



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Funcionalidad del elemento integrativo-conjugativo
AICE5349 de *Streptomyces coelicolor***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Angélica Palacios Adalid



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Servín González
2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Palacios

Adalid

Angélica

57 67 74 63

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309127895

2. Datos del tutor

Dr.

Luis

Servín

González

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

M. en C.

Gabriela

González

Cerón

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Alfonso

José

Vilchis

Peluyera

7. Datos del trabajo escrito.

Funcionalidad del elemento integrativo-conjugativo AICE5349 de *Streptomyces coelicolor*

62 p.

2016

DEDICATORIA

A mis padres, que siempre han sido un ejemplo de esfuerzo, por su comprensión y apoyo incondicional en todo lo que hago, por su amor infinito.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Luis Servín González, por permitirme participar en su laboratorio, por todas sus enseñanzas, anécdotas y datos curiosos. Además, por la paciencia y asesoría en el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su apoyo técnico y enseñanzas en el laboratorio. Además, por el préstamo de cepas, plásmidos y oligonucleótidos para la realización de este trabajo y finalmente por la revisión de este trabajo y sus aportaciones al mismo.

Al Dr. Víctor Valdéz, la Dra. Laura Camarena y al M. en C. Alfonso Vilchis por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, así como por las correcciones, preguntas y comentarios que enriquecieron al mismo.

A la Dra. Gloria Soberón y a su equipo de trabajo por sus observaciones y sugerencias 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 laboratorio: Kevín, Erick, Mauricio, Blanca, Martí, Lalo, Isaí, Eli, Karen, Yersaín, Katia y Karla por su amena compañía, charlas, seminarios y apoyo en el laboratorio.

A Mad porque el destino quiso que nuestra amistad no tuviera problemas de distancia, e hizo que me acompañaras en este viaje lleno de bichos grandes y pequeños, de estrés por entregar trabajos a último momento, de heridas en el campo y de muchos momentos buenos

Finalmente y no menos importantes, a mis amigos de la facultad: José de Jesús, Paulina, Maru, Bryan, Luis y Alice por hacer de los trabajos en equipo y prácticas de campo experiencias muy enriquecedoras por sus conocimientos y alegría.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Características generales del género <i>Streptomyces</i>	3
2.2 Características particulares de <i>Streptomyces coelicolor</i>	4
2.3 Elementos integrativos conjugativos (ICEs)	5
2.3.1 Integración/escisión.....	7
2.3.2 Transferencia conjugativa	8
2.3.3 Regulación.....	9
2.4 Elementos integrativos conjugativos de actinomicetos (AICEs).	10
2.4.1 Integración/escisión.....	11
2.4.2 Replicación.....	12
2.4.3 Transferencia conjugativa	13
2.4.4 Regulación.....	15
2.4.5 Prevalencia de los AICEs	16
2.4.6 AICEs caracterizados y secuenciados más conocidos	16
3. Antecedentes	18
4. Objetivos.....	19
Generales:	19
Particulares:	19
5. Hipótesis	20
6. Materiales y métodos.....	20
6.1 Cepas	20
6.2 Oligonucleótidos utilizados	21
6.3 Plásmidos utilizados	22
6.4 Obtención de cepas	23
6.5 Ensayos de conjugación.....	24
6.6 Detección del AICE5349 integrado en el cromosoma mediante PCR	25
6.7 Ensayo de incompatibilidad entre el producto del gen SCO5330 con la actividad de la metiltransferasa M. SphI.....	27
6.8. Ensayo de formación de <i>pocks</i>	28
6.9 Construcción de un vector integrativo utilizando la integrasa (Int) del AICE5349	28
6.9.1 Aislamiento y clonación del promotor fuerte <i>ermEp</i> *	28
6.9.2 Aislamiento y clonación del gen de la integrasa del AICE5349	29

6.9.3 Obtención del plásmido pSET152 sin la integrasa ni sitio attP del fago ϕ C31.....	30
6.9.4 Clonación del fragmento ermE-5349 en el plásmido pSET Δ INT.....	32
6.9.5 Obtención del sitio de <i>attachment</i> del AICE5349.....	32
6.9.6 Clonación del <i>attB</i> del AICE5349 en el plásmido PSET Δ INT-ermE5349.....	33
6.10 Ensayos de conjugación para observar la integración de los plásmidos pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y (2) en <i>S. lividans</i>	34
7. Resultados y discusión	35
7.1 Ensayos de conjugación para cuantificar la transferencia intraespecífica e interespecífica del AICE5349	35
7.2 Detección de la forma integrada del AICE5349 por PCR.....	38
7.3 Ensayo de incompatibilidad entre el producto del gen SCO5330 con la actividad de la metiltransferasa de DNA M.SphI	41
7.4 Ensayo de formación de <i>pocks</i>	43
7.5 Ensayos de conjugación para observar la integración de los plásmidos pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y (2) en <i>S.lividans</i>	45
8. Conclusiones.....	47
9. Perspectivas.....	47
10. Bibliografía.....	48
ANEXO. Protocolos y medios de cultivo empleados en este trabajo	53

1. Resumen

Los Elementos Integrativos Conjugativos de Actinomicetos (AICEs por sus siglas en inglés) son elementos genéticos móviles autotransferibles que recuerdan a plásmidos y profagos. Éstos se transfieren por conjugación intermicelial de una cepa donadora a una cepa receptora y posterior a la transferencia se integran de forma sitio específica en el cromosoma de la cepa receptora; además, la transferencia conjugativa de estos elementos causa la inhibición temporal del crecimiento en la cepa receptora, lo cual se puede observar en medio sólido como pequeñas zonas circulares en donde la esporulación se retrasa. A tales zonas macroscópicas se les denomina “*pocks*”.

Los AICEs tienen una estructura modular altamente conservada que contiene los genes para llevar a cabo sus funciones (integración, replicación, transferencia conjugativa y regulación), sin embargo, pueden acarrear genes para otras funciones, tales como resistencia a antibióticos o metales pesados, modificación de DNA o patogenicidad. Por lo tanto los AICEs pueden mediar la transferencia horizontal de una gran diversidad de funciones.

El AICE5349 es un elemento de 21.2 kb que se caracterizó mediante un análisis bioinformático, y se localiza en el cromosoma del actinomiceto modelo *Streptomyces coelicolor*, insertado en un gen para un tRNA^{Arg}. Este AICE acarrea un gen que codifica para una nucleasa de restricción metil-específica (SCO5330), el cual es parte del complejo sistema de restricción metil-específico (MSRS por sus siglas en inglés) presente en esta cepa. Este sistema, junto a otras características, distingue a *Streptomyces coelicolor* de *Streptomyces lividans* que carece del AICE5349.

Con el propósito de determinar si el AICE5349 es un elemento funcional capaz de transferirse por conjugación, se obtuvo una cepa de *S. coelicolor* en la que se marcó genéticamente al AICE, mediante la sustitución del gen SCO5329 (que no es esencial para sus funciones) por un gen de resistencia a apramicina. Posteriormente se realizaron conjugaciones de esta cepa con la cepa TK64 de *S. lividans* que es resistente a estreptomicina. Después de la conjugación, se seleccionaron colonias de *S. lividans* resistentes a ambos antibióticos (apramicina y estreptomicina) y posteriormente se confirmó la transferencia del AICE5349 mediante

amplificación por PCR de las regiones flanqueantes del elemento, sí como de las regiones aledañas al mismo, en el cromosoma de su hospedero; además se determinó la transferencia del gen SCO5330 mediante un ensayo de incompatibilidad de la nucleasa codificada por dicho gen con la metilasa de adeninas M.SphI.

La frecuencia de transferencia interespecífica de *S. coelicolor* a *S. lividans* fue de 10^{-3} por receptor; mientras que la frecuencia intraespecífica del AICE5349 fue de entre 0.25 a 0.35 por receptor para *S. lividans* y de 0.16 a 0.25 por receptor para *S. coelicolor*. También se realizó un ensayo para observar la formación de “pocks” durante la transferencia conjugativa y se lograron observar en un tapete confluyente de *S. lividans* cuando el AICE5349 se transfirió a partir de *S. coelicolor*.

Finalmente se realizó un ensayo para probar la actividad de recombinación sitio-específica de la integrasa presente en el AICE5349 mediante expresión heteróloga en *S. lividans*.

2. Introducción

2.1 Características generales del género *Streptomyces*

Los miembros del género *Streptomyces* son bacterias Gram positivas con alto contenido de G+C en su DNA, pertenecen al orden taxonómico Actinomycetales y se caracterizan por habitar el suelo y presentar una compleja diferenciación morfológica (Kieser et al, 2000). Poseen un complejo metabolismo secundario derivado de su estilo de vida saprótrofo consecuencia del ambiente que colonizan. Por tales motivos, producen una gran variedad de compuestos biológicamente activos, tales como antibióticos para defensa contra otras bacterias (Allen, 2010) y enzimas hidrolasas que degradan carbohidratos complejos, proteínas y lípidos, entre otros nutrientes; estas características les confieren gran importancia para la industria biotecnológica, así como para su ecosistema (Hopwood, 2007).

Una de sus características más notables es que poseen un complejo programa genético de diferenciación morfológica, ya que su ciclo de vida incluye una fase multicelular (micelio) y una unicelular (espora). El ciclo de vida inicia con la espora, que al llegar a un ambiente adecuado germina dando lugar a uno o varios tubos germinales que crecen apicalmente y ramifican para constituir el micelio vegetativo; las hifas contienen varias copias del genoma en compartimentos sinciales formados por paredes celulares espaciadas; eventualmente, debido a señales ambientales, así como a escasez de nutrientes, se da la formación del micelio aéreo que coincide con la producción de metabolitos secundarios. Finalmente, las hifas aéreas septan sincrónicamente (Figura 1) para dar lugar a compartimentos unigenómicos ovoides de tamaño regular que al madurar darán lugar a esporas (Flärdh & Buttner, 2009).

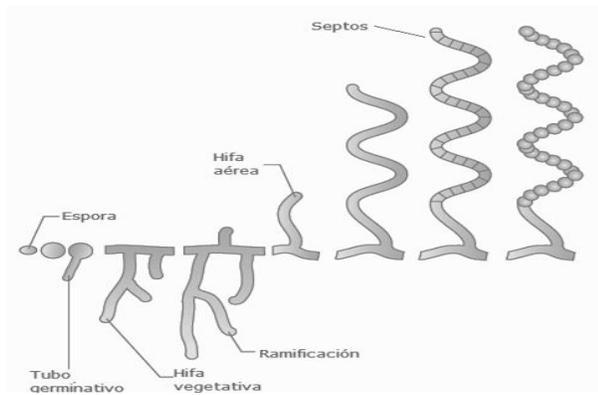


Figura 1. Etapas de diferenciación morfológica de *Streptomyces coelicolor* (Modificado de Flärdh & Buttner, 2009).

Los genomas de organismos del género *Streptomyces* son relativamente grandes comparados con los de otras bacterias, de alrededor de ~8 a 10 Mb con un alto contenido de guanina y citosina (72-74% en el DNA); en contraste con la mayoría de las bacterias que tienen cromosomas circulares, los cromosomas en *Streptomyces* se caracterizan por ser lineales con repeticiones invertidas terminales en sus telómeros, mismos que se encuentran covalentemente unidos a proteínas terminales (TPs); se ha sugerido que dichos cromosomas lineales resultaron de la integración de plásmidos lineales dentro de un cromosoma ancestral circular (Chen, 2002).

2.2 Características particulares de *Streptomyces coelicolor*

Dentro del grupo taxonómico de los estreptomicetos, *Streptomyces coelicolor* A3(2) es el miembro mejor caracterizado del género, tanto a nivel molecular como a nivel genético; éste cuenta con un genoma de 8,667,507 pares de bases, con un contenido de guanina y citosina en el DNA del 72%. Su cromosoma es lineal y contiene una región central con la mayoría de los genes esenciales para el mantenimiento del organismo o “housekeeping”, que es flanqueada por regiones menos conservadas e inestables; al hacer la comparación del genoma de *S. coelicolor* con los de otros actinomicetos tales como *Mycobacterium tuberculosis*, se observa que existe un alto grado de sintenia en la región cromosómica central, por lo que se sugiere que los brazos cromosómicos de *S. coelicolor* fueron adquiridos por transferencia horizontal, así como por

eventos de recombinación, y contienen fundamentalmente genes para la adaptación a diversas condiciones ambientales (Bentley et al, 2002).

Adicionalmente a la producción de variados metabolitos secundarios que les confiere importancia biotecnológica e industrial, las especies del género *Streptomyces* han sido empleadas para expresar proteínas heterólogas tanto de origen procarionte como eucarionte. Una particularidad es que poseen la capacidad de modificación postraducciona de proteínas por glicosilación, específicamente por *O*-manosilación (Espitia et al, 2010). Sin embargo, pese a que *S. coelicolor* es la especie mejor caracterizada, es principalmente utilizada para estudios sobre producción de antibióticos y diferenciación, mientras que *S. lividans* es el hospedero preferido para la clonación y expresión de DNA exógeno (Jayapal, 2007). La razón principal es que *Streptomyces coelicolor* posee un complejo sistema de restricción metil-específico (SRME), lo que significa que restringe la entrada de DNA exógeno que ha sido metilado por los sistemas Dam, Dcm y Hsd de *E. coli*. (González-Cerón et al, 2009). Dicho sistema es muy débil en *S. lividans* pese al enorme grado de similitud que existe entre ambas especies y al hecho de que sus secuencias de rDNA 16S son virtualmente idénticas.

Adicionalmente a presencia del sistema de restricción de DNA metilado, existen otras diferencias fenotípicas entre ambas especies, entre ellas, que *S. lividans* es incapaz de restringir DNA metilado o metilar su propio DNA, además de que presenta escasa actividad proteolítica, y no produce agarasa (Kieser et al, 2000). En 2007 Jayapal y colaboradores encontraron que tales diferencias fenotípicas, podían ser explicadas por la presencia de *islas genómicas* en *S. coelicolor* y la ausencia de las mismas en *S. lividans*. En 2008 te Poele y colaboradores categorizaron una de esas islas genómicas como un AICE, denominándolo AICE5349 por el gen de la integrasa (SCO5349) en el elemento.

2.3 Elementos integrativos conjugativos (ICEs)

La transferencia horizontal de genes juega un papel muy importante en la evolución de los procariontes, ya que facilita su adaptación a alteraciones ambientales e incluso les permite ocupar nichos completamente nuevos (Burrus, 2004). Existe gran variedad de elementos genéticos móviles que promueven tanto la transferencia horizontal de genes, como el

intercambio intercelular de los mismos. Dichos elementos se han dividido tradicionalmente en bacteriófagos, plásmidos y elementos transponibles (Toussaint & Merlin, 2002), los cuales tienen sus características inherentes, sin embargo, hay elementos *quiméricos* que comparten características de dos o más elementos tradicionales, un ejemplo de éstos son los elementos integrativos conjugativos (ICEs).

El término de *elemento integrativo conjugativo* (ICE) fue propuesto por Burrus en el año 2002, en respuesta a la gran heterogeneidad de nomenclatura existente para aquellos elementos genéticos que comparten características de profago y plásmido; términos como transposón conjugativo, plásmido integrativo y CONSTIN (para conjugal, selftransmissible integrating element) fueron propuestos. Los ICEs engloban a un grupo de elementos genéticos móviles de origen cromosomal, que tal como lo haría un plásmido se transfieren de forma conjugativa de una célula donadora a una receptora, y se escinden e integran de forma específica en el cromosoma como lo haría un profago. Éstos se encuentran presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas y su característica principal es su estructura organizada que comprende 3 módulos que representan sus funciones esenciales: integración-escisión, transferencia y regulación (Burrus, 2002; Wozniak & Waldor, 2010).

Los ICEs llevan a cabo un serie de procesos en la célula/micelio hospedero que inicia con su presencia en el cromosoma, donde es flanqueado por secuencias específicas (*attR* y *attL*) que representan los sitios en donde se da la recombinación sitio-específica mediada por la integrasa del elemento; sin embargo, ciertas condiciones inducen la escisión del ICE y por lo tanto se da la recombinación entre ambos sitios *att* para dar lugar a una molécula circular que poseerá su propio sitio de *attachment* plasmídico (*attP*) y en el sitio que ocupaba el ICE en el cromosoma quedará el sitio de *attachment* bacteriano (*attB*). Posteriormente se da la replicación del elemento para ser transferido por la maquinaria de conjugación codificada por el mismo, para finalmente integrarse en el cromosoma de la célula receptora (Bordeleau, et al, 2012) (Figura 2).

