



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis in vitro de la metiltransferasa M.SalI y sus  
variantes con mutaciones en el dominio Lsr2**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**Paniagua Martínez José Alberto**

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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO  
2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Dedicado a:

*Mi madre por siempre apoyarme incondicionalmente  
en las decisiones que tomo y estar presente en los  
momentos importantes de mi vida.  
Mis hermanos por su cariño y aprecio.*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Luis Servín González, por permitirme realizar el presente proyecto en su laboratorio incentivando mi gusto por la ciencia.

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

Al doctor Dr. Luis David Ginez Vázquez por ayudarme con la revisión del escrito y su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio.

A los investigadores y profesores Dra. Rosa Laura Camarena, Dra. Claudia Segal, Dr. Luis David Alcaraz y Biól. Alma Olvia Sánchez, que conforman el jurado, quienes revisaron la tesis y aportaron observaciones precisas para mejorar el escrito.

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.

# INDICE

<b>1. Resumen</b> .....	6
<b>2. Introducción</b> .....	8
2.1 Actinobacterias del género <i>Streptomyces</i> .....	8
2.2 Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> .....	8
2.3 <i>Streptomyces</i> como objeto de estudio.....	8
2.4 Enzimas de restricción .....	9
2.5 Enzimas de modificación .....	9
2.6 Sistema de restricción-modificación.....	9
2.7 Sistemas de restricción-modificación en <i>Streptomyces</i> .....	12
2.8 <i>SaI</i> y su importancia como sistema de restricción-modificación en <i>Streptomyces</i> .....	12
2.9 Proteínas asociadas al nucleóide.....	12
2.10 NAPs de la familia Lsr2.....	13
2.11 NAPs Lsr2 en <i>Streptomyces</i> .....	14
2.12 Dominio Lsr2 en M. <i>SaI</i> de <i>S. albus</i> .....	15
<b>3. Antecedentes</b> .....	17
<b>4. Hipótesis</b> .....	20
<b>5. Objetivos</b> .....	20
5.1 Objetivo general. ....	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
<b>6. Material Y Métodos</b> .....	21
6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	21
6.2 Cepas, almacenamiento, medios y condiciones de cultivo. ....	23
6.3 Re-amplificación de M. <i>SaI</i> .....	23
6.4 Construcción de una mutante puntual de M. <i>SaI</i> <i>SaMR556A</i> .....	24
6.5 Construcción de una mutante sin dominio Lsr2 M. <i>SaI</i> DLsr2 .....	24
6.6 Expresión y purificación de la metiltransferasa M. <i>SaI</i> y sus variantes .....	25
6.7 Análisis de proteínas purificadas .....	25
6.8 Diálisis, concentración, almacenamiento y cuantificación de las proteínas purificadas. ....	26
6.9 Pruebas de metilación <i>in vitro</i> de la metiltransferasa M. <i>SaI</i> y sus variantes .....	26
6.10 Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA).....	27
6.11 Pruebas de metilación <i>in vivo</i> de la metiltransferasa M. <i>SaI</i> y sus variantes .....	27
<b>7. Resultados</b> .....	28
7.1 Generación de constructos genéticos para la expresión de proteínas recombinantes en <i>Streptomyces</i> y <i>E. coli</i> .....	28
7.2 Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad de las metiltransferasas M. <i>SaI</i> , M. <i>SaI</i> DLsr2, M. <i>SaI</i> R556A....	31
7.3 Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) .....	36
7.4 Eficiencia de metilación <i>in vivo</i> de la metiltransferasas M. <i>SaI</i> , M. <i>SaI</i> DLsr2 y M. <i>SaI</i> R556A ....	37

<b>8. Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>9. Conclusión .....</b>	<b>44</b>
<b>10. Apéndice .....</b>	<b>45</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>48</b>

## 1. Resumen

Las enzimas de restricción son un tipo de endonucleasas que tienen la capacidad de reconocer secuencias de DNA y llevar a cabo una escisión en un punto específico denominado sitio de restricción. Este mecanismo enzimático se lleva a cabo por la ruptura de enlaces fosfodiéster en las cadenas de DNA.

En procariontes, las endonucleasas de restricción forman parte de mecanismos complejos, los cuales son llamados sistemas de restricción-modificación (**R-M**), y que son utilizados *in vivo* por las bacterias para protegerse del DNA exógeno. Dependiendo de su mecanismo de acción, los cofactores enzimáticos y la secuencia objetivo, los sistemas de restricción se pueden clasificar en cuatro tipos distintos: I, II, III, IV.

Para fines prácticos de este trabajo destacamos los sistemas de restricción-modificación tipo II, un grupo amplio de enzimas con alto valor biotecnológico y molecular. Estos sistemas constan de una endonucleasa de restricción dependiente de iones magnesio ( $Mg^{+2}$ ) y una metiltransferasa dependiente de **S-AdenosilMetionina** (SAM). En estos sistemas de R-M, la metiltransferasa transfiere el grupo metilo del co-sustrato SAM para metilar nucleótidos del DNA propio de la célula en una secuencia específica. Mientras que, la endonucleasa de restricción interacciona con el catión divalente de magnesio para llevar a cabo la escisión de DNA exógeno.

Por otro lado, las NAPs (**Nucleoid-Associated Proteins**) de la familia Lsr2 (**L**eprosy **S**erum **R**eactive clone 2) son proteínas de bajo peso molecular exclusivas de actinobacterias que tienen una función análoga a la de las proteínas H-NS de proteobacterias (**H**istone-like **N**ucleoid **S**tructuring proteins). Es decir, son reguladores transcripcionales de genes, que actúan modificando la topología del cromosoma bacteriano o uniéndose a la región promotora del gen inhibiendo la transcripción.

Estas proteínas Lsr2 también están presentes en los genomas secuenciados de actinobacterias del género *Streptomyces*. Asimismo, existe una particularidad en la metiltransferasa del sistema R-M *SalI* de *Streptomyces albus* (*M. SalI*), ya que esta metiltransferasa presenta una secuencia homóloga a las proteínas Lsr2 en su extremo carboxilo terminal (c-terminal), algo que no ocurre con otras metiltransferasas de la misma familia.

En este trabajo evaluamos la actividad *in vitro* de la metilasa *M. SalI*, y la comparamos con la de otras dos variantes, que presentan mutaciones en el dominio homólogo a Lsr2. Estas dos variantes presentan una delección completa del dominio Lsr2 en el extremo C-terminal (*M. SalI* $\Delta$ Lsr2) o bien, una mutación puntual en una región importante del dominio Lsr2 (*M. SalI*R556A). Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la relación que tiene este dominio en la interacción proteína-DNA, observando la eficiencia de estas proteínas para proteger al DNA en ensayos de metilación-restricción contra la enzima *SalI*.

Al realizar ensayos de metilación con la metiltransferasa *M. SalI* y sus variantes, tanto *in vivo* como *in vitro*, se encontró que la presencia o ausencia de este dominio no es fundamental para que la enzima pueda llevar a cabo su actividad de metilación nativa. Sin embargo, ambas metiltransferasas que carecen de dominio Lsr2 funcional, mostraron una mejora en la eficiencia de su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, esto sucedió al menos en los ensayos utilizados para la realización de este proyecto.

Sugerimos que el efecto positivo en la actividad de metilación de M.SaI en ausencia del dominio Lsr2, es consecuencia de que este dominio regula la actividad de la enzima. Teniendo implicaciones importantes a considerar para estudios posteriores acerca del entendimiento teórico de esta metiltransferasa y el sistema R-M en el que está implicada junto con la endonucleasa SaI

## **2. Introducción**

### **2.1 Actinobacterias del género *Streptomyces***

Las actinobacterias que pertenecen al género *Streptomyces* son organismos con morfología filamentada, ubicuos, saprófitos, descomponedores, con un ciclo de vida con varias etapas diferenciadas. Además, son quimiorganótrofos, con metabolismo oxidativo que se caracterizan por producir una amplia gama de metabolitos secundarios. Poseen un DNA rico en G-C (Guanina - citosina), que junto con sus otras características vuelven a estas bacterias un modelo para estudios biotecnológicos y moleculares (Kämpfer; et al., 2014 & Rosenberg, et al., 2014)

### **2.2 Ciclo de vida de *Streptomyces***

El ciclo de vida de estos organismos (Figura 1) comienza con la germinación de una espora, la cual formará un tubo germinal que se ramificará en micelio vegetativo compacto, constituido por estructuras hifales poco compartimentalizadas y multigenómicas.

Posteriormente, el desarrollo del organismo o las condiciones adversas, provocarán que el micelio vegetativo sea utilizado como sustrato para formar micelio aéreo, constituido por hifas no ramificadas multigenómicas. Las hifas de este micelio aéreo sufren un proceso de septación sincrónica, que convierte las hifas en esporas unigenómicas. Estas esporas son estructuras de reproducción que al dispersarse iniciarán de nuevo con el ciclo de vida (McGregor, 1954).

De forma interesante, la etapa en la cual se forma el micelio aéreo se caracteriza por la formación de metabolitos secundarios y antibióticos (Liu, et al., 2013). Asimismo, la dispersión de las esporas no es aérea, sino que ocurre mediante insectos que habitan en el suelo y que son atraídos por compuestos volátiles que producen las cepas de *Streptomyces* (Becher et al., 2020).

### **2.3 *Streptomyces* como objeto de estudio**

Las bacterias del género *Streptomyces* han sido un modelo de estudio desde distintos enfoques. Desde un enfoque ecológico se estudian los lugares donde habitan, el tipo de interacciones que tienen con el medio biótico y abiótico, y la manera en que se pueden aislar de estos para estudios *in vitro*.

Sin embargo, su principal relevancia es en estudios de investigación biomédica y biotecnológica, ya que estos organismos producen una amplia gama de metabolitos secundarios, entre los que se incluyen antibióticos de uso humano y veterinario; se considera que aproximadamente 75% de los antibióticos comerciales se obtienen de bacterias del género *Streptomyces* (Madigan, et al., 2019).

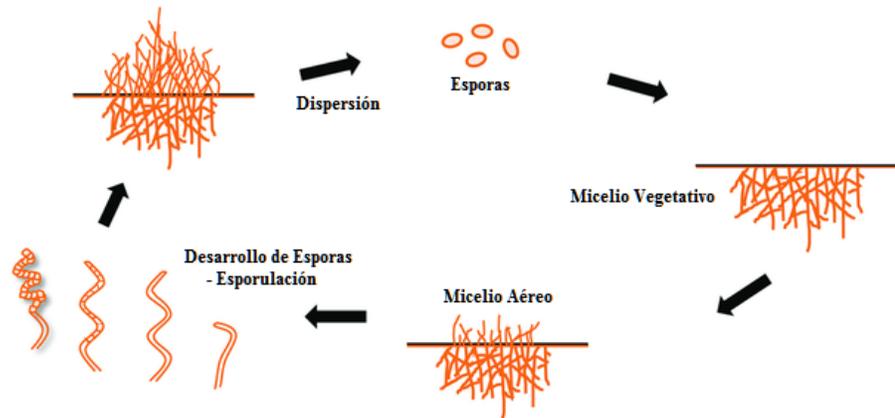


Figura 1. Ciclo de vida *Streptomyces* sp. donde se ilustran las diferentes etapas del desarrollo de estos organismos (Angert, 2005)

## 2.4 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son un tipo de endonucleasas que tienen la capacidad de reconocer una secuencia específica de nucleótidos en el DNA y llevar a cabo una escisión o "corte" en un punto específico denominado sitio de restricción. Este corte se lleva a cabo por la ruptura de enlaces fosfodiéster en las cadenas de DNA (Pingoud, 2004).

Según su estructura, los requisitos del cofactor enzimático y la naturaleza de la secuencia objetivo, las endonucleasas de restricción se clasifican en cuatro tipos distintos (I, II, III y IV), relacionado con el sistema de restricción-modificación al que pertenecen (Loenen<sup>c</sup>, et al., 2013 & Pingoud, 2004).

## 2.5 Enzimas de modificación

Las enzimas de modificación son metiltransferasas o metilasas de adenina o citosina, las cuales son parte de los sistemas de R-M de muchas bacterias. Su función es metilar al DNA del cromosoma bacteriano de manera periódica, transfiriendo grupos metilo del co-sustrato SAM a posiciones específicas de los nucleótidos de la secuencia que reconocen (Figura 2), la cual generalmente es la misma secuencia que reconoce la endonucleasa de restricción a la que están asociadas (Palmer & Marinus; 1994).

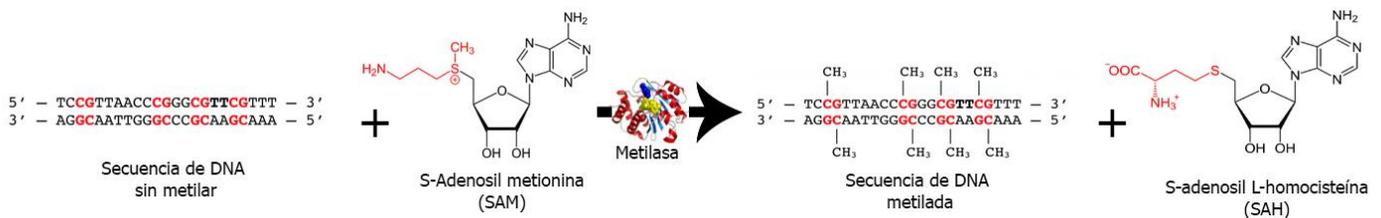
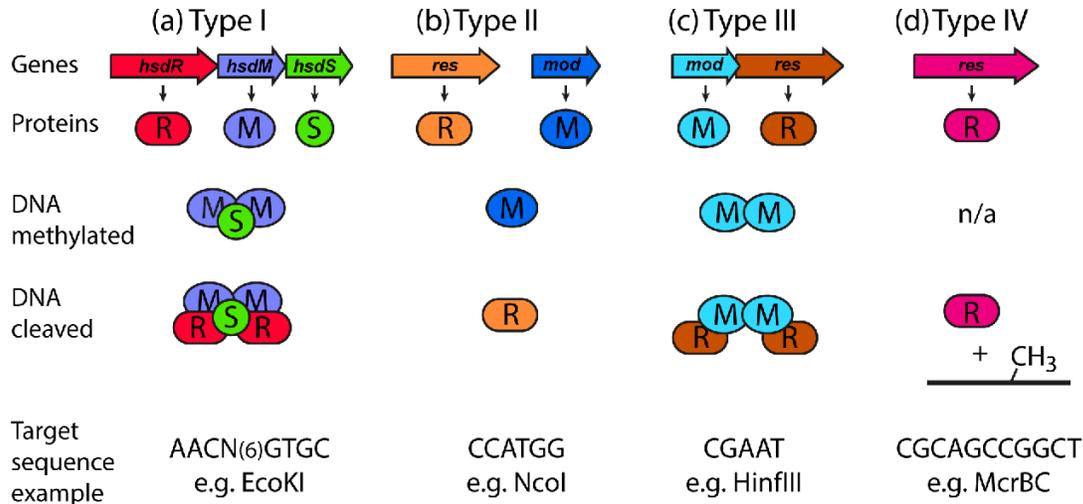


Figura 2. Metilación del ADN, consecuencia de la actividad de una metiltransferasa utilizando como sustrato S-Adenosil metionina. La metilación de secuencias específicas de una cadena de ADN en presencia del co-sustrato SAM es una reacción catalizada por un tipo de enzimas denominada metiltransferasas. En esta reacción los reactivos siempre son una molécula de ADN no metilada y S-Adenosil metionina, los productos después de la reacción catalizada por una metilasa son ADN metilado en secuencias específicas y S-Adenosil L-Homocisteína. Ya que SAM pierde su grupo metilo (-CH<sub>3</sub>).

## 2.6 Sistema de restricción-modificación

Las endonucleasas de restricción, junto con las metiltransferasas forman en las bacterias sistemas de restricción-modificación (R-M). Éstos son mecanismos utilizados *in vivo* como un sistema inmunológico primitivo, que les permite a las bacterias protegerse contra las infecciones por bacteriófagos o agentes extraños, esencialmente el DNA exógeno de otras bacterias o bacteriófagos (Boyer, 1971).

Estos sistemas pueden actuar como enzimas independientes o como complejos enzimáticos (Figura 3). La endonucleasa de restricción, corta el DNA exógeno y la metiltransferasa convencionalmente modifica al DNA propio evitando que sea reconocido por la endonucleasa de restricción y por lo tanto que sufra un corte en su propio genoma (Boyer, 1971).



**Figura 3. Ilustración de los cuatro tipos de sistemas de restricción-modificación (R-M)** (a) R-M tipo I, *loci* separados codifican subunidades de restricción (R), metilación (M) y especificidad (S). En el caso de *E. coli* estos están codificados por los genes *hsdR*, *hsdM*, *hsdS* respectivamente. Para su función se requiere formar un pentámero que consta de 2 subunidades R, 2 subunidades M y 1 subunidad S. La especificidad de unión al DNA depende de la subunidad S. (b) RM- tipo II, constituidos por dos enzimas separadas, 1 endonucleasa (R) y 1 metiltransferasa (M). Ambas enzimas reconocen la misma secuencia de DNA, la cual a menudo es de solo 6 pb y es palíndroma, estas enzimas actúan de forma independiente. (c) R-M tipo III formados por genes co-localizados denominados *mod* (modificación/metiltransferasa) y *res* (restricción/endonucleasa), actúan como un complejo enzimático. (d) Enzimas tipo IV, estas pueden llevar a cabo la escisión de ADN metilado, "sistema" compuesto solo por una endonucleasa de restricción. (Phillips, et al., 2019)

### • 2.6.1 Sistema de restricción-modificación tipo I

Los sistemas R-M tipo I se encuentran en aproximadamente 50% de los procariontes (incluyendo arqueas). Son sistemas que siempre constan de un complejo enzimático pentamérico. Estos sistemas se identificaron por primera vez en *Escherichia coli*, donde están codificados por el grupo de genes de tipo *hsd* (host specificity determinant); *hsdR* codifica a las subunidades de restricción (R), *hsdM* codifica a las subunidades de metilación (modificación o M) y *hsdS* codifica a la subunidad de reconocimiento (S). Generalmente, el complejo enzimático está constituido por dos subunidades R, dos subunidades M y una subunidad S. Las subunidades R son Mg<sup>2+</sup> y ATP dependientes, mientras que las subunidades M son dependientes del co-sustrato SAM. La subunidad S consiste en dos dominios TRD (Target Recognition Domains). Las secuencias que reconocen estos sistemas de R-M no son específicas, generalmente son secuencias de DNA bipartitas que comprenden dos medias secuencias separadas por un número de nucleótidos aleatorios. Cada dominio TRD reconoce una media secuencia y permite el anclaje del complejo enzimático al DNA para llevar a cabo la escisión o modificación de una secuencia adyacente a la secuencia de reconocimiento. Está demostrado que un solo cromosoma bacteriano puede codificar para diferentes subunidades S, por lo que es un sistema de R-M de amplio espectro, el cual puede cambiar dependiendo del DNA que ingrese en la célula. La identificación de secuencias de corte de este tipo de enzimas no es tan clara, por esta razón las secuencias de reconocimiento se deducen a partir del metiloma (los sitios donde metila la metiltransferasa) (Loenen<sup>b</sup>, et al., 2013; Loenen<sup>c</sup>, et al., 2013).

