que contiene tRNAs para la traducción de codones que son raros en <i>E. coli</i> . | |
| <i>S. lividans</i> JT46 | Cepa mutante de <i>S. lividans</i> TK64. Deficiente en recombinación intraplasmídica. | Tsai, <i>et al.</i> , 1987. |
| <i>S. lividans</i> 1326 | Cepa silvestre de <i>Streptomyces lividans</i> . | Kieser, <i>et al.</i> , 2005. |

Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|----------------|---|--------------------------------|
| pJV1 | Aislado de <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> , 10.8 kb, plásmido de alto número de copias. | Bailey, <i>et al.</i> , 1986. |
| pSET152 | <i>aac(3) IV/ApR, lacZ, rep^{pUC}, att^{ϕC31}, int^{ϕC31}, oriT</i> . Replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i> . | Bierman, <i>et al.</i> , 1992. |
| pIJ486 | Vector multicopia replicativo en <i>Streptomyces</i> . Presenta sitios Sall y SphI. Resistencia a tiostrepton. | Hopwood, <i>et al.</i> , 1987. |
| pET28a | Vector de expresión para proteínas | Novagen. |

| | | |
|---------------------|---|---------------|
| | recombinantes en <i>E. coli</i> , agrega una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, presenta resistencia a kanamicina. | |
| pET28a-sphIM | Gen de la metilasa SphI clonado en el vector de expresión pET28a. | Este trabajo. |
| pET28a-sacIM | Gen de la metilasa SacI clonado en el vector de expresión pET28a. | Este trabajo. |
| pET28a-salIM | Gen de la metilasa Sall clonado en el vector de expresión pET28a. | Este trabajo. |

Los genes de las metilasas estudiadas en este trabajo se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Genes de las metilasas empleadas en este trabajo.

| Gen | Organismo | Producto | Función | ID Proteína (GenBank) |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|------------------------------|
| sphIM | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> | Metiltransferasa SphI (M.SphI) | Modifica dsDNA en la secuencia 5'- GCATGC-3'. | AAB40377.1 |
| sacIM | <i>Streptomyces achromogenes</i> | Metiltransferasa SacI (M.SacI) | Modifica citosinas en la secuencia 5'- GAGCTC-3'. | AAC97118.1 |
| salIM | <i>Streptomyces albus</i> | Metiltransferasa Sall (M.Sall) | Modifica adeninas en la secuencia 5'-GTCGAC-3'. | AAA81887.1 |

5.2 Clonación de los genes *sphIM*, *sacIM* y *salIM* en el vector de expresión pET28a.

Se seleccionó el vector pET28a para la clonación de los genes de las metilasas, ya que es ampliamente usado en la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Asimismo el vector facilitó la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad debido a la etiqueta de histidinas que añade en el extremo amino de las proteínas.

Se contaba con los fragmentos que contienen los genes para las metilasas M.SphI, M.SacI, y M.Sall, a los cuales se les había introducido un sitio de NdeI a nivel del codón de inicio, de manera que al clonar en el vector pET28a los genes

quedaran en fase. Estos fragmentos, así como un fragmento correspondiente al vector pET28a, ya habían sido previamente digeridos con NdeI y EcoRI (tabla 6).

Tabla 6. Fragmentos empleados en la clonación.

| Fragmentos | Concentración | Número de bases |
|--------------------------|----------------------|------------------------|
| SphIM NdeI-EcoRI | 50 ng/μL | 980 |
| SacIM NdeI-EcoRI | 50 ng μL | 1200 |
| SalIM NdeI-EcoRI | 50 ng/μL | 1889 |
| pET28a NdeI-EcoRI | 100 ng/μL | 5323 |

- i. Se prepararon tres reacciones de ligación, una correspondiente a cada gen y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente (tabla 7).

Tabla 7. Composición de cada reacción de ligación.

| | Gen <i>sphIM</i> | Gen <i>sacIM</i> | Gen <i>salIM</i> |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Vector pET28a NdeI-EcoRI | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| Inserto NdeI-EcoRI | 2 μL | 2.5 μL | 3.6 μL |
| H₂O | 8 μL | 7.5 μL | 6.4 μL |
| Buffer ligasa 5X | 3 μL | 3 μL | 3 μL |
| Ligasa T4 ↑ [] | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| Volumen final | 15 μL | 15 μL | 15 μL |

- ii. A cada ligación se le añadió 1 μL de glicógeno, un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, 1 volumen de isopropanol y se dejaron precipitando 2 horas a -20°C.
- iii. Se centrifugaron a 13,200 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla de cada precipitación se resuspendió en 4 μL de agua estéril desionizada.
- iv. Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α por electroporación con cada una de las ligaciones (VER ANEXO 1).
- v. Las células se plaquearon en cajas Petri con medio LB y el antibiótico correspondiente (el pET28a se selecciona con kanamicina a una concentración de 30 μg/μL) y se dejaron crecer las colonias toda la noche a 37°C.

- vi. Se seleccionaron 6 colonias por cada una de las ligaciones y se inoculó cada una en 3mL de medio YT2X. Fueron incubados con agitación a 37°C.
- vii. Se tomó una fracción de cada uno de los cultivos para realizar purificación de DNA plasmídico en pequeña escala (VER ANEXO 1).
- viii. Se realizó una simulación *in silico* de cada clonación utilizando el software DNAMAN para elegir las enzimas de restricción que se utilizarían para corroborar por medio de un patrón de restricción cada una de las construcciones.
- ix. Se prepararon las reacciones de digestión y se inocularon a 37°C, posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.8%.
- x. De cada construcción se eligió una colonia que diera el patrón esperado, lo cual señaló que tenían la construcción, con ellas se amplificó y se realizaron las purificaciones de DNA plasmídico en mediana escala (VER ANEXO 1).
- xi. Una vez que se purificaron los plásmidos (pET28a-sphIM, pET28a-sacIM y pET28a-salIM), se cuantificaron en el espectrofotómetro y se prepararon diluciones a una concentración final de 500-600 ng/μL en un volumen de 10 μL cada uno para enviar a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular UNAM y así observar que las construcciones fueran correctas.
- xii. Ya que las secuencias habían sido revisadas, se hicieron transformaciones con cada uno de los plásmidos (pET28a-sphIM, pET28a-sacIM y pET28a-salIM) en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 por electroporación. Las células se plaquearon en cajas Petri con medio LB y los antibióticos correspondientes (kanamicina a concentración de 30 μg/mL para seleccionar el pET28a y cloranfenicol en concentración 50 μg/mL para la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2) y se dejaron crecer las colonias toda la noche a 37°C. Se seleccionaron colonias de cada una de las transformaciones, y se inocularon en medio YT2X para crecer toda la noche en agitación a 37°C. Posteriormente los cultivos se

centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos para tomar el paquete de células y conservarlas en glicerol al 20% a -20°C para su posterior uso.

5.3 Experimentos de inducción de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.SalI en pequeña escala.

El motivo de realizar estas pruebas de inducción en pequeña escala fue determinar el nivel de expresión de las metilasas, así como identificar la fracción en la que se encontraban.

- i. Se tomó una colonia de cada una de las transformaciones con los tres plásmidos (pET28a-sphIM, pET28a-sacIM y pET28a-salIM) en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2, y se realizaron precultivos de 3ml en medio YT2X con los respectivos antibióticos (kanamicina [30 µg/mL] y cloranfenicol [50 µg/mL]) y se dejó crecer a 37°C con agitación durante una noche.
- ii. Se inocularon matraces de 250 mL con 10 mL de medio YT2X y antibióticos (kanamicina [30 µg/mL] y cloranfenicol [50 µg/mL]) con 0.5 mL de los precultivos y se dejaron crecer a 37°C con agitación durante dos horas y treinta minutos, aproximadamente, hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0.6.
- iii. Cada cultivo se dividió en dos matraces con 5 mL de cultivo cada uno, uno de ellos se indujo con 50 µL de IPTG 100mM y el otro no, los cultivos se incubaron a 18°C con agitación durante cinco horas.
- iv. Los cultivos se centrifugaron a 7500 rpm durante cinco minutos para recuperar las células. El paquete de células se lavó con buffer de fosfatos (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) y se resuspendió en 500 µL del mismo.
- v. Se lisaron las células mediante sonicación y el extracto celular se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente se recuperaron las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pastilla).

- vi. La pastilla se lavó y se resuspendió en 500 μL de buffer de urea (NaH_2PO_4 100 mM, Urea 8M, pH6.3).
- vii. Se cuantificó la cantidad de proteína en ambas fracciones por el método de Bradford, con albúmina sérica bovina como estándar, para determinar la concentración de proteína en cada una de ellas.
- viii. Se tomaron muestras de cada fracción y se les agregó buffer de tratamiento 2X (Tris-HCl (pH 6.8) 125 mM, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%) para su análisis en un gel de SDS-PAGE, los geles separadores utilizados fueron al 10% para M.SphI y M.SacI, y al 8% para M.SalI (VER ANEXO 1).

5.4 Experimentos de inducción de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.SalI en gran escala.

- i. Se realizó un precultivo de 10 mL en medio YT2X con antibióticos (kanamicina [30 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y cloranfenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) y se inoculó con 2 μL del stock de la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) roseta almacenada en glicerol al 20%, y se incubó a 37°C con agitación toda la noche.
- ii. El precultivo se inoculó en 400 mL de medio YT2X con antibióticos (kanamicina [30 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y cloranfenicol [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) y se dejó crecer a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6.
- iii. Se agregó IPTG a una concentración final de 1mM para inducir la sobreexpresión de la proteína y se incubó el cultivo a 18°C con agitación durante cinco horas.
- iv. Se centrifugó a 7500 rpm durante diez minutos y el paquete de células se lavó con buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) y se resuspendió en 10 mL del mismo.
- v. Las células se lisaron mediante sonicación y el extracto celular se centrifugó para obtener las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pastilla) y continuar con el proceso de purificación. La pastilla se resuspendió en 4 mL de buffer de urea (NaH_2PO_4 100 mM, Urea 8M, pH6.3).

- vi. El procedimiento se repitió para cada una de las tres metilasas.

5.5 Purificación de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.SalI.

La purificación de las metilasas se realizó mediante cromatografía de afinidad con una columna que contiene resina de Ni-NTA Agarosa.

A pesar de que en los experimentos de inducción en pequeña escala se identificó a las metilasas en la fracción insoluble para los tres casos (M.SphI, M.SacI y M.SalI) se decidió pasar ambas fracciones por columna de Ni-NTA agarosa

- i. Se montó un soporte universal con dos columnas cada una con 3 mL de Ni-NTA agarosa (una para cada fracción).
- ii. Las columnas se equilibraron con 10 mL de buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0, para el caso de la fracción soluble) y con 10 mL de buffer de urea (NaH_2PO_4 100 mM, Urea 8M, pH6.3, para la fracción insoluble).
- iii. Se tomó en un microtubo de polipropileno una alícuota de 100 μL de cada fracción para su posterior análisis mediante un gel de SDS-PAGE.
- iv. Cada una de las fracciones se pasó tres veces por la columna (la tercera vez se quedaron en la columna durante una noche a 4°C).
- v. Los siguientes buffers a utilizar dependían de la fracción que se estuviese tratando, tal y como se muestra a continuación (tabla 8).

Tabla 8. Procedimiento de purificación que se siguió con cada fracción (para ver composición de cada buffer revisar ANEXO 2).

| FRACCIÓN INSOLUBLE | FRACCIÓN SOLUBLE |
|---|---|
| Se realizaron dos lavados con 4 mL de buffer de lavado. | Se realizó un lavado con 10 mL de buffer de lavado 1. |
| Se eluyó cuatro veces con 1 mL de buffer de elución 1. | Se realizó un segundo lavado con 10 mL de buffer de lavado 2. |
| Se eluyó cuatro veces con 1 mL de buffer de elución 2. | Se realizó un último lavado con buffer de lavado 3. |
| | Se eluyó cuatro veces con 1 mL de buffer de elución. |

- vi. Cada uno de los lavados y fracciones de elución se recolectaron y se guardaron a una temperatura de 4°C para su posterior análisis mediante un gel de SDS-PAGE. El procedimiento se repitió para cada una de las metilasas.

5.6 Almacenamiento de las metilasas M.Sphi, M.Sacl y M.Sall

Para preparar el buffer en el que se almacenarían las metilasas se realizó una revisión bibliográfica así como de las metilasas comerciales para llegar a un consenso. Las metilasas se dializaron contra este buffer y se guardaron posteriormente a -20°C.

- Buffer de almacenamiento → Glicerol 50%, BSA 200 µg/mL, NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, pH 8.

M.Sall

En los análisis de SDS-PAGE se observó que de las tres metilasas, de M.Sall se obtuvo una proporción considerable en la fracción soluble, por lo que no fue necesario renaturalizar la enzima; se tomaron todas las fracciones de elución para su almacenamiento; sin embargo, primero era necesario retirar el imidazol presente en la muestra, para ello se dializó contra los siguientes buffers:

- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Imidazol 200 mM, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Imidazol 120 mM, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Imidazol 80 mM, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Imidazol 40 mM, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, pH 8.

Cada uno de ellos durante 1 hora y a una temperatura de 4°C, a excepción del último con el que se dializó durante una noche.

Una vez finalizada la diálisis se recolectó la enzima en tubos, 500 µL en cada uno de ellos, se le agregó glicerol a una concentración final de 50%, β-mercaptoetanol

en concentración final 5 mM y BSA. La enzima se almacenó a -20°C para su posterior uso en los ensayos de actividad.

M.SphI

M.SphI se obtuvo en ambas fracciones al finalizar la purificación, en una proporción menor que la de M.SalI en la fracción soluble. Aun así se decidió trabajar con esta poca enzima ya que el encontrarla en la fracción soluble significaba que la proteína muy probablemente era funcional.

En el caso de esta enzima el imidazol se retiró mediante diafiltración discontinua, centrifugando repetidas ocasiones durante 10 minutos la muestra en filtros Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units 10-KDa. Además de retirar el imidazol, la proteína se concentró al mismo tiempo.

Finalmente se recolectó la enzima en tubos y se agregó glicerol a un volumen final de 50%, β -mercaptoetanol a una concentración final de 5 mM y BSA. La enzima se preservó a -20°C para emplearla posteriormente en los ensayos de actividad.

M.SacI

Esta enzima se obtuvo solamente en la fracción insoluble, lo cual indica que la enzima se había ido a cuerpos de inclusión, de modo que fue necesario utilizar un agente que disolviera estos cuerpos (en este caso se utilizó urea 8 M) y posteriormente se renaturalizó la proteína; esto se hizo mediante la remoción del agente desnaturizante, la urea, por medio de diálisis con buffers que disminuían gradualmente la concentración de urea.

- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 7 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 6 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 5 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 4 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 3 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 2 M, pH 8.
- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, Urea 1 M, pH 8.

- NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 10 mM, pH 8.

La diálisis con cada buffer fue durante una hora treinta minutos a una temperatura de 4°C; con el último buffer se dializó durante una noche.

Al finalizar la diálisis se concentró la enzima con los tubos Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units 10-KDa. Finalmente se recolectó la muestra en tubos y se agregó glicerol a una concentración final de 50%, β-mercaptoetanol en concentración final 5 mM y BSA. La enzima se preservó a -20°C para su posterior uso en los ensayos de actividad.

5.7 Evaluación de la actividad *in vitro* de las metilasas M.SphI, M.SacI y M.SalI.

Buffers de reacción

Para el análisis de la actividad *in vitro* de las metilasas se procedió con una revisión bibliográfica para realizar un buffer de reacción. Se prepararon tres buffers de reacción lo cual proporcionó diferentes condiciones para las metilasas y con ello se determinó en cuál de ellas se presentó una actividad más alta.

- BUFFER A: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8.
- BUFFER B: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, pH 8.
- BUFFER C: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, KCl 50 mM, pH 8.
- BUFFER D: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8.

Todos los buffers se prepararon a una concentración 10 X para su dilución a 1X en la reacción.

DNA sustrato

Además de un buffer de reacción, se necesitaba un sustrato en el cual pudieran actuar las metilasas. Para ello se purificaron plásmidos que tuvieran sitios SphI, SacI y SalI.

Los plásmidos purificados fueron pSET152 de *E. coli*, pJV1 de *S. lividans* JT46 y pIJ486 de *S. lividans* silvestre.

Reacciones y análisis

Las reacciones se prepararon de la siguiente forma:

Plásmido → 1 µg

Buffer de reacción 10 X → 1/10 de volumen final

Metilasa → 2 – 4 µL (aprox. 4 – 8 µg)

S- adenosilmetionina (SAM) → 200 µM

H₂O → la necesaria para llevar a un volumen final de 20 – 40 µL

- i. La reacción enzimática se incubó a 37°C aproximadamente 12 horas.
- ii. La enzima se inactivó con calor, durante 10 minutos a 65–70°C, o mediante extracción fenol-cloroformo.
- iii. Posteriormente se precipitó (se agregó 1 µL de glicógeno 20mg/mL [Roche®], 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de isopropanol) durante dos horas a -20°C.
- iv. Se centrifugó a 13,200 rpm durante 10 minutos, la pastilla se secó durante 2 minutos a 50°C y se resuspendió en 5 µL de TE 10 mM para preparar la reacción de digestión con la enzima correspondiente, y se incubó durante 2 horas 30 minutos a 37°C.
- v. A todas las reacciones se les dio el mismo tratamiento, incluyendo a los controles.

Finalmente se analizaron las reacciones mediante geles de agarosa al 0.8%, tinción con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador con luz UV.

5.8 Optimización de la actividad *in vitro* de la metilasa M.Sall.

Ya que la metilasa M.Sall fue la que mostró actividad *in vitro*, se prosigió a mejorar la misma. Para ello se proporcionaron diferentes condiciones en cada uno de los ensayos y con ello se determinó qué condición beneficiaba su actividad.

La preparación y el procedimiento a seguir después de las reacciones fue el mismo.

