

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA POSIBLE
 METILTRANSFERASA DAM PROVENIENTE DEL BACTERIOFAGO NO
 LAMBDOIDE mEp021

Presentado por:
 EDITH MILENA ALVARADO CUEVAS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
 FACULTAD DE CIENCIAS
 MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
 Depto. de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN
 México D.F. 2006

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA POSIBLE
 METILTRANSFERASA DAM PROVENIENTE DEL BACTERIOFAGO NO
 LAMBDOIDE mEp021

EDITH MILENA ALVARADO CUEVAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

Microbiólogo Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
 FACULTAD DE CIENCIAS
 MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
 Depto. de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN
 México D.F. 2006

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ANEXO 2

FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
Alvarado Cuevas	Edith Milena

DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
Bermúdez Cruz	Rosa María

ASESOR (ES)

Apellidos	Nombres
Martínez Peñafiel	Eva

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Microbiólogo Industrial

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Aislamiento y caracterización de una posible metiltransferasa dam proveniente del bacteriofago no lambdoide mep021

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA: Carrera X Especialización Maestría Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Microbiología Industrial

CIUDAD: MÉXICO AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2006

NÚMERO DE PÁGINAS: 95

TIPO DE ILUSTRACIONES:

-- Ilustraciones

-- Mapas

-- Retratos

Tablas

gráficos y diagramas

-- Planos

-- Láminas

Fotografías

MATERIAL ANEXO (Vídeo, audio, multimedia o producción electrónica):

Ninguno

Duración del audiovisual: _____ Minutos.

Número de casetes de vídeo: _____ Formato: VHS ___ Beta Max ___ $\frac{3}{4}$ ___
Beta Cam _____

Mini DV ___ DV Cam ___ DVC Pro ___ Vídeo 8 ___ Hi 8 ___

Otro. Cual? _____

Sistema: Americano NTSC _____ Europeo PAL _____ SECAM _____

Número de casetes de audio: _____

Número de archivos dentro del CD (En caso de incluirse un CD-ROM diferente al trabajo de grado:

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a mis padres porque son unas personas maravillosas y gracias a ellos, Dios me ha dado la oportunidad de vivir esta experiencia que me ha ayudado a crecer a nivel integral aprendiendo día con día lo fácil o lo duro que puede ser la vida. Formando así el carácter y el criterio necesario para seguir adelante y la tarea de ser alguien en la vida. Gracias les doy por haberme impulsado y por la dicha enorme de ser su hija.

A mi Tutora la Dra. Rosa Bermúdez y mi asesora Eva Martínez que sin ellas no hubiera sido capaz de sacar esta tesis adelante, muchas gracias por haberme recibido, apoyado, y enseñado. Me faltan palabras para agradecerles todo lo que hicieron por mi y lo que me han ayudado a crecer como persona.

Al Dr. Kameyama Kawabe por haberme enseñado las bases de la biología molecular y por las charlas que me dio para guiarme en mi proyecto.

Al Dr. Gabriel Guarneros por permitirme trabajar en su laboratorio y por todos los consejos que me dio para enriquecer mi proyecto y por su preocupación por el mismo.

Al Dr. Javier Hernández por sus valiosos comentarios y por brindarme su amistad y apoyo en mi proyecto.

Al Dr. Francisco Martínez por sus consejos y por todos los conocimientos que me brindo del mundo de la ciencia.

Al Maestro Marco Magos que con su apoyo, cariño y paciencia me enseñó como realizar un buen trabajo y que más que maestro es un gran amigo.

Al Maestro Fernando Fernández que con su conocimiento y sus consejos me enseñó a ser analítica tanto en la genética como en la música y en la vida.

Al Maestro Alex Martínez H. quien también me apoyo y me dio consejos sobre mi proyecto.

A mis amigos Miguelon, Omar, Andrea, Efraín, Guillermo y a todos los del laboratorio 4 quienes también me enseñaron que los mexicanos son muy buena onda.

A Julieth quien me escucho cuando lo necesitaba y supo darme animo. Y a todos mis amigos colombianos quienes desde internet me dieron fuerzas para seguir.

A Cristhian y a toda su familia quienes me apoyaron de todas las formas posibles para que no me rindiera y siguiera adelante logrando así culminar mi tesis y ganando mi familia mexicana.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), por permitirme realizar mi trabajo de grado haciendo uso de sus instalaciones, así como, de materiales y equipos.

A todos muchas gracias por acogerme en sus corazones y a México lindo y querido.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 Metilación del DNA	16
2.2 Metiltransferasas	18
2.2.1 Metiltransferasa CcrM	21
2.3. Función biológica de la metilación Dam	21
2.3.1 Reparación por apareamiento erróneo	22
2.3.2 Replicación del DNA	24
2.3.3 Regulación de la transposición	25
2.3.4 Regulación de genes relacionados con virulencia	25
2.3.5 Regulación de la conjugación bacteriana	27
2.3.6 Regulación de la expresión de otros genes	27
2.3.7 Expresión de Dam	29
2.3.8 Aspectos evolutivos	30
2.3.9 Otras características	32
2.4. Otras metiltransferasas relacionadas con funciones fisiológicas importantes	
32	
2.4.1 Reparación de parches muy cortos de Dcm	32
2.5 Metiltransferasa en bacteriófagos	33
2.6 ANTECEDENTES DIRECTOS	35
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 Generales	37
4.2 Específicos	37
4.3 Esquema general de trabajo	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Diseño de la investigación	39
5.1.1 Análisis bioinformático	39
5.1.2 Bacterias, bacteriófagos y plásmido	40
5.2 Métodos	41
5.2.1 Obtención de placas líticas del bacteriófago mEp021	41

5.2.2	Preparación de lisados bacteriofágicos	41
5.2.3	Aislamiento del DNA del bacteriófago	41
5.2.4	Aislamiento del DNA plásmidico	42
5.2.5	Amplificación por PCR del marco de lectura abierto (ORF) 5 a partir del DNA del fago mEp021.	42
5.2.6	Clonación del ORF 5 en vector transitorio TOPOTA	43
5.2.7	Clonación del ORF 5 en el plásmido pKQV4	44
5.2.7.1	Digestión del vector	44
5.2.7.2	Extracción fenólica	44
5.2.7.3	Digestión del producto de PCR del ORF 5.	44
5.2.7.4	Reacción de ligación	45
5.2.8	Preparación de células electrocompetentes y electroporación.	45
5.2.9	Preparación de las células quimiocompetentes con cloruro de rubidio y transformación	46
5.2.10	Determinación de candidatos positivos mediante PCR y corte con enzimas de restricción enzimática	46
5.2.11	Secuenciación del fragmento clonado en el plásmido pKQV4	46
5.2.12	SDS-PAGE de proteínas citoplasmáticas	47
5.2.13	Recolección de la información	47
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1	Análisis bioinformático	48
6.2	Diseño de oligonucleótidos	56
6.3	Purificación del bacteriófago mEp021	58
6.4	Aislamiento y clonación del fragmento de 348 pb correspondiente al ORF5 del bacteriófago mEp021 responsable de la metilación del DNA.	60
6.5	Comparación de los diferentes patrones de restricción con dos enzimas que reconozcan regiones GATC metiladas y sin metilar.	68
7.	CONCLUSIONES	74
8.	PERSPECTIVAS	75
9.	REFERENCIAS	76
10.	ANEXOS	82
	ANEXO 1 Determinación del punto isoelectrico.	82
	ANEXO 2 Determinación de la masa molecular y comprobación del punto isoelectrico.	83
	ANEXO 3 Determinación de la ubicación de la proteína.	84

ANEXO 4 Determinación de la familia a la que pertenece la proteína del ORF5.

85

ANEXO 5 Análisis de la estructura secundaria de la proteína FMM (Fago Metiltransferasa Mexican)

86

ANEXO 6 Secuencia con el oligo Met-Rev del candidato 3 clonado en pKQV4

87

ANEXO 7 Secuencia con el oligo Met-Fwd del candidato 3 clonado en pKQV4

90

ANEXO 8 Secuencia con el oligo Met-Rev de la clona religada

93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metilación y desmetilación del DNA por diferentes enzimas	16
Figura 2. El estado de metilación es perpetuado por la metiltransferasa que reconoce los sitios hemimetilados como sustrato.	17
Figura 3. Funciones de la (N ⁶ -metil-adenina) Dam en la bacteria	22
Figura 4. Complejo ternario de proteínas encargadas de la reparación por apareamiento erróneo.	23
Figura 5. Región reguladora que se encuentra río arriba del gen pap	26
Figura 6. La afinidad de la proteína Lrp por el DNA del gen pap, disminuye por la metilación del DNA	26
Figura 7. Regulación del gen <i>dam</i> de <i>E.coli</i> K-12	29
Figura 8. Similitud entre las secuencias de metiltransferasas aminoacídicas de las metiltransferasas: <i>EcoRV</i> , <i>dam</i> , <i>DpnII</i> , <i>dam</i> T4 y otras	30
Figura 9. Homología entre la secuencia de aminoácidos de diferentes metiltransferasas	31
Figura 10. Análisis por BLAST del ORF 5	49
Figura 11 Análisis por PSI-BLAST del ORF 5	51
Figura 12. Homología de la secuencia de aminoácidos del ORF5 con otras metiltransferasas	53
Figura 13. Alineamiento de las metiltransferasas para visualizar los motifs de las metiltransferasas Dam que son similares al ORF5.	55
Figura 14. Determinación in silico del patrón de restricción de la secuencia de DNA del ORF5.	57
Figura 15. Oligonucleótidos diseñados para amplificar al ORF5.	58
Figura 16. Placas líticas de los fagos mEp021 y Lambda en la cepa W3110.	59
Figura 17. Electroforesis del producto de PCR (DNA del bacteriófago mEp021) en gel de Agarosa al 1%.	60
Figura 18. Clonación en vector transitorio TOPO TA.	61

Figura 19. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos por miniprep.	62
Figura 20. DNA plasmídico de los candidatos seleccionados.	63
Figura 21. Linearización de candidatos mediante restricción con <i>XhoI</i> .	64
Figura 22. Restricción con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> del candidato 4 de TOPO TA y su control.	64
Figura 23. Clonación del fragmento de 348-pb en pKQV4 y restricción con <i>EcoRI</i> .	65
Figura 24. PCR del candidato 3 para determinar la presencia del inserto.	65
Figura 25. Curva de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido pFMM e inducidas IPTG	66
Figura 26. Electroforesis del corte con enzimas de restricción (<i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>) del vector pKQV4 y del inserto (348 pb) en gel de Agarosa al 1%.	67
Figura 27. Corte del DNA plasmídico con las enzimas de restricción <i>DpnI</i> y <i>MboI</i> .	69
Figura 28. Gel de proteínas	70
Figura 29. Transcripción-traducción in vitro	71

LISTA DE TABLAS

Tabla1 Características y genotipos del material biológico utilizado en este estudio.	40
Tabla 2. Títulos de los lisados de los bacteriófagos mEp021 y lambda	59

RESUMEN

El bacteriófago mEp021 fue aislado de materia fecal humana y caracterizado como un fago no lambdaoide por Kameyama y cols 1999. De este fago se aisló un fragmento de 1500-pb, en donde se encontraron 5 marcos abiertos de lectura (ORF). De estos marcos, únicamente el 5 presentó una identidad significativa ($E=5e-14$, $E=7e-11$ y $E=4e-10$ por blast regular) con las secuencias de metiltransferasas de fagos relacionados con *Salmonella entérica*, *E. coli* 0157:H7, *Haemophilus influenzae* y con otras metiltransferasas ya reportadas en el genbank (Martínez-Peñañiel et al., 2003). La característica principal de esta metiltransferasa pareciera ser la metilación del DNA fágico, esto permite que la bacteria lo reconozca como propio y no lo degrade. Se sabe también que en las bacterias, esta enzima está implicada en procesos vitales como la replicación, reparación por apareamiento erróneo y expresión de genes, entre otros. Es por esto que en el presente trabajo se analizó el marco de lectura abierto 5, para lo cual se extrajo el DNA del fago mEp021. Se diseñaron los oligonucleótidos a partir de la secuencia correspondiente y se amplificó por PCR el gen de la metiltransferasa. El fragmento con un tamaño de 348-pb, fue clonado en un vector transitorio TOPO TA. La identificación de clonas positivas se realizó por medio de patrones de restricción y PCR. Una vez verificada la presencia del inserto en este vector se purificó del gel y se clonó en el vector pKQV4. Se obtuvo una clona que contenía el fragmento, pero al parecer se encontraba lejos de la región Shine-Dalgarno, razón por la cual, no permitió la expresión de la posible proteína. Esto se corroboró por un ensayo de traducción *in vitro*. Posteriormente, se reclonó este producto y se realizó la inducción con IPTG de las clonas positivas y se montó un gel de proteínas totales para observar la presencia de la proteína. Se aisló el DNA plasmídico comprobando así por patrones de restricción la modificación del DNA generada por la expresión del gen de la metiltransferasa. Pero, nuevamente cotejamos por geles de acrilamida tipo SDS/PAGE la ausencia de la metiltransferasa. Estos resultados nos indican que el trabajo no está concluido y servirá para análisis posteriores que nos permitan confirmar la función de este gen.

INTRODUCCIÓN

La metilación del DNA es un proceso llevado a cabo en diferentes organismos, por un grupo de proteínas conocidas como metiltransferasas. En procariontes este tipo de proteínas forman parte de los sistemas de restricción modificación y por lo general dependen de las enzimas de restricción para la función del sistema. Sin embargo, algunas de éstas no están asociadas a enzimas de restricción, tal es el caso de la DNA adenina Metiltransferasa (Dam) de *Escherichia coli*. Estas reconocen a la secuencia de DNA, GATC (preferentemente) y metilan el átomo de nitrógeno del grupo amino de la adenina en la posición N6, lo que permite a la bacteria distinguir entre su propio DNA y el DNA exógeno, ya que al no estar metilado es degradado por las enzimas de restricción.

Otras funciones importantes de algunas Dam bacterianas es regular algunos procesos vitales tales como la replicación del DNA, la reparación por apareamiento erróneo y la expresión de genes, entre otras. Sin embargo, existen otras metiltransferasas que ha mostrado ser importantes para la regulación de la expresión de algunos genes de virulencia, y no vitales para los procesos fisiológicos antes mencionados. Tal es el caso de la proteína VriL de *Dichelobacter nodosus* que esta estrechamente relacionada con la regulación de algunos genes de virulencia y presenta una homología importante con metiltransferasas de fagos. Se sabe también que algunos genes de virulencia en bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella typhimurium* están regulados por metiltransferasas las cuales permiten que su DNA entre a la bacteria sin ser degradado y han sido adquiridas por transferencia horizontal, la cual se puede dar a través de plasmidos, transposones y bacteriófagos. Estas metiltransferasas actúan modulando la unión a ciertas regiones de DNA, que permiten la unión o no de ciertos reguladores transcripcionales. Tal es el caso del operon que codifica para el pili (pap) que es el principal factor de virulencia en la pielonefritis (Douglas M, y cols. 1999).

Es por esto que nos interesa analizar y caracterizar a la posible enzima *dam* del fago mEp021, ya que este fago no comparte homología con los fagos lambdoides, además de conferir un fenotipo hemolítico a la bacteria cuando se encuentra en estado lisogénico. En un estudio previo, se clonó un fragmento del genoma de este fago y se encontraron 5 marcos de lectura abiertos. De los 5 marcos solo el 5 presentó una similitud significativa con secuencias de la metiltransferasa de fagos.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es estudiar esta enzima Dam y propiedades, mediante su aislamiento por medio de técnicas moleculares como PCR, clonación y secuenciación, así como la confirmación de su función.

2. MARCO TEORICO

2.1 METILACION DEL DNA

La metilación del DNA, es un fenómeno que se ha identificado tanto en organismos procariontes como en eucariontes, esta implicada en muchos procesos celulares, incluyendo la regulación de la transcripción, el inicio de la replicación del DNA, la reparación y otros procesos fundamentales.

En las bacterias se asocia con la identificación de una secuencia bacteriana particular, y también con la distinción entre el DNA metilado y no metilado se ha asociado también a la diferenciación entre el DNA propio y el DNA foráneo. Se sabe en procariontes los sistemas de restricción/modificación son los responsables de dichos procesos (Wright et al., 1997). En los eucariontes el estado de metilación esta relacionado principalmente con el control de la transcripción que permite la activación o inactivación de genes. La forma como es controlado este proceso es mediante la metilación del DNA por diferentes metiltransferasas y metilasas (Fig. 1).

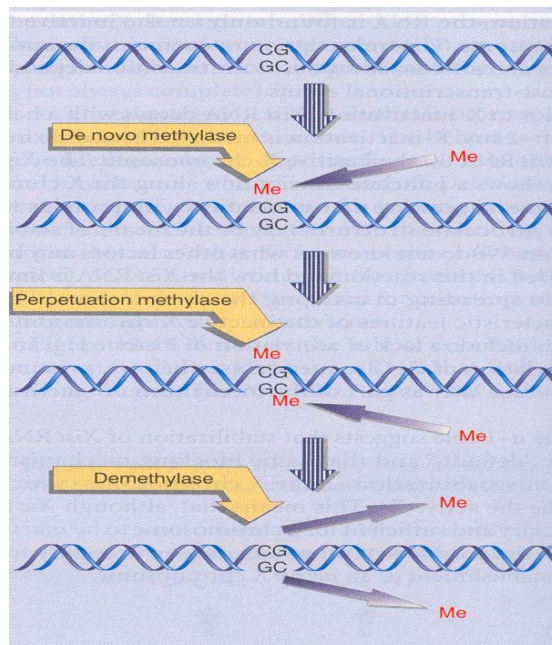


FIGURA 1. Metilación y desmetilación del DNA por diferentes enzimas.

Para modificar el DNA en una nueva posición se requiere la acción de una metilasa *de novo*, que presumiblemente reconoce el DNA en virtud de una secuencia específica. Esta enzima no ha sido caracterizada todavía, pero se presume su existencia por la ocurrencia de la metilación de novo (no se sabe si añade grupos metilo a ambas cadenas de DNA o solamente a una) (Lewin et al., 2003).

Al igual que en los procariontes la diferenciación entre el DNA metilado y hemimetilado es importante ya que se sabe que muchos de estos sitios están, de hecho metilados en el genoma de mamíferos, plantas y hongos. Por otra parte no solo se metila la adenina también se puede metilar la citosina (Fig. 2) como parte de un sistema de defensa del genoma del huésped, el cual evita la transcripción de elementos parásitos como los virus. La ventaja selectiva de este sistema de defensa es que está encargado de buscar secuencias parásitas que son invisibles al sistema inmune y las cuales podrían infligir un daño mutacional si se les permitiera proliferar sin un control (López et al., 1997).

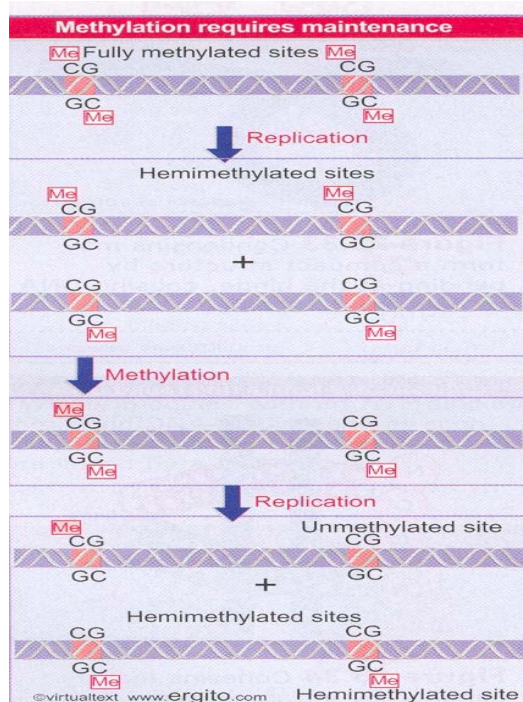


FIGURA 2. El estado de metilación es perpetuado por la enzima metiltransferasa que reconoce los sitios hemimetilados como sustrato.