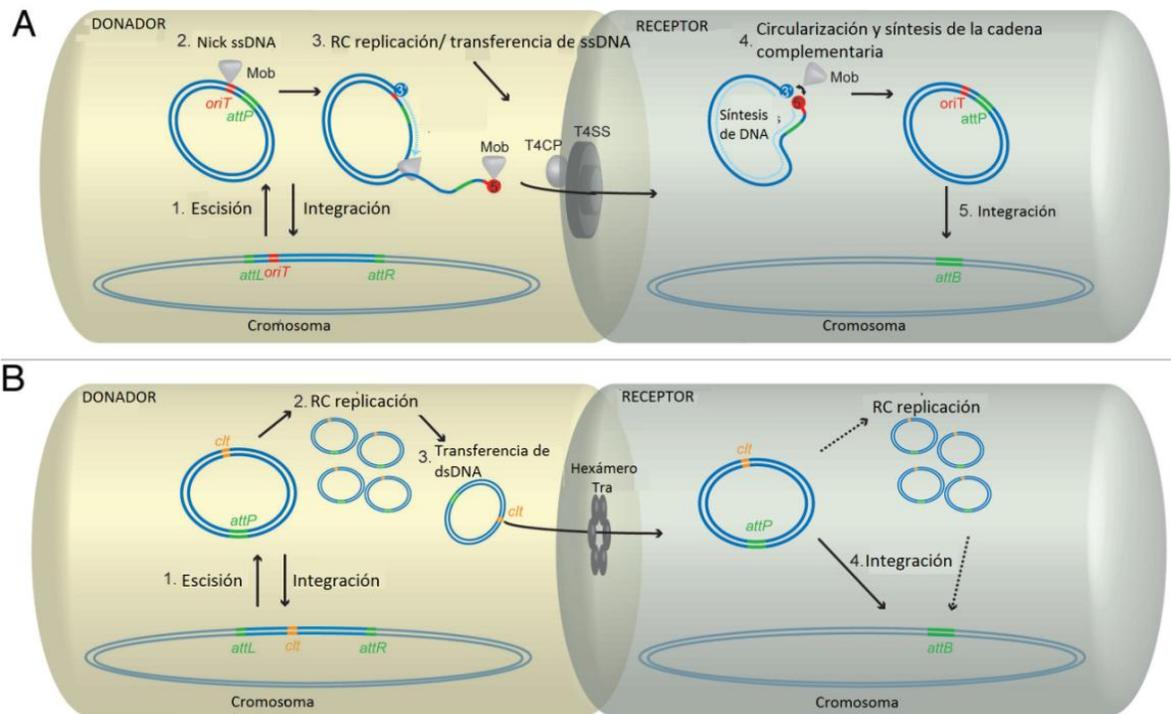


Figura 2. Procesos que lleva a cabo en la célula/micelio hospedero (A) ICE -Elemento Integrativo Conjugativo- y (B) AICE -Elemento Integrativo Conjugativo de Actinomicetos-, ambos siguen el ciclo de integración/escisión, replicación, transferencia e integración, sin embargo las diferencias más notorias que existen entre ellos son la maquinaria de translocación de DNA que utilizan (Sistema de Secreción tipo IV (T4SS) y FstK_SpoIIIE respectivamente), y el número de eventos replicación de la molécula circular, ya que los AICEs una vez escindidos pueden replicarse como plásmidos genuinos (Modificado de Bordeleau et al, 2012).

Además de los genes que codifican para sus módulos esenciales, los ICEs pueden contener genes que confieren distintos fenotipos a sus hospederos, tales como resistencia a antibióticos o metales pesados (Waldor et al, 1996; Balado et al, 2012), capacidad de degradar compuestos aromáticos, fijación de nitrógeno, patogenicidad (Huguet-Tapia et al, 2014) y muchas otras, como sistemas de modificación-restricción (Balado et al, 2012). Los ICEs se encuentran agrupados por las funciones que comparten, sin embargo, ocupan diversos genes y mecanismos para llevarlas a cabo.

2.3.1 Integración/escisión

Todos los ICEs codifican una recombinasa específica (integrasa) que es la enzima que cataliza la recombinación entre los sitios de *attachment* (*attL* con *attR* y *attP* con *attB*) y por lo tanto, es necesaria a la integración y escisión del elemento, aunque para esta última función se requiere

en la mayoría de los casos de factores adicionales como escisionasas (factores de recombinación direccional *RDFs*) (Wozniak & Waldor, 2010).

Las integrasas se agrupan en dos grandes familias que se distinguen por su homología, mecanismo de acción y residuo catalítico, de esta forma tenemos a la familia de las integrasas de tirosina, que es la que predomina en los ICEs y la familia de las integrasas de serina. La integrasa de tirosina más estudiada es la del fago lambda de *Escherichia coli*; los sustratos de recombinación de estas enzimas son repeticiones invertidas que flanquean secuencias de 6 a 8 pb no palindrómicas, sin embargo el *attP* puede llegar a comprender ~400 pb (Fogg, et al, 2014). La mayoría de los sitios *attB* son el extremo 3' de genes que codifican tRNAs (Burrus, 2002); sin embargo, en ICEs se ha observado que la integración también se da en otro tipo de genes, como en el caso de los ICEs de la familia SXT/R391 donde se da en el gen *prfC*, que codifica para un factor que no es esencial para la terminación de la traducción (Hochhut & Waldor, 1999).

Los sitios *attB* y *attP* para las integrasas de serina, generalmente son menores o iguales a 50 pb y consisten en diferentes repeticiones invertidas que flanquean de 2 a 12 pb de secuencia complementaria en donde está incluido el sitio en el que se da la recombinación. Una de las integrasas de serina más estudiadas es la del fago ϕ C31 que se ha utilizado para construir vectores integrativos para su hospedero natural, es decir los miembros del género *Streptomyces* y también para hospederos heterólogos como células de mamífero (Fogg, et al, 2014). Una pequeña parte de los ICEs ocupa recombinasas de serina, entre ellos se pueden mencionar a Tn5397 de *Clostridium difficile* (Burrus et al, 2002).

2.3.2 Transferencia conjugativa

Gracias a análisis bioinformáticos se sabe que en la mayoría de los ICEs de bacterias Gram negativas la maquinaria de conjugación es similar a la de plásmidos conjugativos, es decir que la translocación del DNA se da por sistemas de secreción tipo IV (T4SS); estos sistemas necesitan de la formación del poro de apareamiento, el cual puede variar en complejidad y generalmente involucra el ensamblaje de pili. Por lo tanto, en ICEs se pueden encontrar genes con homología con estos sistemas, a los cuales se les denomina *tra*, *vir* o *trb* por su similitud con los genes de los plásmidos F, pTi o RP4 (Wozniak & Waldor, 2010; Bordeleau et al, 2012).

Debido a la naturaleza cromosómica de los ICEs, el primer paso para que se dé su transferencia conjugativa es su escisión. Posteriormente se requiere del procesamiento del DNA extracromosomal que incluye la unión covalente de una relaxasa en el origen de transferencia (*oriT*) para permitir la replicación de tipo círculo rodante; la relaxasa se mantiene unida al DNA de cadena sencilla mientras interactúa con una proteína acopladora (generalmente una proteína TraG) para dirigir este complejo nucleoprotéico hacia el poro de apareamiento (Bordeleau et al, 2012).

Una vez en la célula receptora, el DNA de cadena sencilla se replica para reconstituir una molécula circular de doble cadena que se integrará en el cromosoma del hospedero (Figura 2). Esta replicación no está involucrada en el aumento del número de copias del elemento, sino que es un intermediario para la integración; sin embargo, se ha sugerido que pueden existir moléculas extracromosomales replicativas del elemento SXT en *E. coli* (Burrus & Waldor, 2002) y hay estudios que indican que se puede incrementar el número de moléculas extracromosomales del ICEBs1 bajo condiciones inductoras (Wozniak & Waldor, 2010).

2.3.3 Regulación

Los genes y mecanismos que regulan la transferencia de los ICEs son muy diversos y complejos, ya que involucran redes que pueden ser activadas o reprimidas por factores ambientales (Wozniak & Waldor, 2010; Burrus et al, 2006). Por ejemplo tenemos a dos ICEs poco relacionados (Tn916 de *Enterococcus faecalis* y a CTnDOT de *Bacteroides*) cuya escisión se estimula con cantidades subinhibitorias de tetraciclina. Los miembros de la familia SXT-R391 codifican la proteína SetR que es un homólogo del represor CI del fago lambda; esta proteína funciona al unirse a operadores río arriba de SetR para inhibir un operón que incluye a los genes *setD* y *setC*, los cuales son los activadores de los genes para la transferencia de SXT, entre los cuáles están los operones para *int* y *tra*. También se ha observado que la transferencia de SXT aumenta y que la transferencia del ICEBs1 se induce, con agentes que inducen la respuesta SOS, como la mitomicina C y quinolonas. El “*quorum sensing*” o “detección de quórum” también es un factor importante en la regulación de la transferencia de algunos ICEs, tales como ICEBs1 y ICEMISym (Wozniak & Waldor, 2010).

2.4 Elementos integrativos conjugativos de actinomicetos (AICEs).

Los AICEs son una clase especial de ICEs que se encuentran en bacterias del orden Actinomycetales. Las características que los distinguen son su capacidad de mantenerse como moléculas extracromosómicas, y que su transferencia conjugativa se da en forma de DNA de doble cadena (te Poele et al.2008). Otras características que comparten la mayoría, más no todos, es que codifican recombinasas (integrasas) de tirosina y que se mantienen integrados en genes específicos de tRNA en el cromosoma del hospedero (Ghinet et al, 2011).

La caracterización de los AICEs como una clase especial de ICEs la realizaron te Poele y colaboradores en 2008: en este estudio, además, se hizo una búsqueda de AICEs en los genomas de actinobacterias mediante Blast, basándose en las integrasas de los elementos que ya estaban identificados como tales (SLP1, pSAM2, pMEA300, etc). De esta forma encontraron varios AICEs putativos en los genomas de *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinispora arenicola*, *Frankia spp.*, *Streptomyces avermitilis* y *S. coelicolor*, entre otros (Figura 3). Posteriormente Ghinet y colaboradores realizaron un estudio más exhaustivo utilizando métodos basados en el modelo oculto de Markov (HMM) para buscar proteínas involucradas en la integración (Int-Tyr, Int-Ser), replicación (RepSA, RepAM, Prim-Pol) y transferencia de los AICEs (FtsK_SpoIIIE, T4SS) en 275 genomas de actinomicetos y apartir de este estudio *in silico* encontraron 144 AICEs y 17 ICEs con un sistema T4SS.

Los AICEs también tienen una estructura modular altamente conservada y te Poele propuso dividir sus módulos en cuatro: integración/escisión, replicación, transferencia conjugativa y regulación.

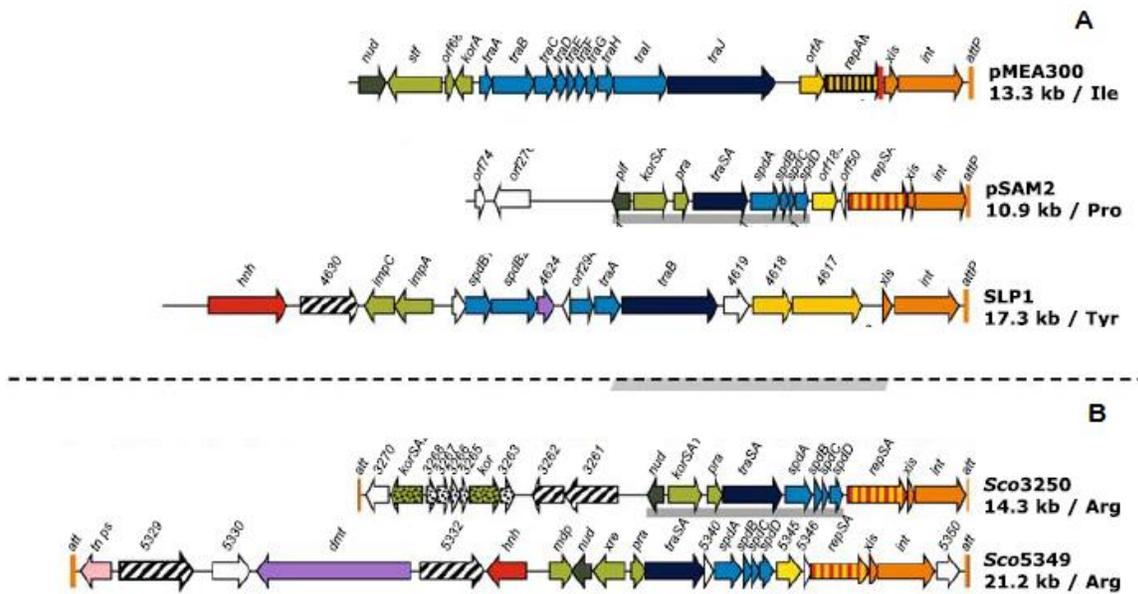


Figura 3. Organización estructural de (A) AICEs previamente identificados y secuenciados: pMEA300 de *Amycolatopsis methanolica*, pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* y SLP1 de *S. coelicolor*. (B) AICEs putativos en el cromosoma de *S. coelicolor*, nótese que son muy similares al elemento pSAM2.. Se muestra el tamaño de los elementos, así como el gen de tRNA en el que se encuentran insertados. Código de colores: naranja para los genes de integración/escisión; Rayado naranja con amarillo para los genes de replicación; azul marino para genes involucrados en la transferencia de DNA; azul celeste para los genes involucrados en diseminación intramicelial y verde botella para genes involucrados en la regulación del elemento. (Modificado de te Poele et al, 2008).

2.4.1 Integración/escisión

El mecanismo de integración en AICEs es igual que en los ICEs y como en estos últimos las integrasas predominantes son las de tirosina, que catalizan la integración en el extremo 3' de genes codificantes para tRNAs; la integración mantiene al gen funcional porque en algunos casos éstos son esenciales para el hospedero, como ejemplo está el gen del tRNA de tirosina, en el cual se integra el elemento SLP1 de *S. coelicolor* (Omer & Cohen, 1984; Vögltli & Cohen, 1992). Sin embargo, la integración también se puede dar en genes para proteínas, tal es caso, del AICE PAIS_t, cuya integración se da en un gen de resistencia a bacitracina (Huguet-Tapia, 2014).

Las integrasas de tirosina encontradas en los AICEs se dividen en ocho subfamilias, y se ha propuesto que esto favorece su coexistencia en el mismo genoma (Ghinet et al, 2011), ya que cuando están muy relacionadas pueden integrarse en el mismo tRNA lo que conlleva a arreglos en tándem, recombinación entre elementos, incompatibilidad o pérdida (Hochhut et al, 1999).

El 14% de los 114 AICEs putativos detectados por Ghinet y colaboradores utilizan integrasas de serina y la mitad de ellos se encuentran en el orden *Corynebacterineae*, la integración de éstos se da principalmente en genes para proteínas y una poca proporción en genes de tRNA.

Para la escisión del elemento se requiere tanto de la integrasa como de la escisionasa (Xis) en la mayoría de los casos, sin embargo, se encontró que la integrasa codificada por el elemento SLP1 de *S. coelicolor* es suficiente para llevar a cabo ambas funciones y que la escisionasa solamente aumentaba la tasa de escisión (Brash & Cohen, 1993).

2.4.2 Replicación

A diferencia de los ICEs encontrados en las otras divisiones bacterianas, los AICEs pueden replicarse extracromosómicamente para aumentar su número de copias por célula. Esta replicación no es necesaria para su mantenimiento, ya que el elemento también permanece en la forma integrada para su segregación durante la división celular (te Poele et al, 2008).

Los AICEs muy probablemente se replican mediante el mecanismo de círculo rodante (RCR). El único AICE para el que esto se ha demostrado es el pSAM2 de *S. ambofaciens* (Hagege et al, 1993). Este mecanismo involucra, entre otras proteínas, a proteínas iniciadoras de la replicación (Rep), las cuáles son codificadas por el propio elemento (te Poele et al, 2008); estas proteínas se unen al origen de replicación que en este caso es de doble cadena (DSO) y guían el ensamblaje del complejo de inicio de la replicación (Khan, 2005).

Las proteínas Rep en AICEs se pueden clasificar en distintas familias, RepSA que a su vez se divide en las subfamilias RepSA^{SAM2} (presente en todos los AICEs encontrados en *Sreptomycineae*) y RepSA^{MR2} (Ghinet et al, 2011); RepAM representa otra familia, y aunque esta última no es parecida a otras proteínas iniciadoras de replicación conocidas, se demostró que es esencial para la replicación del AICE pMEA300 de *Amycolatopsis methanolica*, y es similar a ORFs encontrados en AICEs putativos y caracterizados (te Poele et al, 2006). En algunas ocasiones RepAM está asociada con genes para proteínas con dominio

primasa/polimerasa -Prim-pol- (Ghinet et al, 2011). El mecanismo de replicación del elemento SLP1 de *S. lividans* no se ha caracterizado a pesar de haber sido descubierto en 1981, pero en una de sus dos regiones importantes para la replicación incluye al gen SCO4617 que tiene similitud con el dominio Prim-pol del gen SACE_7028 del elemento pSE211, con lo cual se puede asumir que las proteínas Prim-pol también están involucradas en el proceso de replicación en AICEs, aunque su mecanismo de acción no sea muy claro (te Poele et al, 2008; Ghinet et al, 2011).

2.4.3 Transferencia conjugativa

El mecanismo de translocación del DNA durante la conjugación en los AICEs no se parece al observado en los ICEs de las otras divisiones bacterianas, sino que recuerda al utilizado por los plásmidos del género *Streptomyces* (te Poele et al, 2008). Éste involucra la participación de una sola proteína (TraB, TraSA o Tra) en lugar de un complejo sistema de secreción tipo 4 (T4SS).

Las proteínas Tra utilizadas por plásmidos y AICEs son muy diversas y se pueden clasificar en seis subfamilias (Ghinet et al, 2011). Sin embargo, todas comparten una similitud estructural y funcional con los traslocadores de DNA FtsK y SpoIIIE, los cuáles están involucrados en la segregación cromosomal durante la división celular y esporulación en *E. coli* y *Bacillus subtilis* respectivamente (Kaimer et al, 2009; Vogelmann et al 2011). Estas proteínas forman un poro hexamérico que utiliza ATP para mediar la translocación de DNA de doble cadena. Este proceso involucra el reconocimiento y unión al locus de actuación en cis (*clt*) que es una pequeña región no codificante de aproximadamente 50 pb que está incluida en el plásmido o AICE, y es equivalente al *oriT* (Figura 4). Aunque los locus *clt* no son similares entre sí, comparten la característica de tener secuencias repetidas con la capacidad de formar estructuras secundarias (Vogelmann et al 2011).

Mientras que las proteínas Tra se localizan en las puntas hifales y median la transferencia conjugativa de los AICEs entre las células donadoras y las receptoras (Reuther et al, 2006) existe un complejo proteico constituido por las proteínas Spd (*spread*) responsables de la diseminación intramicelilar del AICE (y plásmidos de *Streptomyces*) a lo largo del micelio de la cepa receptora. Aunque el mecanismo molecular no se ha elucidado por completo, se presume que la diseminación o *spread* es producto de la actividad de las proteínas Spd en conjunto con TraB; concomitante a la diseminación, se da la formación de *pocks* (Thoma & Muth, 2012).