Ya que se habían preparado cuatro diferentes buffers de reacción, se realizó un ensayo para determinar en cuál de ellos M.Sall actuaba mejor. Con el ensayo anterior se determinó que el Buffer C beneficiaba la actividad de la metilasa M.Sall, así que se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de KCl en el buffer de reacción (10 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM). Una vez determinada la concentración más óptima para la actividad de la metilasa se decidió probar con diferentes pH's (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0).

Diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM) fueron otras de las condiciones que se realizaron en un ensayo.

Finalmente se proporcionaron diferentes concentraciones de SAM (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M y 1 mM).

Una vez que se optimizó la actividad de la metilasa M.Sall se realizaron pruebas por triplicado en tres diferentes plásmidos con sitios Sall (pSET152, pJV1 y pIJ486) y se realizaron cuantificaciones para un análisis cuantitativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Experimentos de inducción de los genes para las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI en pequeña escala.

El principal motivo para purificar las metilasas M.SphI, M.SacI y M.SalI fue evaluar su actividad *in vitro* para posteriores aplicaciones en el laboratorio, en particular para el estudio del sistema de restricción de DNA metilado de *S. coelicolor*.

Para purificar las metilasas se procedió a clonar sus genes respectivos en el vector de expresión pET28a. Una vez obtenidas las construcciones en el vector de expresión pET28a, las cuales contenían los genes de las tres metilasas (pET28a-sphM, pET28a-sacIM y pET28a-salM) se realizaron experimentos de inducción a pequeña escala utilizando *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 como hospedero de expresión.

Al realizar las pruebas de inducción en pequeña escala identificamos si las metilasas estaban siendo sobreexpresadas en la fracción soluble o en la fracción insoluble, es decir, como cuerpos de inclusión, dentro de las células. Con base en lo anterior se determinó bajo qué condiciones se purificaría cada metilasa.

Ninguna de las tres metilasas se observó en la fracción soluble; sin embargo, sí se observaron en la fracción insoluble, lo cual sugirió que las metilasas se encontraban en cuerpos de inclusión dentro de las células (figuras 4, 5 y 6).

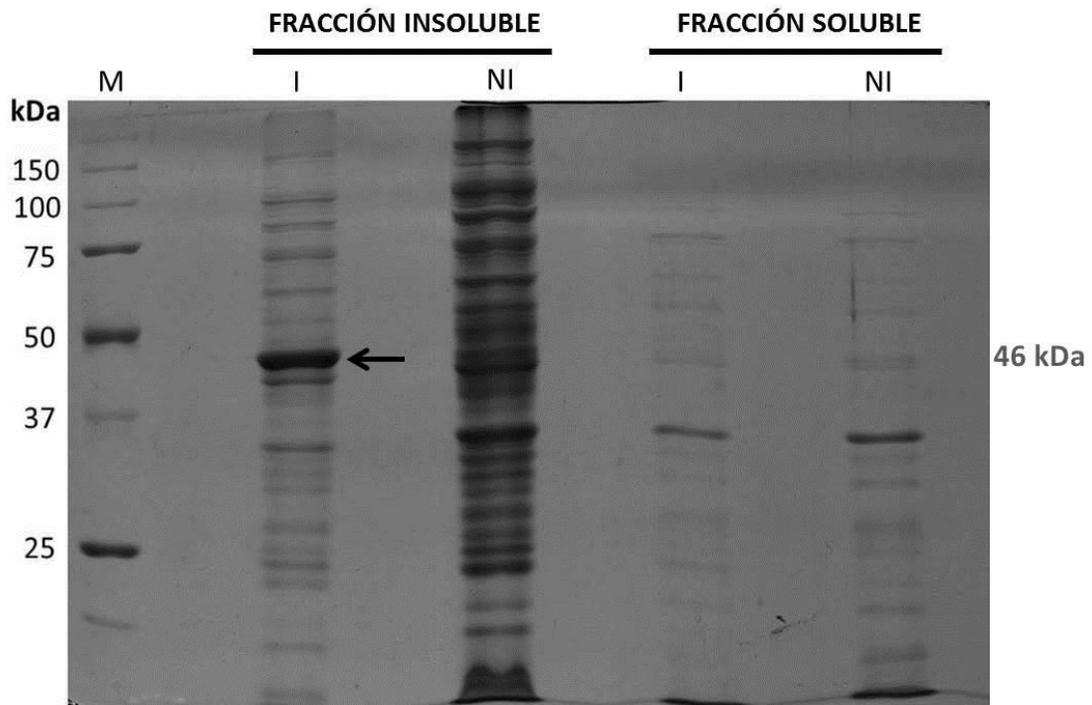


Figura 4. Sobreexpresión de la metilasa M.SacI en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. Marcador de peso molecular (M); cultivo inducido con IPTG (I), cultivo sin inducir (NI). Se observa la presencia de la metilasa (peso teórico 46 kDa; banda correspondiente a la proteína señalada con una flecha) solamente en la fracción insoluble al inducir el cultivo. En la fracción soluble no se detecta a la metilasa.

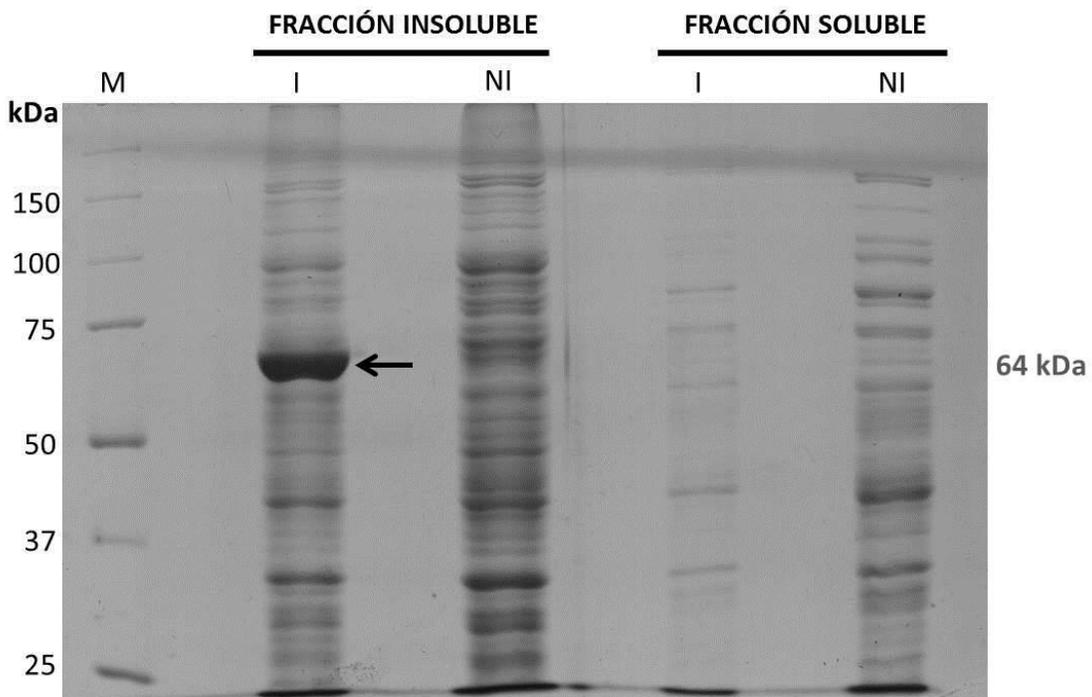


Figura 5. Sobreexpresión de la metilasa M.SalI en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. Marcador de peso molecular (M); cultivo inducido con IPTG (I), cultivo sin inducir (NI). Se observa la presencia de la metilasa (peso teórico 64 kDa, señalada con una flecha la banda correspondiente a la proteína) solamente en la fracción insoluble al inducir el cultivo. En la fracción soluble no se detecta a la metilasa.

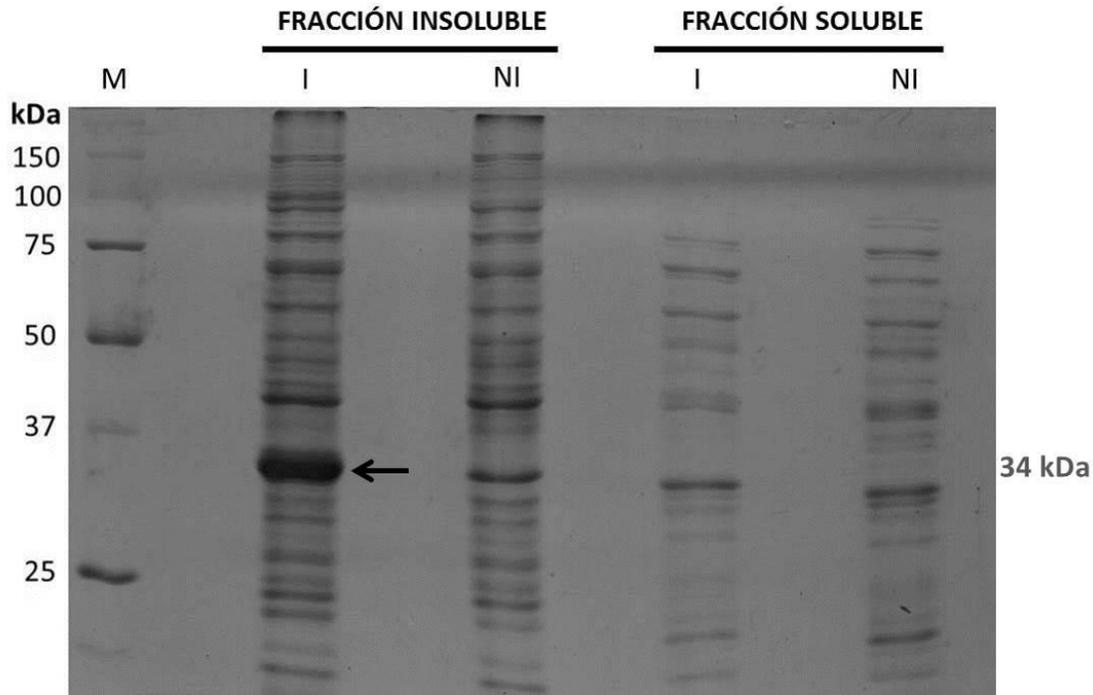


Figura 6. Sobreexpresión de la metilasa M.SphI en *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2. Marcador de peso molecular (M); cultivo inducido con IPTG (I), cultivo sin inducir (NI). Se observa la presencia de la metilasa (peso teórico 34 kDa, señalada con una flecha la banda correspondiente a la proteína) solamente en la fracción insoluble al inducir el cultivo. En la fracción soluble no se detecta a la metilasa.

En algunos trabajos está reportado que la obtención de proteínas en la fracción soluble se favorece al utilizar detergentes como el Tween 20, Triton X-100, entre otros, a bajas concentraciones, para tratar que las proteínas salgan de los cuerpos de inclusión. Para intentar obtener las metilasas en la fracción soluble se repitieron las pruebas de inducción en pequeña escala y se utilizó Triton X-100 para solubilizar los cuerpos de inclusión. Sin embargo, el resultado obtenido fue el mismo y las tres metilasas se detectaron únicamente en la fracción insoluble (datos no mostrados).

6.2 Purificación de las metilasas M.SacI, M.SalI y M.SphI.

Al utilizar el vector de expresión pET28a, se fusionó una etiqueta de histidinas al extremo amino terminal de las metilasas, con el fin de facilitar la purificación de estas enzimas mediante cromatografía de afinidad.

Una ventaja del sistema de purificación que se utilizó en este trabajo, es que las proteínas con la etiqueta de histidinas y que se encuentran en los cuerpos de inclusión pueden hacer que éstos se solubilizan fácilmente con desnaturizantes como la urea o el cloruro de guanidina (Gu•HCl) a concentraciones 8 y 6 M, respectivamente y que de esta forma las proteínas salgan de estos agregados (The QIAexpressionist, 2003). Una vez que las proteínas se purifican bajo condiciones desnaturizantes, éstas deben ser renaturalizadas mediante la remoción del agente desnaturizante. El agente que se empleó en este trabajo fue la urea, ya que su uso ha sido reportado previamente (Maeda, *et al.*, 1995). La urea es capaz de solubilizar los cuerpos de inclusión, lo cual permitió la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Para la purificación de las metilasas, éstas nuevamente fueron sobreexpresadas utilizando a *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 como hospedero de expresión pero en un volumen mayor al utilizado en los ensayos a pequeña escala (figuras 7, 9 y 11 para M.SacI, M.SalI y M.SphI, respectivamente).

A pesar de que en las pruebas de inducción en pequeña escala las metilasas se detectaron únicamente en la fracción insoluble, y de que el intento por solubilizar los cuerpos de inclusión con el detergente Tritón X-100 no resultó exitoso, se decidió pasar ambas fracciones celulares (soluble e insoluble) por una columna con resina de Ni-NTA agarosa. Cada fracción celular se trató con diferentes buffers (ver MATERIALES Y MÉTODOS y ANEXO 2) y ambas fueron analizadas mediante un gel SDS-PAGE (figuras 8, 10 y 12 para M.SacI, M.SalI y M.SphI, respectivamente).

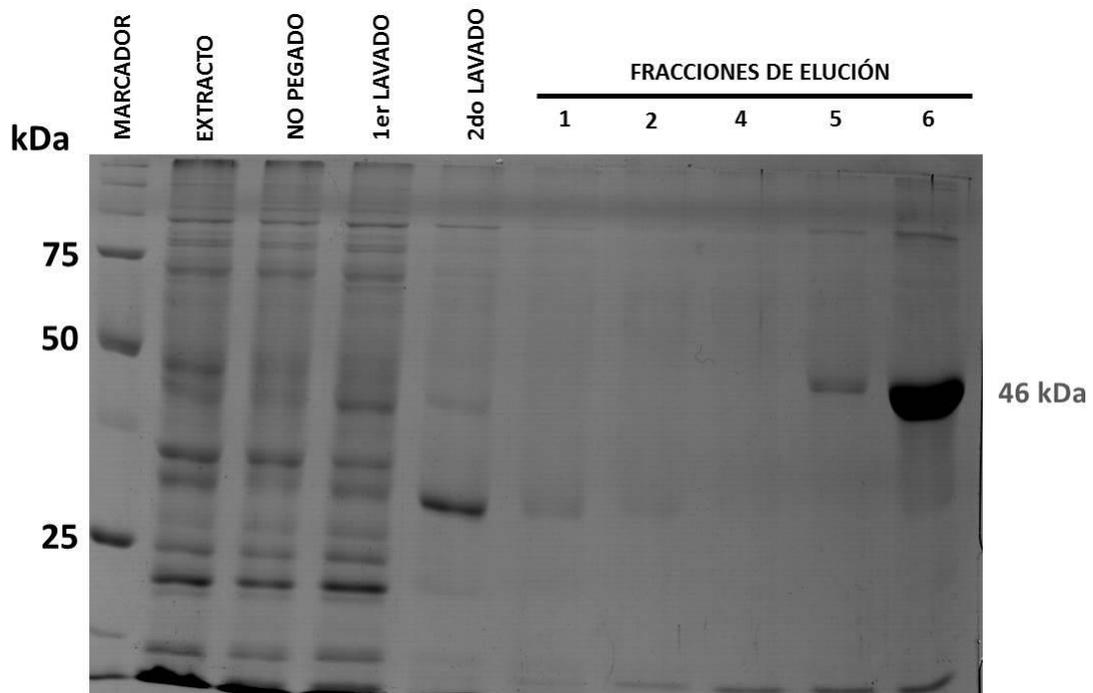


Figura 7. Purificación de la metilasa M.SacI en condiciones desnaturalizantes (fracción insoluble). Se puede observar la recuperación de la metilasa en la última fracción de la elución (peso teórico 46 kDa).

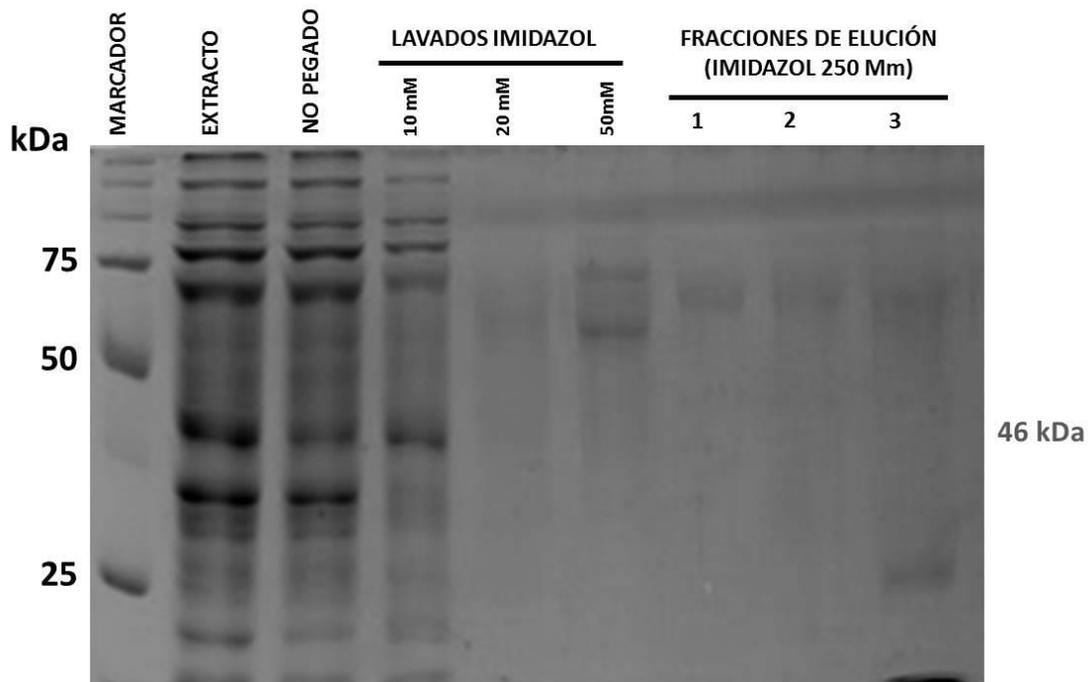


Figura 8. Purificación de la metilasa M.SacI en condiciones nativas (fracción soluble). Se observa que la purificación de la metilasa SacI bajo estas condiciones no resultó exitosa, algo que se había observado previamente en las pruebas de inducción a pequeña escala.