### • 2.6.2 Sistema de restricción-modificación tipo II

El sistema R-M tipo II alberga el grupo más amplio de endonucleasas de restricción caracterizadas. Estas son ampliamente utilizadas por la industria médica y diferentes ramas de la biología molecular, ya que son la principal herramienta en la tecnología de DNA recombinante. Históricamente, la primera endonucleasa caracterizada perteneciente a un sistema R-M tipo II fue **HindI** de *Haemophilus influenzae*, por Daniel Hamilton en el año 1970. Posteriormente, se caracterizaron **EcoRI** y **EcoRII** de *E. coli*, Esto logró consagrarse a las endonucleasas de restricción tipo II como uno de los tipos de enzimas más estudiados y utilizados en las actividades de laboratorio. Hasta el año 2005 se conocían aproximadamente 300 endonucleasas de restricción, así como el sitio de corte y secuencia que reconocen, las cuales además están comercialmente disponibles (Tock & Dryden, 2005).

El sistema R-M tipo II consta de una endonucleasa de restricción y una metiltransferasa que son enzimas independientes (no actúan como complejo). Además, son codificadas por diferentes regiones del cromosoma bacteriano o por plásmidos silvestres, y su estructura varía según la enzima. La endonucleasa de restricción reconoce una secuencia específica de DNA y utiliza cationes divalentes, principalmente  $Mg^{+2}$ , para su actividad enzimática y suele formar homodímeros o tetrámeros para llevar a cabo la escisión. Las endonucleasas de restricción tipo II se clasifican en diferentes tipos según sus propiedades y comportamiento enzimático: A, B, C, E, F, G, H, **P**, S y T. Las endonucleasas de restricción tipo II más comunes son las **P**, que reconocen secuencias palindrómicas. Las metiltransferasas son enzimas que reconocen la misma secuencia que la endonucleasa de restricción a la cual están asociadas, son dependientes del co-sustrato SAM y de ahí obtienen los grupos metilo para transferirlos a la cadena doble de DNA principalmente en citosinas y adeninas, en los carbonos en posición 4 y 6 de ambos nucleótidos, respectivamente (m4C, m4A, m6A y m6C). *In vivo* este sistema siempre consta de una endonucleasa de restricción y una metiltransferasa para funcionar (Loenen<sup>b</sup>, et al., 2013; Tock & Dryden, 2005).

- **2.6.3 Sistema de restricción-modificación tipo III**

En los sistemas de R-M tipo III se encuentran enzimas codificadas por una región contigua del genoma bacteriano denominada **Res/Mod**, la cual codifica para dos enzimas (Res y Mod). Son complejos enzimáticos heterooligómeros que poseen dos subunidades Mod (Modificación) y dos subunidades Res (Restricción) en un arreglo conocido como **Res<sub>2</sub>Mod<sub>2</sub>**. Estos sistemas R-M se han estudiado principalmente en fagos y bacterias Gram negativas. *In vivo* funcionan como un sistema de protección contra DNA recién replicado. Mod es dependiente del co-sustrato SAM y modifica al DNA hemimetilando adeninas en el carbono de posición 6 (hm6A). Res es ATP,  $Mg^{+2}$  y SAM dependiente. El complejo enzimático Mod reconoce secuencias asimétricas, mientras que Res realiza la escisión del DNA en un punto adyacente (a unas 25-28 pares de bases) de la secuencia de reconocimiento. La subunidad Mod puede funcionar independiente de Res, pero Res no puede funcionar sin Mod, por lo que puede ocurrir la hemimetilación en ausencia de restricción, pero no viceversa (Tock & Dryden, 2005 & Loenen<sup>b</sup>, et al., 2013).

- **2.6.4 Sistema de restricción tipo IV**

Estos sistemas difieren de los anteriores ya que carecen de componentes genéticos que codifican una enzima de modificación o metiltransferasa. Por esta razón operan de manera "inversa" a los otros sistemas R-M, es decir, llevan a cabo la escisión de secuencias de DNA modificadas por metilación o hemimetilación. Se sabe que los sistemas de restricción tipo IV están ampliamente distribuidos en procariontes, aunque no está bien caracterizada su actividad enzimática, ni el sitio de corte de muchas de estas enzimas. *In vivo* protegen a las bacterias contra bacteriófagos que han desarrollado sistemas "anti R-M", es decir,

aquellos bacteriófagos que pueden modificar su material genético para “engañar” a la célula que infectan. En *E. coli* los genes que codifican estas nucleasas son *mcrA*, *mcrBC* y *mcrR*, los cuales protegen a la célula contra el DNA hemimetilado del bacteriófago T4. Estas enzimas pueden actuar como complejo con diferentes subunidades unidas covalentemente o de forma individual, donde realizan las funciones de reconocimiento, unión y escisión del DNA. Generalmente una sola enzima puede reconocer y cortar diferentes secuencias modificadas, al igual que diferentes formas de modificación. Entre las principales modificaciones que reconocen las endonucleasas de restricción tipo IV se encuentran la metilación, la hemimetilación, la glicosilación y la glicosilhidroximetilación. La actividad de la nucleasa es dependiente de cationes o iones de metales divalentes, siendo  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  los cofactores más utilizados (Loenen & Raleigh, 2013).

### **2.7 Sistemas de restricción-modificación en *Streptomyces*.**

En el caso de las actinobacterias del género *Streptomyces* se han estudiado dos sistemas de restricción-modificación que las protegen de bacteriófagos de la familia del bacteriófago  $\phi$ C31. Estos sistemas son **PGL (Phage Growth Limitation)** de *Streptomyces coelicolor* y el sistema de **restricción-modificación tipo II *SalI*** de *Streptomyces albus*. Ambos sistemas han sido clonados y expresados en diversas cepas de *Streptomyces* y *E. coli* dando resultados *in vitro*, que corroboran la presencia de estos mecanismos *in vivo* y su función ante la protección contra fagos (Summy & Smith, 2002; Rodicio & Chater, 1988).

### **2.8 *SalI* y su importancia como sistema de restricción-modificación en *Streptomyces*.**

El sistema de restricción-modificación *SalI* de *S. albus*, está codificado por una región de 4.2 kilo bases (kb) en el cromosoma, la cual está constituido por dos genes que codifican para una endonucleasa de restricción (*SalI*) y una metiltransferasa (*SalIM* o *M.SalI*).

La endonucleasa de restricción *SalI* fue purificada y caracterizada por primera vez de la cepa *Streptomyces albus* G por Arrand y cols. en 1978. Quienes determinaron que el sitio de restricción que reconoce esta enzima es **5' G↓TCGAC 3'**.

*SalI* es un monómero con sitios de unión a  $Mg^{+2}$ , pero forma homodímeros para llevar a cabo su actividad (Rodicio, et al., 1994).

*M.SalI* es una metiltransferasa de 65 kDa, dependiente del co-sustrato SAM y se encarga de transferir grupos metilo a las adeninas del DNA de *S. albus* en la secuencia 5' GTCGm6AC 3', evitando que estos sean cortados por *SalI* (Rodicio, et al., 1994).

Chater & Wilde en 1980 y Rodicio & Chater en 1988 demostraron la actividad como sistema de restricción-modificación de *SalI* en pruebas *in vitro*, reportaron que es un sistema de amplio espectro *in vivo* ya que protege a *S. albus* de muchos bacteriófagos de la familia Siphoviridae, en los que se incluyen bacteriófagos afines al fago  $\phi$ C31, así como bacteriófagos afines al fago  $\lambda$ .

Se han reportado diversos isoescizómeros de *SalI* purificados de diversos organismos como; *Xaml* de *Xanthomonas amaranthicola* o *Rrol* de *Rhodococcus rhodochrous*. Las secuencias de estos isoescizómeros no resultan ser ortólogos de *SalI* por lo que surgieron como un evento de especiación temprano al divergir los diferentes grupos de bacterias. (Rodicio & Chater 1988)

### **2.9 Proteínas asociadas al nucleóide.**

Al igual que en otros dominios de organismos vivos, en bacterias existe un grupo de proteínas y factores de transcripción, que pueden organizar y modificar la topología del cromosoma bacteriano, teniendo como función principal la regulación de la expresión genética mediante el super-enrollamiento de regiones específicas del DNA, o la unión a sitios de reconocimiento y bloqueo de la transcripción de genes específicos. En conjunto estas proteínas son denominadas NAPs (**N**ucleoid-**A**ssociated **P**roteins), que constituyen

una superfamilia de proteínas bacterianas con funciones diversas (Drlica K & Rouviere-Yaniv J. 1984).

Una de las NAPs más estudiada es la proteína H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) de *E. coli*, asimismo se han encontrado genes análogos y homólogos que codifican proteínas de tipo H-NS en diversos grupos de bacterias. Esto sugiere que la modificación de la topología del cromosoma bacteriano y la regulación genética por medio de esta modificación son mecanismos ampliamente diversificados en las bacterias (Picker & Wing, 2017).

### **2.10 NAPs de la familia Lsr2.**

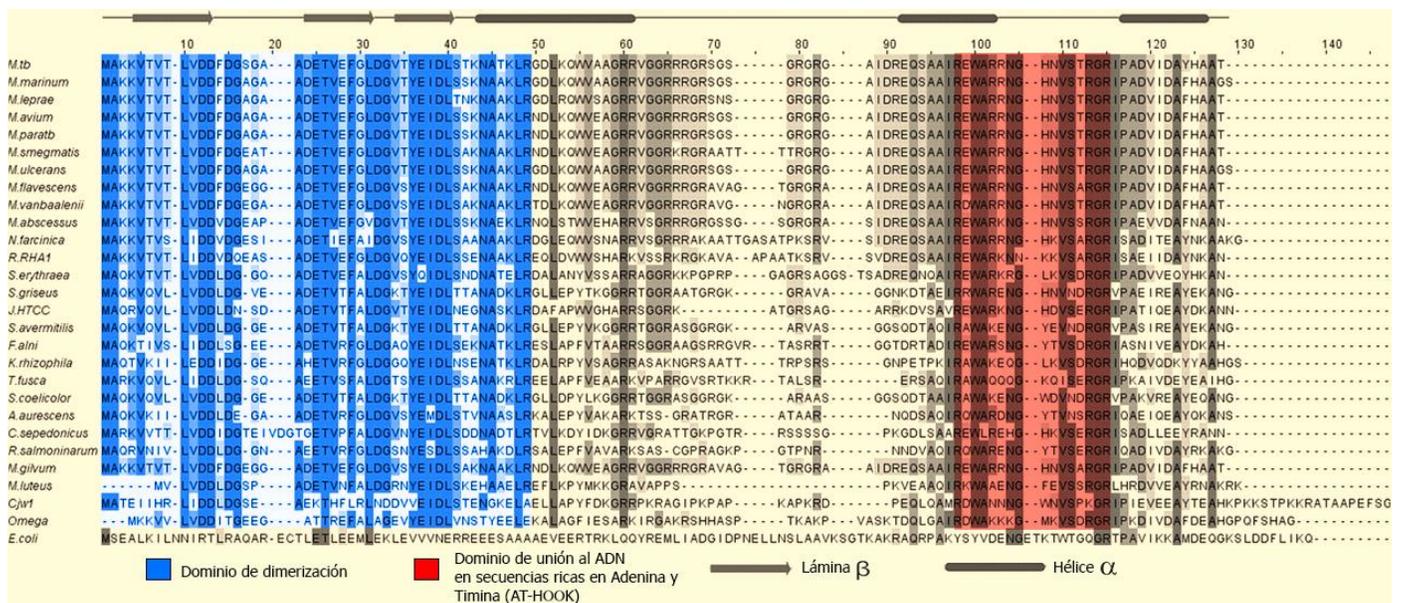
Dentro de la superfamilia de las NAPs se encuentra un grupo de proteínas de bajo peso molecular exclusivas de las actinobacterias, denominado Lsr2 (**L**eprosy **S**erum **R**eactive clone 2).

Las proteínas Lsr2 fueron identificadas como un antígeno fuerte que promovía la aparición de células T en pacientes infectados con lepra (Laal, 1991).

Estas proteínas tienen un peso molecular de ~12 kDa, y su función es análoga a la de las proteínas H-NS de proteobacterias, es decir, actúan como silenciadores xenogénicos y como reguladores de la transcripción de genes, a través de la modificación de la topología del cromosoma bacteriano y la represión de la región promotora de los genes (Gordon, et al., 2008).

La actividad y estructura de las proteínas tipo Lsr2 conocidas, se basa en estudios realizados en actinobacterias del género *Mycobacterium* (específicamente en *Mycobacterium tuberculosis*), en la cual regulan factores de virulencia, la biosíntesis de la pared celular, la resistencia a antibióticos y la respuesta a factores ambientales desfavorables (Le Moigne, et al., 2019 & Chen, et al., 2006).

Gordon y cols. en 2008 demostraron que las proteínas Lsr2 son análogos funcionales de las proteínas H-NS, pues se unen al DNA como un dímero y pueden formar puentes de hidrogeno entre regiones intergénicas del cromosoma bacteriano, limitando la actividad de la ARN polimerasa. También que estas proteínas se unen al DNA de manera no especifica, pero con una tendencia a la unirse en secuencias ricas en AT, lo cual se atribuye a la presencia de un motivo de unión codificado por la secuencia arginina-glicina-arginina, que codifica un gancho de unión a este tipo de secuencias análogo al que está presente en las proteínas HMG-1 de eucariontes (**Figura 4**).



**Figura 4.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas Lsr2 de diferentes actinobacterias. En el alineamiento es posible observar la presencia de aminoácidos conservados y la abundancia de aminoácidos cargados positivamente. La proteína está conservada en los diferentes géneros de actinobacterias (Gordon, et al., 2008).

El número de proteínas Lsr2 o similares a Lsr2 que tienen las actinobacterias es variable dependiendo del género en estudio. La mayoría de las actinobacterias poseen un gen que codifica una proteína homóloga a Lsr2 de *M. tuberculosis*. Aunque en algunos casos pueden poseer más de un gen parálogo que codifica proteínas homólogas a Lsr2, por ejemplo, *Rhodococcus jostii* RHA1 que posee 9 o *Amycolatopsis mediterranei* S669 que posee 7 (Pérez-Rueda et al., 2015).

### 2.11 NAPs Lsr2 en *Streptomyces*

Los genes para proteínas Lsr2 se encuentran presentes en todos los cromosomas secuenciados de *Streptomyces* como dos copias homólogas a las proteínas Lsr2 de *M. tuberculosis*. Estas proteínas son nombradas Lsr2 y Lsr2-Like (**LsrL**), dependiendo de su importancia funcional (Chandra & Chater, 2014).

Al igual que en actinobacterias del género *Mycobacterium*, se ha demostrado que las proteínas Lsr2 y LsrL de *Streptomyces* están implicadas en la organización del cromosoma bacteriano y la regulación de la expresión génica.

- **2.11.1 NAPs Lsr2 en *Streptomyces venezuelae*.**

En *Streptomyces venezuelae* se han descrito dos genes parálogos de proteínas Lsr2: SVEN\_3225 y SVEN\_3832. SVEN\_3225 es más abundante y está involucrada en el desarrollo, crecimiento y esporulación de *S. venezuelae*, además es una proteína esencial para regular el silenciamiento del metabolismo críptico y la producción de metabolitos secundarios. Mientras que SVEN\_3832 es menos abundante, y también está implicada en la supresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios (Gehrke, et al., 2019).

- **2.11.2 SVEN\_3225 Y SVEN\_3832.**

La proteína SVEN\_3225 está constituida por 111 residuos de aminoácidos, posee 36.06% de identidad con Lsr2 de *M. tuberculosis*, mientras que SVEN\_3832, de 160 residuos,

posee 21.87% de identidad con Lsr2 de *M. tuberculosis*. Ambas proteínas poseen un motivo de unión a secuencias ricas en AT como el en Lsr2 de *M. tuberculosis*.

Al comparar las secuencias de las proteínas Lsr2 entre *S. coelicolor* y *S. venezuelae*, SCO3375 y SVEN\_3225 poseen una identidad del 80.18%. Mientras que SCO4076 Y SVEN\_3832 poseen una identidad de 68.46%. Esto sugiere que una de las dos copias parálogas, es más importante que la otra (Gehrke, et al., 2019).

- **2.11.3 NAPs Lsr2 en *Streptomyces coelicolor*.**

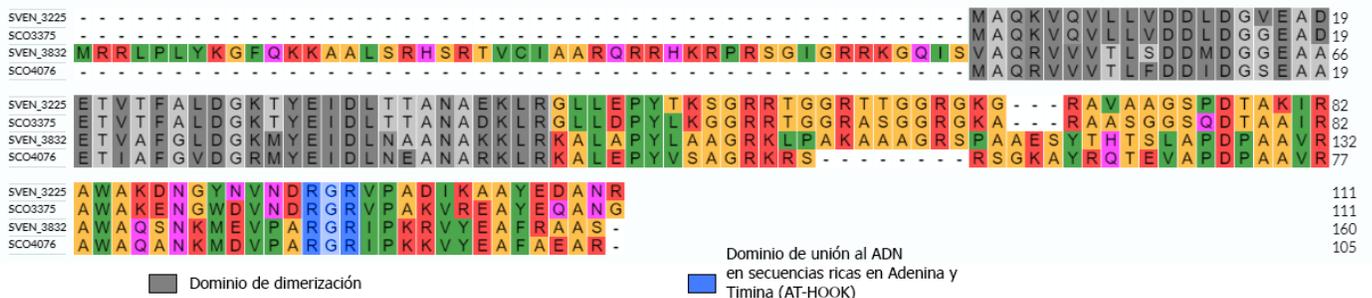
En el genoma de *S. coelicolor* existen dos genes que codifican proteínas Lsr2: SCO3375 y SCO4076. Bradshaw, y cols. en 2013 realizaron un estudio proteómico en el que buscaron medir la abundancia de diferentes NAPs asociadas al cromosoma de *S. coelicolor*, donde identificaron un conjunto de 24 proteínas con una alta probabilidad de ser definidas como NAPs, entre las que se encuentra SCO3375 de manera abundante y SCO4076 en menor abundancia, ambas de manera significativa de acuerdo al criterio utilizado en su estudio. En este mismo estudio infieren que el gen SCO3375 se expresa en mayor abundancia debido a que este se encarga fundamentalmente de la organización del cromosoma bacteriano, mientras que SCO4076 solamente regula la transcripción de genes.

En 2020 Keller Y. demostró que SCO3375 y SCO4076 no codifican proteínas redundantes, puesto que SCO3375 codifica una proteína esencial para *S. coelicolor*, mientras que la ausencia de SCO4076 no afecta el desarrollo de las células. Así mismo el gen SCO3375 puede ser deletado de la célula, solo si esta presenta una copia extra del gen en un plásmido. Tanto el gen SCO3375 como SCO4076 están implicados en el proceso de desarrollo celular, específicamente en la regulación de genes relacionados con la esporulación.

- **2.11.4 SCO3375 Y SCO4076.**

La proteína SCO3375 está constituida por 111 residuos, posee 55.5% de identidad con la proteína Lsr2 de *M. tuberculosis* UT205. Entre sus características se destaca la presencia de un motivo de unión a secuencias ricas en AT codificado por la secuencia arginina-glicina-arginina (Reeves, 2001).

SCO4076 está constituida por 105 residuos, posee una identidad del 45.53% con respecto a Lsr2 de *M. tuberculosis*. SCO4076, también posee un motivo de unión a secuencias ricas en AT (RGR). Entre SCO3375 y SCO4076 hay una identidad del 52.40% (**Figura 5**).