Los *pocks* son zonas macroscópicas de hasta 3 mm de diámetro que reflejan un retraso de crecimiento de la cepa receptora al momento de la transferencia conjugativa de un plásmido o AICE (Figura 4). Éstas se forman al plaquear en medio sólido una cantidad de esporas suficiente para formar un tapete confluyente de la cepa receptora y diluciones de la cepa donadora (Bibb et al, 1977).

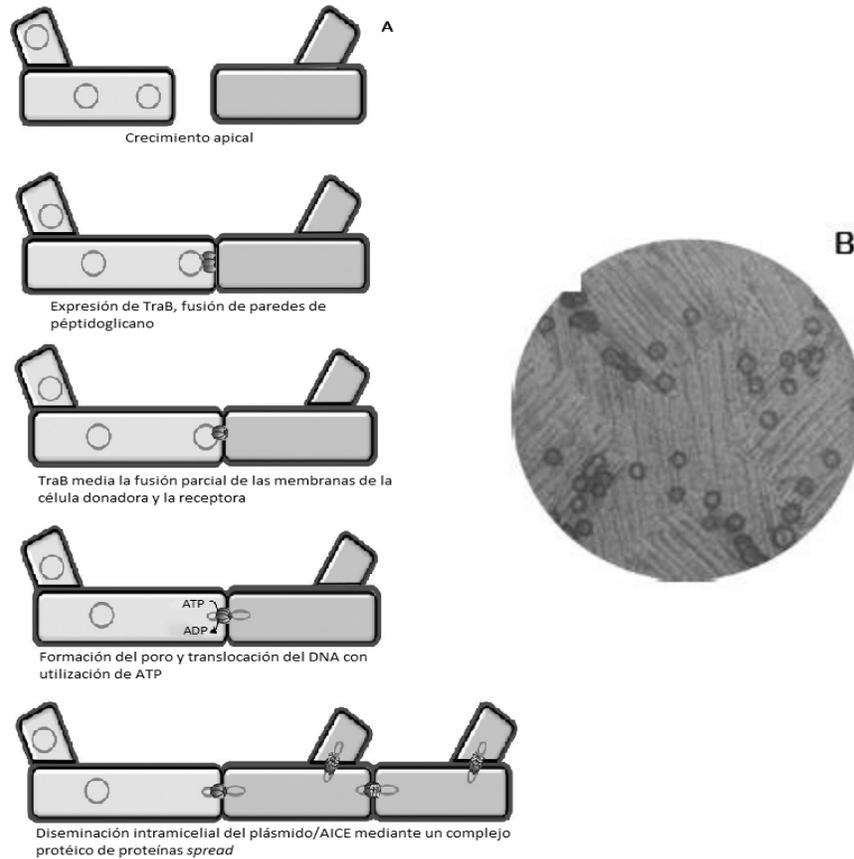


Figura 4. (A) Modelo de transferencia conjugativa intermicelar de AICEs mediada por TraB y de diseminación intramicelar por el complejo proteico de proteínas *spread*. (B) *Pocks* en medio R5 (Modificado de Thoma & Muth, 2012).

Además de AICEs que ocupan proteínas con dominio FtsK_SpoIIIE para su transferencia, se han encontrado 17 ICEs putativos en actinomicetos que podrían estar usando un sistema de secreción tipo 4 para este mismo propósito (Ghinet et al, 2011).

2.4.4 Regulación

En los AICEs las condiciones ambientales también juegan un papel importante en la inducción de su replicación y por ende en su transferencia conjugativa; por ejemplo, el número de moléculas circulares libres de pMEA300 es de menos de 1 por 5-10 cromosomas, pero esta cantidad aumenta al crecer *A. methanolica* en un medio enriquecido con fructosa o sacarosa. Se piensa que un producto de la degradación del azúcar desencadena el comienzo de la conjugación, aunque el mecanismo no se ha elucidado por completo (Vrijbloed, 1995). Algo parecido sucede con pSAM2 de *S. ambofaciens*, del cual solo se detectan moléculas libres cuando se encuentran condiciones favorables para la replicación, es decir cuando hay presencia de micelio receptor potencial (Possoz et al, 2001).

Los sistemas Kil-kor son utilizados por los plásmidos de *Sreptomycetes* y por los AICEs para regular sus funciones de replicación y transferencia. La expresión del gen *kil* (*traB*, *kilA*) es letal y sólo puede ser subclonado en la presencia de su correspondiente gen *killing override* (*korA*, *traR*); estos últimos presentan similitud con la familia GntR de reguladores y tienen homólogos en todos los AICEs (Servín et al, 1995; Reuther et al, 2006; te Poele et al, 2008).

En el caso de pSAM2 de *S. ambofaciens* cuando hay ausencia de células receptoras potenciales, la proteína KorSA reprime la expresión de *Pra* (putative replication activator) que es una proteína que promueve la expresión del operón que incluye a *repSA*, *int* y *xis* (Figura 5) y por lo tanto la transferencia conjugativa del elemento, ya que se ha observado que la replicación autónoma es indispensable para esta función. La proteína Pif es una nudix-hidrolasa que es la responsable de prevenir la transferencia redundante del elemento, al modificar un componente en las células donadoras para evitar que se reconozcan, aunque su mecanismo de acción no se ha elucidado por completo (Sezonov et al, 2000).

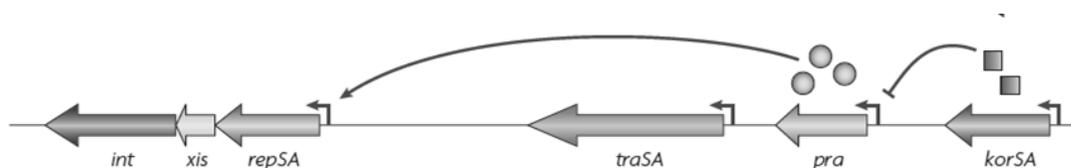


Figura 5. En pSAM2 el regulador transcripcional KorSA reprime la expresión de Pra que es un activador de las funciones de replicación, integración y escisión (Tomado de Wozniak & Waldor, 2010).

En SLP1 de *Streptomyces coelicolor* el locus *imp* (inhibition of plasmid maintenance) codifica las proteínas ImpA e ImpC, de las cuales ImpA está relacionada con las proteínas Kor de otros elementos. Esta funciona al unirse a su propio promotor y a otro que inicia la transcripción en sentido contrario a éste y el cual está involucrado con los genes de diseminación intramicelial (*spdB1* y *spdB2*) y a los de transferencia (*traB*), la función de ImpC es de potenciar la acción de ImpA (Hagege et al, 1999)

2.4.5 Prevalencia de los AICEs

A partir de la búsqueda de AICEs en 275 cromosomas secuenciados de actinobacterias, se encontraron 144 AICEs putativos de los cuales todos, con excepción de uno, pertenecen a bacterias del orden Actinomycetales. Se ha propuesto que los AICEs se confinan a este orden por su mecanismo de transferencia de DNA, adaptado a la naturaleza hifal de los miembros de este orden (Bordeleau et al, 2012). También se encontró una correlación entre el tamaño del genoma y el número de AICEs que se pueden encontrar en él, es decir que genomas grandes pueden albergar varios AICEs diferentes, siendo los miembros de los subórdenes Frankinaea, Micromonosporineae y Streptomycineae los más propensos. Finalmente, cuando se analizó la distribución de los AICEs en función del nicho ecológico se encontró que había una mayor cantidad de elementos por genoma en especies aisladas de suelo, agua y plantas que aquellas provenientes de sedimentos, animales y productos de uso diario (Ghinet et al, 2011).

2.4.6 AICEs caracterizados y secuenciados más conocidos

Los elementos SLP1 de *S. coelicolor*, pSAM2 de *S. ambofaciens*, pMEA100 de *A. mediterranei*, pIJ110 de *Streptomyces parvulus*, pIJ408 de *Streptomyces glaucescens* y pSE211 de *S. erythraea* son algunos de los AICEs más conocidos (Tabla 1), todos ellos se descubrieron en la década de los 80s y el primero en identificarse fue SLP1 en 1981.

SLP1 se identificó como un plásmido en *S. lividans*, de ahí su nombre (*Streptomyces lividans* plasmid 1). Sin embargo, éste sólo se presentaba en dicha cepa después de una cruce con *S. coelicolor*, en tales cruces se formaban *pocks* (zonas de retardo de crecimiento de la cepa receptora) de distintos tipos, es decir que tenían diámetros y formas distintas. A partir de estas observaciones, se obtuvo DNA plasmídico de cada tipo de *pock* y se encontraron moléculas circulares de distintos tamaños; al ser analizadas por restricción se observó que una secuencia era constante en todas ellas, y constituía el *núcleo* del plásmido. Posteriormente, para

identificar de qué cepa provenían dichos plásmidos se realizó un Southern blot y se encontró que dicha secuencia provenía del cromosoma de *S. coelicolor* en donde se encontraba integrada. En este estudio se encontró que además de encontrarse como una molécula replicativa, SLP1 también se podía encontrar integrado en el cromosoma de *S. lividans* (Bibb et al, 1981).

A partir de la caracterización de SLP1 como un plásmido de origen cromosómico, cuya escisión de *S. coelicolor* y transferencia hacia *S. lividans* forma una gama de plásmidos con una región constante (núcleo del AICE), se dio un auge en la búsqueda de otros elementos con esta característica y fue con este tipo de ensayos (conjugación de cepa donadora con *S. lividans* como receptora), observación de *pocks* y búsqueda de moléculas circulares replicativas, con el que se descubrieron los AICEs antes mencionados (Tabla 1), ya que la mayoría de ellos son crípticos, es decir que no transfieren un fenotipo conspicuo a sus hospederos. A partir de que su identificación, se determinó que las frecuencias de transferencia conjugativa inter e intraespecífica de estos elementos era alta (Bibb et al, 1981) y también se encontró que la integración de estos elementos se daba en genes de tRNA que se encontraban en otras bacterias emparentadas (Mazodier et al 1990). Por lo tanto, algunos AICEs se utilizaron para la construcción de plásmidos replicativos así como integrativos (Bibb & Cohen, 1982; Smokvina et al, 1990).

Tabla 1. Características de algunos AICEs identificados (Modificada de te Poele, et al 2008)

AICE	Cepa	Referencia	Tamaño (kb)	Funciones específicas de cada elemento	
				tRNA	CMA
SLP1	<i>S. coelicolor</i>	Bibb et al, 1981	17.3	Tyr	+
pSAM2	<i>S. ambofaciens</i>	Pernodet et al 1984	10.9	Pro	+
pIJ110	<i>S. parvulus</i>	Hoopwood et al, 1984	13.6	Nd	+
pMEA100	<i>A. mediterranei</i>	Moretti et al, 1985	23.3	Phe	+
pSE211	<i>Sac. Erythraea</i>	Brown et al, 1988	17.2	Phe	+

nd, no determinado. CMA. habilidad de movilización cromosómica

3. Antecedentes

El estudio del Sistema de Restricción Metil Específico (SRME) de *S. coelicolor* es uno de los temas más estudiados en el laboratorio del Dr. Luis Servín, la presencia de este sistema es además una de las características fenotípicas que diferencian a la especie *S. coelicolor* de *S. lividans*, y que hacen a esta primera, una especie difícil de manipular genéticamente.

En 2007 Jayapal y colaboradores mediante microarreglos, PCR y análisis de secuencia, encontraron que la presencia de islas genómicas en *S. coelicolor* y la ausencia de las mismas en *S. lividans* podía explicar ésta y otras diferencias fenotípicas. En este estudio se denotó a los genes SCO4213, SCO2863 y SCO4631, presentes en dichas islas genómicas como codificantes de probables nucleasas metil específicas. Fue en 2009 cuando González-Cerón y colaboradores corroboraron la participación de estos genes y del operón SCO3261-SCO3262 en la restricción de DNA que había sido metilado por los sistemas Hsd, Dcm y Dam de *E. coli*, ya que sólo el DNA proveniente de una cepa de *E. coli* carente de todos estos sistemas podía utilizarse para transformar eficientemente a *S. coelicolor*; por otro lado una cepa mutante de *S. coelicolor* carente de los genes antes mencionados, mostró una disminución en la actividad de restricción de DNA metilado, pero aún mostraba restricción hacia aquél que estaba metilado en sitios Dam.

En otro estudio se encontró que el sistema de restricción de *S. coelicolor* era incompatible con otros sistemas de metilación tipo II de *Streptomyces*, de este modo se observó que al introducir el gen de la metilasa M.Sph de *Streptomyces phaeochromogenes* o el gen de la metilasa M.SaII de *Streptomyces albus* se producía la muerte celular. En este tipo de ensayos se encontró que la expresión de estos sistemas en *S. coelicolor* sólo era posible cuando en *S. coelicolor* había ocurrido una mutación; al mapearse la misma, se encontró que esta consistía en la pérdida de una región de 22.1 kb (González-Cerón, datos no publicados) que posteriormente se observó que corresponde al AICE putativo AICE5349 identificado por secuencia (te Poele et al, 2008). Dentro de este elemento se encontraron los genes SCO5330, cuya presencia resultó la responsable de la incompatibilidad con la actividad de las metilasas M.Sph, M.SaII (Martínez-Morales, datos no publicados), así como con la metilasa Dam (Cadena-Sandoval, 2014) y SCO5333 que se encontró que es incompatible con la actividad de las metilasas M.SacI y Dcm.

Este trabajo se enfoca en el estudio de la funcionalidad del elemento integrativo conjugativo de actinomicetos AICE5349 de *S. coelicolor* (que también fue identificado como una isla genómica por Jayapal) que alberga los genes mencionados anteriormente, como mediador de la transferencia horizontal de genes con los siguientes objetivos:

4. Objetivos

Generales:

- ❖ Determinar si los módulos de integración/escisión y transferencia conjugativa del elemento
- ❖ AICE5349 son funcionales a través de cruas interespecíficas entre *S. coelicolor* y *S. lividans*
- ❖ Determinar si el elemento AICE5349 puede también transferirse intraespecíficamente.

Particulares:

- ❖ Comparar la frecuencia de transferencia del elemento AICE5349 con el elemento SLP1 identificado anteriormente por Bibb et al, (1981)
- ❖ Observar si el elemento forma *pocks* en un tapete de las células receptoras como resultado de su transferencia conjugativa
- ❖ Determinar si existe la forma libre del elemento AICE 5349 en las cepas receptoras
- ❖ Aislar el gen de la integrasa del elemento AICE5349 y construir un plásmido integrativo empleando dicha integrasa

5. Hipótesis

Los módulos de integración y transferencia conjugativa del elemento AICE5349 son funcionales y por lo tanto será capaz de transferirse en forma interespecífica de *Streptomyces coelicolor* a *Streptomyces lividans* y de integrarse en ésta última en forma sitio específica.

6. Materiales y métodos

6.1 Cepas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo pertenecen al género *Streptomyces* y a la especie *E. coli*; las cepas del género *Streptomyces* fueron empleadas principalmente para los ensayos de conjugación y extracción de DNA total cromosómico, mientras que las cepas de la especie *E. coli* fueron empleadas tanto para la extracción de DNA plasmídico para llevar a cabo clonaciones y conjugaciones (tabla 2).

Tabla 2. Cepas de *E. coli* y del género *Streptomyces* utilizadas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>S. coelicolor</i> M145ΔSCO5329::apra	SCP1-, SCP2- sustitución del gen SCO5329 por un cassette de resistencia a Apramicina	Este trabajo
<i>S. coelicolor</i> IB21	Δ AICE5349, Cepa mutante carente del AICE5349	González-Cerón, no publicado
<i>S. coelicolor</i> IB21-hyg	Cepa IB21 a la que se le introdujo un gen de resistencia a higromicina mediante el plásmido integrativo pMS81	Este trabajo
<i>S. lividans</i> TK64	Pro-2, str-6, SLP2- SLP3- Cepa resistente a estreptomycinina y sin factores de fertilidad	Hopwood <i>et al.</i> , 1983
<i>S. lividans</i> TK64-AICE5349	Cepa de <i>S. lividans</i> TK64 con el AICE5349 insertado en el cromosoma	Este trabajo

<i>S. lividans</i> TK54	His-2 leu-2 spc-1 SLP2- SLP3- Cepa resistente a espectinomomicina y sin factores de fertilidad	Hopwood <i>et al.</i> , 1983
<i>S. lividans</i> 1326	Cepa silvestre	Kieser <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> λ (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15)	Grant, <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsd-M.</i> Cepa deficiente en los sistemas de metilación de DNA. Contiene plásmido “helper” con los elementos necesarios para la conjugación con <i>Streptomyces</i> y un cassette de resistencia a kanamicina.	McNeil <i>et al.</i> , 1992

6.2 Oligonucleótidos utilizados

Se diseñaron oligonucleótidos con la ayuda del programa Primer 3 plus para la detección del AICE5349 tanto en su forma integrada como en su forma libre y para la clonación de su integrasa.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los sitios de restricción introducidos se marcaron en negritas

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
TRNADEL1	ACCGCTGAAGAAGCTCAGTC	González-Cerón, no publicado
TRNADEL2	AGCTCGAGGTTGACCCTGAT	González-Cerón, no publicado
SCO_100072	CCTCATCCTGGCTAATCTTG	Este trabajo
SCO_100073	CCAAGATCCTGTCCACGAAT	Este trabajo
SCO5326	AGCTATCCATCCTCCCGAAT	Este trabajo
AICE_F	GGCGGTTAGTCACCTGAAGA	Este trabajo

AICE_R	GAACTGACCCCTACCGACAA	Este trabajo
SIN_INTF	GATGTAGGAGGGCGTGGATA	Este trabajo
SIN_INTR	GGACGTCTGGAATCGCTAGA	Este trabajo
INT_FOR	CCGAGATCTGACCTGGTTGCGGCAGTT	Este trabajo
INT_REV	GGCTCTAGAACCGGACGGAACCTCT	Este trabajo
ATTB_FOR	CCATGCATGCACAGCTCAGGCAGACGTTA	Este trabajo
ATTB_REV	GTGTGCATGCGACCGGTACTTGTCATGG	Este trabajo

6.3 Plásmidos utilizados

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo. Se utilizaron tanto plásmidos integrativos como no integrativos para los ensayos de conjugación e incompatibilidad.