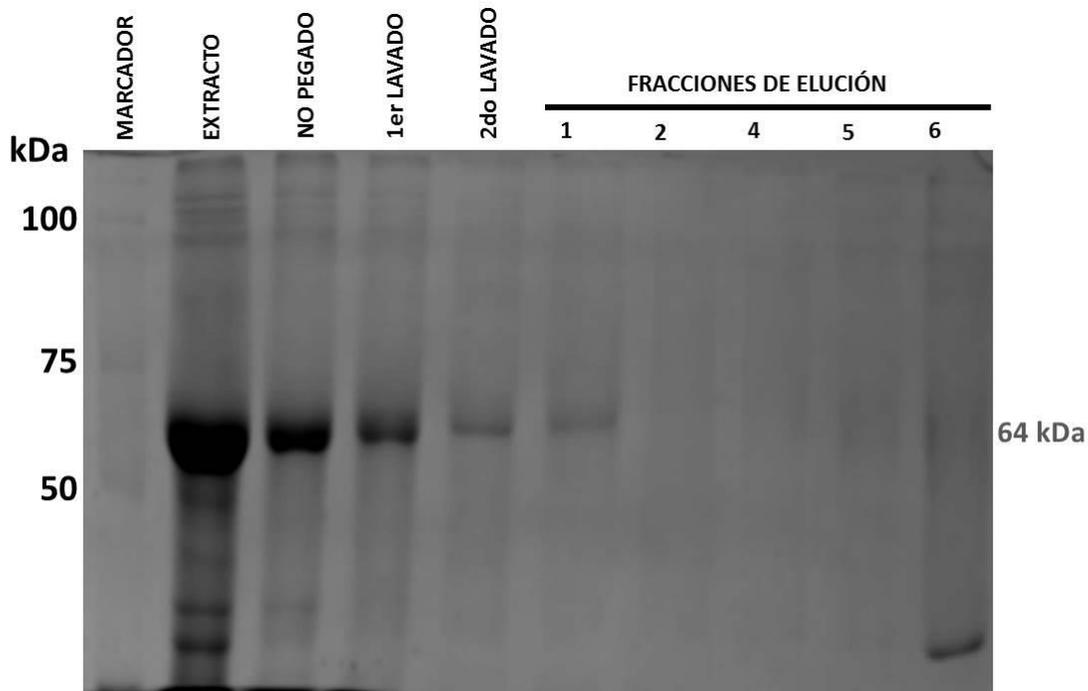


Figura 9. Purificación de la metilasa M.Sall en condiciones desnaturalizantes (fracción insoluble). La purificación de esta metilasa bajo condiciones desnaturalizantes no resultó exitosa ya que como se puede observar una gran cantidad de proteína no se pegó a la columna, y la restante va saliendo con los buffers de lavado.

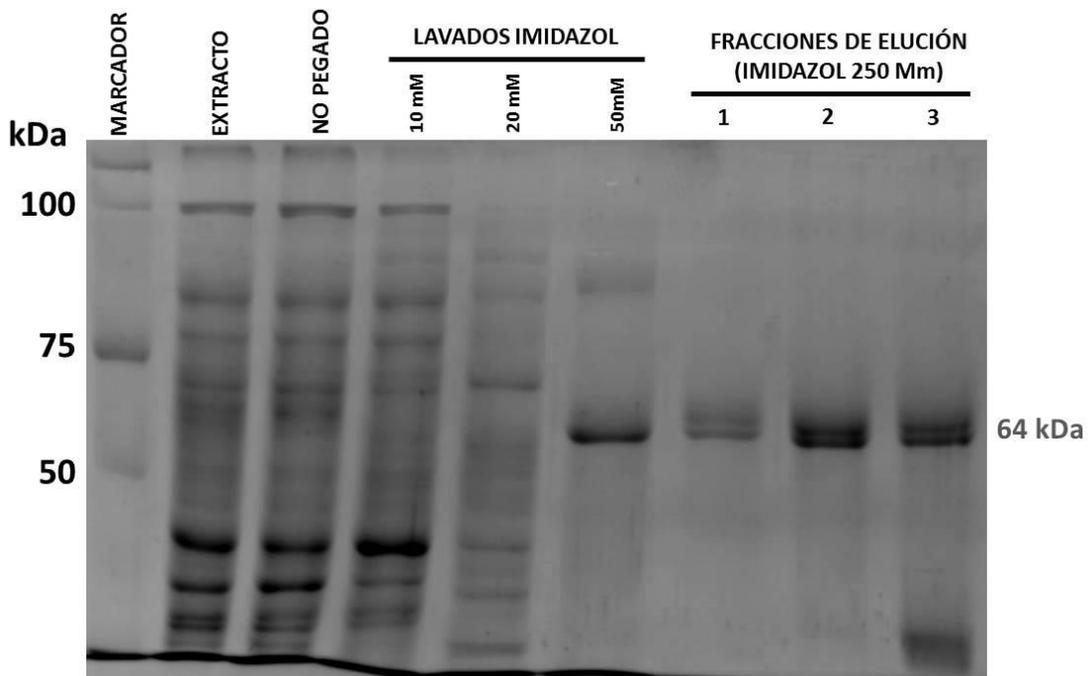


Figura 10. Purificación de la metilasa M.Sall en condiciones nativas (fracción soluble). En las tres fracciones correspondientes a las eluciones con Imidazol 250 mM se puede observar una banda que corresponde con el peso teórico de la metilasa M.Sall (64 kDa), por lo que, contrario a lo observado en las primeras pruebas de inducción, esta vez sí se detectó a la metilasa en la fracción soluble, lo cual indica que se encuentra en su estado nativo y por lo tanto puede ser funcional.

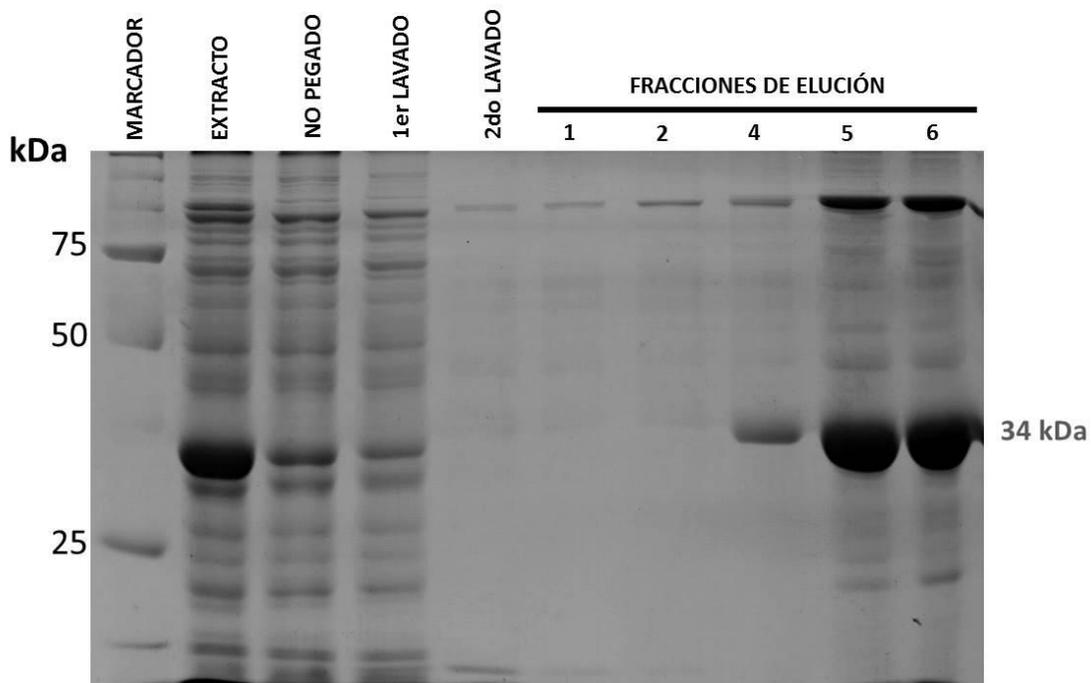


Figura 11. Purificación de la metilasa M.SphI en condiciones desnaturizantes (fracción insoluble). La proteína purificada de los cuerpos de inclusión se detecta desde el inicio en la muestra y posteriormente en las últimas tres fracciones de la elución, siendo las dos últimas las que presentan una mayor cantidad de proteína.

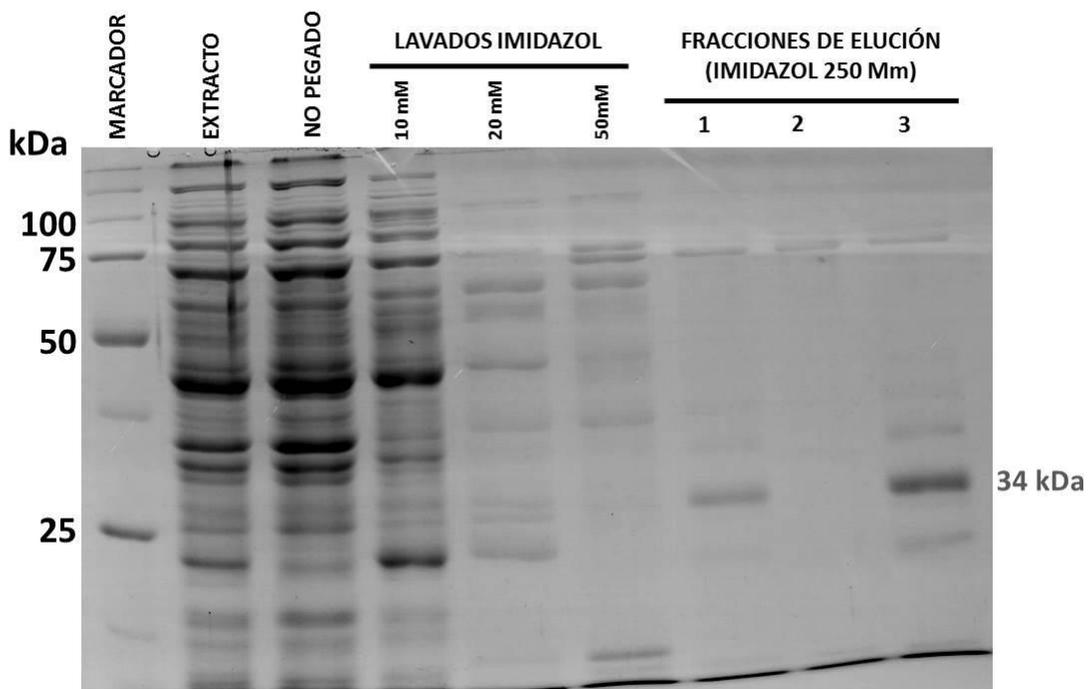


Figura 12. Purificación de la metilasa M.SphI en condiciones nativas (fracción soluble). En la última fracción de la Elución se observa una banda correspondiente al peso teórico señalado para la metilasa (34 kDa); sin embargo, la cantidad de proteína obtenida bajo estas condiciones es muy pobre comparada a la que se obtuvo bajo condiciones desnaturizantes.

Como se observó en cada uno de los análisis por SDS-PAGE, dos de las tres metilasas se obtuvieron de la purificación bajo condiciones nativas aunque en cantidades muy bajas. A pesar de esto, en lo correspondiente a estos dos casos (metilasas M.Sall y M.SphI) se trabajó con las proteínas obtenidas bajo dichas condiciones, ya que al haberlas obtenido de la fracción soluble era más probable que estas metilasas se encontraran en su estado nativo, es decir, correctamente plegadas y por lo tanto la probabilidad de que fueran funcionales era mayor.

Para el caso de la metilasa M.SacI la purificación exitosa fue solamente la realizada bajo condiciones desnaturalizantes, es decir, que la metilasa se agregó en forma de cuerpos de inclusión, resultado que se observó previamente en las pruebas de inducción a pequeña escala. Por tal motivo, resultó necesaria su renaturalización e intentar que la metilasa se plegara de forma correcta. Lo anterior se realizó mediante diálisis contra buffers que disminuían la concentración de urea desde 8 M hasta 0 M (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

6.3 Evaluación de la actividad *in vitro* de las metilasas M.SacI, M.Sall y M.SphI.

Una vez que las metilasas fueron purificadas se procedió a evaluar su actividad; para evitar su degradación fueron preservadas en buffer de almacenamiento (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

Para determinar si las metilasas tenían actividad *in vitro* se realizaron ensayos de digestión utilizando plásmidos con sitios de reconocimiento para estas enzimas. En cada reacción se utilizó 1 µg de DNA como sustrato para las metilasas. Finalmente los análisis se realizaron en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz UV (ver Métodos).

M.Sall

Esta metilasa se obtuvo de la purificación bajo condiciones nativas, por lo cual es factible suponer que la metilasa estaba correctamente plegada y muy probablemente era funcional. Esto, se comprobó incubando el plásmido de prueba

resultó parcial en todos los casos (1 μ L, 2 μ L y 3 μ L), el ensayo mostró que la protección es mayor con 2 μ L, es decir, aproximadamente 4 μ g de metilasa.

Este primer ensayo de actividad se realizó incubando durante 1 hora la reacción de metilación, por lo tanto, se repitió el ensayo aumentando el tiempo de incubación a 12 horas (figura 14).

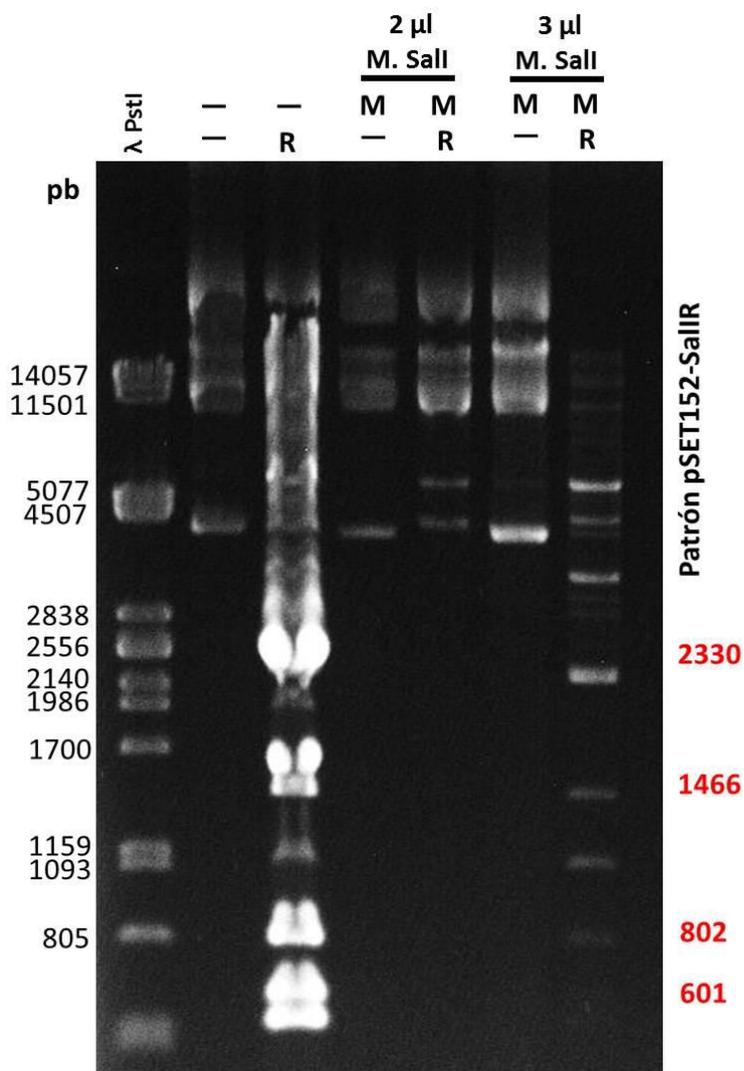


Figura 14. Ensayo de actividad de la metilasa M.Sall. Como control se utilizó el plásmido pSET152 sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), o digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestra al plásmido tratado con diferentes cantidades de metilasa (M) (cada μ L contenía aproximadamente 2 μ g de metilasa), sin digerir (-) y digerido con Sall (R). A la izquierda de la imagen se indican los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pSET152 con Sall.

En el segundo ensayo de la actividad de M.Sall se observó una mayor protección contra la restricción de Sall utilizando 2 μ L, es decir, aproximadamente 4 μ g de metilasa M.Sall. Si bien la protección contra la restricción no fue total (ya que se observaron algunas bandas que corresponderían al plásmido lineal), ésta resultó mayor que al utilizar más metilasa (aproximadamente 6 μ g).

M.SphI

Las pruebas de metilación con M.SphI se realizaron utilizando como sustrato el plásmido pIJ6902. Aunque esta metilasa no necesitó renaturalizarse debido a que se obtuvo de la fracción soluble y esto favorecía que fuera funcional, la enzima no mostró actividad en los ensayos realizados (figura 15).

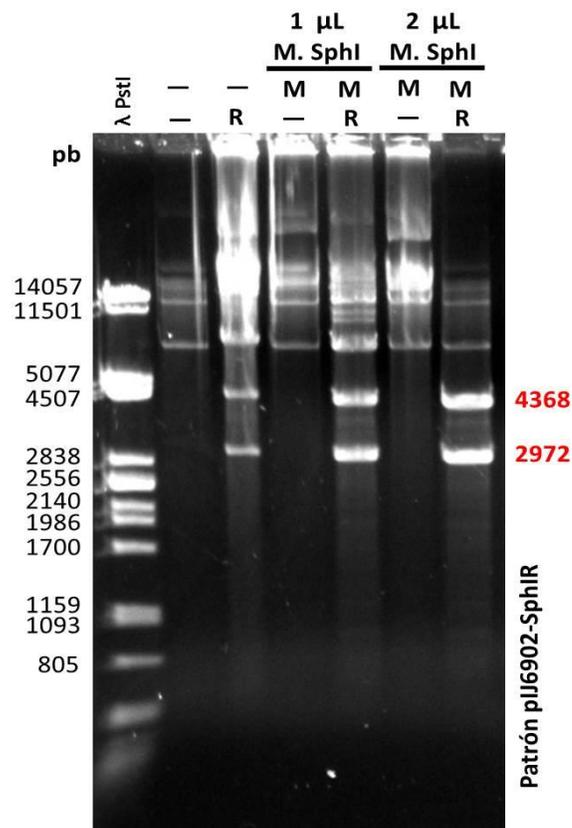


Figura 15. Ensayo de actividad de la metilasa M.SphI en el plásmido pIJ6902. Como control se utilizó el plásmido pIJ6902 sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción SphI (R). El resto de los carriles muestra al plásmido tratado con diferentes cantidades de metilasa (M), sin digerir (-) o digerido con SphI (R). A la izquierda de la imagen se indican los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pIJ6902 con SphI.