2.2 METILTRANSFERASAS

Tradicionalmente las enzimas de restricción son usadas para la clonación de genes. Es por esto que en años recientes, los genes de muchas enzimas de restricción, han sido clonados. La finalidad de clonarlas es principalmente comercial, aunque existe otra que es académica: en ésta lo que se pretende es entender como las enzimas reconocen el DNA, ya que son altamente específicas y sus especificidades son tan variadas que ofrecen oportunidades excepcionales para investigar sus interacciones proteína-DNA.

Las enzimas de restricción se encuentran principalmente en bacterias y normalmente se encuentran acompañadas de enzimas de modificación; estas dos actividades forman el sistema de restricción-modificación (R-M) que en las bacterias es equivalente a un sistema de inmunidad. Debido a que las enzimas de modificación son tan variadas y tan específicas como las enzimas de restricción existe un gran interés en el estudio de estas enzimas.

Se han descubierto varios tipos de sistemas (R-M), que parecen realizar trabajos biológicos equivalentes. Las diferencias están relacionadas a la composición de las enzimas y los co-factores; al reconocimiento en simetría de secuencias y características de rompimiento. Sin importar el tipo de sistema, el corte requiere de cationes como el Mg^{2+} o un catión similar; la modificación requiere al menos S-adenosilmetionina (AdoMet), y afectan un nucleótido en cada cadena de la secuencia de reconocimiento.

Sistemas de metiltransferasas

a) Los sistemas tipo I son complejos y constan de tres proteínas: R, M y S, que forman un complejo que restringe y modifica. El corte requiere AdoMet y ATP mientras que la modificación solo requiere AdoMet. El corte ocurre a cierta distancia de la secuencia de reconocimiento. Las secuencias de reconocimiento son asimétricas y bipartitas; abarcando dos sub-secuencias de tres o cuatro pares de bases en longitud, separadas por seis a ocho pares de bases. La sub-unidad S es la que determina la especificidad para restricción y modificación. Estos genes no

forman parte del mismo operón, los genes M y S son transcritos a partir de un mismo operón mientras que el gen R es transcrito a partir de otra región de DNA.

b) El sistema tipo II agrupa a las más comunes, en donde se encuentran las endonucleasas y las metiltransferasas cuya función puede estar separada. Las secuencias de reconocimiento son esencialmente simétricas. Estas comprenden de cuatro a ocho nucleótidos específicos, pero pueden incluir un nucleótido adicional. El rompimiento ocurre simétricamente dentro de la secuencia y se cree que las endonucleasas actúan principalmente como homodímeros, mientras que las metiltransferasas funcionan como monómeros. Con frecuencia en los alineamientos de secuencias; el gen R está primero; aunque a veces el gen M puede encontrarse primero. Existe una gran variedad de estos sistemas, que pueden tener diferentes orientaciones: orientaciones opuestas, divergentes o convergentes.

En el sistema R-M de tipo IIs (secuencia) las secuencias de reconocimiento tipo II son asimétricas y por lo general tienen una longitud de cuatro a siete nucleótidos. Las endonucleasas cortan a una distancia definida arriba de 20 nucleótidos a un lado de la secuencia. En este sistema las endonucleasas son más largas que las endonucleasas de tipo II y probablemente actúan como monómeros. A veces la modificación se lleva a cabo por dos metiltransferasas al menos 20 veces arriba de la secuencia de reconocimiento, que actúan en cada una de las cadenas. En algunos sistemas, la metilación de nucleótidos está dada en una sola cadena. Existen ejemplos para el sistema de tipo IIs que son poco comunes. Uno de ellos es *Eco571* que está compuesta por la asociación de una endonucleasa-metiltransferasa (RM), y una metiltransferasa que se encuentra codificada en otra región. El corte se da fuera del sitio de reconocimiento y la metilación de la secuencia solo ocurre sobre una cadena; la metiltransferasa metila la secuencia sobre ambas cadenas, mientras que el corte es estimulado por AdoMet. Otros ejemplos estudiados son las enzimas *GsuI* que actúa de manera similar al complejo antes descrito y *BcgI* que es otra excepción, en este caso esta endonucleasa requiere AdoMet, y corta fuera de la secuencia de reconocimiento,

pero sobre ambos sitios. El corte elimina un fragmento de 34 pares de bases que contiene la secuencia del sitio de reconocimiento. Se sabe también que *Bst4* se comporta de manera similar a *BcgI* (Geoffrey et al., 1991).

c) En el Sistema R-M tipo III, las proteínas R y M forman un complejo que restringe y modifica, donde la proteína M es capaz de metilarse a sí misma. El corte requiere ATP y es estimulado por AdoMet. Las secuencias de reconocimiento son asimétricas y no interrumpidas, con una longitud de cinco a seis nucleótidos. El corte ocurre en aproximadamente 25 nucleótidos fuera de la secuencia de reconocimiento. Únicamente una cadena de la secuencia de reconocimiento llega a ser metilada, en una aparente excepción a la regla en donde ambas cadenas deben ser metiladas para preservar la modificación durante la replicación. Sin embargo, el corte solo tiene lugar cuando los dos sitios se encuentran sin modificaciones en el DNA y la orientación es opuesta (Geoffrey et al., 1991).

Otros tipos de sistemas: Existe cierto número de metiltransferasas cuya función no se encuentra acompañada de endonucleasas. Algunas funcionan en la modificación y, otras están asociadas a la reparación por apareamiento erróneo. Existen también enzimas cuya función es la restricción y no dependen de las metiltransferasas. Son pocos los casos de endonucleasas que necesitan de sitios metilados para realizar el corte. En otros casos, las actividades son más complicadas (Geoffrey et al., 1991).

Para este trabajo, son de particular interés las metiltransferasas de tipo II, ya que la posible DAM del fago no lambdaoide parece ser una de este tipo. Se sabe por lo menos de 100 proteínas de MTasas de tipos II que han sido secuenciadas y clasificadas. La clasificación de estas metiltransferasas se basa en el tipo de blanco o compuesto a metilar y en la estructura de sus dominios. Existen dos clases de MTasas tipo II y se distinguen por la posición del DNA que es metilado. Una clase metila la posición C5 del anillo pirimídico de la citosina produciendo C5-metil-citosina (5mC) y la otra clase metila los átomos de nitrógeno del grupo amino exocíclico de la citosina o adenina formando N4-metilcitosina (N4mC) y

N6-metiladenina (N6mA), respectivamente. Los análisis de secuencia revelan que todas las MTasas C5 contienen un set de 10 residuos de aminoácidos conservados y una región variable cercana al C-terminal que marca parte del dominio de reconocimiento blanco (TRD) que es responsable del reconocimiento de la secuencia específica del DNA. Las regiones amino de las MTasas contienen solo nueve de diez secuencias conservadas, las cuales son distribuidas en distintos ordenes dando una subclasificación α , β y γ . Cada grupo está representado por una familia de MTasas específica; así el grupo α contiene casi exclusivamente N6mA MTasas, el grupo β contiene principalmente N4mC MTasas y varias N6mA MTasas y el grupo γ contiene N6mA MTasas. Estudios estructurales de varias MTasas provenientes de estos grupos muestran que la posición espacial de la MTasa requiere regiones funcionales para el ensamble de AdoMet y el mantenimiento de la transferencia de grupos metilo. Sin embargo, el dominio TRD difiere entre las clases de MTasa en secuencia y posición espacial (Scavetta et al., 2000).

2.2.1. Metiltransferasa CcrM

Otra metiltransferasa, descrita en procariontes se encuentra en la bacteria *Caulobacter crescentus* (CcrM). Esta metiltransferasa metila el residuo de adenina en la secuencia GANTC y está asociada a regulación de la expresión genética. La metilación del DNA es catalizada por la proteína CcrM durante el ciclo celular (Wright et al., 1997). Es de particular importancia para el control del ciclo celular ya que en *Caulobacter*, el estado de metilación del DNA refleja la replicación progresiva del cromosoma, provista por señales bioquímicas; esta iniciación de la replicación del cromosoma solo se da sobre el DNA completamente metilado (Reisenauer et al., 1999).

2.3. Función biológica de la metilación Dam

El estudio del papel de la metilación Dam en la biología de *E. coli* revela que el producto del gen *dam* juega un papel en la reparación del DNA por apareamiento erróneo. La metilación Dam (perteneciente a la subdivisión γ de *Proteobacterias*)

también parece estar involucrada en la regulación y coordinación de varios procesos celulares, incluyendo la replicación del DNA y la regulación de la expresión de genes (Mashhoon et al., 2004) (Fig. 3). Entre estos se encuentran los genes de virulencia de varias especies patógenas como *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae* y *Salmonella typhimurium* (Falker et al., 2005).

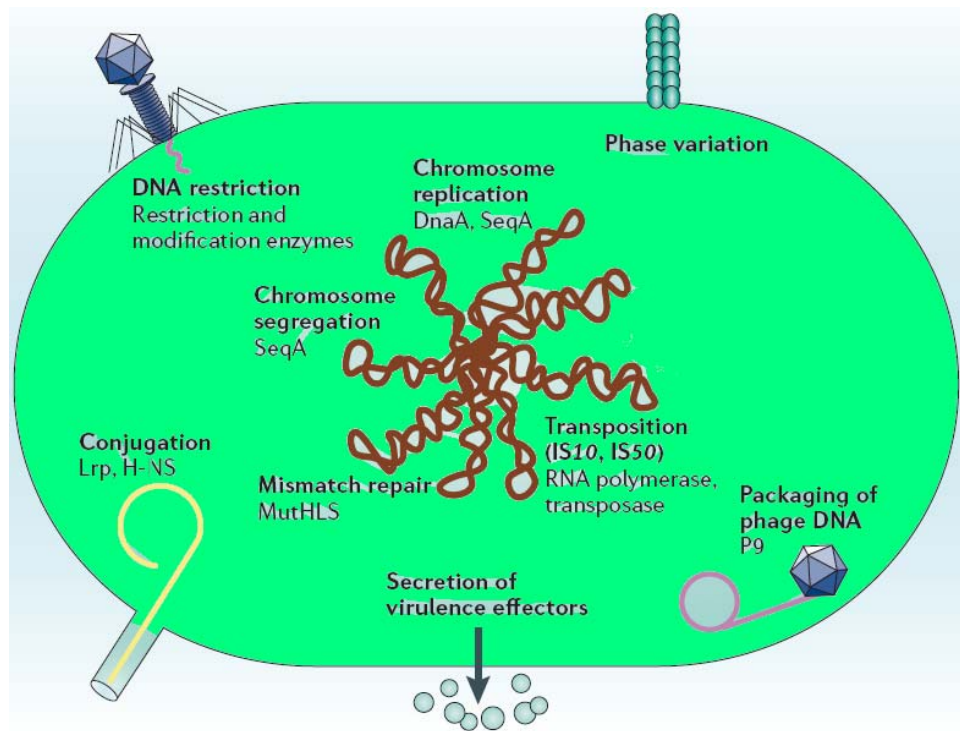


FIGURA 3 Funciones de la (N^6 -metil-adenina) Dam en la bacteria. La Dam se encuentra involucrada en varios procesos bacterianos fundamentales como: la replicación del cromosoma, la reparación de bases mal apareadas en el DNA, la regulación de la conjugación y el empaquetamiento del DNA fágico en la cápside, entre otros.

2.3.1 Reparación por apareamiento erróneo

La metilación por Dam es una parte integral del sistema de reparación por apareamiento erróneo, debido a que metila la posición N_6 de la adenina en la secuencia GATC (Robbins et al., 2005). Esta metilación ocurre después de que la nueva cadena de DNA ha sido sintetizada por la horquilla de replicación. Como resultado una porción de DNA cerca de la horquilla de replicación permanece hemimetilado por un corto tiempo después de la replicación (Calmann et al.,

2003). Esto permite al sistema de reparación por apareamiento erróneo discriminar entre la cadena molde y la cadena naciente y corregir las bases mal incorporadas en la nueva cadena sintetizada. El proceso es llevado a cabo por medio de un complejo ternario (Fig. 4) de proteínas dentro de las cuales se encuentra la proteína MutS. Esta se encarga de reconocer las bases mal apareadas y activa la integración de las proteínas MutL y MutH al complejo. La proteína MutH es una endonucleasa específica de la secuencia GATC, la cual rompe el enlace fosfodiéster de la guanina y provee una señal para que la helicasa y la exonucleasa se unan al complejo y degraden el fragmento en donde se encuentra la base mal apareada. Luego se resintetiza la cadena por la DNA polimerasa III y la ligasa forma de nuevo el enlace fosfodiéster (Wion et al., 2006).

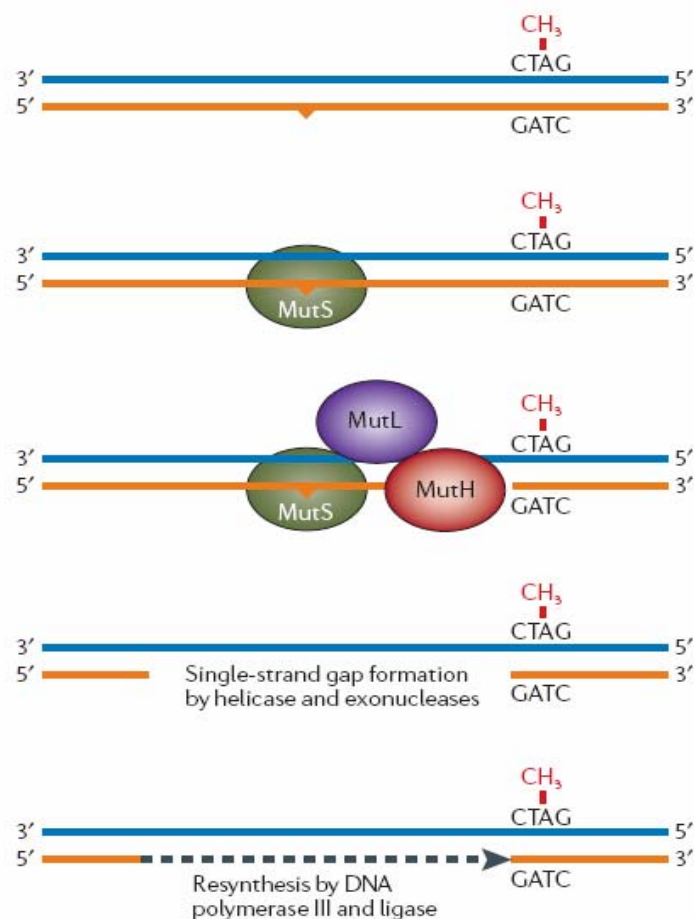


FIGURA 4. Complejo ternario de proteínas encargadas de la reparación por apareamiento erróneo

Es interesante como en cepas que presentan mutaciones en el gen *dam*, no metilan ninguno de los sitios GATC del genoma, lo que aparentemente evita la reparación por apareamiento erróneo, ya que no puede diferenciar entre la cadena molde y la naciente. Sin embargo, la reparación por apareamiento erróneo aún ocurre en estas cepas pero puede ocurrir sobre cualquier cadena. Como resultado las cepas *dam*-tienen un incremento en la frecuencia de mutación espontánea. Las cepas que sobreexpresan Dam también tienen elevadas tasas de mutación debido a la rápida metilación de nuevos sitios GATC replicados reduciendo la efectividad de la corrección por el sistema de reparación por apareamiento erróneo en la cadena naciente de DNA. El éxito de este sistema de reparación depende de los niveles altos o bajos de la metiltransferasa Dam, los cuales muestran altas tasas de mutación cuando su concentración es modificada (Boye et al., 1992).

2.3.2 Replicación del DNA

El origen de replicación (*oriC*) del cromosoma de *E.coli* contiene 11 sitios GATC que se distribuyen en un fragmento de 254 pb y que dependen de la metilación para su funcionamiento. La replicación del cromosoma comienza cuando la proteína DnaA se une a *oriC* y separa las dos cadenas de la doble hélice. El ensamble de esta proteína en la región *oriC* solo es posible si el *oriCGATC* esta metilado; un origen hemimetilado es inactivo.

Los sitios GATC de *oriC* no son metilados inmediatamente y permanecen hemimetilados de uno o tres ciclos celulares. La causa de este retraso es que el origen hemimetilado es secuestrado por una proteína llamada SeqA. Como consecuencia, se previene la metilación del *oriC* de la nueva cadena sintetizada por la metilasa Dam. El *oriC* permanece hemimetilado, y se retrasa el comienzo de un nuevo ciclo de replicación (Wion et al., 2006).

En experimentos realizados en microsomas se ha demostrado que el inicio de una nueva ronda de la replicación (dependiente de *dnaA* a partir del origen de replicación (*oriC*)) ocurre solo a una baja eficiencia si la metilación es incompleta

en los sitios de GATC. Ensayos por citometría de flujo en cepas que contienen mutaciones en *dam*, mostraron una replicación no coordinada cuando se le compara con cepas silvestres. Ogden et al., (1988) han realizado experimentos que sugieren que la región de metilación de DNA hemimetilado es requerida para el anclaje de los sitios que contienen la región del origen de replicación (de *E. coli*) en la membrana cuando ésta se encuentra en división. Esto sugiere que la metilación del origen de replicación es un factor importante antes, durante y después del inicio de la replicación del DNA, la partición del cromosoma y la división celular.

2.3.3 Regulación de la transposición

La metilación también parece ser un evento importante durante la transposición. En los transposones bacterianos *IS10* e *IS50*, la metilación por Dam inhibe la transposición mediante dos mecanismos independientes. El primero de ellos ocurre en la región promotora, el promotor de la transposasa *IS10*, contiene una región o sitio GATC que se sobrelapa con la región -10, esto impide que la RNA polimerasa entre e inhibe la transcripción del gen de la transposasa. El segundo, consiste en la metilación de regiones GATC que se encuentran en ambas regiones *IS10* e *IS50*, la metilación de estos sitios GATCs terminales inhiben la actividad de la transposasa.

2.3.4 Regulación de genes relacionados con virulencia.

La pielonefritis es una enfermedad asociada al pili Pap de la cepa de *E. coli* uropatogénica, que media la adherencia a la mucosa del tracto urinario. La síntesis del pili Pap es controlada mediante la metilación, que puede encender o apagar la expresión de este antígeno capaz de generar una respuesta inmunológica. (Wion et al., 2006). La fase de variación de Pap es regulada por los patrones de metilación del DNA, los cuales son producidos por el ensamble de proteína reguladora de leucina (Lrp). Los experimentos *in vivo* indican que el ensamble de la proteína Lrp a los sitios 1, 2 y 3 que se sobrelapan con el promotor *pap*-BAP, inhiben la metilación del sitio GATC-II, lo que mantiene la expresión de pilis apagada.

Mientras que el ensamble de Lrp a los sitios 4, 5 y 6 que se encuentran río arriba inhiben la metilación de GATC-I lo que mantiene la expresión de los pilis encendida. La metilación del sitio GATC-I en la fase apagada de las células reduce la afinidad de Lrp-Papi por los sitios 4, 5 y 6 (Fig. 5).