Plásmido	Descripción	Referencia
pMS81	oriT, ϕ BT1 <i>attB-int</i> , Hyg ^R Plásmido replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i> derivado del fago ϕ BT1; con resistencia a higromicina	Gregory, et al., 2003
pB404	<i>sphM</i> , Hyg ^R Plásmido integrativo derivado del pMS81 con el gen que codifica la metilasa SphM	González-Cerón, no publicado
St6G9	Cósmido que comprende desde el gen SCO5289 hasta el SCO5331 con resistencia a kanamicina	Redenbach et al, 1996
pSET152	<i>aac(3)IV/Ap^R</i> , <i>lacZ</i> , <i>rep^{pUC}</i> , <i>att^{ϕC31}</i> , <i>int^{ϕC31}</i> , <i>oriT</i> . Plásmido replicativo en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>Streptomyces</i> derivado del fago ϕ C31, con resistencia a apramicina	Bierman, et al., 1992
pSET-5349	pSET152 con el gen SCO5349 clonado en el sitio de EcoRV	Este trabajo
pSET Δ INT	pSET152 sin la integrasa ni sitio <i>attP</i> del fago ϕ C31	Este trabajo
pSET Δ INT-ermE5349	pSET Δ INT con el promotor fuerte constitutivo <i>ermEp*</i> y el gen de la integrasa SCO5349	Este trabajo

pSETΔINT-ermE5349attB 1) Y (2)	pSETΔINT-ermE5349 con el sitio de attachment del AICE5349 clonado en el sitio para SphI	Este trabajo
pIJ4090 pBlueScript II SK	Vector de expresión derivado del pIJ101 que contiene el promotor fuerte constitutivo <i>ermEp</i> [*] Amp ^R Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i>	M.J. Bibb, no publicado Stratagene, La Jolla, CA, USA
pBlueScript-ermE	pBlueScript II SK Vector con el promotor fuerte constitutivo <i>ermEp</i> [*] clonado en los sitios BamHI-EcoRI	Este trabajo
pBlueScript-ermE5349	pBlueScript-ermE con el gen de la integrasa SCO5349 clonado en los sitios BamHI-XbaI	Este trabajo

6.4 Obtención de cepas

Para determinar si el AICE5349 es un elemento funcional que puede ser transferido por conjugación, lo primero que se realizó fue obtener una cepa de *S. coelicolor* con un cassette de resistencia a apramicina dentro del AICE5349, el gen que se eligió para ser sustituido fue el SCO5329, el cual no es esencial para las funciones de transferencia ni integración del elemento. Esta mutagénesis se realizó con el método Redirect (Gust, Kieser & Chater, 2002) en el cuál mediante un direccionamiento por PCR se sustituye una secuencia dentro de un cósmido de *S. coelicolor* por un marcador seleccionable utilizando fragmentos con extensiones homólogas de 39 nucleótidos, en el cassette de disrupción se incluye un oriT lo cual permite la introducción del cósmido a *S. coelicolor* mediante conjugación con la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002, que es deficiente en sus sistemas de metilación de DNA, y por lo tanto evita el fuerte sistema de restricción metil-específico de *S. coelicolor*.

En este caso, el cósmido en el que se realizó el PCR targeting fue el St6G9 mismo que se introdujo por electroporación en la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 (ver **Protocolo #7**), posteriormente dicha cepa transformada se conjugó con la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145 (ver **Protocolo #6**) que carece de los plásmidos SCP1 y SCP2; las colonias transconjugantes de *S. coelicolor* se replicaron en sectores en cajas con apramicina y en cajas con kanamicina, conservando el mismo orden para seleccionar colonias apramicina-resistentes y kanamicina-sensibles, lo cual indicó que el reemplazo del gen silvestre por el mutado mediante un doble entrecruzamiento se dio de forma exitosa y no se dio la integración del cósmido en el cromosoma. Se seleccionaron dos colonias con tales características a las que se les denominó M145ΔSCO5329::apra (1) y M145ΔSCO5329::apra (2).

Las cepas de *S. lividans* TK54 Y TK64 son derivadas de la cepa 66, que carecen de los plásmidos SLP2 (que funciona como un factor de fertilidad) y SLP3; éstas se recuperaron de esporas conservadas a -20°C en glicerol, y para reactivarlas se estriaron en medio MS enriquecido con extracto de levadura al 10%. Se seleccionaron dos colonias de cada cepa.

La cepa de *S. coelicolor* IB21 es una derivada de la cepa silvestre M145 que carece del AICE5349; a esta cepa se le introdujo un cassette de resistencia a higromicina, presente en el plásmido integrativo pMS81, que se introdujo en la misma mediante su conjugación con la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 previamente transformada con dicho plásmido (ver **Protocolo #6**). Esta cepa junto con TK54 Y TK64 de *S. lividans* fueron utilizadas como receptoras para estudiar la habilidad del AICE5349 para promover su autotransferencia e integración.

6.5 Ensayos de conjugación

El intercambio genético en *Streptomyces* es muy común en su ambiente natural. En condiciones de laboratorio se requiere del cultivo mixto de las cepas parentales en medio sólido para que se dé durante la fase de crecimiento temprano que es cuando se encuentra en la fase de micelio vegetativo. Sin embargo, la conjugación es un proceso que no se da en forma sincrónica, sino que involucra eventos sucesivos de recombinación mientras ambas cepas crecen en el medio (Kieser, *et al*, 2000). Por lo tanto para realizar una conjugación, se plaquea una mezcla de las esporas de las cepas parentales en medio MS y se dejan crecer juntas por varios días hasta obtener esporas, que son cosechadas y conservadas a -20°C en glicerol al 20%.

El primer ensayo de conjugación involucró a la cepa de *S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra como donadora y a la cepa de *S. lividans* TK64 como receptora. Después de obtener las esporas producto del evento de conjugación se realizaron diluciones seriadas hasta el orden de 10^{-7} y se plaquearon en medio MS suplementado con cada uno de los antibióticos a los que eran resistentes las cepas parentales así como en medio MS suplementado con ambos antibióticos; esto con el fin de contar la cantidad de transconjugantes así como de las cepas parentales. La frecuencia de transferencia del AICE5349 fue calculada dividiendo el promedio de colonias transconjugantes (con resistencia a ambos antibióticos) entre el total de las colonias receptoras.

A partir de esta primera conjugación y de los ensayos posteriores que corroboraron la transferencia del AICE5349 se realizaron otras conjugaciones para probar la transferencia del AICE5349 de forma intraespecífica de la siguiente forma (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas del género *Streptomyces* involucradas en los ensayos de conjugación

Cepa donadora	Cepa receptora	Resistencias a antibióticos de transconjugantes	Tipo de conjugación
<i>S. coelicolor</i> M145ΔSCO5329::apra	<i>S. lividans</i> TK64	apramicina/ estreptomomicina	Interespecífica
<i>S. lividans</i> TK64-AICE5349	<i>S. lividans</i> TK54	apramicina/ espectinomomicina	Intraespecífica
<i>S. coelicolor</i> M145ΔSCO5329::apra	<i>S. coelicolor</i> IB21-hyg	apramicina/ higromicina	Intraespecífica

Como control, las cepas parentales se plaquearon por separado en medio MS suplementado con el antibiótico al que era resistente la cepa con la que se iba a congregar para observar si había mutantes espontáneas que afectarían la cuantificación de la frecuencia de transferencia.

6.6 Detección del AICE5349 integrado en el cromosoma mediante PCR

El AICE5349 es un elemento genético que comprende 21.2 kb, por lo tanto para detectar su integración en el cromosoma se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran cada uno de los extremos del elemento y la región cromosomal adyacente, para evidenciar que elemento se integró completo. Cabe mencionar que en el laboratorio ya se contaba con los oligonucleótidos TRNADEL1 Y TRNADEL2 que se unen a las regiones cromosomales adyacentes al AICE5349, y que se utilizaron para comprobar que la cepa mutante IB21 que carece del AICE5349 era correcta. Por lo tanto, con ayuda del programa Primer 3 plus se diseñaron los oligonucleótidos que permitieran la amplificación de la región de interés.

Los oligonucleótidos diseñados fueron SCO100072, SCO100073 y SCO5326 (ver Tabla 2), la pareja TRNADEL1-SCO100072 amplifica el extremo izquierdo del elemento y la región adyacente en el cromosoma de *S. coelicolor*, la pareja SCO5326-SCO100072 amplifica el extremo izquierdo del elemento y la región adyacente en el cromosoma de *S. lividans*, mientras que la pareja TRNADEL2-SCO100073 amplifica el extremo derecho del elemento y la región adyacente en el cromosoma tanto de *S. coelicolor*, como de *S. lividans* (Figura 6). Los productos esperados de las reacciones de PCR son 607, 686 y 465 respectivamente. Las

cuatro días y posteriormente se raspó el micelio a partir del celofán, a partir del cual se realizó la extracción de DNA cromosómico conforme al protocolo antes descrito (**ver Protocolo #4**).

De esta forma se esperaba amplificar el sitio *attP* del AICE mientras se transfería de forma conjugativa o mientras se diseminaba a lo largo del micelio de la cepa receptora.

6.7 Ensayo de incompatibilidad entre el producto del gen SCO5330 con la actividad de la metiltransferasa M.SphI

Como ya se había mencionado en los antecedentes, el gen SCO5330 fue identificado como una nucleasa metil-específica del sistema de restricción de DNA de *S. coelicolor*, que reconoce y restringe secuencias de DNA metilado por las metiltransferasas Dam (*E. coli*) y M.SphI (*S. phaeochromogenes*), esto se descubrió al introducir un plásmido integrativo que contenía el gen de la nucleasa (SCO5330) en *S. lividans* y posteriormente introducir otro plásmido integrativo con el gen de la metiltransferasa M.SphI, el resultado fue que las células de *S. lividans* no crecieron porque su DNA se encontraba metilado por la acción de la metiltransferasa y la nucleasa metil-específica (SCO5330) lo estaba restringiendo. A este fenómeno se le denomina *incompatibilidad* entre una metilasa y una nucleasa (Cadena Sandoval, 2014).

Retomamos este ensayo de incompatibilidad para observar si las células de *S. lividans* TK64 que recibieron el AICE5349 por conjugación con *S. coelicolor* también recibieron y expresaban el producto del gen SCO5330 (que se encuentra dentro de dicho elemento), por lo tanto, se transformaron células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido integrativo pB404, que contiene el gen *sphM* de la metiltransferasa M.SphI y un gen de resistencia a higromicina, para que funcionara como donadora en el ensayo de conjugación (**ver Protocolo # 6**) con las cepas de *S. coelicolor* M145ΔSCO5329::apra, *S. coelicolor* IB21, *S. lividans* TK64, *S. lividans* TK64-AICE(1) y *S. lividans* TK64-AICE(2).

La hipótesis de este experimento es que si *S. lividans* TK64 recibió el AICE5349 de *S. coelicolor*, se provocará su muerte celular, porque la nucleasa metil-específica SCO5330 estará restringiendo el DNA de la célula en cuanto se metile por la acción de la enzima M. SphI.

6.8 Ensayo de formación de *pocks*

Los *pocks* son zonas circulares de hasta 3 mm de diámetro que se observan en medio sólido, e indican la transferencia de un elemento conjugativo (plásmido, AICE) de una cepa donadora a una receptora, por lo que el crecimiento de la cepa receptora se retrasa para diseminar elemento conjugativo a lo largo de sus compartimentos.

Para observar la formación de *pocks*, se plaquearon 10^5 esporas de *S. lividans* TK64 (cepa receptora) en medio R5 y subsecuentemente se realizaron diluciones de *S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra para plaquearse junto con las antes mencionadas. Se incubaron a 30°C hasta la observación de *pocks* y se tomaron fotografías. Una vez que el micelio en dichas placas se encontraba totalmente esporulado, las cajas fueron replicadas con ayuda de terciopelo estéril en medio MS suplementado con apramicina y estreptomicina para seleccionar transconjugantes.

6.9 Construcción de un vector integrativo utilizando la integrasa (Int) del AICE5349

Con la finalidad de evaluar si la integrasa presente en el AICE5349 es funcional separada del elemento, se intentó la construcción de un vector integrativo en el que ésta se expresara constitutivamente, lo cual se describe a continuación.

6.9.1 Aislamiento y clonación del promotor fuerte constitutivo *ermEp**

Para lograr la expresión del gen de la integrasa se utilizó el promotor fuerte constitutivo *ermEp** (ID genbank M11200), el cual se extrajo del vector pIJ4090. Este vector se introdujo por transformación a la cepa 1326 de *Streptomyces lividans* por el método de tratamiento de protoplastos con polietilenglicol, ya que el vector sólo replica en el género *Streptomyces* (**ver protocolo #8**). Una vez que se obtuvo la cepa transformada, se purificó el plásmido (**ver protocolo #1**), mismo que se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI para posteriormente cargarlo en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) con el fin de extraer el fragmento correspondiente al promotor *ermEp** (**ver protocolo #4**). Éste se cuantificó para ligarse (**ver protocolo #5**) con el vector pBlueScript II SK previamente digerido con las enzimas antes mencionadas; posteriormente se introdujo por electroporación en células de *E. coli* DH5a que se plaquearon en medio LB suplementado con ampicilina (50mg/mL), se seleccionaron transformantes a las que se les extrajo el plásmido a pequeña escala (**ver protocolo #1**) y se verificó la inserción del fragmento por el patrón de restricción, dando como resultado pBlueScript-*ermEp*.

6.9.2 Aislamiento y clonación del gen de la Integrasa del AICE5349

El gen de la integrasa del AICE5349 corresponde al gen SCO5349, cuya secuencia se obtuvo del sitio <http://strepdb.streptomyces.org.uk>. Dicha secuencia se tomó como base para diseñar los oligonucleótidos para su amplificación con ayuda del programa Primer 3 plus, mismos a los que se les agregaron los sitios de restricción para las enzimas BglII y XbaI (ver tabla 2). La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa de alta fidelidad Pfu Ultra AD (Agilent Technologies) con un programa tipo *touchdown* (Korbie & Mattick, 2008). El producto de PCR (Figura 7a) se clonó como un fragmento de extremos romos en el plásmido pSET152 en el sitio para la enzima EcoRV, dicha ligación se transformó por electroporación en células de *E. coli* DH5a y se extrajo el plásmido (pSET-5349) para mandarlo a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular.

El análisis de la secuencia con los programas Chromas lite y DNAMAN, reveló que el gen de la integrasa clonado se amplificó sin mutaciones, y por lo tanto se prosiguió a digerir el plásmido pSET-5349 con las enzimas BglII y XbaI y al plásmido pBlueScript-ermEp con las enzimas BamHI y XbaI para posterior purificación por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

El fragmento correspondiente a la integrasa se ligó al plásmido pBlueScript-ermEp y el producto de la ligación se introdujo por electroporación en células de *E. coli* DH5a que se plaquearon en medio LB suplementado con ampicilina (50mg/mL), de algunas transformantes se extrajo el plásmido a pequeña escala y se analizó por restricción con las enzimas EcoRI y XbaI para corroborar la presencia del inserto, dando como resultado el plásmido pBlueScript-ermEp5349 (Figura 7c)

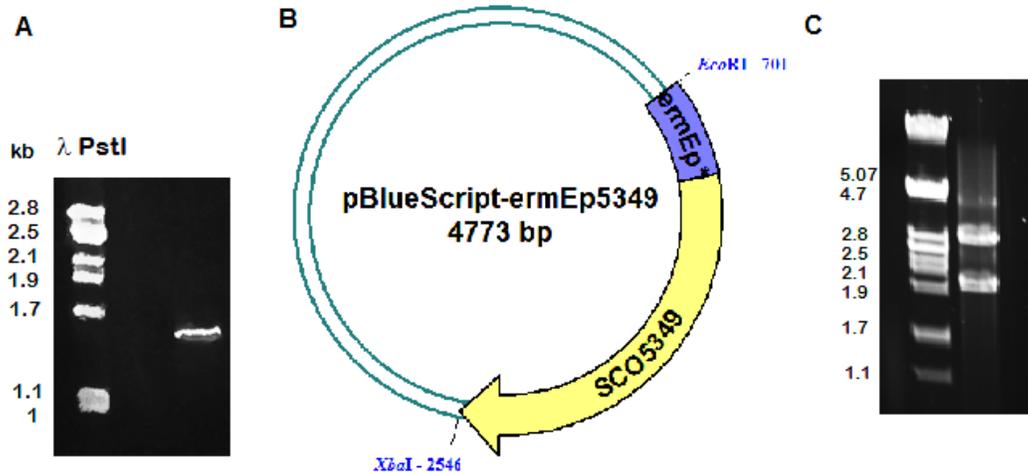


Figura 7. (A) Gen SCO5349 con sitios para las enzimas BglIII y XbaI con un tamaño de 1572 pb obtenido por PCR (B) Mapa del plásmido pBlueScript-ermEp5349 producto de la ligación del fragmento correspondiente al gen SCO5349 con el plásmido pBlueScript-ermEp (C) Gel de agarosa que muestra al plásmido pBlueScript-ermEp5349 digerido con las enzimas EcoRI y XbaI para corroborar la presencia del inserto (SCO5349) da unas bandas de 2928 pb (pBlueScript) y 1845 pb (ermEp-5349)

6.9.3 Obtención del plásmido pSET152 sin la integrasa ni sitio attP del fago ϕ C31

Se seleccionó el plásmido pSET152 para fungir como molde para la construcción de nuestro vector, buscando sustituir el gen de la integrasa y el sitio de *attachment* del fago ϕ C31 por el gen de la integrasa y sitio de *attachment* del AICE 5349. Por lo tanto, a partir la secuencia de pSET152 obtenida del genbank (ID AJ414670) se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 2), que permitieran amplificar desde un poco antes del inicio del gen *lacZ* hasta incluir el sitio único para la enzima SphI (Figura 8a).

