



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIO LSR2 EN *Streptomyces*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
BIÓL. YERSAIN ELY KELLER DE LA ROSA

TUTOR PRINCIPAL  
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. HERMINIA LOZA TAVERA  
[Facultad de Química](#)

DR. SEBASTIÁN POGGIO GHILARDUCCI  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México, septiembre de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Dedicatoria

*A mis padres, por su apoyo y amor.  
A mis hermanos, por estar siempre conmigo.*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Luis Servín González, por permitirme proponer un proyecto en su laboratorio y guiarme durante el mismo.

A la Dra. Herminia Loza y al Dr. Sebastián Poggio, miembros del comité tutor, por sus observaciones y correcciones durante el desarrollo del proyecto.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su apoyo técnico y consejos en el laboratorio.

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

A los miembros del jurado Dra. Gloria Soberón, Dra. María Elena Flores, Dra. Bertha González, Dr. Sergio Sánchez y Dr. Dimitris Georgellis por sus observaciones a este escrito.

A la Psic. Claudia Carrillo por ser una inspiración, apoyarme y dejarme ser parte de su vida.

Al Programa Institucional para la producción de biomoléculas de interés biomédico en Bacterias y Hongos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

## **Financiamiento**

Este trabajo fue financiado por el proyecto **IN207212** del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**).

Agradecimientos al Programa Institucional para la producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Bacterias y Hongos de Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Durante la realización del proyecto fui beneficiado con la beca para estudiantes de posgrado del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT). No. de registro **814145**.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Streptomyces</i> .....	2
2.2 Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	2
2.3 Dinámica del DNA durante la esporulación de <i>S. coelicolor</i> .....	3
2.4 Proteínas asociadas a nucleoide.....	3
2.5 Condensación del cromosoma durante la esporulación de <i>S. coelicolor</i> .....	4
2.6 La familia de proteínas H-NS.....	5
2.7 La proteína Lsr2 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
2.8 Las proteínas Lsr2 en <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	7
2.9 Dominio Lsr2 C-terminal en la metilasa M.Sall de <i>Streptomyces albus</i> .....	9
<b>3. Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>12</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>7. Material y métodos.....</b>	<b>14</b>
7.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en el trabajo.....	18
7.2 Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	19
7.3 Construcción de las mutantes nulas en <i>Streptomyces</i> .....	19
7.4 Conjugación de <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 con <i>S. coelicolor</i> .....	20
7.5 Prueba de viabilidad de las esporas.....	21
7.6 Amplificación de los genes <i>sco3375</i> , <i>sco4076</i> y el fragmento Dom.Lsr2.....	21
7.7 Purificación de las proteínas Lsr2.....	21
7.8 Cross-linking de las proteínas SCO3375 y SCO4076.....	22
7.9 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	22
7.10 Ensayo de protección contra la DNAsa I.....	22
7.11 Microscopia de campo claro y fluorescencia.....	22
7.12 Producción de antibióticos.....	22
<b>8. Resultados.....</b>	<b>23</b>
8.1 Distribución de los genes que codifican homólogos de Lsr2 en <i>Actinobacteria</i> .....	23
8.2 El gen <i>sco4076</i> de <i>S. coelicolor</i> no es esencial.....	23
8.3 El gen <i>sco3375</i> de <i>S. coelicolor</i> M145 es esencial.....	24
8.4 Fenotipo de la cepa mutante $\Delta$ <i>sco3375</i> .....	27
8.5 Las cepas $\Delta$ <i>sco4076</i> y $\Delta$ <i>sco3375</i> son sensibles a la temperatura y a SDS.....	29
8.6 Expresión de proteínas con la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal.....	31

8.7 Purificación de proteínas Lsr2.....	32
8.8 Purificación de la proteína SCO3375.....	33
8.9 SCO3375 interactúa de manera inespecífica con DNA.....	35
8.10 Purificación de la proteína SCO4076.....	37
8.11 La proteína SCO4076 interactúa de manera inespecífica con el DNA.....	38
8.12 Ensayo de protección contra DNAsa I.....	40
8.13 Purificación del dominio Lsr2 de la metilasa M.Sall (Dom.Lsr2).....	41
8.14 Dimerización de la proteína Dom.Lsr2.....	42
8.15 La proteína Dom-Lsr2 interactúa de manera inespecífica con el DNA.....	42
8.16 Segregación y condensación de las esporas en la cepa mutante $\Delta sco3375$ .....	44
8.17 Construcción de mutante nula $\Delta Sli_{3719}$ .....	47
<b>9. Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>57</b>

# 1. Resumen

Las proteínas asociadas al nucleoide (NAPs) tienen un bajo peso molecular, en su mayoría básicas, con habilidad de unión a DNA; éstas contribuyen importantemente en la estructura del nucleoide y están involucradas en la compactación del cromosoma, donde están implicadas en la replicación, recombinación y en la regulación de la expresión génica.

La proteína Lsr2 es una NAP de *Mycobacterium tuberculosis* de bajo peso molecular (12.1 kDa). Se une al DNA preferentemente en regiones ricas en AT, y se encuentra involucrada en varios procesos celulares, incluyendo la biosíntesis de la membrana celular y funciones metabólicas en *Mycobacterium smegmatis*. Además, una mutante nula *lsr2* en *M. smegmatis* muestra una morfología afectada de la colonia y reducción en la formación de biofilm. Por otra parte, el gen *lsr2* de *M. tuberculosis* no puede ser deletado del cromosoma, sugiriendo que ese gen es esencial.

La proteína Lsr2 no presenta similitud en secuencia ni estructural con las proteínas H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein), pero presenta propiedades bioquímicas análogas y es funcionalmente intercambiable con H-NS de *E. coli*. Proteínas homólogas de Lsr2 se encuentran presentes en todos los genomas secuenciados de Mycobacterias, igual que en Actinobacteria, incluyendo el género *Streptomyces*. En el cromosoma de *Streptomyces coelicolor* hay dos copias de las proteínas Lsr2-like, codificadas por los genes *sco3375* y *sco4076*, sin embargo, estas proteínas no han sido caracterizadas. Además, un dominio homólogo a Lsr2 se encuentra localizado en el extremo C-terminal de la proteína metiltransferasa Sall de *S. albus*, pero este dominio no se encuentra en metilasas de DNA homólogas.

Nuestros resultados muestran que una de las proteínas Lsr2 en *S. coelicolor*, SCO3375 se encuentra asociada al nucleoide y tiene una contribución importante en la condensación y segregación del cromosoma durante la esporulación de *Streptomyces*. *In vitro*, las proteínas Lsr2 se unen al DNA de manera dependiente de la longitud e independiente de la secuencia, sin ninguna preferencia estructural aparente. Ambas proteínas de *Streptomyces* (SCO3375 y SCO4076) muestran formación de estructuras homodiméricas en ensayos de *cross-linking*. También observamos que el dominio Lsr2 presente en el extremo C-terminal de la metiltransferasa Sall de *S. albus* puede unirse al DNA de manera dependiente de la longitud del DNA.

Sugerimos que el gen *sco3375* es esencial para *S. coelicolor*, pero interesantemente no en *S. lividans* donde una mutante nula presenta una sobreproducción de antibióticos. Una mutante nula *sco3375* en el cromosoma, pero con una copia extra del gen clonada en un plásmido integrativo de bajo número de copias (pIJ6902), presenta un nucleoide menos compacto respecto a la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145, además de un aumento en la producción de esporas anucleadas en las cadenas de esporas. Esta cepa y la cepa mutante *sco4076* son deficientes en la resistencia a calor y en la pigmentación de la espora, así como también más sensibles a detergentes.



## 2. Introducción

### 2.1 *Streptomyces*.

El género *Streptomyces* está constituido por bacterias filamentosas Gram-positivas, y pertenece al filo de las actinobacterias que presentan una morfología y un ciclo de vida complejo. La especie *Streptomyces coelicolor* es el estreptomiceto modelo y ha sido ampliamente estudiado a nivel molecular y genético. Su cromosoma es de topología lineal con un tamaño de 8.7 Mpb y con un contenido aproximado de 73% de G + C en el DNA (Bentley, 2002). Adicionalmente posee 3 plásmidos, SCP1 (lineal, 356 KB), SCP2 (circular, 31 Kb), y SLP1 (17 Kb), el cual se encuentra integrado en el cromosoma. La topología lineal del cromosoma no es común en bacterias, y solo otros cuantos géneros lo presentan, por ejemplo; *Borrelia* y *Agrobacterium* (Galperin, 2007).

La molécula de DNA lineal del cromosoma de *Streptomyces* presenta una región centro o “core” la cual se extiende desde la posición ~1.5 Mb a 6.4 Mb, y se encuentra conservada dentro de las especies de *Streptomyces* (Ikeda *et al.*, 2003; Choulet *et al.*, 2006; Ohnishi *et al.*, 2008). Es en esta región donde se localizan mayoritariamente los genes que codifican proteínas esenciales, tales como las involucradas en la replicación de DNA, transcripción, traducción, o división celular. La región central es flanqueada por dos brazos, en los cuales se localizan los genes que codifican normalmente para proteínas no esenciales, como las que intervienen en el metabolismo secundario (Kirby, 2011).

### 2.2 Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*.

El ciclo de vida de *Streptomyces* se caracteriza por una progresión a través de distintas etapas diferenciadas. El ciclo inicia con la germinación de una espora. Los tubos germinales crecen por medio de extensión apical y se ramifican, llegando a formar redes densas de micelio vegetativo compacto. La depleción de nutrientes, y posiblemente otros estímulos desencadenan la formación de un segundo tipo celular; las hifas aéreas, las cuales emergen del micelio vegetativo. Las hifas aéreas también crecen por extensión apical, sin embargo, no se ramifican. La elongación de las hifas aéreas se detiene y comienza la septación dando como resultado la formación de cadenas de esporas. Coincidiendo con la septación, los cromosomas son condensados y segregados, en donde cada preespora recibirá una copia del cromosoma (McCormick, 2012).

Cada preespora debe madurar, culminando en el ensamblaje de una gruesa pared, lo cual significa una remodelación del peptidoglicano original (Haiser, 2009), también se realiza la protección del nucleoide con la asociación de proteínas (Facey, 2009) y la formación de un pigmento que recubre las esporas, el cual es de color gris en *S. coelicolor*. Posteriormente las esporas individuales son liberadas en el ambiente.

La diferenciación del micelio vegetativo al micelio aéreo coincide con la síntesis de los metabolitos secundarios, de los cuales muchos presentan actividad antibiótica. El análisis de la secuencia del cromosoma de *S. coelicolor* ha permitido la identificación de al menos

29 agrupamientos o “clústers” de genes (aproximadamente el 4.5 % del genoma) relacionados con la biosíntesis de enzimas del metabolismo secundario (Liu, 2013). Tres de los clústers mencionados se conocían antes de la secuenciación del genoma y corresponden a las rutas biosintéticas de los antibióticos actinorrodina (ACT) el cual da el color azul característico del organismo, undecilprodigiosina (RED) de color rojo y el antibiótico dependiente de calcio (CDA). *S. coelicolor* A3(2) produce además un antibiótico denominado metilenomicina cuyos genes biosintéticos están localizados en el plásmido SCP1 (Bentley *et al.*, 2002; Bentley *et al.*, 2004; Yepes, 2011).

### **2.3 Dinámica del DNA durante la esporulación de *S. coelicolor*.**

En la mayoría de los casos, las bacterias unicelulares contienen una copia del cromosoma circular empaquetado dentro de un nucleoide, y la replicación del DNA, la condensación del cromosoma y la segregación, ocurren simultáneamente (Hirano, 2002). Las proteínas asociadas al nucleoide involucradas en estos procesos, han sido ampliamente estudiadas en organismos como *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Errington, 2003), pero no así en organismos de desarrollo complejo como *Streptomyces*.

Durante el desarrollo de *Streptomyces* ocurren cambios en la estructura del nucleoide. En el micelio vegetativo los nucleoides son grandes y heterogéneos, con alrededor de una docena de cromosomas por cada compartimento celular de las hifas vegetativas. Más tarde, en el micelio aéreo existen nucleoides grandes y elongados que se encuentran en múltiples copias en los compartimentos (Hopwood & Glauert, 1960). Después del inicio de la constricción de los septos, aproximadamente 50 copias del cromosoma lineal son alineados a través de la célula septante, y de esta manera se distribuye el DNA de manera equivalente en las esporas (Ditkowski *et al.*, 2010).

### **2.4 Proteínas asociadas a nucleoide.**

Debido a la acción combinada de varios factores, las bacterias compactan su DNA en una estructura condensada, aunque dinámica. La organización del nucleoide está mediada a través del agrupamiento molecular y la función de varias proteínas. Estas proteínas incluyen las topoisomerasas, las RNA polimerasas, y también las proteínas asociadas al nucleoide (NAPs).

Las proteínas asociadas a nucleoide, se unen mayoritariamente al DNA de manera inespecífica, aunque algunas se unen a regiones específicas. Se ha evidenciado que existen uniones preferenciales a secuencias ricas en AT, un ejemplo de éstas son las secuencias promotoras. Típicamente cubren de 10 a 30 pb de DNA en los sitios de unión, deformando localmente el DNA, dependiendo de la NAP en particular.

El impacto dentro del nucleoide se debe a que pueden modular la estructura dinámica y contribuyen en la compactación del mismo a través de flexión, formación de puentes y empaquetamiento del DNA cromosomal. La formación de puentes es relevante no sólo para la compactación del DNA, sino también en la regulación de la transcripción.

Azam en 1999 describió que la abundancia de NAPs varía con respecto a la fase de crecimiento en *E. coli*. Durante el crecimiento exponencial las NAPs más abundantes incluyen a FIS (**F**actor for **I**nversion **S**timulation), StpA (**S**uppressor of **t**d mutant **p**henotype **A**), H-NS (**H**istone-like **n**ucleoid-**s**tructuring protein), e IHF (**I**ntegration **h**ost **f**actor). Durante la fase estacionaria o de privación nutricional, los niveles de NAPs decaen, mientras que Dps (**D**NNA-binding **p**rotein from **s**tarved cells) e IHF incrementan y son las proteínas más abundantes en el nucleóide. Debido a su alta abundancia intracelular y a sus propiedades de unión al ADN, se cree que estas cuatro proteínas son los elementos más importantes en la organización y compactación del cromosoma bacteriano.

En un estudio proteómico de las proteínas de unión al nucleóide en *Streptomyces*, Bradshaw (2013) determinó que la abundancia de las NAPs; HU (**H**istone-like proteins *Escherichia coli* **U**93), Dps y H-NS-like se correlaciona con la abundancia de *E. coli*.

## 2.5 Condensación del cromosoma durante la esporulación de *S. coelicolor*.

Después de la segregación del cromosoma y la septación, el DNA dentro de las preesporas se condensa. Las proteínas asociadas al nucleóide (NAPs) desempeñan un papel importante dentro de este proceso, y al menos 4 clases de estas proteínas se han estudiado en *S. coelicolor*; SMC (**s**tructure **m**aintenance of **c**hromosomes), HU, IHF, Dps.

Las **SMC** son proteínas que se encuentran en eucariontes, procariontes y arqueas, y su función está involucrada en la organización del cromosoma. Las proteínas SMC, ScpA y ScpB de *S. coelicolor* comparten identidad extensa con proteínas ortólogas de otras bacterias. Los 3 genes codificantes de las proteínas están presentes en todas las cepas de *Streptomyces* secuenciadas. Probablemente, el complejo SMC/ScpA/ScpB interacciona de manera inespecífica con el DNA, y cuando los complejos interaccionan entre ellos provocan la condensación. La proteína no es esencial, pero mutantes nulas de SMC generan efectos en la compactación del nucleóide, y además exhiben efectos en la segregación del cromosoma, formando 7% más de esporas anucleadas en comparación con la cepa silvestre. Esto es similar a otras especies bacterianas como *B. subtilis* o *Caulobacter crescentus*. Además, mutantes nulas de estos genes presentan mayor susceptibilidad al daño al DNA por diversos agentes y una menor resistencia a la temperatura (Dedrick *et al.*, 2009; Kois *et al.*, 2009).

Las **HU** son proteínas de peso molecular pequeño y cargadas positivamente. *E. coli* y *Salmonella* poseen 2 homólogos (HU $\alpha$  y HU $\beta$ ). Los homodímeros HU $\alpha/\alpha$  predominan en la fase vegetativa de crecimiento, y los heterodímeros HU $\alpha/\beta$  aumentan su expresión durante la fase estacionaria o choque térmico. Las proteínas HU se unen preferencialmente a DNA estructuralmente curvado más que a una secuencia específica (Shimizu, 1995).

*S. coelicolor* codifica dos proteínas HU-like (Bentley *et al.*, 2002): HupA (SCO2950) y HupS (SCO5556). La expresión de HupA se detecta predominantemente durante el crecimiento

vegetativo, mientras que la expresión de HupS se induce durante el desarrollo de las hifas áreas y la esporulación, donde tiene un papel en la compactación del nucleoide en la espora (Salerno, 2009). Mutantes *hupS* presentan una menor pigmentación respecto a la cepa silvestre y son más sensibles al calor, mientras que una cepa  $\Delta hupA$  de *S. lividans* tiene un crecimiento más lento en medio líquido (Yokoyama *et al.*, 2001).

El **IHF** fue una proteína originalmente identificada por estar involucrada en la integración del fago  $\lambda$  en *E. coli*. Posteriormente se determinó su participación en la expresión genética y la recombinación sitio-específica (Haniford, 2006). La proteína IHF presenta dos subunidades, IHF $\alpha$  e IHF $\beta$ . La interacción de IHF con el DNA se establece por las cargas positivas que recubren la superficie de la proteína y, aunque se ha establecido la existencia de una secuencia consenso de unión al DNA (Ali *et al.*, 2001), esta unión también puede ser inespecífica.

*S. coelicolor* presenta una proteína equivalente funcional, sIHF. Una cepa mutante en *sihf* presenta defectos en la compactación del cromosoma, en la segregación y en la producción de antibióticos. En ensayos *in vitro* se ha determinado que la unión al DNA se realiza de manera secuencia inespecífica, y además la afinidad de la proteína sIHF al DNA está determinada por la longitud del mismo y no por la secuencia (Swiercz *et al.*, 2013).

Las **Dps** tienen un papel importante en el proceso de asociación al nucleoide comprimiéndolo y protegiéndolo de posibles daños, cuando las células se encuentran en un ambiente de presión o esporulación (Karas, 2015). Las proteínas Dps se encuentran en casi todas las bacterias. Son proteínas de aproximadamente 19 kDa. Se unen al DNA de manera inespecífica, y pueden causar un alto grado de compactación lo cual contribuye a la protección del DNA. *S. coelicolor* presenta 3 homólogos a las proteínas Dps; DpsA, DpsB, DpsC relacionadas cercanamente al desarrollo. Estas proteínas, aunque conservan una estructura cuaternaria similar, difieren en la composición de sus aminoácidos. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que la proteína DpsB no forma complejos oligoméricos. La diferencia en la longitud y la composición de aminoácidos de las tres proteínas refleja la diferencia en la función de las proteínas. Algunas condiciones de estrés, estimulan la expresión de las proteínas Dps. Hay diferencias en la prevalencia de las proteínas en *Streptomyces*, siendo DpsB la más común dentro del género *Streptomyces* (Facey, 2009).

## 2.6 La familia de proteínas H-NS.

Los miembros de la familia de las proteínas H-NS se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas. A diferencia de varias proteínas asociadas al nucleoide, la proteína H-NS presenta un punto isoeléctrico neutro, pero contiene regiones donde las cargas de los aminoácidos permiten la interacción con el DNA. Las proteínas están involucradas en la regulación de la transcripción génica, el silenciamiento de genes adquiridos lateralmente y también en el empaquetamiento del DNA. La unión de H-NS se realiza de manera secuencia-independiente, pero reconoce el DNA curvo y preferentemente a regiones ricas en AT (Lim, 2012).

La proteína H-NS presenta 3 componentes estructurales; un dominio de dimerización/oligomerización N-terminal, un dominio C-terminal con capacidad de unión a ácidos nucleicos, y una región flexible entre ambos, lo que permite la actuación de forma independiente de ambos dominios (Esposito, 2002). El dominio de oligomerización es una región bastante conservada dentro de los distintos miembros de la familia de proteínas H-NS, sin embargo, su grado de conservación es inferior al dominio C-terminal de unión a ácidos nucleicos.

Es interesante remarcar que existen otras especies bacterianas donde no es posible caracterizar el papel regulador de H-NS ya que se considera esencial el gen *hns*, por ejemplo, en *Proteus mirabilis* (Wirjon *et al.*, 2016) o *Bordetella bronchiseptica* (Goyard y Bertin, 1997). Varias proteínas de la familia H-NS se han descrito tales como StpA de *E. coli*, MvaT y MvaU de *Pseudomonas aeruginosa*, y también Lsr2 en *Mycobacterium tuberculosis* (Lim, 2012; Winardhi, 2014).

El gen *Rv3597* de *M. tuberculosis* codifica la proteína Lsr2 la cual es una proteína análoga funcional de H-NS. Lsr2 no presenta identidad de secuencia con H-NS de *E. coli*. El dominio de oligomerización de H-NS es alargado y completamente helicoidal, el dominio equivalente de Lsr2 es globular y está compuesto en su mayor parte por láminas  $\beta$  (Summers, 2012). El dominio C-terminal de H-NS no comparte ninguna homología estructural con Lsr2, excepto un motivo corto que está involucrado en la interacción con el DNA rico en AT (Gordon, 2008; Gordon, 2010).

Adicionalmente, las proteínas H-NS y Lsr2 intercalan un *loop* específico de la proteína en el surco menor del DNA. Para H-NS este *loop* está contenido en su motivo canónico (**TWTGX<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>P**), donde la secuencia X<sub>1</sub>GX<sub>2</sub> (normalmente **QGR**) forma una estructura conocida como "AT-hook" (Teramoto, 2010). La proteína Lsr2 también intercala un AT-hook (secuencia **RGR**) en el surco menor del ADN rico en AT (Uyar, 2009).

Dado que carecen de identidad en sus secuencias, se ha sugerido que los orígenes de Lsr2 y H-NS son distintos y sus similitudes funcionales son el resultado de evolución convergente. A pesar de su falta casi completa de similitud de secuencia o estructural, H-NS y Lsr2 son funcionalmente intercambiables y *hns* puede complementar el fenotipo de mutaciones *lsr2* en *M. smegmatis* y viceversa (Gordon, 2008; Gordon, 2011).