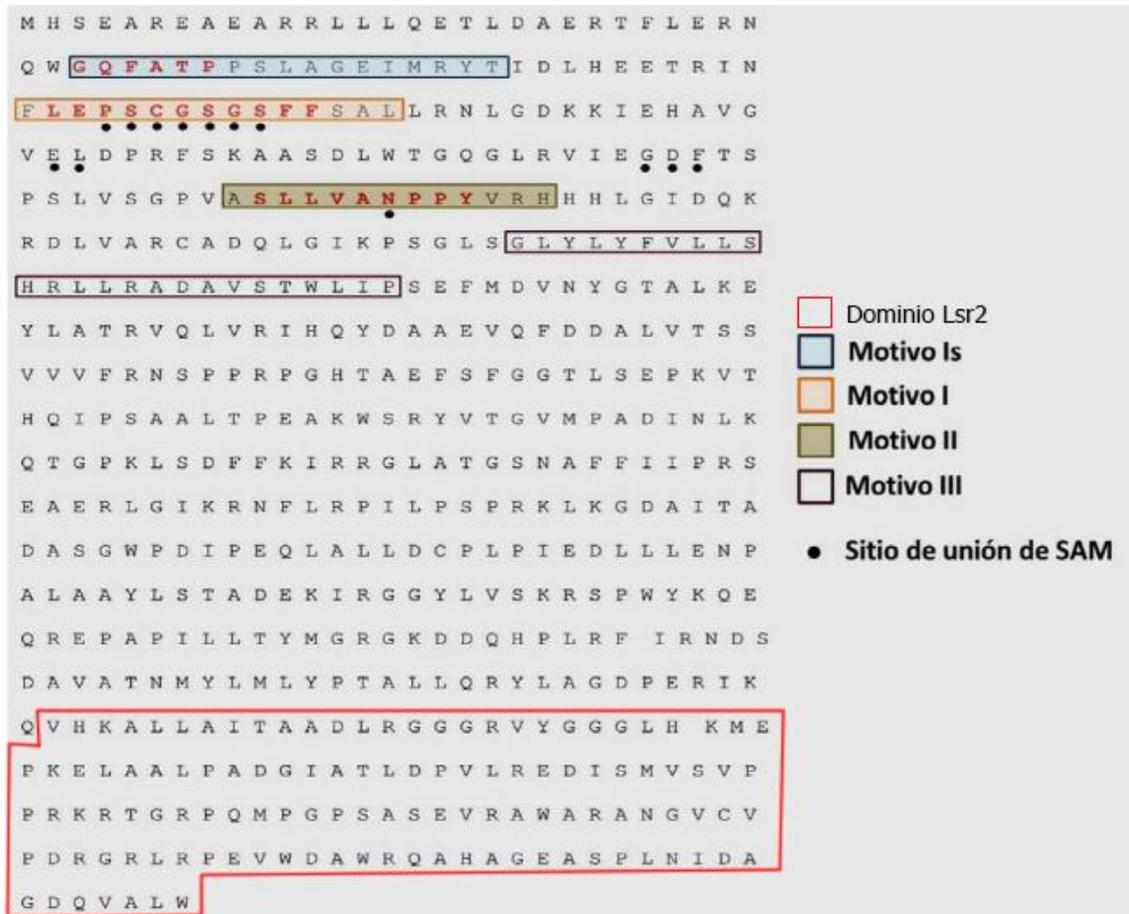
**Figura 5.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas Lsr2 de *Streptomyces coelicolor*, SCO3375 y SCO4076 y *Streptomyces venezuelae*; SVEN\_3225 y SVEN\_3832. Se observa el alto grado de conservación de las secuencias, así como la conservación de los dominios importantes en las proteínas Lsr2

## **2.12 Dominio Lsr2 en M.Sal de S. albus.**

Gómez D. (2015) logró clonar, expresar, purificar y optimizar la actividad *in vitro* de la metiltransferasa M.Sal. Posteriormente, con la finalidad de identificar los dominios

conservados, analizó la secuencia de la metilasa M.SalI mediante una búsqueda de homología con el programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), encontrando dos motivos conservados en todas las metiltransferasas: **CMI**, encargado de transferir grupos metilo y **CMII**, el sitio de unión a SAM, además de otros dos motivos conservados denominados **Is** y **III**. También describió la presencia de un dominio homólogo a **Lsr2** en una pequeña región en la zona **carboxilo terminal (C-terminal)** de la enzima M.SalI (**Figura 6**).

### M. SalI



**Figura 6.** Secuencia de aminoácidos de la metilasa M.SalI, en la que se marcan ciertas características, en rojo se encuentran señalados motivos conservados (Gómez D. 2015).

El dominio Lsr2 de la metilasa M.SalI según esta búsqueda consta de 122 residuos, posee una secuencia similar a otras proteínas Lsr2 descritas en *Streptomyces*, además comparte con estas la presencia de un motivo de unión a secuencias ricas en **AT** (RGR), por lo que este dominio podría estar involucrado en la unión de la enzima M.SalI con las secuencias de DNA que reconoce o con la actividad de metilasa de esta enzima. Interesantemente, la metilasa M.SalI de *S. albus* es la única enzima en la que se ha reportado un dominio Lsr2, cosa que no ocurre en otras metiltransferasas de la misma familia o homólogas a esta.

### 3. Antecedentes

Como ya se mencionó, todas las proteínas homólogas a Lsr2 presentan como característica principal la interacción con DNA, actuando fundamentalmente como reguladores xenogénicos y factores de transcripción que se unen al DNA para modificar la topología del cromosoma bacteriano.

Una mutante de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, con una delección en un par de bases en el gen para la proteína Lsr2 (específicamente en el motivo de unión a DNA rico en AT) presentacaracterísticas distintas al fenotipo silvestre. Entre dichas características se encuentra la capacidad para deslizarse sobre agar (hipermotilidad) y una mayor resistencia a las infecciones por fagos y a antibióticos de amplio espectro (Arora, et al., 2008).

Además, Chen, y cols. en 2006 demostraron que una mutación puntual en la segunda arginina del motivo de unión RGR (R86A) en la proteína homóloga a Lsr2 de *M. smegmatis* **tiene una unión defectuosa al DNA** comprometiendo la actividad nativa de la proteína. Este motivo está conservado en la secuencia del dominio Lsr2, presente en el extremo C-terminal de la metilasa M. *SaI* (Figura 7), por lo que podría estar involucrado en la unión de esta enzima al DNA.

Dominio Lsr2 M. <i>SaI</i> <i>S. albus</i>	VHKALLAITAADLRGG-----GRVYGGGLHKMEPKELAALPADGIATLDPVLR	48	
<i>S. coelicolor</i> SCO4076	MAQRVVVTLFDDIDGS-EAAETIAFGVDGRMYEIDLNEANAR-----KLR	44	
<i>S. coelicolor</i> SCO3375	MAQKVQVLLVDDLDDGG-EADEVTFALDGKTYEIDLTTANAD-----KLR	44	
<i>M. tuberculosis</i> UT205	MAKKVTVTLVDDFDGSGAADEVTEFGLDGVTYEIDLSTKNAT-----KLR	45	
<i>M. leprae</i> TN	MAKKVTVTLVDDFDGAGADEVTEFGLDGVTYEIDLTKNAA-----KLR	45	
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	MAKKVTVTLVDDFDGGEATADDEVTEFGLDGVTYEIDL SAKNAA-----KLR	45	
Dominio Lsr2 M. <i>SaI</i> <i>S. albus</i>	EDISMVSVPPR-----KRTGRPQMPGPSASEVRAWARANGVCPDRGRLRPE	95	
<i>S. coelicolor</i> SCO4076	KALEPYVSAGRKRSRS----GKAY---RQTEVADPPAAVRAWAQANKMDVPARGRIPKK	96	
<i>S. coelicolor</i> SCO3375	GLLDPYLKGGRRRTGGRASGGRGKARAASGG---SQDTAAIRAWAKENGWVNDRGRVPAK	101	
<i>M. tuberculosis</i> UT205	GDLKQWVAAGR RVGGRRRGRSG--SGRGRGAIDREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPAD	103	
<i>M. leprae</i> TN	GDLRQWVSAGRRVGGRRRGRSN--SGRGRGAIDREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPAD	103	
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	NDLKQWVEAGR RVGGRKRGRAATTTTRGRGAIDREQSAAIREWARRNGHNVSTRGRIPAD	105	
Dominio Lsr2 M. <i>SaI</i> <i>S. albus</i>	VWDARQAHAGEASPLNIDAGDQVALW	122	
<i>S. coelicolor</i> SCO4076	VYEAFAEAR-----	105	
<i>S. coelicolor</i> SCO3375	VREAYEQANG-----	111	
<i>M. tuberculosis</i> UT205	VIDAYHAAT-----	112	
<i>M. leprae</i> TN	VIDAFHAAT-----	112	
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	VIDAFHAAT-----	114	

■ Motivo de union AT "RGR"

■ Identities

**Figura 7.** Alineamiento de las secuencias de las proteínas Lsr2 de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. tuberculosis* UT205, *M. leprae* TN, SCO4076 y SCO3375 de *S. coelicolor* M145, con el extremo C-terminal de la metilasa M. *SaI* de *S. albus*. Las secuencias presentan diversas identidades y sustituciones conservativas. Además, se observa la presencia del motivo "RGR" de unión a DNA rico en AT en todas las secuencias.

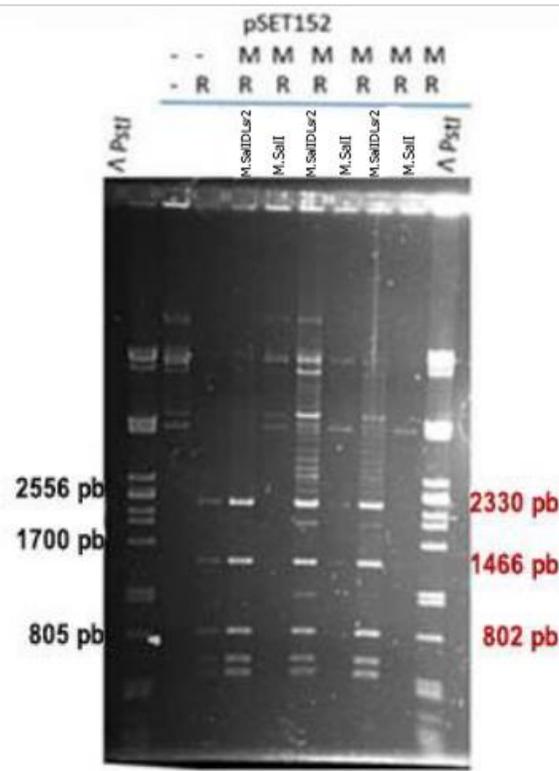
Para tener una idea de la posible estructura del dominio Lsr2 de la metilasa M. *SaI*, utilizamos el servidor Jpred4 para realizar una predicción de estructura secundaria. Éste se basa en la homología de las secuencias y las compara con secuencias de proteínas de las cuales se conoce su estructura cristalográfica (Drozdetskiy, 2015).

De acuerdo con este análisis, el dominio Lsr2 de la enzima M. *SaI* presenta diversos motivos estructurales que se encuentran conservados en algunas proteínas Lsr2 que se han cristalizado a partir de *Mycobacterium*. Entre estos motivos se encuentran, del extremo N-terminal al C-terminal, una lámina β, una horquilla β, y múltiples α-hélices.

Además el servidor relaciona la secuencia del dominio Lsr2 de M. *SaI* con la secuencia de la proteína Lsr2 de *M. tuberculosis* Rv3597c. La proteína Lsr2 de *M. tuberculosis* Rv3597c fue cristalizada por Summers, et al., (2012), quienes describieron que la proteína forma dímeros para poder unirse al DNA del cromosoma bacteriano (Figura 8).



*M. SaI*ΔLsr2 se veía afectada por la ausencia del dominio Lsr2 (Figura 10), protegiendo de manera poco significativa al DNA blanco, de la escisión por la enzima *SaI*.



**Figura 10.** Actividad de metilación por las enzimas *M. SaI* silvestre y la mutante *M. SaI*ΔLsr2. En esta Figura se observa que las muestras de plásmido tratadas con *M. SaI*ΔLsr2 presentan una digestión parcial contra la endonucleasa de restricción *SaI*. Como control se observa el plásmido sin tratar con la metilasa, es decir, no metilado (-), ni digerido con la enzima de restricción *SaI* (R). El siguiente carril muestra al plásmido sin metilar (-) digerido con *SaI* (R). El resto de los carriles corresponden al plásmido tratado con metilasa (M, Silvestre o Mutante) y digerido con *SaI* (R). (Keller Y. 2020).

Debido a estos antecedentes, en este trabajo se evaluará si el dominio Lsr2 en la metiltransferasa *M. SaI* es importante para función de la enzima, y también cómo este está relacionado con la actividad de la metiltransferasa, destacando la importancia del mismo para el reconocimiento y unión a secuencias de DNA.

## 4. Hipótesis

Si el resultado preliminar es replicable, implicaría que el dominio Lsr2 de la metiltransferasa M.SalI interviene de forma negativa en la unión de la enzima con el ADN, al modificarlo en una región importante y/o eliminarlo de la enzima, afectando su actividad de metiltransferasa.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general.

- Con el fin de corroborar los antecedentes, estudiar la actividad de la metiltransferasa M.SalI de *Streptomyces albus*, así como la contribución del dominio Lsr2 en la actividad de metilación de esta enzima.

### 5.2 Objetivos específicos.

- Modificar el gen silvestre de la metiltransferasa M.SalI, eliminando el dominio (M.SalI $\Delta$ Lsr2), y/o realizar una mutación puntual en la segunda arginina del motivo "RGR" de unión a DNA (M.SalI R556A).

- Clonar las secuencias de M.SalI, M.SalI $\Delta$ Lsr2 y MSalI R556A en plásmidos de expresión.

- Expresar, purificar y medir la actividad *in vitro* de la metiltransferasa M.SalI y sus variantes M.SalI $\Delta$ Lsr2 y MSalI R556A, mediante un ensayo de metilación que permita observar la capacidad de protección del DNA contra la escisión de la endonucleasa SalI.

- Caracterizar la unión de las proteínas (M.SalI, M.SalI $\Delta$ Lsr2 y MSalI R556A) al DNA mediante ensayos EMSA.

- Observar la capacidad de metilación *in vivo* del DNA genómico de una cepa de *E. coli* carente de sistemas de metilación propios.

## 6. Material Y Métodos

### 6.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo

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

ORGANISMOS		
Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Delta$ (argF-lac)169, lacZ $\Delta$ M15, recA1, endA1, hsdR17	Hanahan, 1985
BW25113	F <sup>-</sup> , DE(araD-araB)567 lacZ4787(del)::rrnB-3 LAM- rph-1 DE(rhaD-rhaB)568 hsdR514	Lessard et al., 1998
IBEC58	$\Delta$ dam, $\Delta$ dcm, $\Delta$ hsdRMS Derivada de BW25113	González-Cerón G., et al., 2009
BL21 DE3 Rosetta2	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
<i>Streptomyces lividans</i>		
1326	SLP1+ SLP2+	Hopwood et al., 1983

Tabla 2. Plásmidos

PLÁSMIDOS		
Nombre	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
Vectores		
pBluescript II SK	Vector de clonación Amp <sup>R</sup>	Alting-mees et al., 1989
pET28a	Vector de expresión T7 promotor, N-terminal His Tag, C-terminal His Tag, LacI, Kan <sup>R</sup>	Novagen
pSET152	Vector integrativo Apr <sup>R</sup> , lacZ- $\alpha$ , $\phi$ -C31 integrasa.	Kieser et. al, 2000
pUC18	Vector de clonación Amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron, C et al., 1985
Constructos genéticos		
pUC18 – M. <i>Sa</i> I	M. <i>Sa</i> I clonado en el plásmido pUC18	Este trabajo
pUC18 – M. <i>Sa</i> I $\Delta$ Lsr2	M. <i>Sa</i> I $\Delta$ Lsr2 clonado en el plásmido pUC18	Este trabajo
pUC18 – M. <i>Sa</i> I/R556A	M. <i>Sa</i> I/R556A clonado en el plásmido pUC18	Este trabajo
pBluescript II SK - M. <i>Sa</i> I	M. <i>Sa</i> I clonado en el plásmido pBluescript II SK	Este trabajo
pET28a – M. <i>Sa</i> I 6HNT	M. <i>Sa</i> I clonado en el plásmido pET28a poniendo la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	Este Trabajo
pET28a – M. <i>Sa</i> I $\Delta$ Lsr2 6HNT	M. <i>Sa</i> I $\Delta$ Lsr2 clonado en el plásmido pET28a poniendo la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	Keller Y. 2020
pET28a – M. <i>Sa</i> I/R556A 6HNT	M. <i>Sa</i> I/R556A clonado en el plásmido pET28a poniendo la	Este trabajo

	etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	
<i>Streptomyces</i>		
<b>Vectores</b>		
pIJ6021	Vector de expresión PtipA Kan <sup>R</sup> , Tsr <sup>R</sup> , Tsr-inducible.	Takano, et al., 1995
pIJ6021-STIIC	Vector de expresión derivado del plásmido pIJ6021, modificado para poner la etiqueta Streptag II en el extremo C-terminal. No conjugativo, multicopia, Kan <sup>R</sup> Tsr <sup>R</sup> , promotor tipAP, Tsr-inducible.	Keller Y. 2020
pIJ6021-6HNT	Vector de expresión derivado del plásmido pIJ6021, modificado para poner la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. No conjugativo, multicopia, Kan <sup>R</sup> Tsr <sup>R</sup> , promotor tipAP, Tsr-inducible.	Este trabajo
pIJ6021-6HCT	Vector de expresión derivado del plásmido pIJ6021, modificado para poner la etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal. No conjugativo, multicopia, Kan <sup>R</sup> Tsr <sup>R</sup> , promotor tipAP, Tsr-inducible.	Este trabajo
<b>Constructos genéticos</b>		
pIJ6021-STIIC – M. <i>SaII</i>	M. <i>SaII</i> clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta Streptag II en el extremo C-terminal	Este trabajo
pIJ6021-STIIC – M. <i>SaII</i> ΔLsr2	M. <i>SaII</i> ΔLsr2 clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta Streptag II en el extremo C-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HNT – M. <i>SaII</i>	M. <i>SaII</i> clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HNT – M. <i>SaII</i> ΔLsr2	M. <i>SaII</i> ΔLsr2 clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HNT – M. <i>SaII</i> R556A	M. <i>SaII</i> R556A clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HCT – M. <i>SaII</i>	M. <i>SaII</i> clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HCT – M. <i>SaII</i> ΔLsr2	M. <i>SaII</i> ΔLsr2 clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal	Este trabajo
pIJ6021-6HCT – M. <i>SaII</i> R556A	M. <i>SaII</i> R556A clonado en el plásmido pIJ6021 que pone la	Este trabajo

	etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal	
--	---	--

Tabla 2. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos			
Nombre	Secuencia	Sitios de corte	Referencia
ARG2Forward	5'- ggT gTg TGC gTA CCC gAT gCC ggT Cgg CTT CgC CC -3'		Este trabajo
ARG2Reverse	5'- ggg CgA AgC CgA CCg gCA TCg ggT ACg CAC ACA CC -3'		Este trabajo
ARG2_FIPCR	5'- gAT gCC Tgg CgA CAg gCA C -3'		Este trabajo
ARG2_RIPCR	5'- ACA CAC CgT TTg CgC gTg C -3'		Este trabajo
SaMStrepTagII	5'- gAC gAA TTC CAC AAA gCG ACT TGA TCC CC -3'	<i>EcoRI</i>	Este trabajo
SaMBHINup	5'- Cgg gAT CCA TAT gCA TAg CgA ggC gAg AgA g -3'	<i>BamHI</i> & <i>NdeI</i>	Este trabajo
DomLsr2NdeIF	5'- ggg gCA TAT ggT ACA TAA AgC CCT CCT AgC C-3'	<i>NdeI</i>	Keller Y. 2020
DomLsr2EcoRID	5'- ggg gAA TTC TCA CCA CAA AgC gAC TT -3'	<i>EcoRI</i>	Keller Y. 2020
SaMsinLsrEco	5'- ggg gAA TTC ACg gAg ggA CCg ACA CCA TCg -3'	<i>EcoRI</i>	Keller Y. sin reportar
PstDown	5'- Cgg CTg CAg CTC gCC Cg -3'	<i>PstI</i>	González-Cerón G. sin reportar
SacUp	5'- gCT gCg gTC gAC gAg CTC -3'	<i>SacI</i>	González-Cerón G. sin reportar
6021HamF	5' – CCA CTC CgC CCA TAT gAA gCT TTC Tag Agg ATC CAT gCA TgA ATT CCC CAg ATC TAA AgT TTT gTC -3'	<i>NdeI</i>	González-Cerón G. sin reportar
6021HamR	5'- AAg CTT CAT ATg ggC ggA gTg gTg gTg gTg gTg gTg CAT CCT TCC gCT CCC TTC TCT gAC g -3'	<i>NdeI</i>	González-Cerón G. sin reportar

## 6.2 Cepas, almacenamiento, medios y condiciones de cultivo.

En el caso de *E. coli*, las cepas utilizadas fueron DH5 $\alpha$  para procesos de clonación, IBEC58 para procesos de clonación y obtención de DNA no metilado, y BL21 DE3 Rosetta 2 para la expresión de proteínas.