Para facilitar la reacción de PCR, el plásmido se digirió parcialmente con la enzima HindIII, poniendo tubos para interrumpir la reacción a los 1, 2, 5, 15, 25, 45, 55 y 70 minutos, inactivando la enzima por calor (20 minutos a 80°C). Posteriormente se corrió un gel para observar a qué tiempo de incubación se obtenía el plásmido lineal (Figura 8b) (ya que HindIII corta en tres sitios, dos de ellos dentro del gen de la integrasa de ϕ C31), se seleccionó el tratamiento donde hubo mayor cantidad del mismo, para finalmente purificar el fragmento por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y utilizarlo como templado en la reacción de PCR que se realizó bajo un programa *touchdown*.

El producto lineal de la reacción de PCR (Figura 8c) se ligó para obtener una molécula circular, que se introdujo por electroporación en células de *E. coli* DH5a, mismas que se plaquearon en medio LB suplementado con apramicina (50mg/μL), X-gal (200mg/μL), e IPTG (0.1 mM) para comprobar que el gen *lacZ* fuese funcional, se seleccionaron transformantes para extraer el plásmido a pequeña escala y se digirió con la enzima *SphI* para corroborar que el tamaño coincidiera con el esperado, el producto fue el plásmido pSETΔINT (Figura 8c).

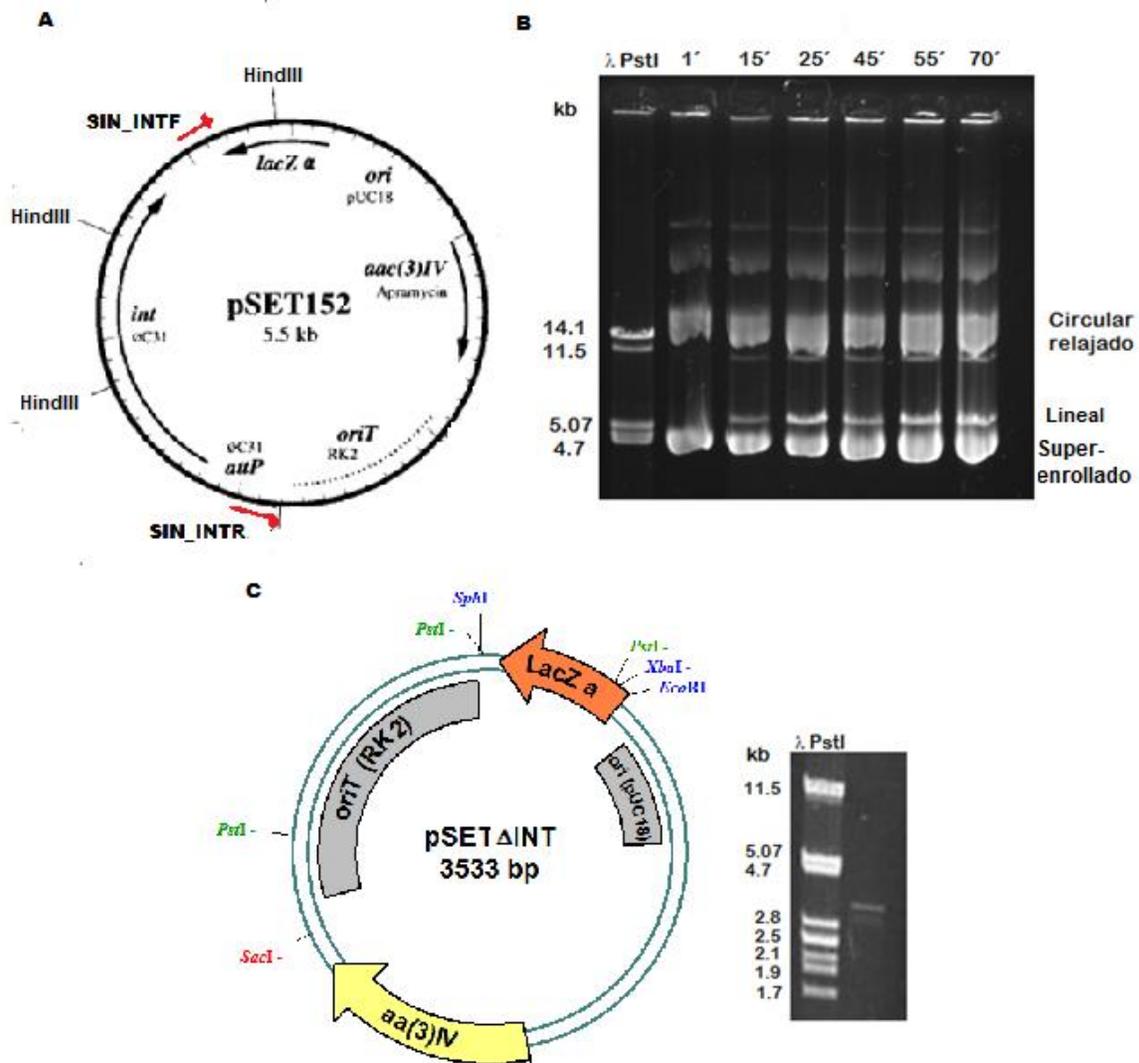


Figura 8. (A) Mapa del plasmido pSET152 en el que se indica la posición de los oligonucleótidos diseñados (flechas rojas) para la amplificación del mismo sin la integrasa ni sitio *attP* del fago φC31. También se indican los sitios para la enzima *HindIII*. (B) Digestión parcial del plásmido pSET152 con la enzima *HindIII* interrumpida a distintos tiempos de incubación para obtener el

plásmido lineal. (C) Mapa del plásmido pSET152 amplificado sin la integrasa ni sitio de *attachment* del fago ϕ C31 por una reacción de PCR dando como resultado un producto de 3533 pb.

6.9.4 Clonación del fragmento ermE-5349 en el plásmido pSET Δ INT

Los plásmidos pBlueScript-ermE5349 y pSET Δ INT fueron sometidos a una digestión doble con las enzimas EcoRI y XbaI, posteriormente los fragmentos correspondientes al gen de la integrasa con el promotor *ermEp** y al pSET Δ INT se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cuantificaron y se ligaron. El producto de la ligación se introdujo por electroporación en células de *E. coli* DH5a, mismas que se plaquearon en medio LB suplementado con apramicina (50mg/ μ L), X-gal (200mg/ μ L), e IPTG (0.1 mM) y se seleccionaron colonias blancas para corroborar la presencia del inserto mediante una lisis en gel de varias colonias (**ver protocolo #2**), finalmente, se seleccionó una colonia para realizarle una extracción de plásmido a mediana escala, el producto fue el plásmido pSET Δ INT-ermE5349.

6.9.5 Obtención del sitio de *attachment* del AICE5349

El sitio de *attachment* plasmídico (*attP*) correspondiente a la forma circular libre del elemento no se logró amplificar en los ensayos previamente descritos (ver apartado 7.9), por este motivo se partió de la secuencia del tRNA flanqueante del AICE5349 para obtener el *attB*. Se analizaron y alinearon las secuencias del tRNA (*attR*), pseudo tRNA (*attL*) y de la secuencia correspondiente al *attB* del AICE SLP1 (Lee et al, 1988) para observar cual era la secuencia más factible a utilizar. Se diseñaron oligonucleótidos con el sitio de restricción para la enzima SphI en ambos extremos (ver Tabla 2), para amplificar el tRNA (*attR*) abarcando éste y algunas bases contiguas. La reacción de PCR se llevó a cabo con DNA cromosómico de *S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra como templado, el producto fue un fragmento de 287 pb (Figura 9), mismo que se purificó por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

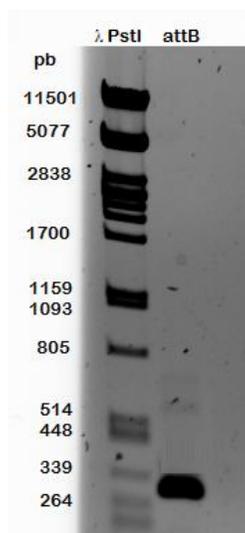


Figura 9. Fragmento de 287 pb que corresponde al sitio de *attachment* bacteriano del AICE5349 con sitios para la enzima SphI obtenido por PCR.

6.9.6 Clonación del *attB* del AICE5349 en el plásmido pSETΔINT-ermE5349

El plásmido pSETΔINT-ermE5349 y el fragmento correspondiente al *attB* fueron digeridos con la enzima SphI. El plásmido además, fue sometido a una reacción con fosfatasa alcalina para evitar que se ligara consigo mismo, posteriormente tanto el plásmido como el *attB* fueron purificados por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cuantificaron y se ligaron. El producto de la ligación se introdujo por electroporación en células competentes de *E. coli* DH5a, que se plaquearon en medio LB suplementado con apramicina (50 mg/mL), se seleccionaron transformantes para extraer el plásmido a pequeña escala y se corroboró la presencia del inserto mediante el patrón de restricción con la enzima PstI (Figura 10). Se obtuvieron los plásmidos pSETΔINT-ermE5349attB(1) y pSETΔINT-ermE5349attB(2) correspondientes a las dos orientaciones en la que el *attB* se insertó en el sitio SphI del plásmido.

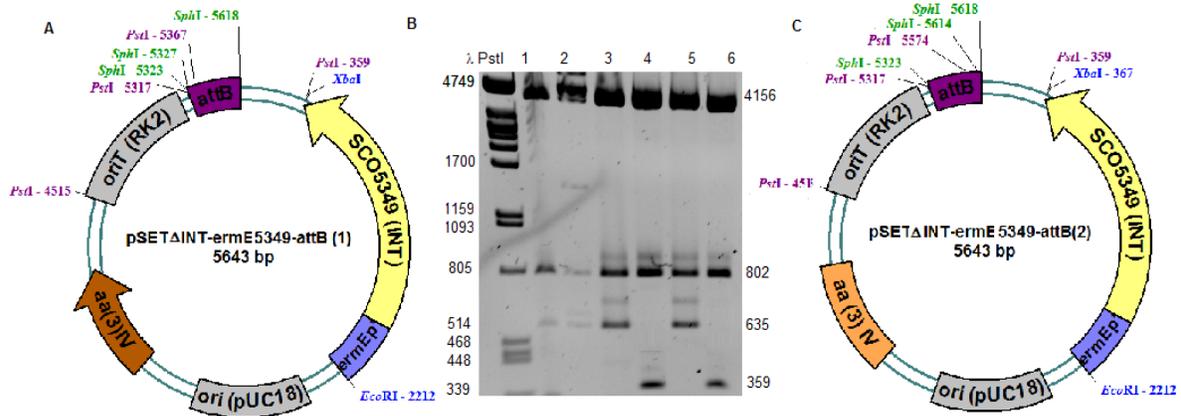


Figura 10. Mapas de los plásmidos (A) pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y (C) pSET Δ INT-ermE5349attB (2), producto de la clonación del sitio de *attB* en el plásmido pSET Δ INT-ermE5349 en su sitio único para la enzima *SphI*, y verificación mediante patrón de restricción con la enzima *PstI* (C). Cada carril corresponde a una miniprep realizada, se observa que los carriles 3 y 5 corresponden a una orientación pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y los carriles 4 y 6 a la otra orientación pSET Δ INT-ermE5349attB (2).

6.10 Ensayos de conjugación para observar la integración de los plásmidos pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y (2) en *S. lividans*

Los plásmidos pSET152, pSET Δ INT-ermE5349, pSET Δ INT-ermE5349attB(1) y pSET Δ INT-ermE5349attB(2) se introdujeron por electroporación en células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002, que se plaquearon en medio LB suplementado con apramicina (50mg/mL). Cada una de las cepas de *E. coli* obtenidas de la retransformación funcionaron como donadoras en un ensayo de conjugación con las cepas de *S. lividans* TK64 y TK54. El protocolo para llevar a cabo las conjugaciones fue el citado en Kieser *et al*, 2000 (**ver Protocolo #6**), sin embargo se le hizo una modificación al suplementar las cajas de MS con 60 mM de CaCl₂ en lugar de utilizar MgCl₂, ya que se había reportado que al hacer esto, la frecuencia de conjugación se aumentaba de 10 a 100 veces (Wang & Jin, 2014). También se repitieron los ensayos de conjugación utilizando 10mM de MgCl₂ como lo estipula el protocolo original.

7. Resultados y discusión

7.1 Ensayos de conjugación para cuantificar la transferencia intraespecífica e interespecífica del AICE5349

Los primeros AICEs caracterizados se identificaron mediante cruzas entre la cepa hospedera del elemento y otra que careciera del mismo (generalmente *S. lividans*), en dónde en la mayoría de los casos se podía encontrar el AICE en su forma libre replicativa, pero en otros sólo en su forma integrada.

Como primer acercamiento para probar la capacidad de transferencia conjugativa del AICE5349 se realizó una crusa con la cepa de *S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra como donadora. La cepa M145 es una cepa silvestre, que es el hospedero natural del AICE; para poder observar un fenotipo adquirido por la transferencia conjugativa, se marcó genéticamente al elemento, al sustituir el gen SCO5329, que no es esencial para sus funciones, por un cassette de resistencia para apramicina. La cepa TK64 de *S. lividans* fue la receptora, la cual tiene resistencia a estreptomycin y carece de los plásmidos SLP2 y SLP3 que se habían identificado como factores de fertilidad (Hopwood et al, 1983). Los ensayos de conjugación se realizaron con el método descrito anteriormente. La frecuencia de transferencia se calculó respecto al número de colonias de la cepa receptora y se obtuvieron los siguientes datos (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de transferencia del AICE5349 a partir de *S. coelicolor* hacia *S. lividans*

Donador <i>S. coelicolor</i>	u.f.c de <i>S. lividans</i> TK64	u.f.c de <i>S. lividans</i> TK64 transconjugantes	Frecuencia de transferencia del AICE5349 por receptora
M145 Δ SCO5329::apra 1	1.1 x 10 ⁵	188	1 x 10 ⁻³
M145 Δ SCO5329::apra 2	5.3 x 10 ⁴	57	1 x 10 ⁻³

u.f.c. unidades formadoras de colonias

Las células que se consideraron transconjugantes fueron aquellas que presentaron resistencia a ambos antibióticos (apramicina y estreptomycin), todas ellas eran *S. lividans* lo cual se evidenció al no producir agarasa y por su poca pigmentación en el medio de cultivo.

La frecuencia de transferencia fue de una entre mil colonias de la receptora, la cual es menor a la presentada por el elemento SLP1 que oscila entre 1.8 a 3.6 por cada 100, aunque cabe mencionar que en dicho estudio la frecuencia se calculó en función de la cepa donadora y fue contando el número de *pocks* en un tapete de la cepa receptora (Bibb et al, 1981). Este ensayo se realizó en otros AICEs caracterizados y se encontró que los elementos pIJ110 y pIJ408 mostraron una frecuencia de 10^{-2} a 10^{-5} y que pSAM2 mostró una de 99% en *S. lividans* (Hopwood et al, 1984; Simonet et al, 1987).

Tanto la frecuencia de transferencia como el rango de hospederos dependen de las maquinarias de replicación e integración del AICE, de tal forma que la replicación autónoma es un requisito para la transferencia conjugativa, como se demostró para pSAM2 (Smokvina et al, 1991). Por lo tanto, la comparación de la frecuencia de transferencia conjugativa del AICE5349 se realizó contra la de SLP1, ya que mediante un análisis filogenético se encontró que la integrasa SCO5349 pertenece a la subfamilia SLP1 de integrasas de tirosina en AICEs (Ghinet et al, 2011), aunque cabe mencionar que su proteína iniciadora de replicación pertenece a la subfamilia de pSAM2 (RepSA^{SAM2}).

La obtención de estos resultados nos mostró que la resistencia al antibiótico apramicina se transfirió de *S. coelicolor* hacia *S. lividans*, sin embargo, para tener una mejor evidencia que el AICE5349 efectivamente se transfirió, se realizaron los ensayos que se describirán en las secciones siguientes, tales ensayos dieron resultados positivos, lo cual nos llevó a realizar más ensayos de conjugación para observar si el AICE5349 se podía transferir de forma intraespecífica.

El siguiente ensayo de conjugación se realizó con dos cepas de *S. lividans* transconjugantes, producto del ensayo anterior, a las que se denominaron *S. lividans* TK64-AICE5349 (1) y TK64-AICE5349 (2) que fungieron como cepas donadoras y a la cepa de *S. lividans* TK54 como receptora (Tabla 7); en este ensayo se pudo observar un incremento de la frecuencia de transferencia, que aumentó en comparación con el ensayo anterior, aunque la frecuencia comparada con la presentada por el elemento SLP1 en un ensayo similar siguió siendo menor, ya que SLP1 presentó una frecuencia de 84 a 89 por cada 100 (Bibb et al, 1981).

Tabla 7. Transferencia del AICE5349 de forma intraespecífica en *S. lividans*

Donador <i>S. lividans</i>	u.f.c de <i>S. lividans</i> TK54	u.f.c de <i>S. lividans</i> TK54 con ambas resistencias (apra-spc)	Frecuencia de transferencia del AICE5349 por receptora
TK64	1.73 x 10 ⁸	7	4 x 10 ⁻⁹
TK64-AICE5349(1)	1.52 x 10 ⁸	5.7 x 10 ⁷	3.5 x 10 ⁻¹
TK64-AICE5349(2)	1.8 x 10 ⁸	5.1 x 10 ⁷	2.8 x 10 ⁻¹

u.f.c. unidades formadoras de colonias

Como se había mencionado en los antecedentes, la cepa IB21 de *S. coelicolor* es una mutante que carece del AICE5349. Para observar si podíamos reintroducirle el AICE, se utilizó como receptora en un ensayo de conjugación con las cepas M145ΔSCO5329::apra 1 y 2 como donadoras. En este ensayo se observó que la frecuencia de transferencia intraespecífica también aumentó como lo hizo al realizarse en la especie *S. lividans* (Tabla 8).