## 2.7 La proteína Lsr2 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Lsr2 (leprosy serum reactive clone 2) se identificó inicialmente como un potente antígeno para las células T, en una búsqueda de clonas positivas que reaccionaran con los sueros de pacientes con lepra (Laal, 1991).

La proteína Lsr2 tiene un peso molecular de 12.5 kDa (112 aa) y se encuentra conservada en el orden Actinobacteria (Gordon *et al.*, 2008). Fue descrita como una proteína de unión a DNA en 2007 en un estudio de regulación transcripcional de tolerancia a fármacos, en *M.*

*tuberculosis* H37Rv (Colangeli *et al.*, 2007). En otro estudio bioquímico, la interacción de Lsr2 con DNA dio evidencia de que Lsr2 se une de manera no específica al DNA (con gran preferencia por secuencias ricas en AT), además de formar complejos largos con el DNA conforme el tamaño del DNA aumentaba, y no presentó una unión preferencial a DNA curvo o no curvo, lo cual la diferencia de H-NS. (Chen *et al.*, 2006). Sin embargo, también existe evidencia que Lsr2 forma puentes entre el DNA.

Los ortólogos de Lsr2 se encuentran presentes en todos los genomas secuenciados del género *Mycobacterium*. Los homólogos de Lsr2 también están presentes en otros actinomicetos tales como *Streptomyces*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Chen *et al.*, 2006).

Una mutante *Isr2::Tn* de *M. smegmatis* muestra una morfología alterada de sus colonias y es defectuosa en la biosíntesis de micolil-diacilgliceroles. Además, se produce una elevada cantidad de otros lípidos de la pared celular, los glicopéptidolípidos. Esto sugiere que Lsr2 está involucrado en la biosíntesis de los lípidos micobacterianos de la pared celular y los fenotipos asociados con las mutaciones *Isr2*, como la formación de biopelícula y la motilidad de deslizamiento, son probablemente las consecuencias de la alteración de la composición de la pared celular (Chen, 2006; Kocíncová, 2008).

La mayoría de las actinobacterias tiene sólo una proteína homóloga a Lsr2. Sin embargo, en algunos casos este número es mayor, como en *Rhodococcus jostii* RHA1 y *Amycolatopsis mediterranei* S699, que tienen 9 y 7 proteínas similares a Lsr2, respectivamente (Pérez-Rueda *et al.*, 2015).

El genoma de *Streptomyces* es particularmente grande y codifica una alta proporción de reguladores transcripcionales en comparación con otras especies por lo que es posible que también contenga más NAPs: la duplicación de genes dentro de este linaje ha generado 2 parálogos de HU, 2 de Lsr2 y 3 de Dps (Facey *et al.*, 2009).

## **2.8. Las proteínas Lsr2 en *Streptomyces coelicolor*.**

Los genes *Isr2* se encuentran ampliamente distribuidos en todos los genomas secuenciados de *Streptomyces*, los cuales presentan las dos copias. La abundancia de las proteínas Lsr2 también se presenta en los genomas secuenciados de algunos actinofagos. Como se mencionó anteriormente en el genoma de *S. coelicolor* existen dos genes parálogos que codifican proteínas Lsr2: *sco3375* y *sco4076*.

### 2.8.1 SCO3375.

Bradshaw (2013) identificó un conjunto de 24 proteínas con una alta probabilidad de unión a DNA, basándose en los criterios de abundancia (Ishihama, 2005) y en la predicción de unión a DNA (puntuación de DNAbinder, (Kumar, 2007)). Entre las proteínas identificadas, la proteína SCO3375 se observaba de manera relativamente abundante, pero en cantidad menor a las proteínas siHF o HupA, además de encontrarse en cantidades menores a lo esperado para las proteínas H-NS. Sin embargo, esto pudo deberse a las condiciones en las que fueron probadas.

Kim (2015), identificó factores de transcripción que pueden controlar directamente la transcripción de los genes *ssg* específicos de esporulación, por medio de ensayos de captura de afinidad de DNA (Park, 2009). Utilizando cebos biotinilados de ADN correspondientes a las regiones promotoras de los genes *ssgA*, *ssgB*, *ssgG* y *ssgR* determinaron que SCO3375 se unía al fragmento promotor *ssgB*. La proteína SsgB es responsable de reclutar a FtsZ a la pared de las hifas que se van a convertir en esporas para comenzar la división celular esporogénica (Noens *et al.*, 2005).

La proteína SCO3375 posee 55.45% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con Lsr2 de *M. tuberculosis*. En la secuencia se observa que contiene la secuencia RGR que está involucrada en la unión a DNA en Lsr2, como ya se mencionó (Figura 1). Consta de 111 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 11.7 kDa, con un pI de 6.8.

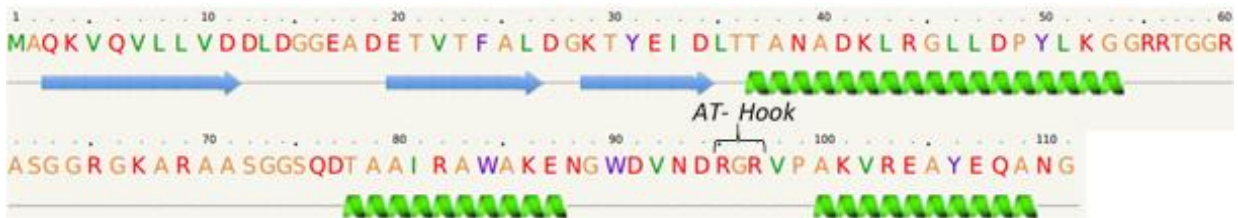


Figura 1. Secuencia de aminoácidos de SCO3375. Se muestra la secuencia de la proteína y la predicción de estructura secundaria obtenida por PHYRE<sup>2</sup> así como la posición del AT-hook.

## 2.8.2 SCO4076.

SCO4076 es una proteína de 11.6 kDa (105 aa), posee una identidad de 47.62% con Lsr2 de *M. tuberculosis*. Su pI es 9.5 mostrando una notable diferencia con SCO3375 en cuanto a las características de sus aminoácidos. En la Figura 2, se observa que también cuenta con el segmento AT-Hook. SCO3375 y SCO4076 tienen un porcentaje de identidad de 52.38%.



Figura 2. Secuencia de residuos de aminoácidos de SCO4076. Se muestra la secuencia de la proteína y la predicción de estructura secundaria obtenida por PHYRE<sup>2</sup> así como la posición del AT-hook.

## 2.9 Dominio Lsr2 C-terminal en la metilasa M.Sall de *Streptomyces albus*

*Streptomyces albus* es uno de los estreptomicetos más ampliamente distribuidos geográficamente, el cual presenta un crecimiento relativamente rápido y ha sido empleado como modelo de expresión heteróloga de clúster de productos naturales (Seipke, 2015).

M.Sall es una proteína de *S. albus* G, la cual forma parte del sistema de modificación-restricción de tipo II, el cual está conformado por los genes *salR* y *salM* que codifican para la endonucleasa de restricción Sall y la metiltransferasa M.Sall (Rodicio *et al.*, 1988). La metilasa M.Sall se compone de 587 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 64 kDa. Esta enzima modifica adeninas en la secuencia 5'-GTCGAC-3'.

En la enzima M.Sall se encontró un dominio Lsr2 en el extremo C-terminal, el cual solo se presenta en las enzimas relacionadas. En otras metiltransferasas SAM-dependientes no se encuentra este dominio C-terminal homólogo a Lsr2. De igual forma se observa la presencia del dominio RGR, además se tiene reportado que la sustitución R86A en *M. smegmatis* no restituye el fenotipo silvestre, mostrando una actividad de unión a DNA defectuosa, e inhibe la actividad nativa de Lsr2 (Chen, 2006). En la Figura 3 se puede observar que este aminoácido se mantiene conservado en la metilasa Sall, lo cual sugiere que el dominio podría ser funcional.

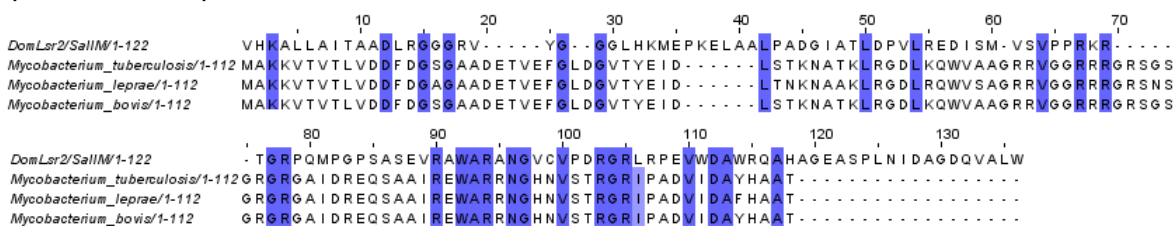


Figura 3. Alineamiento del dominio Lsr2 de M.Sall y proteínas Lsr2 de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis*.



### 3. Antecedentes

Gómez, D. (2015) clonó, expresó, purificó y analizó la actividad *in vitro* de la metiltransferasa M.Sall, siendo ésta la única metilasa que mostró actividad *in vitro* de 3 enzimas analizadas (M.SphI y M.SacI no mostraron actividad). Al analizar la secuencia y encontrar un dominio Lsr2 C-terminal, con base en estos resultados se sugirió que este dominio fuera importante para la actividad de la enzima, por lo cual se realizó una delección de la porción final del gen *salM* que codifica el dominio Lsr2.

El fragmento resultante *salM* $\Delta$ *lsr2* se clonó y expresó en *E. coli*. La metiltransferasa silvestre M.Sall y la metiltransferasa mutante M.Sall $\Delta$ Lsr2 se purificaron y se realizaron pruebas de actividad *in vitro*. Estos consistieron en incubar al plásmido pSET152 (no metilado) con 4  $\mu$ g de las metiltransferasas en presencia de S-adenosil metionina (SAM), y posteriormente el plásmido se precipitó y se digirió con la enzima de restricción Sall para determinar el grado de metilación (Figura 4).

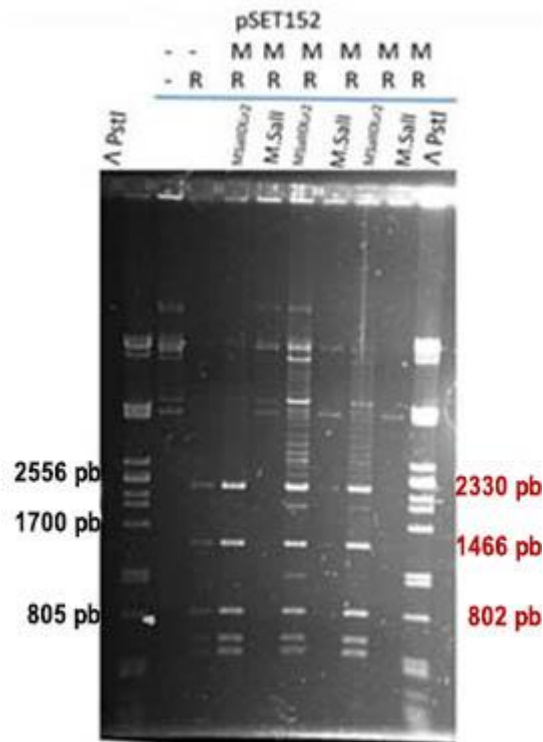


Figura 4. Actividad de metilación por las enzimas M.Sall silvestre y la mutante M.Sall $\Delta$ Lsr2. Como control se observa el plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), ni digerido con la enzima de restricción Sall (R). El siguiente carril muestra al plásmido sin metilar (-) digerido con Sall (R). El resto de los carriles corresponden al plásmido tratado con metilasa (M, Silvestre o Mutante) y digerido con Sall (R).

En la figura 4 se observa que la metiltransferasa M.Sall silvestre sí fue capaz de metilar los sitios de reconocimiento de la endonucleada Sall, ya que la enzima de restricción fue incapaz de digerirlo. Por otro lado la metilasa M.Sall $\Delta$ Lsr2 no fue capaz de metilar completamente al plásmido, ya que el DNA sí fue digerido (la digestión parcial observada podría indicar que la metilasa mutante si conservó un poco de actividad de metilasa). Estos resultados preliminares sugieren que el dominio Lsr2 de la metilasa M.Sall es necesario para la actividad completa de esta enzima.

Con estos resultados preliminares nos interesamos en estudiar las características de las proteínas Lsr2 de *S. coelicolor*, así como del dominio Lsr2 de la metilasa M.Sall.

## 4. Justificación

Durante las primeras etapas en el desarrollo de *S. coelicolor*, el DNA cromosomal no se encuentra condensado y se localiza disperso en las hifas multinucleoides. Al inicio de la esporulación, en las hifas aéreas se lleva a cabo la compactación y segregación del DNA, resultando en una distribución uniforme de los cromosomas en las esporas. Las proteínas asociadas al nucleóide involucradas en este proceso, se conservan en actinobacterias, sin embargo, pueden variar de las que se encuentran en otras bacterias (por ejemplo; *E. coli*).

*Streptomyces* no codifica para proteínas IHF, FIS, o H-NS, las cuales se encuentran en bacterias Gram-negativas como *E. coli*. Sin embargo, proteínas funcionalmente equivalentes podrían desempeñar las mismas funciones. Particularmente, este es el caso de las proteínas SCO3375 y SCO4076, las cuales son homólogas de Lsr2 de micobacterias, la cual se ha demostrado es una proteína análoga funcional de H-NS.

Estas proteínas Lsr2 de *S. coelicolor* no han sido caracterizadas, por lo que pueden representar un interesante modelo de estudio de NAPs, dado el complejo ciclo de vida de este organismo.

## 5. Hipótesis

- Los genes *sco3375* y *sco4076* son redundantes.
- La participación de las proteínas Lsr2 codificadas por estos genes ocurre principalmente en la compactación/ segregación del cromosoma.
- El dominio carboxilo-terminal Lsr2 de la metilasa M.Sall es funcional y capaz de formar complejos DNA-Proteína.

## 6. Objetivos

1. Evaluar la funcionalidad de los genes *sco3375* y *sco4076*.

1.1 Construir mutantes sencillas de los genes *sco3375* y *sco4076* en *S. coelicolor*, así como una mutante doble.

1.2 Evaluar el efecto fenotípico de las mutaciones sobre la viabilidad y la esporulación.

2. Caracterización de las proteínas SCO3375, SCO4076 y del Dominio Lsr2 de la metilasa M.Sall.

2.1 Clonar, expresar, purificar las proteínas SCO3375, SCO4076 y el dominio Lsr2 de M.Sall.

2.2 Realizar ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando las proteínas purificadas.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados en el trabajo

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y *Streptomyces*.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5a	F-endA1glnV44thi-  <i>1recA1relA1gyrA96deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17(rK-mK+)</i> , λ-	Grant,1990
IBEC58	Δ <i>dam</i> Δ <i>dcm</i> Δ <i>hsdRMS</i> derivada de BW25113.  Obtención de DNA no metilado.	González-Cerón <i>et al.</i> , 2009
BL21 Rosetta 2™	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> ).  Expresión de proteínas.	Novagen
Rosetta-gami 2	Δ( <i>ara-leu</i> )7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> <i>Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> ) Expresión de proteínas.	Novagen
ET12567/pUZ8002	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM</i> Cm <sup>R</sup>  DNA no metilado, conjugaciones intergénicas.	Paget <i>et al.</i> ,1999
BT340	DH5α con el plásmido de recombinación FLP.  (pCP20)	Datsenko & Wanner, 2000

<b><i>Streptomyces</i></b>		
<b><i>S. coelicolor</i> M145</b>	A3(2) SCP1 <sup>-</sup> ; SCP2	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
<b><i>S. coelicolor</i> M145 (6902(H)+sco3375)</b>	Plásmido integrativo pIJ6902 con el gen <i>sco3375</i> clonado.	Este trabajo
<b><i>S. coelicolor</i> Δ<i>sco4076</i></b>	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145 con el gen <i>sco4076</i> deletado.	Este trabajo.
<b><i>S. coelicolor</i> Δ<i>sco3375</i></b>	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145 (6902(H)+ <i>sco3375</i> ) con el gen <i>sco3375</i> en el cromosoma deletado. Con el pIJ6902+ <i>sco3375</i>	Este trabajo
<b><i>S. lividans</i> 1326</b>	SLP1 <sup>+</sup> SLP2 <sup>+</sup>	Hopwood <i>et al.</i> , 1983
<b><i>S. lividans</i> 1326 Δ<i>Sli_3719</i></b>	Derivada de <i>S. lividans</i> 1326 con el gen <i>sli_3719</i> deletado.	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos y cósmidos utilizados en este trabajo.

<b>Plásmido</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pET28a	Vector de expresión, 6His, Kan <sup>R</sup>	Novagen
pET28-sco3375	<i>sco3375</i> clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo.	Este Trabajo

pET28-sco4076	<i>sco4076</i> clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo.	Este Trabajo
pET28-DomLsr2	Dominio Lsr2 de la metiltransferasa Sall clonado en el extremo carboxilo. pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo.	Este Trabajo
pET28-sco3375NE	<i>sco3375</i> clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo amino.	Este Trabajo
pET28-sco4076NE	<i>sco4076</i> clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo amino.	Este Trabajo
pET28-DomLsr2NE	Dominio Lsr2 de la metiltransferasa Sall clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo amino.	Este Trabajo
pET28-SalIM	<i>salM</i> clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo amino.	Este Trabajo
pET28-SalIMΔlsr2	<i>salM</i> sin el dominio Lsr2 clonado en el vector pET28a, poniendo la etiqueta de histidinas en el extremo amino.	Este Trabajo
pBlueScript IISK	Vector de clonación en <i>E. coli</i> .	Alting-Mees <i>et al.</i> , 1989.
pIJ6902	Apra <sup>R</sup> , promotor <i>tipA</i> , sitio <i>att</i> del fago phiC31, en el cromosoma de <i>Streptomyces</i> . Inducible por tioestreptón.	Huang <i>et al.</i> , 2005

pIJ6902(H)	Hyg <sup>R</sup> , promotor tipA, sitio att del fago phiC31, en el cromosoma de <i>Streptomyces</i> .	Este trabajo
pIJ773	aac(3)IV(apra <sup>R</sup> ) + oriT	Gust <i>et al.</i> , 2003
StD25	Cósmido derivado de SuperCos 1, Kan <sup>R</sup> Apra <sup>R</sup> , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) que incluye el gen <i>sco4076</i> .	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
StE94	Cósmido derivado de SuperCos 1, Kan <sup>R</sup> Apra <sup>R</sup> , con un fragmento del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> A3(2) que incluye el gen <i>sco3375</i> .	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
pIJ790	Plásmido de recombinación de lambda RED inducible por L-arabinosa, Cm <sup>R</sup> ; replicación sensible a temperatura.	Gust <i>et al.</i> , 2003

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitios de corte
SCO3375Forward (mutación <i>sco3375</i> )	5'-CCCCCggCCCTCAAgtTATCgATgAAAggAAATCCggTgA TTCCggggATCCGTCGACC-3'	
SCO3375Reverse (Mutación <i>sco3375</i> )	5'-CggCCgATggCgCCgCCggTggCgggggTCgggTgATCATGT AggCTggAgCTgCTTC-3'	
SCO4076Forward (Mutación <i>sco4076</i> )	5'-TCATCgCggAgATgCCgCACgAAgggACCgATATTCgTgAT TCCggggATCCgTCgACC -3'	
SCO4076Reverse (mutación <i>sco4076</i> )	5'-CgCTCCCGCCggACACCggCTCgCCTCgCgCACggCTCAT gTAggCTggAgCTgCTTC-3'	
SCO3375UP	5'-ATAACAaggACggCgATAC-3'	



(Verificación de la mutación sco3375)		
SCO3375Down (verificación de la mutación sco3375)	5'-AACCGCCCTggATCTCgT-3'	
SCO4076UP (verificación de la mutación sco4076)	5'-CCCAATTACAggCGAACAgT-3'	
SCO4076Down (verificación de la mutación sco4076)	5'-ggCgTgCTCCAgACTTTAg-3'	
Lsr2DomSalMNcol	5'-ggggCCATggTACATAAAgCCCTCCTAgCC-3'	<i>NcoI</i>
Lsr2DomSalMHind	5'-gCCAAgCTTCCACAAAgCGACTTgATCCC -3'	<i>HindIII</i>
SCO3375NcoI	5'-ggggCCATggCACAGAAggTTCAggTCCTT-3'	<i>NcoI</i>
SCO3375Hind	5'-gggAAgCTTgCCgTTggCCTgCTCgTAC-3'	<i>HindIII</i>
SCO4076NcoI	5'-ccggCCATggCgCgCgTgTCgTggTCA-3'	<i>NcoI</i>
SCO4076Hind	5'-gggAAgCTTCCgCgCCTCggCgAACgCCTC-3'	<i>HindIII</i>
sco3375NdeIEcoRI	5'-cgggCATATggCACAgAAggTTCAggTCCTT-3'	<i>NdeI</i>
sco3375EcoRID	5'-ggggAATTCTCgCCgTTggCCTgCTCg-3'	<i>NdeI</i>
sco4076NdeIF	5'-ggggCATATggCgCgCgTgTCgTggTCA-3'	<i>NdeI</i>
sco4076EcoRID	5'-ggggAATTCTCACCgCgCCTCggCgA-3'	<i>EcoRI</i>
DomLsr2NdeIF	5'-ggggCATATggTACATAAAgCCCTCCTAgCC-3'	<i>NdeI</i>
DomLsr2EcoRID	5'-ggggAATTCTCACCACAAAgCgACTTg-3'	<i>EcoRI</i>
ApraHyg1	5'-TgCAACAgTgCCgTTgATCgTgCTATgATCgACTgATgAC ACAAgAATCCCTgTTACTTCTC-3'	
ApraHyg2	5'-gCCCCTCCAACgTCATCTCgTTCTCCgCTCATgAgCTC AggCgCCgggggCggTgTC-3'	

## 7.2 Cepas, medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *Streptomyces* se almacenaron en forma de suspensiones densas de esporas en glicerol al 20% (v/v) a -20°C. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron: DH5 $\alpha$  para llevar a cabo los procesos de clonación, BL21 Rosetta 2 (Novagen) para la expresión de proteínas y ET12567/pUZ8002 como cepa donadora para las conjugaciones intergénicas, debido a la no metilación de DNA y a la presencia del plásmido “helper”. En cepas de *Streptomyces* con derivados del plásmido pIJ6902, se utilizó tioestreptón como inductor a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml.