Para las cepas DH5 $\alpha$  e IBEC58 se utilizó medio líquido YT2X y medio sólido LB-agar, las células crecieron a 37 °C.

Para la cepa BL21 DE3 Rosetta 2 se utilizó medio líquido YT2X suplementado con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 M y glicerol 0.4%, el medio sólido fue LB-agar. De igual forma las células crecieron a 37 °C. El almacenamiento de células de *E. coli* fue mediante suspensiones densas de células en glicerol 10% (v/v) a -20 °C.

En el caso de *Streptomyces lividans* la cepa utilizada fue 1326 para procesos de clonación y expresión de proteínas. Para la transformación, se generaron protoplastos tratados con polietilenglicol y se utilizó medio sólido R2. Para la obtención de esporas se utilizó medio MS (Mannitol Soya Flour), y para la expresión de proteínas se utilizó medio LB sacarosa 25% (Keiser, et al., 2000). El almacenamiento de esporas en *S. lividans* fue mediante suspensiones densas de esporas en glicerol 20% (v/v) a -20 °C.

## 6.3 Re-amplificación de M.SaI

A partir de un fragmento de DNA cromosómico que contenía el gen *M.SaI*, se realizó una amplificación mediante PCR donde además se agregaron los sitios de corte de *BamHI* *NdeI* y *EcoRI* utilizando el par de oligos SaMBHINup y SaMStrepTagII. El producto de esta síntesis fue clonado en los sitios de *BamHI* y *EcoRI* del plásmido pUC18 para su reamplificación y posterior verificación por secuenciación.

Posteriormente el fragmento *M.SalI* se subclonó entre el sitio de *NdeI* y *EcoRI* de los vectores de expresión pET28a, pIJ6021-STIIC, pIJ6021-6HNT y pIJ6021-6HCT.

#### 6.4 Construcción de una mutante puntual de *M.SalI* *SaMR556A*

A partir del fragmento de DNA del gen *SaM* se amplificaron dos subproductos mediante PCR. Para el primer subproducto se utilizaron el par de oligonucleótidos *SaMBHINup* y *ARG2Reverse* para amplificar la mayor parte del gen desde su extremo N-terminal donde además se cambiaron las bases para llevar a cabo las mutaciones R556A.

Para el segundo subproducto se utilizó el par de oligonucleótidos *SaMStrepTagII* y *ARG2\_FIPCR* para amplificar desde el sitio de la mutación de interés hasta el extremo C-terminal (donde termina la secuencia).

Posteriormente estos productos fueron utilizados como templados capaces de empalmarse y que tuvieran la mutación. Con el par de oligonucleótidos *SaMBHINup* y *SaMStrepTagII* se amplificó de nuevo el gen completo con las mutaciones para sustituir la arginina 556 por una alanina (Figura 11).

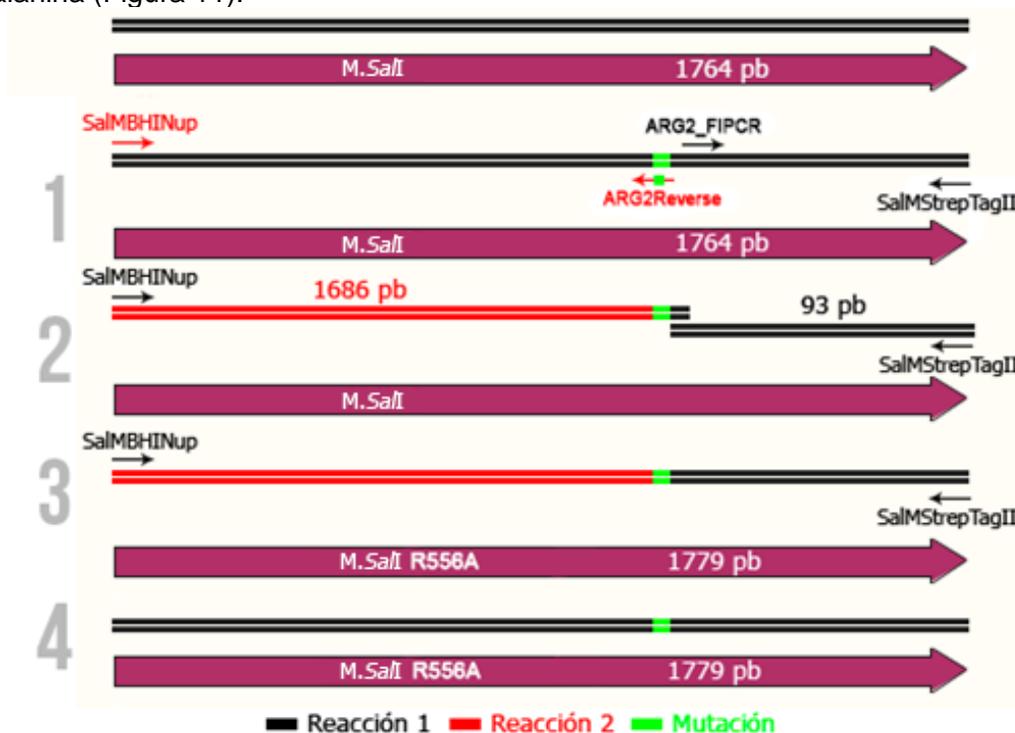


Figura 11. Estrategia experimental. Overlap PCR donde se ilustra el resultado de ambas reacciones por separado y la manera de unirlos para volver a amplificar el gen *M.SalI*

El producto de esta amplificación fue clonado entre los sitios de *BamHI* y *EcoRI* del plásmido pUC18 y fue verificado por secuenciación.

Posteriormente el fragmento *M.SalI* R556A se subclonó entre el sitio de *NdeI* y *EcoRI* de los vectores de expresión pET28a, pIJ6021-STIIC, pIJ6021-6HNT y pIJ6021-6HCT.

#### 6.5 Construcción de una mutante sin dominio *Lsr2* *M.SalI*Δ*Lsr2*

A partir del fragmento de DNA del gen *M.SalI* se amplificó un producto mediante PCR utilizando el par de oligos *SaMBHINup* y *SaMsinLsrEco*. El producto de esta síntesis fue clonado en los sitios de *BamHI* y *EcoRI* del plásmido pUC18 y verificado por secuenciación (Figura 12).



Figura 12. Estrategia experimental. PCR para eliminar el dominio con función homóloga a Lsr2 a partir del gen *SaM*.

Posteriormente el fragmento *M.SaIIΔLsr2* se subclonó entre el sitio de *NdeI* y *EcoRI* de los vectores de expresión pET28a, pIJ6021-STIIC, pIJ6021-6HNT y pIJ6021-6HCT.

### **6.6 Expresión y purificación de la metiltransferasa *M.SaI* y sus variantes**

En el caso de *E. coli* Rosetta2 con los plásmidos derivados del pET28a, con los genes de las metiltransferasas clonados, se crecieron las células en medio YT2X suplementado con 10% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.17 M y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.72 M y glicerol 0.4% con los antibióticos kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloranfenicol (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 37 °C con agitación constante hasta llegar a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.5.

La expresión de las proteínas se realizó mediante la inducción con 1mM de IPTG, posteriormente se incubaron las células a 18 °C durante 6 h más.

Para la purificación de las proteínas se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad con una columna de Ni-Sepharose HisTrap™ (Níquel-sefarosa). Se utilizó el equipo FPLC ÄktaPrime Plus (Fast Protein Liquid Chromatography) de GE Healthcare.

En el caso de *S. lividans* 1326 con los plásmidos derivados del pIJ6021 con los genes de las metiltransferasas clonados, las células se crecieron en medio LB sacarosa 25% con el antibiótico kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 30 °C con agitación constante hasta llegar a una  $\text{DO}_{450}$  de 0.4. La expresión de proteínas se realizó mediante la inducción con tioestreptón (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) posteriormente se incubaron las células a 30 °C durante 24 horas más.

Para la purificación de las proteínas se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad en este caso con una columna de Ni-Sepharose HisTrap™ (Níquel-sefarosa), una columna de HisTrap™ Capto™ Q (Milli Q intercambio aniónico fuerte) y/o una columna de HisTrap™ Capto™ S (Intercambio catiónico fuerte). Se utilizó un equipo FPLC ÄktaPrime Plus (Fast Protein Liquid chromatography) de GE Healthcare.

### **6.7 Análisis de proteínas purificadas**

Las fracciones resultantes de las purificaciones se analizaron mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se tiñeron con colorante azul de Coomassie.

También se analizaron mediante Western-Blot con un anticuerpo contra la etiqueta de 6 histidinas (Anti-6His Tag Sigma™) o contra la etiqueta StrepTag II (Strep Tag Monoclonal Antibody Thermo Fisher™)

### **6.8 Diálisis, concentración, almacenamiento y cuantificación de las proteínas purificadas.**

De manera independiente, las proteínas fueron dializadas y concentradas simultáneamente mediante centrifugación de alta velocidad utilizando un filtro Amicon® de Merck con una membrana de tamaño de poro de 10,000 MWA.

El buffer de almacenamiento utilizado para dializar y almacenar las proteínas contenía Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8, BSA 200 µg/mL, β-mercaptoetanol 5 mM y glicerol 50%.

Las proteínas fueron cuantificadas mediante reactivo de Bradford, empleando una curva patrón de BSA.

### **6.9 Pruebas de metilación *in vitro* de la metiltransferasa M.SalI y sus variantes**

Las pruebas de metilación de las enzimas purificadas se realizó mediante el protocolo propuesto por Gómez D. 2015 (Figura 13), utilizando como sustrato el plásmido pSET152, el cual tiene múltiples sitios diana tanto de *SalI* como de *M.SalI*.

Los ensayos de metilación se realizaron incubando 2 µg de cada una de las metilasas *M.SalI*, *M.SalI*ΔLsr2 y/o *M.SalI*R566A, con el plásmido pSET152 durante toda la noche a 37 °C, utilizando el buffer de reacción propuesto por Gómez D. 2015. El buffer contiene Tris-HCl 50 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y BSA 200 µg/mL a pH 8 con 1 mM de co-sustrato SAM.

El DNA resultado del proceso de metilación fue tratado con la endonucleasa *SalI* con el fin de observar la protección del DNA consecuencia de la modificación por metilación de las enzimas del DNA.

Posteriormente, para evaluar la capacidad de estas proteínas para metilar el DNA, se realizó el mismo ensayo, tomando una muestra cada hora en un intervalo de 12 horas.

El resultado de estas pruebas se analizó mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con un equipo foto-documentador “Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System”.



**FIGURA 13. Ensayo de metilación *in vitro*.** 1) El paso de metilación consiste en incubar un plásmido con múltiples sitios diana de *SalI* / *M.SalI* con las metilasas *M.SalI*, *M.SalI*ΔLsr2 y/o *M.SalI*R566A durante diferentes intervalos de tiempo en presencia del co-sustrato SAM. Si la metilación es eficiente el resultado de este ensayo será un plásmido metilado en los sitios diana de estas enzimas. Si la metilación es deficiente el resultado de este ensayo será un plásmido no metilado o metilado deficientemente 2) El paso de restricción consiste en digerir el ADN del paso anterior con la endonucleasa de

restricción *SalI* durante dos horas, posteriormente las muestras son corridas en un gel de agarosa mediante electroforesis. 3) Dependiendo de lo ocurrido en paso de metilación. Si esta fue eficiente el ADN estará protegido contra la escisión de *SalI* reflejado en un gel de agarosa con la conformación nativa del ADN utilizado para el ensayo. Si la actividad de metilación no fue eficiente o no se llevó a cabo el ADN será digerido parcial o totalmente por la enzima *SalI* por lo que en un gel de agarosa este se verá parcialmente o totalmente digerido.

### **6.10 Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)**

El plásmido pSET152 fue incubado por 15 minutos a 37 °C con diferentes concentraciones de las proteínas en buffer de reacción Tris-HCl 50 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y BSA 200 µg/mL a pH 8.

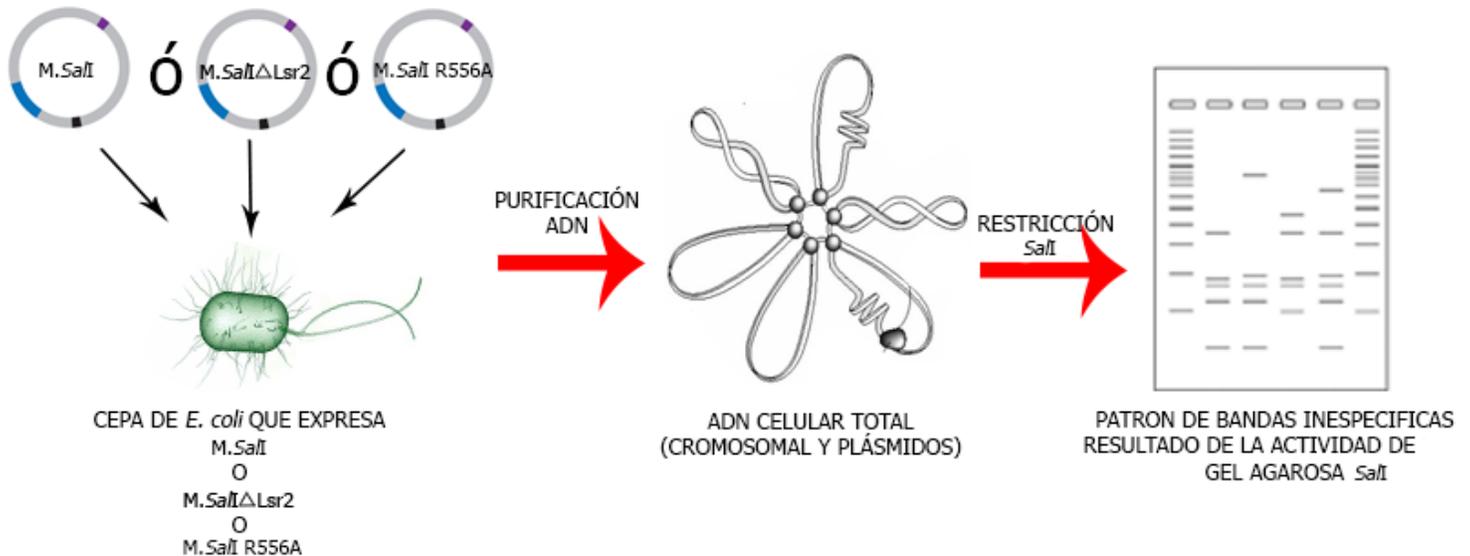
El resultado de estas reacciones se analizó mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con un equipo foto-documentador “Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System”.

### **6.11 Pruebas de metilación *in vivo* de la metiltransferasa M.SalI y sus variantes**

Los plásmidos derivados del pET28a con los genes de las metiltransferasas M.SalI, M.SalIΔLsr2 o M.SalIR556A clonados, fueron introducidos mediante electroporación a 1.5 Volts en la cepa IBEC58 que carece de sistemas de metilación propios. De las transformantes se tomaron colonias aisladas que fueron incubadas en medio líquido YT2X con 1 mM de IPTG durante 18 horas a 37 °C.

Posteriormente, se extrajo DNA total de las células (Kieser, et al., 2000) y fue digerido con la enzima *SalI* para observar la protección del DNA *in vivo* (Figura 14).

El resultado de estas reacciones se analizó mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con un equipo foto-documentador “Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System”.



**FIGURA 14. Ensayo de metilación *in vivo*.** A partir de una cepa de *E. coli* que expresa M.SalI o M.SalIΔLsr2 o M.SalIR556A, se purifico el ADN total (cromosomal y plásmidos), este ADN es tratado con la endonucleasa *SalI* y posteriormente se observa el resultado en un gel de agarosa. Dependiendo de la actividad de metilación de cada una de las enzimas. Si esta fue eficiente el ADN estará protegido contra la escisión de *SalI* reflejado en un gel de agarosa donde el ADN tendrá una conformación nativa. Si la actividad de metilación no fue eficiente o no se llevó a cabo el ADN total será digerido parcial o totalmente por la enzima *SalI* por lo que en un gel de agarosa este se verá parcialmente o totalmente digerido.

## 7. Resultados

### 7.1 Generación de constructos genéticos para la expresión de proteínas recombinantes en *Streptomyces* y *E. coli*

Para poder expresar y purificar las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI* R556A se clonaron los genes codificantes para estas proteínas en diferentes vectores de expresión tanto de *Streptomyces lividans*, como de *E. coli*.

#### - 7.1.1 Expresión de *M.SalI* y sus variantes en vectores de expresión de *Streptomyces*.

Para la expresión de las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI* R556A en *Streptomyces* se utilizaron plásmidos derivados del vector de expresión pIJ6021 (Takano, et al., 1995), los cuales colocan una etiqueta Strep Tag II en el extremo C-terminal, una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal o una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal.

#### - 7.1.2 Expresión y purificación de *M.SalI* y *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 con la etiqueta Strep Tag II C-terminal.

La purificación de *M.SalI* y *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 con la etiqueta Strep Tag II en el extremo C-terminal se realizó en *S. lividans* 1326 utilizando el vector de expresión pIJ6021-STIIC. Para la expresión de las proteínas, las células crecieron en medio LB con 25% sacarosa, y cuando el cultivo alcanzó una  $D.O_{.450} = 0.4$ , se indujo la expresión de la proteína recombinante con tioestreptón a una concentración de 50  $\mu$ g/mL.

Las proteínas fueron identificadas en la fracción soluble mediante ensayos de WB. Sin embargo, la sobreexpresión y purificación de las proteínas *M.SalI* y *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 tuvo baja eficiencia, posiblemente debido a la baja afinidad con la cual se unen a la columna de estreptavidina (**Apéndice 1**).

#### - 7.1.3 Expresión y purificación de *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A con la etiqueta de 6 histidinas C-terminal o N-terminal

La purificación de *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A con la etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal o N-terminal se realizó en *S. lividans* 1326 utilizando el vector de expresión pIJ6021-6HCT o pIJ6021-6HNT. La expresión de las proteínas se realizó en medio LB 25% sacarosa y fue inducida con tioestreptón a una concentración de 50  $\mu$ g/mL cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de  $D.O_{.450} = 0.4$ .