Tabla 8. Transferencia del AICE5349 en *S. coelicolor*

Donador <i>S. coelicolor</i>	u.f.c de <i>S. coelicolor</i> IB21-hyg	u.f.c de <i>S. coelicolor</i> con ambas resistencias (apra-hyg)	Frecuencia de transferencia del AICE5349 por receptora
M145ΔSCO5329::apra 1	7.9 x 10 ⁷	3.5 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁻¹
M145ΔSCO5329::apra 2	4 x 10 ⁸	2.6 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁻¹

u.f.c. unidades formadoras de colonias

Este ensayo de conjugación no se realizó para SLP1 ya que Bibb no contaba con una cepa de *S. coelicolor* que careciera del elemento. Lo que se intentó en dicho estudio fue transformar a *S. coelicolor* con las formas circulares de SLP1 obtenidas en *S. lividans*; en dichos ensayos se obtuvieron muy pocas transformantes, y al analizarlas fue posible observar que SLP1 siempre se encontraba en su forma integrada. Este hecho se atribuyó a que había incompatibilidad entre la copia de SLP1 que ya se encontraba integrada en el cromosoma de *S. coelicolor* y la copia introducida (Bibb et al, 1981). Sin embargo, este ensayo sí se realizó con pSAM2, en el que un derivado del mismo se introdujo por transformación a protoplastos de *S. ambifaciens* carentes del AICE; se observó que en el 80% de los casos el derivado de pSAM2 se encontraba en

forma libre y el 20% en su forma integrada. En dicho trabajo no se proporcionó la frecuencia exacta de transferencia, y solo se menciona que fue moderadamente alta (Possoz et al, 2001); otro AICE con el que se realizó este ensayo fue con pMEA100 de *Amycolatopsis mediterranei* y se obtuvo una frecuencia de transferencia de 20% por cepa receptora (Moretti et al, 1985). Esta frecuencia es muy similar a la observada para el AICE5349.

7.2 Detección de la forma integrada al cromosoma del AICE5349 por PCR

Al término del primer ensayo de conjugación (*S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra x *S. lividans* TK64) observamos que la resistencia a apramicina se había transferido de *S. coelicolor* a *S. lividans*. Sin embargo, esta evidencia genética no demostraba que se hubiera transferido todo el AICE5349 por conjugación y que estuviera integrado en el cromosoma. Para demostrar tanto su transferencia como su integración sitio específica en el cromosoma en la cepa receptora, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan los extremos del AICE y las zonas aledañas al mismo en el cromosoma de su hospedero, ya que dado el tamaño del mismo (21 kb) era difícil amplificarlo completo en una reacción de PCR.

Como se mencionó anteriormente se diseñaron los oligonucleótidos SCO100072, SCO5326 (ver Tabla 2), para amplificar el extremo izquierdo del AICE, así como la región cromosomal adyacente. La pareja TRNADEL1-SCO100072 en el cromosoma de *S. coelicolor* y la pareja SCO5326-SCO100072 en el cromosoma de *S. lividans*. Los productos de tales reacciones fueron 607 pb y 686 pb respectivamente (Figura 11).

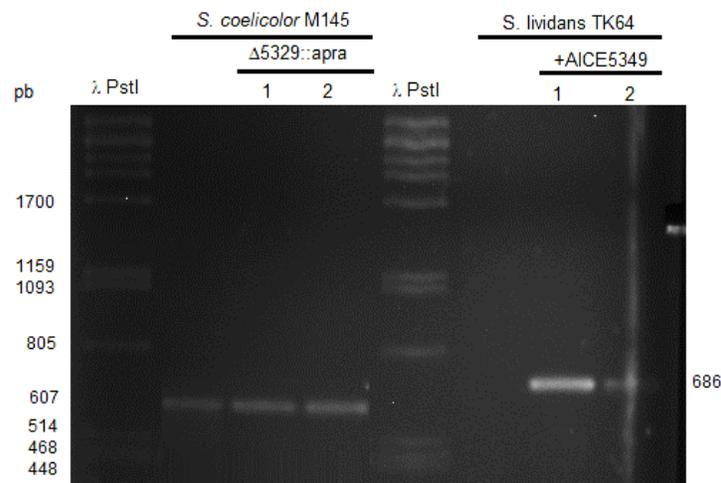


Figura 11. Detección del extremo izquierdo AICE5349 en el cromosoma de su hospedero *S. coelicolor*, tanto en la cepa silvestre como en las cepas en las que se marcó al AICE al sustituir al

gen SCO5329 por un cassette de resistencia a apramicina (izquierda). Detección en *S. lividans* TK64 silvestre (control negativo) y en dos de las cepas transconjugantes (derecha).

Para amplificar el extremo derecho del AICE5349 con la región cromosomal adyacente, se utilizó la pareja de oligonucleótidos TRNA_DEL2-SCO100073 tanto para *S. coelicolor* como para *S. lividans* dando un producto de 456 pb (Figura 12).

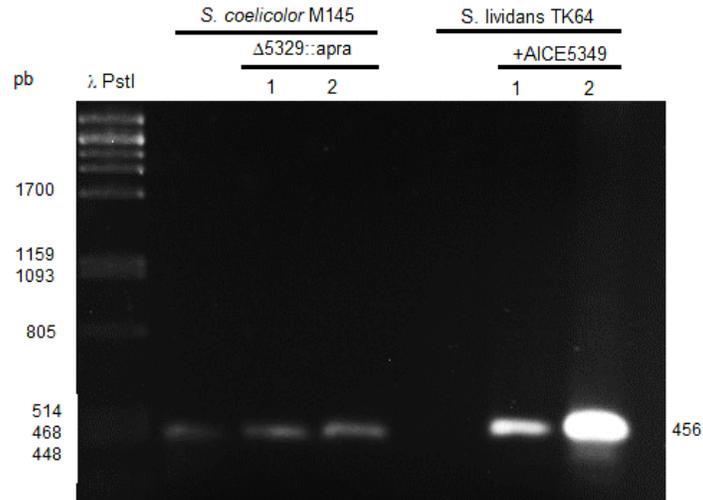


Figura 12. Detección del extremo derecho AICE5349 en los cromosomas *S. coelicolor* como control positivo, tanto en la cepa silvestre como en las que se encuentra marcado el elemento (izquierda) y en *S. lividans* TK64, tanto en la cepa silvestre como control negativo, como en las cepas transconjugantes (derecha).

Con este ensayo se confirmó que el AICE5349 puede transferirse de forma conjugativa de *S. coelicolor* a *S. lividans* y que al suceder este evento, el AICE se inserta sitio-específicamente en el locus que le corresponde en *S. lividans* según la sintenia que guarda con *S. coelicolor*.

7.2.1 Detección de la forma libre del AICE5349

Con el fin de detectar si el AICE5349 se encontraba también en forma libre en las cepas de *S. lividans* transconjugantes, el primer ensayo que se realizó fue una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos SCO_100072 y SCO_100073 que, simulando la forma circular amplificarían la región correspondiente al *attP*; el templado fue una preparación de DNA total de las cepas transconjugantes de *S. lividans*, sin embargo, no se obtuvo ningún producto al realizar las reacciones. Posteriormente se diseñó otro par de oligonucleótidos (AICE_R y AICE_F) con el mismo propósito y el templado fue una preparación de DNA total de las cepas

transconjugantes de *S. lividans*, extraído de micelio vegetativo, estadio en el cual probablemente habría una mayor cantidad de moléculas libres del AICE. Se realizaron las reacciones de PCR tanto con un programa convencional como con uno de tipo *touchdown*, pero en ninguno de los dos casos se logró obtener un producto de amplificación. Una posibilidad para explicar lo anterior es que la forma circular del AICE5349 tenga un tiempo de vida muy corto y que en poco tiempo se integre en el cromosoma de su hospedero y/o que sea de muy bajo número de copias como se ha observado en otros AICEs.

Para algunos AICEs caracterizados, sólo el estado integrado se ha encontrado en el hospedero original y el estado libre se observa después de la conjugación con una cepa libre del AICE, tal es el caso de SLP1 (Bibb et al 1981), pIJ110, pIJ408 (Hopwood et al, 1984), pMEA100 (Moretti et al 1985) y pSAM2 (Pernodet et al 1984). Sin embargo en otros AICEs sí se ha observado la presencia concomitante de la forma circular y de la forma integrada, ya que el ensayo que se realizó para detectarlos fue mediante extracción de DNA y búsqueda de plásmidos. Los AICEs que entran en esta categoría son pMEA100 para el cual hay 0.5 copias libres por cromosoma, pSE101 para el cual hay 1 copia libre por cada 10 cromosomas y pSAM2 que en su forma libre se encontraron de 5-10 copias por cromosoma. Como se puede observar el número de copias de la forma circular es muy baja en su hospedero original, lo que nos indica que la replicación no es indispensable para el mantenimiento del elemento ya que se encuentra integrado en el hospedero. Podemos notar que el número de copias por cromosoma del estado libre de pSAM2 es mayor; la razón es que pSAM2 se detectó en dos cepas de *S. ambofaciens*, en la cepa B2 sólo se encontraba en su forma integrada y en la cepa B3 se encontraba tanto en su forma integrada como en la forma libre, posteriormente se descubrió que en la cepa B3 pSAM2 se encontraba en un estado desregulado en el que por una mutación puntual, el promotor de *pra* se había vuelto un promotor fuerte, y en consecuencia *pra* se expresaba en un nivel alto promoviendo a su vez la expresión del operón compuesto por *int*, *xis* y *repSA* (Sezonov et al, 1995).

Puede ser que no se haya podido encontrar la forma libre del AICE5349 en las cepas transconjugantes de *S. lividans* debido a que el AICE no sufrió ningún tipo de mutación que involucrara un cambio en sus funciones de integración, escisión o replicación como sucedió

para pSAM2 en la cepa receptora, también cabe mencionar que se analizó un número pequeño de transconjugantes para detectar la presencia de la forma circular del AICE5349.

7.3 Ensayo de incompatibilidad entre el producto del gen SCO5330 con la actividad de la metiltransferasa de DNA M.SphI.

Como se mencionó en los antecedentes tanto el producto del gen SCO5330 como el del gen SCO5333 son nucleasas metil-específicas del complejo sistema de restricción tipo IV de *S. coelicolor*. Ambos genes se encuentran comprendidos dentro del AICE5349. Estudios previos mostraron que el producto del gen SCO5330 es incompatible con la actividad de la metilasa Dam de *E. coli* y de la metilasa M. SphI de *S. phaeochromogenes* (Cadena-Sandoval, 2014), ya que al clonar los genes de las metilasas en cepas con el gen SCO5330 integrado en su cromosoma, se causaba la muerte celular de dichas cepas, porque la nucleasa (SCO5330) estaba cortando el DNA de las células que se encontraba metilado por la acción de las metilasas introducidas.

El propósito de este ensayo fue observar si el producto del gen SCO5330 comprendido en el AICE349, se había heredado y se expresaba de manera correcta tanto en su hospedero original (*S. coelicolor*) como en las cepas de *S. lividans* transconjugantes que adquirieron el AICE5349, indicando que el AICE puede transmitir el fenotipo que alberga e indirectamente que está siendo transferido en forma completa a las cepas receptoras.

El gen de la metiltransferasa M. SphI contenido en el plásmido integrativo pB404 se introdujo por conjugación en las cepas de *S. coelicolor* M145 (en la que se marcó el AICE5349) como control positivo, en la cepa IB21 de *S. coelicolor* (que carece del AICE5349), en la cepa TK64 de *S. lividans* como control negativo y en las cepas transconjugantes de *S. lividans* TK64 para probar si adquirieron el gen de la nucleasa-metil específica por la integración del AICE5349 (Figura 13).

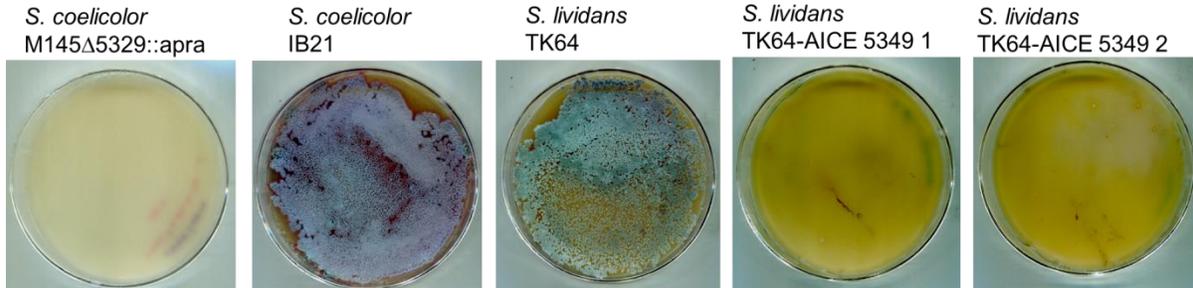


Figura 13. Incompatibilidad de la metiltransferasa M. SphI con el producto del gen SCO5330 presente en el AICE5349. De izquierda a derecha, *S.coelicolor* M145 como control positivo, por ser el hospedero original del AICE hay muerte celular por la actividad de la nucleasa SCO5330 sobre el cromosoma metilado, *S. coelicolor* IB21 y *S. lividans* TK64 carecen del AICE por lo tanto la introducción de la metilasa no afecta en su crecimiento, finalmente las cepas de *S. lividans* que adquirieron el AICE5349 por conjugación muestran el mismo fenotipo que *S. coelicolor* M145, en el que hay muerte celular por la incompatibilidad entre la nucleasa y la metilasa.

Los ICEs que acarrean genes de sistemas de restricción-modificación son escasos, algunos ejemplos son los ICEs de la familia SXT-R391, ICEV*sp*-Por3 e ICEValSpaI que se aislaron de bacterias del género *Vibrio* aisladas de órganos de peces, estos ICEs contienen dentro de sus regiones variables tanto el gen de restricción, como el de modificación (metilación) de sistemas R-M tipo II, y se comprobó que dichos genes son funcionales en un ensayo en el que *E. coli* con estos genes se volvió resistente a la infección de fagos ambientales extraídos de agua de río y al fago T1 (Balado et al, 2012). En este caso la presencia de los genes del sistema R-M representan una ventaja adaptativa para sus hospederos.

En AICEs identificados, los genes de sistemas R-M son aún más escasos, el único gen caracterizado como tal es el SCO4631 que se encuentra en el extremo de SLP1 y es una de las nucleasas metil-específicas del complejo sistema tipo IV de *S. coelicolor*. La funcionalidad de este gen fue probada independientemente de SLP1 y mostró actividad de restricción sobre DNA modificado por la metilasa Dcm de *E. coli* (González-Cerón et al, 2009). Estudios posteriores mostraron que además presentaba actividad de restricción sobre DNA modificado con azufre (fosforotioación), modificación de la que es responsable el cluster de genes *dndA-E* presente en *S. lividans*. Por lo tanto cuando se lograba clonar dicho gen en *S. lividans* se perdía el cluster *dndA-E* porque la actividad de ambos era incompatible (Liu et al, 2010); de manera inversa, al clonar el cluster *dndA-E* en *S. coelicolor* se obtenían pocas transformantes y al mapearse se observó que habían perdido SLP1 de manera íntegra (tal como sucedió cuando se intentó clonar

el gen de la metilasa M.SphI en *S. coelicolor* que provocó la pérdida del AICE5349 (González-Cerón, datos no publicados)). Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron con el gen SCO4631 independiente de SLP1. En los trabajos en los que Bibb et al (1981) descubrieron a SLP1 y su transferencia conjugativa a *S. lividans*, los fragmentos de SLP1 que se transfirieron oscilaban de las 9.37 a 12.96 kb (su tamaño original es de 17.3 kb), lo que nos indica que probablemente la región del gen *sco4631* no se transfirió por la incompatibilidad del cluster *ndnA-E* presente en *S. lividans*. Sin embargo, en 1984 Omer & Cohen observaron que ocasionalmente la secuencia entera de SLP1 se integra en el cromosoma de *S. lividans*, aunque no se sabe si esto conllevó a una mutación del gen SCO4631 o a la pérdida del cluster *ndnA-E* en *S. lividans*. Si SLP1 se transfiriera a un hospedero sin el cluster *ndnA-E* con el que es incompatible, es probable que también incluya al gen SCO4631 y este se exprese correctamente, tal como lo hizo el gen SCO5330 transferido por el AICE5349 en el ensayo descrito en este apartado.

7.4 Ensayo de formación de *pocks*

Durante la transferencia conjugativa tanto de AICEs como de plásmidos de *Streptomyces* se da una inhibición temporal del crecimiento de la cepa receptora, produciendo zonas en la que la esporulación se retrasa a las que se les denomina *pocks*. La observación de estas zonas de crecimiento retardado es un carácter muy útil en el estudio e identificación de plásmidos en *Streptomyces* (Bibb et al, 1981), ya que casi la totalidad de éstos son crípticos. Se presume que este retraso de crecimiento está asociado a los genes *kil* (*tra*) y su función es la diseminación del plásmido o AICE a lo largo del micelio de la cepa receptora. Otros genes responsables de este fenómeno son el cluster de genes *spdA-D*. Por lo tanto, al realizar este ensayo también se está probando la funcionalidad de estos genes.

Se plaqueó 10^5 esporas de la cepa receptora junto con diluciones altas de la cepa donadora en medio R5, se incubaron durante 3 días y se tomaron fotografías cuando los *pocks* ya eran visibles, posteriormente se tomaron fotos a los 5 días en los que la caja se encontraba esporulada y finalmente se realizó una réplica de la caja en medio selectivo con los antibióticos para seleccionar a las transconjugantes (Figura 14). También se plaqueó solamente a la cepa receptora como un control negativo.