Para *E. coli* se utilizó el medio líquido rico YT2X y los cultivos se crecieron a 37°C, con agitación. La obtención del micelio de *S. coelicolor*, las preparaciones de esporas, las transformaciones con polietilenglicol, y las conjugaciones se realizaron de acuerdo con los medios y las condiciones descritas por Kieser *et al.*, (2000).

## 7.3 Construcción de las mutantes nulas en *Streptomyces*.

Las deleciones en el cromosoma fueron generadas usando el sistema *ReDirect* empleando cósmidos de una librería de *S. coelicolor* (con el esqueleto del SuperCos1 conteniendo resistencia a kanamicina; Redenbach *et al.*, 1996). Los genes *sco3375* y *sco4076* de *S. coelicolor* M145 fueron sustituidos por el cassette de resistencia a apramicina *aac(3)IV* utilizando el procedimiento de PCR-targeting (Gust *et al.*, 2004).

La secuencia codificante de los genes (desde el codón de inicio al codón de termino) fue inicialmente reemplazada por un cassette que contiene el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) y un origen de transferencia *oriT* (proveniente del plásmido pIJ773). Los cósmidos StD25 y StE94, que contienen a los genes *sco3375* y *sco4076* respectivamente, fueron introducidos por electroporación a la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 (Datsenko y Wanner, 2000; Gust *et al.*, 2004) la cual expresa los genes del sistema Red del fago lambda. El cassette de resistencia a apramicina fue amplificado con pares de oligonucleótidos que generaron productos de PCR con extensiones de 36 pb correspondientes a las regiones flanqueantes de los genes a interrumpir. En el caso del gen *sco3375* se amplificó el cassette con los oligonucleótidos *sco3375Forward* y *sco3375Reverse*, y en el caso del gen *sco4076* se amplificó con los oligonucleótidos *sco4076Forward* y *sco4076Reverse* (Tabla 3). Estos productos de PCR fueron introducidos por electroporación en *E. coli* BW25113/pIJ790 con los cósmidos StD25 y StE94, respectivamente, resultando en el reemplazamiento del gen *sco3375* (para el caso del cósmido StD25), y *sco4076* (para el caso del cósmido StE94), por el cassette de resistencia a apramicina. Los cósmidos con las mutaciones fueron introducido por electroporación en *E. coli* ET12567/pUZ8002 y las colonias bacterianas resultantes fueron empleadas en conjugaciones con *S. coelicolor* M145 o M145pIJ6902(H)+*sco3375*. Las transconjugantes en las que el gen cromosómico fue reemplazado por el cassette mediante doble recombinación entre el cósmido mutante y el cromosoma de *S. coelicolor*, fueron identificadas replicando las colonias en medio MS conteniendo kanamicina o apramicina. Las colonias que fueron sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina se consideraron como las que perdieron los cósmidos y se realizó el reemplazo de los genes

cromosómicos con el cassette de resistencia. Dichos reemplazos se confirmaron mediante PCR, utilizando un par de oligonucleótidos para cada gen: SCO3375UP y SCO3375DOWN para el caso del gen *sco3375* y 4076UP y 4076DOWN para el caso del gen *sco4076*.

Las mutantes  $\Delta$ *sco3375* y  $\Delta$ *sco4076* sin el cassette de resistencia se obtuvieron mediante recombinación ente los sitios FRT que flanquean al cassette. Los cósmidos mutantes fueron electroporados en la cepa de *E. coli* BT340 (Datsenko & Wanner, 2000), la cual contiene un plásmido sensible a temperatura, y que codifica la recombinasa FLP. A 30°C el plásmido se replica y a 42°C la recombinasa FLP se expresa y el plásmido eventualmente se pierde. La recombinasa FLP reconoce los sitios FRT que flanquean al cassette de resistencia a apramicina y el resultado es la remoción del cassette, dejando una secuencia de 81bp (cicatriz).

Después de una noche de incubación a 42°C, se realizaron replicas en medio LB conteniendo kanamicina o apramicina, buscando la pérdida del cassette de resistencia, la confirmación del cassette de resistencia se realizó por PCR; empleando los pares de oligonucleótidos *sco3375UP/sco3375DOWN* y *sco4076UP/sco4076DOWN* (Tabla 3). Los cósmidos mutantes fueron posteriormente introducidos a las cepa *S. coelicolor*  $\Delta$ *sco4076::Apra* y  $\Delta$ *sco3375::Apra*. Inicialmente se seleccionaron colonias con resistencia a kanamicina, para asegurar la introducción de los cósmidos, las cuales se crecieron posteriormente sin presión selectiva, para después seleccionar las colonias sensibles tanto a kanamicina como a apramicina. Las mutantes nulas sin el cassette de resistencia se verificaron por PCR.

#### **7.4 Conjugación de *E. coli* ET12567/pUZ8002 con *S. coelicolor*.**

Las conjugaciones se realizaron conforme al protocolo de Kieser *et al.*, 2000. Los plásmidos o cósmidos fueron transformados en *E. coli* ET12567 (deficiente en la metilación), la cual además contiene el plásmido movilizador pUZ8002. Un cultivo líquido de ET12567/pUZ8002, conteniendo el plásmido o cósmido de interés, fue incubado toda la noche en medio líquido YT2X a 37°C a 200 rpm con los antibióticos necesarios para el mantenimiento del plásmido. Posteriormente 1 ml de este cultivo fue utilizado para inocular un matraz de 250ml con 20 ml de medio YT2X, el cual fue incubado a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de ~0.6. Después de la centrifugación a 6,000 rpm a 4°C, el pellet fue lavado con medio YT2X (al menos un par de veces) y se resuspendió en 1 ml del mismo medio.

Durante este proceso, 10  $\mu$ L de una preparación densa de esporas de *S. coelicolor* fueron añadidas a 500  $\mu$ L de medio YT2X, y se realizó un choque térmico a 50°C durante diez minutos, para posteriormente colocar las esporas en hielo. Se tomaron 500  $\mu$ L de las células de *E. coli* lavadas y se mezclaron con los 500  $\mu$ L de la dilución de esporas de *S. coelicolor*. La mezcla de células de *E. coli* y esporas fue centrifugada, y posteriormente se realizaron diluciones, las cuales fueron plaqueadas en cajas de medio MS e incubadas por 16 horas a 30°C. Posteriormente las exconjugantes fueron seleccionadas mediante la adición a cada caja de 1 ml de agua estéril con los antibióticos adecuados para cada plásmido (Kieser *et al.*, 2000).

## 7.5 Prueba de viabilidad de las esporas.

Para probar si las esporas mutantes son tan resistentes como la cepa parental a la temperatura, una suspensión de esporas diluida adecuadamente fue incubada a 60°C durante diferentes lapsos (0, 20 y 60 minutos). Después de la incubación las suspensiones de esporas fueron plaqueadas en medio MS a diferentes diluciones. Las cajas fueron incubadas 48 horas a 30°C. La tasa de supervivientes fue calculada como el número de colonias formadas en el medio después del tratamiento a 60°C dividido entre el número de colonias crecidas en el medio sin el tratamiento a 60°C, representado en porcentaje.

Para evaluar el efecto del detergente SDS en las cepas mutantes, las preparaciones de esporas de las cepas fueron incubadas en 5% SDS, 1% SDS o agua durante 1 hora a temperatura ambiente. Las diluciones fueron plaqueadas en medio MS e incubadas a 30°C durante 48 horas. El título de colonias supervivientes al tratamiento con SDS fue determinado en relación al número de colonias incubadas en agua.

## 7.6 Amplificación de los genes *sco3375*, *sco4076* y el fragmento Dom.Lsr2.

Los genes *sco3375* y *sco4076* se amplificaron a partir del DNA cromosomal de *S. coelicolor* M145 con los pares de oligonucleótidos *sco3375*Nco/*sco3375*Hind y *sco4076*Nco/*sco4076*Hind (Tabla 3), respectivamente. Los productos de PCR resultantes se purificaron y clonaron como fragmentos romos en el sitio *EcoRV* del vector pBluescript II SK. Los plásmidos resultantes se verificaron por secuenciación, y posteriormente los genes se subclonaron en el vector de expresión pET28a en los sitios *NcoI-HindIII*.

El fragmento del gen *salM* que codifica para el dominio Lsr2 de la metilasa M.SalI se amplificó a partir del gen silvestre *salM* de *S. albus* con el par de oligonucleótidos Lsr2DomSalMNco/Lsr2DomSalMHind (Tabla 3). El producto de PCR se clonó en el sitio *EcoRV* del vector pBluescript II SK, y el plásmido resultante se verificó por secuenciación. Posteriormente, el fragmento se subclonó en el vector de expresión pET28a en los sitios *NcoI-HindIII*.

## 7.7 Purificación de las proteínas Lsr2.

Los plásmidos derivados del pET28a con los diferentes genes clonados fueron introducidos a la cepa de *E. coli*, Rosetta 2, la cual codifica varios tRNAs para codones raramente utilizados por *E. coli*, pero utilizados en genes de *Streptomyces*.

Las células se crecieron en medio YT2X con kanamicina (50 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) a 37°C con agitación constante hasta llegar a una  $DO_{600}$  de 0.6. La expresión se indujo adicionando 1 mM de IPTG, continuando la incubación a 37°C durante 4 h a 200 rpm. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad en una columna de Níquel. Se utilizó un equipo FPLC ÄktaPrime Plus y una columna His-Trap (GE Healthcare). Las fracciones resultantes se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS, y se tiñeron con azul de Coomassie.

### **7.8 Cross-linking de las proteínas SCO3375 y SCO4076.**

Se añadieron distintas concentraciones de glutaraldehído a una preparación de proteína pura de SCO3375 y SCO4076 (6 µg), en buffer HEPES, pH: 8.0. Se tomaron alícuotas a los (0, 2, 10) minutos y fueron mezclados con buffer de Carga 2X, e incubadas a 65°C por 10 minutos. Las muestras fueron separadas en un gel al 14% de poliacrilamida-SDS. El gel fue analizado por medio de Western Blot con anticuerpo anti-His (SIGMA).

### **7.9 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).**

El DNA fue incubado por 30 minutos a temperatura ambiente con las cantidades indicadas de proteína en un volumen total de 20 µl en buffer que contiene 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 2.5% glicerol. Las mezclas DNA-proteína fueron cargadas en geles de poliacrilamida 3.5% para fragmentos pequeños o 1% de agarosa para fragmentos grandes y fueron corridos en buffer TBE 1x. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio.

### **7.10 Ensayo de protección contra la DNAsa I.**

120 ng del plásmido pUC19 fueron incubados durante 1 hora en presencia o ausencia de la proteína SCO4076, en un volumen final de 25 µl en buffer que contiene: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl. Posteriormente se añadió 1 unidad de DNAsa I (Gibco) y una concentración final 4mM de MgCl<sub>2</sub>, la mezcla fue incubada a 37°C durante 10 minutos. La reacción se detuvo con la adición de EDTA (0.5%) y la mezcla fue incubada a 75 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron tratadas con un volumen de fenol:cloroformo, el DNA fue precipitado y la electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%.

### **7.11 Microscopia de campo claro y fluorescencia.**

Después de 5 días de crecimiento de las cepas de *Streptomyces* en medio sólido MS, los cubreobjetos fueron colocados sobre el micelio aéreo, posteriormente fueron tratados con metanol frío, lavados 3 veces con PBS y el DNA fue teñido con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y montado en un portaobjetos. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Olympus BX51. La longitud de las esporas, el área del nucleóide y la fluorescencia fueron determinadas empleando el software ImageJ.

### **7.12 Producción de antibióticos.**

La producción de antibiótico fue realizada en medio sólido. Las cajas fueron inoculadas con 10<sup>3</sup> esporas. Para CDA las cepas fueron incubadas en medio NA a 30°C durante dos días. Posteriormente, las cajas fueron cubiertas con una capa de 5 ml de agar suave (conteniendo 60 mM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) inoculado con *B. subtilis* ATCC 6633 como el organismo sensible (0.2 ml, D.O.<sub>600</sub> 0.25) y se incubó de nuevo a 30°C. Una réplica sin Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> fue usada como control negativo. Para la determinación de undecilprodigiosina (RED) se empleó el medio PGA (Coco, 1991).

## 8. Resultados

### 8.1 Distribución de los genes que codifican homólogos de Lsr2 en *Actinobacteria*.

Todas las cepas de *Streptomyces* con el genoma secuenciado contienen dos genes que codifican proteínas homólogas a Lsr2, como se observa en la figura 5. Es posible observar que genes ortólogos de *sco3375* se encuentran ampliamente distribuidos en el suborden de los *Actinomycetes*. Fuera de los *Streptomyces* son pocos los genomas de actinobacterias que presentan ambas copias, mientras que algunos carecen de homólogos de estos genes. En algunos organismos se presentan más de dos parálogos de *Lsr2* en su genoma (Pérez-Rueda & Ibarra, 2015).

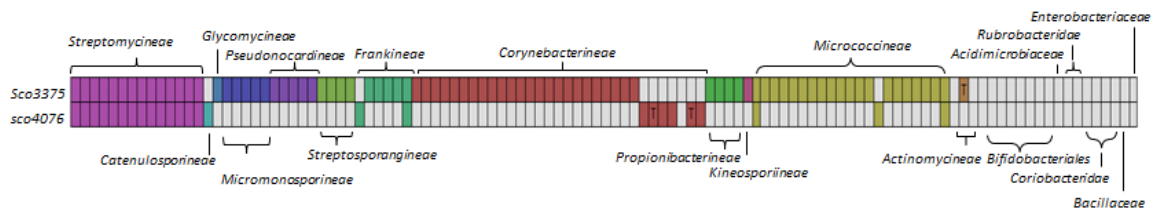


Figura 5. Distribución en el suborden *Actinobacteria* de genes ortólogos a los genes *sco3375* y *sco4076* de *S. coelicolor*, que codifican proteínas Lsr2. La figura fue adaptada de Chandra *et al.*, 2014. Se muestra el resultado de búsquedas BLASTP recíprocas con los productos de los genes *Lsr2* de *S. coelicolor*.

### 8.2 El gen *sco4076* de *S. coelicolor* no es esencial.

En *M. tuberculosis* se ha reportado que la proteína Lsr2 es esencial para el crecimiento, pero no así para *M. smegmatis*, donde se encuentra involucrada en un gran número de funciones biológicas como la organización del cromosoma o la regulación génica (Colangeli *et al.*, 2007). Con el fin de determinar si la proteína Lsr2 codificada por el gen *sco4076* es esencial, se obtuvo una mutante nula en dicho gen (Figura 6.A), como se describe en Material y Métodos. Esta mutante nula carente del gen *sco4076* fue viable, demostrando que dicho gen no es esencial. Además, la cepa mutante no presentó defectos visibles aparentes en la diferenciación morfológica en medio sólido (Figura 6.B).

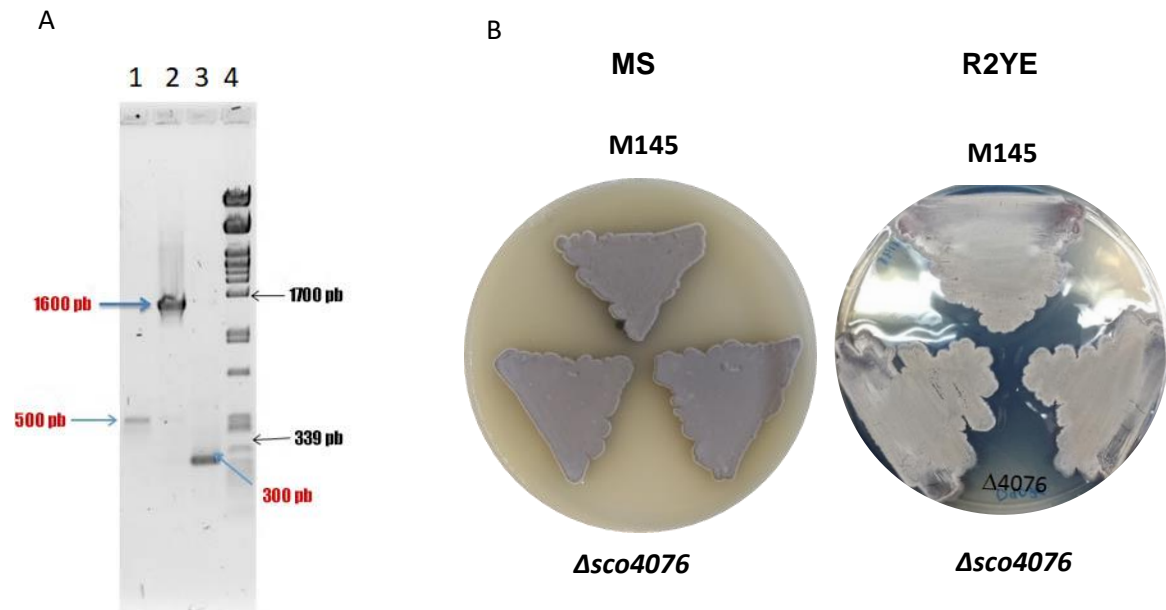


Figura 6. Obtención de una mutante nula en el gen *sco4076*. A) Verificación de la eliminación del gen *sco4076* por PCR. El carril 1 corresponde al gen *sco4076* amplificado de la cepa silvestre (500 pb), carril 2 al gen *sco4076* eliminado y sustituido por el cassette de resistencia a apramicina (1.6 kb), el carril 3 al gen *sco4076* eliminado y sustituido por la secuencia cicatriz y el carril 4 al marcador de peso molecular (DNA del fago lambda digerido con *Pst*I). B) Morfología de las cepas *S. coelicolor* M145 y  $\Delta sco4076$ , en medios MS y R2YE, después de ser incubadas 5 días a 30°C.

### 8.3 El gen *sco3375* de *S. coelicolor* M145 es esencial.

El sistema de mutagénesis *Redirect* antes descrito, ha sido el empleado para realizar las mutaciones en *S. coelicolor*, donde la selección de colonias sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina, después de la introducción del cósmido mutado, significa un reemplazo en el gen de interés. Normalmente estas cepas mutantes ocurren con una frecuencia de entre 10% y 50% de las exconjugantes. En el caso de los intentos para obtener la mutación en el gen *sco3375*, utilizando el cósmido StE94, no fue posible obtener exconjugantes con las características deseadas, aún después de analizar más de 2500 colonias exconjugantes. Es decir, no se logró obtener la sustitución del gen *sco3375* por el cassette de resistencia a apramicina en el cromosoma. La incapacidad de obtener mutantes nulos mediante el protocolo *Redirect* parecía indicar que el gen *sco3375* es esencial para *S. coelicolor*. Para demostrar lo anterior se utilizó una estrategia que consistió en insertar en el cromosoma un plásmido integrativo con el gen *sco3375* clonado, con el objetivo de tener una copia extra, y de este modo poder realizar la delección del gen silvestre en el cromosoma.

El plásmido empleado, pIJ6902, permite la expresión regulada del gen clonado, y por lo tanto el gen *sco3375* se clonó en este plásmido bajo el promotor  $P_{tipA}$ , inducible por tioestreptón. Dado que el plásmido pIJ6902 proporciona resistencia a apramicina, se

cambió el cassette de apramicina por uno de resistencia a espectinomicina. Las mutaciones con el cassette de resistencia a espectinomicina, no se lograron obtener, ni en la cepa silvestre (*S. coelicolor* M145), ni en la cepa con la copia extra del gen *sco3375* (pIJ6902+*sco3375*) después de analizar más de 1000 exconjugantes. El cassette de resistencia a espectinomicina requería una elevada concentración de antibiótico para la selección y afectaba la morfología de las colonias. Por lo cual esta estrategia se cambió.

El método siguiente fue emplear el cassette de resistencia a apramicina, pero para esto, se requería sustituir el gen de resistencia del pIJ6902 (apramicina, figura 7.A) por otro gen de resistencia. Para este fin se sustituyó el gen de resistencia a apramicina, *aac(3)IV*, por el de resistencia a higromicina (empleando los oligonucleótidos ApraHyg1 y ApraHyg2, tabla 3), sustituyendo solamente la secuencia codificante y manteniendo el promotor del gen *aac(3)IV*. Una vez construido este derivado del plásmido pIJ6902 ahora seleccionable con higromicina (pIJ6902(H), figura 7.B), se realizó nuevamente el método de doble recombinación, con el objetivo de obtener la sustitución del gen *sco3375* en el cromosoma.

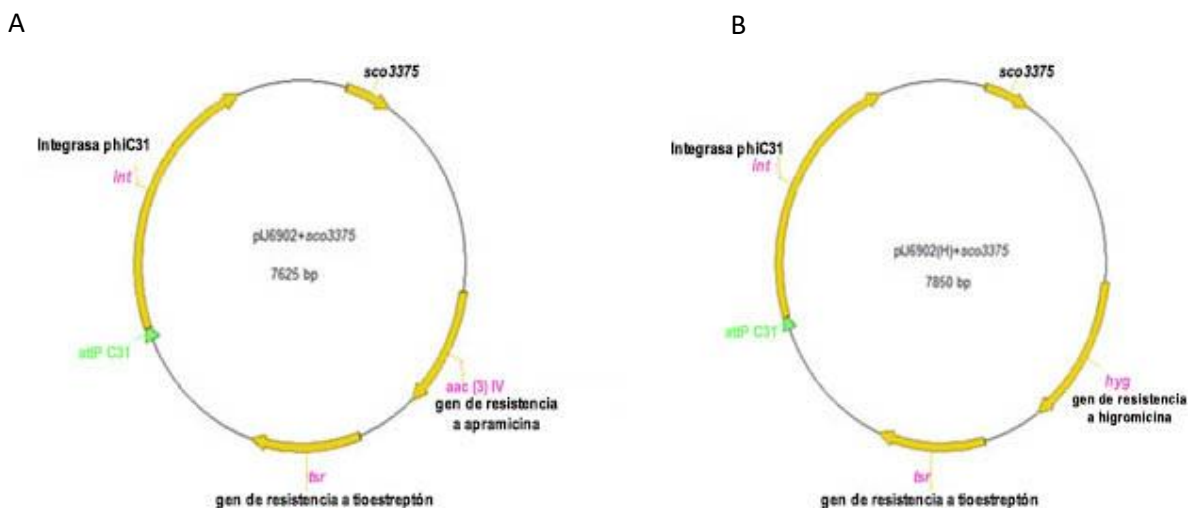


Figura 7. Esquema de los plásmidos integrativos. A) pIJ6902 con el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV*. B) pIJ6902(H) con el gen de resistencia a higromicina *hyg*.