Las proteínas fueron identificadas tanto en la fracción soluble como en las fracciones eluyentes mediante ensayos de WB. Aunque en la sobreexpresión y purificación de las proteínas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A estas lograron unirse al níquel existía un problema de degradación significativa de las proteínas. Aunado a esto había muchas proteínas contaminantes en las fracciones de la elución (**Apéndice 2**).

#### - 7.1.4 Expresión y purificación de *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A con la etiqueta de 6 histidinas y afinidad iónica a Milli-Q y Capto™ S.

Para disminuir la abundancia de proteínas inespecíficas en el proceso de purificación de *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A fusionadas con la etiqueta de 6 histidinas, diseñamos la siguiente estrategia. Posterior a la expresión de las proteínas se realizó un primer

tratamiento de purificación basado en afinidad iónica y el punto isoeléctrico, utilizando un gradiente de cloruro de potasio. y posteriormente un segundo tratamiento de purificación convencional por afinidad a níquel. Esto resultó en una notable reducción de las proteínas contaminantes, pero también de las proteínas de nuestro interés, haciéndolas casi indetectables mediante WB. Por estas razones, esta opción fue poco viable (**Apéndice 3**). La razón principal de intentar purificar estas proteínas en *S. lividans* es debido a que anteriormente se ha reportado que estas son poco solubles cuando se expresan de manera heteróloga en *E. coli*, en condiciones nativas resulta muy difícil conseguir una gran cantidad de estas proteínas para los ensayos *in vitro*.

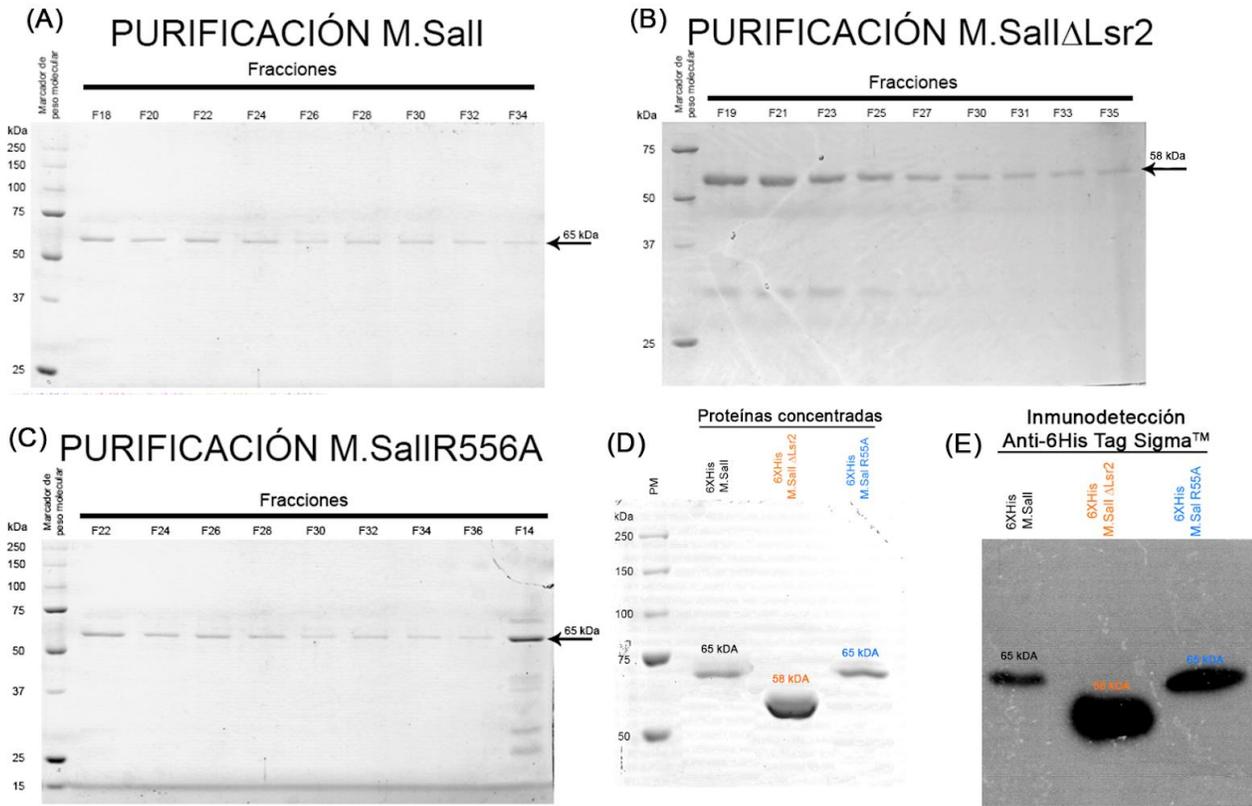
Aun así, por las razones expuestas en la sección de apéndice, al final se optó por trabajar con *E. coli*. Donde mejoramos notablemente la solubilidad de estas proteínas, mediante las condiciones de cultivo propuestas en la sección de “material y métodos”.

- **7.1.5 Expresión de M.Sal, M.Sal $\Delta$ Lsr2 y M.SalR556A en vectores de expresión de *E. coli*.**

Para la expresión de las metiltransferasas M.Sal, M.Sal $\Delta$ Lsr2 y M.SalR556A en *E. coli* BL21 DE3 Rosetta2 se utilizó el vector de expresión pET28a (Novagen), agregando la etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal.

En los tres casos se obtuvo una cantidad de proteína manejable, que se detectaba tanto en la fracción soluble total, como en las fracciones eluídas. Una vez concentradas las proteínas se veían puras y en cantidad suficiente para ser utilizadas en los ensayos de actividad.

Asimismo, al realizar la inmunodetección con el anticuerpo anti-6His se corroboró que las proteínas purificadas correspondían a las metiltransferasas M.Sal, M.Sal $\Delta$ Lsr2 y M.SalR556A (Figura 15).

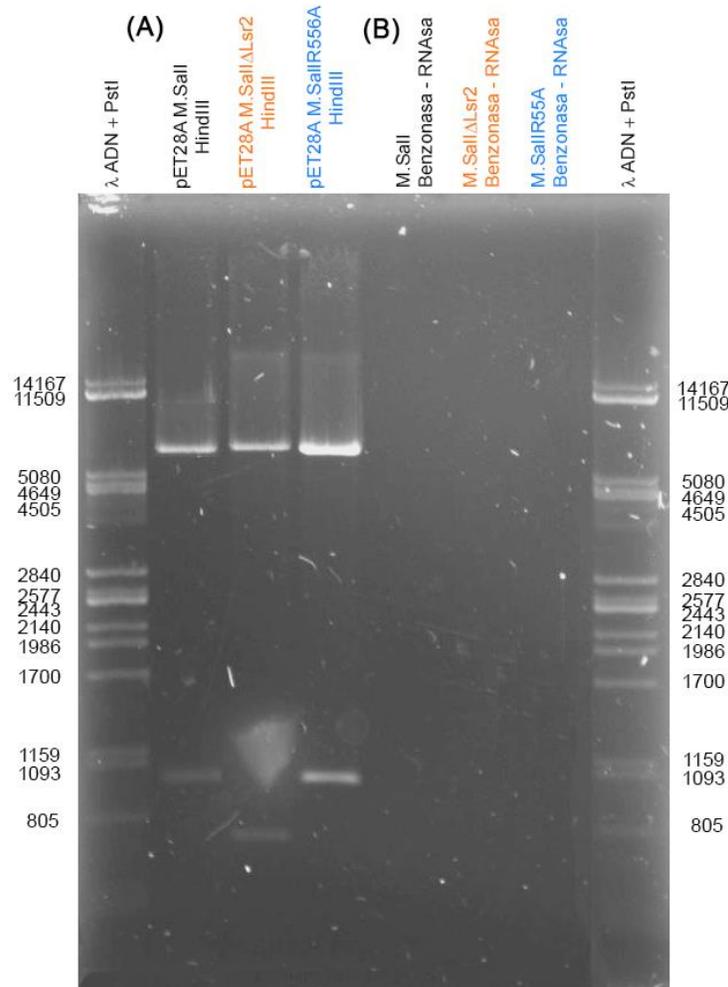


**Figura 15.** Purificación de las metiltransferasas desde *E. coli*, mediante afinidad a níquel por la etiqueta de polihistidinas; 6 his-tag (A) Resultado de la purificación de la metiltransferasa silvestre *M.SalI*. (B) purificación de la metiltransferasa *M.SalI*ΔLsr2, carente de dominio Lsr2. (C) purificación de la metiltransferasa con la mutación puntual *M.SalI*R556A. (D) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en donde se observan 2 μg de las metiltransferasas después de ser concentradas y dializadas con filtros Amicon® (10,000 MWA) donde se aprecia la diferencia de tamaños de las proteínas. (E) Western-Blot de las proteínas concentradas utilizando el anticuerpo Anti-6his Tag de Sigma™.

Como las metiltransferasas llevan a cabo su función mediante la formación de complejos DNA-proteína, además de la purificación, los extractos a partir de los que se purificaron las 3 enzimas fueron tratados con las nucleasas DNAse I, Benzonase® y RNase pancreática de ratón, con una modificación al protocolo propuesto por VingadasSalon y cols. en 2016 incubándolos a 4°C simultáneamente a la lisis de células mediante sonicación. Esto se hizo con el objetivo de que las proteínas no estuvieran contaminadas con residuos de DNA cromosómico, plásmido y ARN de las células que fueron utilizadas para expresar las proteínas y así evitar sesgos al medir la actividad de las enzimas.

Para corroborar la ausencia de DNA contaminante se corrieron 2 μg de cada proteína en un gel de agarosa al 1.2% (Figura 16).

En este gel también se incluyen las construcciones originales con las que fueron transformadas las células de *E. coli* BL21 DE3 Rosetta2 para poder llevar a cabo la expresión de las proteínas de manera heteróloga.



**Figura 16.** Análisis de la purificación y digestión de las Metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalIΔLsr2*, *M.SalIR556A* (A) Digestión realizada con la endonucleasa *HindIII* de los plásmidos pET28a donde se clonaron los genes *M.SalI*, *M.SalIΔLsr2*, *M.SalIR556A* en los sitios de *NdeI* y *EcoRI*. Se observa la diferencia en la migración de DNA del fragmento pequeño en *M.SalIΔLsr2* con respecto a *M.SalI* y *M.SalIR556A*. (B) Metiltransferasa *M.SalI*, *M.SalIΔLsr2*, *M.SalIR556A* purificada con la etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino, a partir de extractos tratados con benzonasa y RNase. Se observa que la muestra obtenida de la purificación no presenta restos del DNA cromosómico y/o de ARN de las células que fueron empleadas para expresar las proteínas por lo que se reduce el riesgo de interferencias durante la medición de su actividad enzimática.

## **7.2 Ensayos *in vitro* de la actividad de las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalIΔLsr2*, *M.SalIR556A*.**

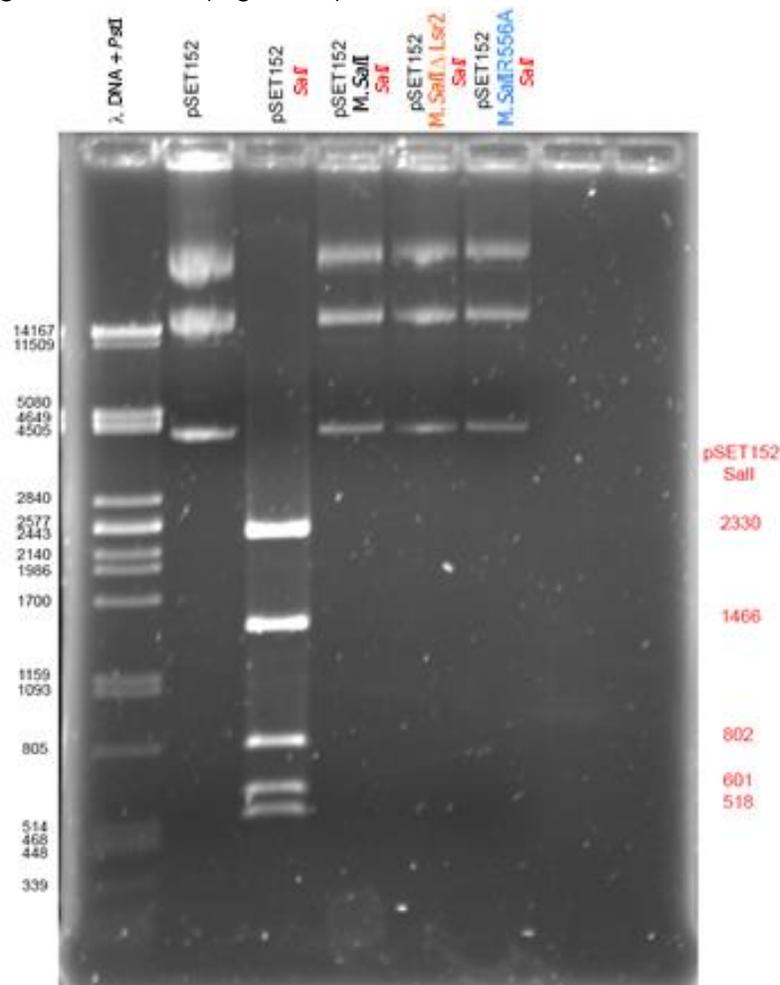
Con el fin de observar si la función del dominio homólogo a Lsr2 presente en el extremo carboxilo-terminal de la metiltransferasa *M.SalI* está relacionado con la actividad de metilación de esta enzima, se realizaron pruebas de actividad utilizando como sustrato el plásmido pSET152 circular no metilado, el cual tiene 4 sitios de reconocimiento para el sistema *SalI/M.SalI*.

En 2015 Gómez D. demostró que el DNA metilado con la metiltransferasa silvestre *M.SalI* era protegido en su totalidad contra la escisión de la enzima de restricción *SalI* después de incubar el DNA con la metiltransferasa toda la noche a 37 °C en las condiciones establecidas en dicho trabajo. Algunos resultados no publicados en ese trabajo sugerían

que un menor tiempo de incubación (entre 2 y 4 horas), no es suficiente para que la metiltransferasa *M.SalI* llevara a cabo la modificación del DNA objetivo (González-Cerón, comunicación personal).

Por esta razón se realizó un primer ensayo de metilación utilizando las proteínas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A, bajo las condiciones mencionadas en la sección de material y métodos, y adicionalmente las proteínas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Pasado este tiempo, el DNA del plásmido pSET152 fue extraído con un volumen de fenol-cloroformo 1:1 (v/v) y un volumen de cloroformo con el fin de eliminar los residuos de metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A.

Posteriormente los DNA plásmidos incubados con las metiltransferasas fueron precipitados y resuspendidos en TE para llevar a cabo un ensayo de restricción con 20 unidades de enzima *SalI*, la cual se incubó durante 2 horas. El resultado de esta digestión se observó en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 17).



**Figura 17.** Ensayo de actividad de las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2, y *M.SalI*R556A. Como control se utilizó el plásmido pSET152 sin enzimas de modificación y/o restricción, y también el plásmido pSET152 sin enzima de modificación *M.SalI* pero digerido con la endonucleasa *SalI*. En los siguientes carriles se encuentra el plásmido incubado con las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2, o *M.SalI*R556A, respectivamente, y digeridos con la enzima de restricción *SalI*.

Como se observa en la Figura 17, a diferencia de lo reportado en los antecedentes (Keller Y. 2020), al realizar un ensayo de metilación incubando el DNA toda la noche las tres

metiltransferasas (*M.SaI*, *M.SaI* $\Delta$ Lsr2, *M.SaI*R556A) tienen actividad de metilación. Esto se ve reflejado en una protección en las regiones de unión de *M. SaI* del plásmido pSET152 contra la actividad de la endonucleasa *SaI* ya que, como se observa en el gel de agarosa de la Figura 17, en los tres casos el patrón de bandas de los plásmidos se parece más al control que no fue tratado con ninguna de las dos enzimas.

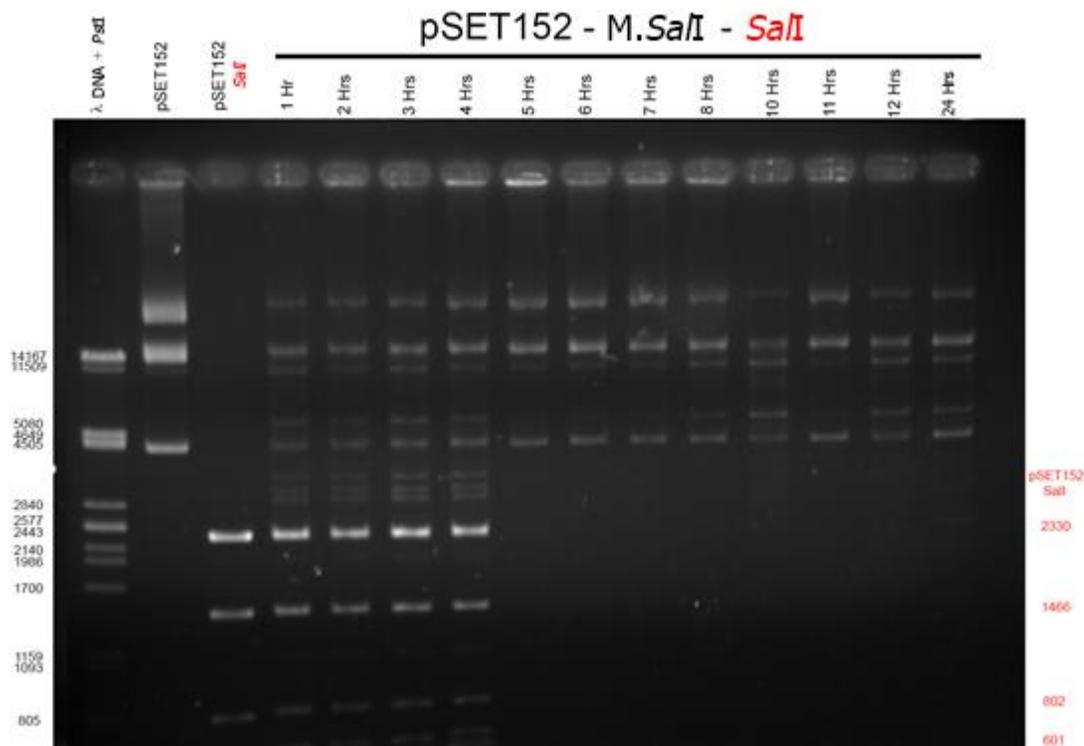
### - 7.2.1 Eficiencia de la metilación *in vitro* de la metiltransferasa *M.SaI*

Dado que en el experimento anterior el tiempo de incubación fue prolongado, se optó por realizar el mismo experimento, pero variando el tiempo de incubación de la reacción de metilación. Para esto se realizó el ensayo de metilación anteriormente descrito incubando al DNA con las metiltransferasas *M.SaI*, *M.SaI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SaI*R556A durante diferentes tiempos.

Esto se realizó con el objetivo de observar si la metilación completa observada en el plásmido consecuencia de la actividad de las tres enzimas era consecuencia del prolongado tiempo de incubación.

Se repitió el ensayo de metilación por tiempo, se prepararon muestras de plásmido pSET152, que se incubaron en presencia de la metiltransferasa *M.SaI* por diferentes tiempos desde 1 hasta 12 horas. Pasado el tiempo de incubación de cada muestra, se trató con un volumen de fenol/cloroformo 1:1 (v/v) y posteriormente cloroformo.

Las muestras fueron precipitadas, resuspendidas en TE y digeridas con la endonucleasa *SaI* durante 2 horas. El resultado se analizó en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 18).