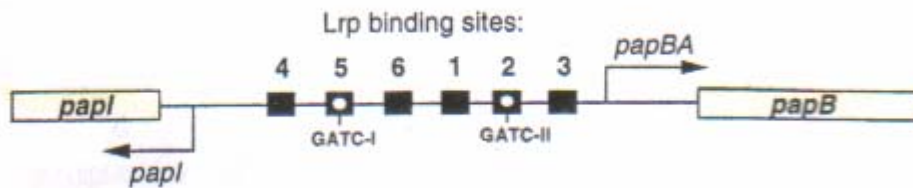


FIGURA 5. Región reguladora que se encuentra río arriba del gen *pap*.

Los resultados muestran que la metilación de GATC-I dentro de los sitios de ensamble Lrp reduce 5 veces la afinidad de Lrp al DNA *pap* (Fig. 6). Consecuentemente, el ensamble de Lrp al DNA *pap* inhibe la metilación de GATC-I.

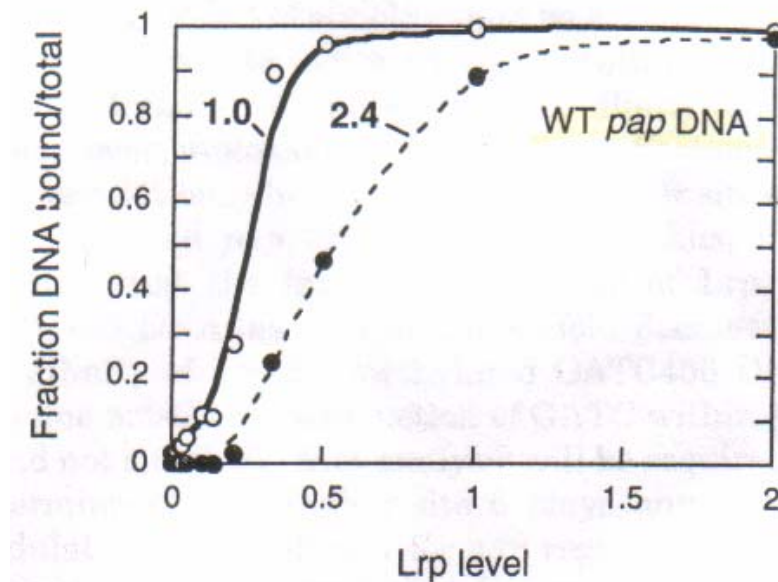


FIGURA 6. La afinidad de la proteína Lrp por el DNA del gen *pap*, disminuye por la metilación del DNA. Los círculos llenos muestran una afinidad menor de la proteína Lrp por el DNA del gen *pap* que se encuentra metilado, mientras que los círculos vacíos muestran una afinidad mayor de la proteína Lrp por el DNA del gen *pap* que no está metilado.

Como se observa en la Figura 6 aumenta la afinidad de Lrp al DNA por cuando no está metilado (los círculos blancos) y disminuyen los niveles de ensamble de

Lrp al DNA pap al estar metilado (los círculos oscuros). Estos datos indican que Dam y Lrp compiten por el sitio GATC-I (Hale et al., 1998).

2.3.5 Regulación de la conjugación bacteriana

La metilación es importante en la conjugación de plásmidos relacionados con cepas patógenas. Tal es el caso de la transferencia del plásmido de virulencia (pSLT) en *Salmonella* y el factor F que son reprimidos por la metilación Dam. La represión de este plásmido involucra dos acciones: la primera de ellas es la activación del gen *finP*, este produce un pequeño RNA el cual inhibe la conjugación; la segunda acción involucra la represión del gen *traJ*, el cual codifica para un activador transcripcional del operón de transferencia. En el primer caso la metilación de la región promotora del gen *finP* previene la represión transcripcional al no permitir la unión de la proteína H-NS. Mientras que la metilación de la región promotora del gen *traJ* previene la unión de la proteína Lrp que es el activador transcripcional de *traJ*.

La secuencia activadora río arriba (UAS) de *traJ* contiene dos sitios de ensamble Lrp, ambos de los cuales son necesarios para la activación transcripcional. Un sitio contiene GATC y su metilación afecta la unión de Lrp; la metilación de GATC reduce la unión de Lrp y la proteína Lrp restante se enlaza a la UAS formando un complejo que no permite la activación del promotor (Wion et al., 2006).

2.3.6 Regulación de la expresión de otros genes

Los genes de organismos como *E. coli* y otros elementos como bacteriófagos y transposones contienen los sitios GATC en sus regiones promotoras. Estos, en gran parte de los casos están regulados por la metilación Dam. El paso de la horquilla de replicación a través de la región del cromosoma que contiene cualquiera de estos genes conduce al incremento o reducción de la cantidad de transcripción de estos promotores. Mientras que la modulación efectuada por la actividad de metilación es usualmente modesta, (en un orden de 2-6 veces), puede tener un efecto significativo en la acción del producto de un gen particular. Por

ejemplo, Tn10 y Tn5 exhiben un cambio en la transposición, delección o inversión seguido del paso de la horquilla de replicación a través de sus genomas. Este tipo de regulación obviamente juega un papel importante en la diseminación de estos elementos a nuevos sitios. La regulación del operón *pap*, que codifica para el pili asociado a la pielonefritis, está involucrado en la metilación ó no metilación de 2 sitios Dam en la región reguladora del operón. Otras evidencias han mostrado la relación de Dam con la regulación de otros genes relacionados con adherencia como *daa* (pili F1845), *fae* (pili K88), *fan* (pili K99), *fim* (pili Tipo I) y *sfa* (pili S) (Palmer et al., 1994).

El resurgimiento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ya disponibles ha causado gran preocupación en la comunidad médica y ha creado una necesidad en el desarrollo de nuevos agentes antibióticos. En el pasado los antibióticos surgieron por el análisis de productos naturales y la identificación subsecuente de su proteína blanco, adicionalmente se han descubierto productos sintetizados en el laboratorio, así como nuevos métodos terapéuticos. Los antibióticos eficaces podrían ser inhibidores de una enzima bacteriana esencial que es única para la bacteria y no tiene homología en mamíferos. Se ha reportado el progreso hacia el desarrollo de inhibidores selectivos de moléculas pequeñas de una metiltransferasa de DNA bacteriana N-6 adenina, usando un mecanismo basado en el acercamiento de multisustratos que demuestra la inhibición de la enzima CcrM (MTasa de DNA regulada por el ciclo celular) de *Brucella abortus*.

La metilación del DNA es un evento biológico importante y ubicuo que implica un nivel adicional de información de las (cuatro bases) del código genético. La mayoría de las MTasas de DNA en bacterias pertenecen a sistemas de modificación y restricción (R/M) que protege el DNA hospedero bacteriano de virus invasivos. CcrM, sin embargo aunque carece de enzimas de restricción comunes de sistemas R/M, cumple un papel regulador crítico en la progresión correcta de eventos del ciclo celular, y es esencial para la viabilidad celular. Además, CcrM esta conservada entre muchas especies bacterianas incluyendo patógenos como *B. abortus*, *Helicobacter pilory*, y *Haemophilus influenza*. En

mamíferos, la metilación de DNA es también crítica en la regulación de funciones superiores del genoma incluyendo replicación, y expresión de genes, adicionalmente esta íntimamente relacionada con la bioquímica de algunos tipos de cáncer. La actividad de la MTasa de DNA N-6 adenina no se encuentra en células de mamíferos, sin embargo, aparece en cambio en la citosina C-5. Por estas razones CcrM esta implicada como un blanco ideal para la terapia antibacteriana. Una segunda MTasa reguladora de DNA la N-6 bacteriana Dam que aunque no es esencial para la viabilidad celular, ha demostrado recientemente que es esencial para la virulencia bacteriana en *Salmonella typhimurium* (Wahnon et al., 2001).

2.3.7 Expresión de Dam

La expresión del gen *dam* ha sido estudiada y existe evidencia de la actividad de un promotor débil río arriba del gen *dam* de *E.coli*. Sin embargo, fusiones de *dam:lacZ* han mostrado que la expresión de *dam* esta influenciada al menos por cinco promotores. El más fuerte de estos se encuentra estrechamente ligado a la región (P1-P2) que corresponde a la región 5' de los genes *aroK* y *aroB*. Dos promotores que también permiten la transcripción de mRNA de *dam*, (P3 y P4) se encuentran en la región 3' del gen críptico *urf74.3* (Fig. 7). Finalmente, datos experimentales muestran que el total de la proteína alcanza aproximadamente 130 moléculas por célula cuando se encuentra en fase exponencial (Palmer et al., 1994).

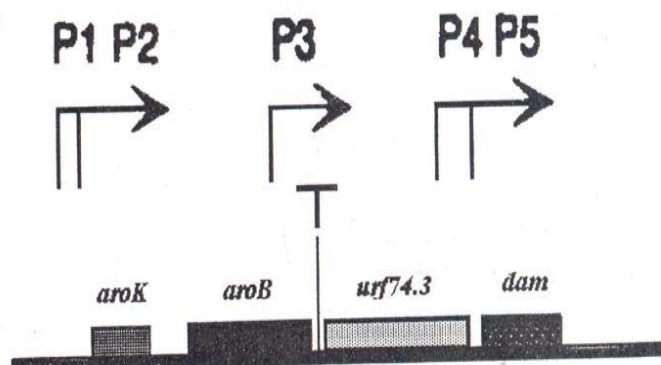


FIGURA 7. Regulación del gen *dam* de *E. coli* K-12

2.3.8 Aspectos evolutivos

Desde un punto de vista evolutivo, la metilación de las secuencias GATC han sido detectadas en gran parte en las bacterias Gram (-) y algunas Gram (+), así como en archeobacterias, pero gran parte de ellas están asociadas a sistemas de restricción. Hay una homología en la secuencia de amino ácidos entre varias MTasas Dam hasta ahora identificadas que sugieren la existencia de un origen evolutivo común (Fig. 8, 9).

Region		Methylation site
Region IV		
<i>EcoRV</i>	¹⁸⁷ D- <u>D</u> - - V V Y C <u>D P P Y I</u> GRH	G ^m ATATC
<i>dam</i>	¹⁷³ D- <u>D A S</u> V V Y C <u>D P P Y A P L S</u>	G ^m ATC
<i>DpnII</i>	¹⁸⁷ T <u>G D</u> - - F V Y F <u>D P P Y I</u> P L S	G ^m ATC
<i>damT4</i>	¹⁶⁴ D <u>G D</u> - - F V Y V <u>D P P Y L I T V</u>	G ^m ATC
<i>EcoRI</i>	¹³³ K S <u>D</u> - - I V V T N P P E S L F R	GA ^m ATTC
<i>PaeR7</i>	¹¹³ Q F <u>D</u> - - F V V G N P P Y V R P E L	CTCG ^m AG
<i>PstI</i>	¹⁴⁵ K Y N- - K A I L N P P Y L K I A	CTGC ^m AG
<i>BspRI</i>	²⁷⁵ I G <u>D</u> - - - L S L D P ^G P Y F T	GG ^m CC
<i>BsuRI</i>	²⁷⁷ I G <u>D</u> - - - L V T D P ^G P Y F T	GG ^m CC
<i>HhaI</i>	¹⁷⁴ D L N I Q N- F Q F P ^K P F E L N T F	G ^m CGC
III		
<i>EcoRV</i>	¹²⁸ R F N S K G G E- N V P F C- - K K P	G ^m ATATC
<i>dam</i>	¹²⁴ R Y N L R G E F- N V P F G R Y K K P	G ^m ATC
<i>DpnII</i>	¹³⁴ R V N S K N Q F- N V P Y G R Y K N P	G ^m ATC
<i>damT4</i>	¹¹⁶ R I N D K G N F- T T P F G- - K K P	G ^m ATC
<i>PaeR7</i>	³³⁴ R G Q- - G V I - N- P E A E S G G	CTCG ^m AG
<i>PstI</i>	¹⁸⁶ V A I T P R S E F C N G P Y F N E F K K	CTCG ^m AG
<i>EcoRII</i>	¹⁷⁸ D H D V L L A ^G E P C Q P F S L A G	C ^m CAGG
SPRM	¹⁰¹ Y V E T L- K E K Q P K F F V F	G ^m CNGC
	³⁴⁵ N G R R F K D D G E P A E T V N	
<i>kgsA</i>	¹¹⁰ V E G N L P Y N I S T	
<i>ermD</i>	V V S N I P Y A I T T	
<i>ermA</i>	I Y G N I P Y N I S T	
pAM177	I V G S T P Y H L S T	

FIGURA 8. Similitud entre las secuencias de metiltransferasas aminoacídicas de las metiltransferasas: *EcoRV*, *dam*, *DpnII*, *dam T4* y otras

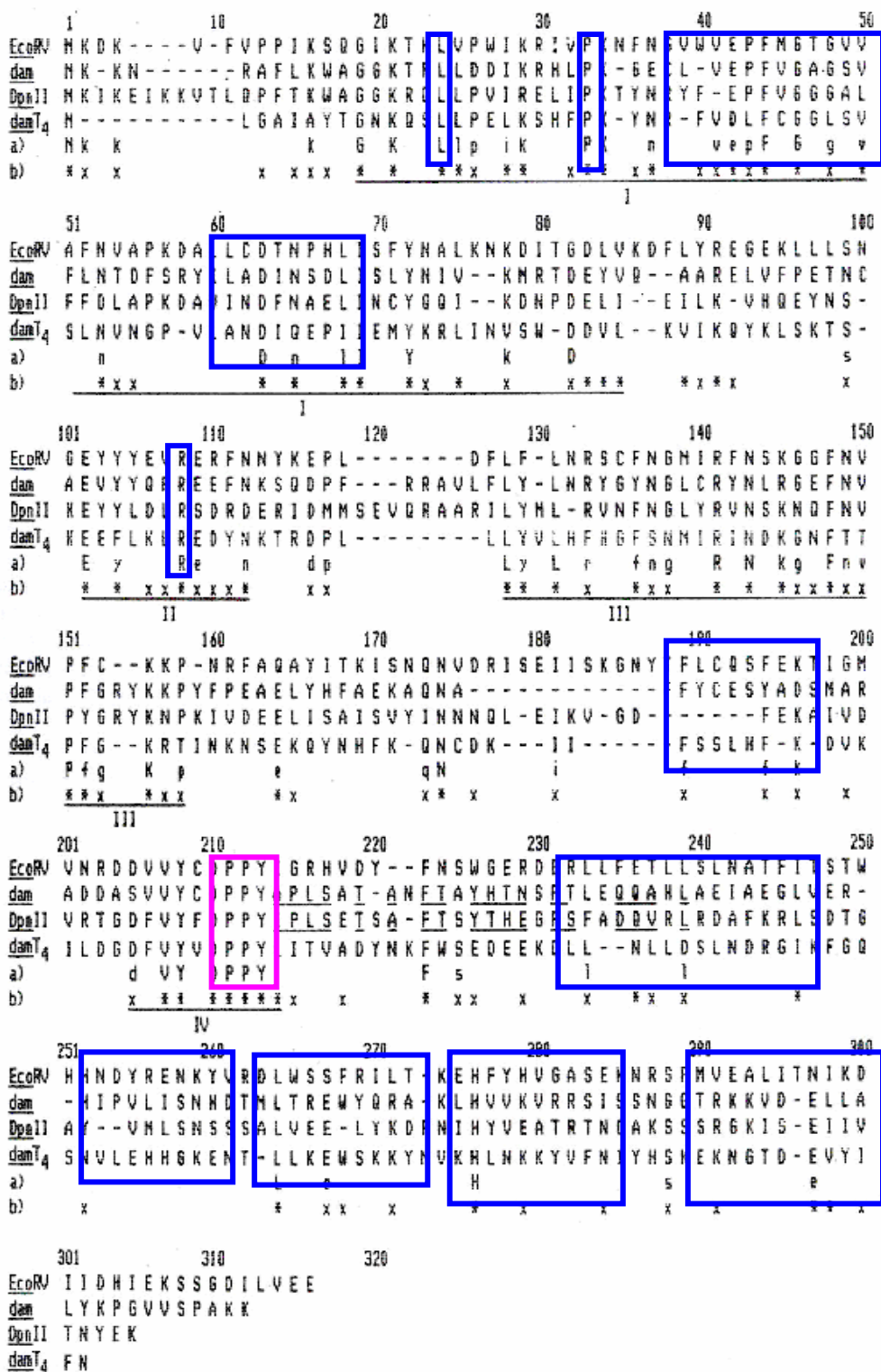


FIGURA 9. Homología entre la secuencia de aminoácidos de diferentes metiltransferasas en azul y en rosado su sitio activo.

El gen *dam* parece ser uno de los pocos genes que está distribuido de forma universal entre las enterobacterias. Basados en la secuenciación de nucleótidos un cierto número de MTasas de clase II comparten una similitud entre ellas.

2.3.9 Otras características

Es interesante denotar que muchos de los fagos de *E.coli* han adquirido una copia del gen *dam*, presumiblemente para aumentar el material genético del hospedero durante la infección, esto al permitir su integración y no ser reconocido como extraño. Por otro lado, la metilación de *dam* ha mostrado que juega un papel importante en el empaquetamiento del DNA del fago P1. También el recientemente descubrimiento retron (Elemento transponible que codifica para la transcriptasa reversa (RT) y para las funciones de la metiltransferasa Dam) de *E.coli*, Ec67, contiene un gen con una homología funcional y una similitud en la secuencia a *dam*. La manera en que se sintetiza es mediante la transcripción de un mensajero que forma una estructura secundaria muy particular, esta sirve como un oligonucleótido corto que permite la síntesis de DNA por la RT, eso le permite sintetizar un elemento de doble cadena que se transpone debido a que contiene repetidos directos de 26 pares de bases que flanquean a la secuencia. Sin embargo, hay muchas especies de bacterias que contienen secuencias GATC no metiladas (Palmer et al., 1994).

2.4 Otras metiltransferasas relacionadas con funciones fisiológicas importantes

2.4.1 Reparación de parches cortos de Dcm

La desaminación de las 5 metilcitosina (5=meC) da como resultado la formación de una timina. Se ha observado que los sitios de reconocimiento de Dcm (CCWGG) son sitios “calientes” (frecuentes) que permiten mutaciones con una mayor frecuencia. Se ha descrito un sistema de reparación que reconoce y repara los sitios T::G mal apareados por las secuencias cortas de escisión (<10bp). Este

tipo de reparación ha sido denominado reparación de parche muy corto (Vsp) que requiere de los productos génicos de *mutL* y *mutS*, y la MTasa de Dcm.

2.5 Metiltransferasa en bacteriófagos

Los bacteriófagos son organismos parásitos que necesitan de un hospedero para su desarrollo. La producción de progenie comienza con la infección por bacteriófagos los cuales requieren una célula hospedera susceptible, la inyección del ácido nucleico del fago que posteriormente se transcribe, se traduce y se replica la información genética del fago por la maquinaria del hospedero y finalmente la liberación de la progenie infecciosa. Dentro de las características de resistencia de la infección del fago se encuentra: la carencia de un receptor bacteriano y la presencia de un sistema activo de restricción/modificación la cual puede decrecer la producción de fagos pero que raramente detiene la infección completamente. Así, la metilación Dam juega un papel importante en la infectividad del fago en diferentes aspectos de la estabilidad del DNA en la relación fago/hospedero (Zaleski et al., 2005).