En la figura 15 se observa que la metilasa M.SphI no tuvo actividad ya que no se observa protección contra la digestión y el patrón de bandas observado para las pruebas es el mismo que se observa en el control (pIJ6902 sin metilar y digerido con SphI).

A diferencia de la metilasa M.Sall, la metilasa M.SphI se obtuvo en una cantidad mucho menor, con una concentración menor a 0.5 µg/µL de proteína, por lo tanto, se repitió el ensayo de actividad utilizando más enzima y con otro DNA como sustrato; se eligió el DNA del bacteriófago TO1 (figura 16).

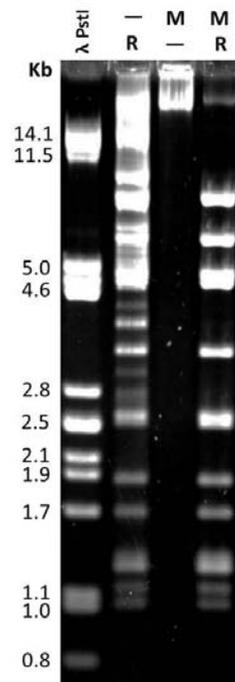


Figura 16. Ensayo de actividad de la metilasa M.SphI sobre el DNA del bacteriófago TO1. Como control tenemos al DNA del bacteriófago TO1 sin tratar con la metilasa (-), es decir, no metilado, y digerido con enzima de restricción SphI (R). El resto de los carriles muestra el DNA del bacteriófago tratado con metilasa (M), sin digerir (-) o digerido con SphI (R). A la izquierda de la imagen se indican los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) correspondiente al DNA de lambda digerido con PstI.

La metilasa M.SphI se purificó en condiciones nativas y esto indicaba que se encontraba plegada correctamente y por lo tanto la probabilidad de que fuera funcional era alta. Sin embargo, no se detectó actividad en ninguno de los ensayos realizados. Lo anterior puede deberse a la baja cantidad de proteína obtenida que

era de menos de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, así como a la falta de condiciones óptimas para que la metilasa desarrollara su actividad.

Sobre esa base, no se descarta que la metilasa M.SphI que purificamos sea funcional, pero sería necesario probar diferentes factores para determinar las condiciones en las cuales la metilasa sea activa.

M.SacI

De acuerdo con las figuras 7 y 8, la metilasa M.SacI se obtuvo solamente en la purificación en condiciones desnaturalizantes con urea a una concentración de 8M, por lo que posteriormente pasó por un proceso de renaturalización mediante diálisis contra buffers que disminuían paulatinamente la concentración de urea (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

Lamentablemente con la metilasa M.SacI tampoco se detectó actividad alguna en los ensayos de digestión (datos no mostrados), ya que los plásmidos tratados con esta metilasa fueron susceptibles a ser digeridos con SacI. Esta metilasa tampoco se obtuvo en gran cantidad (menos de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Por lo anterior, no se descarta que la metilasa se encuentre bien renaturalizada, pero podría necesitarse una mayor concentración de enzima o bien proporcionar las condiciones necesarias para que sea activa.

6.4 Optimización de la actividad *in vitro* de la metilasa M.SalI

Ya que la metilasa M.SalI fue la que mostró actividad *in vitro*, se prosiguió a optimizar las condiciones de reacción para mejorar su actividad. Para ello se probaron diferentes condiciones en cada uno de los ensayos y con ello se determinó qué condición favorecía su actividad. El procedimiento a seguir después de las reacciones de metilación, corresponde al utilizado en los ensayos previos (ver MATERIALES Y MÉTODOS).

Para establecer el o los tipos de iones que favorecen la reacción, inicialmente se realizó una revisión bibliográfica, encontrándose que en varios trabajos se reporta el uso de NaCl a concentraciones que varían entre 50 mM y 25 (Janulaitis, *et al*,

1982). También se reporta el uso de altas concentraciones de Tris-HCl (Kiss, *et al*, 1983). Y en varias metilasas comerciales se utiliza KCl a una concentración de 50 mM. Con base en lo anterior se decidió preparar cuatro diferentes buffers de reacción (ver MATERIALES Y MÉTODOS) y se realizó un ensayo con los mismos para determinar en cuál de ellos se observaba una mejor actividad de M.Sall (figura 17).

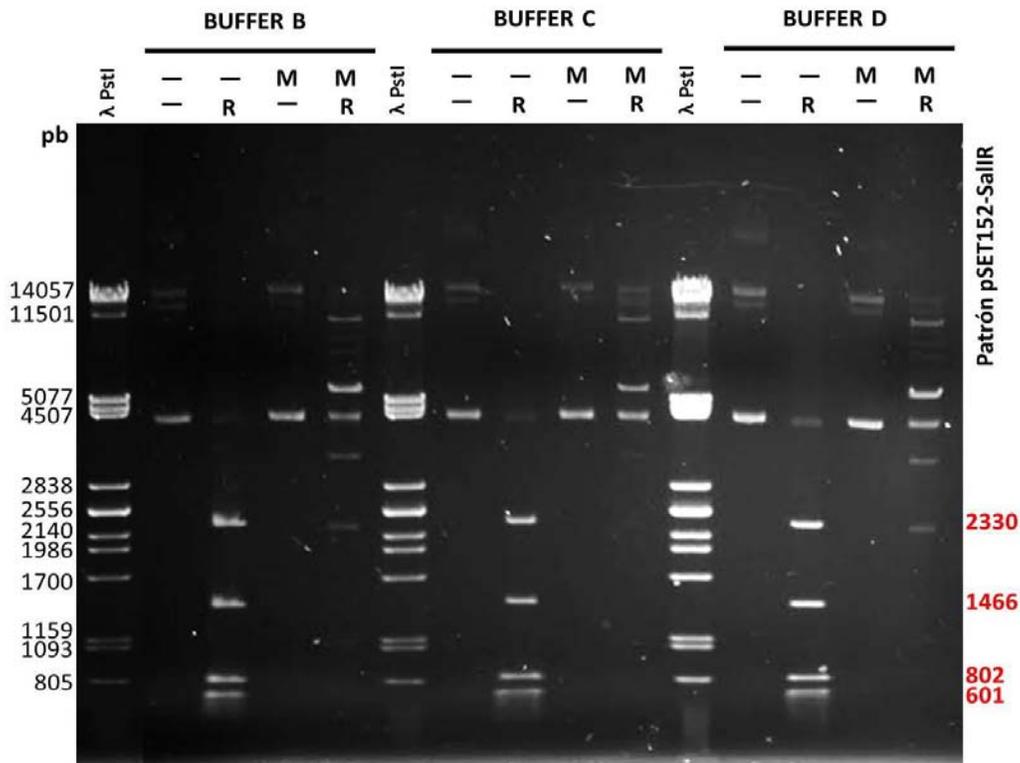


Figura 17. Ensayo de actividad de la metilasa M.Sall en el plásmido pSET152 y con diferentes buffers. Como control se utilizó el plásmido sin tratar con la metilasa (-), es decir, no metilado, y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestra al plásmido sin metilar (-) ni digerido (-); tratado con metilasa (M), sin digerir (-) o digerido con Sall (R). **BUFFER B:** Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, pH 8. **BUFFER C:** Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, KCl 50 mM, pH 8. **BUFFER D:** Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8. A la izquierda de la imagen los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pSET152 con Sall

El buffer A (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8) no se probó en este ensayo ya que fue el buffer utilizado en los primeros ensayos.

En la figura 17 se observa que en los buffers B y D el plásmido tratado con la metilasa presenta un nivel menor de protección contra la digestión ya que se

observa un mayor número de bandas al digerirlo y se determinó que el Buffer C (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, KCl 50 mM, pH 8) favorecía la actividad de la metilasa M.Sall.

Ya que el KCl presente en el buffer C favoreció la actividad de la metilasa M.Sall, se procedió a probar diferentes concentraciones de KCl (10 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM) para determinar en cuál de ellas la metilasa actuaba mejor (figura 18).

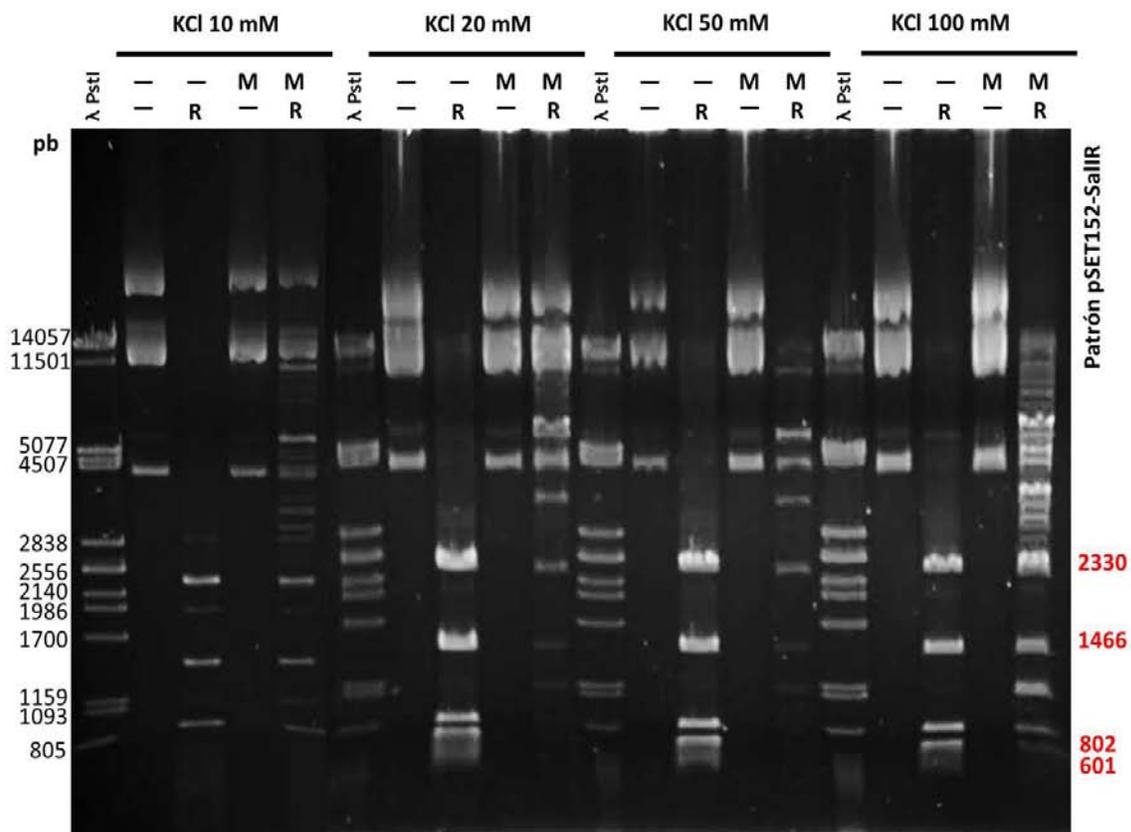
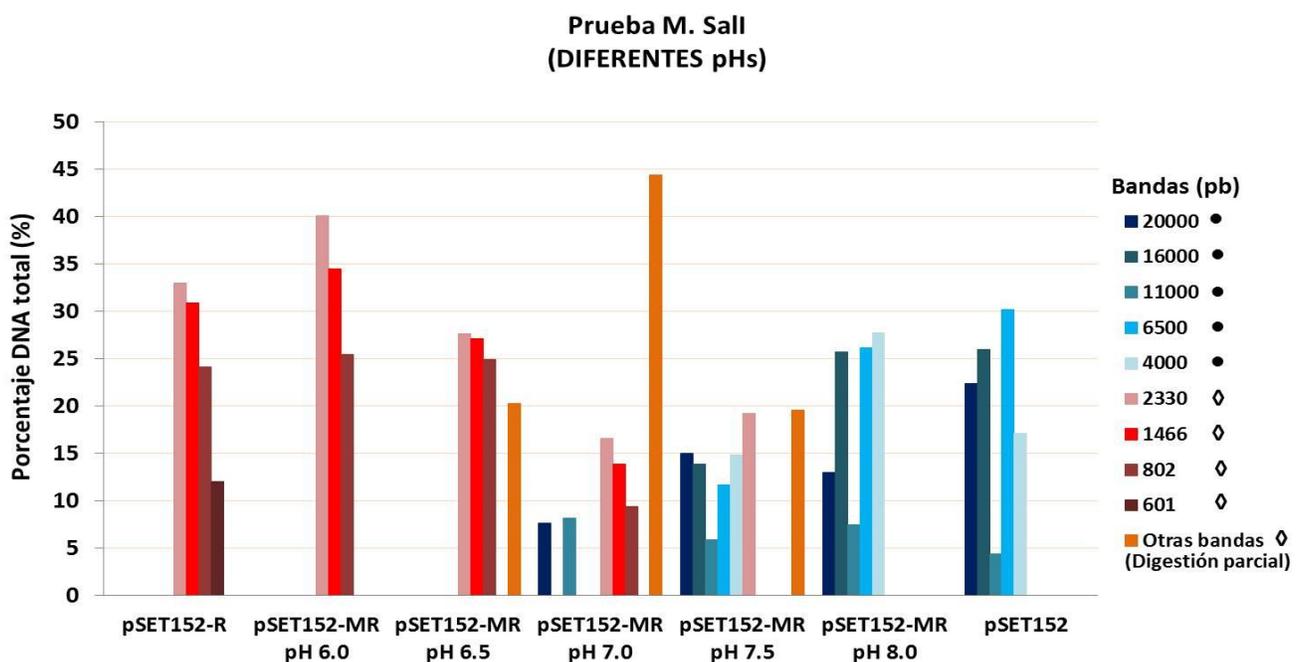


Figura 18. Ensayo de actividad de la metilasa M.Sall en el plásmido pSET152 utilizando buffers con diferente concentración de KCl. Como control se observa plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestra al plásmido sin metilar (-) ni digerido (-); tratado con metilasa (M), sin digerir (-) o, digerido con Sall (R).

A la izquierda de la imagen los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pSET152 con Sall

Claramente se observa en la figura 19 que en pHs menores a 7.0 la actividad de la metilasa es prácticamente nula, es decir, que en estas condiciones la enzima no es capaz de metilar el DNA, ya que como se observa en el gel, el DNA es completamente digerido y no hay protección alguna contra la digestión. A partir del pH 7.0 la protección comienza a ser más notoria conforme el pH se va elevando, siendo el pH 8.0 la mejor opción ya que casi todo el DNA permanece sin digerir, indicándonos que la metilasa modificó un alto porcentaje del DNA total.

Para observar el resultado del ensayo anterior de una forma más cuantitativa se realizó una cuantificación de DNA utilizando el programa KODAK Molecular Imaging y con los datos obtenidos se procedió a la construcción de una gráfica (figura 20).



NOTA: ● Bandas correspondientes al plásmido pSET152 sin digerir (tonalidades azules); ◇ bandas correspondientes a la digestión del plásmido pSET152 con R. Sall (tonalidades rojas).

Figura 20. Gráfica que representa las bandas obtenidas en el ensayo de digestión de la metilasa M.Sall en el plásmido pSET152 utilizando buffers con diferente pH. En el lado derecho se anotaron las bandas que fueron resultado de la digestión con Sall, “Otras bandas” indica la suma de las bandas resultantes en digestión parcial.

Aunque en el gel de agarosa al 0.8% del ensayo de actividad de M.Sall utilizando diferentes pHs (figura 19) se puede observar cómo mejora la actividad de la metilasa a partir del pH 7.0, en la gráfica se puede apreciar esto pero de una forma cuantitativa, ésta nos presenta que en buffers a pH menores a 7 la protección contra la digestión es prácticamente nula, en el pH 7.0 el mayor porcentaje de DNA se encuentra en el apartado “otras bandas”, es decir, que hay un gran número de bandas generadas por digestión parcial, tal como se observa en la figura 19 en donde se aprecia una gran cantidad de bandas como resultado de una actividad poco eficiente por parte de la metilasa M.Sall. En el pH 7.5 aún se presentan bandas como resultado de digestión parcial pero en un porcentaje mucho menor y tres de las bandas resultantes del patrón de pSET52 digerido con Sall (601, 802 y 1466) desaparecen por completo. Finalmente se observa una gran similitud entre el plásmido pSET152 metilado y digerido con R.Sall en un pH 8.0 y el plásmido sin metilar ni digerir, esto como resultado de una eficiente metilación por parte de la metilasa M.Sall.

Prosiguiendo con la optimización de la actividad de M.Sall se decidió utilizar $MgCl_2$ para determinar si producía algún efecto en la actividad de la metilasa, para ello, se utilizó $MgCl_2$ en diferentes concentraciones (1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM). Para este ensayo se preparó un buffer diferente (Tris-HCl 50 mM, KCl 20 mM, pH 8.0). Este buffer contaba ya con las condiciones que optimizaban la actividad de M.Sall determinadas en los ensayos anteriores, simplemente no contenía EDTA, ya que éste es un agente quelante y por lo tanto el $MgCl_2$ no tendría efecto alguno en la actividad de la metilasa, con base en lo anterior se utilizó un buffer con EDTA 10 mM para tener un control negativo.