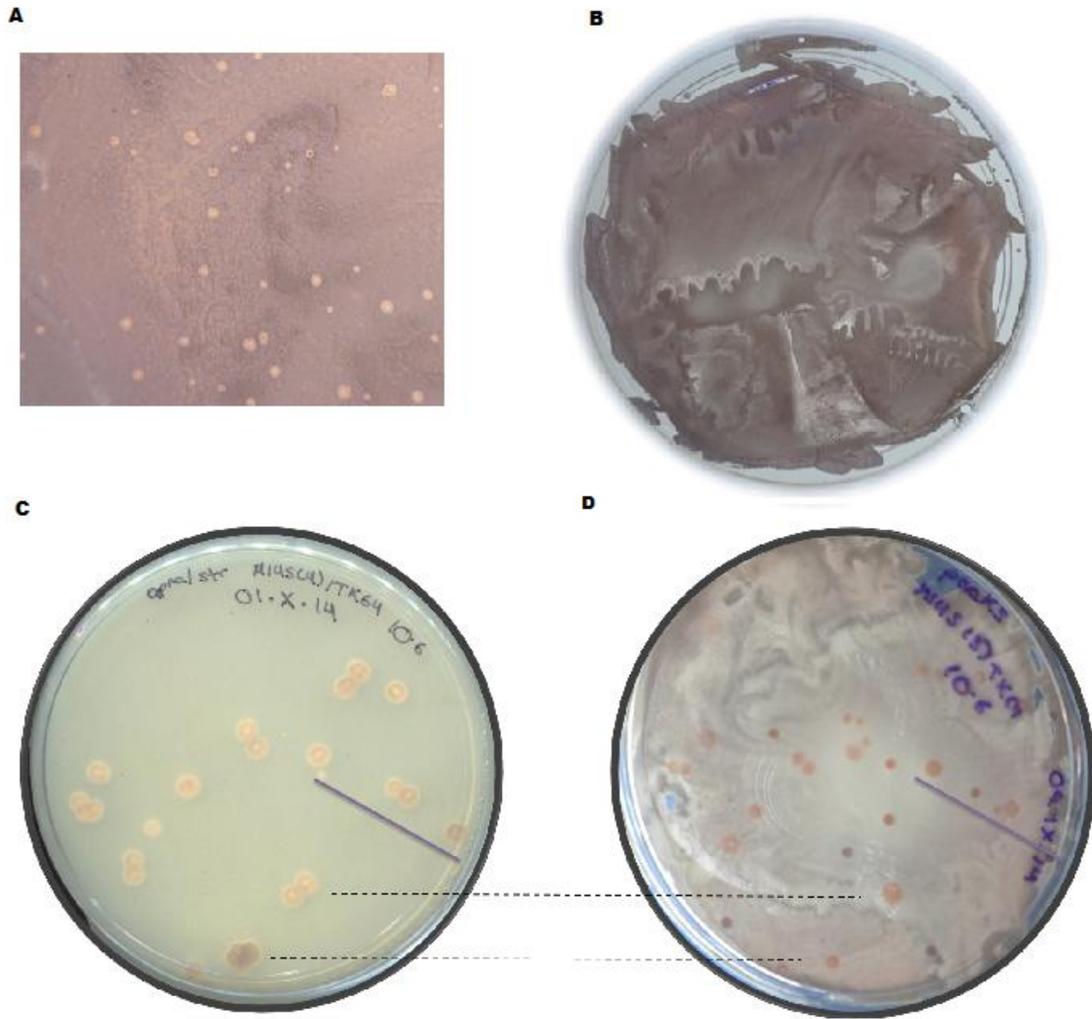


Figura 14. Ensayo de formación de *pocks*. (A) Los *pocks* lucen como pequeñas zonas circulares en la que se inhibe el crecimiento por la transferencia conjugativa de un plasmido o AICE a una cepa carente de éste. (B) Tapete confluyente de *S. lividans* TK64 como control negativo, en el que no se observan los *pocks*. (C) Réplica de los *pocks* en una caja con antibióticos para seleccionar a las colonias transconjugantes (D) Vista trasera de los *pocks* cuando la caja ya se encontraba esporulada.

Los *pocks* fueron visibles a partir de la dilución 10^{-3} de cepa donadora (*S. coelicolor* M145 Δ SCO5329::apra), sin embargo los *pocks* se encontraban muy juntos unos de otros, y la réplica de los mismos se realizó en las cajas con la dilución 10^{-6} con ayuda de terciopelo. A partir de este ensayo observamos que el AICE5349 es capaz de formar *pocks* al ser transferido de forma conjugativa de *S. coelicolor* a *S. lividans* tal como sucede con otros AICEs.

7.5 Ensayos de conjugación para observar la integración de los plásmidos pSET Δ INT-ermE5349attB (1) y (2) en *S.lividans*

Como se menciona en Materiales y Métodos se construyó un vector para observar la actividad de recombinación sitio-específica de la integrasa SCO5349 fuera del contexto del AICE al construir un plásmido integrativo, utilizando el cromosoma de *S. lividans* como blanco de integración; con este propósito se sustituyeron el gen de la integrasa y el sitio *attP* del fago ϕ C31 del plásmido pSET152 por el gen de la integrasa SCO5349 bajo el promotor fuerte constitutivo *ermEp** y por el sitio *attB* del AICE5349.

Se obtuvieron dos plásmidos con tales características (pSET Δ INT-ermE5349attB(1) y pSET Δ INT-ermE5349attB(2)), ya que el sitio *attB* se clonó con extremos romos en un sitio para SphI y quedó en dos orientaciones. Para poder determinar si estos plásmidos eran funcionales y podían integrarse en *Streptomyces*, el primer paso fue introducirlos por electroporación a la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002, así como con el plásmido pSET152 como control positivo y con el plásmido pSET152 Δ INT como control negativo. Se realizaron los ensayos de conjugación tomando como donadora a la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con los plásmidos antes mencionados y como cepa receptora a *S. lividans* TK64. Después de 16 a 20 hrs de incubación se agregó 1 mL de H₂O con ácido nalidíxico y apramicina para seleccionar a las transconjugantes.

En el único tratamiento en el que se observó el evento de integración fue en el plásmido control, es decir, con el plásmido pSET152 con una frecuencia de 9.8×10^{-1} . La razón por la que los plásmidos pSET Δ INT-ermE5349attB(1) y pSET Δ INT-ermE5349attB(2) no mostraron actividad de integración pudo haber sido porque el fragmento correspondiente al sitio de *attB* fue insuficiente para promover la actividad de recombinación de la integrasa; para amplificar el sitio de *attB* se utilizó el artículo de Lee et al, 1988 como referencia, que indica el sitio de *attachment* mínimo para el elemento SLP1 es de 112 pb ya que la integrasa del AICE5349 pertenece a la subfamilia de integrasas SLP1 (Ghinet et al., 2011), sin embargo, para el elemento pSAM2 se indica que el sitio de *attachment* mínimo es de 390 pb ya que la integrasa de este elemento reconoce los brazos flanqueantes al sitio *core* donde se da el evento de recombinación.

La expresión heteróloga de integrasas de AICEs caracterizados ya se había reportado para elementos como pSE211, pSAM2 y PAISt. En el caso de pSE211 y pSAM2, la expresión de sus respectivas integrasas se realizó en *E. coli* y el procedimiento fue clonar la integrasa y sitio *attP* en un plásmido multicopia y el sitio *attB* en otro plásmido, ambos plásmidos se introdujeron a células de *E. coli* y se buscaron cointegrados que indicaron la actividad de recombinación (integración) de las integrasas (Katz et al., 1991; Raynal et al., 1998). En el caso de PAISt la expresión heteróloga de su integrasa se realizó en *S. coelicolor*, ya que estudios previos confirmaron que era un hospedero adecuado para la movilización del AICE, por lo tanto, clonaron la integrasa (INTSt) bajo un promotor fuerte y a la región *downstream* a ésta (en donde se encontraba la secuencia palindrómica de 8 pb que fungió como *attP*) en un vector integrativo derivado del fago ϕ BT1 carente de la integrasa y sitio *attP* del fago, para que fuera un vector replicativo en *E. coli* y pudiera movilizarse de esta especie hacia *S. coelicolor*. En estos ensayos realizados por Huguet-Tapia et al, 2014, obtuvieron una frecuencia de integración de 6.4×10^{-7} con respecto al total de colonias de cepa receptora, lo cual confirmó la actividad de integración de INTSt.

8. Conclusiones

- ❖ El AICE5349 es un elemento funcional capaz de transferirse por conjugación y de integrarse de forma sitio-específica en el cromosoma de una cepa receptora, tanto en ensayos de conjugación de tipo interespecífica como intraespecífica.
- ❖ Los genes *spread* (*spd*) presentes en el elemento son funcionales ya que se logró observar los “*pocks*” (fenotipo del que son responsables).
- ❖ El AICE5349 es capaz de proveer de nuevas funciones a su hospedero, en este caso, restricción a DNA metilado.

9. Perspectivas

- ❖ Encontrar las condiciones experimentales para detectar la forma circular del AICE5349, las cuales pudieran ser extracciones de plásmido a gran escala suponiendo un bajo número de copias del elemento.
- ❖ Implementar extracciones de plásmido a distintos tiempos después de la conjugación a partir de micelio vegetativo, tal como se hizo con el elemento pSAM2. Con estos ensayos se podría obtener el sitio de *attachment* plasmídico y repetir el ensayo de construcción de un vector para confirmar la actividad de integración de la integrasa.
- ❖ Amplificar una región más amplia para utilizar como *attP* ya que el segmento que utilizamos fue insuficiente para facilitar la integración del plásmido.

10. Bibliografía

1. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J & Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8: 251–259
2. Balado M, Lemos ML, Osorio CR. 2012. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction-modification systems that confer resistance to bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 457–467
3. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147
4. Bibb MJ, Freeman RF, Hopwood DA. 1977. Physical and genetic characterization of a second sex factor, SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* 154:155–166
5. Bibb MJ, Ward JM, Kieser T, Cohen SN & Hopwood DA. 1981. Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* 184: 230-240.
6. Bibb, M. J., and Cohen, S. N. (1982). Gene expression in *Streptomyces*: Construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 187, 265-277.
7. Bierman, M., Logan, R., Obrien, K., Seno, E. T., Rao, R. N. & Schonher, B. E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116, 43–49
8. Bordeleau E, Ghinet MG, Burrus V. 2012. Diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria: Coexistence of two mechanistically different DNA-translocation systems. *Mob Genet Elements*;2(2):119–24
9. Brasch MA, Cohen SN. 1993. Excisive recombination of the SLP1 element in *Streptomyces lividans* is mediated by Int and enhanced by Xis. *J Bacteriol* 175:3075–3082
10. Burrus V, Marrero J, Waldor MK. 2006. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55:173–183.
11. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B & Guedon G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46: 601-610.
12. Burrus V & Waldor MK. 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155: 376-386.
13. 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.
14. Chen C, Huang C, Lee H, Tsai H & Kirby R. 2002. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends in genetics* 18: 522–529

15. Eckhardt T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584–588. doi:10.1016/0147-619X(78)90016-1
16. Espitia C., Servín-González L. and R. Mancilla. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Mol. BioSyst.*, 6, 775–781
17. Flårdh K & Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* Jan;7(1):36-49.
18. Fogg, P. C., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M. & Smith, M. C. 2014. New applications for phage integrases. *J. Mol. Biol.* 426, 2703–2716, doi: 10.1016/j.jmb.2014.05.014
19. González-Cerón G, Miranda-Olivares OJ, Servín-González L. 2009. Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol Lett.* 301(1): 35-43.
20. Ghinet M. G., Bordeleau E., Beaudin J., Brzezinski R., Roy S., Burrus V. 2011. Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in Actinobacteria. *PLoS ONE* 6:e27846. 10.1371/journal.pone.0027846
21. Grant S.G. Jessee J., Bloom F.R. and Hannan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol 87, p.4645-4649
22. Gregory MA, Till R, Smith . 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phi BT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol* 185: 5320–5323 doi:10.1128/JB.185.17.5320-5323
23. Gust B, Kieser T, Chater K.F. 2002. PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, United Kingdom
24. Hagege J, Pernodet JL, Friedmann A, Guerineau M. 1993. Model and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Microbiol* 10:799–812
25. Hagege JM, Brasch MA, Cohen SN. 1999. Regulation of transfer functions by the imp locus of the *Streptomyces coelicolor* plasmidogenic element SLP1. *J Bacteriol* 181:5976–5983
26. Hochhut, B. & Waldor, M. K. 1999. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into prfC. *Mol. Microbiol.* 32, 99–110
27. Hopwood DA. 2007. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford University Press; New York
28. Hopwood DA, Hintermann G, Kieser T, Wright HM. 1984. Integrated DNA sequences in three *Streptomyces* form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid* 11:1-16
29. Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M. and Bibb, M.J. 1983. Plasmids, Recombination and Chromosome Mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology*, 129, 2257-2269
30. Hopwood, D. A. & Wright. H. M. 1978. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and General Genetics* 162, 307-3 17.

31. Huguet-Tapia, J. C., Brignell, R. D., Loria R. 2014. Characterization of the Integration and Modular Excision of the Integrative Conjugative Element PAISt in *Streptomyces turgidiscabies* Car8. *PLoS ONE* 9(6): e99345. doi:10.1371/journal.pone.0099345
32. Jayapal KP, Lian W, Glod F, Sherman DH, Hu WS. 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics*. 8:229.
33. Kaimer C, González-Pastor JE, Graumann PL. 2009. SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74:810-25; PMID: 19818024;06894.x
34. Katz, L., Brown, D.P., Donadio, S. 1991. Site-specific recombination in *Escherichia coli* between the att sites of plasmid pSE211 from *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 227: 155–159.
35. Khan SA. 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53:126–136
36. Kieser T, Bibb M, et al. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John INNES Foundation, Norwich U. K
37. Korbie DJ, Mattick JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*. 3:1452–1456.
38. Lee SC, Omer CA, Brasch MA, Cohen SN. 1998. Analysis of recombination occurring at SLP1 att sites. *J Bacteriol*; 170:5806–5813
39. Liu,G., Ou,H.Y., Wang,T., Li,L., Tan,H., Zhou,X., Rajakumar,K., Deng,Z. and He,X.. 2010. Cleavage of phosphorothioated DNA and methylated DNA by the type IV restriction endonuclease ScoMcrA. *PLoS Genet.*, 6, e1001253.
40. MacNeil DJ, Gewain KM, Occi JL, Foor F. 1992. Vectors for generating nested deletions and facilitating subcloning G+C-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. *Gene*. 119(1):149-50.
41. Mazodier P, Thompson C, Bocard F. 1990. The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol. Gen. Genet*. 222:431–434
42. Moretti P, Hintermann G, Hutter R. 1985. Isolation and characterization of an extrachromosomal element from *Nocardia mediterranei*. *Plasmid* 14:126–133
43. Omer CA and Cohen SN. 1984. Plasmid formation in *Streptomyces*: excision and integration of the SLP1 replicon at a specific chromosomal site. *Mol Gen Genet* 196: 429–438.
44. Pernodet, J.-L., J.-M. Simonet, and M. Guerineau. 1984. Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol. Gen. Genet*. 198:35–41.
45. te Poele, E. M., Bolhuis, H. & Dijkhuizen, L. 2008. Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 127–143

46. te Poele EM, Kloosterman H, Hessels GI, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2006. RepAM of the *Amycolatopsis methanolica* integrative element pMEA300 belongs to a novel class of replication initiator proteins. *Microbiology* 152:2943–2950
47. Possoz C, Ribard C, Gagnat J, Pernodet JL, Guerineau M. 2001. The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol Microbiol* 42:159–166
48. Raynal, A., Tuphile, K., Gerbaud, C., Luther, T., Guerineau, M. & Pernodet, J. L. 1998. Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: functional analysis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28, 333±342.
49. Redenbach M. *et al.* 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21, 77–96.
50. Reuther J, Gekeler C, Tiffert Y, Wohlleben W & Muth G. 2006. Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol Microbiol* 61: 436–446.
51. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd Edition.
52. Servin-Gonzalez L, Sampieri AI, Cabello J, Galvan L, Juarez V & Castro C. 1995. Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology* 141: 2499–2510.
53. Sezonov, G., J. Hagege, J.-L. Pernodet, A. Friedmann, and M. Guerineau. 1995. Characterization of *pra*, a gene for replication control in pSAM2, the integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol.* 17:533–544.
54. Sezonov G, Possoz C, Friedmann A, Pernodet JL, Guerineau M. 2000. KorSA from the *Streptomyces integrative* element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. *J Bacteriol* 182:1243–1250
55. Simonet J.M, Boccard F, Pernodet JL, Gagnat J. Guerineau M. 1987. Excision and integration of a self-transmissible replicon in *Streptomyces ambofaciens*. *Gene* 59:137-144
56. Smokvina T, Mazodier P, Boccard F, Thompson CJ, Guérineau M. 1990. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94:53–9
57. Smokvina T, Boccard F, Pernodet J-L, Friedmann A, Guerineau M. 1991. Functional analysis of the *Streptomyces ambofaciens* element pSAM2. *Plasmid* 25:40–52
58. Thoma L, Muth G 2012. Conjugal DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough? *FEMS Microbiol Lett* 337:81–88. doi:10.1111/1574-6968.12031
59. Toussaint A & Merlin C. 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* 47: 26-35.
60. Vogelmann J, Ammelburg M, Finger C *et al.* 2011. Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J* 30: 2246–2254.

61. Vogtli M, Cohen SN. 1992. The chromosomal integration site for the *Streptomyces* plasmid SLP1 is a functional tRNA(Tyr) gene essential for cell viability. *Mol. Microbiol.* 6:3041–3050.
62. Vrijbloed JW, Jelinkova M, Hessels GI, Dijkhuizen L. 1995. Identification of the minimal replicon of plasmid pMEA300 of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Mol Microbiol* 18:21–31
63. Wan XK, & Jin JL. 2014. Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains, *FEMS Microbiol Lett* Aug;357(1):99-103. doi: 10.1111/1574-6968.12507.
64. Wozniak RA, Waldor MK.2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 8(8):552–63. Epub 2010/07/06. doi:10.1038/nrmicro2382

ANEXO. Protocolos y medios de cultivo empleados en este trabajo

#1 Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala (Miniprep) (Sambrook & Russell, 2001; modificado por Servín-González)

1. Tomar 1.5mL de un cultivo de toda la noche y pasar a un tubo eppendorf estéril, centrifugar 5 minutos a 6000 rpm.
2. Resuspender el paquete de células o el micelio en 200 μ L de Tris 25 mM, EDTA 25mM pH 8. Para *Streptomyces* el TE debe contener lisozima 2mg/mL.
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para *E. coli*. Para *Streptomyces* incubar a 37°C hasta que el micelio se vea translúcido y viscoso.
4. Agregar 400 μ L de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta ver transparente y muy viscoso. Incubar por 10 minutos.
5. Agregar 300 μ L de acetato de potasio 3M pH 4.8 y mezclar bien hasta perder la viscosidad y ver un precipitado blanco. Incubar por 15 minutos.
6. En el caso de *Streptomyces* centrifugar por 5 minutos a 13200 rpm y pasar el sobrenadante a otro tubo. Agregar 400 μ L de fenol/cloroformo. Para *E. coli* agregar directamente el fenol/cloroformo. Agitar en vórtex y centrifugar 3 minutos a 13200 rpm.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitar por 5 minutos.
8. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Retirar todo el sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 μ L de TE (10mM de Tris, 10mM de EDTA, pH 8). Después, agregar 150 μ L de acetato de sodio 4M pH 6. Mezclar y dejar incubando por al menos una hora a -20°C.
9. Centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm. Tomar el sobrenadante y pasar a un tubo limpio. Añadir 200 μ L de isopropanol y dejar precipitando por 10 minutos.