**Figura 18.** Ensayo de actividad de la metiltransferasa *M.SaI*. Como controles se utilizaron al plásmido pSET152 sin enzimas de modificación ni restricción y el plásmido pSET152 digerido con la endonucleasa *SaI*. En los carriles siguientes se puede

observar la eficiencia de metilación de la enzima *M.SalI* en función del tiempo de incubación a 37 °C. Adicionalmente, como control positivo se incluyó una muestra de pSET152 metilada toda la noche con *M.SalI* (último carril).

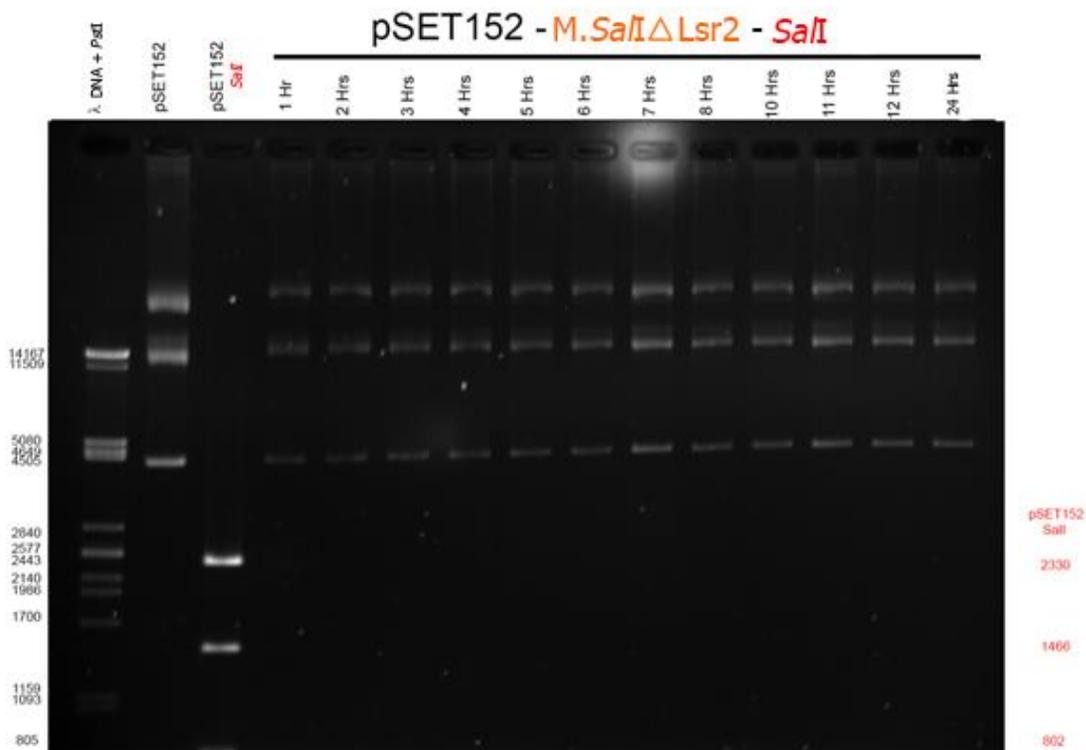
El resultado indica que al incubar poco tiempo la metiltransferasa *M.SalI* (<4 h), esta no tuvo una eficiencia de metilación alta, resultando en una digestión parcial del plásmido pSET152, como se observa en el gel de agarosa para los carriles de las muestras que se incubaron de 1 a 4 horas.

Aparentemente después de 5 h la enzima alcanzó un alto nivel de eficiencia lo que se vio reflejado en una protección casi total del DNA contra la endonucleasa *SalI*.

### - 7.2.2 Eficiencia de la metilación *in vitro* de la metiltransferasa *M.SalI*ΔLsr2

Para la metiltransferasa mutante que carecía del dominio homólogo a Lsr2 en su extremo carboxilo terminal (*M.SalI*ΔLsr2) se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. Nuevamente en 11 muestras de plásmido pSET152 se llevó a cabo el ensayo de metilación incubando el DNA con la enzima *M.SalI*ΔLsr2 desde 1 hasta 12 horas.

Para corroborar si la muestra había sido metilada, el DNA se sometió a un ensayo de restricción con la enzima *SalI* durante 2 horas. El resultado de estos experimentos se analizó en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 19).



**Figura 19.** Ensayo de actividad de la metiltransferasa *M.SalI*ΔLsr2. Como controles se utilizaron al plásmido pSET152 sin enzimas de modificación ni restricción y al plásmido pSET152 digerido con la endonucleasa *SalI*. En los carriles siguientes se puede observar la eficiencia de metilación de la enzima *M.SalI*ΔLsr2 en función del tiempo de incubación a 37 °C. Adicionalmente, como control positivo se agregó en el último carril una muestra de pSET152 metilada toda la noche con *M.SalI*ΔLsr2.

Como se observa en la **Figura 19**, la mutante que carece de dominio Lsr2 *M.SalI*ΔLsr2 presentó una eficiencia de metilación alta tanto con tiempos de incubación cortos (~1 hora)

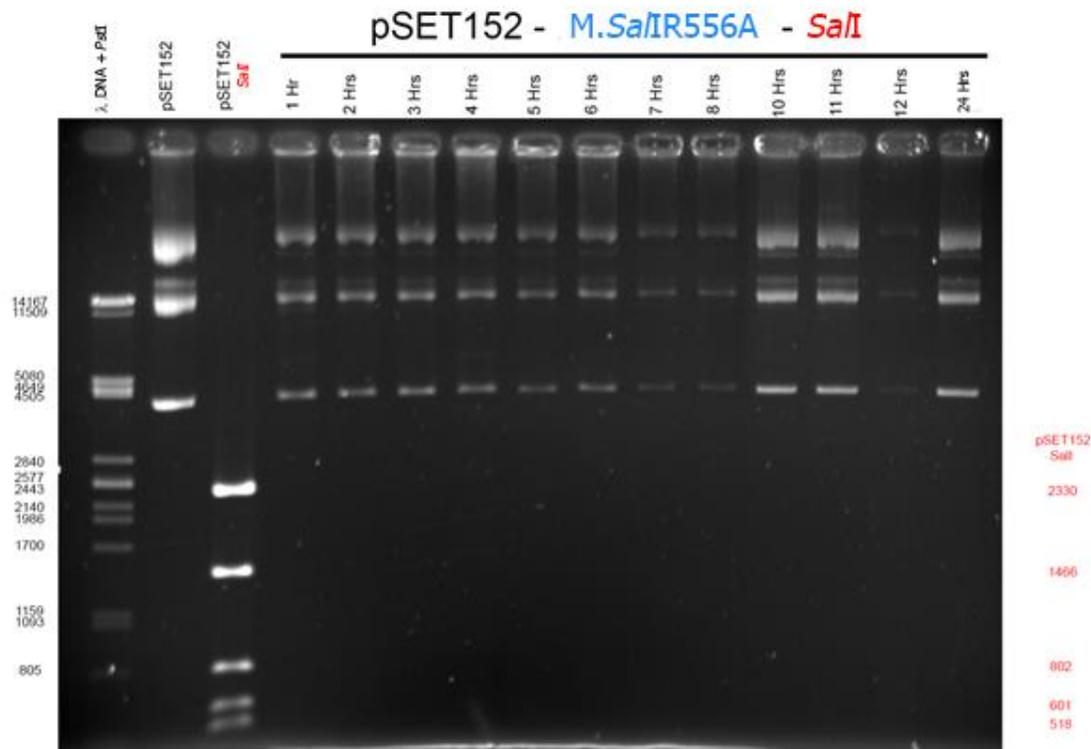
como largos. No se observaron bandas de digestión parcial o bandas adicionales a las que corresponden al plásmido circular.

Lo anterior sugiere que, *in vitro*, la enzima mutante *M.SaII* $\Delta$ Lsr2 actúa con mayor eficiencia que la enzima silvestre *M.SaII* en las mismas condiciones.

### - 7.2.3 Eficiencia de la metilación *in vitro* de la metiltransferasa *M.SaII*R556A

Por último, se realizó el mismo ensayo utilizando la metiltransferasa que tiene una mutación puntual en un motivo importante del dominio Lsr2 (*M.SaII*R556A)

Nuevamente e11 muestras de plásmido pSET152 se incubaron con la metiltransferasa *M.SaII*R556A desde 1 hasta 12 horas. Posteriormente, para medir la eficiencia de metilación, se digirieron las muestras con la enzima *SaII* durante 2 horas. El resultado fue analizado en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 20).



**Figura 20.** Ensayo de actividad de la metiltransferasa *M.SaII*R556A. Como controles se utilizaron al plásmido pSET152 sin enzimas de modificación ni restricción y al plásmido pSET152 digerido con la endonucleasa *SaII*. En los carriles siguientes se puede observar la eficiencia de metilación de la enzima *M.SaII*R556A según el tiempo que se deje incubando a 37 °C. Adicionalmente se agregó en el último carril del gel como control positivo una muestra de pSET152 metilada toda la noche con *M.SaII*R556A.

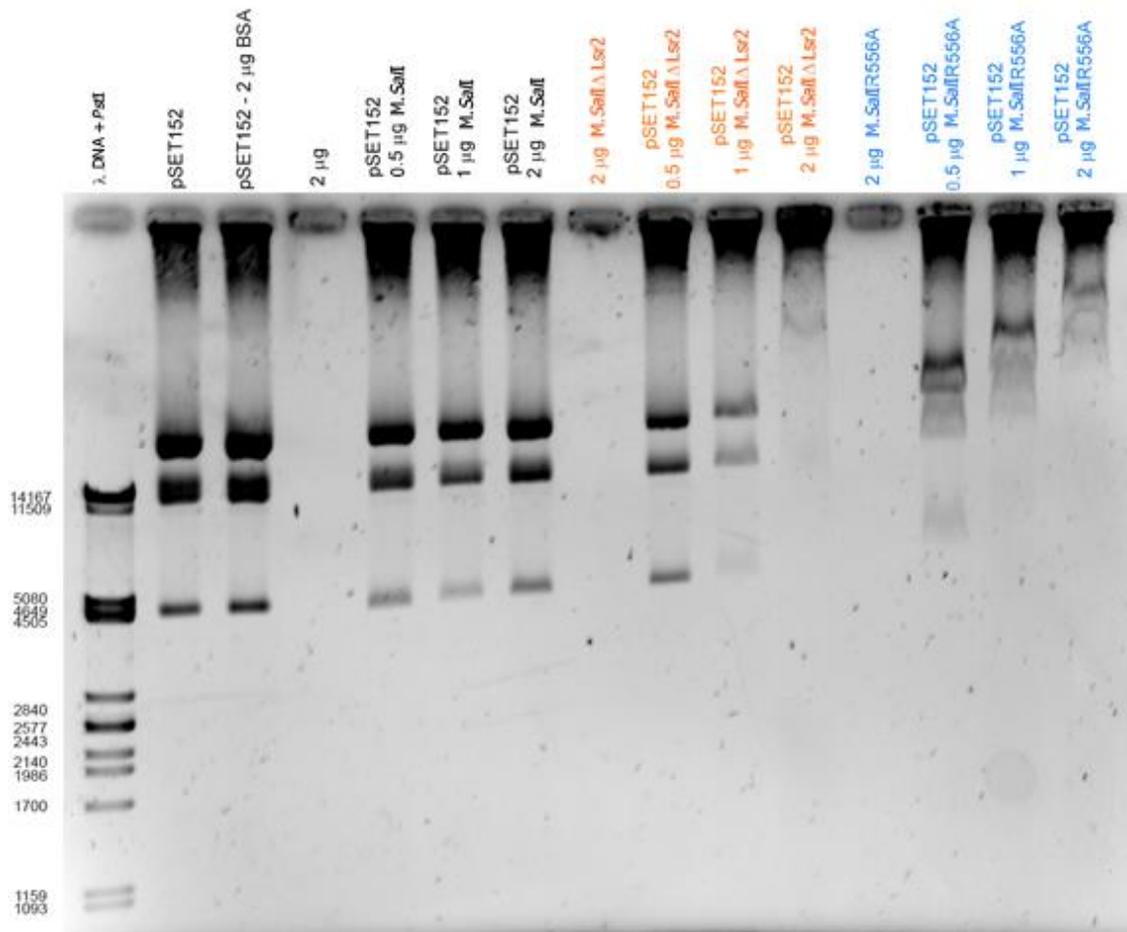
En este resultado se puede observar que la mutante *M.SaII*R556A se comportó de forma similar a la enzima mutante *M.SaII* $\Delta$ Lsr2, al menos en este ensayo de metilación *in vitro*. Ambas mutantes tuvieron una alta eficiencia de metilación en poco tiempo (1 hora aproximadamente), lo que se refleja en la protección del plásmido pSET152 contra la escisión por la endonucleasa *SaII*.

Al igual que con las muestras tratadas con *M.SaII* $\Delta$ Lsr2, las muestras tratadas con *M.SaII*R556A no tuvieron digestión parcial o bandas adicionales a las del plásmido circular. Por lo tanto, ambas mutantes (*M.SaII* $\Delta$ Lsr2 & *M.SaII*R556A) son más eficientes para metilar

DNA con respecto a la enzima silvestre, al menos en las condiciones de este ensayo de metilación.

### 7.3 Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

Con la finalidad de observar la formación de complejos DNA-proteína y analizar si la ausencia estructural y/o funcional del dominio Lsr2 afectaba la unión de la metiltransferasa *M.SalI* al DNA, se realizó un ensayo EMSA donde se incubó al plásmido pSET152 con diferentes concentraciones de las proteínas (*M.SalI*, *M.SalI*ΔLsr2 y *M.SalI*R556A) a 37 °C por un periodo corto de tiempo (10 minutos). La unión se detuvo agregando un volumen de Tris 1M y glutaraldehído a una concentración de 0.001%. Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 21).



**Figura 21.** Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando al plásmido circular pSET152 y diferentes concentraciones de *M.SalI*, *M.SalI*ΔLsr2 o *M.SalI*R556A (0.5 μg – 2 μg). Como controles se usaron el plásmido pSET152, el plásmido pSET152 incubado con 2 μg BSA, además 2 μg de *M.SalI*, 2 μg de *M.SalI*ΔLsr2 y/o 2 μg *M.SalI*R556A respectivamente.

Las muestras incubadas en presencia de las proteínas migraron de una forma diferente con respecto a los controles, por lo que en los tres casos existen interacciones DNA-proteína. De igual forma la migración del DNA en el gel se retardó más conforme aumentó la concentración de proteína.

También se observa que con poco tiempo de incubación el DNA con la proteína *M.SaI* silvestre no presentó retardo en su corrimiento, comparándola con respecto a la enzima mutante sin dominio Lsr2 (*M.SaIΔLsr2*) y a la enzima con una mutación puntual (*M.SaIR556A*).

También se destaca que en el caso de las enzimas *M.SaIΔLsr2* y, sobre todo con *M.SaIR556A*, el retardo en el corrimiento del DNA es notorio desde una concentración baja de proteína (0.5 µg), cosa que no ocurrió con la enzima silvestre en la cual no se aprecia un retardo aparente de las bandas, incluso en la muestra con alta concentración de la enzima (2 µg).

#### **7.4 Eficiencia de metilación *in vivo* de la metiltransferasas *M.SaI*, *M.SaIΔLsr2* y *M.SaIR556A***

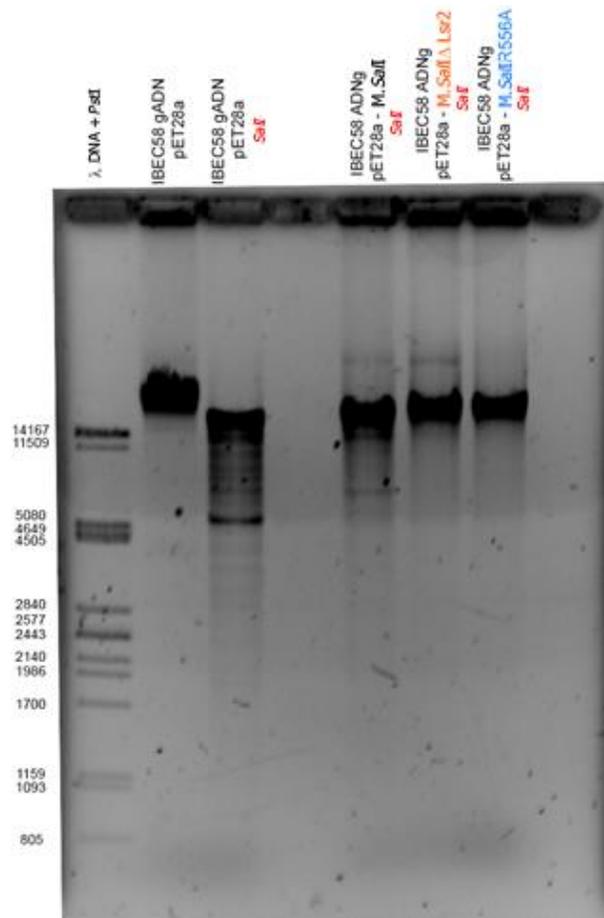
Como última prueba se verificó la eficiencia de metilación *in vivo* de las metiltransferasas *M.SaI*, *M.SaIΔLsr2* y *M.SaIR556A*. Para esto las proteínas se expresaron de manera heteróloga en una cepa de *E. coli* (IBEC58) que presenta las mutaciones  $\Delta dam$ ,  $\Delta dcm$ ,  $\Delta hsdRMS$ , con el objetivo de evitar la metilación del DNA genómico (plásmidos y cromosoma) por un agente externo a las enzimas de nuestro interés.

Para llevar a cabo este proceso se inocularon colonias aisladas de la cepa IBEC58 en matraces con 3 mL de cultivo YT2X y kanamicina 50 µg/mL, que habían sido previamente transformadas con los plásmidos derivados del pET28a que expresan *M.SaI*, *M.SaIΔLsr2* y *M.SaIR556A*.

Posteriormente las células se crecieron a 37°C toda la noche (~16 horas) induciendo la expresión de las proteínas con una concentración final de 1 mM de IPTG.

El proceso de extracción de DNA total de las células se hizo mediante lisis (Kieser, et al., 2000).

Se tomaron 300 ng del DNA resultante y se digirieron por 2 horas con la enzima *SaI*. El resultado fue analizado en un gel de agarosa al 0.8%. (Figura 22).