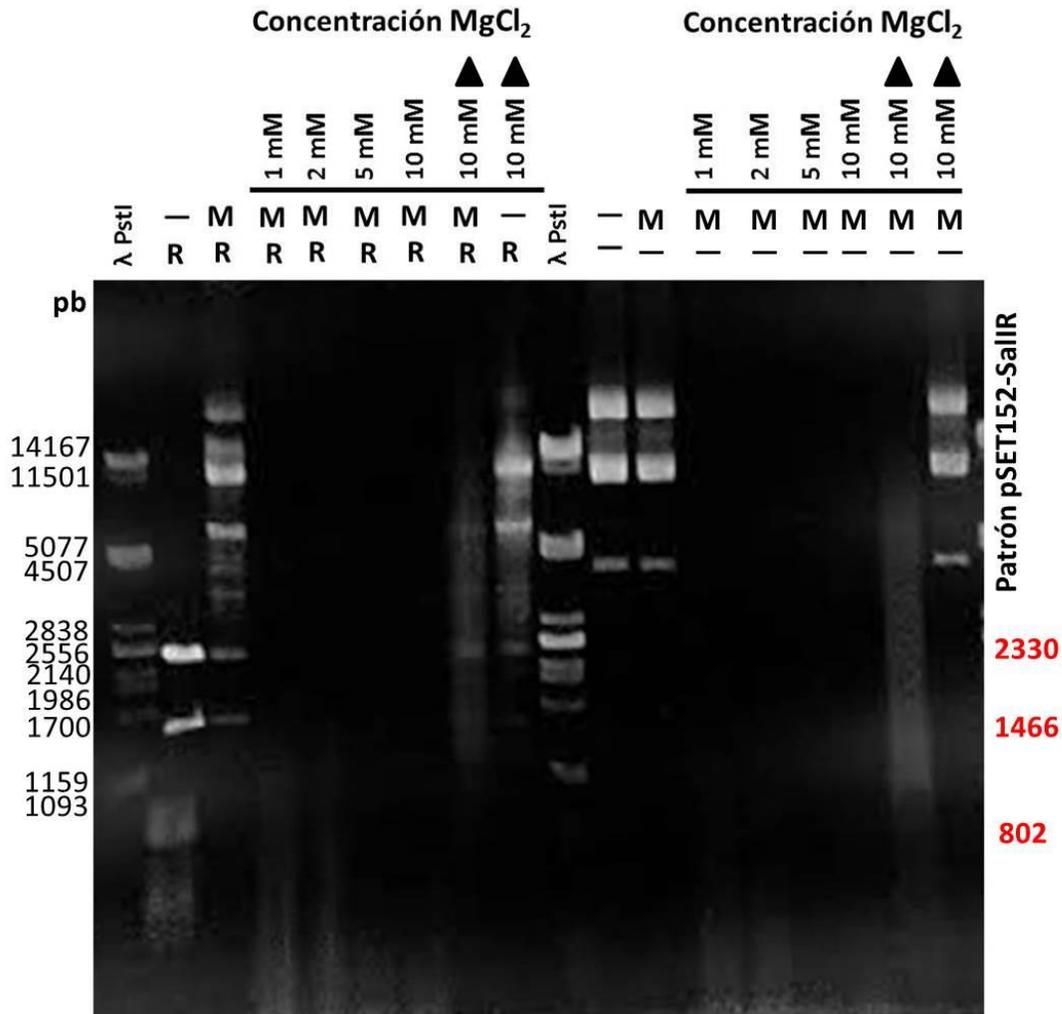


Figura 21. Ensayo de actividad de la metilasa M.Sall en el plásmido pSET152 utilizando diferentes concentraciones de MgCl₂. Como control se observa plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestran al plásmido sin metilar (-), ni digerido (-); y al plásmido tratado con metilasa (M) sin digerir (-), y digerido con Sall (R). El triángulo sobre algunos carriles indica el uso de buffer de reacción con EDTA 10 mM. A la izquierda de la imagen los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pSET152 con Sall.

El efecto al utilizar MgCl₂ resultó muy notorio (figura 21), en los carriles con muestras en las que se utilizó magnesio parece que el DNA se hubiese degradado. En la figura también se aprecia que en los carriles en los que se utilizó buffer con EDTA 10 mM esto no sucedió, ya que como se mencionó anteriormente, es un agente quelante y anuló el efecto del magnesio en las muestras.

Está reportado que el Mg^{2+} causa un efecto en la actividad de la metilasa M.SssI, haciendo que esta metilasa presente actividad de topoisomerasa en la presencia de este catión (Matsuo, *et al*, 1994), en ese trabajo se utilizan otras metilasas, entre ellas M. HhaI, M. HpaII y M. MspI, y se reporta que en la presencia de Mg^{2+} estas metilasas pierden afinidad por el DNA, al igual que la metilasa M. SssI. Puede ser que M.Sall haya perdido afinidad por el DNA tal como se reportó para las otras metilasas; sin embargo, también cabe la posibilidad de que la metilasa M.Sall purificada, no se encuentre 100% pura sino que haya presencia de alguna o algunas nucleasas que se activaron con el magnesio y que degradaron al DNA, ya que como se observa en la imagen de la purificación de M.Sall (figura 10), se aprecia más de una banda.

La gran mayoría de las reacciones de metilación son catalizadas por metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina o SAM (Cheng, *et al*, 1999), M.Sall pertenece a esta clase de enzimas y por lo tanto utiliza SAM como donador de grupos metilo, por lo tanto, se decidió realizar un ensayo utilizando SAM en concentraciones 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M y 1 mM (figura 22).

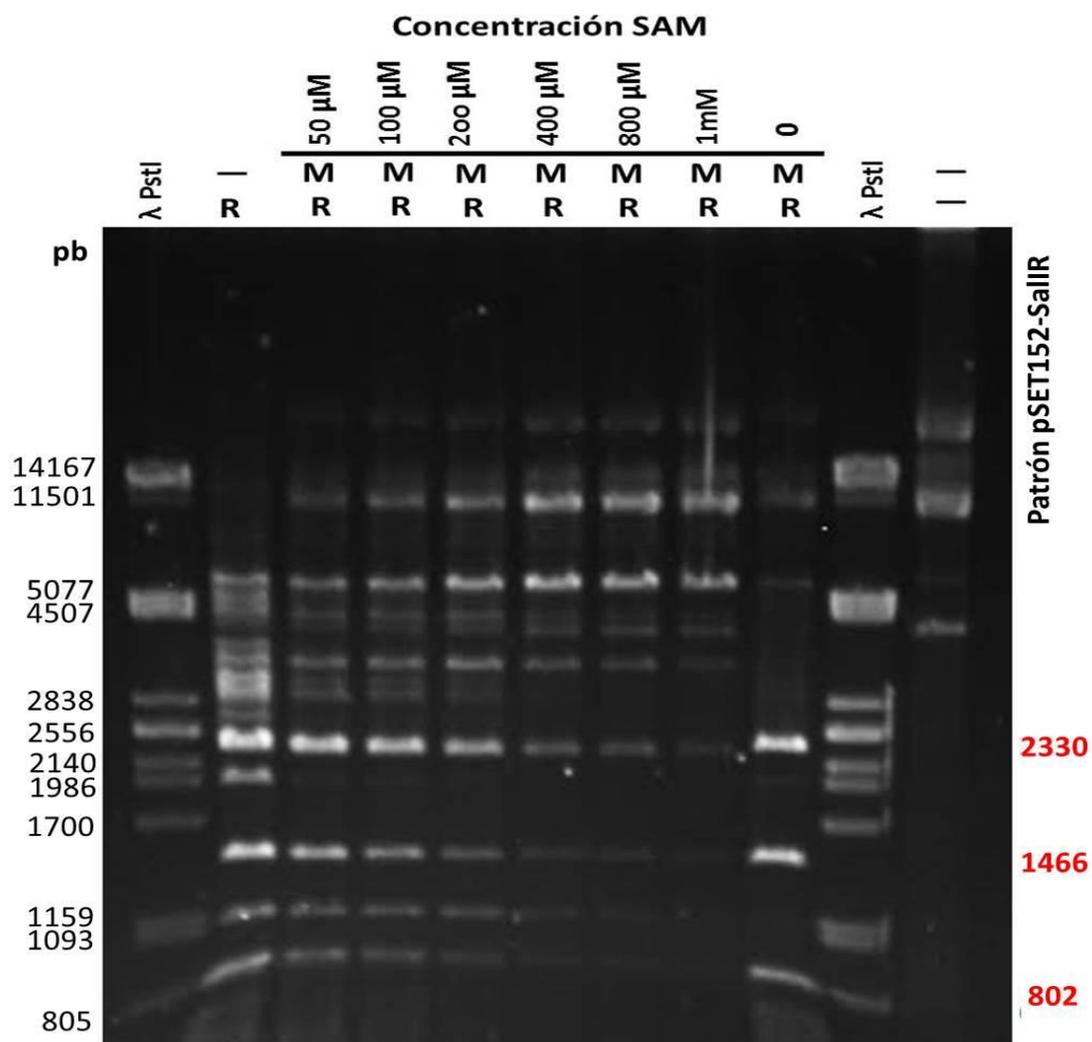


Figura 22. Ensayo de actividad de la metilasa M.SalI en el plásmido pSET152 utilizando diferentes concentraciones de SAM. Como control se observa plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestra al plásmido sin metilar (-) ni digerir (-); y al plásmido tratado con metilasa (M) y digerido con Sall (R). A la izquierda de la imagen los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pSET152 con Sall.

Este ensayo con diferentes concentraciones de SAM, el gel ilustra muy bien cómo la actividad de la metilasa M.SalI se va optimizando conforme la concentración de SAM se eleva, al parecer la enzima de restricción Sall no digirió completamente el DNA del control ya que se ven demasiadas bandas resultado de una actividad parcial; sin embargo, hay otro control que es el plásmido con metilasa pero sin

SAM, en donde sí se obtiene el patrón característico de pSET152 digerido con Sall. Al igual que con el ensayo de actividad utilizando buffers con diferente pH, en este ensayo también se realizó una cuantificación y con los datos se procedió a realizar una gráfica que nos diera una representación cuantitativa del ensayo (figura 23).

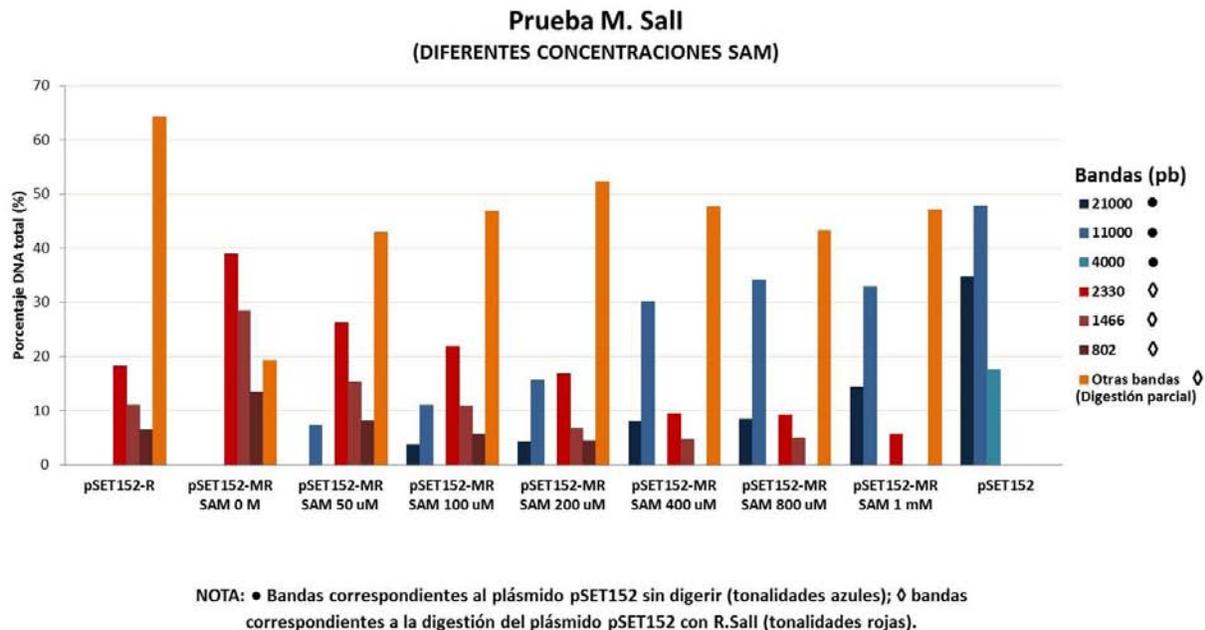


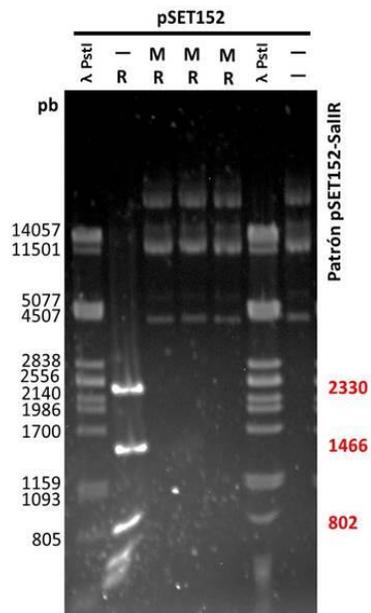
Figura 23. Gráfica que representa las bandas obtenidas en el ensayo de digestión de la metilasa M.Sall en el plásmido pSET152 utilizando diferentes concentraciones de SAM. En el lado derecho se anotaron las bandas que fueron resultado de la digestión con Sall, “Otras bandas” indica la suma de las bandas resultantes en digestión parcial.

Tal como se observa en la figura 22 y como se mencionó, en la gráfica se puede apreciar que un alto porcentaje del DNA del control (pSET152 sin metilar y digerido con Sall) no se digirió completamente. Conforme se va elevando la concentración de SAM se observa en la gráfica que bandas pertenecientes al patrón de pSET152 digerido con Sall van desapareciendo como la de 802 pb que desaparece a partir de SAM 400 μ M, y la de 1466 pb que desaparece utilizando SAM 1mM, si bien la banda de 2330 pb no desaparece por completo disminuye altamente su porcentaje hasta quedar en menos de un 10% con SAM 1mM. Es así como con este ensayo se determinó que la mejor concentración de S-adenosilmetionina es 1mM ya que mejora la actividad de la metilasa M.Sall.

6.5 Ensayos de actividad in vitro de la metilasa M.Sall con las condiciones óptimas

Una vez que se optimizó la actividad de la metilasa M.Sall se realizaron pruebas por triplicado en tres diferentes plásmidos con sitios Sall (pSET152, pJV1 y pIJ486) y se realizaron cuantificaciones para un análisis cuantitativo (figuras 24, 25 y 26). Con base en los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se utilizó el conjunto de condiciones que favorecieron la actividad de la metilasa M.Sall en cada uno de los ensayos: KCl 20 mM, pH 8.0, y SAM 1mM.

A



B

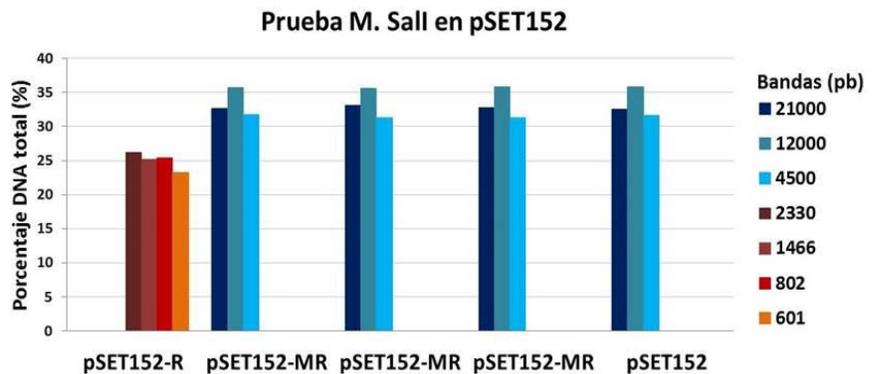


Figura 24. Ensayo por triplicado de actividad in vitro de M.Sall en el plásmido pSET152. A. Gel de agarosa al 0.8%, como control se observa el plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con la enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestran al plásmido sin metilar (-) ni digerir (-); y al plásmido tratado con metilasa (M) y digerido con Sall (R). **B.** Gráfica que representa las bandas obtenidas en este ensayo al digerir con Sall, en el lado derecho se anotaron las bandas que fueron resultado de la digestión, así como las bandas que presenta el plásmido sin digerir. En tonalidades azules las bandas correspondientes al plásmido pSET152 sin digerir y en tonalidades rojas las bandas correspondientes a la digestión de pSET152 con Sall.

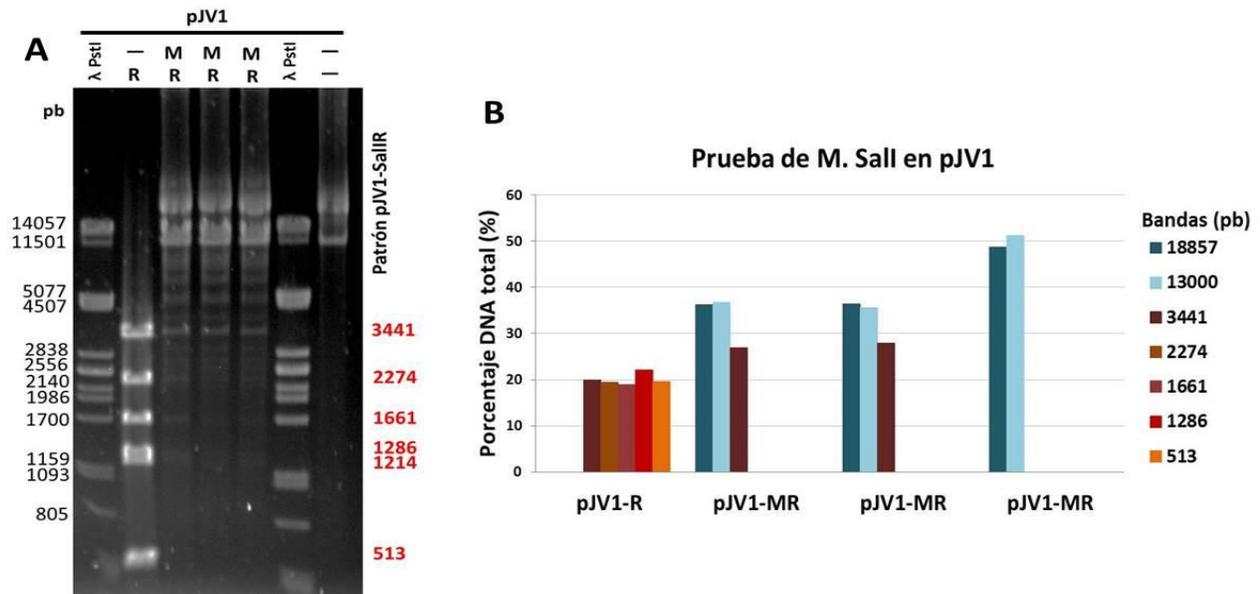


Figura 25. Ensayo por triplicado de actividad in vitro de M.Sall en el plásmido pJV1. **A.** Gel de agarosa al 0.8%, como control se observa el plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestran al plásmido sin metilar (-) ni digerir (-); y al plásmido tratado con metilasa (M) y digerido con Sall (R). **B.** Gráfica que representa las bandas obtenidas en este ensayo al digerir con Sall, en el lado derecho se anotaron las bandas que fueron resultado de la digestión, así como las bandas que presenta el plásmido sin digerir. En tonalidades azules las bandas correspondientes al plásmido pJV1 sin digerir y en tonalidades rojas las bandas correspondientes a la digestión de pJV1 con Sall.