10. Centrifugar durante 10 minutos a 13200 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 45µL de TE 10mM. Agregar 5µL de acetato de sodio 3M pH 6 y 125µL de etanol absoluto frío. Precipitar por 10 minutos.
11. Centrifugar por 10 minutos a 13200 rpm, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 25µL de TE 10mM.

#2 Lisis de células en gel para identificación de plásmidos para *E. coli* (Eckhardt, 1978)

1. Replicar con palillos estériles colonias de la transformación a cajas de Petri con medio LB con el antibiótico apropiado, utilizando una plantilla de 20 cuadros (aprox. 1 cm² por cuadro). Replicar una colonia que contenga el vector vacío, la cual servirá de control. Numerar las réplicas del 1 al 20, usando la posición 1 para el control.
2. Añadir 15 µl de solución I a 20 pozos de una placa de microtitulación. Transferir con palillos estériles una buena cantidad de células a cada pozo, en forma ordenada, cuidando que las células se dispersen en el buffer.
3. Añadir 15 µl de solución II a cada pozo, mezclar bien subiendo y bajando un par de veces con la micropipeta e inmediatamente cargar 15 µl en el pozo de un gel de agarosa con 20 carriles. Procesar y cargar cada muestra antes de pasar a la siguiente.
4. Añadir a cada pozo una capa superior consistente en 10 µl de solución III.
5. Esperar 15 minutos y después aplicar bajo voltaje (50 volts) por 30 minutos. Posteriormente subir el voltaje a 100 volts hasta que el colorante llegue a la parte inferior del gel.
6. Teñir con bromuro de etilido y observar en el transiluminador.

Soluciones:

Solución I: Tris 25 mM pH 8.0, sacarosa 25%, EDTA 0.25M.

Solución II: Disolver lisozima en la solución I a una concentración final de 0.1 mg/ml y RNAsa a una concentración final de 0.1 mg/ml (esta solución debe ser fresca y no se puede guardar)

Solución III: Mezclar en un tubo Eppendorf 90 µl de agua estéril, 60 µl de buffer de carga para DNA 5X y 150 µl de SDS al 10%

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

1. Preparar un gel al 0.6% de agarosa de bajo punto de fusión con TBE 1X. Se deja gelificar a 4°C por 30 minutos.
2. Correr el gel a un voltaje constante de 11 V durante toda la noche.
3. Al siguiente día, teñir con bromuro de etidio (10µg/mL). Cortar la banda usando la lámpara UV de baja intensidad. Y pasar un tubo nuevo.
4. Fundir a 70°C por 10 minutos.
5. Agregar 1/10 del volumen de NaCl 5M, mezclar y dejar otros 5 minutos a 70°C.
6. Preparar fenol saturado mezclando 100µL de NaCl 5M, 400µL de agua y 500µL de fenol, se vortexea y centrifuga 1 minuto a 13200 rpm. Retirar la fase acuosa. Agregar el fenol saturado a la agarosa fundida, 2/3 de su volumen. Mezclar con ayuda del vórtex y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo. Posteriormente, agregar 1 volumen de fenol/cloroformo, agitar y centrifugar por 3 minutos a 13200 rpm.
8. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 volumen de cloroformo. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm.
9. Pasar la fase acuosa a otro tubo y se agregar 1µL de glucógeno y 1 volumen de isopropanol. Mezclar y dejar precipitar a -20°C por al menos 2 horas.
10. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm, retirar todo el sobrenadante.
11. Resuspender el botón en 10µL de TE 10mM

#4 Minipreparaciones de DNA cromosomal de *Streptomyces* (Kieser et al, 2000; modificado por Servín-González)

1. Crecer el micelio en 3.5 ml de medio LB con sacarosa + glicina 0.5%.
2. Una vez que el micelio haya crecido (normalmente unas 72 hrs) transferir a un tubo Eppendorf y cosechar por centrifugación.
3. Lavar el micelio con 1 ml de sacarosa 10.3% y extraer todo el sobrenadante con cuidado.
4. Resuspender en 0.5ml de TE 25 mM + lisozima 2 mg/ml + RNAsa 50 µg/ml.

5. Incubar a 37°C hasta que se observe la lisis del micelio (se observa viscoso y translúcido) normalmente entre 30 y 60 minutos.
6. Añadir 250 µl de SDS 2% y agitar en vórtex durante 1 minuto o hasta que esté homogéneo.
7. Añadir 250 µl de fenol/cloroformo y agitar en vórtex durante 30 segundos.
8. Centrifugar 5 minutos en la microfuga y con cuidado pasar la fase acuosa a un tubo limpio, cuidando de no llevarse la interfase que es muy viscosa)
9. Repetir la extracción con fenol/cloroformo un par de veces más.
10. Añadir 1/10 volumen de acetado sodio 3M y 1 volumen de isopropanol. Invertir varias veces el tubo hasta observar la precipitación de la malla de DNA.
11. Extraer el sobrenadante sin tomar la malla de DNA
12. Lavar la malla con etanol 70%, extraer todo el sobrenadante y secar el DNA.
13. Resuspender en un volumen mínimo de TE 10 Mm (100-200 µl). Cuantificar

#5 Reacción de ligación (Según especificaciones del producto)

1. En un tubo Eppendorf agregar: 2 µL de amortiguador de ligasa T4 5X, vector (dependiendo de la concentración), inserto (dependiendo de la concentración), 1 µL de Ligasa T4 HC, la cantidad de agua estéril desionizada necesaria para llevar a 10 µL de volumen final.
2. Agitar un poco y dar un pulso en la centrífuga.
3. Dejar toda la noche a temperatura ambiente.
4. Para transformar en *Streptomyces*, simplemente se utiliza la cantidad necesaria como lo indique el protocolo.
5. Para transformar en *E. coli*, al siguiente día precipitar la reacción agregando al mismo tubo de la ligación 1 µL de glucógeno, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
6. Dejar a -20°C, 2 horas.
7. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Desechar el sobrenadante.
8. Secar el pellet 5 minutos a 50°C y resuspender en la cantidad necesaria de agua estéril desionizada (5-10 µL). Transformar como lo indica el protocolo de electroporación en *E. coli*.

#6 Conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces* (Kieser et al, 2000)

1. Crecer un precultivo de la cepa donadora ET12567/pUZ8002 que contiene el plásmido a conjugar en *Streptomyces* en 3 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios a 37°C y agitación de 200 rpm, durante toda la noche.
2. Inocular 30 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios con todo el volumen del precultivo y se dejar crecer a 37°C y agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO de entre 0.6- 0.8 a 600 nm.
3. Centrifugar todo el cultivo en condiciones estériles a 6000 rpm/10 minutos/4°C y retirar el sobrenadante.
4. Repetir los pasos de centrifugación dos veces con el mismo volumen de medio YT2X sin antibióticos; al final resuspender el paquete de células en 2-4 mL (dependiendo del número de conjugaciones a realizar) de medio YT2X sin antibióticos.
5. Tomar entre 50 a 150 μ L de una preparación densa de esporas de la cepa receptora de *Streptomyces* (dependiendo de la densidad de la misma) y pasar a un tubo eppendorf estéril. Centrifugar las esporas a 6000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar el mismo volumen de agua estéril para lavar y quitar el exceso de glicerol y centrifugar 5 minutos a 6000 rpm.
7. Agregar a las esporas limpias 500 μ L de medio YT2X y dar un choque térmico a las esporas durante 10 minutos a 50°C en baño maría.
8. Dejar enfriar las esporas a temperatura ambiente y posteriormente agregar un mismo volumen de células ET12567/pUZ8002 recién lavadas. Mezclar perfectamente y centrifugar por 3 minutos a 3000 rpm. Retirar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 200 μ L de YT2X.
9. Realizar diluciones de 10^{-1} y/o 10^{-2} y plaquear las células en medio MS suplementado con 10mM de MgCl₂. Incubar las cajas de 16 a 20 horas a 30°C.
10. Posteriormente agregar a cada caja 1 mL de agua estéril con los antibióticos necesarios para seleccionar las exconjugantes de *Streptomyces*; repartir el agua de manera homogénea en toda la superficie de la caja hasta absorberse completamente.
11. Incubar las cajas a 30°C hasta la aparición de las exconjugantes.

#7 Electroporación en *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001)

1. Para preparar las células de *E. coli* competentes crecer un precultivo de la respectiva cepa en un tubo de ensayo estéril con 3 mL de medio YT2X y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos toda la noche a 37°C.
2. Al día siguiente, tomar 0.3 mL del precultivo para inocular un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio SOB y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos. Dejar crecer hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm
3. Centrifugar en un tubo estéril durante 10 minutos a 6000 rpm para recuperar las células.
4. Tirar el sobrenadante y las células se lavan con 10 mL de glicerol al 10%. Resuspender
5. Realizar 2 lavados más, iguales al paso 3 y 4.
6. En el último lavado dejar una pequeña cantidad de glicerol, y resuspender las células.
7. Tomar una alícuota de 50µL. Almacenar el resto en alícuotas de la misma cantidad en tubos eppendorf y guardar a -70°C hasta su posterior uso.
8. Agregar a la alícuota de células la cantidad de DNA necesario, agitar y pasar a una celda para electroporación Biolabs, previamente enfriada en hielo.
9. Dar un pulso con el programa Ec1 previamente establecido en el electroporador Biolabs.
10. Agregar 1 mL de medio YT2X a la celda y pasar las células a un tubo de ensayo estéril para incubar a 37°C durante 1 hora con agitación de 200 rpm.
11. Tras la recuperación de las células, pasarlas a un tubo eppendorf estéril y centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos.
12. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 0.3 mL de medio YT2X
13. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} plaquear en cajas de LB más los respectivos antibióticos.

#8 Transformación de *Streptomyces* por protoplastos (Kieser et al, 2001; modificado por Servín-González)

1. En un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con resorte agregar medio YEME suplementado con 125 µL de MgCl₂ y 1.25 mL de glicina 10% inocular 50-100 µL de una preparación densa de esporas.
2. Dejar incubar durante 36-40 horas a 30°C y con agitación de 200 rpm.

3. Pasado el tiempo, recuperar el micelio centrifugando 10 minutos a 7000 rpm. Si quedan restos de micelio en el matraz, lavar con 10 mL de sacarosa 10.3%.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el micelio en 15-20 mL de sacarosa 10.3%, dependiendo de la cantidad de micelio.
5. Una vez resuspendido, dividir en alícuotas de 5 mL en tubos de vidrio para centrifuga estériles.
6. Las alícuotas de 5 mL centrifugar 10 minutos a 3500 rpm. Retirar todo el sobrenadante y estas alícuotas se pueden almacenar a -20°C hasta su posterior uso.
7. Suplementar una alícuota de buffer P** de 40 mL con lo siguiente: 100 μL de trazas R2, 0.5 mL de KH_2PO_4 (0.8%), 5 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) y 5 mL de $\text{Tris} \cdot \text{Cl}$ (3%).
8. Filtrar el amortiguador P suplementado con ayuda de un filtro Millipore 0.45 μm , y colocar en un recipiente estéril.
9. Preparar 7.5 mg de lisozima en 5 mL de buffer P filtrado. Mezclar con ayuda del vórtex y filtrar sobre uno de los tubos de vidrio con la alícuota de micelio usando un filtro Millipore 0.45 μm .
10. Mezclar por inversión suave y dejar incubando por máximo 1 hora. Cada 15 minutos repetir la inversión suave. Para estar seguro de que se han formado los protoplastos, se puede observar un poco de la muestra al microscopio.
11. Habiéndose formado los protoplastos, filtrarlos con ayuda de un filtro para esporas, transferir los protoplastos filtrados a un tubo de vidrio y centrifugar 10 minutos a 3500 rpm y 25°C .
12. Mientras se centrifugan los protoplastos preparar la solución de polietilenglicol 1450 (PEG), disolviendo 0.5 g de PEG 1450 en 1.5 mL de buffer P filtrado. Esta mezcla se filtra con un filtro Millipore 0.45 μm .
13. Terminada la centrifugación, retirar el sobrenadante y resuspender sin usar vórtex, sólo golpes con el dedo y agregar el DNA con el que se transformará, e inmediatamente agregar 0.6 mL de la solución de PEG con una pipeta Pasteur. Con el bulbo succionar un par de veces y agregar 5 mL de amortiguador P filtrado.
14. Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm. Quitar todo el sobrenadante y resuspender el pellet con los nudillos. Agregar 0.3 mL de buffer P y hacer diluciones 10^{-1} y/o 10^{-2} .

15. En cajas de medio R2* suplementado y secado, poner 100 μ L de cada dilución, y para dispersar los protoplastos utilizar 3 mL de agar suave fundido pero no tan caliente. Y dispersar todo en la superficie de la caja.
16. Incubar de 18 a 20 horas a 30°C y después agregar los antibióticos respectivos mezclándolos en agua y dispersando bien en toda la caja 1 mL de la mezcla.

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

**Buffer P (Hoopwood & Wright, 1978): Para 300 ml de agua Mili-Q se le agrega: Sacarosa 51.5g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.01g, K_2SO_4 0.125 g. Se afora a 400 ml con agua Mili-Q y se esteriliza en autoclave

#9 Preparación densa de esporas de *Streptomyces* (Kieser et al, 2000)

1. En cajas Petri suplementadas con extracto de levadura, y con el antibiótico necesario, inocular con esporas de manera confluyente e incubar a 30°C por una semana o hasta ver que ha esporulado perfectamente.
2. Agregar a cada caja 5 mL de agua estéril y con un asa bacteriológica raspar la superficie para separar las esporas del micelio.
3. Recuperar el agua y pasarla a un filtro de esporas (Tubo estéril con algodón). De ser necesario agregar otros 5 mL de agua a la caja y recuperar todas las esporas.
4. Para quedarse con lo más posible de esporas y limpiar el filtro, en el último filtrado agregar 5 mL de agua estéril.
5. Racionar el filtrado en tubos de vidrio y centrifugar 10 minutos a 3500 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante y agregar 10 mL de agua para dar un lavado. Repetir el centrifugado.
7. Descartar el sobrenadante y resuspender las esporas en el volumen adecuado de glicerol 20% (0.5-1 mL) , pasar a un pequeño vial etiquetado. El vial se puede guardar a -20°C.

Medios de cultivo

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

- ❖ **YT2X (Sambrook & Russell, 2001)**: Triptona 1.6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH 7.2. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C.
- ❖ **SOB (Sambrook & Russell, 2001)**: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5mM, pH 7.2. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C.
- ❖ **LB (Sambrook & Russell, 2001)**: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0. Se esterilizó en autoclave 15 minutos por 121°C. Se agregó 1.5% de Select Agar (Gibco BRL) en caso de ser LB sólido.

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

- ❖ **MS (Kieser et al, 2000)**: Manitol 10g, harina de soya 10g, agua de la llave 500 ml, se autoclaveó a 115°C por 15 minutos. Posteriormente se hicieron alícuotas de 50 ml y se volvieron a esterilizar a 115°C por 15 minutos. El agar 2% se pone en alícuotas apartadas de 50 ml y se esterilizan también a 115°C por 15 minutos y se mezcla con una alícuota de harina de soya y manitol antes de verter en cajas de Petri.
- ❖ **YEME (Kieser et al, 2000)**: Se utilizó para crecer micelio para preparar protoplastos. Extracto de levadura 0.3%, Peptona 0.5%, Extracto de malta 0.3%, Glucosa 1%, Sacarosa 34%, pH 7. A 25 mL de medio se le adicionó 0.125mL de MgCl₂·6H₂O (1M) y 1.25mL de Glicina (10%).
- ❖ **R2YE (Kieser et al, 2000)**: Se utilizó para regenerar protoplastos. Solución base: Sacarosa 103g, K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂·6H₂O 10.12g, Glucosa 10g, Casaminoácidos 0.1g, aforar a 800mL. Colocar 2.2g de Bacto-Agar (Difco) en botellas y añadir 80mL de la

solución base. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. Para preparar las cajas, se fundió la alícuota de 80mL y se añadió lo siguiente: KH_2PO_4 (0.5%) 1mL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.68%) 8mL, L-prolina(20%) 1.5mL, Tris·Cl (3%, pH 7.2) 10mL, Trazas R5* 0.2mL, CuSO_4 (2mM) 0.2mL, NaOH(1N) 0.2mL, Extracto de levadura(10%) 5mL. Se dejaron secar las cajas por 3 horas en la campana de flujo laminar.

*Trazas R5 (para preparar 1L): ZnCl_2 40 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg.

❖ **Agar suave:** Se empleó para las transformaciones de protoplastos. Sacarosa 10.3g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.012g, Tris·HCl (3%, pH 7.2) 10mL, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5M) 0.4mL, Agar 0.65g. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se esterilizó en la autoclave por 15 minutos a 121°C.

❖ **LB-Sacarosa (Kieser et al, 2000):** Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Sacarosa 25%, pH 7.0. Se esterilizó en autoclave 15 minutos por 121°C