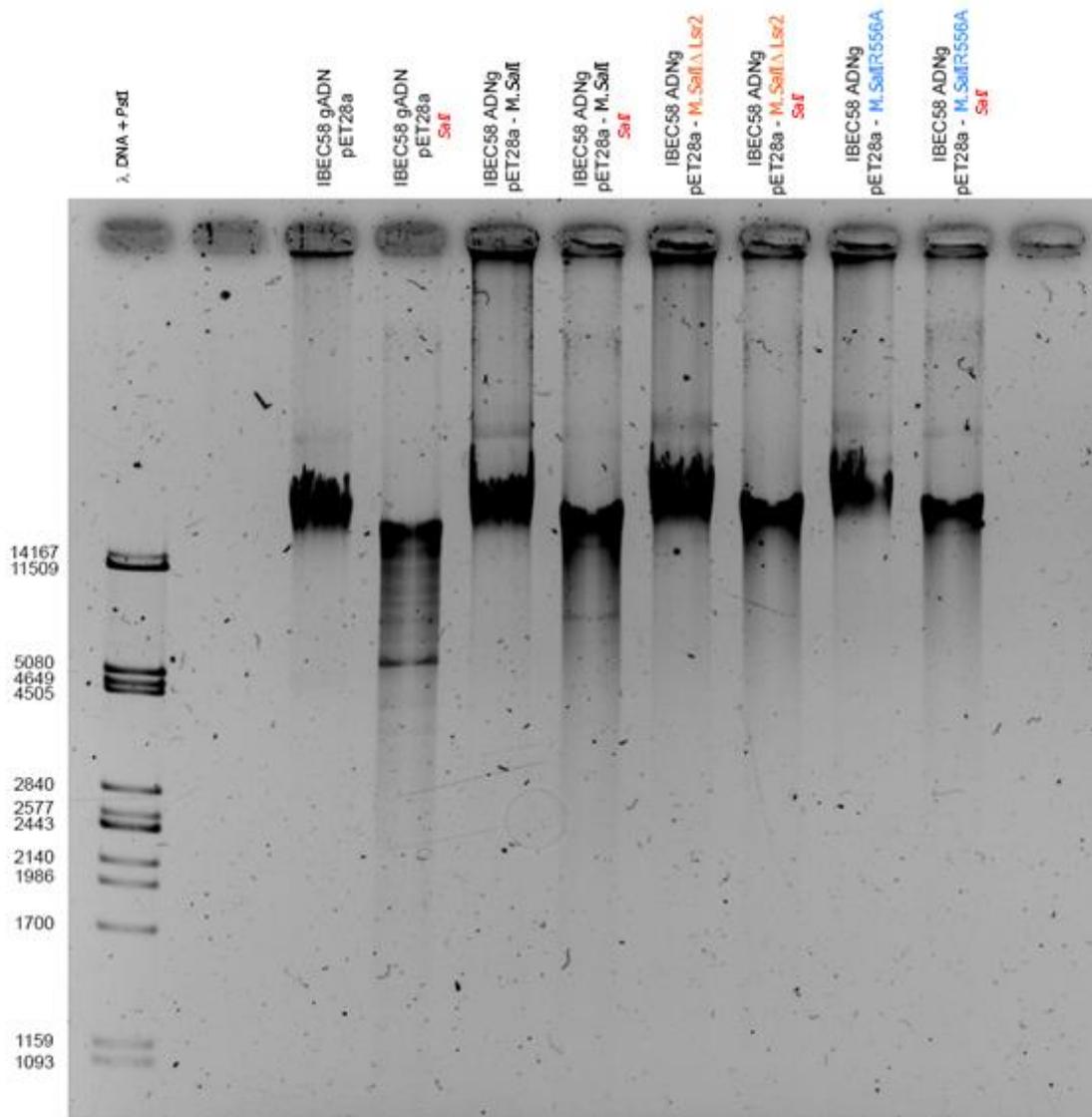
**Figura 22.** Ensayo de metilación *In vivo* del DNA genómico de *E. coli* IBEC58. Como control se utilizó DNA total de *E. coli* IBEC58 transformada con el plásmido pET28a e inducido con 1 mM IPTG sin digerir y digerido con *SalI*. En los carriles siguientes se observa la digestión con *SalI* del DNA total de *E. coli* IBEC58 transformada con el plásmido pET28a que tiene clonado y está expresando *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 o *M.SalI*R556A respectivamente.

En este caso se cometió un error ya que la cepa IBEC58 carece del cassette DE3, el cual induce la expresión de la RNA polimerasa T7, por lo que teóricamente las proteínas no pudieron haber sido expresadas por la célula aun en presencia de IPTG.

Aun así en el resultado se observa que la metilación del DNA cromosómico y plasmídico fue mayor en las células que expresaron las metiltransferasas *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A, con respecto a la células que expresaron la metiltransferasa *M.SalI* en las cuales el DNA total parece estar menos protegido. Creemos que se pudo expresar algún promotor desconocido de alguna ARN polimerasa que permitió la producción de las metiltransferasas *M.SalI*, *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SalI*R556A, ya que el resultado parece ser concluyente y contrasta con la información obtenida en las pruebas *in vitro*.

Esto se ve reflejado esencialmente en la parte superior del gel ya que se observaron múltiples bandas difusas en el carril donde se corrió el DNA total de las células que expresaron la metiltransferasa *M.SalI*, específicamente entre 14 kb y 5 kb. Esto no se observó en el DNA de las células que expresaron las metiltransferasas *M.SalI* $\Delta$ Lsr2 o *M.SalI*R556A.

Este experimento se repitió mejorando la resolución del gel y agregando como controles los DNA cromosómicos respectivos, sin digerir, además haciendo la electroforesis en un gel de agarosa al 0.6%, con un bajo voltaje (30 V constantes) a 4 °C (Figura 22).



**Figura 22.** Ensayo de metilación *In vivo* del DNA genómico de *E. coli* IBEC58. Controles: DNAG *E. coli* IBEC58 y *E. coli* IBEC58 digerido con *SaI*. Posteriormente se observan el DNAG de *E. coli* IBEC58 que expresó *M.SaII*, sin digerir y digerido con *SaI*. El DNAG de *E. coli* IBEC58 que expresó *M.SaIIΔLsr2*, sin digerir y digerido. Y el DNAG de *E. coli* IBEC58 que expresó *M.SaII R556A*, sin digerir y digerido.

En la Figura 22 se observa nuevamente que el DNA menos protegido (es decir, el menos metilado) fue el de las células que expresaron la enzima *M.SaII*.

De igual forma se observa, que al expresar las proteínas y ver su efecto directo en las células, la eficiencia de la metilación disminuye en los tres casos (*M.SaII*, *M.SaIIΔLsr2* y *M.SaII R556A*) con respecto a lo visto en las pruebas *in vitro*, ya que el DNA total digerido migra más abajo que las muestras de DNA total sin digerir.

Por último algo importante a destacar es que el resultado obtenido en la prueba *in vitro* coincide con esta prueba *in vivo*, demostrando que al menos en *E. coli* la producción de las

metilasas heterólogas *M.SaI* $\Delta$ Lsr2 y *M.SaI*R556A resulta en enzimas más eficientes en cuanto actividad y cantidad de producción con respecto a la enzima *M.SaI* silvestre.

## 8. Discusión

En la actualidad el estudio de los sistemas de restricción-modificación tipo II sigue vigente. Las endonucleasas de restricción son de gran valor para la industria biotecnológica, y siguen siendo una herramienta indispensable para el estudio de la biología molecular aún en aquellas técnicas que consideramos de vanguardia (Moniruzzaman, et al., 2022)

Por otro lado, el estudio de las metiltransferasas que pertenecen a sistemas R-M tipo II ha sido relevante a lo largo del tiempo para estudiar las relaciones que tienen los organismos procariontes con su entorno, así como los mecanismos de defensa de estos organismos y su evolución a lo largo del tiempo (Ren, et al., 2022). Actualmente existe un interés por el estudio de metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina ya que se ha encontrado un uso a estas enzimas, principalmente como marcadores de DNA genómico que permitan entender los procesos de regulación genéticos y/o epigenéticos en las bacterias (Adhikari S, & Curtis PD 2016). Aunque el uso de estas enzimas no se limita a esto, hay diversos estudios que sugieren utilizar estas metiltransferasas como catalizadores para reacciones de síntesis y/o biosíntesis de productos naturales bajo condiciones controladas (Abdelraheem., et al., 2022).

Aunado a esto existe un interés creciente por el estudio de la superfamilia de proteínas NAPs, sobre todo en las actinobacterias ya que este grupo filogenético de procariontes alberga diversos organismos que son de interés biotecnológico y biomédico. En el caso de las actinobacterias del género *Streptomyces* el estudio de las NAPs está enfocado en el mejoramiento de cepas, con el objetivo de descifrar el metabolismo críptico de estos organismos y así poder aprovechar todos los compuestos naturales que estas bacterias sintetizan en condiciones naturales, los cuales no se han podido producir de manera eficiente en condiciones de laboratorio (Du C., et al., 2022).

El interés de estudiar a la enzima M.SalI viene desde los trabajos de Rodicio & Chater en 1998 donde describen el sistema de restricción modificación tipo II SalI de *Streptomyces albus* y caracterizan a la endonucleasa de restricción SalI, una de las primeras enzimas de restricción producidas y purificadas de manera industrial.

Al estudiar el otro componente del sistema R-M SalI (M.SalI) surge el descubrimiento de que esta enzima tiene fusionado una región en su extremo carboxilo-terminal con un alto porcentaje de identidad a la NAP Lsr2 de *Mycobacterium tuberculosis* lo que es novedoso ya que ninguna otra metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina en actinobacterias presenta algo similar.

Esto nos llevó a proponer en primera instancia que ese dominio Lsr2 podría regular la interacción DNA-proteína de la metiltransferasa M.SalI. Al realizar los experimentos pertinentes nos dimos cuenta de que, contrario a la hipótesis planteada, el dominio Lsr2 de la metiltransferasa M.SalI no solo no es esencial para la unión de M.SalI al sitio de reconocimiento (5'-GTTCGAC-3') sino que, por el contrario, la ausencia funcional y estructural de este dominio Lsr2 resulta en una metiltransferasa con un fenotipo más eficiente al metilar el DNA.

Una posible explicación de este resultado es que el dominio Lsr2 provoca un efecto estérico en la unión de la enzima M.SalI al DNA, que tiene como consecuencia una enzima silvestre menos eficiente en los ensayos de metilación *in vitro* e *in vivo* probados en este trabajo. Este efecto estérico se ha observado en otras proteínas (principalmente de membrana) que

tienen múltiples dominios de unión en donde al encontrarse con regiones con las que pueden interactuar, existe una competencia por aprovechar los sitios de unión lo que está directamente relacionado con el tamaño de las regiones y el espaciado de los sitios de unión del dominio (Hlavacek W., et al. 1999). Un ejemplo de esto en *Streptomyces* es la NAP de unión Gbn asociada a nucleótidos GATC que no reconoce, ni se une a secuencias que están en estrecha proximidad (Du C., et al., 2022). De cualquier manera es importante mencionar que en *Streptomyces albus*, en donde se identificó originalmente el sistema *SaII*/M.*SaII* la metilasa M.*SaII* es eficiente para proteger *in vivo* el DNA del organismo del daño provocado por la enzima *SaII*, de lo contrario la cepa no sería viable.

Por lo que para conocer las interacciones entre la metiltransferasa M.*SaII* y el DNA se necesitan hacer otros experimentos, por ejemplo, cristalizar la proteína para determinar cómo es su interacción con el DNA cuando carece de dominio Lsr2 y cuando el dominio Lsr2 está presente, sobre todo teniendo en cuenta que el dominio Lsr2 aislado de la proteína M.*SaII* es capaz de unirse al DNA por sí mismo en ausencia del resto de la proteína (Keller Y. 2020).

Por otro lado también surge la duda de cuál es entonces la función del dominio Lsr2 en la metiltransferasa M.*SaII* en *Streptomyces albus*, y por qué se ha conservado la fusión entre proteínas en este organismo.

En el caso de los organismos del género *Streptomyces* existen pocas proteínas que lleven a cabo múltiples funciones que no estén relacionadas directamente con el desarrollo, esporulación, o metabolismo. Podemos mencionar como ejemplo la proteína DksA de *S. coelicolor*, la cual presenta un dominio de unión a DNA en su extremo amino terminal, así como un dominio regulador de la ARN polimerasa en su extremo carboxilo terminal (Aldridge M., et al. 2013).

Un caso similar a esto podría ser la metiltransferasa M.*SaII* que presenta un dominio Lsr2, además del dominio de unión a la secuencia que reconoce. Sabemos además que las proteínas Lsr2 de *Streptomyces* pueden formar complejos heterooligoméricos e interactuar con otras proteínas distintas (Keller Y. 2020). Por lo tanto la función del dominio Lsr2 de la metiltransferasa M.*SaII* podría ser ajena a la interacción con el DNA (con la secuencia diana de *SaII*) durante la actividad de metilación, y jugar otro papel en el desarrollo del organismo. Nuevamente para esto hace falta plantear otras estrategias y experimentos, que permitan observar cuál es el efecto *in vivo* de la metiltransferasa M.*SaII* en *Streptomyces albus* cuando no esté el dominio Lsr2. En el caso de la metilación del DNA cromosómico de *S. albus* podríamos esperar un resultado similar a lo observado *en E. coli* en este trabajo. Pero no podemos descartar un comportamiento diferente en la protección contra el bacteriófago  $\phi$ C31 al descrito por Chater & Wilde en 1980 y Rodicio & Chater en 1988. O incluso conocer si el dominio Lsr2 de la M. *SaII* posee un papel regulador, que limita la actividad de la M. *SaII* en *S. albus*.

Por último se debe mencionar que aunque el resultado no fue el esperado, algo positivo a destacar, fue que se consiguió mejorar la expresión y purificación de unas proteínas con función homóloga a M.*SaII*, estas son la proteína M.*SaII* $\Delta$ Lsr2 y M.*SaII*R556A las cuales además resultaron ser proteínas con mayor eficiencia de metilación que la proteína de fenotipo silvestre M.*SaII*.

Si bien esto es contrario a nuestra hipótesis, nos abre un panorama amplio sobre el estudio de la expresión de proteínas recombinantes y su aprovechamiento en los diferentes campos de la biotecnología y la biología molecular.

Por lo tanto, este trabajo sirve como antecedente para estudios a futuro en donde se busquen estrategias para optimizar la expresión y actividad de otras enzimas potencialmente valiosas.

## 9. Conclusión

- El dominio homólogo a Lsr2 de la metiltransferasa M. *SaI* no es determinante para la actividad de metilación de la enzima en su secuencia de reconocimiento (5' GTCGm6AC 3'), ya que la ausencia funcional o estructural de este dominio no afecta la capacidad de metilación de la enzima M. *SaI* *in vivo* e *in vitro*.
- La eficiencia de metilación de la enzima M. *SaI* es mayor, tanto *in vivo* como *in vitro* cuando la enzima carece del dominio (es decir M.*SaI*ΔLsr2 y M.*SaI*R556A).

### Perspectivas

- Para explicar el aumento en la eficiencia de metilación en las enzimas M.*SaI*ΔLsr2 y M.*SaI*R556A se propone que el dominio Lsr2 de M.*SaI* provoca un efecto estérico en esta enzima, ya que al igual que la metiltransferasa M.*SaI*, el dominio Lsr2 puede formar complejos con el DNA.
- Así mismo el dominio Lsr2 en M.*SaI* puede ser un factor regulador de la proteína que limita su actividad enzimática, pero que lleva a cabo otras funciones las cuales desconocemos.
- Al menos en *E. coli* la expresión heteróloga de las metiltransferasas M.*SaI*ΔLsr2 y M.*SaI*R556A resultan en enzimas con actividad de metilación más eficiente con respecto a M.*SaI*, tanto *in vivo* como *in vitro*. Creemos que estos resultados no son extrapolables a *Streptomyces albus*, ya que en este organismo la metiltransferasa M.*SaI* actúa en conjunto con la endonucleasa *SaI* como un sistema de restricción-modificación tipo II, por lo que resultaría interesante continuar con investigaciones, que permitan aproximarse al funcionamiento real de este dominio Lsr2 en M.*SaI* en *Streptomyces*.
- Para fines prácticos resulta más eficiente expresar, purificar y usar las M.*SaI*ΔLsr2 y M.*SaI*R556A con respecto a la enzima silvestre M.*SaI*. Esto al menos con las condiciones reportadas en este proyecto y los anteriores a este. Por lo que pudiese emplearse cualquiera de estas dos enzimas como un producto dentro de los laboratorios.
- Hace falta seguir estudiando la relación de este dominio homólogo a Lsr2 con la M.*SaI* y su importancia en *Streptomyces albus* principalmente con respecto al sistema de restricción-modificación tipo II que involucra a esta metiltransferasa.

## 10. Apéndice

### 10.1 Intentos de purificación de las metiltransferasas M. *SalI* y M. *SalI* $\Delta$ Lsr2 en *Streptomyces lividans*.

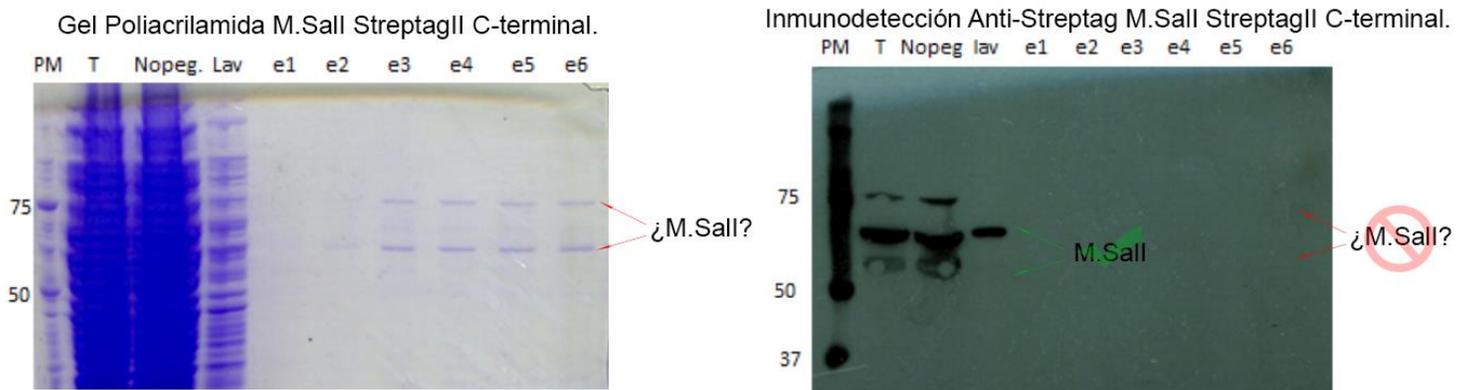
En este apartado se incluyen algunas imágenes con una breve descripción, de los intentos de purificación de las proteínas M. *SalI* y M. *SalI* $\Delta$ Lsr2, utilizando como vector de clonación y expresión variantes del plásmido pIJ6021, las cuales agregan etiquetas de afinidad, el organismo utilizado para llevar a cabo los experimentos fue *S. lividans* 1326.

La información detallada sobre los materiales y técnicas utilizadas se encuentra en las **secciones 7.1.2 a 7.1.4** del presente trabajo.

Las imágenes presentadas a continuación no son todas las realizadas para las **secciones 7.1.2 a 7.1.4**, pero son las que considero que resumen de manera general los resultados de estas secciones, así como la razón por la cual se excluyeron de los resultados reportados formalmente.

#### - **10.1.1 Expresión y purificación de M. *SalI* y/o M. *SalI* $\Delta$ Lsr2 con la etiqueta Strep Tag II C-terminal.**

En el caso de la purificación por afinidad a estreptavidina, las proteínas recombinantes no se unieron a la columna a pesar de que presentan el polipéptido sintético Strep Tag II en su extremo carboxilo terminal. Se observó que, aunque algunas proteínas se unieron a la columna y se purificaron, cuando se realizó el WB con el anticuerpo Strep Tag Monoclonal Antibody Thermo Fisher™, no correspondían a M. *SalI* o sus variantes (Apéndice 1).



**APÉNDICE 1.** Gel de poliacrilamida e inmunodetección de las muestras obtenidas de la proteína M. *SalI* mediante afinidad a Streptag-II. Aunque algunas proteínas se unieron a la columna, vemos que no son la metiltransferasa.