Se sabe que los bacteriófagos como T4 codifican para la DNA [N⁶- adenina] metiltransferasa (T4 Dam) que metila adenina en la secuencia GATC, también puede reconocer otros sitios no canónicos como GAY (en donde Y representa citosina ó timina) (Kosykh et al., 1995). Los virus de *Escherichia coli* T1 y T2 al igual que T4 codifican para metiltransferasas de DNA. El virus T1 presenta una homología cercana con la MTasa Dam del fago HP1. El orden de subdominios de estos fagos es similar a los de la clase γ m⁶A MTasas (Bujnicki et al., 2001). T1 es capaz de crecer alternativamente en varias cepas hospederas, sugiriendo que la metilación del DNA podría proveer protección contra el sistema de restricción del huésped. Sin embargo, los virus bacterianos T2 y T4 los cuales tienen su DNA modificado por grupos hidroximetil en los residuos de citosinas, también codifican una metiltransferasa de DNA capaz de metilar la secuencia modificada 5'-GAThmC-3' (en donde hm es hidroximetil) en la adenina (Scherzer et al., 1987). La secuencia de nucleótidos del gen *dam* de T4 reveló información sobre marcos de lectura abiertos que codifican polipéptidos de 26 y 30 Kilodaltones y

han sido identificados como un polipéptido de Dam. (Miner et al., 1988). Esto sugiere que la metilación del DNA no solo juega un papel importante en *E.coli*, por ejemplo en reparación por apareamiento erróneo y en replicación sino también en el desarrollo de algunos virus.

Entre los bacteriófagos, Mu es único. Además de su extraordinaria propiedad de funcionar como un elemento transponible, Mu emplea dos estrategias inusuales para extender su rango de hospedero. Uno involucra la expresión de formas alternativas de las fibras de la cola que especifican diferentes capacidades de adsorción en varias células del hospedero; esto se logra mediante la inversión de DNA de la región G del fago, el cual codifica estas proteínas. La otra estrategia involucra un tipo inusual de la función en la modificación de DNA, codificado por el gen *mom*. Es una modificación secuencia-específica inusual de adeninas que protege el DNA del fago contra una variedad de sistemas de restricción/modificación controlados por el hospedero (Sun et al., 1996).

Los bacteriófagos (virus bacterianos) han desarrollado varias tácticas para superar las barreras de restricción del hospedero. El bacteriófago T4, por ejemplo, protege su DNA con residuos hidroximetilcitosina glicosilados, mientras que el DNA λ es enmascarado por metilación específica del hospedero. Debido a que el DNA de los fagos T7 y T3 son hipometilados y no contienen bases extrañas como el T4, seguramente hacen uso de otras modificaciones no caracterizadas hasta el momento. En el primer paso de la infección, T7 y T3 introducen dentro del hospedero solo una pequeña parte de su DNA, el cual no contiene sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción que proviene de K-12 y B de *E. coli*. Este pequeño segmento codifica para una proteína que evita los cortes con enzimas de restricción, después de la expresión de ésta, se permite el desarrollo de virus. T1 exhibe otra característica más que no es compartida ni siquiera con T4 y T3. El DNA de T1 es metilado independientemente de la metilación del DNA del hospedero y es por tanto protegido contra la restricción del hospedero (Auer et al., 1984).

2.6 ANTECEDENTES DIRECTOS

Kameyama y cols 1999, reportaron la caracterización de bacteriófagos lambdoides (fagos que comparten características con el fago λ), y la descripción de un nuevo grupo de fagos denominado fagos No lambdoides. Este nuevo grupo únicamente comparte con los fagos lambdoides el requerimiento de los factores Nus del huésped (Factores requeridos para la actividad antiterminadora del fago λ). Este grupo difiere, de los fagos lambdoides en propiedades como: la de no ser inducidos con luz ultravioleta, tener un tiempo de eclipse mayor que el de los lambdoides y su DNA presenta resistencia a la digestión con varias enzimas de restricción como *HindIII*, *EcoR1*, *SacI* y *SacII*, entre otras (enzimas cuyos sitios se encuentran presentes en el DNA de lambda).

Como parte de la caracterización de estos fagos se analizó un fragmento de 1500 pb del bacteriófago mEp021. En este se encontraron 5 marcos de lectura abierta (ORF), de los cuales los primeros cuatro no presentaron una identidad significativa con las proteínas reportadas en los bancos de genes. Sin embargo, el ORF 5 presentó una secuencia con una similitud significativa ($E=5e-14$, $E=7e-11$ y $E=4e-10$ por blast regular) mediante análisis del psi-blast) con las secuencias de metiltransferasas de fagos relacionados con *Salmonella entérica*, *E. coli* 0157:H7 y *Haemophilus influenzae*. La identificación así como análisis de la función de este marco nos permitirá saber si la resistencia al corte del DNA del fago mEp 021 con enzimas de restricción es debido a modificaciones por esta proteína. Se sabe que algunos fagos como T4 presentan este tipo de proteínas que modifican el DNA fágico, y así evitan la degradación de su propio DNA (Karam et al., 1994).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha estudiado el papel de las metiltransferasas debido a que se encuentran implicadas en varios procesos fundamentales como en la replicación del DNA, en la reparación por apareamiento erróneo y en la regulación de expresión de genes, entre otros. Por la importancia de esta enzima en bacterias y en bacteriófagos, particularmente sobre estos últimos se han realizado estudios en fagos no lambdoide ya que han sido recientemente descritos. De estos estudios, se tomo un fragmento del genoma del fago mEp021 y se encontró que tenían cinco marcos de lectura abiertos siendo el quinto el que presento una identidad significativa con otras metiltransferasas. Sin embargo, aún no se tenía una función definida. Por lo anterior, se realizo un estudio que contribuyera al análisis del marco abierto de lectura cinco y que nos permitiera determinar su posible función y grado de similitud con otras metiltransferasas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

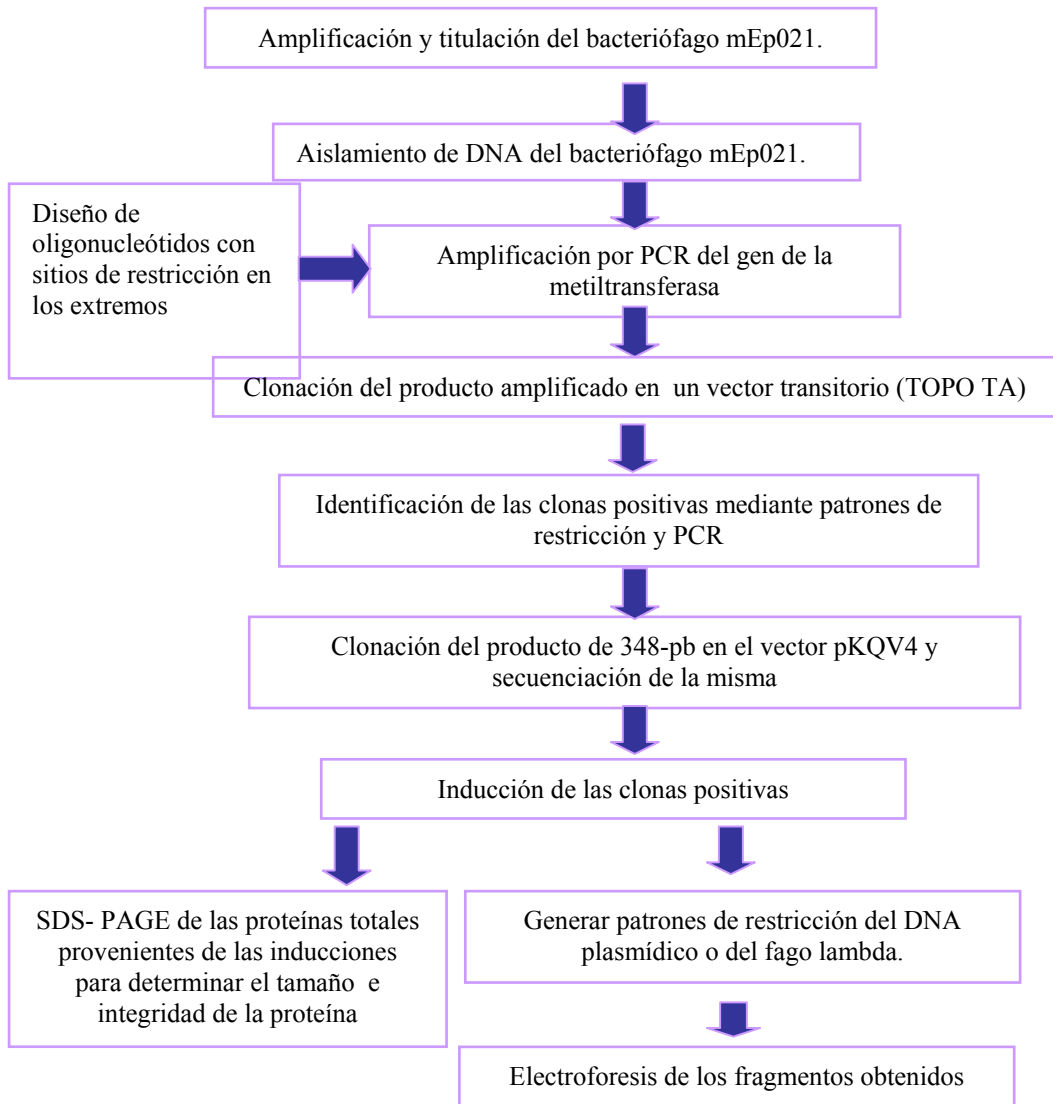
Aislar y caracterizar una posible metiltransferasa Dam proveniente del bacteriófago no lambdoide mEp021

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar un análisis in silico tanto de la secuencia de DNA como de la proteína para diseñar los oligonucleótidos correspondientes al marco abierto de lectura 5.
2. Realizar la purificación del fago mEp021.
3. Extraer el DNA del bacteriófago mEp021 para la amplificación del gen de la metiltransferasa por PCR.
4. Realizar la clonación del producto amplificado en el vector transitorio TOPOTA.
5. Identificación de las clonas positivas por PCR y corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.
6. Clonación del producto de 348-pb en el vector pKQV4 secuenciación de la misma y transformación del plásmido pFMM, en cepas bacterianas *dam⁻*.
7. Aislamiento del DNA plasmídico (del objetivo 6) inducidas con y sin IPTG para analizar patrones de restricción (enzimas que reconozcan sitios GATC como: *DpnI* y *MboI*).

4.3 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Aislamiento y caracterización de una posible metiltransferasa dam proveniente del bacteriófago no lambdoide mEp021.



5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Diseño de la investigación: Experimental

Se estudio el marco de lectura abierto 5 del fago mEp021. El cual se obtuvo del estudio de un fragmento del genoma del fago mEp021 en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Instituto Politécnico Nacional).

5.1.1 Análisis bioinformático:

Se utilizo en el sitio National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparar la secuencia obtenida de la secuenciación de un fragmento de 1500 pares de bases del fago mEp021, se realizó el alineamiento con otras secuencias del banco de genes y se definieron las secuencias conservadas de las mismas con las herramientas que se encontraron en la página <http://www.expasy.org/>. Para determinar el punto isoeléctrico, el peso molecular y la composición de los aminoácidos de la proteína se utilizo el sitio <http://www.expasy.org/tools/tagident.html> y para su confirmación se uso http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html. Para la búsqueda de similitudes se utilizaron los sitios <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, <http://www.expasy.org/tools/blast/>, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> también se realizo el análisis Psi-Blast y un alineamiento de las metiltransferasas para visualizar los motif utilizando <http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/cgi-bin/ESPrIPT.cgi>. Para la predicción de la topología de la proteína se uso <http://www.psort.org/>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> y para la predicción de la estructura secundaria se uso http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html. Para el alineamiento de la secuencia el sitio http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html y para el análisis de las enzimas de restricción usadas <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>. Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos por medio del programa OLIGO DNA/RNA PRIMER ANALYSIS SOFTWARE VERSION 4.1.

2.2.1 Bacterias, bacteriófagos y plásmido

La bacteria que se utilizo en este estudio es *Escherichia coli* W3110 (derivada de K-12), para multiplicar el fago mEp021. La cepa DH5 α derivada de K-12 se empleo para la extracción de plásmidos y para transformación con la mezcla de ligación. Para el crecimiento de la bacteria W3110 se prepararon cajas de medio de cultivo LB (Luria-Bertani), las cuales se incubaron a 37°C. Para la obtención de lisados bacterianos se utilizo el caldo TB (medio triptona) y para el aislamiento de las placas del fago se prepararon cajas de medio TB.

Bacteria(<i>E. coli</i>)	Genotipo	Fuente
W3110	F λ rph $\bar{}$	Bachmann(1972)
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17recA1</i> <i>endA1 gyrA96thi-1relA1</i>	Hanaba D, (1983)
GM271	<i>F- dcm-6 hsdR2 ara-14</i> <i>leuB6 tonA31 lacY1 tsx-</i> <i>78 supE44 galK2 hisG4</i> <i>rpsL136 xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	Palmer y Marinus (1994)
GM2163	<i>F- dam-13::Tn9 dcm-6</i> <i>hsdR2 leuB6 his-4 his-1</i> <i>ara-14 lacY1 galK2</i> <i>galKT22 xyl-5 mtl-1</i> <i>rpsL136 tonA31 tsx-78</i> <i>supE44 McrA-McrB-</i>	Palmer y Marinus (1994)
Bacteriófagos		
mEp021	No lambdoide	Kameyama y col., (1999)
Lambda ó W-1	Lambda wild type	Kameyama y col., (1999)
Plásmido		
pKQV4	*Marcador de selección de ampicilina *Región promotora de <i>ptac</i> *Bajo número de copias	Strauch y col., 1989

Tabla 1. Características y genotipos del material biológico utilizado en este estudio.

5.2 Métodos:

5.2.1 Obtención de placas líticas del bacteriófago mEp021

Se obtuvieron depositando en línea recta 20 µl del lisado del fago de un extremo a otro de la caja que contiene agar TB. Se dejó secar y posteriormente se cubrió con un tapiz de la cepa W3110 (2 ml de agar fundido TB y 0.5 ml de cultivo bacteriano) el cual debe quedar homogéneo para la obtención de placas líticas aisladas. Otra forma en la que se realizó fue por un tapiz de W3110 en una caja de LB y se dejó secar. Luego se realizaron diluciones del fago de 10^{-2} a 10^{-8} (0.99 ml de SM + 0.01 ml del fago 1:100) y luego se goteó 0.01 ml de cada dilución y se incubó a 30°C toda la noche.

5.2.2 Preparación de lisados bacteriofágicos

Se tomó una placa aislada del fago y se colocó en una matraz Erlenmeyer con 0.5 ml de la cepa W3110. Después de 15 minutos se adicionaron 10 ml de medio TB líquido y se incubó durante 6 a 8 horas en agitación a 200rpm hasta obtener lisado celular. Posteriormente se agregó 0.1 ml de cloroformo al sobrenadante (el cual tuvo un aspecto claro) y se agitó de nuevo durante 5 minutos. La muestra se centrifugó a 7,150g por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante libre de restos celulares a un tubo estéril y se almacenó a 4°C.

5.2.3 Aislamiento del DNA del bacteriófago

Se tomaron 25 ml del lisado fágico (con un título aproximado de 10^{10} UFP/ml), se le agregó una solución DEAE celulosa (equilibrada con medio LB a pH 7) y se agitó por 30 minutos. Se eliminó la DEAE celulosa por centrifugación a 16,090 g por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se le agregaron 6.5g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta la disolución total, luego se centrifugó a 11,180g durante 30 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1M pH 8). Se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo y se mezcló en vortex, luego se centrifugó a 7,150g por 5 minutos. Se tomó la fase acuosa y se resuspendió en vortex con un volumen igual de cloroformo, se centrifugó a 7,150g durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa y se ajustó a una concentración de 0.3M con acetato de sodio 3 M y se resuspendió en dos volúmenes iguales con

etanol o con uno de isopropanol. Se centrifugo a 11,180g por 30 minutos para recuperar la pastilla de DNA y luego la pastilla se lavo con etanol al 70% y se dejo secar a baja temperatura. Después se resuspendió en 50 µl de TE 1X.

5.2.4 Aislamiento del DNA plásmidico

Se inoculo una colonia de la bacteria conteniendo el plásmido pKQV4 en 5 ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 µg/ml), se incubo en rotación continua a 200 rpm a 37°C durante toda la noche. Se centrifugo 1.5 ml del cultivo a 6,280g durante 5 minutos. La pastilla se resuspendió en 100µl de la solución I fría (glucosa 50mM, Tris -HCl 10nM (pH 8), EDTA 10mM (ph8)). Se mezclo hasta formar una emulsión homogénea y se mantuvo en hielo hasta agregar la solución II (SDS al 1% y NaOH 0.2N). Se agregaron 200 µl de la solución II. Se mezclo en hielo hasta agregar la solución III (acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial). Se agregaron 10µl de RNasa A (10 mg/ml) por 15 minutos. Se agregaron 150 µl de la solución III. Se mezclo por inversión y se dejo reposar en hielo por 10 minutos. Se centrifugo a 11,180g durante 15 minutos. Se tomo la fase acuosa y se agrego volumen a volumen una mezcla de fenol:cloroformo. Se mezclo por 30 segundos con vortex y se centrifugo a 16,090g durante 5 minutos. La fase acuosa se mezclo con cloroformo volumen a volumen y se centrifugo a 11,180g durante 5 minutos. La fase acuosa se equilibrio con acetato de potasio 3M hasta una concentración de 0.3M de acetato de potasio. El DNA se precipito con dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezclo suavemente y se dejo reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifugo a 16,090g durante 15 minutos. El sobrenadante se decanto y el DNA se lavo con etanol al 70%. Se centrifugo a 11,180g durante 10 minutos. La pastilla se dejo secar y se resuspendió en 100 µl de TE 1X estéril (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM, pH 8).

5.2.5 Amplificación por PCR del marco de lectura abierto (ORF) 5 a partir del DNA del fago mEp021.

El ORF 5 se amplificó y clonó por medio del siguiente procedimiento: para la amplificación se preparó una mezcla que contiene 23.3 μl de agua destilada estéril, 5.0 μl del regulador 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, KCl 500mM; Invitrogen®), 2.0 μl de MgCl_2 50mM (Invitrogen®), 1.5 μl de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's GibcoBR®) 2.5mM, el iniciador Met-Fwd (100 uM), el iniciador Met-Rev (100 uM), 0.2 μl de Platinum Taq DNA polimerasa (Applied Biosystem®) 5 U/ μl y 2 μl de DNA, en un volumen final de 50 μl . Las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) y se sometieron a un ciclo inicial de 94°C/5 minutos. Posteriormente se realizaron 35 ciclos de 94°C/60 segundos, 58.9°C/30 segundos y 72°C/45 segundos. Mantener a 4°C. Luego se realizó un corrimiento electroforético de las muestras junto con un marcador de peso molecular en un gel de agarosa al 1%.

5.2.6 Clonación del ORF 5 en vector transitorio TOPOTA

El producto de PCR obtenido se clonó en el vector comercial TOPO TA (Invitrogen). El cual contiene unida covalentemente en sus extremos a la topoisomerasa I. Esta enzima permite la unión de las bases de adenina que normalmente añade la Taq polimerasa al producto de PCR, con los extremos del vector que contienen timinas como extremos salientes. Para esto se hizo una mezcla de reacción que contenía: 4 μl del producto de PCR, 1 μl de solución de sales y agua estéril para un volumen final de 5 μl , posteriormente se adicionó 1 μl del vector TOPO TA. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para transformar en quimiocompetentes de DH5 α 3 μl de la mezcla de reacción. Para la transformación se incubó en hielo durante 30 minutos y se le dio un shock térmico a 42°C por 30 segundos. Se le adicionó LB y se dejó incubando en agitación a 37°C por 1 hora, se centrifugó por 2 minutos, se resuspendió la pastilla y se plaqueó en cajas de LB ampicilina, para incubarla toda la noche a 37°C.