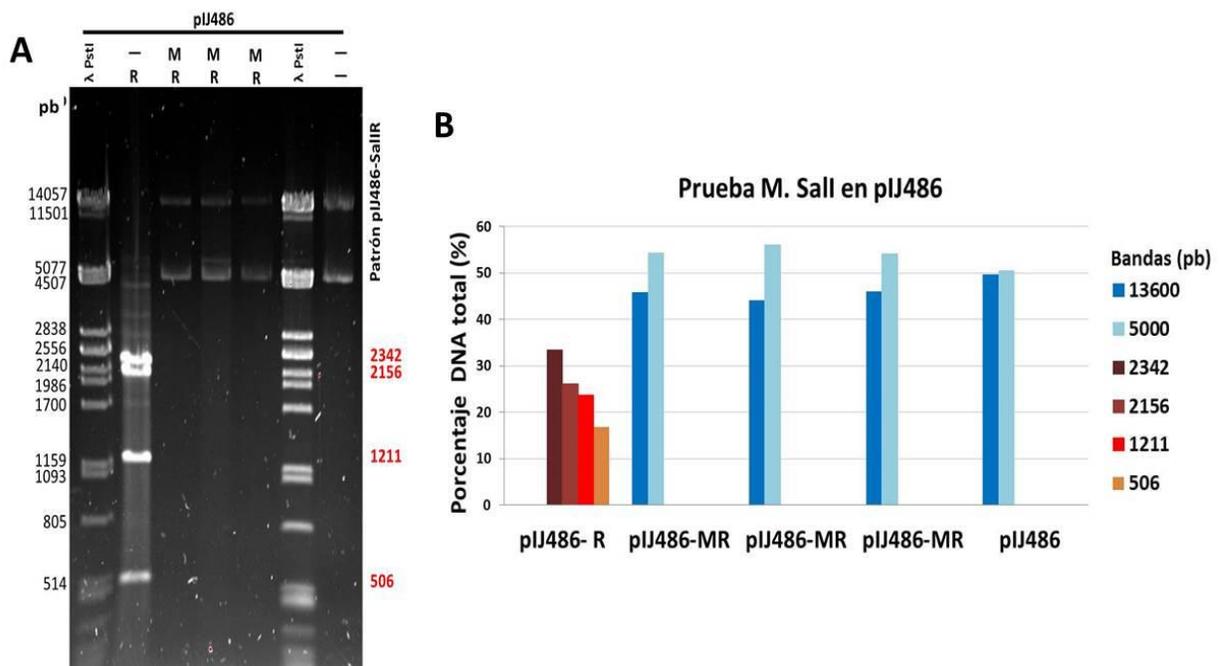


Figura 26. Ensayo por triplicado de actividad in vitro de M.Sall en el plásmido pIJ486. **A.** Gel de agarosa al 0.8%, como control se observa el plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), y digerido con enzima de restricción Sall (R). El resto de los carriles muestran al plásmido sin metilar (-) ni digerir (-); y al plásmido tratado con metilasa (M) y digerido con Sall (R). A la izquierda de la imagen los pesos moleculares del marcador de peso molecular (pb) y a la derecha los pesos moleculares de las bandas esperadas de la digestión del plásmido pIJ482 con Sall **B.** Gráfica que representa las bandas obtenidas en este ensayo al digerir con Sall, en el lado derecho se anotaron las bandas que fueron resultado de la digestión, así como las bandas que presenta el plásmido sin digerir. En tonalidades azules las bandas correspondientes al plásmido pIJ486 sin digerir y en tonalidades rojas las bandas correspondientes a la digestión de pIJ486 con Sall.

En los ensayos por triplicado de la metilasa M.Sall en los plásmidos pSET152 y pIJ486 (figuras 24 y 26), se observa una completa protección contra la digestión de Sall, lo cual se puede apreciar tanto en el gel como en sus gráficas correspondientes, y se observa una gran similitud entre los plásmidos metilados y digeridos y los plásmidos sin metilar ni digerir, lo cual señala que la metilasa modificó todo el DNA.

En el ensayo por triplicado de la metilasa M.Sall en el plásmido pJV1 (figura 25) se observa una banda correspondiente al patrón de pJV1 digerido con Sall (banda de 3441 pb) en dos de los tres carriles del plásmido metilado y digerido con Sall,

además de que se observan otras bandas que aunque no se detectaron por el programa en la cuantificación, son visibles en el gel. Lo anterior puede deberse a que la metilasa M.Sall haya modificado la mayor parte del DNA pero no el 100% de éste, así como a que el plásmido utilizado no se encontrara completamente limpio y esto haya afectado el ensayo.

6.6 Análisis de las secuencias de las metilasas M.SacI, M.Sall y M.SphI

Con la finalidad de identificar los dominios conservados en las secuencias de las tres metilasas utilizadas en este trabajo, se realizó una búsqueda mediante BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) implementada en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information) empleando cada una de las secuencias de las metilasas M.SacI, M.Sall y M.SphI.

M.Sacl

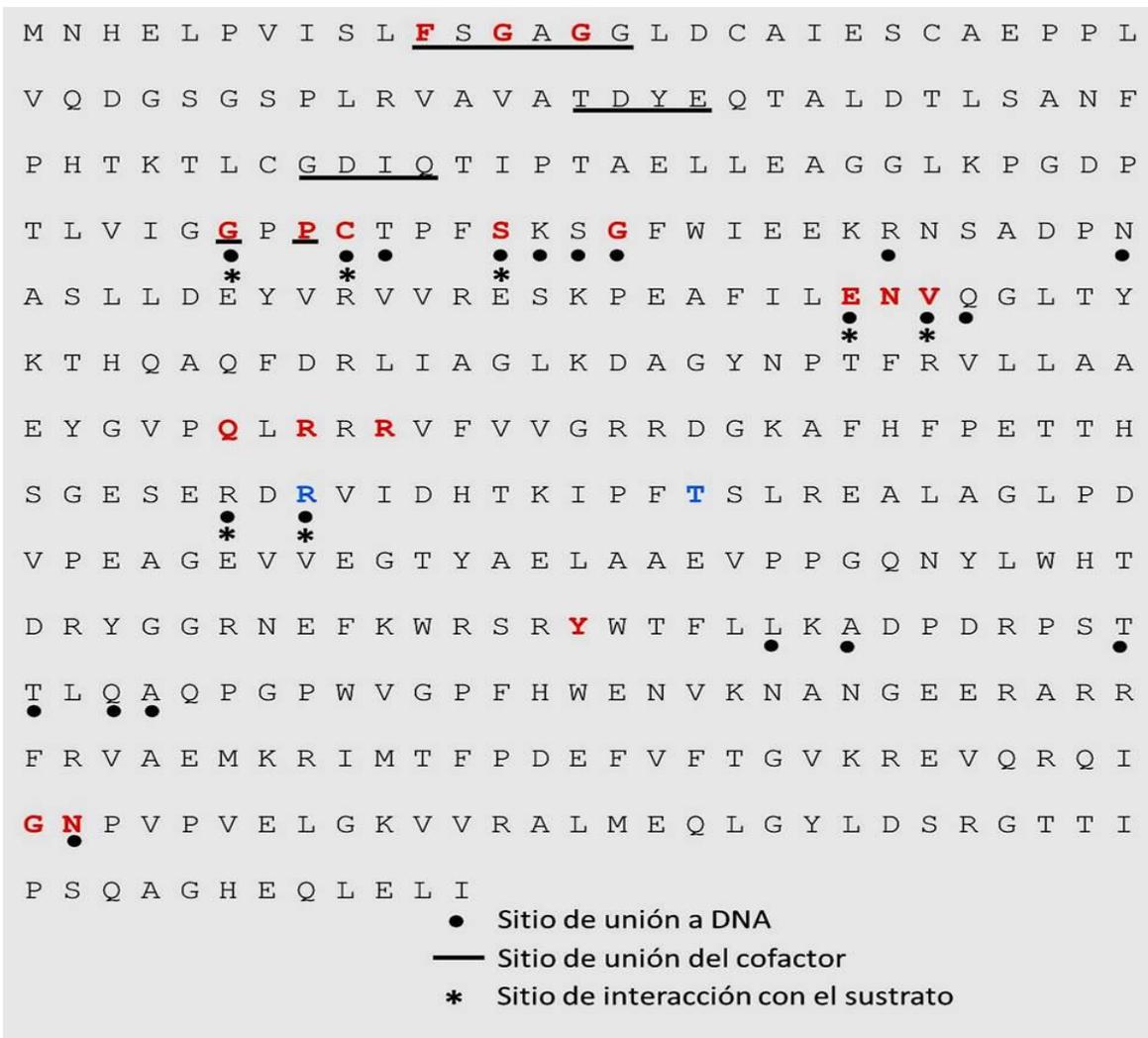


Figura 27. Secuencia de M.Sacl. Secuencia de aminoácidos de la metilasa M.Sacl, en la que se marcan ciertas características. En rojo se encuentran señalados los motivos conservados, en azul otro motivo conservado relacionado con el reconocimiento de la secuencia de DNA a modificar. ● Debajo de los residuos de aminoácidos característicos que conforman el sitio de unión a DNA. Subrayados los residuos de aminoácidos característicos del sitio de unión del cofactor. *Residuos de aminoácidos que conforman el sitio de interacción con el sustrato.

| M. SacI | | |
|---|---|-----|
| Dcm | | |
| M.SacI | 7 VISLF SGAGGLDCAI ESCAE PPLVQDGS GS PLRVAVATDYEQTALDTLSA | 56 |
| Dominio DCM | 1 VIDLFAGIGGLSLGFE---E-----AG--FEIVFANEIDPPAVATYKA | 38 |
| M.SacI | 57 NFPHTKTLCGDIQTI PTAELLEAGGLKPGDPTLVI GGPCTPFPSKSGFWI | 106 |
| Dominio DCM | 39 NFPHGDIILGDI----KEL-DGEALRKSDVDVLI GGPCCQDFS IAG--- | 79 |
| M.SacI | 107 EEKRN SADPNASLLDEYVRVRESKPEAFI LENVQGLTYKTHQAQFDRLI | 156 |
| Dominio DCM | 80 -KRRGYDDPRGSLFLEFIRLIEQLR PKFFVLENVKGLLSSKGQT-FDEIK | 127 |
| M.SacI | 157 AGLKDAGYNPTFRVLLAAEYGVLPQLRRRVFVVG-RRDGKAFHFPETTHSG | 205 |
| Dominio DCM | 128 KELEE LYGVEFNFILNAADYGV PQSRERVF IVGFRDNIDLD-PNVLPL | 176 |
| M.SacI | 206 ESERDRVIDHTKIPFTSLREALAGLPDVPEAGEVVEG--TYAELAAEVPP | 253 |
| Dominio DCM | 177 PLGR-----K---KTLKEALKNN-DLPETDELYLSRDLRNHEAKSLPK | 215 |
| M.SacI | 254 GQNYLWHTDRYGRNEFKWRSRYWT FLLKADPDRPSTILQAQPGFWGPF | 303 |
| Dominio DCM | 216 NKGERLPSLRWGEALTLRRYKGGKSYIRLHPDKPAPTVRG--G--G-- | 258 |
| M.SacI | 304 HWENVKNANGEERARRFRVAEMKRIMTFPDEFVFTGVKREVQRQIGNFVP | 353 |
| Dominio DCM | 259 ---NERFIHPLED-RELTVREARLQGFDDFVFPGSKTDQYRQIGNSVF | 304 |
| M.SacI | 354 VELGKVVVRAIMEQL | 368 |
| Dominio DCM | 305 PLLAEATAKAILKKL | 319 |
| Identidad: 120/365 (32.9%) Similitud: 189/365 (51.8%) Vacios: 49/365 (13.4%) | | |

Figura 28. Análisis de la secuencia de M.SacI. Se observa el alineamiento de la secuencia de la metilasa M.SacI con la secuencia del dominio conservado DCM. La línea (|) indica a los residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias; los dos puntos (:) designan residuos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares; el punto (.) indica aminoácidos distintos y el guión (-) indica los vacíos.

Dependiendo de la base que será metilada, pirimidina o purina, se pueden distinguir tres tipos de metiltransferasas (Lauster, *et al*, 1989), M.SacI pertenece a las metilasas que modifican citosinas en la posición C-5. Una amplia porción de las secuencias de las DNA (citosina-C5)-metiltransferasas del tipo II presentan bloques de aminoácidos altamente conservados (Trautner, *et al*, 1996). Hay usualmente diez motivos conservados en las (citosina-C5)-metiltransferasas (Lauster, *et al*, 1989; Posfai, *et al*, 1989). Está reportado que la comparación de la secuencia de la metilasa M.SacI con otras metilasas conocidas indica que ésta contiene los diez motivos conservados característicos de las (citosina-C5)-

metiltransferasas (Xu, *et al*, 1998). Cinco de estos diez motivos se encuentran extremadamente bien conservados y son los señalados en rojo en la Figura 27, cada uno de ellos contiene al menos tres posiciones invariables, estos son: (1) F-G-G, (2) G-PC-S-G, (3) ENV, (4) Q-R-R y (5) Y-GN, el guión representa un espacio de longitud fija (Pósfai, *et al*, 1989). Curiosamente, la secuencia de M.Sacl presenta un espacio notablemente mayor en el motivo Y-GN entre la tirosina (Y) y la glicina (G).

En todas las C5-metilasas que reconocen sitios que contienen 5'-GC-3' como parte de la secuencia de reconocimiento, hay un residuo de R conservado dentro de la región variable del dominio de reconocimiento del sitio blanco (TRD por sus siglas en inglés), que reconoce de la G 5' a la citosina modificada (Xu, *et al*, 1998). Esta R y la T (marcadas en azul en la figura 27) son los residuos conservados que forman parte del dominio de reconocimiento del sitio blanco de M.Sacl.

También se observa en la figura 28 que mediante el BLAST realizado, en la secuencia de M.Sacl se reconoce altamente al dominio característico de las DNA-(citosina-C5)-metiltransferasas, ya que se pueden observar varios aminoácidos compartidos al realizar el alineamiento de la secuencia de la metilasa y la secuencia consenso de este dominio.

M. Sall

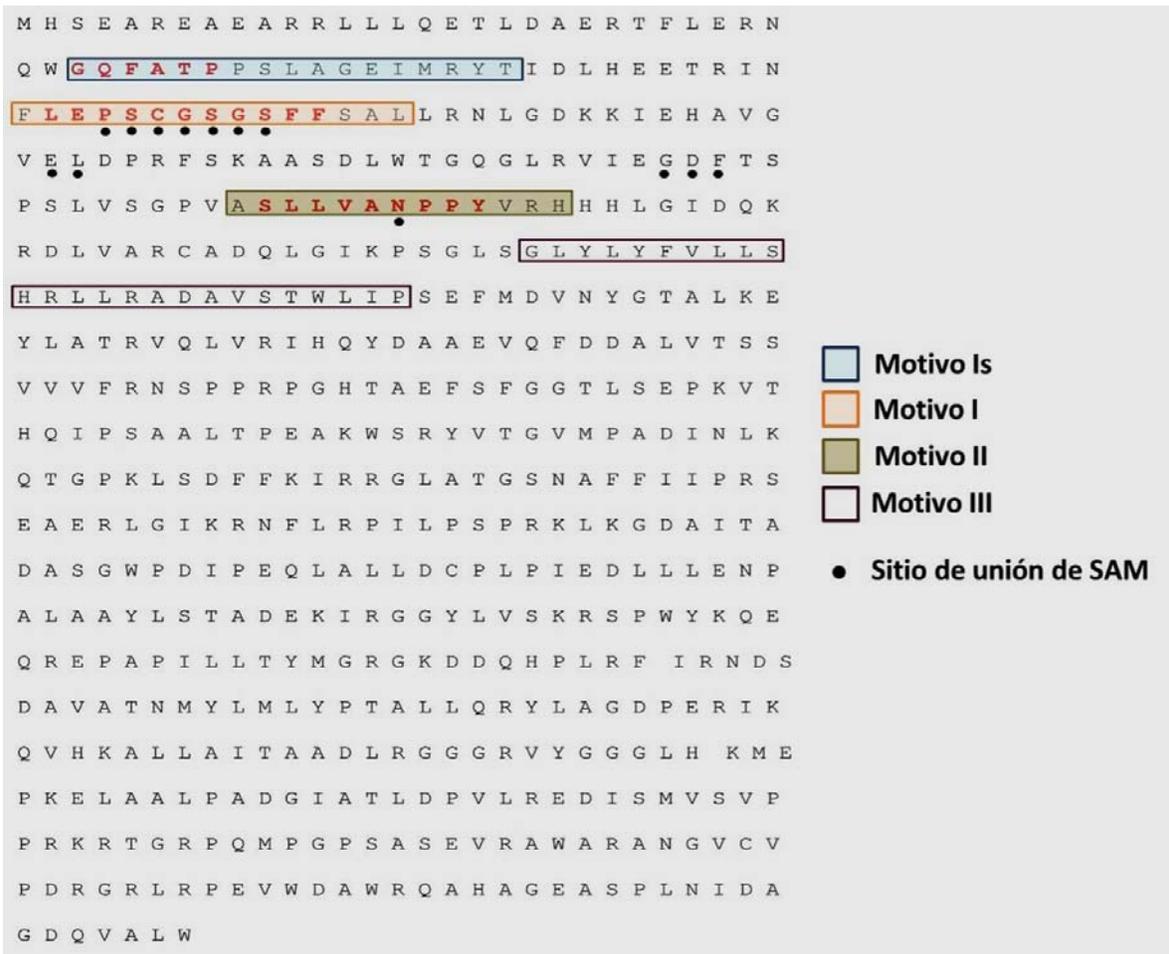


Figura 29. Secuencia de M.Sall. A. Secuencia de aminoácidos de la metilasa M.Sall, en la que se marcan ciertas características, en rojo se encuentran señalados motivos conservados.
● Debajo de los residuos de aminoácidos característicos del sitio de unión de S-adenosilmetionina.