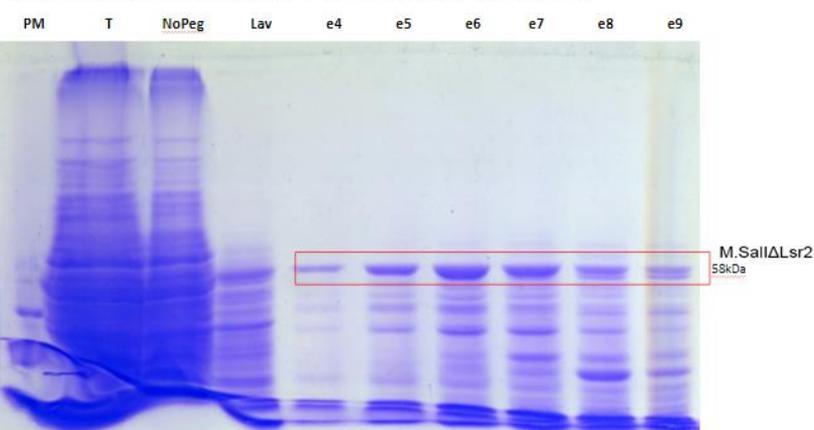
#### - **10.1.2 Expresión y purificación de M. *SalI* y/o M. *SalI* $\Delta$ Lsr2 con la etiqueta 6His C-terminal y/o 6His N-terminal.**

Dado que no fue posible la purificación de las proteínas por afinidad a estreptavidina, se decidió purificarlas por afinidad a níquel.

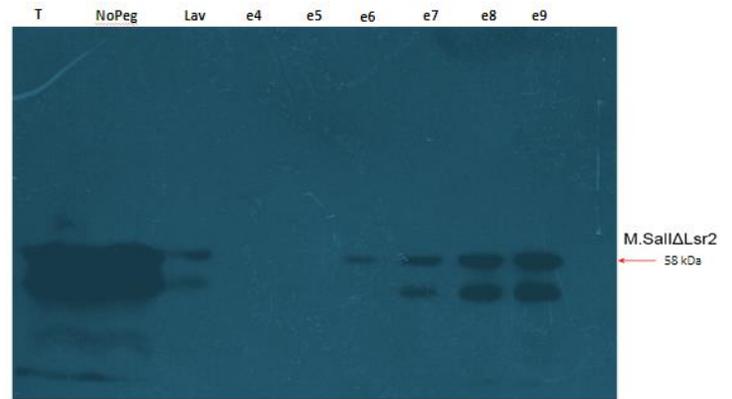
Para ello, se cambió la etiqueta Streptag II por una etiqueta de 6 Histidinas en este caso en su extremo C-terminal. Se observa que, aunque la proteína de interés se une a la columna de níquel, también lo hacen muchas otras proteínas de menor peso molecular. Éstas no fueron caracterizadas, pero podrían ser productos de degradación de la proteína de interés,

ya que *Streptomyces* es una bacteria cuyo citoplasma contiene una alta cantidad de proteínas con actividad proteolítica (**Apéndice 2**).

Gel Proteínas M.Sal $\Delta$ Lsr2 6His C-terminal.



Inmunodetección M.Sal $\Delta$ Lsr2 6His C-terminal.



**APENDICE 2.** Gel de poliacrilamida e inmunodetección de las muestras obtenidas de la proteína M.Sal $\Delta$ Lsr2, mediante afinidad a níquel. La proteína de nuestro interés (M.Sal $\Delta$ Lsr2) está presente en las fracciones y es visible tanto en el gel de poliacrilamida como en el Western-Blot. Pero estas muestras presentan una contaminación que pudiese ser otras proteínas o incluso degradación de la propia metiltransferasa.

- **10.1.3 Expresión y purificación de M.Sal y/o M.Sal $\Delta$ Lsr2 con la etiqueta 6his C-terminal y/o 6his N-terminal combinando con un método de afinidad iónica a Milli-Q.**

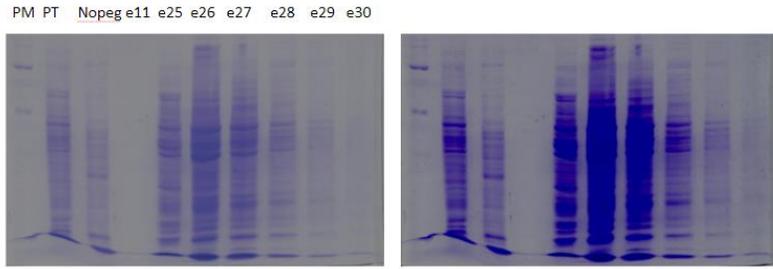
Las proteínas tienen una carga formal neta, que les confiere un pKa característico ácido o básico. En el caso de la metiltransferasa M.Sal, una predicción estimó que la proteína tiene un valor de pKa aproximado a 8 (básico-débil). Por ello, utilizamos una columna de intercambio aniónico fuerte (en este caso una resina con Milli-Q) para purificarla. El resultado de este proceso fue la elución de fracciones que contenían una mezcla de proteínas.

Con estas fracciones se realizó un análisis rápido mediante Dot-Blot, el cual nos permitió descartar las fracciones en las que no estaban presente la metiltransferasa M.Sal.

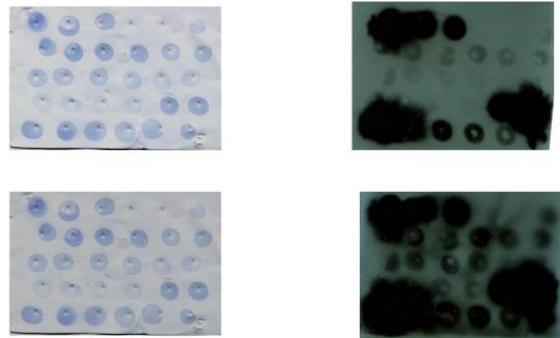
Finalmente, aquellas fracciones con la metiltransferasa M.Sal se sometieron a un segundo proceso de purificación, esta vez usando la afinidad a níquel.

El resultado de realizar dos procesos de purificación disminuye drásticamente la cantidad de proteína de nuestro interés purificada (**Apéndice 3**), por lo que también se descartó este método.

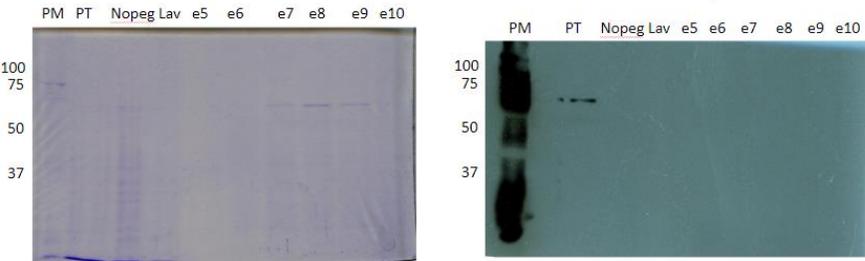
A) Gel Poliacrilamida M.Sall 6His purificación Afinidad Anionica Mili.Q



B) Dot-Blot M.Sall 6His purificación Afinidad Anionica Mili.Q



C) Gel Poliacrilamida e inmunodetección M.Sall 6His purificación Afinidad Anionica Mili.Q + Purificación afinidad al níquel



APENDICE 3. Resultados obtenidos aplicando un método de dos pasos de purificación por cromatografía de afinidad (Mili.Q + Níquel) en este caso para purificar la metiltransferasa *M. Sall*. **(A)** Se observan los resultados de la purificación mediante afinidad aniónica, donde existe una gran interferencia de otras proteínas básicas las cuales se “purificaron” junto con la metiltransferasa *M. Sall* que era la proteína de nuestro interés, este resultado es esperado ya que al emplear un método de cromatografía por afinidad iónica, todas las proteínas con un pKa cercano a 8 se unen a la columna. **(B)** Se observa una variación de la técnica de inmunodetección Western-Blot, en este caso es un Dot-Blot, aunque esta técnica es menos precisa y resolutive que el Western-Blot es una técnica eficiente para descartar soluciones (o fracciones en este caso) que no tienen la proteína/enzima de interés. **(C)** Por último, podemos ver el resultado de combinar dos técnicas de purificación, tras lo cual la gran mayoría de la proteína de interés *M.Sall* se pierde, en este caso el resultado fue inverso al esperado y en lugar de aumentar la eficiencia de purificación, se redujo.

## 11. Referencias

- 1) Abdelraheem E., Thair B., Varela R., Jockmann E., Popadić D., Hailes H., Ward J., Iribarren A., Lewkowicz E., Andexer J., Hagedoorn P. & Hanafeld U. (2022) **Methyltransferases: Functions and Applications**. *EFMC Chem BioChem* 23-18 e202200212 DOI: 10.1002/cbic.202200212
- 2) Adhikari S. & Curtis P. (2016) **DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria**. *FEMS Microbiol Rev.* 40(5):575-91. DOI: 10.1093/femsre/fuw023.
- 3) Aldridge M., Facey, P., Francis, L., Bayliss, S., Del Sol, R., Dyson, P. (2013). **A novel functional histone protein in *Streptomyces*: a candidate for structural coupling between DNA conformation and transcription during development and stress?** *Nucleic Acids Res.* 414813–4824. DOI: 10.1093/nar/gkt180
- 4) Alting-Mees M. A., Short, J. M. (1989). **pBluescript II: gene mapping vectors**. *Nucleic Acids Res.* 17:9494. DOI: 10.1093/nar/17.22.9494
- 5) Angert E. R. (2005). **“Alternatives to binary fission in bacteria”**. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 214–224. DOI: 10.1038/nrmicro1096
- 6) Arora K., Whiteford, D. C., Lau-Bonilla, D., Davitt, C. M., & Dahl, J. L. (2008). **Inactivation of *Lsr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis***. *J. Bact.* 190(12), 4291–4300. DOI: 10.1128/JB.00023-08
- 7) Becher P. G., Verschut, V., Bibb, M. J., Bush, M. J., Molnár, B. P., Barane, E., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., Song, L., Challis, G. L., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2020). **Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal**. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(6), 821–829. DOI: 10.1038/s41564-020-0697-x
- 8) Birnboim H. C., & Doly, J. (1979). **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**. *Nucleic Acids Res.* 7(6), 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513
- 9) Boyer HW (1971). **"DNA restriction and modification mechanisms in bacteria"**. *An. Rev. Microbiol.* 25: 153–76. DOI:10.1146/annurev.mi.25.100171.001101.
- 10) Bradshaw E., Saalbach, G., & McArthur, M. (2013). **Proteomic survey of the *Streptomyces coelicolor* nucleoid**. *J. Proteomics*, 83, 37–46. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.02.033.
- 11) Chater KF, Wilde LC. (1980). ***Streptomyces albus* G mutants defective in the *SalGI* restriction-modification system**. *J. Gen. Microbiol.* 116(2):323-34. doi: 10.1099/00221287-116-2-323.
- 12) Chandra G., & Chater, K. F. (2014). **Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences**. *FEMS Microbiology reviews*, 38(3), 345–379. DOI: 10.1111/1574-6976.12047
- 13) Chen J. M., German G. J., Alexander D. C., H. Ren T. Tan & Liu J. (2006). **"Roles of *Lsr2* in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*"**. *J. Bact.* 188633-641. DOI: 10.1128/JB.188.2.633-641.2006
- 14) Drlica K., & Rouviere-Yaniv, J. (1987). **Histonelike proteins of bacteria**. *Microbiol. Rev.* 51(3), 301–319. DOI: 10.1128/mr.51.3.301-319.1987
- 15) Drozdetskiy A, Cole C, Procter J & Barton GJ. (2015) **JPred4: a protein secondary structure prediction server**. *Nucleic Acids Res.* DOI: 10.1093/nar/gkv332

- 16) Du C., Willemse, J., Erkelens, A. M., Carrion, V. J., Dame, R. T., & van Wezel, G. P. (2022). **System-Wide Analysis of the GATC-Binding Nucleoid-Associated Protein Gbn and Its Impact on *Streptomyces* Development.** *mSystems J.* 7(3), e0006122. DOI: 10.1128/msystems.00061-22
- 17) Gehrke E., Zhang X., Pimentel-Elardo S., Johnson A., Rees C., Jones S., Hindra, Gehrke S., Turvey S., Boursalie S., Hill J., Carlson E., Nodwell J., & Elliot M. (2019) "**Silencing cryptic specialized metabolism in *Streptomyces* by the nucleoid-associated protein Lsr2**" *eLife*, DOI: 10.7554/eLife.47691
- 18) 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.
- 19) González-Cerón G., Miranda-Olivares O. J., & Servín-González L. (2009). **Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases.** *FEMS microbiology letters*, 301(1), 35–43. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01790.x
- 20) 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. Bact.* 190(21), 7052–7059. DOI: 10.1128/JB.00733-08
- 21) Hanahan D. 1985 **Techniques for transformation of *E. coli* in DNA cloning: a practical approach**, ed Glover D.M. (IRL Press, Oxford, United Kingdom), 1:109-135. DOI: 10.1093/oso/9780199634774.003.0001
- 22) Hlavacek W., Posner R. & Perelson A. (1999) **Steric Effects on Multivalent Ligand-Receptor Binding: Exclusion of Ligand Sites by Bound Cell Surface Receptors.** *Biophysical J.* 6 , 76 doi: 10.1016/S0006-3495(99)77456-4
- 23) Hopwood D., Kieser T., Wright H & Bibb M. (1983) **Plasmids, Recombination and Chromosome Mapping in *Streptomyces lividans* 66.** *J. G. Microbiol.* 129, 2257-2269. DOI: 10.1099/00221287-129-7-2257
- 24) Kämpfer P., Glaeser S. Parkes L., Keulen G. & Dyson P. (2014). **Capítulo 42 "The Family Streptomycetaceae" en The Prokaryotes: Actinobacteria.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-30138-4.
- 25) Keller Y. 2020. **ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIO LSR2 EN *Streptomyces*.** Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- 26) Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater KF. & Hopwood D. (2000). **Practical *Streptomyces* genetics.** John Innes Foundation, Norwich U.K.
- 27) 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 seramimics native *Mycobacterium leprae*in T-cell responses across the leprosy spectrum.** *Proc. Natl Acad. Sci.* 88:1054–1058. DOI: 10.1073/pnas.88.3.1054
- 28) Le Moigne V, Bernut A, Cortès M, Viljoen A., Dupont C., Pawlik A., Gaillard J., Misguich F., Crémazy F., Kremer L. & Herrmann J. (2019) **Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in *Mycobacterium abscessus*.** *Front Microbiol.* 2019;10:905 DOI: 10.3389/fmicb.2019.00905
- 29) Lessard I A, Pratt S D, McCafferty D G, Bussiere D E, Hutchins C, Wanner B L, Katz L & Walsh C T. (1998) **Homologs of the vancomycin resistance D-Ala-D-Ala dipeptidase**

- VanX in *Streptomyces toyocaensis*, *Escherichia coli* and *Synechocystis*: attributes of catalytic efficiency, stereoselectivity and regulation with implications for function.** *Chem. Biol.* 5 489-504 DOI: 10.1016/s1074-5521(98)90005-9.
- 30) Liu G., Chater KF, Chandra G., Niu G. y Tan H. (2013). **Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*.** *Microbiol. and Mol. Bio.* Revs. MMBR, 77 (1), 112–143. DOI: 10.1128/MMBR.00054-12.
- 31) <sup>a</sup>Loenen W., & Raleigh E. (2013). **The other face of restriction: modification-dependent enzymes.** *Nucleic Acids Res* 42(1), 56–69. DOI:10.1093/nar/gkt747
- 32) <sup>b</sup>Loenen W., Dryden F., Raleigh A., Wilson G., & Murray E. (2013). **Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes.** *Nucleic Acids Res.* 42(1), 3–19. DOI: 10.1093/nar/gkt990
- 33) <sup>c</sup>Loenen, W.; Dryden D.; Raleigh, E.; & Wilson, G. (2013). **Type I restriction enzymes and their relatives.** *Nucleic Acids Res.* 42(1), 20–44. DOI:10.1093/nar/gkt847
- 34) Madigan M., Bender K., Buckley D., Sattley W. & Stahl D. (2019). Capítulo 16 "Diversity of Bacteria - 16.12 Filamentous Actinobacteria: *Streptomyces* and Relatives" en Brock Biology of Microorganisms 15<sup>a</sup> edición. Pp. 551-553 *Pearson*. ISBN: 1292235101
- 35) McGregor J. (1954). "Nuclear Division and the Life Cycle in a *Streptomyces* sp." *J. Gen. Microbiol.* 11, 52-56.
- 36) Moniruzzaman M., Zhong Y., Huang Z., & Zhong G. (2022). **Having a Same Type IIS Enzyme's Restriction Site on Guide RNA Sequence Does Not Affect Golden Gate (GG) Cloning and Subsequent CRISPR/Cas Mutagenesis.** *IJMS*, 23(9), 4889. DOI: 10.3390/ijms23094889
- 37) Palmer B.R. and Marinus M.G. (1994) **The dam and dcm Strains of *Escherichia coli*.** *Gene*, 143, 1-12. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90597-5.
- 38) Perez-Rueda, Ernesto & Ibarra, Jose. (2015). **Distribution of putative xenogeneic silencers in prokaryote genomes.** *Computational biology and chemistry.* 58. 167-172. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2015.06.007.
- 39) Phillips Z.N., Husna A.U., Jennings M.P., Seib K.L., & Atack J.M. (2019). **Phasevarions of bacterial pathogens - phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction-modification systems.** *Microbiology.* 17. DOI: 10.1099/mic.0.000805
- 40) Picker M. & Wing H. (2017) H-NS, Its Family Members and Their Regulation of Virulence Genes in Shigella Species. *Genes.* 7, 112 DOI: 10.3390/genes8060162
- 41) Pingoud A. (2004). **Restriction Endonucleases.** 3-16. Alemania Berlin. Springer. ISBN 13:9783540205029.
- 42) Reeves R (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function". *Gene.* 277 (1–2): 63–81. DOI:10.1016/S0378-1119(01)00689-8.
- 43) Ren J., Lee HM., Shen J. et al. (2022) **Advanced biotechnology using methyltransferase and its applications in bacteria: a mini review.** *Biotechnol Lett* 44, 33–44. DOI: 10.1007/s10529-021-03208-9
- 44) Rodicio M. & Chater K. (1988). "Cloning and expression of the *SaI* restriction-modification genes of *Streptomyces albus G*". *Mol Gen Genet.* 213. 346-353 DOI: 10.1007/BF00339601

- 45) Rodicio M., Quinton-Jager T., Moran L., Slatko B. & Wilson G. (1994). "**Organization and sequence of the *SaI* restriction-modification system**". *Gene*, 151 167-172. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90650-5
- 46) Rosenberg E., Delong E., Lory S., Stackebrandt E. & Thompson F. (2014) **The Prokaryotes: Actinobacteria**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-30138-4.
- 47) Sumbly, P., and M. C. Smith. 2002. **Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3 (2)**. *Mol. Microbiol.* 44:489–500.
- 48) Summers E. L., Meindl K., Usón I., Mitra, A. K., Radjainia M., Colangeli, R., Alland, D., & Arcus V. L. (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. DOI: 10.1371/journal.pone.0038542
- 49) Takano E., White J., Thompson C. J., & Bibb M. J. (1995). **Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp.** *Gene*, 166(1), 133–137. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00545-2
- 50) Tock M. & Dryden D. (2005). **The biology of restriction and anti-restriction**. *J. Microbiol.* 8(4), 466–472. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003
- 51) Vingadassalon A., Bouloc P. & Rimsky S. (2016) **Removing nucleic acids from nucleoid-associated proteins purified by affinity column**. *J Biol Methods*. 3, 1: e35. DOI: 10.14440/jbm.2016.98
- 52) Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). "**Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors**". *Gene*. 33 (1): 103–119. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.