5.2.7 Clonación del ORF 5 en el plásmido pKQV4

Se empleo el vector pKQV4, ya que además de ser un vector de bajo número de copias contiene un sitio de policlonación. Desafortunadamente no tiene un marcador de selección que permita determinar si la bacteria contiene al plásmido con inserto, por lo que las clonas se seleccionaron por PCR y por corte con enzimas de restricción.

5.2.7.1 Digestión del vector

El DNA del plásmido pKQV4 se corto tanto con la enzima *EcoRI* como con *HindIII*. La reacción consistió en: 3 µg del vector, 2.0 µl del regulador (50mM de acetato de potasio, 20mM de Tris- acetato, 10mM de acetato de magnesio. 1mM de ditiotritol), 1.0 µl de la enzima (5 U/µl) y agua estéril para llevar la mezcla a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubo a 37°C durante toda la noche. La digestión se comprobó corriendo la mezcla de reacción en un gel de agarosa al 1%.

5.2.7.2 Extracción fenólica

El vector digerido y linearizado se sometió a una extracción fenólica con un volumen igual de fenol:cloroformo (volumen a volumen), y finalmente se precipito con dos volúmenes de etanol absoluto frío y se centrifugo a 21,910g durante 20 minutos. La pastilla se lavo con etanol al 70% frío, se centrifugo nuevamente y se resuspendió en el regulador TE 1X.

5.2.7.3 Digestión del producto de PCR del ORF 5

El fragmento de DNA amplificado por PCR que contiene el ORF 5 del fago mEp021 fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la siguiente forma: se mezclaron 300 ng de DNA del fago, 1µl del regulador 10 X (50mM de acetato de potasio, 20mM de Tris-acetato, 10mM de acetato de magnesio, 1mM de ditiotreitil), 1µl de enzima (1U/µl) y agua estéril hasta un volumen final de 20 µl.

Se incubo durante 2 horas con 1U/ μ l de la enzima *EcoRI* y 2 horas más con 1U/ml de la enzima *HindIII*.

5.2.7.4 Reacción de ligación

Se tomaron 50 ng del plásmido pKQV4, 5.72 ng aproximadamente del producto de PCR amplificado a partir del DNA del Fago mEp021. El cálculo para determinar las cantidades se realizó en base al tamaño del vector, para esta técnica se recomienda usar una cantidad de vector e inserto menor a los 100 ng , 4.0 μ l del regulador de ligación 5X (Tris-HCl (pH 7.5) 50mM, MgCl₂ 10mM, ditioneitol 10mM, ATP 1mM, 25 μ g/ml de albúmina sérica bovina) y agua estéril para llevarla a un volumen final de 20 μ l, se adiciona 1 μ l de la enzima ligasa del fago T4. Se incubo a 28°C por toda la noche. La cepa de *E.coli* DH5 α , tratada con cloruro de rubidio, se transformó con la mezcla de ligación y se sembró en cajas de agar LB con ampicilina al 100 ug/ml para la selección de recombinantes.

5.2.8 Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Se inoculo una colonia de la cepa DH5 α en 10 ml de caldo LB y se dejo incubar durante toda la noche a 37°C a 150 rpm. Se inocularon 4 ml del cultivo de toda la noche, en 400 ml de caldo LB, se mantuvieron en agitación hasta que alcanzo una DO₅₅₀=0.8. Las células se obtuvieron por centrifugación a 5,470g durante 10 minutos. Dichas células se resuspendieron en 500 ml de glicerol al 10% a 4°C. Este proceso se repitió 2 veces, para posteriormente resuspender la pastilla en un volumen final de 2 ml. Estas células se guardaron en alícuotas de 120 μ l a -70°C. Para la transformación se colocaron alícuotas de 20 μ l de las células previamente tratadas en tubos estériles de microcentrífuga, se agrega 1 μ l de DNA y se mezcla con una micropipeta. Se colocó cada mezcla de células y DNA entre los electrodos de la cámara de electroporación. Las condiciones de pulso que se utilizaron fueron 2.4kV y 4k Ω en el Cell- portador (GibcoBRL).

5.2.9 Preparación de las células quimiocompetentes con cloruro de rubidio y transformación

Se tomo una colonia de la cepa DH5 α y se creció en medio líquido SOB con Magnesio (20mM) durante toda la noche. Se inoculo 1ml en medio SOB con Magnesio (20mM) en 100ml de medio, hasta una densidad de 0.3-0.4 a 550nm. Se incubo en hielo 15 minutos, y se centrifugo a 4,020g durante 5 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 16 ml de la solución TFB I (RbCl 100mM, MnCl₂ 50mM, KAc 30mM, CaCl₂ 10mM, glicerol 15%, pH 5.8), se incubo a 4°C durante 15 minutos. La mezcla se centrifugo a 4,020g a 4°C durante 10 minutos y la pastilla obtenida se resuspendió en 4ml de la solución TFB II (MOPS 10mM, RbCl 10mM, CaCl₂ 75mM, glicerol al 15% pH 8). Se hicieron alícuotas de 200 μ l y se congelaron a -72°C hasta su uso (Hanahan et al., 1983).

5.2.10 Determinación de candidatos positivos mediante PCR y corte con enzimas de restricción enzimática

La selección se hizo mediante PCR (descrito en el 5.2.5) y la identidad se confirmo mediante corte con enzimas de restricción. Tomando 10 μ l del DNA del candidato, 2 μ l del buffer de la enzima (10x), 1U/ μ l de la enzima ya sea *EcoRI* (Biolabs) ó *HindIII* (Biolabs) y 7 μ l de agua para un volumen final de 20 μ l. Luego se dejo cortando a 37°C por toda la noche.

5.2.11 Secuenciación del fragmento clonado en el plásmido pKQV4

La secuenciación de las clonas positivas se realizo de la siguiente manera: se colocaron 500 ng de plásmido pKQV4 con el inserto (ORF5), el iniciador Met-Rev a una concentración final de 10 pM, 8 μ l de la mezcla de secuenciación (terminador Dye-A marcado con dicloro (R6G), terminador Dye-C marcado con dicloro (TAMRA), terminador Dye-G marcado con dicloro (R110), terminador Dye-T marcado con dicloro (ROX), desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP,

dITP, y dTTP), Ampli Taq DNA polimerasa con pirofosfatasa termoestable, MgCl₂ 3 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9) y agua estéril para llevarlo a un volumen final de 20 µl (protocolo para ABI PRISM™ “dRhodamine Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit”). Posteriormente se llevaron a 30 ciclos de: 96°C/10segundos, 45°C durante 5 segundos y 4°C por 7 minutos. Los productos de secuenciación se purificaron con columnas CENTRI SEP (Princeton® Separations, Applied Biosystems) y se secaron al vacío durante 30 minutos. Los productos ya purificados se analizaron en un secuenciador automático Perkin Elmer™ ABI PRISM™310 (En la unidad de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV).

5.2.12 SDS-PAGE de proteínas citoplasmáticas

Se inoculo una colonia de la cepa DH5α que contenía el vector vacío pKQV4 en tubos con 5 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml), durante toda la noche. La bacteria se centrifugo durante un minuto para empastillar; y se agregaron 50 µl del amortiguador de muestra (Tris-HCl 50mM, pH 6.8, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.05%). Dichas muestras se hirvieron a 100°C durante 4 minutos. Finalmente las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, el cual se preparo de acuerdo con lo descrito por (Sambrook et al., 1989) y se tiño con una solución de azul de Coomassie.

5.2.13 Recolección de la información:

Para la recolección de documentos/información se utilizaron libros de algunas bibliotecas locales de la Ciudad de México, entre las cuales se encuentra la biblioteca del centro de investigación y estudios avanzados del IPN (CINVESTAV) que contenían los temas pertinentes para este anteproyecto, también se utilizaron artículos de revistas con reconocimiento científico. Así como información de sitios como el Pubmed de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y (<http://highwire.stanford.edu/>)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis bioinformático

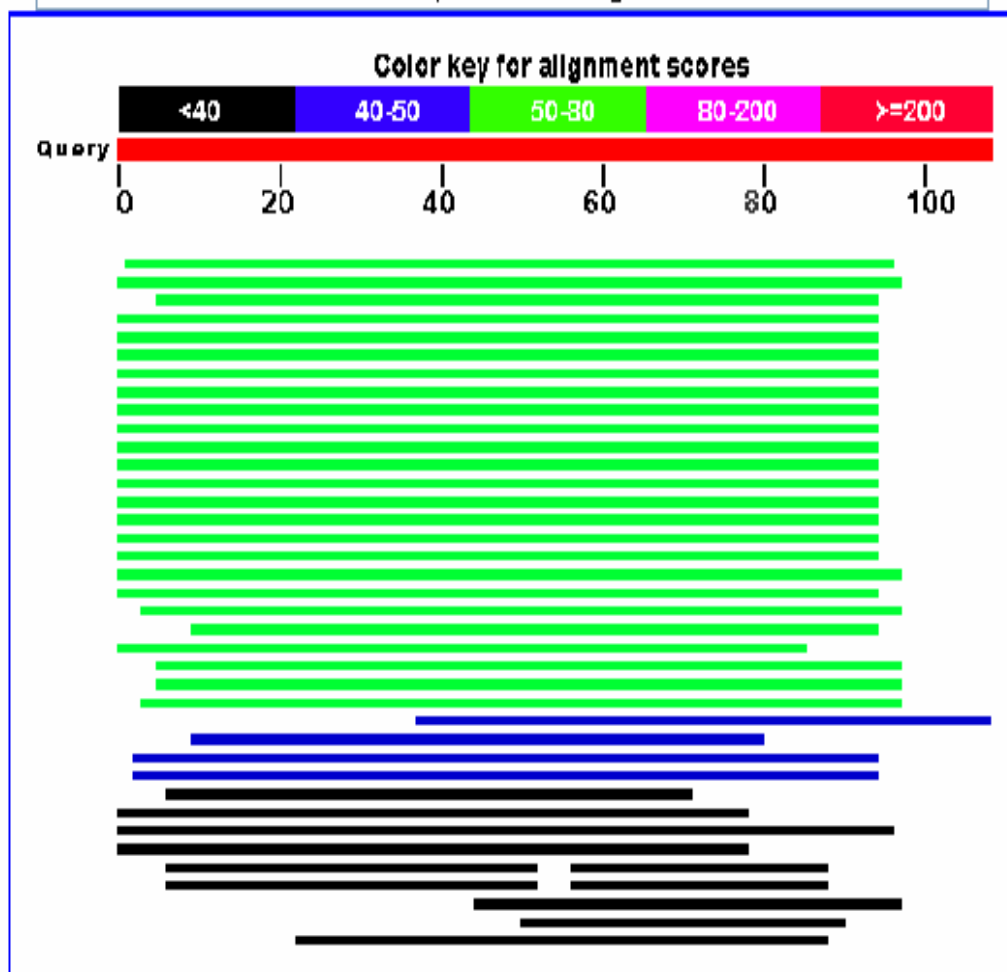
Actualmente no existen muchos estudios sobre los bacteriófagos y la implicación que podrían tener en procesos vitales para la célula como lo es la replicación, la reparación por apareamiento erróneo y la expresión de genes, entre otros. Kameyama et al., 1999 reportó una colección de bacteriófagos lambdoides y no lambdoides aislados de materia fecal, dentro de los cuales encontró 20 grupos de inmunidades diferentes siendo el grupo I perteneciente a los no lambdoides uno de los más importantes por la mayor cantidad de fagos que presentó. Este grupo tiene características particulares como el no ser inducido con luz ultravioleta, tiene un periodo de eclipse mayor al de los lambdoides y su DNA presenta resistencia a la digestión con varias enzimas de restricción. Martínez-Peñañiel (et al., 2003) analizó un fragmento de 1500pb de uno de estos bacteriófagos no lambdoides, el mEp021, y encontró 5 marcos abiertos de lectura (ORF) dentro de los cuales los primeros 4 no presentaron identidad con alguna secuencia reportada, pero el quinto sí presentó una similitud significativa con otras metiltransferasas de bacterias y fagos.

Por los antecedentes mencionados se clonó y caracterizó esta posible metiltransferasa proveniente del ORF5 del bacteriófago no lambdoide mEp021. Para lo cual se realizó un análisis bioinformático, con ayuda de los programas públicos disponibles en red referidos en metodología. Después del resultado obtenido con el blast ($E=5e-14$, $E=7e-11$ y $E=4e-10$), se realizó un alineamiento PSI-BLAST ($E=3e-38$, $E=1e-31$ y $E=4e-31$) para determinar homologías distantes entre la secuencia de la metiltransferasa del fago mEp021, con las diferentes secuencias de metiltransferasas tanto de fagos como de bacterias (Fig. 10).

BLAST

Distribution of 40 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



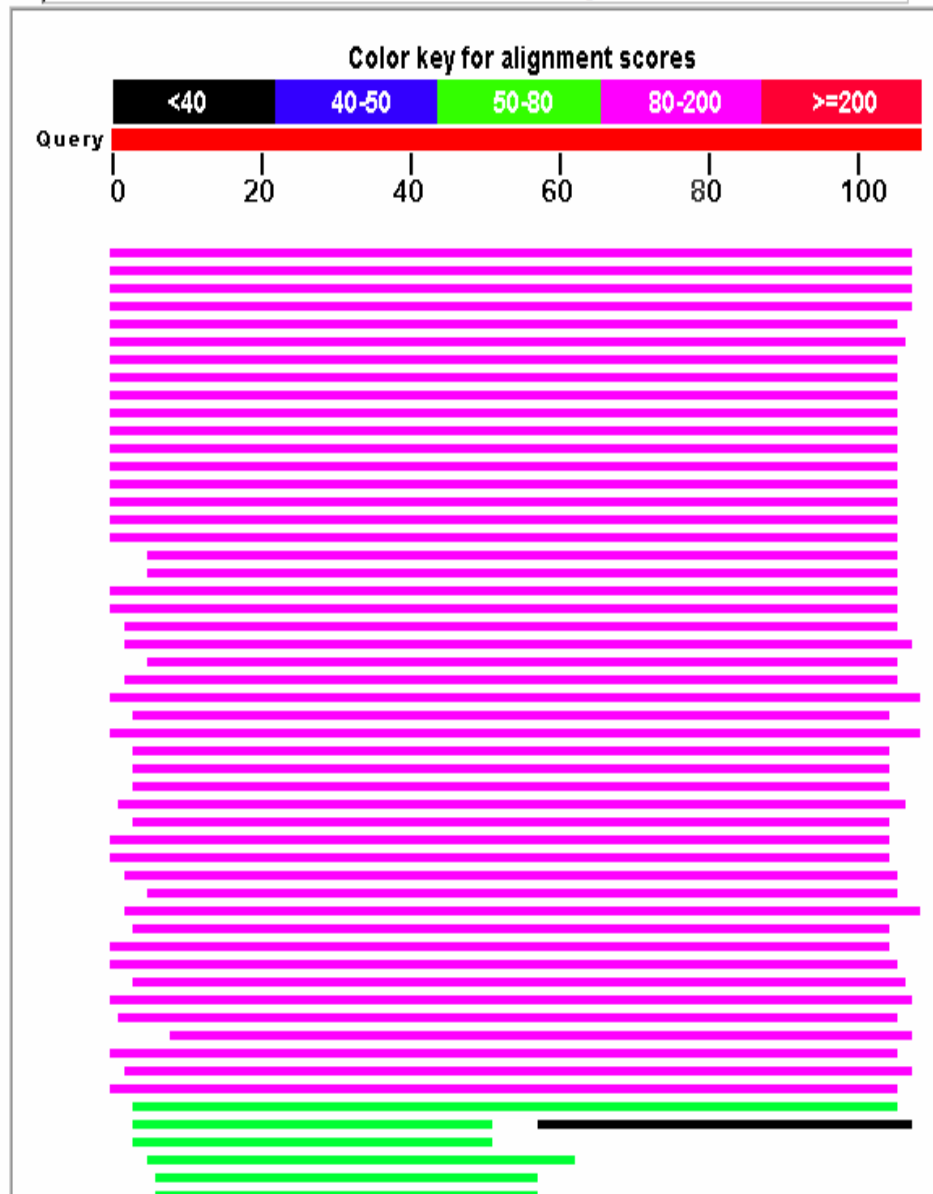
Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value	
gi 82741153 ref ZP_00903881.1 	hypothetical protein Sputw3181...	79.3	5e-14	
gi 85058707 ref YP_454409.1 	hypothetical protein SGO729 [Sod...	75.5	7e-13	G
gi 16506093 emb CAD09979.1 	hypothetical protein [Salmonella ...	72.4	6e-12	G
gi 85059672 ref YP_455374.1 	hypothetical protein SG1694 [Sod...	70.1	3e-11	G
gi 85059158 ref YP_454860.1 	hypothetical protein SG1180 [Sod...	68.6	7e-11	G
gi 71467694 emb CAJ19990.1 	putative methyltransferase [Bacterio	68.2	9e-11	
gi 26107825 gb AAN80024.1 	Putative DNA N-6-adenine-methyltra...	67.0	2e-10	G
gi 75256367 ref ZP_00728037.1 	hypothetical protein EcolE2_01...	66.2	4e-10	
gi 9634205 ref NP_037744.1 	Gp62 [Bacteriophage HK97] >gi 690...	66.2	4e-10	G
gi 23343464 emb CAC95095.1 	hypothetical protein [Bacteriophage	65.9	5e-10	
gi 32170967 ref NP_859212.1 	hypothetical protein Stx1p133 [S...	65.9	5e-10	G
gi 32171135 ref NP_859379.1 	hypothetical protein Stx2Iip132 ...	65.9	6e-10	G
gi 73476163 emb CAJ26400.1 	putative methyltransferase [Bacterio	65.9	6e-10	
gi 75234681 ref ZP_00719001.1 	hypothetical protein EcolE1_01003	65.5	6e-10	
gi 23343496 emb CAC95062.1 	hypothetical protein [Bacteriophage	65.5	7e-10	
gi 75231363 ref ZP_00717751.1 	hypothetical protein EcolB7_01000	65.1	8e-10	
gi 20065928 ref NP_613011.1 	hypothetical protein Stx2Ip133 [...	65.1	8e-10	G
gi 85058722 ref YP_454424.1 	phage DNA methyltransferase [Sod...	64.7	1e-09	G
gi 15802651 ref NP_288678.1 	putative DNA methyltransferase e...	63.9	2e-09	G
gi 31408061 emb CAD90795.1 	DNA adenine methylase [Bacterioph...	63.5	2e-09	G
gi 37787975 gb AAP49979.1 	Dam methylase [Enterobacteria phag...	63.5	3e-09	G
gi 75436969 ref ZP_00733375.1 	hypothetical protein AsucDRAFT...	62.4	5e-09	
gi 9628617 ref NP_043482.1 	orf13 [Haemophilus phage HP1] >gi...	57.8	1e-07	G
gi 17981827 ref NP_536818.1 	dam [Haemophilus phage HP2] >gi...	57.4	2e-07	G
gi 109302912 ref YP_654727.1 	Dam [Bacteriophage F108] >gi 73...	55.8	6e-07	G
gi 32035086 ref ZP_00135145.1 	COG0458: Carbamoylphosphate sy...	49.3	6e-05	
gi 166164 gb AAA87390.1 	DNA N-6-adenine-methyltransferase (M.T1	48.5	7e-05	
gi 23468089 ref ZP_00123655.1 	hypothetical protein Hsom02002467	47.8	1e-04	
gi 53728275 ref ZP_00133506.2 	hypothetical protein Haso02002008	43.5	0.003	
gi 24374529 ref NP_718572.1 	prophage LambdaSo, DNA modificat...	35.4	0.79	G
gi 66396299 ref YP_240658.1 	ORF032 [Bacteriophage S2A] >gi 6...	35.0	0.88	
gi 74311569 ref YP_309988.1 	putative DNA methylase [Shigella...	34.7	1.2	G
gi 66396438 ref YP_240800.1 	ORF032 [Bacteriophage 92] >gi 66...	34.3	1.4	
gi 29423677 gb AAO73551.1 	reverse-transcriptase [Chlamydomonas	33.5	2.5	
gi 29423694 gb AAO73554.1 	pol protein [Chlamydomonas reinhardt	33.5	2.6	
gi 109070662 ref XP_001115393.1 	PREDICTED: similar to HLA cl...	33.1	3.2	G
gi 109148803 ref XP_001117647.1 	PREDICTED: similar to HLA cl...	33.1	3.5	G
gi 23130452 ref ZP_00112267.1 	COG0270: Site-specific DNA met...	33.1	3.7	
gi 15459286 gb AAL00420.1 	Sucrose-6-phosphate hydrolase [Str...	32.0	8.3	G
gi 56751345 ref YP_172046.1 	ammonium transport protein [Syne...	32.0	8.4	G

Figura 10. Análisis por BLAST del ORF 5

En este análisis blast se puede observar que el ORF5 presenta un score (entre 50-80) con las metiltransferasas tanto de fagos como de bacterias. Posteriormente se realizó el análisis psi-blast (Fig 11).