Con este método se obtuvo una frecuencia de doble recombinación de aproximadamente 10% de exconjugantes en la cepa M145/pIJ6902(H)+*sco3375* (es decir resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina). Se realizó comprobación mediante PCR a 3 colonias, y en las 3 se encontró la sustitución del gen silvestre por el gen de resistencia a apramicina. A partir de una de estas colonias se eliminó el cassette de resistencia, dejando solamente la secuencia cicatriz (Figura 8). Este resultado confirmó que el cósmido utilizado sí poseía la estructura correcta y era capaz de recombinar para dar lugar a la delección del gen en el cromosoma.



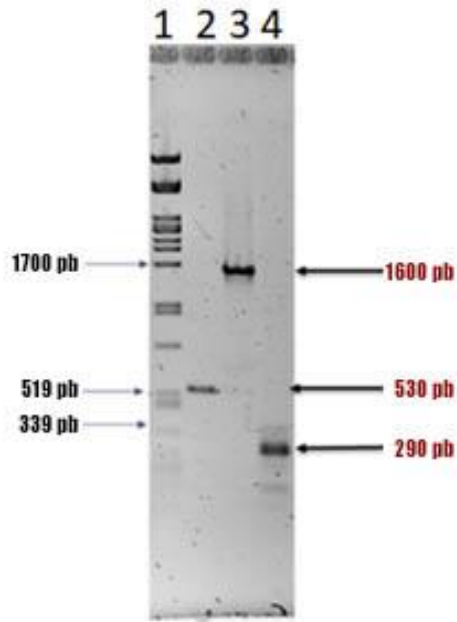


Figura 8. Verificación de la eliminación del gen *sco3375* en la cepa M145/pIJ6902(H)+*sco3375* por PCR. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al gen *sco3375* amplificado de la cepa silvestre (530 bp), el carril 3 al gen *sco3375* eliminado y sustituido por el cassette de apramicina (1.6 kb) en la cepa con la copia extra del gen en el pIJ6902(H), el carril 4 al gen *sco3375* eliminado y sustituido por la secuencia cicatriz (29 pb).

Adicionalmente, se realizó un intento de eliminar el gen en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 con el plásmido pIJ6902(H) vacío. Aunque se lograron obtener colonias sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina, al realizar el PCR con el DNA cromosomal, el producto resultante era del tamaño esperado para el gen silvestre (figura 9). Se realizó el PCR a todas las colonias que presentaban el fenotipo, y en todos los productos de PCR el tamaño observado correspondía al esperado para el gen silvestre. Este resultado, aunado a los anteriores, confirma que el gen *sco3375* es esencial en *S. coelicolor*.

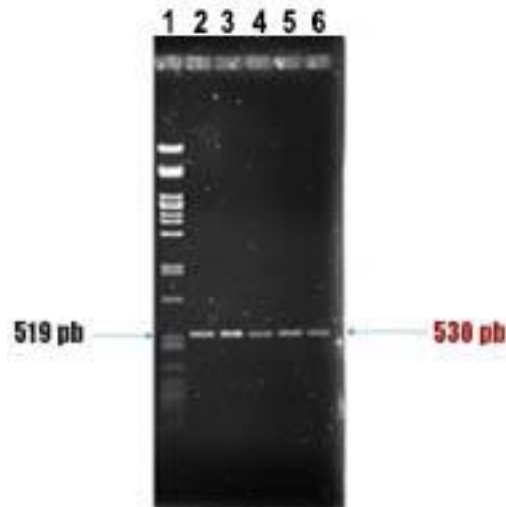


Figura 9. Producto de PCR de 5 colonias independientes con el fenotipo Kan<sup>S</sup>, Apra<sup>R</sup> de la cepa *S. coelicolor* M145/pIJ6902(H). Se observa que el tamaño del producto corresponde al del gen silvestre *sco3375*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, cepa silvestre M145; carriles 3 al 6, exconjugantes resistentes a apramicina y sensibles a kanamicina.

#### 8.4 Fenotipo de la cepa mutante $\Delta$ *sco3375*.

Una mutante nula en el cromosoma *sco3375* se obtuvo solo en presencia de una copia extra, clonada en el vector pIJ6902(H) lo que demuestra que este gen es esencial en *S. coelicolor* al igual que lo es el gen *Isr2* en *M. tuberculosis*. Con el objetivo de conocer si la mutación tenía algún efecto en el desarrollo, se crecieron las cepas en medio MS y R2YE (Figura 10). Es posible observar una deficiencia en el desarrollo de micelio aéreo y en la esporulación en la cepa  $\Delta$ *sco3375*; a pesar de que el medio contiene tioestreptón, y por lo tanto se asegura la expresión del gen *sco3375* clonado en el plásmido, el fenotipo no es restaurado al fenotipo silvestre. También se probó la producción del antibiótico dependiente de calcio (CDA) y se encontró que la mutante  $\Delta$ *sco3375* tiene una producción casi nula, mientras que la cepa silvestre y la cepa  $\Delta$ *sco4076* producen niveles que inhiben efectivamente el crecimiento de la cepa indicadora (*B. subtilis* ATCC6633, Figura 11A). Además, también se identificó la producción del antibiótico undecilprodigiosina (RED) en el medio PGA, y se observó una disminución en la producción en la cepa  $\Delta$ *sco3375* comparada con las cepas silvestre y  $\Delta$ *sco4076* (Figura 11B). El fenotipo silvestre no fue obtenido aun cuando se añadió tioestreptón al medio para asegurar la expresión del gen *sco3375* clonado en el plásmido. Estos datos sugieren que, aun cuando el gen *sco3375* clonado en el plásmido se expresan en niveles suficientes para permitir que la cepa sea viable, existe un fenotipo alterado, el cual pudiera deberse a diferencias en la regulación de la expresión del gen.

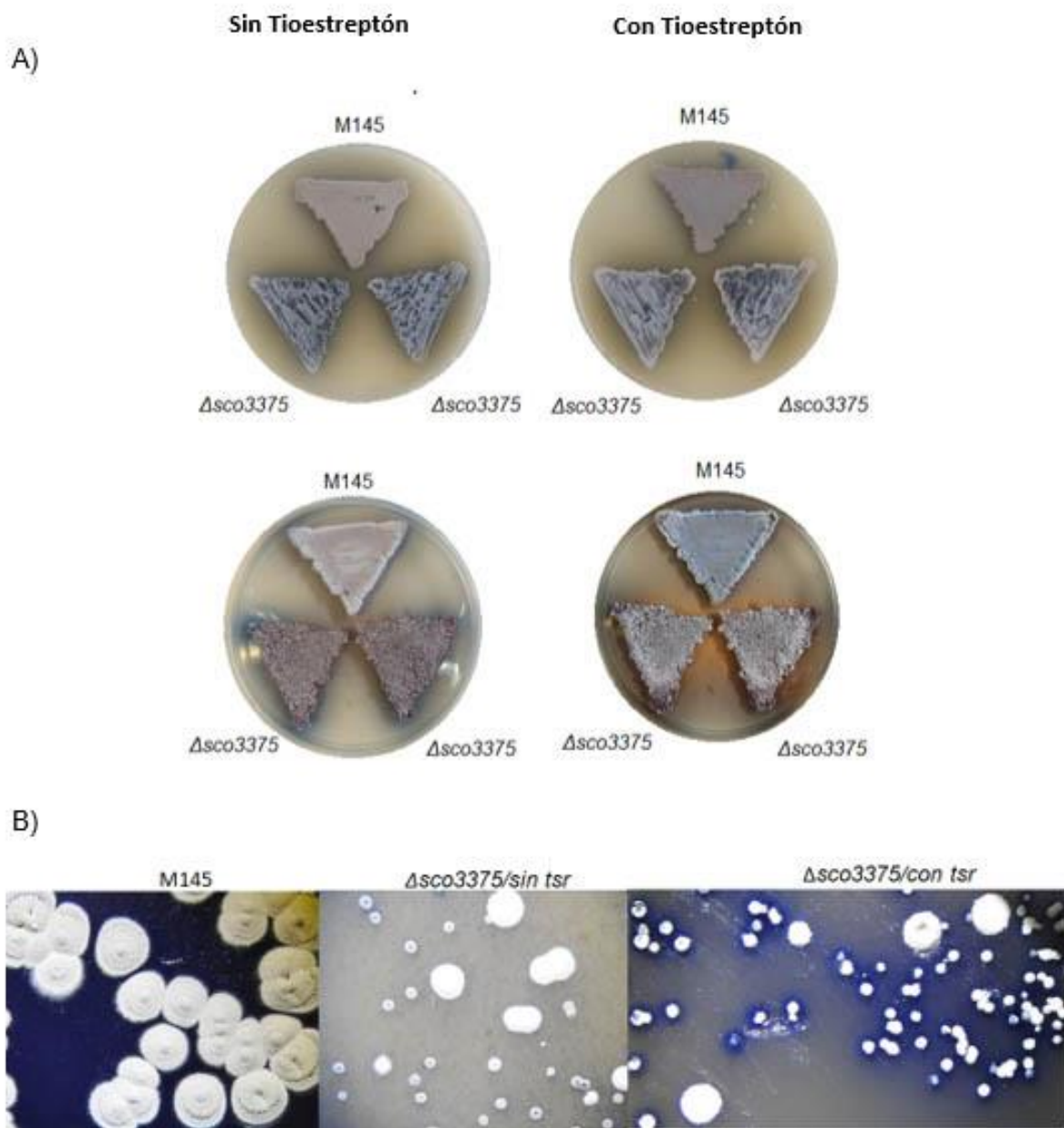
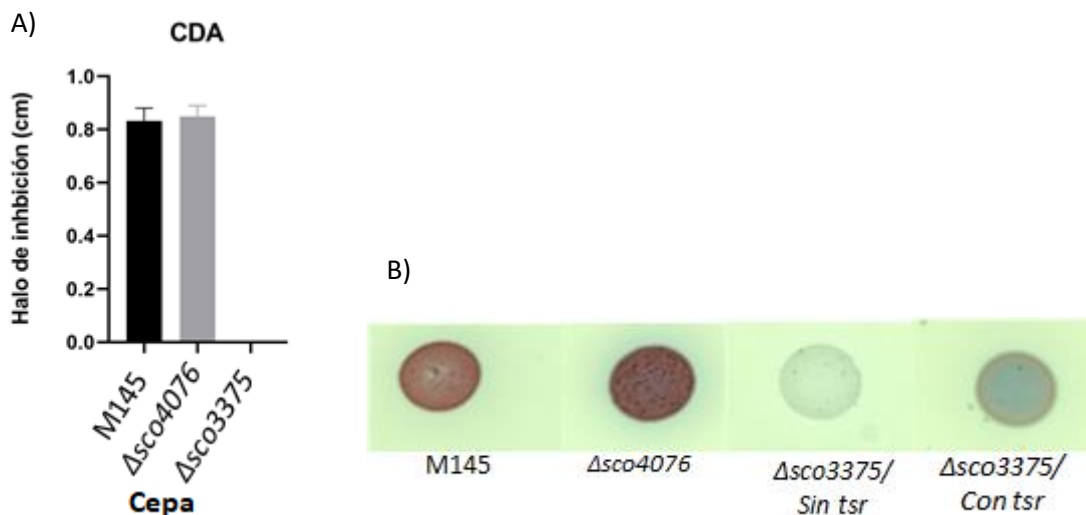


Figura 10. La eliminación del gen *sco3375* afecta la morfología de *S. coelicolor*. A) Morfología de las cepas M145 y  $\Delta sco3375$  en medios MS y R2YE. La incubación se realizó durante 5 días a 30°C. B) Morfología de las colonias en medio MS.



**Figura 11.** Producción de antibióticos por las cepas silvestre y mutantes. A) Producción de CDA en medio NA utilizando *B. subtilis* ATCC6633 como cepa indicadora. B) Producción de RED en medio PGA.

### 8.5 Las cepas $\Delta$ sco4076 y $\Delta$ sco3375 son sensibles a la temperatura y a SDS.

Las esporas de *Streptomyces* son relativamente resistentes a desecación, digestión enzimática y exposición a una temperatura moderadamente alta (McBride & Ensign, 1987). Para determinar si las esporas de las cepas mutantes eran igual de resistentes a una alta temperatura como la cepa silvestre parental, una suspensión de esporas de cada cepa fue incubada a 60°C durante 20 o 60 minutos. Las esporas fueron posteriormente plaqueadas en medio MS, e incubadas por dos días a 30°C para determinar la viabilidad de las mismas después del tratamiento con calor.

Es posible observar (Figura 12A) que existe un efecto mayor de la temperatura en las esporas de las cepas mutantes después de 20 minutos de incubación, ya que las esporas de la cepa silvestre presentaron una viabilidad de aproximadamente el 50%, mientras que las esporas de ambas cepas mutantes presentaron una viabilidad menor (aprox. 35% para la cepa  $\Delta$ sco4076 y de aprox. 20% para la cepa  $\Delta$ sco3375, independientemente de la presencia de tioestrepτόn. Por otro lado, el porcentaje de esporas viables a los 60 minutos fue de 17% para la cepa  $\Delta$ sco4076 y de 15% para las esporas de la cepa  $\Delta$ sco3375 incubadas con el inductor tioestrepτόn; se observó una clara disminución en la viabilidad cuando no se indujo la expresión del gen, ya que el porcentaje de esporas viables fue menor al 1%, mientras que la cepa silvestre el porcentaje de viabilidad a 60 minutos fue de 33% (Figura 12B).

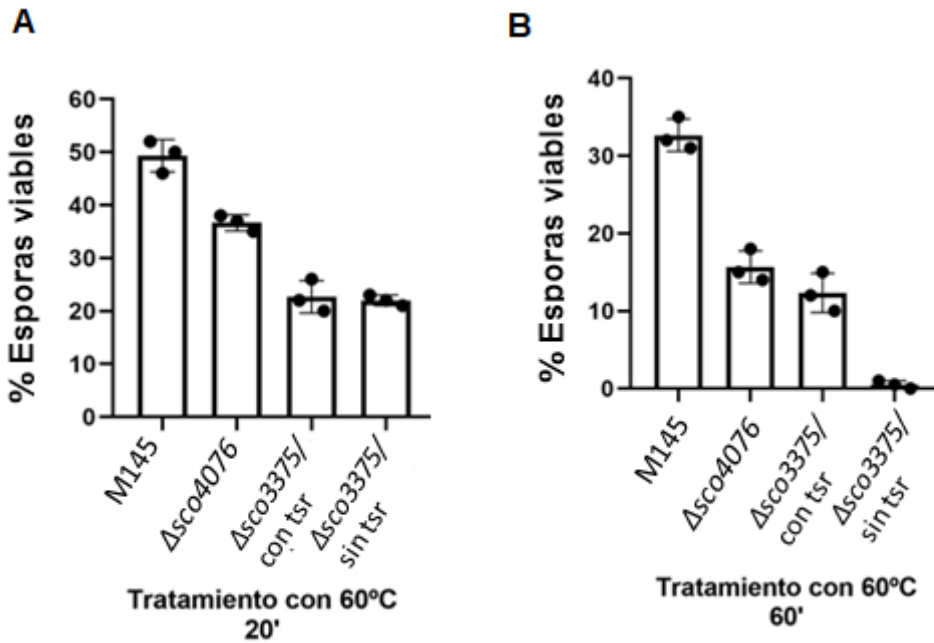


Figura 12. Efecto de las mutaciones  $\Delta$ sco4076 y  $\Delta$ sco3375 en la viabilidad de esporas de *S. coelicolor* y mutantes sometidas a calor. A) Tratamiento con calor a 60°C durante 20 min de las cepas M145 y  $\Delta$ sco4076,  $\Delta$ sco3375 con y sin tioestrepón. B) Tratamiento durante 60 minutos.

También se ha reportado que las esporas de *Streptomyces* son resistentes al tratamiento con SDS. El efecto del SDS en las mutantes  $\Delta$ sco4076 y  $\Delta$ sco3375 de *S. coelicolor* fue probado a concentraciones de SDS de 1% y 5%, usando agua destilada como control. Una suspensión de esporas fue incubada a temperatura ambiente por una hora con cada concentración de SDS, y posteriormente las esporas fueron plaqueadas e incubadas a 30°C por dos días. La concentración de 1% de SDS fue suficiente para que en las cepas mutantes  $\Delta$ sco4076 y  $\Delta$ sco3375 el porcentaje de supervivientes fuera del 7% y 5% respectivamente, mientras que en la cepa silvestre fue de aproximadamente el 50% (Figura 13A). A la concentración de 5% de SDS se hubo una disminución hasta el 1% y 3.5% de las cepas  $\Delta$ sco3375 y  $\Delta$ sco4076 respectivamente (Figura 13B).

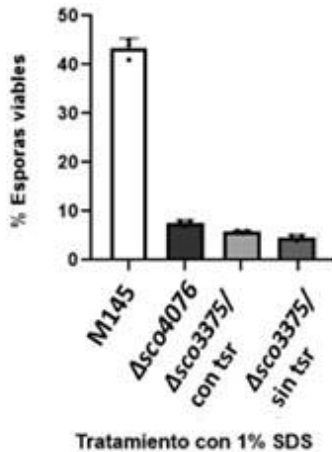
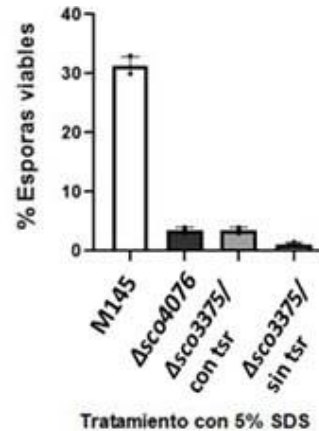
**A****B**

Figura 13. Efecto de las mutaciones  $\Delta$ sco4076 y  $\Delta$ sco3375 en la viabilidad de esporas tratadas con SDS. A) Tratamiento con SDS al 1% durante una hora. B) Tratamiento con SDS al 5% durante una hora.

### 8.6 Expresión de proteínas con la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal.

Con el fin de estudiar a las proteínas Lsr2, se decidió clonaras en un vector de expresión que colocara una etiqueta con seis histidinas. La etiqueta de histidinas, debido a su tamaño relativamente pequeño (2.5 kDa), se considera que no interfiere significativamente con la función y estructura de la mayoría de las proteínas (Gräslund, 2008), sin embargo, existen reportes donde se demuestra el efecto de la posición de la etiqueta de histidinas en la expresión y producción de proteínas (Ledent, 1997; Sabaty, 2013).

La expresión de las proteínas SCO4076 y SCO3375 y del dominio Lsr2 de la metilasa M.Sall (Dom.Lsr2) con la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo se realizó en la cepa de *E. coli* Rosetta 2 empleando el plásmido pET28a. La expresión fue inducida con 1mM de IPTG a una  $D_{0600}$  de 0.6. La determinación de la solubilidad de las proteínas se llevó a cabo utilizando el protocolo de Qiagen (The QIAexpressionist), y se observó que solo una pequeña parte de las proteínas sobre-expresadas SCO3375, SCO4076 y Dom.Lsr2 se encontraba en la fracción soluble.

A pesar de que se observaba la presencia de estas proteínas en la fracción soluble y se podían detectar las etiquetas de histidinas por Western Blot, en múltiples intentos de sobre-expresión y purificación de las proteínas SCO4076 y Dom.Lsr2, las proteínas no se podían purificar con alta eficiencia. Por lo anterior, se cambió la posición de la etiqueta de histidinas y se colocó en el extremo N-terminal. Empleando los oligonucleótidos

sco4076NdeIF/sco4076EcoRID y DomLsr2NdeIF/DomLsr2EcoRID (Tabla 3), y realizando las clonaciones como se mencionó anteriormente.

En este caso sí fue posible la purificación de las proteínas, como se describe en la siguiente sección.

### 8.7 Purificación de proteínas Lsr2.

Cuando las proteínas fueron purificadas inicialmente y se comenzaron a realizar los ensayos de unión a DNA, se observaba la presencia de DNA en las preparaciones de las proteínas SCO3375 y Dom.Lsr2 (Figura 14) sin embargo, no se observaba en la proteína SCO4076, por lo cual se realizó de nuevo la purificación de las proteínas, pero ahora de acuerdo al protocolo propuesto por Vingadassalon *et al.*, 2016, el cual incluye la adición de la nucleasa comercial *Benzonase*® al extracto celular (posterior al sonicado) e incubando la reacción 30 minutos a 37°C. Después de este tiempo se añadió MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 4 mM y 127 U de DNasa I y la reacción se mantuvo a 37°C durante 30 minutos más. El proceso de purificación se realizó como se menciona en Materiales y Métodos, y al final de la purificación se confirmó la ausencia de DNA en las muestras de proteína pura.

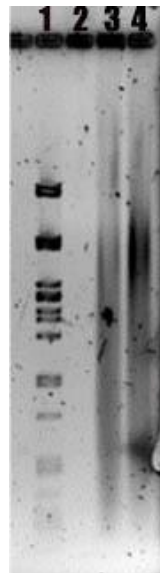


Figura 14. Presencia de DNA en las muestras concentradas de las proteínas purificadas. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a la muestra de la proteína SCO4076, el carril 3 a la proteína SCO3375 y el carril 4 a la proteína Dom.Lsr2.



## 8.8 Purificación de la proteína SCO3375.

La proteína SCO3375 se purificó tanto a partir de *E. coli* como de *S. lividans* 1326 con un alto grado de pureza, para lo cual se utilizaron los plásmidos pET28a y pIJ4123+sco3375, respectivamente, los cuales expresan la proteína con la etiqueta de histidinas. El fraccionamiento celular seguido de un análisis por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-His mostró que la proteína SCO3375 se encontraba en la fracción citosólica. En la figura 15 se muestra la purificación de la proteína SCO3375 a partir de *E. coli*.