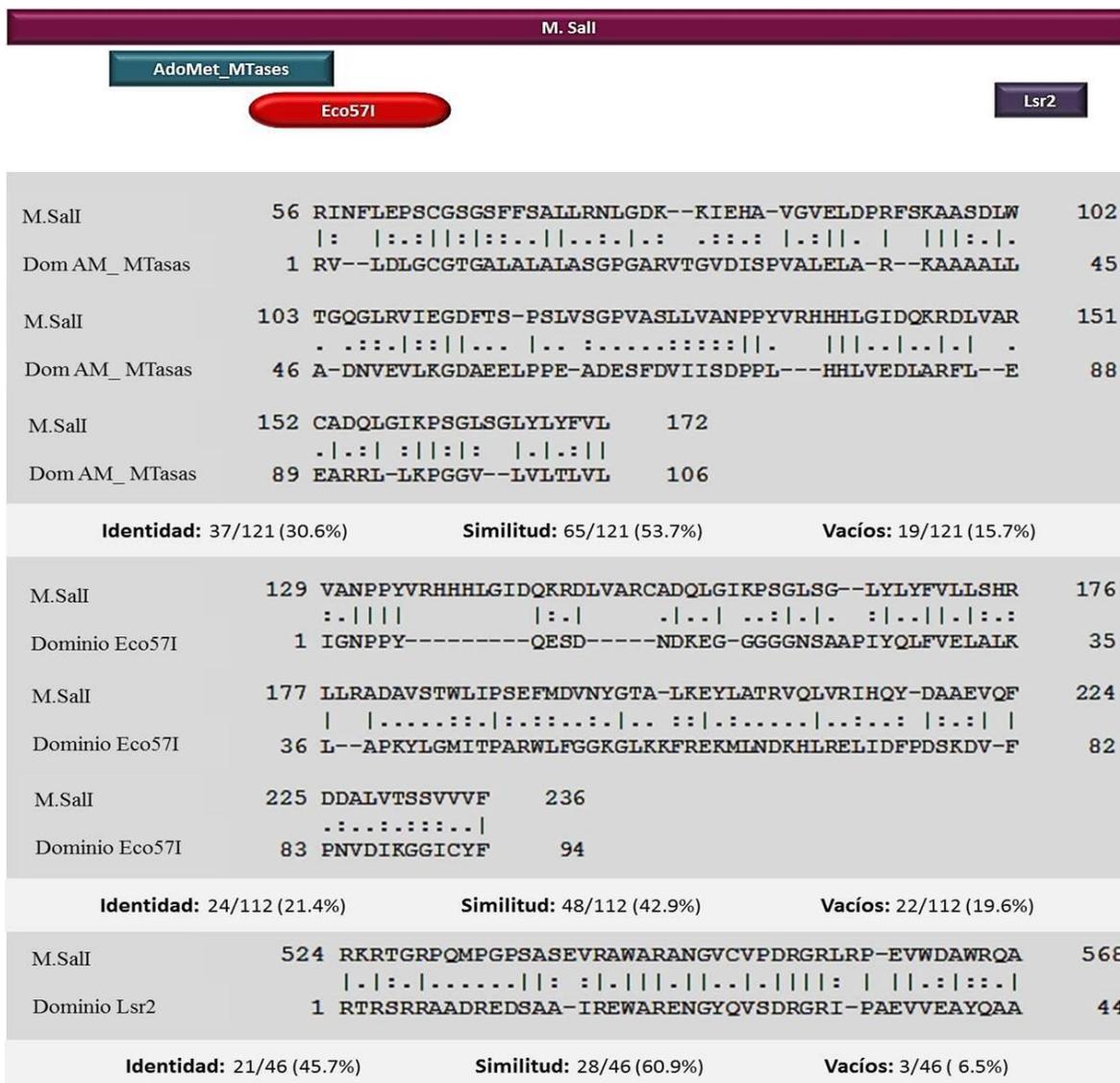


Figura 30. Análisis de la secuencia de M.Sall. Se observa el alineamiento de la secuencia de la metilasa M.Sall con las secuencias de los dominios conservados Metiltransferasa (MTasa), dominio Eco57I y dominio Lsr2. La línea (|) indica a los residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias; los dos puntos (:) designan residuos con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares; el punto (.) indica aminoácidos distintos y el guión (-) indica los vacíos.

La metilasa M.Sall reconoce la secuencia palindrómica 5'-GTCGAC-3', en la cual modifica a la adenina en la posición N6 en ambas cadenas del DNA. La mayoría

de los miembros de la familia de metiltransferasas a la que pertenece M.Sall tienen un motivo en común, -G-FFTP-, en su N-terminal (Wilson, 1992). En el caso de M.Sall, está presente el motivo GQFATP X en la zona de su N-terminal (Rodicio, *et al*, 1994) (figura 29).

M.Sall pertenece al grupo γ de las N6-adenina-metiltransferasas. Hay dos motivos que caracterizan a este grupo: -LEP-CG-G-FL-, el probable sitio de unión a SAM y, -DI-NPPY-, el probable sitio activo (Rodicio, *et al*, 1994). Tal y como se observa en la figura 29, en M.Sall estos motivos están representados por -LEPSCGSGSFF- y -SLLVANPPY- (Rodicio, *et al*, 1994).

Se ha demostrado que todas las metiltransferasas comparten dos motivos conservados, CM I (F-G-G) y CMII (PPY en las N-metiltransferasas y P/F PC en las C-metiltransferasas) (Timinskas, *et al*, 1995). Al motivo I se le asigna la función de transferir el grupo metilo mientras que el motivo II es el sitio de unión a SAM. Utilizando nuevos procedimientos se identificaron dos motivos conservados adicionales a los dos anteriores motivo Is (CM Is) y motivo III (CM III) dentro de las secuencias de aminoácidos de casi todas las N6-adenina y N4-citosina metiltransferasas (Timinskas, *et al*, 1995). Estos cuatro motivos se encuentran señalados en la secuencia de M.Sall en la figura 29, y se identificaron gracias a las bases de datos señaladas en UniProt (<http://www.uniprot.org/>) al realizar un análisis de la secuencia de M.Sall.

Por otro lado, se observan también los alineamientos de la secuencia de M.Sall y las secuencias consenso de los dominios identificados por el BLAST en el NCBI. Se identifican varios aminoácidos que componen al dominio de metiltransferasa cerca del amino terminal de M.Sall. Como se observa en la figura 30, varios de los residuos de aminoácidos compartidos entre la secuencia consenso de este dominio y la secuencia de M.Sall forman parte de los motivos conservados I y II, que son importantes para la transferencia del grupo metilo y la unión de la S-adenosilmetionina.

Se identificó además al dominio Eco57I. Eco57I es una enzima de *E. coli* la cual reconoce la secuencia asimétrica de DNA 5'-CTGAAG-3' y tiene las actividades de restricción (corta DNA a pequeña distancia del sitio de reconocimiento) y de modificación (metilación), ambas residiendo en una cadena polipeptídica sencilla (Tamulaitiene, *et al*, 2004). Eco57I pertenece a los sistemas de modificación-restricción tipo II, y se pueden encontrar homólogos de esta enzima en varias bacterias filogenéticamente diversas. Este dominio se presenta en algunas endonucleasas así como en varias enzimas de modificación (metilasas) tal como en el caso de M.Sall que se alinea con este dominio en un intervalo de poco más de 100 aminoácidos; se observa que ambos comparten algunos residuos que conforman a los motivos II y III en M.Sall. Como se mencionó anteriormente, el motivo II es el sitio de unión a SAM y en las N-metiltransferasas se caracteriza por los aminoácidos PPY (Timinskas, *et al*, 1995), los cuales se conservan en M.Sall y en el dominio Eco57I; esta enzima al igual que M.Sall modifica las adeninas pero en una sola cadena de DNA. La presencia de este dominio en la secuencia de M.Sall puede atribuirse a las características que comparte con la enzima Eco57I ya que ambas modifican adeninas y pertenecen a los sistemas de modificación-restricción tipo II.

Finalmente se observa el dominio Lsr2 en una pequeña región (poco más de 40 aminoácidos) en la zona C-terminal de M.Sall. Como se observa en la figura 30, comparten varios residuos de aminoácidos. Lsr2 es una pequeña proteína básica (~12 kDa) encontrada en todos los genomas de micobacterias secuenciadas hasta ahora. Homólogos de Lsr2 están presentes también en otros actinomicetos tales como *Streptomyces* (Gordon, *et al*, 2008). Lsr2 es una proteína involucrada en varios procesos como la síntesis de la pared celular y resistencia a antibióticos. Hay evidencia de que Lsr2 tiene la capacidad de hacer puentes entre segmentos distantes de DNA, lo cual sugiere que tiene un papel en la organización global y compactación del nucleoide (Chen, *et al*, 2008). Lo anterior sugiere que Lsr2 es un análogo funcional de las proteínas H-NS (histone-like proteins) las cuales tienen un papel en la organización del cromosoma bacteriano así como en la replicación, recombinación y regulación génica (Gordon, *et al*, 2008). Evidencia directa a

través de experimentos de complementación *in vivo* sugiere que en efecto Lsr2 es un homólogo funcional de las proteínas H-NS, lo que la identificaría como la primera proteína parecida a las proteínas H-NS, en bacterias gram positivas (Gordon, *et al*, 2008). Con base en lo anterior, el hecho de que M.Sall tenga este dominio en su secuencia puede ser por razones de transferencia horizontal y que la presencia de este dominio esté relacionada con algunas funciones fisiológicas que la metilasa M.Sall lleve a cabo en *Streptomyces*, o bien le brinde alguna característica especial a la metilasa, ya que Lsr2 es capaz de unir segmentos distantes de DNA; bien podría ser el dominio de unión a DNA que presenta M. Sall. Sin embargo, se necesita más evidencia para especificar la función de este dominio en la metilasa.

M. SphI

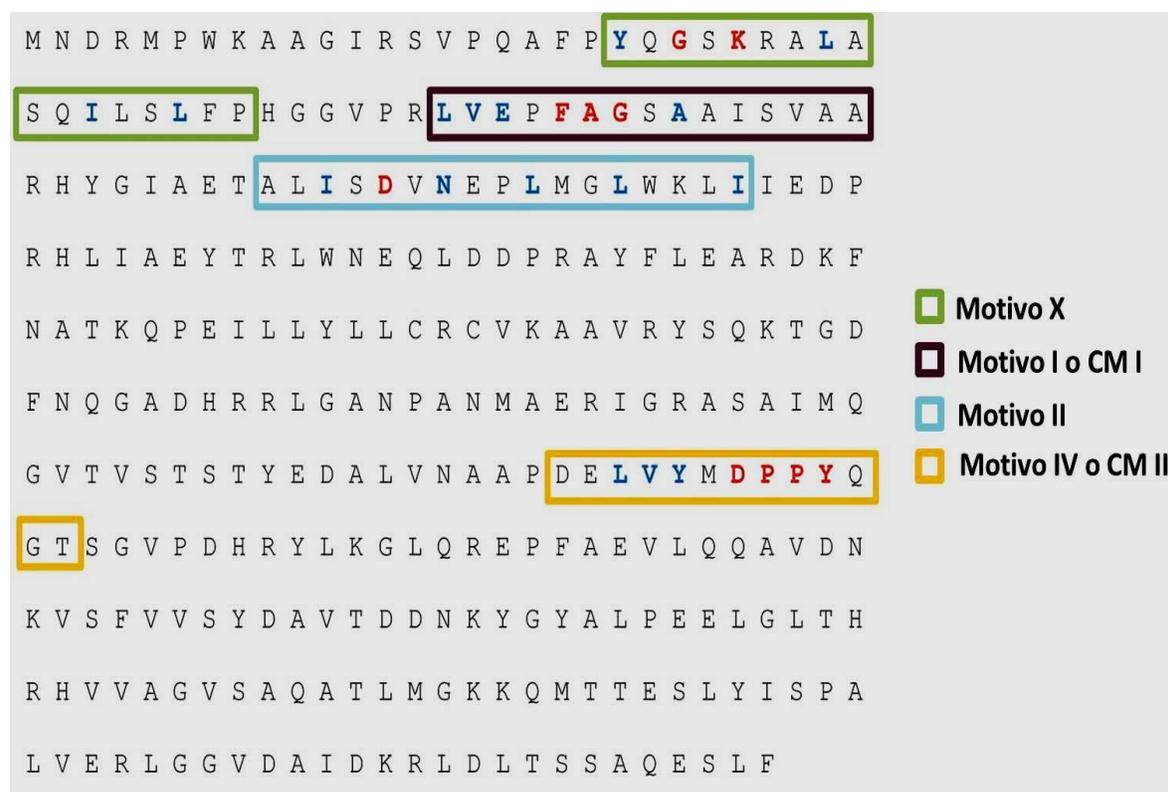


Figura 31. Secuencia de M.SphI. Secuencia de aminoácidos de la metilasa M.SphI, en la que se marcan ciertas características, en rojo se encuentran señalados los residuos de aminoácidos más conservados y en azul residuos de aminoácidos que varían un poco.

clasificación de Malone (1995) el motivo CMI corresponde al motivo I y el motivo CMII corresponde al motivo IV. En la figura 31 se señalan cuatro motivos que son los más conservados, mientras que el resto tienden a variar más entre las diferentes amino-metiltransferasas.

Finalmente, se identificó en la secuencia de M.SphI al dominio N6-adenina-DNA metiltransferasa clase D12, grupo al que pertenece M.SphI. En la figura 32 se puede apreciar que el dominio alinea con la mayor parte de la secuencia, compartiendo un alto número de residuos de aminoácidos, entre ellos varios de los que conforman los motivos conservados en M.SphI y otras metiltransferasas y que se relacionan con su sitio activo, así como el sitio de unión al cofactor SAM.

7. CONCLUSIONES

- El cloruro de potasio a una concentración de 20 mM, el pH 8 y la S-adenosilmetionina a una concentración de 1mM, favorecen la actividad *in vitro* de la metilasa M.Sall probada en los plásmidos pSET152, pJV1 y pIJ486.
- A pesar de haber obtenido purificadas las metilasas M.SphI y M.SacI, no se consiguió actividad *in vitro* de las mismas, probablemente por falta de condiciones óptimas para su actividad, o, en el caso de M.SacI, que ésta no se haya plegado correctamente durante su renaturalización.
- El análisis de las secuencias de las metilasas resaltó importantes características de éstas así como los motivos altamente conservados. Lo anterior, las relaciona evolutivamente no sólo entre ellas sino también con otras metilasas presentes en diferentes organismos.

8. PERSPECTIVAS

- Ya que fue posible obtener a la metilasa M.SphI mediante la purificación en condiciones nativas, sería interesante implementar la expresión para obtener una mayor concentración de proteína, es decir, realizar el procedimiento en un volumen mayor para obtener M.SphI altamente concentrada y así poder realizar los ensayos de actividad con diversas condiciones para determinar cuáles son las óptimas y necesarias para que M.SphI sea activa *in vitro*.
- Solubilizar los cuerpos de inclusión de M.SacI con otros agentes, como el cloruro de guanidina. Así como implementar otra estrategia de renaturalización, podría espaciarse el tiempo entre cada buffer al dializar o ir reduciendo en menor grado la concentración del agente desnaturante (urea o cloruro de guanidina).

Otra opción para purificar M.SacI y así evaluar su actividad *in vitro* podría ser el cambiar de modelo de expresión. Incluso utilizar el organismo del que proviene la metilasa *Streptomyces achromogenes*, o alguna otra especie de *Streptomyces* que esté relacionada para que así no haya problemas en el momento de la expresión y la metilasa no se vaya a cuerpos de inclusión.

- Desarrollar un trabajo de bioinformática más profundo para identificar todos los motivos que se encuentran presentes en las secuencias de las metilasas, en especial aquellos en los que los residuos de aminoácidos varían en alto grado, lo cual podría ayudar a determinar si presentan algún papel en la función de las metilasas e incluso con un mayor análisis determinar parte de la estructura de estas metilasas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez M. A., Gómez A., Gómez P., Rodicio M. R. 1995. **Expression of the *SalI* restriction-modification system of *Streptomyces albus* G in *Escherichia coli*.** Gene 157: 231-232.

Bentley S.D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A.-M., Challis G.L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J. & Hopwood D. A. 2002. **Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Nature 417: 141-147.

Bertani G., Weigle J.J., 1953. **Host controlled variation in bacterial viruses.** J. Bacteriol 65(2): 113-121.

Buryanov Y., Shevchuk T. 2005. **The use of prokaryotic DNA methyltransferases as experimental and analytical tools in modern biology.** Analytical Biochemistry 338: 1-11.

Cadena-Sandoval M. 2014. La expresión de la metiltransferasa Dam de *Escherichia coli* es letal en *Streptomyces coelicolor* y se debe a la presencia de una nucleasa adquirida por transferencia horizontal. Tesis UNAM.