Distribution of 68 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



Sequences producing significant alignments:			Score	E	
			(Bits)	Value	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 85058722 ref YP_454424.1 	phage DNA methyltransferase [Sod...	159	3e-38	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 85059158 ref YP_454860.1 	hypothetical protein SG1180 [Sod...	154	1e-36	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 85059672 ref YP_455374.1 	hypothetical protein SG1694 [Sod...	152	5e-36	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 85058707 ref YP_454409.1 	hypothetical protein SG0729 [Sod...	149	2e-35	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 26107825 gb AAN80024.1 	Putative DNA N-6-adenine-methyltra...	137	1e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 75436969 ref ZP_00733375.1 	hypothetical protein AsucDRAFT...	136	2e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 71467694 emb CAJ19990.1 	putative methyltransferase [Bacterio	136	3e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 31544017 ref NP_852742.1 	DNA adenine methylase [Bacteriop...	136	4e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 9634205 ref NP_037744.1 	Gp62 [Bacteriophage HK97] >gi 690...	135	4e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 75234681 ref ZP_00719001.1 	hypothetical protein EcolE1_01003	135	5e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 75256367 ref ZP_00728037.1 	hypothetical protein EcolE2_01...	135	5e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 23343464 emb CAC95095.1 	hypothetical protein [Bacteriophage	135	6e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 73476163 emb CAJ26400.1 	putative methyltransferase [Bacterio	135	6e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 15832235 ref NP_311008.1 	putative DNA methylase [Escheric...	135	6e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 15830450 ref NP_309223.1 	putative DNA methylase [Escheric...	135	6e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 23343496 emb CAC95062.1 	hypothetical protein [Bacteriophage	134	8e-31	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 15800954 ref NP_286970.1 	putative DNA N-6-adenine-methylt...	134	9e-31	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 9628617 ref NP_043482.1 	orf13 [Haemophilus phage HP1] >gi ...	134	1e-30	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 17981827 ref NP_536818.1 	dam [Haemophilus phage HP2] >gi ...	133	2e-30	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 15802651 ref NP_288678.1 	putative DNA methyltransferase e...	133	2e-30	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 75231363 ref ZP_00717751.1 	hypothetical protein EcolB7_01000	132	4e-30	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 23468089 ref ZP_00123655.1 	hypothetical protein Hsom02002467	129	2e-29	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 37787975 gb AAP49979.1 	Dam methylase [Enterobacteria phag...	129	4e-29	<input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 73918073 gb AAZ93651.1 	Dam [Bacteriophage F108]	127	1e-28	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 53728275 ref ZP_00133506.2 	hypothetical protein Haso02002008	125	7e-28	
<input checked="" type="checkbox"/>	gi 66396299 ref YP_240658.1 	ORF032 [Bacteriophage 52A] >gi 6...	124	1e-27	

Figura 11. Análisis PSI-BLAST del ORF 5.

En donde se puede observar que tiene un score alto (entre 80-200) cuando es comparada con las metiltransferasas de bacteriófagos como HK97, HP1 y BP-933W entre otros y con bacterias como: *Shigella*, *Salmonella* y *Haemophilus* entre otras al igual que los resultados del blast. Lo que indica que si presenta una gran identidad con las metiltransferasas provenientes de fagos y de bacterias patógenas.

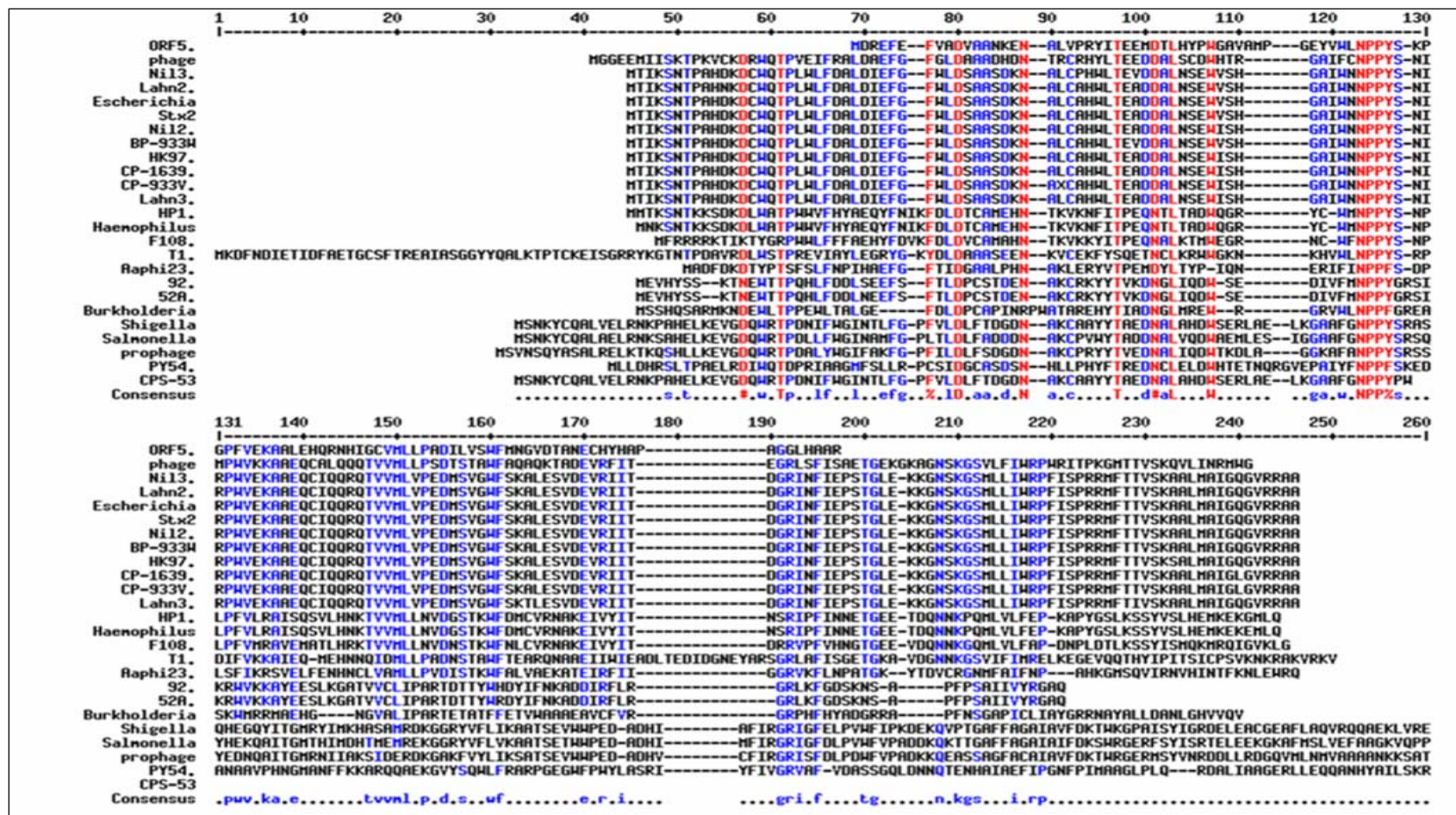


Figura 12. Homología de la secuencia de aminoácidos del ORF5 con otras metiltransferasas.

Los que presentaron un alto índice de expectación se tomaron para hacer un alineamiento de la secuencia de aminoácidos y determinar las secuencias conservadas (Fig. 12), las cuales se pueden ver en color rojo. La región mas conservada es NPPY (corresponde al sitio catalítico) consistente con lo reportado por Lauster et al en 1987, encontrada en enzimas de restricción como *DpnII*, *EcoRV* y la *dam* del bacteriófago T4 entre otras indicando así que este es uno de los motifs del sitio activo de las metiltransferasas. Los aminoácidos de color azul son los que se encuentran relacionados en carga y tamaño y que en su mayoría presentan una similitud de estructura fuerte en esas regiones para los organismos o elementos que dan un mejor score. Es por esto que se analizaron los diferentes motifs en algunas metiltransferasas de fagos como Hp1, Stx2, Bp-933W y Cp-933V comparadas con el ORF5 (Fig 13).

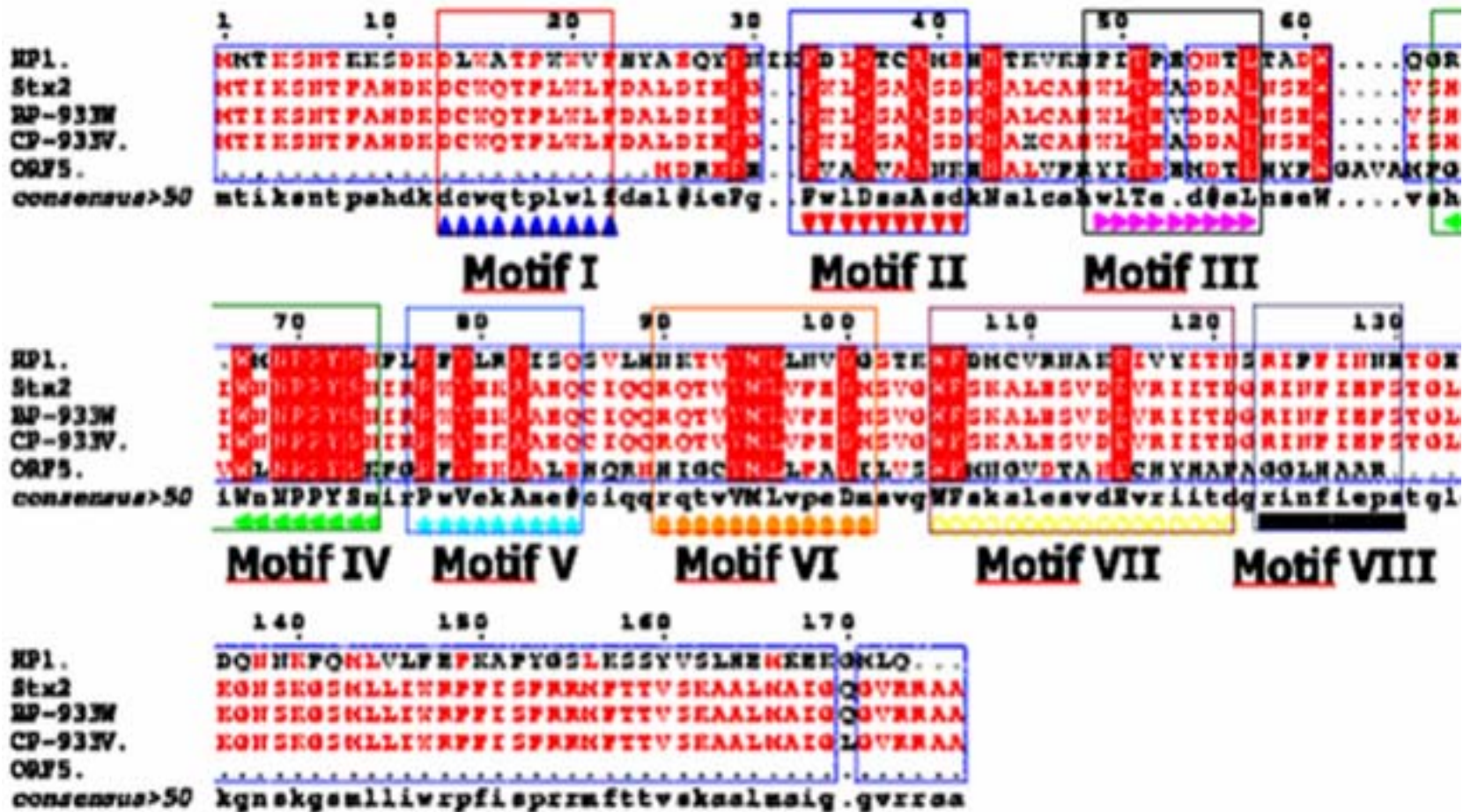


Figura 13. Alineamiento de las metiltransferasas para visualizar los motifs de las metiltransferasas Dam que son similares al ORF5

En este análisis se encontraron 6 motifs de los 8 observados con una identidad del 54-57% para el ORF5. Los primeros tres motifs corresponden al ensamblaje de AdoMet y del 4-8 corresponden al sitio activo según lo reportado por Bujnicki et al., 2001. Implicando así que el ORF5 tiene estos motifs correspondientes a las metiltransferasas provenientes de fagos. Sin embargo le faltan el 1 y el 8 los que podrían ser importantes para su función. Parte del análisis consistió también en la determinación del punto isoeléctrico, del peso molecular, de la ubicación de la proteína, la determinación de la familia a la que pertenece y su estructura secundaria. En los cuales se encontró que tiene un punto isoeléctrico de 5.17 (ver anexo 1) lo cual indica que se podría purificar a futuro si se le comprueba su función. Tiene un peso molecular de 12.1KDa (ver anexo 2), es decir, que es una proteína pequeña, su localización fue citoplasmática (ver anexo 3). Se encontró que a la familia que pertenece esta proteína es la DNA N-6-adenina-metiltransferasa (Dam) (ver anexo 4) de acuerdo a los resultados obtenidos con el programa interactivo 3D-JIGSAW y el análisis de la estructura secundaria mostró que tiene dentro de su estructura por lo menos 3 alfa hélice. Entre las dos primeras alfa hélices se encuentra el sitio activo de esta metiltransferasa, lo que nos permitió inferir que esta metiltransferasa pudiera ser activa. Posteriormente al análisis bioinformático se procedió al diseño de oligonucleótidos.

6.2 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos primero se verificó mediante métodos bioinformáticos, que la secuencia a clonar no contuviera los sitios de las enzimas a utilizar para la clonación dirigida. En este caso el programa utilizado fue el NebCutter Versión 2 disponible en la página de Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) (ver resultados). Por los resultados obtenidos se determinó que los sitios para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* se podían utilizar en el diseño de los oligonucleótidos, ya que la secuencia de DNA del ORF5 no los contiene (Fig. 14).

Linear Sequence: *unnamed sequence*

[Help](#)
[Comments](#)

Display: - NEB single cutter restriction enzymes
 - Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

GC=50%, AT=50%

Cleavage code	Enzyme name code
⌞ blunt end cut	Available from NEB
⌞ 5' extension	Has other supplier
⌞ 3' extension	Not commercially available
⌞ cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	•: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site

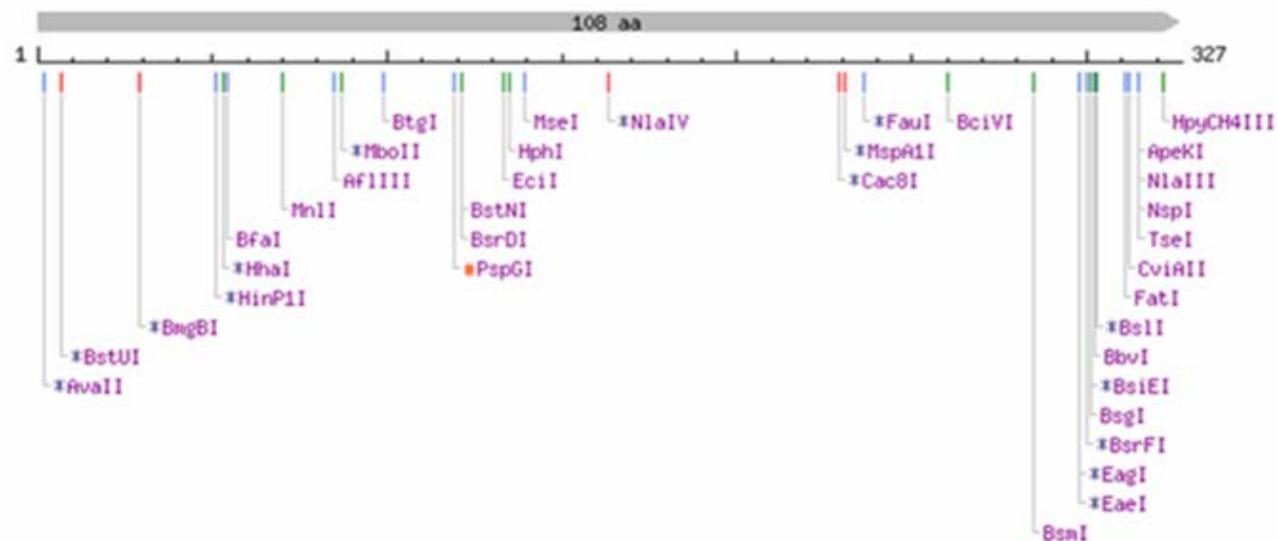


Figura 14. Determinación in silico del patrón de restricción de la secuencia de DNA del ORF5.

Después de confirmar que estos sitios no existían en la secuencia a amplificar, se diseñaron los oligos con el programa (OLIGO DNA/RNA PRIMER ANALYSIS SOFTWARE VERSION 4.1). Se adicionaron las secuencias de los sitios de restricción de cada enzima para producto final de 348-pb (Figura 15). Otras condiciones que se tuvieron en cuenta para amplificar fueron el porcentaje de GC de met-F de 48% y de met-R de 52% para un promedio de 50.9%, una temperatura de alineamiento de 58.9, con una diferencia entre los iniciadores de 3.2 y un producto con una longitud original de 327pb datos obtenidos por el programa Oligo versión 4.1.

Secuencia de DNA (348 pb)



Figura 15. Oligonucleótidos diseñados para amplificar al ORF5.

Una vez diseñados los oligonucleótidos se procedió a purificar el bacteriófago mEp021 para la utilización de los mismos.

6.3 Purificación del bacteriófago mEp021

Para la purificación de los fagos mEp021 y lambda, se determinó el título de los mismos para su amplificación como se describió en la metodología (figura 16).