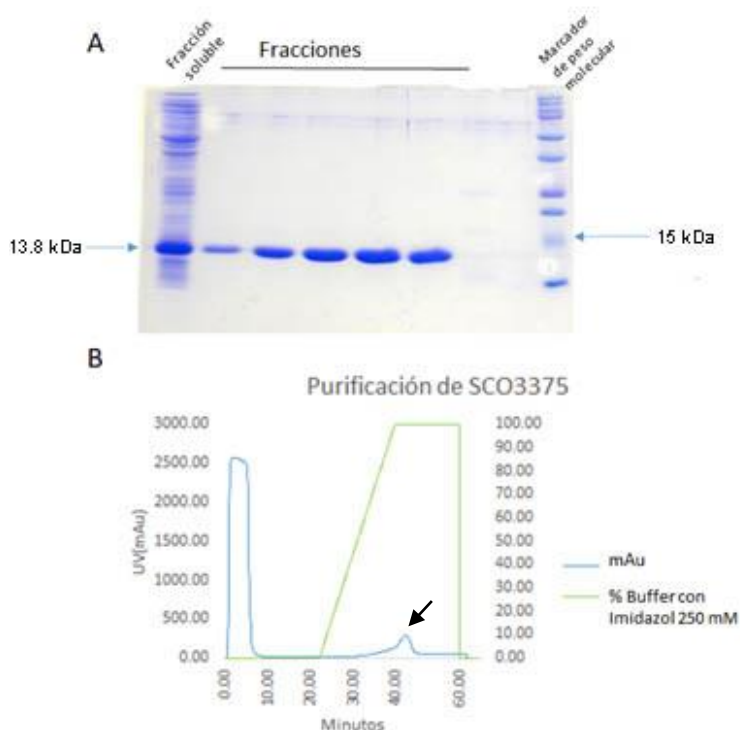


Figura 15. Purificación de la proteína SCO3375. A) se muestra el extracto soluble total que fue cargado en una columna His-Trap montada en un equipo ÄktaPrime Plus, así como las diferentes fracciones de la elución con imidazol. B) gráfica del proceso de purificación generada por el equipo ÄktaPrime donde se observa el pico correspondiente a la proteína pura.

La proteína SCO3375 se encuentra anotada como una proteína Lsr2-like, lo cual sugiere que la proteína tiene función de unión a DNA. Con el objetivo de conocer y probar esta posibilidad, se investigó la capacidad de la proteína SCO3375 de formar estructuras oligoméricas, lo cual es una característica de las proteínas asociadas al nucleóide, se añadió glutaraldehído a diferentes concentraciones (0.025%, 0.5%, 2.3%) a la proteína pura (6 µg por muestra) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (2 y 10 minutos). Se observó que la proteína SCO3375 forma complejos diméricos *in vitro* (Figura 16).



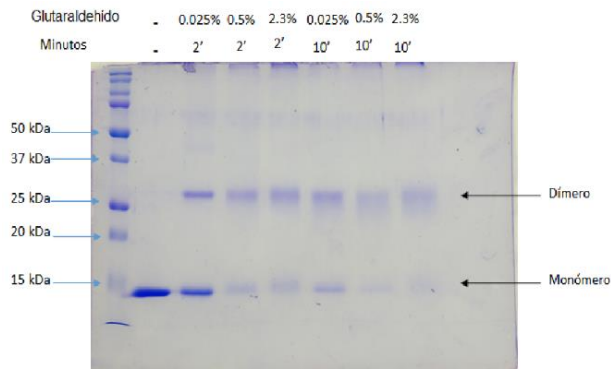


Figura 16. Dimerización de la proteína SCO3375. Se añadió glutaraldehído a diferentes concentraciones a la proteína pura (6 µg). Las alícuotas fueron removidas a los tiempos determinados, se incubaron a 65°C, durante 10' y posteriormente fueron sometidas a electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 14% y teñidas con azul de Coomassie.

Adicionalmente, y para revelar si existían complejos oligoméricos mayores a los dímeros, tanto la proteína purificada como la fracción citosólica de la cepa *S. lividans*/pIJ4123+sco3375 fueron tratadas con glutaraldehído al 0.025%, se tomaron alícuotas de la mezcla a los 2 minutos después de la adición de glutaraldehído y analizadas por Western blot después de ser sometidas a electroforesis desnaturalizante, como se observa en la figura 17. Es posible observar que, en el caso de la proteína pura (Figura 17A), existen tanto dímeros como oligómeros de orden mayor (probablemente trímeros y tetrámeros) que fueron detectados por el anticuerpo anti-histidinas. También fue posible la detección de dímeros en el extracto soluble de *S. lividans* (Figura 17B).

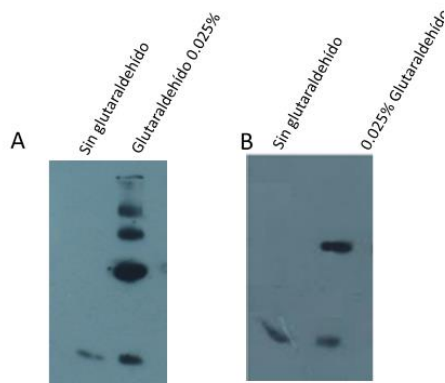


Fig 17. Oligomerización de SCO3375. A) Entrecruzamiento de SCO3375. Se añadió glutaraldehído (0.025%), a la proteína pura (6 µg) durante 2 minutos, se hirvió la muestra y se cargó en un gel al 14% de poliacrilamida. B) El glutaraldehído (0.025%) fue añadido a extracto celular de *S. lividans* 1326. Ambas muestras fueron detectadas con un anticuerpo anti-His.

## 8.9 SCO3375 interactúa de manera inespecífica con DNA.

Con el fin de determinar si la proteína SCO3375 tiene la capacidad de unirse a DNA de manera inespecífica, se realizaron ensayos de unión a DNA de doble cadena (dsDNA) de diferentes tamaños, mediante la técnica de EMSA (electrophoretic mobility shift assay). Inicialmente se estudió un dsDNA de 23 pb, y se observó que su corrimiento fue retrasado de una manera dependiente de la concentración de proteína SCO3375. A la concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  se formó el primer complejo definido, mientras que a concentraciones altas de proteína ( $>6 \mu\text{M}$ ) el DNA fue retrasado casi en su totalidad (Figura 18A). También se probó la habilidad de la proteína SCO3375 de unirse a DNA superenrollado (Figura 18B), como es un plásmido. La formación de los complejos DNA-Proteína se observó a concentraciones muy bajas de la proteína (0.033  $\mu\text{M}$ ). Además, se realizó la prueba de la capacidad de la proteína de asociarse a DNA de cadena sencilla (ssDNA), ya que se ha demostrado que es un sustrato para varias proteínas asociadas al nucleóide en otras bacterias (Hirano *et al.*, 1998). En la prueba con el ssDNA (Fig. 18C) se observó un retraso gradual respecto a la concentración de proteína y un aspecto a considerar es la cantidad de proteína requerida para el comienzo del retraso, que fue aparentemente menor que con el dsDNA.

Por último, se comparó la afinidad de unión a DNA lineal contra DNA circular o superenrollado. Como se observa (Figura 18.D) no existió una preferencia de la proteína por una topología del DNA, a diferencia de lo que se ha reportado en *Mycobacterium* en la cual existe una preferencia a DNA circular (Colangeli *et al.*, 2007). Estos resultados indican que la proteína SCO3375 se une al DNA de una manera independiente de secuencia y de topología, y puede formar varios complejos DNA-Proteína.

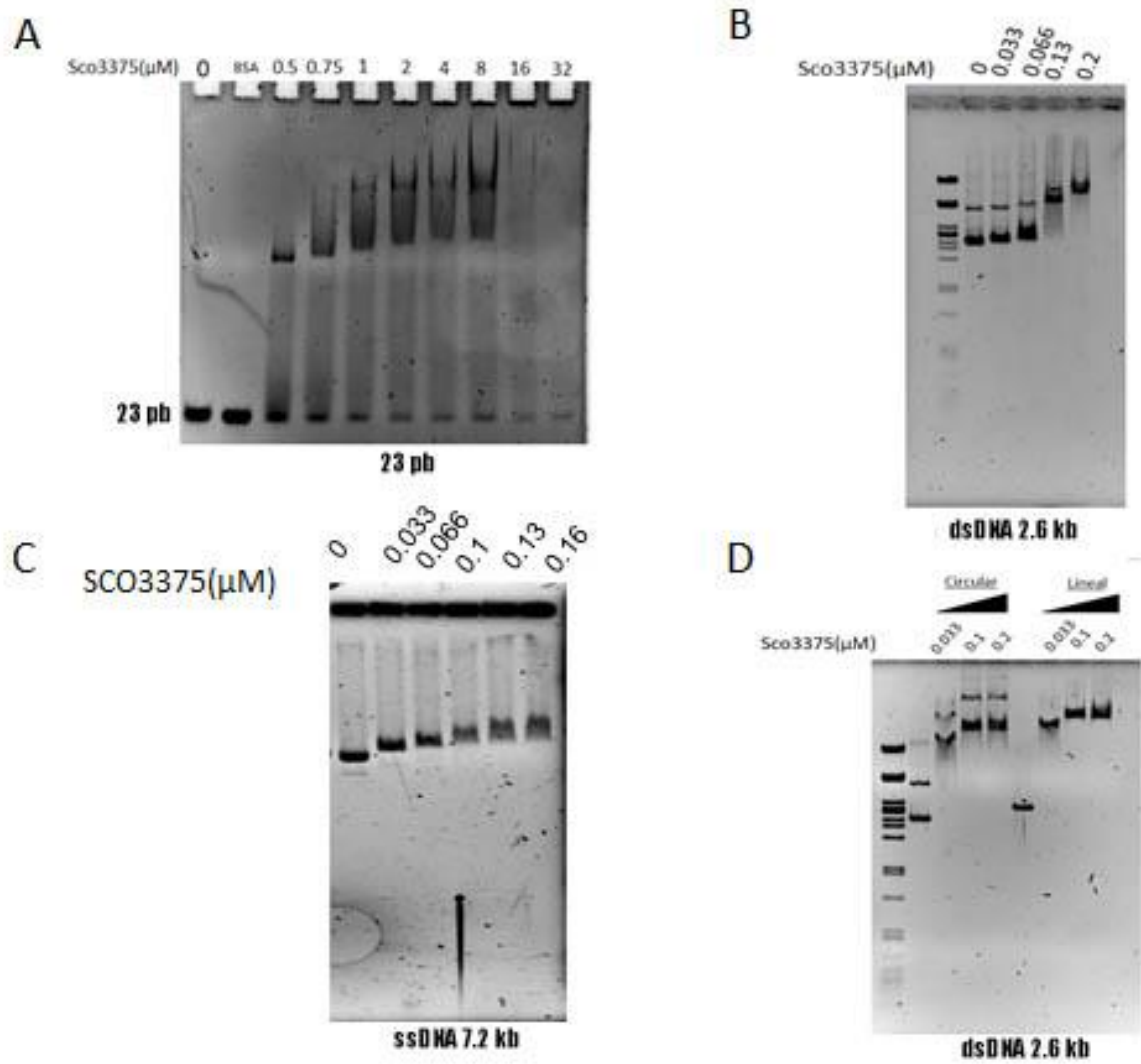


Figura 18. Unión de la proteína SCO3375 a DNA. Se observa la formación de complejo DNA-proteína mediante retraso en el corrimiento con concentraciones crecientes de SCO3375. Los DNAs utilizados fueron A) Fragmento de 23pb. B) Fragmento de DNA superenrollado, pUC19. C) ssDNA, M13mp18. D) DNA circular y lineal del plásmido, pUC19.

### 8.10 Purificación de la proteína SCO4076.

Con el fin de purificar la proteína SCO4076, el gen *sco4076* fue clonado en el plásmido pET28a, e introducido a la cepa Rosetta 2 de *E. coli*. A partir de ahí se expresó y se purificó la proteína con la etiqueta de histidinas en el extremo amino con una alta pureza (Figura 19).

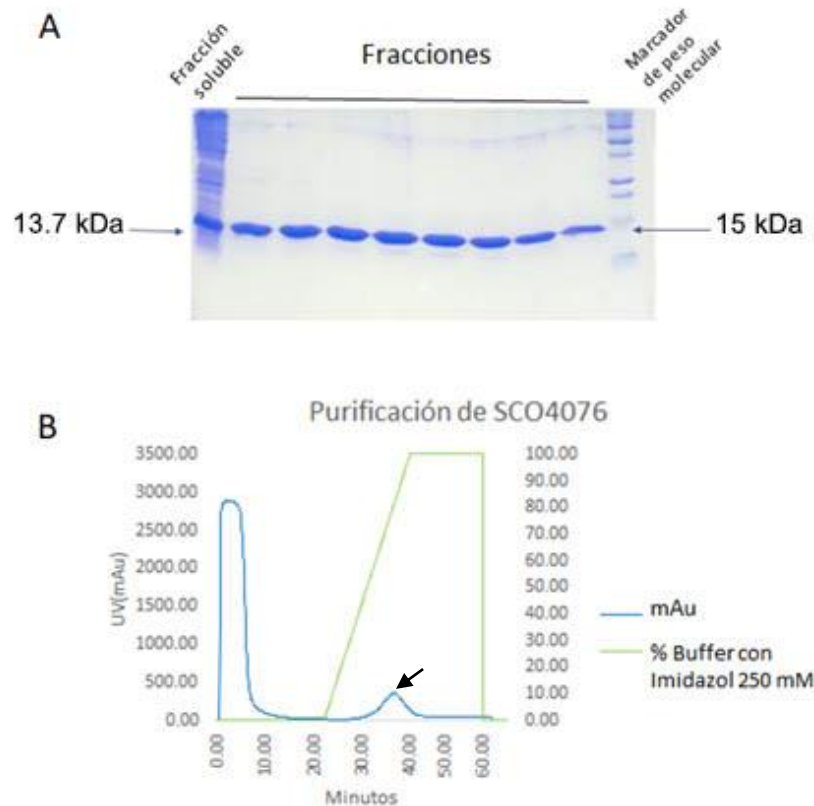


Figura 19. Purificación de la proteína SCO4076. A) se muestra el extracto soluble total que fue cargado en una columna His-Trap montada en un equipo ÄktaPrime Plus (carril 1), así como las diferentes fracciones de la elución con imidazol. B) Se muestra la gráfica generada por el equipo ÄktaPrime donde se observa la fracción purificada.

La proteína SCO4076 tiene un peso molecular predicho de 11.6 kDa y un punto isoeléctrico de 9.6. El fraccionamiento celular seguido de un análisis por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-His mostró que la proteína SCO4076 se encontraba en la fracción citosólica. Se probó que la proteína SCO4076 tuviera la característica de formación de complejos, por lo cual la proteína pura fue tratada con 0.1% de glutaraldehído, se tomaron alícuotas a 2 y 5 minutos y fueron analizadas por SDS-PAGE al 14%. Se observó

que la proteína SCO4076 sí logra formar complejos siendo más abundantes los dímeros, sin embargo, existen otras estructuras oligoméricas superiores (Figura 20).

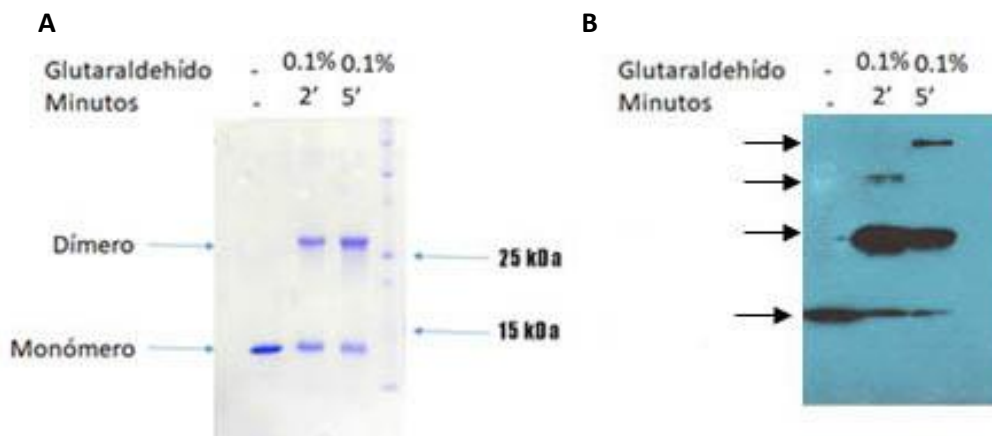


Figura 20. Dimerización de la proteína SCO4076. A) se añadió glutaraldehído al 0.1% a una solución de proteína pura (6 µg). Las alícuotas fueron removidas a los tiempos determinados, se incubaron a 65°C, durante 10' y fueron cargadas en un gel al 14% de poliacrilamida. B) Western blot utilizando un anticuerpo Anti-His.

### 8.11 La proteína SCO4076 interactúa de manera inespecífica con el DNA.

Con el fin de determinar si la proteína SCO4076, tiene la capacidad de unirse a DNA de manera inespecífica al igual que la proteína SCO3375, se realizaron los mismos ensayos de unión a DNA de diferentes tamaños. Con un fragmento pequeño de 23 pb se observó que la formación de complejos es dependiente de la concentración de la proteína, la formación del primer complejo ocurrió a la concentración de 1 µM (Figura 21A), el doble de la concentración necesaria para detectar complejos con la proteína SCO3375. La habilidad de unirse a DNA superenrollado también fue probada con esta proteína; interesantemente al emplearse la misma concentración de proteínas que SCO3375, la formación del complejo no generó un retardo de la misma magnitud. Sin embargo, sí se observó un cambio en la corrida respecto al DNA sin proteína (Figura 21B), lo cual puede sugerir un mecanismo o afinidad diferente de las dos proteínas con el DNA. Con la prueba de ssDNA se observó la formación de complejos DNA-Proteína con concentraciones similares a las de la proteína SCO3375 (Figura 21C). En la comparación de la afinidad con el DNA lineal y circular, se observó que interactúa de la misma manera con las dos topologías del DNA (Figura 21D), similar a lo que ocurre con SCO3375 y diferente a Lsr2 de *Mycobacterium*.

Estos resultados indican que la proteína SCO4076, al igual que la proteína SCO3375, se une al DNA de una manera independiente de secuencia y puede formar varios complejos DNA-Proteína.

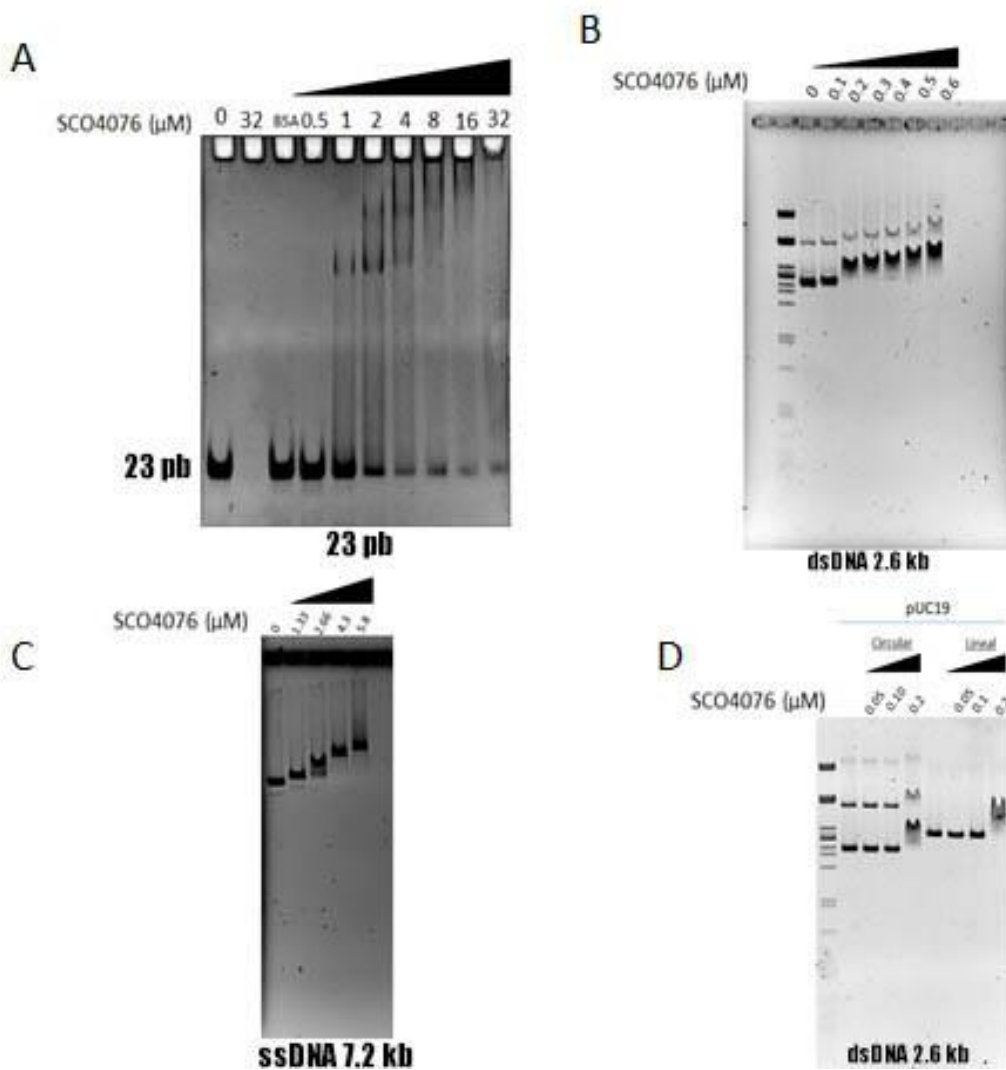


Figura 21. Unión de la proteína SCO4076 a DNA. Se observa la formación de complejo DNA-proteína mediante retraso en el corrimiento con concentraciones crecientes de SCO4076. Los DNAs utilizados fueron A) Fragmento de 23pb. B) DNA superenrollado, pUC19. C) ssDNA, M13mp18. D) DNA circular y lineal del plásmido pUC19.

### 8.12 Ensayo de protección contra DNasa I.

Las proteínas asociadas al nucleide son capaces de proteger al DNA de la degradación por la DNasa I (Grayling, 1997). Esta propiedad fue probada con la proteína SCO4076 (Figura 22). El plásmido pUC19 fue tratado con 1 Unidad de DNasa I durante 10 minutos a 37 °C. Se observó que la DNasa degradó totalmente el DNA en ausencia de SCO4076, así como con la presencia de BSA (5 µg). En contraste la actividad de la DNasa I fue considerablemente inhibida por la preincubación con la proteína SCO4076.

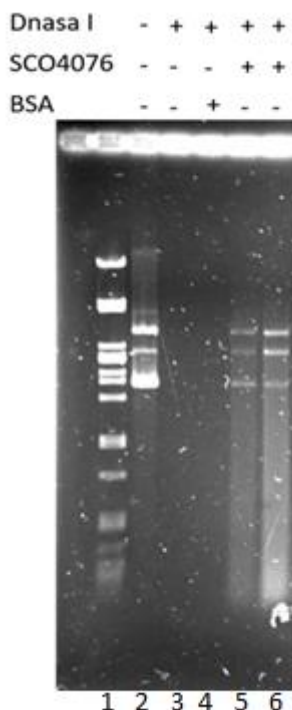


Figura 22. Ensayo de protección contra la degradación por la DNasa I. El plásmido pUC19 fue previamente tratado con la proteína SCO4076, posteriormente se añadió 1 U de Dnasa I, la reacción se incubó a 37°C durante 10 min. Se inactivó la reacción con EDTA y fue incubada a 75 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron tratadas con fenol:cloroformo y el DNA fue precipitado, para su posterior análisis en un gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, plásmido pUC19, Carril 3, pUC19 tratado con 1U de Dnasa I; Carril 4, pUC19 tratado con 5 µg de BSA y 1U de DNasa I; Carril 5, pUC19 tratado con 1.6 µg de SCO4076 y 1 U de DNasa I; Carril 6, pUC19 tratado con 3.2 µg de SCO4076 y 1 U de DNasa I.