Cheng J, Ren H, Shaw J, Wang Y, Li M, Leung A, Tran V, Berbenetz N, Kocíncová D, Yip C, Reyrat J, Liu J. 2008. **Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein.** Nucleic Acids Research. 36 (7): 2123-2135.

Cheng X, Blumenthal RM (Eds). 1999. **S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions.** Singapore: World Scientific Publishing.

Flärdh K., Buttner MJ. 2009. ***Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.** Nature Reviews Microbiology 7(1): 36-49.

Flett F., Mersinias V., Smith C. P. 1997. **High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes.** FEMS Microbiology Letters 155: 223-229.

González-Cerón G., Miranda-Olivares O. J., Servín-González L. 2009. **Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces***

***coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases.** FEMS Microbiology Letters 301: 35-43.

Gordon B, Imperial R, Wang L, Navarre W, Liu J. 2008. **Lsr2 of *Mycobacterium* Represents a Novel Class of H-NS-Like Proteins.** Journal of Bacteriology. 190 (21): 7052-7059.

Guthrie E.P., Quinton-Jager T., Moran L.S., Slatko B. E., Kucera R. B., Benner J. S., Wilson G. G., Brooks J. E. 1996. **Cloning, expression and sequence analysis of the *SphI* restriction-modification system.** GENE 180: 107-112.

Ishikawa K., Fukuda E., Kobayashi I. 2010. **Conflicts0 Targeting Epigenetic Systems and Their Resolution by Cell Death: Novel Concepts for Methyl-Specific and Other Restriction Systems.** DNA Research 17(6): 325-342.

Janulaitis A, Povilionis P, Sasnauskas K, 1982. **Cloning of the modification methylase gene of *Bacillus centrosporus* in *Escherichia coli*.** Gene. 20: 197-204.

Janulaitis A, Vaisvila R, Timinskas A, Klimasauskas S, Butkus V. 1992. **Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification enzymes.** Nucleic Acids Research. 20 (22): 6051-6056.

Jeltsch A., Jurkowska R. Z., Jurkowski T. P., Liebert K., Rathert P., Schlickerrieder M. 2007. **Application of DNA methyltransferases in targeted DNA methylation.** Appl Microbiol Biotechnol 75: 1233-1240.

Kiss A, Baldauf F, 1983. **Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of two modification methylase genes of *Bacillus subtilis*.** Gene. 21: 111-119.

Lauster R, Trautner TA, Noyer-Weidner M. 1989. **Cytosine-specific Type II DNA Methyltransferases: A conserved Enzyme Core with Variable Target-recognizing Domains.** J. Mol. Biol. 206: 305-312.

MacNeil D. 1988. **Characterization of a Unique Methyl-Specific Restriction System in *Streptomyces avermitilis*.** Journal of Bacteriology 170 (12): 5607-5612.

Maeda Y, Koga H, Yamada H, Ueda T, Imoto T. 1995. **Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea.** Protein Engineering. 8 (2): 201-205.

Malone T, Blumenthal R, Cheng X. 1995. **Structure-guided Analysis Reveals Nine Sequence Motifs Conserved among DNA Amino-methyl-transferases,**

and Suggests a Catalytic Mechanism for these Enzymes. J. Mol. Biol. 253: 618-632.

Matsuo K, Silke J, Gramatikoff K, Schaffner W.1994. **The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in the presence of Mg²⁺.** Nucleic Acids Research 22 (24): 5354-5359.

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

Oliveira P. H., Touchon M., Rocha E. P. C. 2014. **The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts.** Nucleic Acids Research 42(16): 10618-10631.

Pósfai J, Bhagwat A, Pósfai G, Roberts R. 1989. **Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases.** Nucleic Acids Research 17 (7): 2421-2435.

Rao D. N., Dryden D. T. F., Bheemanaik S. 2013. **Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective.** Nucleic Acids Research, 1-11.

Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A. S., Bickle T. A., Bitinaite J., Blumenthal R. M., Degtyarev S. Kh., Dryden D. T. F., Dybvig K., Firman K., Gromova E. S., Gumpert R. I., Halford S. E., Hattman S., Heitman J., Homby D. P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T. R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D. H., Lacks S., Marinus M. G., Miyahara M., Morgan R. D., Murray N. E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D. N., Reich N., Repin V. E., Selker E. U., Shaw P., Stein D. C., Stoddard B. L., Szybalski W., Trautner T. A., Etten J. L. V., Vitor J. M. B., Wilson G. G., Xu S. 2003. **A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes.** Nucleic Acids Research 31(7): 1805-1812.

Rodicio M.R., Chater K.F. 1988.**The Sall (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G.** Gene 74: 39-42.

Rodicio M, Quinton-Jager T, Moran L, Slatko B, Wilson G. 1994. **Organization and sequence of the Sall restriction-modification system.** Gene 151: 167-172.

Srikhanta Y. N., Fox K. L, Jennings M. P. 2010. **The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes.** Nature Reviews Microbiology 8:196-206.

Tamulaitiene G, Grazulis S, Janulaitis A, Janowski R, Bujacz G, Jaskolski M. 2004. **Crystallization and preliminary crystallographic studies of a bifunctional restriction endonuclease Eco57I.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics. 6 (2): 251-254.

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

Timinskas A, Butkus V, Janulaitis A. 1995. **Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6] methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases.** Gene. 157: 3-11.

Tock M, Dryden D. 2005. **The biology of restriction and anti-restriction.** Current Opinion in Microbiology 8: 466-472.

Trautner T, Pawlek B, Behrens B, Willert J. 1996. **Exact size and organization of DNA target-recognizing domains of multispecific DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases.** The EMBO Journal 15 (6): 1434-1442.

Vasu K, Nagaraja V. 2013. **Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense.** Microbiol Mol Biol Rev 77(1): 53-72.

Waksman SA., Henrici AT. 1943. **The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes.** J. Bacteriology 46(4): 337-341.

Wilson G. 1992. **Amino acid sequence arrangements of DNA methyltransferases.** Methods Enzymol. 216: 259-279.

Xu S, Xiao J, Ettwiller L, Holden M, Aliotta J, Poh C, Dalton M, Robinson D, Petronzio T, Moran L, Ganatra M, Ware J, Slatko B, Benner J. 1998. **Cloning and expression of the *Apa* I, *Nsp*I, *Nsp*HI, *Sac*I, *Scal*, and *Sap*I restriction-modification systems in *Escherichia coli*.** Mol Gen Genet. 260: 226-231.

Zotchev S. B., Schrempf H., Hutchinson R. 1995. **Identification of a Methyl-Specific Restriction System Mediated by a Conjugative Element from *Streptomyces bambergiensis*.** Journal of Bacteriology 177(16): 4809-4812.

ANEXO 1. PROTOCOLOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

1. Inocular células en 3 mL de medio YT2X con el antibiótico correspondiente e incubar con agitación toda la noche.
2. Obtener las células por centrifugación en microtubos de polipropileno.
3. Resuspender el paquete de células en 200 μ L de Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH=8, e incubar 5 minutos en hielo.
4. Añadir 400 μ L de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS al 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso, e incubar 10 minutos en hielo.
5. Añadir 300 μ L de acetato de potasio 3M pH 4.8, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
6. Añadir al tubo 400 μ L de fenol/cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos en la microcentrífuga.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga. Retirar todo el sobrenadante con una pipeta. Es necesario dar un segundo pulso en la microcentrífuga para eliminar todo el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en 50 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Añadir 150 μ L de acetato de sodio 4M pH 6. Mezclar bien e incubar una hora a -20° C.
10. Centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ L de isopropanol. Precipitar 10 minutos en hielo.
11. Centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga. Eliminar todo el sobrenadante. Resuspender en 45 μ L de TE, añadir 5 μ L de acetato de sodio 3M pH 6 y 125 μ L de etanol frío. Precipitar 10 minutos en hielo.
12. Centrifugar 10 minutos en la microcentrífuga. Eliminar todo el sobrenadante. Secar la pastilla y resuspenderla en 25 μ L de TE.

MIDIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO

1. Inocular un matraz con 100 mL de medio YT2X con los antibióticos correspondientes e incubarlo con agitación toda la noche. En el caso de *Streptomyces* el medio que se utiliza es LB + azúcar al 25% y se incuba durante tres días.
2. Obtener las células por centrifugación a 7,500 rpm durante 10 minutos.

3. Resuspender el botón de células en 10 mL de Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH 8 e incubar 10 minutos hasta verlo translúcido y viscoso. Para *Streptomyces* el TE 25 mM contiene lisozima (2mg/mL) y se incuba a 37°C aproximadamente 30 minutos a una hora o hasta verse translúcido y viscoso.
4. Añadir 20 mL de solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión. Incubar 10 minutos en hielo. En *Streptomyces* a veces es necesario homogenizar bien con ayuda de una jeringa.
5. Añadir 15 mL de acetato de potasio 3M pH 4.8, mezclar por inversión hasta que se observe un precipitado blanco e incubar 15 minutos (**NOTA:** Para *Streptomyces* se centrifuga a 7,500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se pasa a otro tubo y se continúa con el siguiente paso).
6. Agregar 40 mL de fenol/cloroformo, agitar en vórtex y centrifugar 10 minutos a 7,500 rpm.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 100 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 10 minutos.
8. Centrifugar 10 minutos a 7,500 rpm, retirar sobrenadante con pipeta. Es necesario dar un segundo pulso en la centrifuga para eliminar todo el sobrenadante.
9. La pastilla se resuspende en 2 mL de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Añadir tres volúmenes de acetato de sodio 4M e incubar una hora a -20°C.
10. Centrifugar 10 minutos a 7,500 rpm. Tomar sobrenadante y añadir un volumen de isopropanol. Precipitar 10 minutos en hielo.
11. Se centrifuga 10 minutos a 7,500 rpm y se elimina el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 500 µL de TE y pasar el contenido a un microtubo de polipropileno.
12. Agregar 4 µL de RNAsa y dejar a 37°C toda la noche.
13. Añadir 600 µL de fenol/ cloroformo. Agitar en vórtex y centrifugar 10 minutos a 13,200 rpm.
14. Pasar la fase acuosa a otro tubo y agregar 500 µL de cloroformo. Agitar en vórtex y centrifugar a 13,200 rpm.
15. Pasar fase acuosa a otro tubo. Añadir 50 µL de acetato de sodio 3M, mezclar por inversión y dar un pulso en la microcentrifuga. Agregar un volumen de isopropanol y precipitar 10 minutos.
16. Centrifugar 10 minutos a 13,200 rpm y eliminar sobrenadante.
17. Resuspender la pastilla en TE 10 mM.

(Limpieza del plásmido “Spooling”)

18. Añadir un décimo de volumen de acetato de sodio 3M. Mezclar con vórtex y dar un pulso en la microcentrifuga.
19. Agregar un volumen de isopropanol y mezclar con cuidado para formar una malla blanca.
20. Quitar sobrenadante con cuidado y dar un pulso en la microcentrifuga para eliminarlo por completo.
21. Resuspender en TE 10 mM.
22. Repetir los pasos 18, 19, 20, y 21 hasta que el sobrenadante se vea translúcido.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli*.

1. Inocular un precultivo de 3 mL de medio SOB con los antibióticos correspondientes con 5 µL de células de *E. coli*. Incubar con agitación toda la noche a 37°C.
2. Preparar un matraz de 250 mL con 20 mL de medio SOB (y antibióticos correspondientes) e inocular con 0.2 mL del precultivo. Incubar con agitación hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de 0.6.
3. Pasar el contenido a un tubo de centrifuga estéril y obtener el botón de células mediante centrifugación por 10 minutos a 6,000 rpm.
4. Eliminar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 10 mL de glicerol al 10% y centrifugar 10 minutos a 6,000 rpm. Repetir el lavado dos veces más.
5. Resuspender el pellet en 200 µL de glicerol 10% y pasar a microtubos de polipropileno en alícuotas de 60 µL.
6. Almacenar a -70°C.

TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

1. Agregar 2 - 5 µL del plásmido o de la ligación deseada (dependiendo de su concentración) a un stock de 50 µL de células competentes de la cepa requerida.
2. Mezclar muy bien y pasar el contenido a una celda para electroporar previamente enfriada en hielo.
3. Colocar la celda en electroporador y dar un pulso a 1600 Volts. Se retira la celda y se coloca de nuevo en hielo.
4. Añadir 1 mL de medio YT2X a la celda. Resuspender las células y pasar a un tubo de vidrio estéril. Dar una hora de recuperación incubando a 37°C con agitación.

- Posteriormente pasar las células a un tubo Eppendorf estéril y centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 0.3 mL de medio YT2X.
- Preparar cajas Petri con medio LB con los antibióticos correspondientes.
- Hacer diluciones (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) e inocular 100 μ L de éstas en las cajas de LB con el antibiótico correspondiente. Plaquear e incubar una noche a 37°C.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y GEL PARA ANÁLISIS SDS-PAGE

Muestras

- Cuantificar la cantidad de proteína en las muestras mediante el método de Bradford.
- Preparar las muestras con buffer de tratamiento 2X (Tris-HCl (pH 6.8) 125 mM, SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10%). $\frac{3}{4}$ del volumen final de muestra y $\frac{1}{4}$ de volumen final del buffer de tratamiento 2X.
- Hervir durante 5 minutos las muestras ya con el buffer de tratamiento 2X, cargar en el gel, o en caso de querer usarlas posteriormente congelarlas a -20°C.

Gel

- Limpiar los vidrios con etanol, usar guantes para no ensuciarlos. Montar el vidrio en la base.
- Primero se agrega la mezcla de acrilamida para el gel separador; el porcentaje de ésta depende de la masa molecular de la proteína que se quiera observar (los geles utilizados en este trabajo fueron al 8% y al 10%):

| | 8% | 10% |
|---|------------|------------|
| Acrilamida:bis-acrilamida (29:1) | 2.6 mL | 3.3 mL |
| Buffer 1.5 M Tris-HCl pH=8.8 | 2.5 mL | 2.5 mL |
| SDS 10% | 0.1 mL | 0.1 mL |
| Agua bidestilada | 4.6 mL | 4 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 50 μ L | 50 μ L |
| TEMED | 5 μ L | 5 μ L |
| Volumen final | 10 mL | 10 mL |

- Verter la solución entre los dos vidrios, evitando que se formen burbujas. Agregar etanol al 70% para eliminar el menisco de la solución de manera que el gel polimerice con una superficie plana.
- Una vez polimerizado el gel, retirar el etanol y enjuagar con agua destilada.
- Preparar la mezcla de acrilamida para el gel concentrador:

| | |
|---|--------|
| Acrilamida:bis-acrilamida (29:1) | 1.3 mL |
| Buffer 0.5 M Tris-HCl pH=6.8 | 5 mL |
| SDS 10% | 0.1 mL |
| Agua bidestilada | 3.4 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 50 µL |
| TEMED | 10 µL |
| Volumen final | 10 mL |

6. Agregar el gel concentrador y evitar la formación de burbujas al colocar el peine. Dejar polimerizar.
7. Retirar el peine y limpiar los pozos con agua destilada. Montar en la cámara de electroforesis y cargar las muestras.
8. Correr la electroforesis a 80 – 100 Volts.

Tinción con azul de Coomassie

1. Teñir 30 minutos con solución de azul brillante de Coomassie R-250.
2. Desteñir durante 40 minutos con solución de desteñir 1.
3. Desteñir toda la noche con solución de desteñir 2.
4. Cambiar el gel a agua bidestilada.

ANEXO 2. MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

MEDIO LB

Triptona 1%

Extracto de Levadura 0.5%

NaCl 1%

Ajustar pH 7.0

*Para LB sólido se agrega 1.5% de Select Agar, Gibco BRL.

Esterilizar 15 minutos en autoclave a 121°C.

MEDIO SOB

Triptona 2%

Extracto de Levadura 0.5%

NaCl 0.05%

KCl 2.5 mM

Ajustar pH 7.2

Esterilizar 15 minutos en autoclave a 121°C.

MEDIO YT2X

Triptona 1.6%

Extracto de Levadura 1%

NaCl 0.5%

Ajustar pH 7.2

Esterilizar 15 minutos en autoclave a 121°C.

SOLUCIÓN DE AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE R-[250]

Stock azul brillante de Coomassie R-[250] 12.5 mL

Ácido acético 50 mL

Agua desionizada 27.5 mL

SOLUCIÓN DE DESTENIR 1

Metanol 50 mL

Ácido acético 10 mL

Agua desionizada 40 mL

SOLUCIÓN DE DESTENIR 2

Metanol 5 mL

Ácido acético 7 mL

Agua desionizada 88 mL

BÚFFER DE FOSFATOS (DE LISIS Y CARGA) 1X

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM
Ajustar pH 8.0

BÚFFER DE UREA

NaH₂PO₄ 100 mM
Urea 8 M
Ajustar pH 6.3

Buffers empleados en la purificación de proteínas en fracción insoluble.

BUFFER DE LAVADO

NaH₂PO₄ 100 Mm
Tris-HCl 10 mM
Urea 8 M
Ajustar pH 6.3

BUFFER DE ELUCIÓN 1

NaH₂PO₄ 100 Mm
Tris-HCl 10 mM
Urea 8 M
Ajustar pH 5.9

BUFFER DE ELUCIÓN 2

NaH₂PO₄ 100 Mm
Tris-HCl 10 mM
Urea 8 M
Ajustar pH 4.5

Buffers empleados en la purificación de proteínas en fracción soluble.

BUFFER DE LAVADO 1

NaH₂PO₄ 50 Mm
NaCl 300 mM
Imidazol 10 mM
Ajustar pH 8.0

BUFFER DE LAVADO 2

NaH₂PO₄ 50 Mm
NaCl 300 mM
Imidazol 20 mM
Ajustar pH 8.0

BUFFER DE LAVADO 3

NaH₂PO₄ 50 Mm

NaCl 300 mM
Imidazol 50 mM
Ajustar pH 8.0

BUFFER DE ELUCIÓN

NaH₂PO₄ 50 Mm
NaCl 300 mM
Imidazol 250 mM
Ajustar pH 8.0