Figura 16. Placas líticas de los fagos mEp021 y Lambda en la cepa W3110. mEp021 (A) y lambda (B) en un tapiz de la cepa de *E. coli* W3110

Se pueden observar las placas líticas de los fagos a utilizar en este trabajo, así como el título que fue de 4×10^9 UFP/ml para mEp021 y de 5×10^{10} UFP/ml para lambda. Una vez confirmada la viabilidad de los mismos se realizaron lisados, que fueron titulados (los títulos se muestran en la tabla 2).

TITULACION			
Fecha	Fago	Por Duplicado	Título
13-Jul-06	Lambda (λ)		27×10^8 UFP/ml
14-Jul-06	mEp021		32×10^8 UFP/ml
18-Jul-06	mEp021	X	1×10^8 UFP/ml
	(T Marco)		8×10^6 UFP/ml
18-Jul-06	mEp021	X	5×10^6 UFP/ml
			19×10^6 UFP/ml
18-Jul-06	Lambda (λ)	X	4×10^{10} UFP/ml
			5×10^{10} UFP/ml
20-Jul-06	Lambda (λ)		5×10^{10} UFP/ml
20-Jul-06	mEp021		4×10^9 UFP/ml
21-Jul-06	mEp021		1×10^8 UFP/ml

Tabla 2. Títulos de los lisados de los bacteriófagos mEp021 y lambda.

Los títulos más altos de mEp021 y lambda y con los que se trabajo fueron los del 20 de Julio marcados en azul.

6.4 Aislamiento y clonación del fragmento de 348-pb correspondiente al ORF5 del bacteriófago mEp021 responsable de la metilación del DNA.

Luego se extrajo el DNA del bacteriófago mEp021 para amplificar el gen de la metiltransferasa por PCR (figura 17).

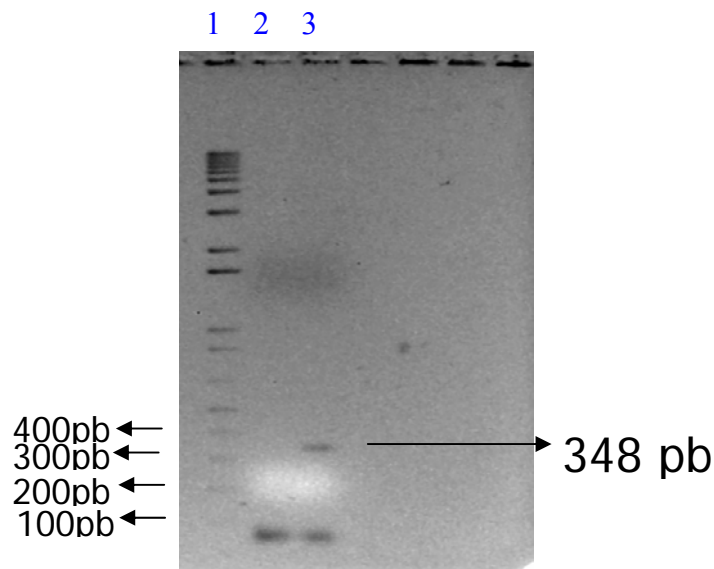


Figura 17. Electroforesis del producto de PCR (DNA del bacteriófago mEp021) en gel de Agarosa al 1%. Carril1, MPM 100 pb plus(Invitrogen). Carril2, Control negativo (Oligos). Carril3, producto amplificado de 348pb.

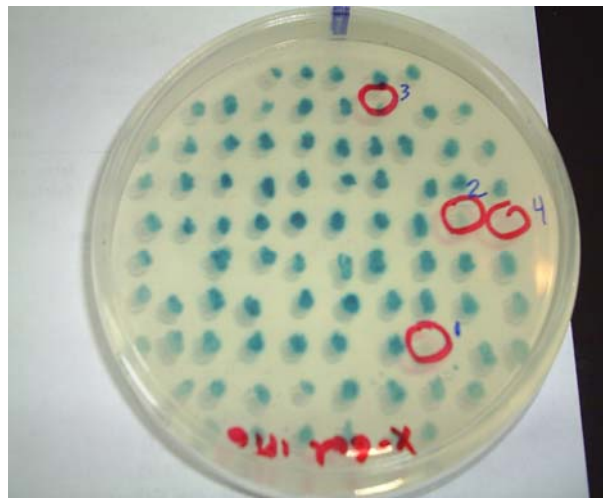
Observándose del producto de PCR en el carril 3 un fragmento amplificado de 348-pb, correspondiente al inserto esperado del gen de la metiltransferasa y en el carril 2 como control negativo (únicamente oligos).

Una vez obtenidos los fragmentos tanto del vector como del inserto, se procedió a la clonación del inserto en un vector transitorio (TOPO TA, Invitrogen) debido a que la Taq polimerasa le adiciona al producto de PCR adeninas para que se una de forma eficiente a las timinas del vector y así facilitar la subclonación en pKQV4. Este vector no requiere de ligasa, porque contiene unida covalentemente en sus extremos, una Topoisomera encargada de hacer la unión ya que rompe el enlace fosfodiester y forma un enlace covalente entre su residuo de tirosina y el fósforo

pero en el momento en que se encuentra con el grupo OH del inserto se desprende dejando el inserto ligado al vector. Mediante esta estrategia se lograron distinguir las clonas que tenían el inserto de las que no debido a que este vector posee un gen de resistencia ampicilina y el gen $LacZ$ de la β -galactosidasa que al expresarse por la adición del inductor IPTG tomo el sustrato X-gal y dio una coloración azul, pero al interrumpirse la expresión de este gen por el acoplamiento del inserto al vector tomo una coloración blanca por lo cual se seleccionaron los candidatos que presentaban una coloración blanca (Fig. 18). Se realizaron dos clonaciones en este vector iguales, una llamada TOPO TA y la otra TOPO N.

TOPO TA

(A)



TOPO N

(B)

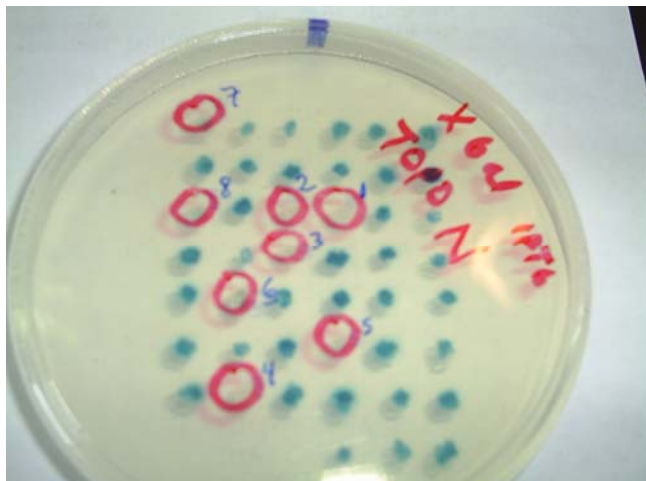


Figura 18. Clonación en vector transitorio TOPO TA, transformada en bacterias competentes DH5 α y espatulada es cajas de LB-Ampicilina (100 μ g/ml.) Con círculo rojo se indican A) 4 Candidatos blancos de un fondo de 85, (B) 8 Candidatos blancos de un fondo de 45.

De la clonación en TOPO TA se encontraron 4 candidatos blancos debido a la interrupción de la expresión del gen de la β -galactosidasa de un fondo de 85 azules correspondientes a la expresión del gen y su crecimiento fue debido al gen de resistencia a ampicilina y a que el genotipo de las bacterias DH5 α en las cuales se transformaron son $recA^-$ y por lo tanto no híbrida o recombina el DNA permitiendo así que la clonación original permanezca en la bacteria, al igual que el IPTG inductor de la expresión del gen de la metiltransferasa el cual metila el DNA y así la bacteria lo reconoce como propio y no como exógeno y por lo tanto no lo degrada. Y en TOPO N se encontraron 8 candidatos blancos de un fondo de 45 azules. Obtenidos los candidatos blancos con el posible inserto se procedió a la extracción de DNA plasmídico de cada uno (Fig 19).

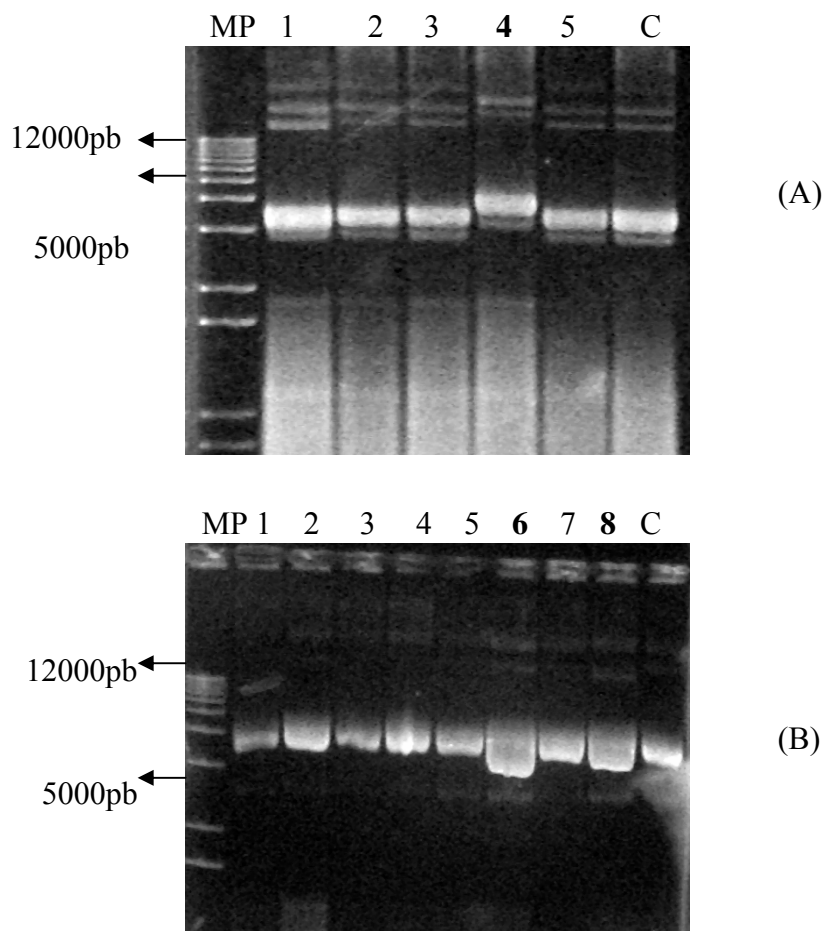


Figura 19. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos por miniprep. (A) Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2-5 candidatos blancos de TOPO TA. Carril 6, candidato entre azul-blanco. Carril 7, Control (colonia azul). (B) Carril 1, MP. Carril 2-9, Candidatos blancos de TOPO N. Carril 10, Control (colonia azul).

En los cuales se pueden ver claramente la diferencia en migración por lo cual se escogió en TOPO TA el candidato 4 y en TOPO N los candidatos 6 y 8 y se corrió otro gel de los seleccionados (Fig. 20).

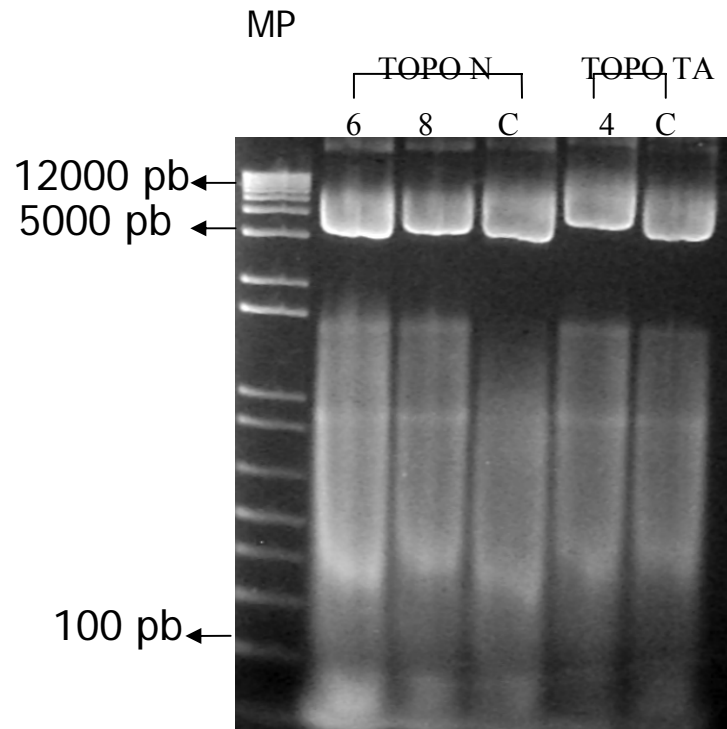


Figura 20. DNA plasmídico de los candidatos seleccionados. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Candidato 6 de TOPO N. Carril 3, Candidato 8 de TOPO N. Carril 4, Control (colonia azul) de TOPO N. Carril 5, Candidato 4 de TOPO TA. Carril 6, Control (colonia azul) de TOPO TA.

Obteniéndose como resultado que el candidato 4 de TOPO TA fue el que presento una diferencia más notoria en migración. Sin embargo para hacer más evidente la diferencia se linearizo el plasmido con la enzima *XhoI* ya que solo tiene un sitio de corte en el vector. (Fig. 21).

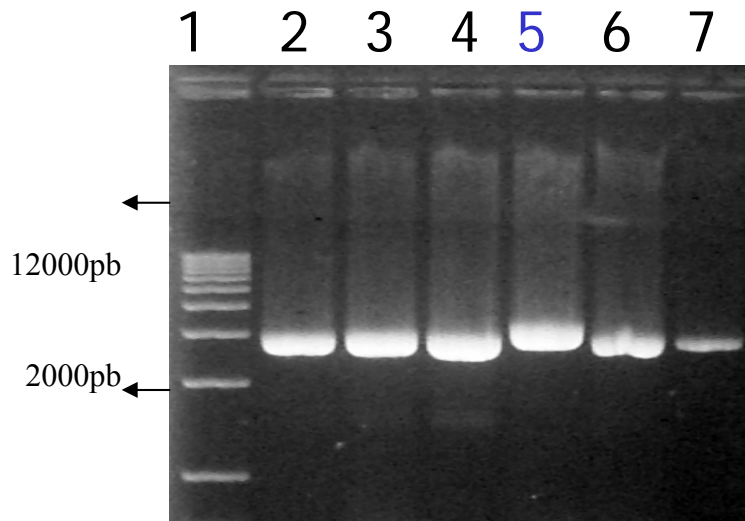


Figura 21. Linearización de candidatos mediante restricción con *XhoI*. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Candidato 6 de TOPO N. Carril 3, Candidato 8 de TOPO N. Carril 4, Control (colonia azul) de TOPO N. Carril 5, Candidato 4 de TOPO TA. Carril 6, Control (colonia azul) de TOPO TA. Carril 7, DNA restringido con *XhoI*.

Y al cortarse con esta enzima el plasmido queda lineal y aquel candidato que contiene el inserto presenta un mayor peso molecular, es por ello que se escogió el candidato 4 de TOPO TA. Se realizó el corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para determinar la presencia del inserto (Fig. 22)

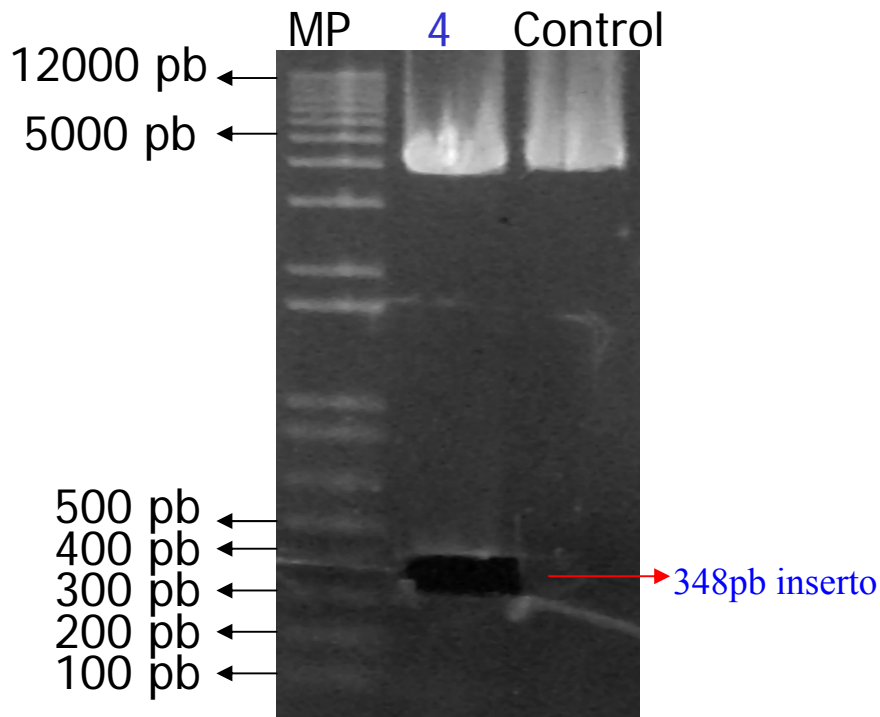


Figura 22. Restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* del candidato 4 de TOPO TA y su control. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Candidato 4 de TOPO TA. Carril 3, Control (colonia azul) de TOPO TA.

El cual se encontró entre 300y 400-pb, la banda obtenida se cortó y purifico para ser clonado en el vector pKQV4 y cortado posteriormente con *EcoRI* (Fig 23).

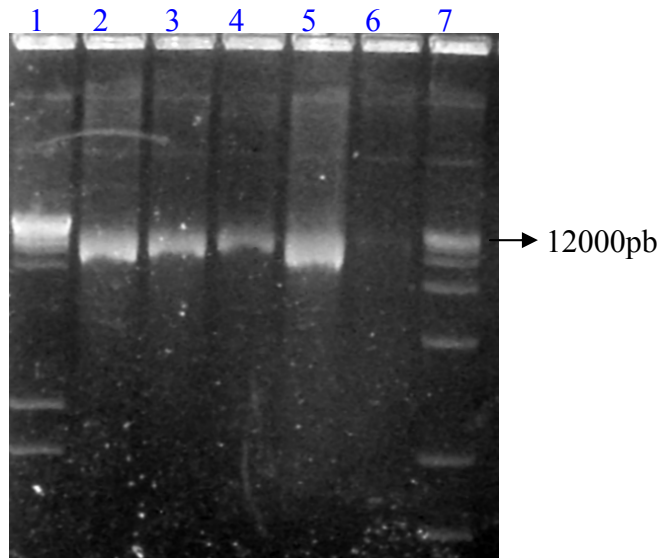


Figura 23. Clonación del fragmento de 348-pb en pKQV4 y restricción con *EcoRI*. Carril 1, λ HindIII. Carril 2-5, Candidatos. Carril 6, pKQV4. Carril 7, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen).

De la clonación se obtuvieron 4 candidatos de los cuales al cortarse con *EcoRI* el que demostró tener un mayor peso molecular fue el candidato 3. El cual se tomo y se realizo una amplificación por PCR del inserto (Fig 24).