### 8.13 Purificación del dominio Lsr2 de la metilasa M.SalI (Dom.Lsr2).

El dominio Lsr2 (Dom.Lsr2) es un dominio carboxilo-terminal de la metiltransferasa M.SalI, el cual muestra una identidad considerable con la proteína Lsr2. Este fragmento solo es encontrado en la metiltransferasa M.SalI y metiltransferasas relacionadas, pero no en otras metiltransferasas de otros sistemas de modificación-restricción. Por lo anterior estábamos interesados en determinar si el dominio Lsr2, el cual contiene conservada la secuencia putativa de unión a DNA, podía purificarse en forma aislada y unirse a DNA *in vitro*.

La proteína Dom.Lsr2 fue purificada de *E. coli* (Figura 23) y se obtuvo con un buen grado de pureza. Esta proteína tiene una masa de 15.1 kDa y un punto isoeléctrico de 8.5.

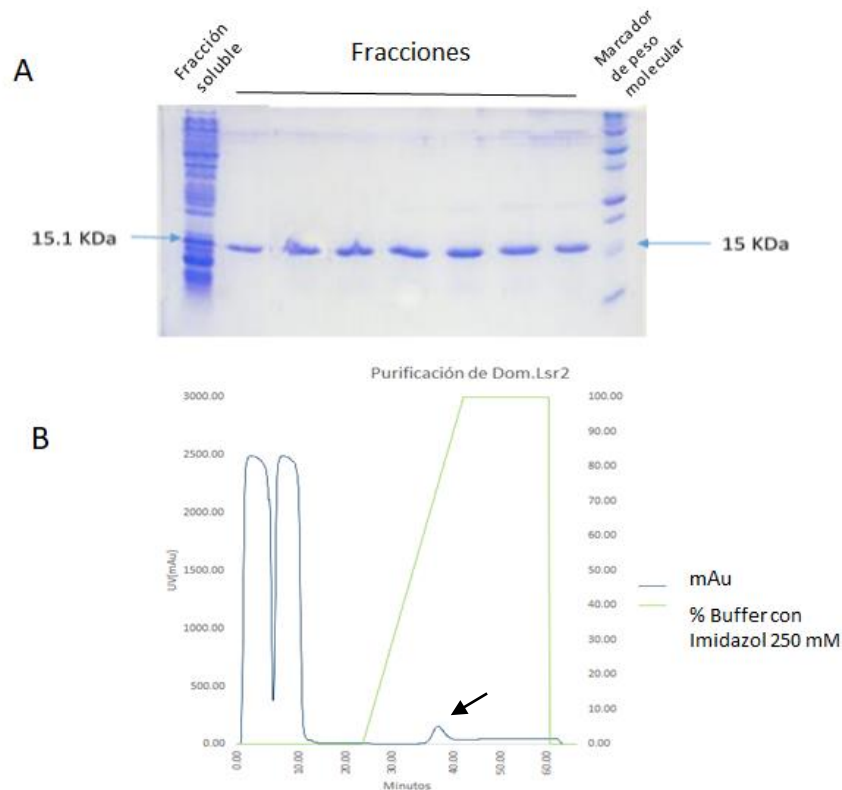


Figura 23. Purificación de la proteína Dom.Lsr2. A) se muestra el extracto soluble total que fue cargado en una columna His-Trap montada en un equipo ÄktaPrime Plus, así como las diferentes fracciones de la elución con imidazol. B) Se muestra la gráfica generada por el equipo ÄktaPrime donde se observa la fracción purificada.



### **8.14 Dimerización de la proteína Dom.Lsr2.**

La proteína Lsr2 se ha determinado como una proteína que forma estructura  $\alpha/\beta$  homodimérica (Summers,2012). Diez residuos se encuentran conservados dentro del Dominio N-terminal (1-55 aa) de la proteína Lsr2 (Asp-11, Asp-12, Phe-25, Tyr-32, Ile-34, Asp-35, Leu-36, Leu-44, Leu-48 and Trp-51), algunos de los aminoácidos relevantes en la formación de complejos oligoméricos, se encuentran conservados en el fragmento Dom.Lsr2 de M. Sall, sin embargo, no se lograron identificar complejos oligoméricos. Se debe considerar que es solo una fracción de la proteína M. Sall y posiblemente la dimerización ocurra en la proteína silvestre completa.

### **8.15 La proteína Dom-Lsr2 interactúa de manera inespecífica con el DNA.**

Se realizaron ensayos de EMSA con el objetivo de determinar si el dominio Dom.Lsr2 de la metilasa M.Sall puede unirse *in vitro* a DNA en forma inespecífica, como lo hacen las proteínas SCO3375 y SCO4076. La primera prueba fue un fragmento pequeño de dsDNA de 23 pb y, como se puede observar en la Figura 24A, al aumentar la cantidad de proteína, la cantidad de DNA libre comenzó a disminuir; sin embargo, no se logró formar un complejo DNA-Proteína claramente definido, a pesar de que la concentración de proteína empleada fue 10 veces mayor (5.3  $\mu$ M) que la necesaria para formar un complejo DNA-Proteína con SCO3375 (0.5  $\mu$ M). Con la prueba de DNA superenrollado sí se observó la formación de complejos, la cual fue dependiente de la concentración de proteína (Figura 24B). Un aspecto interesante para considerar es la cantidad de proteína requerida para la formación de complejos fue mayor a la requerida con las proteínas SCO3375 y SCO4076. El dominio Dom.Lsr2 también se pudo unir a ssDNA (Figura 24C), y en la comparación de la afinidad a la unión de DNA lineal o circular (Figura 24D), se muestra que el retardo ocurre de la misma manera en ambas muestras, similar a lo ocurrido con las proteínas Lsr2 de *S. coelicolor*.

Estos datos revelan que el dominio Dom.Lsr2 de la metilasa M.Sall sí pudo por sí solo unirse a DNA *in vitro*, que su unión fue dependiente de la longitud del fragmento, y que la secuencia de reconocimiento fue inespecífica. Estos resultados sugieren la posibilidad que este dominio sea importante para la actividad total de la metiltransferasa M.Sall.

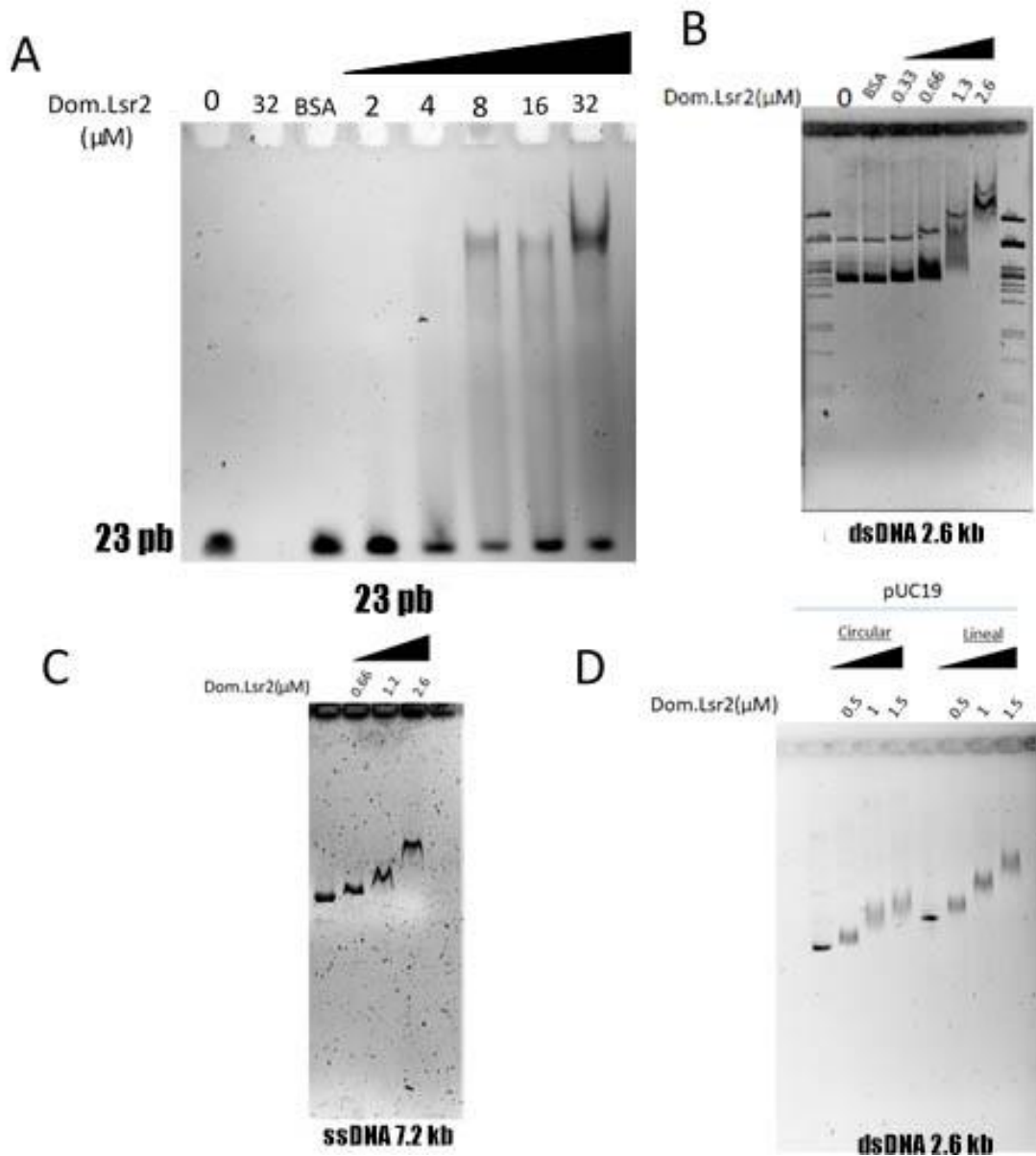


Figura 24. Unión del dominio Dom.Lsr2 a DNA. Se observa la formación de complejos DNA-proteína mediante retraso en el corrimiento con concentraciones crecientes de la proteína Dom.Lsr2. Los DNAs utilizados fueron A) Fragmento de 23pb B) Fragmento de DNA superenrollado, pUC19. C) ssDNA, M13mp18. D) DNA lineal y circular, pUC19.

## 8.16 Segregación y condensación de las esporas en la cepa mutante $\Delta$ sco3375.

Lsr2 es una proteína esencial en *M. tuberculosis*, pero no en la especie relacionada (no patógena) *M. smegmatis* (Le Moigne *et al.*, 2019), en la cual una cepa mutante sin Lsr2 presenta un efecto pleiotrópico. Cepas de *S. coelicolor* mutantes en las NAPs reportadas hasta ahora presentan aberraciones en la condensación y segregación del cromosoma, así como afectaciones, en la producción de antibiótico, en la viabilidad celular y en la esporulación.

Con el objetivo de conocer la funcionalidad de los genes en la viabilidad, desarrollo y segregación del cromosoma, se analizaron las cepas mutantes en los genes que codifican proteínas Lsr2 de *S. coelicolor*.

Debido a los resultados descritos anteriormente de los efectos por la delección del gen *sco3375* (afectaciones en la esporulación, en la viabilidad, y en la producción de antibióticos) nos interesamos en determinar si también se presentaban defectos en la organización del cromosoma durante la esporulación, como se ha descrito anteriormente para otras NAPs. Por lo cual se realizó una tinción de los cromosomas de *Streptomyces* con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se observaron bajo microscopía de fluorescencia (Figura 27). Inicialmente se analizó el contenido de DNA en las esporas ( $n > 2000$ ), obteniendo un porcentaje mayor de esporas anucleadas en la cepa  $\Delta$ sco3375, de 4.5% respecto de la cepa silvestre M145. Cuando se añadió tioestreptón al medio el porcentaje de células anucleadas bajó a 1%. También se midió el área del nucleóide de las cepas, y se observó que la cepa silvestre presentó un nucleóide más compacto respecto a la mutante  $\Delta$ sco3375 con un promedio de  $0.30 \mu\text{m}^2$  y  $0.46 \mu\text{m}^2$  respectivamente. En la figura 25 se presenta la distribución de las áreas de los nucleóides por cada cepa y se observa como en la cepa  $\Delta$ sco3375 se encuentra en la región de mayor tamaño.

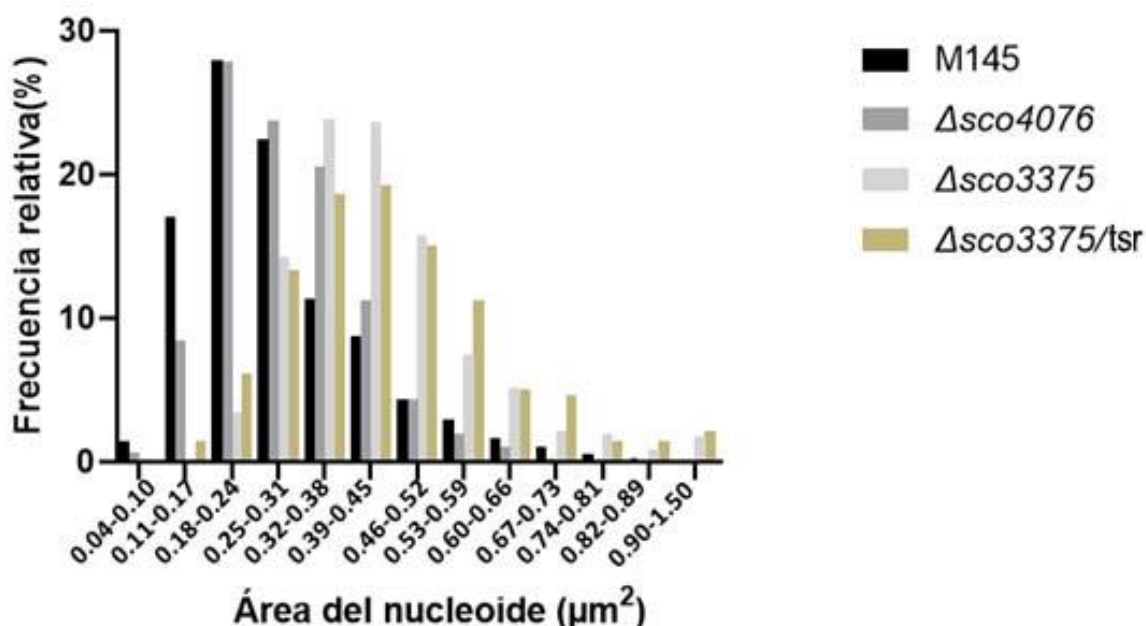


Figura 25. Distribución del área de los nucleóides de las cepas M145,  $\Delta$ sco4076,  $\Delta$ sco3375 y  $\Delta$ sco3375 crecida con tioestreptón. Se midió el área de 600 esporas por cada cepa.

Cuando comparamos la longitud de la espora se encontró que la distribución se mantenía, el promedio de la longitud de las esporas fue 0.75  $\mu\text{m}$  para las esporas silvestres y 0.9  $\mu\text{m}$  en la cepa  $\Delta\text{sco3375}$ . En la gráfica de cajas (Figura 26) se muestra que las longitudes de las esporas son estadísticamente diferentes, y que al añadir tioestreptón el fenotipo no fue restituido al fenotipo silvestre, algo que ya se había observado en la prueba de resistencia a la temperatura y al SDS.

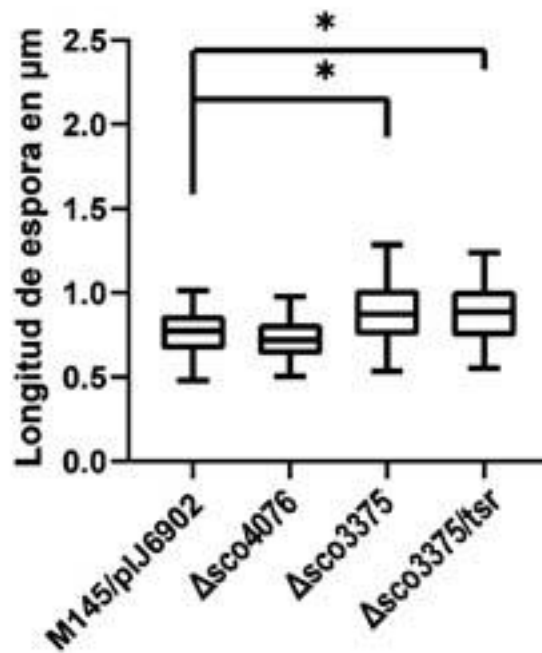


Figura 26. Distribución de la longitud de las esporas de las cepas M145,  $\Delta\text{sco4076}$ ,  $\Delta\text{sco3375}$  y  $\Delta\text{sco3375}$  crecida con tioestreptón. Los datos son presentados como diagrama de caja. El número de esporas medidas fue superior a 500 para cada cepa. Los bigotes representan los percentiles al 5% y 95%. Todos los valores P fueron calculados utilizando una prueba de  $t$  de una cola (\* $P < 0.001$ ).

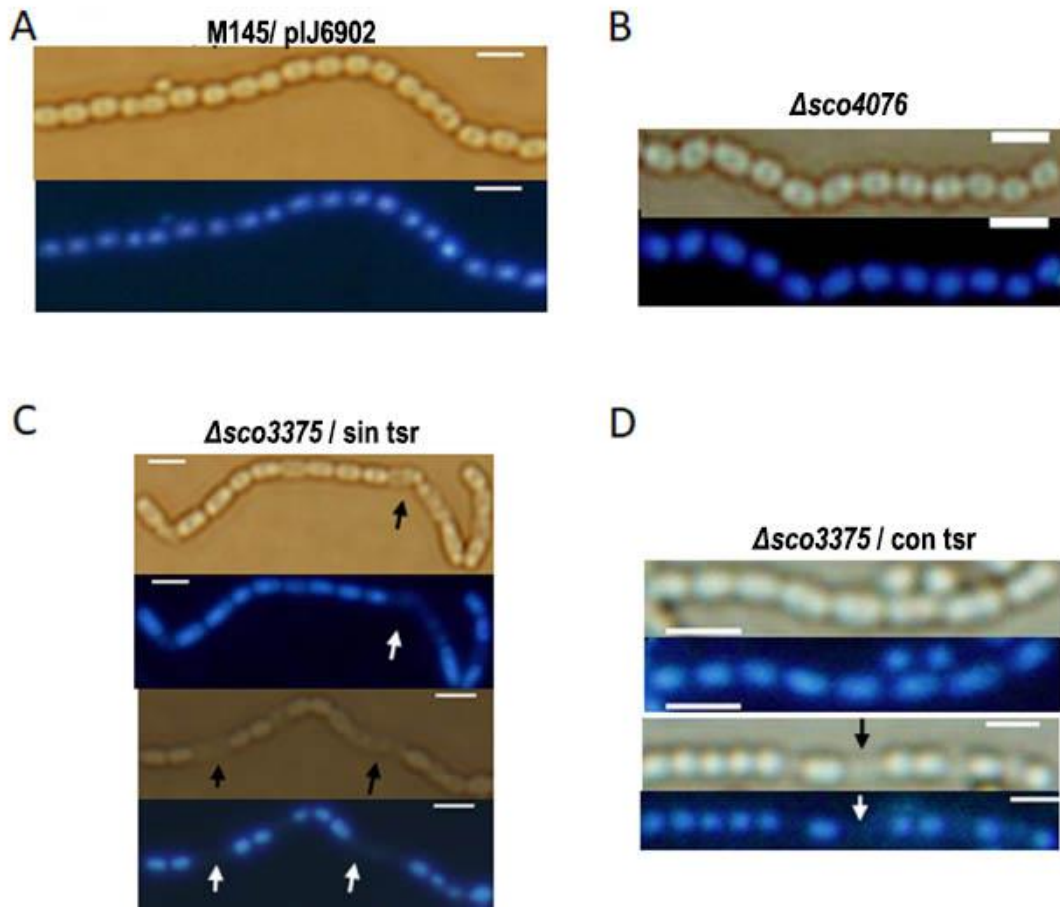


Figura 27. Influencia de la delección del gen *sco3375* en la segregación del cromosoma, tinción del DNA con DAPI. A) *S. coelicolor* M145, con el plásmido vacío pIJ6902. B) Mutante  $\Delta$ *sco4076*. C) Mutante  $\Delta$ *sco3375* sin tiorstreptón. D) Mutante  $\Delta$ *sco3375* con tiorstreptón. Las esporas anucleadas están señaladas con una flecha.

La barra de escala: 2 μm.

### 8.17 Construcción de mutante nula $\Delta Sli\_3719$ .

*S. lividans* es una especie cercanamente relacionada a *S. coelicolor*, inclusive a nivel genómico, aunque presentan algunas diferencias fisiológicas y morfológicas (Lewis *et al.*, 2010). Para investigar el papel del gen homólogo a *sco3375* en *S. lividans* (*Sli\_3719*) se realizó la delección en la cepa silvestre *S. lividans* 1326 (Figura 28). Interesantemente este gen se pudo eliminar fácilmente del cromosoma en *S. lividans* 1326, aún en ausencia de un gen que lo complementara en *trans*, a diferencia de lo observado en *S. coelicolor*.

Para detectar las alteraciones putativas en la producción y/o en el desarrollo morfológico de *S. lividans*, la cepa mutante  $\Delta Sli\_3719$  fue comparada con la cepa silvestre. Las dos cepas fueron crecidas en distintos medios solidos complejos (R2YE, LB, NA, GYM) a 30°C. La cepa  $\Delta Sli\_3719$  no mostraba diferencias en el desarrollo morfológico en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, sí se mostró un aumento en la producción de antibióticos en todos los medios probados (Figura 29).

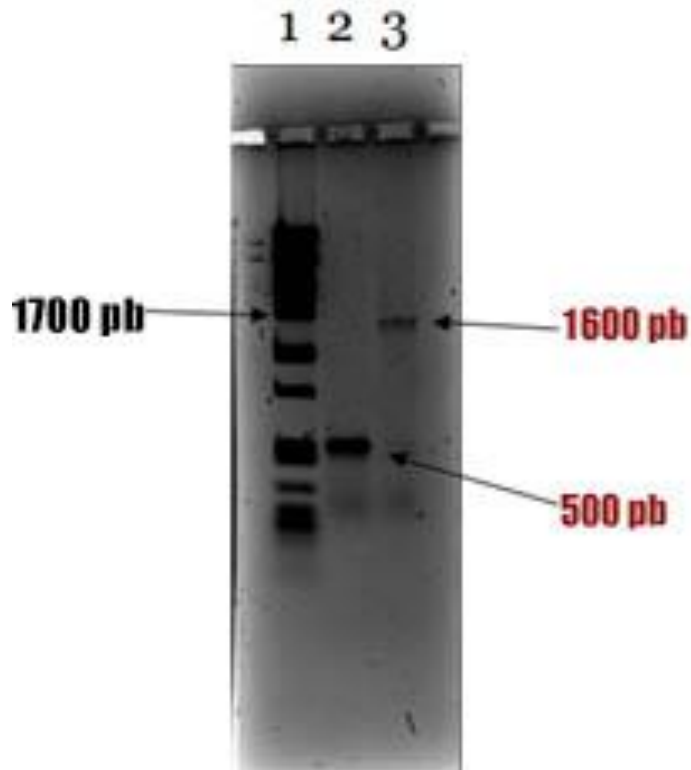


Figura 28. Verificación de la mutación del gen *Sli\_3719* en *S. lividans*. Carril 1.- marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al gen *Sli\_3719* amplificado de la cepa silvestre (530 pb), carril 3 al gen *Sli\_3719* eliminado y sustituido por el cassette de resistencia a apramicina (1.6 kb).

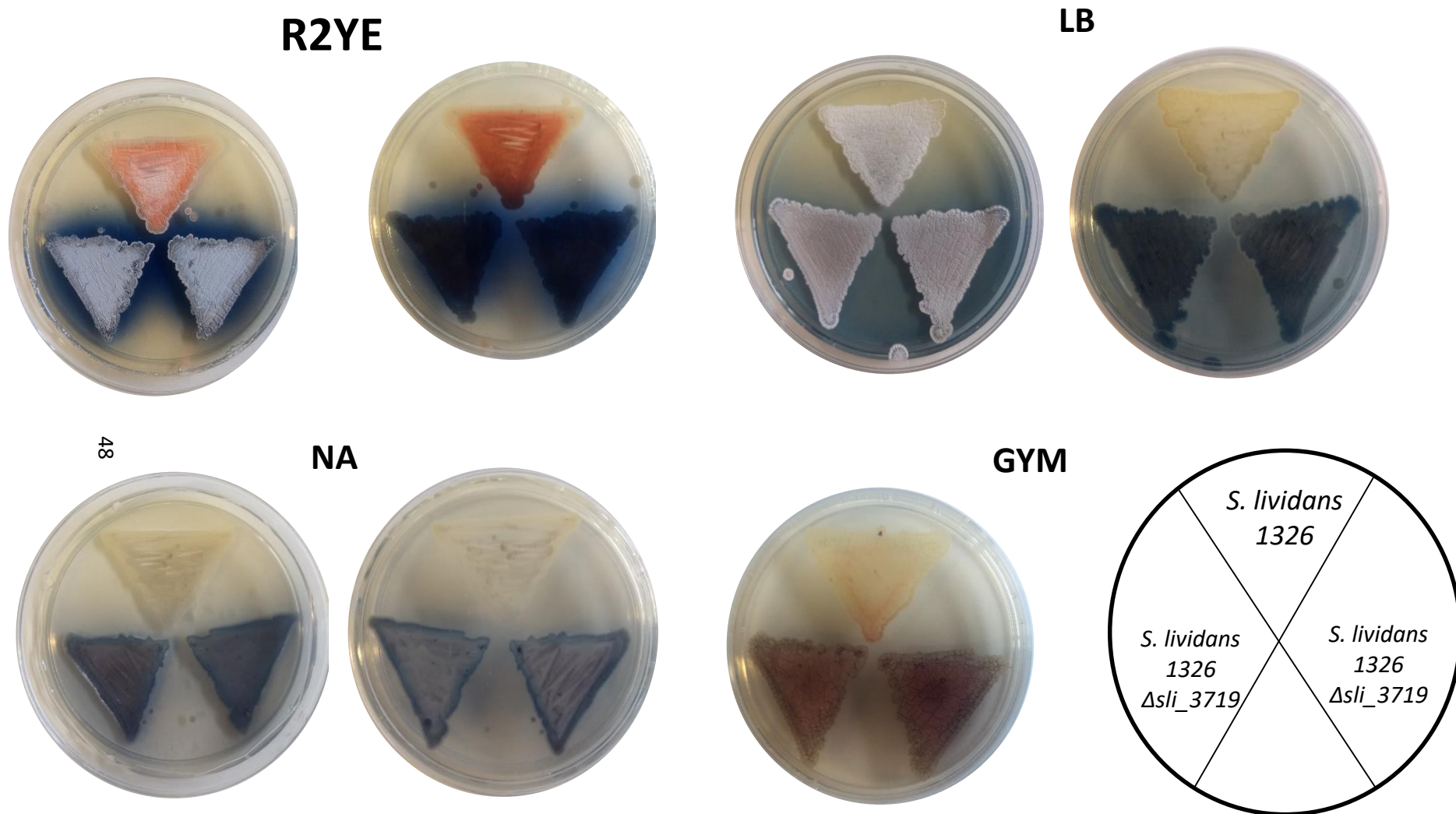


Figura 29. Fenotipo de las cepas *S. lividans* 1326,  $\Delta$ *Sli*\_3719 crecidas a 30°C durante 6 días. Los medios empleados fueron medios complejos; R2Y3, LB, NA y GYM.

También se realizó la comparación del tamaño de los nucleoides de la cepa silvestre *S. lividans* 1326 y su derivada mutante  $\Delta Sli\_3719$  (Figura 30). En este análisis se consideró la longitud del nucleoide, por lo cual la longitud de 600 nucleoides fue determinada para cada cepa. El promedio de la longitud para la cepa silvestre fue de 0.75  $\mu\text{m}$  y la cepa  $\Delta Sli\_3719$  corresponde a 0.93  $\mu\text{m}$ . También en la distribución de los nucleoides se observa como existe una mayor distribución en las longitudes de mayor tamaño en la cepa  $\Delta Sli\_3719$ .

Esto se ve reflejado en el número de nucleoides presentes en los compartimentos pre-espora en un intervalo dado en la hifa esporogénica. Por ejemplo, *S. lividans* 1326 presenta 10 nucleoides en un intervalo de 12  $\mu\text{m}$  y la mutante tiene 8 nucleoides en el mismo intervalo.

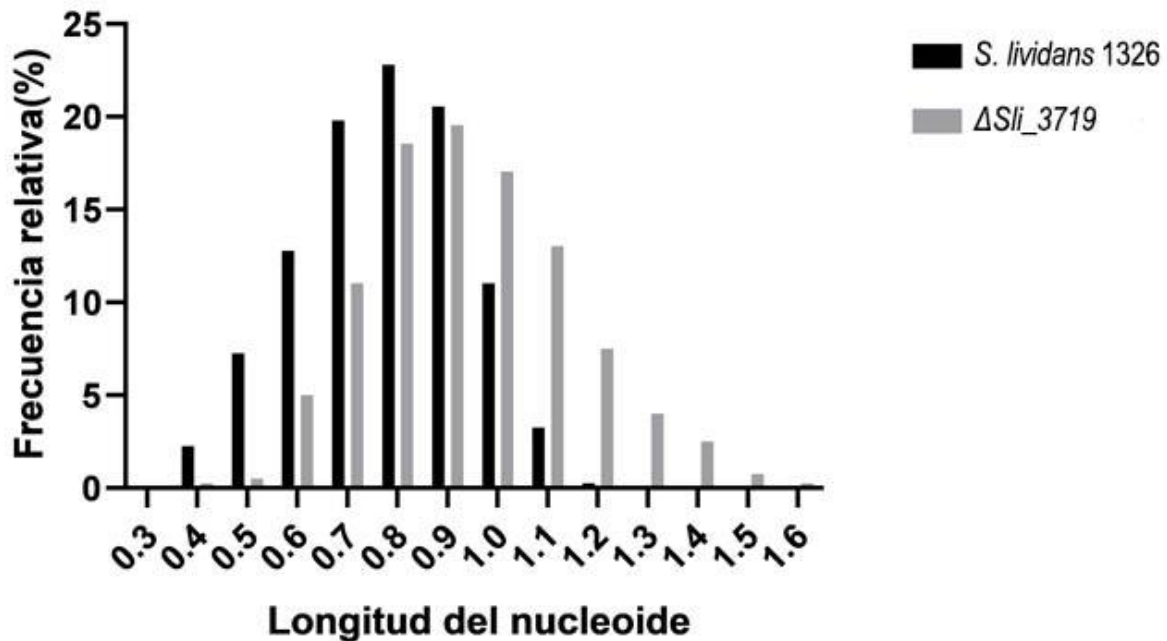


Figura 30. El histograma muestra la distribución de la longitud de los nucleoides de las cepas *S. lividans* 1326 y mutante,  $\Delta Sli\_3719$ . 600 esporas fueron medidas por cada cepa. El histograma fue realizado graficando los porcentajes de nucleoides por intervalos de  $\mu\text{m}$ , a través de 0.3 a 1.6  $\mu\text{m}$ .



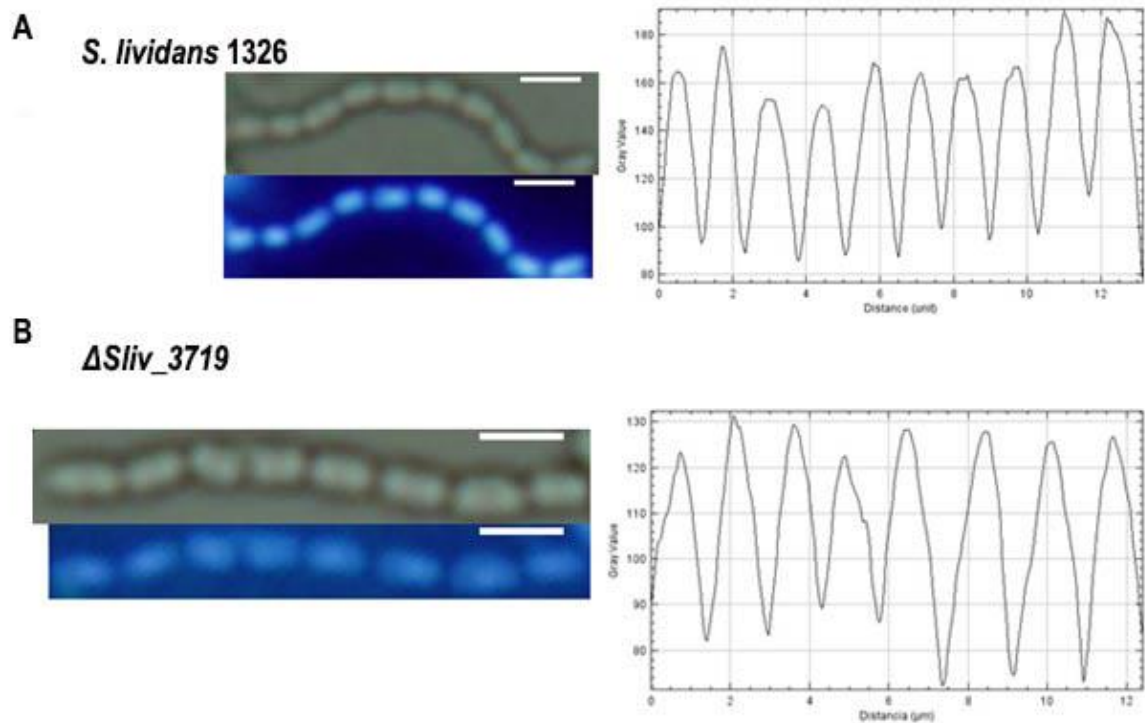


Figura 31. Perfiles de fluorescencia de los nucleoides teñidos. A) *S. lividans* 1326, B) cepa mutante  $\Delta$ *Sli*<sub>3719</sub>. Las imágenes empleadas para determinar los perfiles, son mostradas a un costado de la gráfica de fluorescencia relativa a través de una distancia de 12  $\mu$ m.

La barra de escala: 2  $\mu$ m.

También se realizó la medición de las esporas de las cepas *S. lividans* 1326 y mutante  $\Delta Sli\_3719$ , observándose que el promedio de la longitud de las esporas fue  $0.85\mu\text{m}$  para las esporas silvestres y  $1.1\mu\text{m}$  en la cepa  $\Delta Sli\_3719$ . En la figura 32 se muestra la gráfica de cajas de la distribución de las longitudes, y presenta una diferencia estadística.

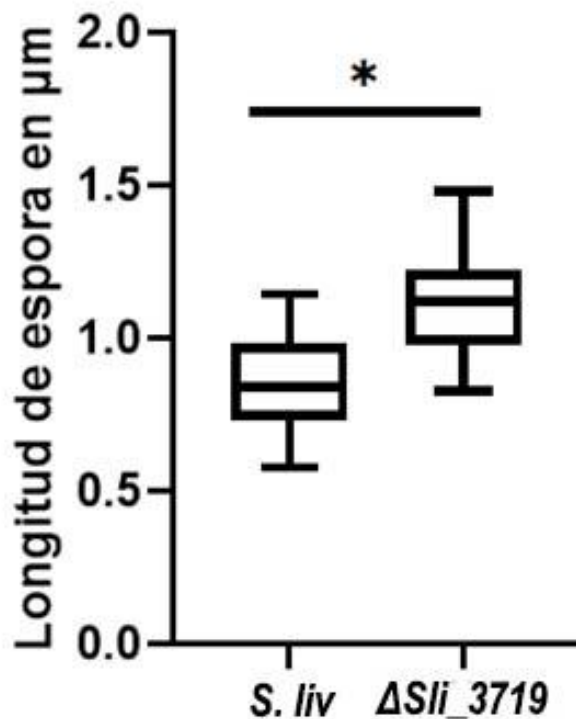


Figura 32. Distribución de la longitud de las esporas de las cepas *S. lividans* 1326 y mutante  $\Delta Sli\_3719$ . Los datos son presentados como diagrama de caja. El número de esporas medidas fue superior a 500 para cada cepa. Los bigotes representan los percentiles al 5% y 95%. Los valores P fueron calculados utilizando una prueba de *t* de una cola (\* $P < 0.001$ ).

## 9. Discusión.

Se ha estudiado ampliamente la proteína Lsr2 en *Mycobacterium*, sin embargo, las proteínas Lsr2 de *Streptomyces coelicolor* representan una oportunidad para explorar la contribución fisiológica en una bacteria con desarrollo complejo.

Dado que el genoma de *S. coelicolor* muestra que existen dos genes que codifican proteínas Lsr2, cabría la posibilidad de que éstas tuvieran un papel redundante en la célula. Sin embargo, los fenotipos observados en las mutantes obtenidas en este trabajo, no correspondieron con dicha hipótesis. La obtención de la cepa mutante  $\Delta sco4076$  fue relativamente sencilla, a diferencia de la mutante  $\Delta sco3375$ , en la cual solo se pudo eliminar el gen silvestre del cromosoma teniendo una copia extra clonada, sugiriendo la esencialidad del gen *sco3375*. Además, este gen se encuentra localizado cerca de dos genes con una actividad similar ATPasa (*sco3373*), similar a *Mycobacterium* en el cual el gen *lsr2* está situado adyacentemente a la subunidad ATPasa del complejo proteasa Clp (Summers *et al.*, 2012), mientras que en el contexto genético de *sco4076* no se encuentra ninguna proteína con esa actividad. Sugiriendo que si existe una relación de ortólogos ocurre entre *lsr2* de *Mycobacterium* y *sco3375*.

En un análisis del el fosfoproteoma de *S. coelicolor*, se identificó a la proteína SCO3375 como una fosfoproteína (Parker *et al.*, 2010). La treonina que puede ser fosforilada se encuentran en todos los *Streptomyces*, mientras que todos los homólogos de SCO4076 presentan una prolina en esa posición, la cual no es considerada como un blanco para fosforilación. Hasta el momento no se conoce cuál es la función de la fosforilación, pero se ha sugerido como un método de regulación conservado evolutivamente.

La morfología de la mutante *sco4076* no presentó un defecto en el desarrollo, siendo muy diferente a los resultados esperados por las proteínas NAPs ya caracterizadas en *Streptomyces* como DdbA, sIHF, HupS, las cuales presentan defectos en la esporulación. La resistencia a temperatura y SDS fue el único fenotipo observable de la cepa  $\Delta sco4076$  ya que a los 60 minutos a 60°C sobrevivían un porcentaje de 3.5% de las esporas; sin embargo, los porcentajes de viabilidad son superiores a los presentados en las cepas  $\Delta hupS$  en la cual solo sobrevivieron 0.1% a 60°C durante 60 minutos, mientras que en la cepa  $\Delta sIHF$  a los 20 minutos ya no sobreviven (Salerno *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Swiercz *et al.*, 2013). La sensibilidad a una alta temperatura y a un detergente, podría deberse a alteraciones en la membrana de la spora, de forma similar a lo que ocurre con los niveles de expresión de *hupS* que son mayores en esta etapa.

Debido a los resultados de la mutante en el gen *sco3375* se sugiere como un gen esencial en *S. coelicolor*, ya que solo pudo ser deletado del cromosoma en presencia de una copia extra. Curiosamente, en *S. lividans* el gen homólogo pudo ser eliminado, por lo que la indispensabilidad de esta proteína Lsr2 podría ser dependiente de la cepa de *Streptomyces*. Recientemente se identificó que la proteína Lsr2 y HU interaccionan físicamente (Datta *et al.*, 2019) y el complejo HU-Lsr2 es un regulador de la expresión génica. Además, se mostró que las propiedades de unión a DNA diferían como complejo respecto a las proteínas

independientes. Por lo tanto, una posible asociación con otras proteínas podría ser una explicación a la diferencia observada entre *S. coelicolor* y *S. lividans*.

Las proteínas H-NS y StpA de *E. coli* y MvaT y MvaU de *P. aeruginosa* probablemente forman complejos homoméricos y heteroméricos por medio de su extremo N-terminal (Dorman, 2004; Li, 2009), por lo cual se puede sugerir que en *Streptomyces* las proteínas puedan formar complejos heteroméricos, ya que los complejos homoméricos fueron identificados en las proteínas Lsr2 de *Streptomyces*.

La mutante *sco3375* tiene una importante contribución en el desarrollo de *Streptomyces* y en el metabolismo secundario, además también es indispensable en el crecimiento y en la viabilidad. La delección de *sco3375* produce defectos en la compactación del cromosoma, en la segregación y en la producción de antibiótico. Además, al igual que otras proteínas está involucrada en la dinámica del cromosoma, y su función es más evidente durante la esporulación, ya que es en esta etapa en donde ocurre la compactación y la segregación. El fenotipo del aumento en el área del nucleoide de la mutante *sco3375* se ha observado en mutantes de NAPs en *S. coelicolor* tales como SMC (Kois *et al.*, 2009), HupS (Salerno, 2009), DpsA (Facey *et al.*, 2009), y IHF (Swiercz *et al.*, 2013).

Las mutantes *hupS* son deficientes en la condensación del cromosoma, y presentan una pigmentación reducida de esporas, sin embargo, el contenido de DNA está apropiadamente segregado en las esporas, a diferencia de la mutante *sco3375*. Las mutaciones en *smc* no afectan la forma de las esporas, pero sí incrementan el porcentaje de esporas anucleadas (7.5%), que es mayor al observado para la cepa *sco3375* (4.5%). Mutantes *dpsA* presentan variación en el tamaño de la espora y también defectos en la condensación del cromosoma, como *sco3375*; sin embargo, no presentan esporas anucleadas.

También se observó que la producción de antibióticos (ACT y CDA) fue reducida en la mutante *sco3375*, respecto a la cepa silvestre, durante el crecimiento en medio sólido. Esto fue similar a lo que se había observado en la cepa mutante *sIHF*, la cual es considerada como una proteína que rige la dinámica del cromosoma.

Muchas de las NAPs caracterizadas se unen a una secuencia de DNA específica, ya sea una secuencia consenso, una secuencia con cierto contenido AT o DNA con una estructura definida. Por ejemplo secuencias consenso han sido identificadas para IHF y Lrp (Hales *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1995), mientras que la proteína HU se une preferencialmente a DNA con “gaps” y “nicks” (mellas) (Balandina *et al.*, 2002; Swinger, 2007), adicionalmente H-NS, Lsr2 y Fis se unen a secuencias de DNA rico en AT (Gordon *et al.*, 2008; Kahramanoglou *et al.*, 2011).

Las capacidades de unión de las proteínas SCO3375 y SCO4076 a fragmentos de DNA de diferentes longitudes fueron determinadas y los EMSAs mostraron que estas proteínas pueden unirse a DNA de cadena sencilla y doble, y que la unión se realiza de manera independiente de secuencia. Bajas concentraciones de las proteínas son requeridas para retrasar la corrida electroforética de muestras de DNA grandes (2,900 pb) más que las pequeñas (23 pb). Esto podría indicar que actúan de una forma cooperativa en la unión o

que estas proteínas prefieren la estructura de DNA que está inherente en los fragmentos largos de DNA.

La metiltransferasa M.Sall presenta un dominio Lsr2 poco conservado dentro de las metilasas de sistemas de modificación restricción de tipo II dependientes de S-adenosil metionina (SAM). Este caso es particular ya que existen pocos reportes en *Streptomyces* en los cuales una proteína se encuentre involucrada en varias funciones. La proteína DksA de *S. coelicolor* presenta un extremo N-terminal de unión a DNA tipo histona y un extremo C-terminal con dominio DksA que puede potencialmente modular la actividad de la RNA polimerasa en conjunción con ppGpp (Aldridge *et al.*, 2013). Debido a su extremo N-terminal la proteína puede unir y condensar DNA *in vitro*.

El dominio Lsr2 de la proteína M.Sall fue capaz de unir al DNA de manera independiente de secuencia, y no presentó preferencia respecto a la topología. Dado que el dominio Lsr2 de la metilasa fue funcional, es probable que se encuentre involucrado en la actividad total de esta enzima, contribuyendo a la unión de la misma al DNA.

### **Distribución de los genes *lsr2* en fagos.**

Como se mencionó anteriormente los ortólogos de los genes *lsr2* se encuentran ampliamente distribuidos en las actinobacterias. Además, genes que codifican proteínas Lsr2 también se han descrito en actinofagos. Esto representa una diferencia con las proteínas H-NS, las cuales, aunque se han reportado genes que las codifican en plásmidos (Doyle, 2007), han sido escasamente reportado en los genomas de los fagos (Skennerton, 2011). Las secuencias que se localizan en los genomas de los fagos, mayoritariamente, acarrean solo el dominio de oligomerización H-NS, el cual es capaz de desreprimir genes bajo el control transcripcional de la proteína H-NS del hospedero.

Realizando un análisis de BlastP con las secuencias Lsr2 de *Streptomyces* contra la base de datos de actinofagos (Russell & Hatfull, 2017), se identificaron 364 secuencias con un e-value  $\leq 0.001$ . (Figura 33). Como se observa, existe una mayor cantidad de proteínas Lsr2 en fagos de *Mycobacterium* y puede deberse a que la mayoría de los genomas en la base de datos actualmente corresponden a micofagos.

Un aspecto interesante era identificar en qué fagos se encontraban más frecuentemente las secuencias *lsr2*, si en fagos virulentos o temperados, por lo cual se clasificaron los fagos analizados como virulentos o lisogénicos, considerando como fagos lisogénicos, aquellos que al menos contuvieran una integrasa, resolvasa o recombinasa en su genoma. Se determinó que el 75% corresponden a fagos con un ciclo de vida lisogénico y 25% a fagos virulentos. Un dato a considerar es lo que ocurre con los fagos de *Streptomyces*, en los cuales, en algunos casos se encontraban, dos copias de los genes *lsr2*, y particularmente estos fagos fueron clasificados como virulentos.

Por lo tanto, se puede considerar que la distribución de los genes *lsr2* se favorece en fagos lisogénicos. Esto podría estar relacionado con que las proteínas u homólogos a Lsr2 pueden reemplazar a proteínas represoras del fago, como se ha observado en *Corynebacterium*. Y también, que fagos virulentos codifiquen proteínas Lsr2 en su genoma podría significar una adaptación mutua entre las proteínas Lsr2 de las cepas hospederas y

las de los fagos. Esto puede ser justificado por la acción de una proteína tipo H-NS codificada por el fago EPBR (Skenneron *et al.*, 2011) el cual tiene como potencial silenciar el 6% del genoma del hospedero, incluyendo el sistema CRISPR-Cas y mecanismos de modificación y restricción.

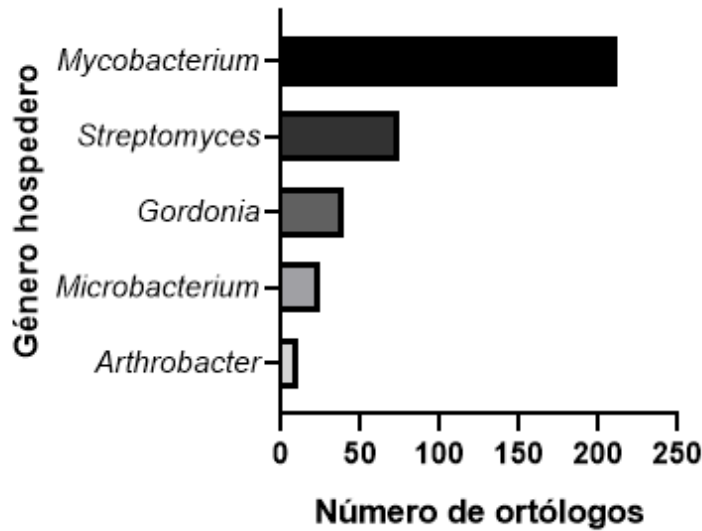


Figura 33. Se observa la distribución de las secuencias *lsr2* en actinofagos. La grafica de barras muestra la frecuencia de los ortólogos codificados por genes *lsr2* (n= 364) que fueron predichos por BlastP (e-value  $\leq 0.001$ ) a través de varios ordenes de actinofagos.

## 10. Conclusiones

Los genes *sco3375* y *sco4076* no codifican proteínas redundantes, ya que el gen *sco4076* puede ser deletado del cromosoma sin afectar el desarrollo de *S. coelicolor*, mientras que el gen *sco3375* solo puede ser eliminado del cromosoma en presencia de una copia extra codificada en un plásmido, evidenciando que ese gen es esencial en *S. coelicolor*.

Las proteínas Lsr2 de *S. coelicolor*, SCO3375 y SCO4076, forman complejos oligoméricos, y poseen función de unión a DNA, de manera secuencia inespecífica, pero sí dependiente de la longitud. Además, no muestran una preferencia respecto a la topología lineal o circular del DNA.

El Dominio Lsr2 encontrado en la metiltransferasa M.Sall puede unirse al DNA de cadena sencilla y doble, también depende de la longitud del DNA y no tiene una preferencia respecto a la topología lineal o circular del DNA.

## 11. Referencias

- Abramoff, M.D, Magalhaes, P.J, Ram, S.J. 2004. **Image processing with ImageJ.** *Biophotonics Int* 11:33–42.
- Aldridge, M., Facey, P., Francis, L., Bayliss, S., Del Sol, R., Dyson, P. 2013. **A novel bifunctional histone protein in Streptomyces: a candidate for structural coupling between DNA conformation and transcription during development and stress?** *Nucleic Acids Res.* 414813–4824.
- Ali, B.M., Amit, R., Braslavsky, I., Oppenheim, A.B., Gileadi, O., and Stavans, J. 2001. **Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF).** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:10658-10663.
- Alting-Mees, M. A., Short, J. M. 1989. **pBluescript II: gene mapping vectors.** *Nucleic Acids Res.* 17:9494.
- Azam, T.A., Ishihama A. 1999. **Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity.** *J. Biol. Chem.* 274:33105–33113.
- Balandina, A., Kamashev, D. Rouviere-Yaniv, J. 2002. **The Bacterial Histone-like Protein HU Specifically Recognizes Similar Structures in All Nucleic Acids DNA, RNA, and their hybrids.** *J Bacteriol.* 277(31):27622-27628.
- Becq, J., Gutierrez, M.C., Rosas-Magallanes, V. 2007. **Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli.** *Mol. Biol. Evol.* 24: 1861-1871.
- Bentley, S.D. *et al.* 2002. **Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2).** *Nature.* 417(6885):141-147.
- Bentley, S. D., Brown, S. , Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J. , Barrell, B. G., McCormick, J. R., Santamaria, R. I., Losick, R. , Yamasaki, M. , Kinashi, H. , Chen, C. W., Chandra, G. , Jakimowicz, D. , Kieser, H. M., Kieser, T. and Chater, K. 2004. **SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, Streptomyces coelicolor A3(2).** *Mol Microbiol.* 51: 1615-1628.
- Berger, M.F., Philippakis, A.A., Qureshi, A.M., He, F.S., Bulyk, M.L. 2006. **Compact, universal DNA microarrays to comprehensively determine transcription-factor binding site specificities.** *Nat. Biotechnol.* 24:1429–35
- Bradshaw, E., Saalbach, G., McArthur, M. 2013. **Proteomic survey of the Streptomyces coelicolor nucleoid.** *J Proteomics.* 83:37-46.
- Chandra G., Chater K. F. 2014. **Developmental biology of Streptomyces from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences.** *FEMS Microbiol. Rev.* 38: 345–379.
- Chen, J.M., German, G.J., Alexander, D.C., Ren, H., Tan, T., Liu, J. 2006. **Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of Mycobacterium smegmatis.** *J. Bacteriol.* 188(2): 633-641.



- Choulet, F., Bertrand, A., Gallois, A., *et al.* 2006. **Evolution of the Terminal Regions of the Streptomyces Linear Chromosome.** *Mol. Biol. Evol.* 23(12): 2361–2369.
- Colangeli, R., Helb, D., Vilchèze, C., Hazbón, M. H., Lee, C. G., Safi, H., *et al.* 2007. **Transcriptional regulation of multi-drug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in *M. tuberculosis*.** *PLoS pathog*, 3(6):e87.
- Cui, Y.Q., Wang, G.D., Calvo, J.M. 1995. **A consensus sequence for binding of Lrp to DNA.** *J Bacteriol.* 177:4872–4880.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L. 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *P Natl Acad Sci.* 97: 6640–6645.
- Datta, C., Jha, R. K., Ahmed, W., Ganguly, S., Ghosh, S. and Nagaraja, V. 2019. **Physical and functional interaction between nucleoid-associated proteins HU and Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis*: altered DNA binding and gene regulation.** *Mol Microbiol.* 111: 981-994.
- Dedrick, R.M., Wildschutte, H., McCormick, J.R. 2009. **Genetic interactions of smc, ftsK, and parB genes in *Streptomyces coelicolor* and their developmental genome segregation phenotypes.** *J. Bacteriol.* 191(1):320–332.
- Ditkowski, B., Troć, P., Ginda, K., Donczew, M., Chater, K. F., Zakrzewska-Czerwińska, J. and Jakimowicz, D. 2010. **The actinobacterial signature protein ParJ (SCO1662) regulates ParA polymerization and affects chromosome segregation and cell division during *Streptomyces* sporulation.** *Mol. Microbiol.* 78: 1403-1415.
- Doyle, M., Fookes, M., Ivens, A., Mangan, M., Wain, J., Dorman, C. 2007. **An H-NS-like Stealth Protein Aids Horizontal DNA Transmission in Bacteria.** *Science.* 315 :251-252
- Errington, J. 2003. **Regulation of endospore formation in bacillus subtilis.** *Nat. Rev. Microbiol.* 1:117–126.
- Esposito D, *et al.* 2002. **H-NS Oligomerization Domain Structure Reveals the Mechanism for High Order Self-association of the Intact Protein.** *J. Mol. Biol.* 324: 841-850
- Dorman, C. J. 2004. **H-NS: a universal regulator for a dynamic genome.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2:391-400.
- Facey, P.D., Hitchings, M.D., Saavedra-Garcia, P., Fernandez-Martinez, L., Dyson P.J., Del Sol R. 2009. ***Streptomyces coelicolor* Dps-like proteins: differential dual roles in response to stress during vegetative growth and in nucleoid condensation during reproductive cell division.** *Mol. Microbiol.* 73:1186–1202.
- Galperin, M. 2007. **Linear chromosomes in bacteria: no straight edge advantage?.** *Environ. Microbiol.* 9(6): 1357–1362.
- Gómez, D. 2015. **Clonación, expresión, purificación y análisis de la actividad in vitro de las metilasas m.sali, m.saci y m.sphi.** Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- González-Cerón, G. Miranda-Olivares, Servín-González, L. 2009. **Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and**

- of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol. Lett.* 301:35–43.
- Gordon, B.R., Imperial, R., Wang, L., Navarre, W.W., Liu J. 2008. **Lsr2 of Mycobacterium represents a novel class of H-NS-like proteins.** *J. Bacteriol.*190:7052–5
  - Gordon, B.R., Li, Y., Wang, L., Sintsova, A., van Bakel, H. 2010. **Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in Mycobacterium tuberculosis.** *PNAS.* 107(11):5154-9.
  - Goyard, S., Bertin, P. 1997. **Characterization of BpH3, an H-NS like protein in Bordetella pertussis.** *Mol Microbiol.* 24: 815–823
  - Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. 1990. **Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.** *P Natl Acad Sci.* 87: 4645–4649
  - Gräslund, S., et al. 2008. **The use of systematic N- and C-terminal deletions to promote production and structural studies of recombinant proteins.** *Protein Expr. Purif.* 58: 210-221
  - Grayling, R.A., Bailey, K.A., Reeve, J.N. 1997. **DNA binding and nuclease protection by the HMf histones from the hyperthermophilic archaeon Methanothermus fervidus.** *Extremophiles.* 1:79–88
  - Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K.F. 2003. **PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.** *PNAS.* 100:1541–1546.
  - Haiser, H.J., Yousef, M.R., Elliot, M.A. 2009. **Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in Streptomyces coelicolor.** *J Bacteriol.*191:6501–6512.
  - Hales, L. Gumpert, R., Gardner, J. 1994. **Mutants of Escherichia coli integration host factor: DNA-binding and recombination properties.** *Biochimie.*76:1030-1040
  - Haniford, D. 2006. **Transpososome Dynamics and Regulation in Tn10 Transposition.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41(6): 407-424,
  - Hirano, T. 2002. **The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair.** *Genes Dev.* 16:399–414.
  - Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H. 1985. **Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual.** John Innes Foundation, Norwich, UK.
  - Hopwood, D.A., Glauert, A.M. 1960. **Observations on the chromatinic bodies of Streptomyces coelicolor.** *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8(1):257–265.
  - Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., Bibb, M.J. 1983. **Plasmids, recombination and chromosome mapping in Streptomyces lividans 66.** *J. Gen Microbiol.* 129(7):2257-69.
  - Hopwood, D. A., & Glauert, A. 1960. **The fine structure of Streptomyces coelicolor. II. The nuclear material.** *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8:267-278.

- Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M.J. 2005. **Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor***. *Mol. Microbiol.* 58:1276–1287.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Ikuchi, H., Shiba, T., Omura, S. 2003. **Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis***. *Nat. Biotechnol.* 21: 526- 531.
- Ishihama, Y. 2005. **Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein**. *Mol. Cell Proteomics.* 4 (9) 1265-1272
- Johansson, J., Balsalobre, C., Wang, S.Y., Urbonaviciene, J., Jin, D.J., Sonden, B., Uhlin, B.E. 2000. **Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli***. *Cell.* 102:475–485.
- Kahramanoglou, C., Seshasayee, A.S., Prieto, A.I., Ibberson, D., Schmidt, S., Zimmermann, J., Benes, V., Fraser, G.M., Luscombe, N.M. 2011. **Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli***. *Nucleic Acids Res.* 39:2073–2091.
- Kamna, S., Milstein, J., Wiley, W. 2016. **Xenogeneic Silencing and Its Impact on Bacteria Genomes**. *Annu. Rev. Microbiol.* 70:199–213.
- Karas, V. O., Westerlaken, I., Meyer, A. S. 2015. **The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses**. *J. Bacteriol.* 197(19): 3206–3215.
- Kim, C.J., Whang, Y.R., Kenney, L.J., Yan, J. 2012. **Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility**. *Nucleic Acids Res.* 40:3316–3328.
- Kim, H., Traag, B., Hasan, A., Wezel, G. 2015. **Transcriptional analysis of the cell division-related *ssg* genes in *Streptomyces coelicolor* reveals direct control of *ssgR* by AtrA**. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 108: 201–2
- Kirby, R., Herron, P., Hoskisson, P. 2011. **Analysis of developmental gene conservation in the *Actinomycetales* using DNA/DNA microarray comparisons**. *Anton. Leeuw. Int.* 99:159–177.
- Kieser, T. Bibb, M. *et al.* 2000. **Practical *Streptomyces* genetics**. John Innes Foundation, Norwich U.K.
- Kocíncová, D., Singh, A.K., Beretti, J.L. 2008. **Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis***. *Tuberculosis.* 88: 390-398.
- Kois, A., Świątek, M., Jakimowicz, D., Zakrzewska-Czerwińska, J. 2009. **SMC protein-dependent chromosome condensation during aerial hyphal development in *Streptomyces***. *J. Bacteriol.* 191:310–319.
- Kumar, M., Gromiha, M. M., & Raghava, G. P. 2007. **Identification of DNA-binding proteins using support vector machines and evolutionary profiles**. *BMC bioinformatics*, 8: 463.
- Laal, S., Sharma, Y.D., Prasad, H.K., Murtaza, A., Singh, S., Tangri, S., Misra, R.S., Nath I. 1991. **Recombinant fusion protein identified by lepromatous sera**

mimics native *Mycobacterium leprae* in T-cell responses across the leprosy spectrum. *Proc. Natl Acad. Sci.* 88:1054–1058.

- Le Moigne, V., Bernut, A., Cortès, M., *et al.* 2019. **Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in *Mycobacterium abscessus*.** *Front Microbiol.* 10:905.
- Ledent, P., Duez, C., Vanhove, Marc, Lejeune, A., *et al.* 1997. **Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters.** *FEBS Letters*, 413(2):194-6.
- Lewis, R.A., *et al.* 2010. **Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative genomic hybridization.** *BMC Genomics.* 11:682.
- Li, C., Wally, H., Miller, S.J., Lu, C.D. 2009. **The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** *J. Bacteriol.* 191:6211–6218.
- Lim, C. J., Whang, Y. R., Kenney, L. J., Yan, J. 2012. **Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility.** *Nucleic Acids Res.* 40(8): 3316–3328.
- Lim, C.J., Kenney, L.J., Yan, J. 2014. **Single-molecule studies on the mechanical interplay between DNA supercoiling and H-NS DNA architectural properties.** *Nucleic Acids Res.* 42:8369–78
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. 2013. **Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *streptomyces*.** *MMBR*, 77(1): 112–143.
- Luijsterburg, M.S., Noom, M.C., Wuite, G.J., Dame, R.T. 2006. **The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective.** *J. Struct. Biol.* 156:262–272.
- McBride, M.J., Ensign J.C. 1987. **Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores.** *J. Bacteriol.* 169(11):4995–5001.
- McCormick, J. R., & Flärdh, K. 2012. **Signals and regulators that govern *Streptomyces* development.** *FEMS Microbiol. Rev.*, 36: 206–231.
- Noens, E. E., Mersinias, V., Traag, B. A., Smith, C. P., Koerten, H. K. and van Wezel, G. P. 2005. **SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*.** *Mol. Microbiol.* 58: 929-944.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H. 2008. **Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350.** *J Bacteriol.* 190(11):4050–4060
- Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., Buttner, M.J. 1999. **Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^E$  is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *J Bacteriol.* 181: 204–211.
- Park, K.T., Dahl, J.L., Bannantine, J.P. 2008. **Demonstration of allelic exchange in the slow-growing bacterium *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and generation of mutants with deletions at the *pknG*, *relA*, and *Lsr2* loci.** *Appl. Environ. Microbiol.* 74(6): 1687-1695.
- Parker, J.L., Jones, A.M.E., Serazetdinova, L., Saalbach, G., Bibb, M.J., Naldrett, M.J. 2010. **Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation,**

phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics* 10:2486–2497.

- Pérez-Rueda, E., Ibarra, J.A. 2015. **Distribution of putative xenogeneic silencers in prokaryote genomes.** *Compu. Biol. Chem.* 58: 167-172.
- Qu, Y., Lim, C.J., Whang, Y.R., Liu, J., Yan, J. 2013 **Mechanism of DNA organization by *Mycobacterium Tuberculosis* protein Lsr2.** *Nucleic Acids Res.* 41:5263– 72
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. 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.
- Rodicio, M.R., Chater, K.F. 1988. **The Sa11 (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G.** *Gene.* 74(1) 39-42
- Russell, D.A. 2018. **Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes.** *Methods Mol Biol.* 1681:109–125.
- Russell, D. A., & Hatfull, G. F. 2017. **PhagesDB: the actinobacteriophage database.** *Bioinformatics.* 33(5), 784–786.
- Sabaty M., Grosse, S., Adryanczyk, G., et al. 2013. **Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis.** *BMC Biochemistry.* 14(1):28.
- Salerno, P., Larsson, J., Bucca, G., Laing, E., Smith, C.P., Flärdh, K. 2009. **One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation.** *J. Bacteriol.* 191:6489–6500.
- Seipke, R. F. 2015. **Strain-level diversity of secondary metabolism in *Streptomyces albus*.** *PLoS One.* 10(1): e0116457.
- Sharadamma, N., Harshavardhana, Y., Singh, P., Muniyappa, K. 2010. ***Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS binds with high affinity to the Holliday junction and inhibits strand exchange promoted by RecA protein.** *Nucleic Acids Res.* 38: 3555-3569
- Shimizu, M., Miyake, M., Kanke, F., Matsumoto, U., and Shindo, H. 1995. **Characterization of the binding of HU and IHF, homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, to curved and uncurved DNA.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1264: 330–336.
- Skennerton, C.T., et al. 2011. **Phage encoded H-NS: a potential achilles heel in the bacterial defence system.** *PLoS One.* 6(5):e20095.
- Summers, E.L., Meindl, K., Uson, I., Mitra, A.K., Radjainia, M. 2012. **The structure of the oligomerization domain of Lsr2 from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a mechanism for chromosome organization and protection.** *PLoS ONE.* 7(6): e38542.
- Swiercz, J.P., Nanji, T., Gloyd, M., Guarné, A., Elliot, M.A. 2013. **A novel nucleoid-associated protein specific to the actinobacteria.** *Nucleic Acids Research.* 41:4171–4184.
- Swinger, K.K., Rice, P. A. 2004. **IHF and HU: flexible architects of bent DNA.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 28–35.

- Teramoto, J., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K., Ishihama, A. 2010. **A novel nucleoid protein of *Escherichia coli* induced under anaerobic growth conditions.** *Nucleic Acids Res.* 38: 3605–3618.
- Uyar, E., Kurokawa, K., Yoshimura, M., Ishikawa, S., Ogasawara, N., Oshima, T. 2009. **Differential binding profiles of StpA in wild type and *hns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis.** *J. Bacteriol.* 191:2388-2391
- Vingadassalon, A., Bouloc, P., Rimsky, S. 2016. **Removing nucleic acids from Nucleoid-Associated proteins purified by affinity column.** *J. Biol. Methods*, 3(1): e35.
- Wirjon, I. A., Lau, N. S., Arip, Y. M. 2016. **Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Phage pPM\_01 Isolated from Raw Sewage.** *Intervirology.* 59:243-253.
- Winardhi, R.S., Castang, S., Dove, S.L., Yan, J. 2014. **Single-Molecule Study on Histone-Like Nucleoid-Structuring Protein (H-NS) Parologue in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaU Bears DNA Organization Mode Similarities to MvaT.** *PLOS ONE.* 9(11): e112246.
- Winardhi, R.S., Fu, W., Castang, S., Li, Y., Dove, S.L., Yan, J. 2012. **Higher order oligomerization is required for H-NS family member MvaT to form gene silencing nucleoprotein filament.** *Nucleic Acids Res.* 40:8942–52
- Yang, Y.H., Song, E., Willemse, J., Park, S.H., Kim, W.S., Kim, E.J., Lee, B.R., Kim, J.N., van Wezel, G.P., Kim, B.G. 2012. **A novel function of *Streptomyces* integration host factor (slHF) in the control of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor*.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101:479–492.
- Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R.I., Díaz, M. 2011. **Novel Two-Component Systems Implied in Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*.** *PLOS ONE* 6(5):e19980.
- Yokoyama, E., Doi, K. Kimura, M., Ogata, S. 2001. **Disruption of the *hup* gene encoding a histone-like protein HS1 and detection of HS12 of *Streptomyces lividans*.** *Res. Microbiol.* 152: 717–723.