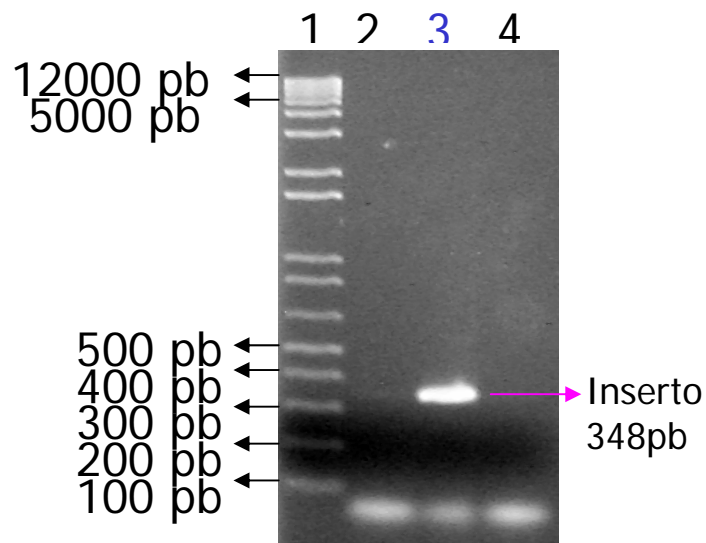


Figura 24. PCR del candidato 3 para determinar la presencia del inserto. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Vector (Control). Carril 3, Candidato 3. Carril 4, Oligos.

Obtenido el inserto en el candidato 3 para comprobar la construcción pFMM (plásmido Fago Metiltransferasa Mexican) se secuenció (ver anexo 6 y 7).

Para descartar que la expresión de la metilasa del fago no fuera toxica para la bacteria, las cepas dam^+ (GM271) y dam^- (GM2163) transformadas con p.m. fueron crecidas con y sin IPTG para determinar por medio del montaje de una curva si la proteína era tóxica (Fig. 25).

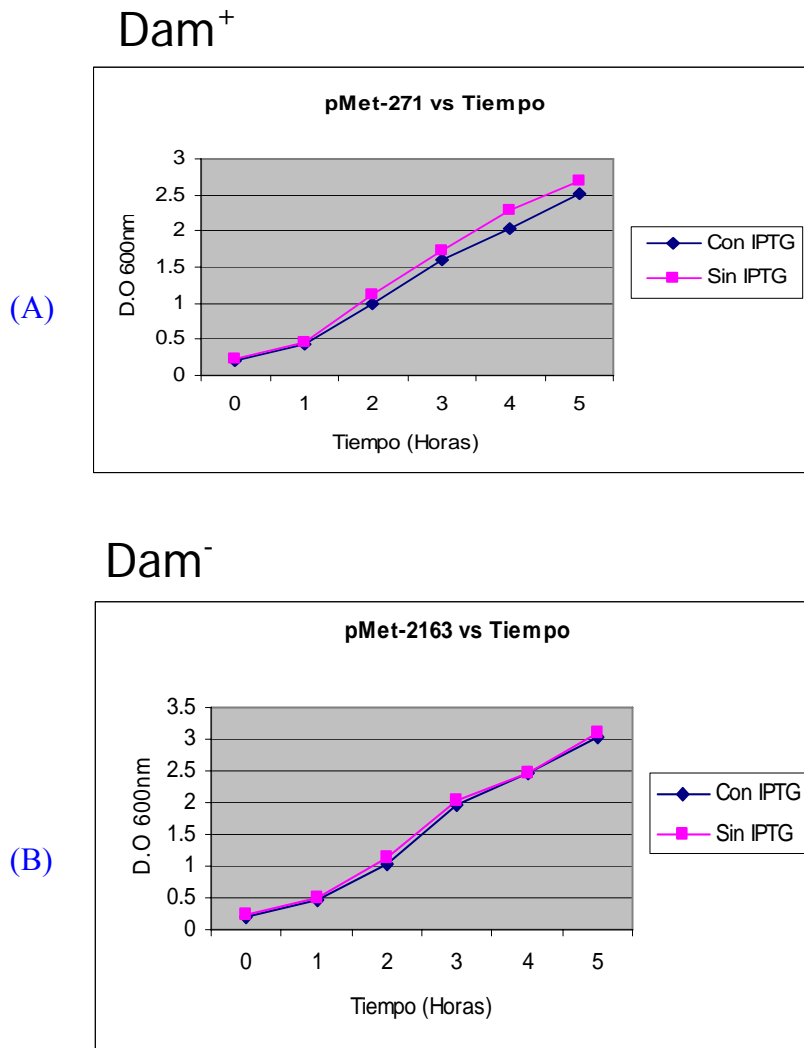


Figura 25. Curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* transformada con el plasmido pFMM e inducidas con IPTG. En Azul con IPTG y en Rosado sin IPTG. (A) p.m. en la cepa dam^+ (GM271). (B) p.m. en la cepa dam^- (GM2163).

Pero como indican las gráficas de la proteína en ambas cepas, con o sin inducción de la expresión de esta por IPTG desde la hora 0 hasta la hora 5 crece sin causar algún daño a la bacteria al menos en crecimiento. Infiriendo así que la proteína no es tóxica.

Luego se procedió a cortar tanto el vector como el inserto con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fig 26) para determinar si el inserto correspondía al tamaño del ORF5 que es de 348 pb. Se observo en el carril 2 un fragmento de 5700-pb del vector pKQV4 y en el carril 3 un fragmento de 348-pb, correspondiente al inserto cortado con *EcoRI* y *HindIII* (ORF5).

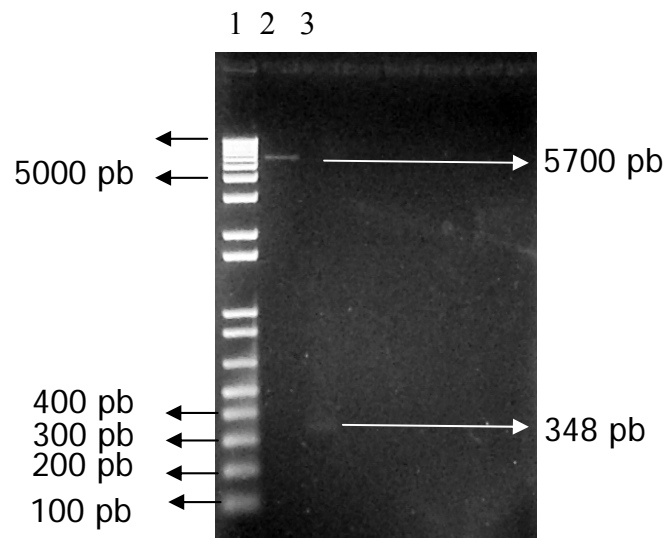


Figura 26. Electroforesis del corte con enzimas de restricción (*EcoRI* y *HindIII*) del vector pKQV4 y del inserto (348-pb) en gel de Agarosa al 1%. Carril1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril2, pKQV4. Carril3, inserto de 348-pb.

El inserto obtenido se ligó con el vector pKQV4, sin embargo la secuencia no fue del todo parecida a la ya determinada (secuencia del ORF5) y también la región Shine-Dalgarno (SD) no quedó a la distancia adecuada (ver anexo 6). Esto debido a que al realizar la doble digestión en el vector transitorio (TOPO TA) con las enzimas de restricción se generó un corte parcial del inserto que permitió que se arrastraran bases de más que no permiten una buena traducción del transcrito. Para obtener una mejor construcción se obtuvieron los fragmentos de novo y se religó el plásmido pKQV4 y el inserto proveniente del vector transitorio. De las clonas obtenidas se seleccionaron dos candidatos, para ser secuenciados de acuerdo a la metodología ya descrita. Una de las clonas mostró una secuencia igual a la ya determinada para el ORF5 y una distancia adecuada a la región SD (ver anexo 8).

Desafortunadamente la actividad de esta nueva construcción no pudo ser determinada.

6.5 Comparación de los diferentes patrones de restricción con dos enzimas que reconozcan regiones GATC metiladas y sin metilar.

Con el objeto de establecer el patron de restricción del fago lambda obtenido de cepas dam- y dam+ transformadas con la posible metilasa del fago, estas fueron transformadas con el pFMM para luego infectar con lambda y analizar por patrones de restricción la modificación con enzimas cuyo corte dependa de que el DNA este metilado (*DpnI*) o no este metilado (*MboI*) del DNA (Fig. 27)

Construcciones:

- 1 pKQV4-dam-
- 2 pFMM-dam-
- 3 pEM-067-dam-
- 4 pKQV4-dam+
- 5 pFMM-dam+
- 6 pEM-067-dam+

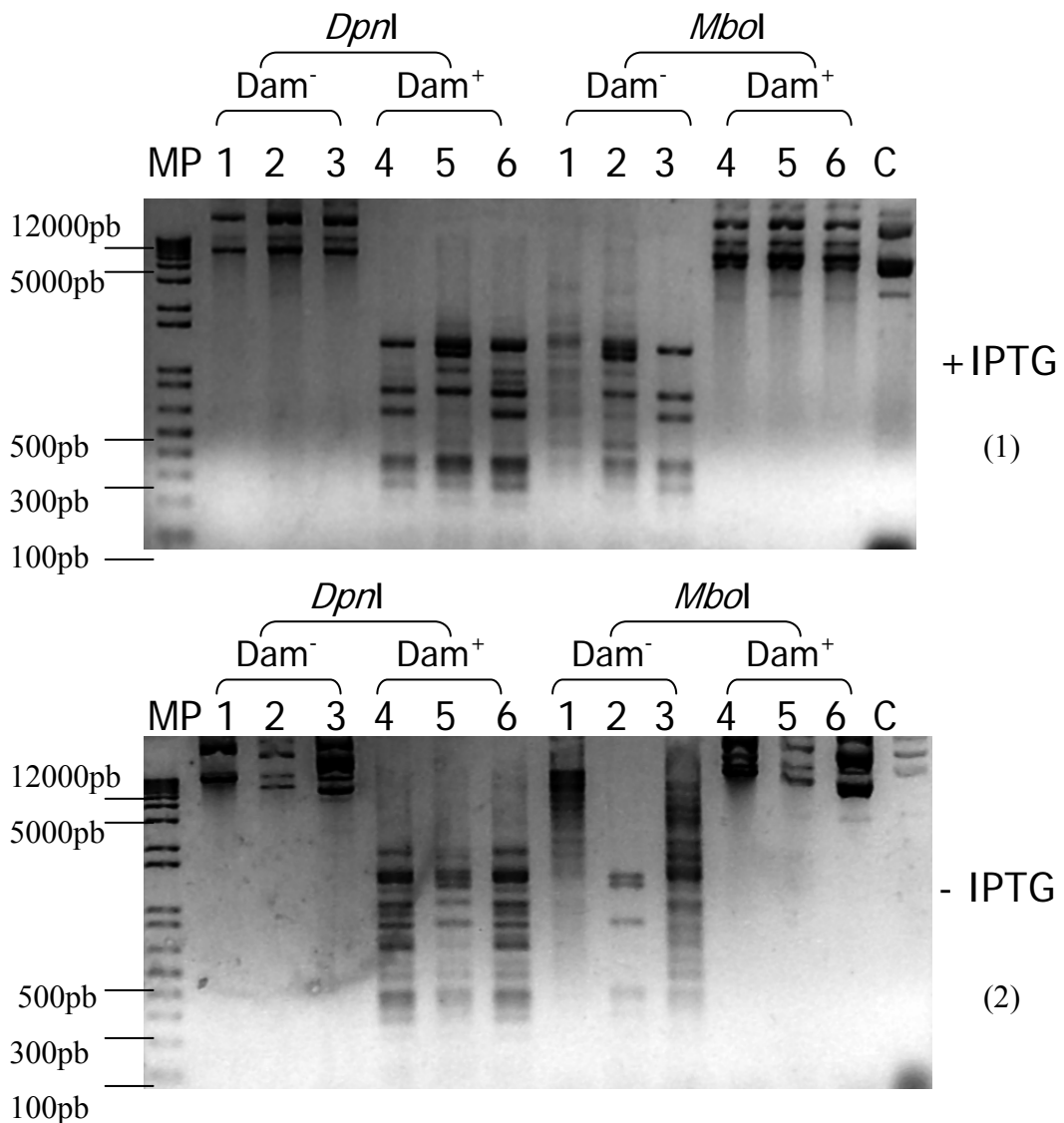


Fig. 27. Corte del DNA plasmídico con las enzimas de restricción *DpnI* y *MboI*. 1Gel: con IPTG, cortados con *DpnI*. Carril 1, MPM 100 pb plus (Invitrogen). Carril 2, pKQV4-dam⁻. Carril 3, pFMM-dam⁻. Carril 4, pEM-067-dam⁻. Carril 5, pKQV4-dam⁺. Carril 6, pFMM-dam⁺. Carril 7, pEM-067-dam⁺. Carril 8, Control (DNA plasmídico pFMM sin enzima). Cortados con *MboI* Carril 1, MPM 100 pb plus (Invitrogen). Carril 2, pKQV4-dam⁻. Carril 3, pFMM-dam⁻. Carril 4, pEM-067-dam⁻. Carril 5, pKQV4-dam⁺. Carril 6, pFMM-dam⁺. Carril 7, pEM-067-dam⁺. Carril 8, control (DNA plasmídico pFMM sin enzima y sin IPTG) En el gel 2 se muestran las mismas construcciones pero sin IPTG.

Para ver la expresión del gen y consecuentemente la función de la metiltransferasa se probaron las bacterias que contienen los plásmidos pFMM y pEM-067(plasmido que contiene los 5 marcos de lectura incluyendo al ORF 5, Martínez-Peñafiel et al., 2005) fueron cultivadas con y sin IPTG con todos los controles correspondientes. Posteriormente el DNA del fago fue extraído de estas

bacterias para someterlo a restricción con las enzimas cuya restricción depende de metilación o depende de ausencia de metilación. De esta manera se utilizó la enzima de restricción *DpnI* la cual corta el DNA metilado (Calmann et al., 2003). Sin embargo los resultados muestran que en las cepas *dam*⁻ que contenían la posible metilada la enzima *DpnI* no restringió al DNA de lambda lo que indicaría que el gen de la metiltransferasa tanto en la construcción de pFMM como en la pEM-O67 no es funcional (carril 3 y 4). La actividad enzimática fue verificada mediante la exitosa restricción observada en el DNA de fago proveniente de las cepas *dam*⁺ las cuales si se cortan porque la cepa tiene la metiltransferasa cromosomal.

La confirmación de que el DNA no se metilo, se muestra con la enzima *MboI* ya que corta el DNA no metilado y por tanto en las cepas *dam*⁻ si lo cortó mostrando claramente que el DNA no se encuentra metilado y en las cepas *dam*⁺ el DNA proveniente del fago no fue restringido debido al gen cromosomal anteriormente mencionado. En el control sin IPTG se observo lo mismo ya que no hay expresión de la metilasa del fago.

Para corroborar este resultado se realizo un gel de proteínas en las mismas condiciones con y sin IPTG (Fig. 28).

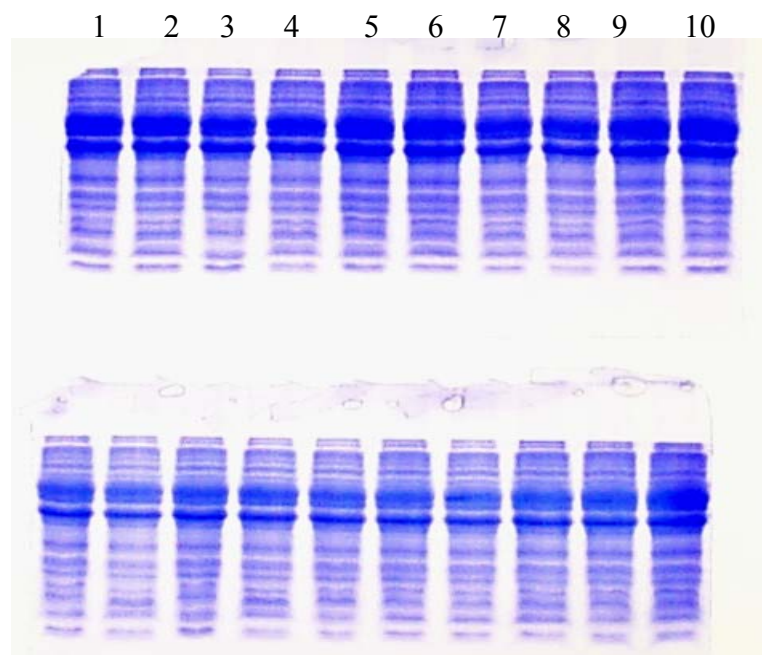


Fig 28. Gel de proteínas. Carril 1, 3, 5, y 9, sin IPTG. Carril 2, 4, 6, 8 y 10 con IPTG

El cual mostro que con y sin inductor no hay producto de traducción que correspondan al tamaño de la metilasa, por lo que se infiere que las bases de mas agregadas al inserto por el corte parcial de este influyeron para que no hubiera una eficiente traducción del producto. Otro ensayo realizado fue el transcripción-traducción *in vitro* en donde tampoco se pudo observar la proteína esperada de 12.1KDa (Fig 29). Es por esto que, aún no se puede determinar si el gen de la metiltransferasa es funcional.

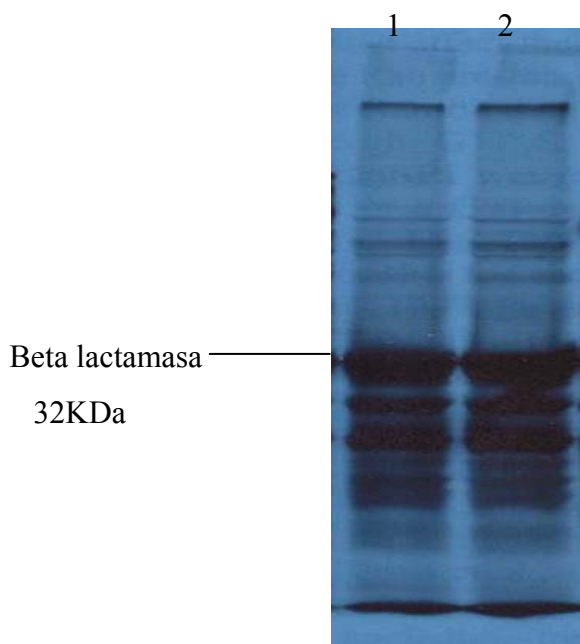


Fig 29. Transcripción-traducción *in vitro*. Carril 1, vector (pKQV4). Carril 2, vector-inserto.

Aunque tradicionalmente las enzimas de restricción se han utilizado para clonación de genes, en años recientes muchos de estos mismos genes de restricción han sido clonados. Algunos de estos genes solo son clonados con fines comerciales, sin embargo otros están siendo estudiados por los efectos que tienen en otros procesos de importancia en la fisiología y patogenicidad de varios organismos (Wilson, 1991; Wion, et al, 2006).

La modificación de DNA más común es la metilación, la formación de C5- metil citocina (m5C) y N6- metil adenina (m6A) es muy común en los genomas de

hongos, bacterias y protistas, mientras que la producción de N4- metil citocina (m4C) solo es encontrada en bacterias. La modificación de bases en los genomas bacterianos es llevada a cabo por dos metiltransferasas: aquellas asociadas a sistemas de restricción modificación y metiltransferasas solas que no contienen una contraparte de restricción.

Diversos grupos de proteobacterias usan la m6A como parte de defensa del genoma, en su replicación, reparación, segregación nuclear, regulación de la expresión de algunos genes, control de la transposición e interacciones patógeno-hospedero.

De estos dos sistemas, el sistema R-M es el más estudiado, fue descubierto como consecuencia de los experimentos hechos en 1950 con bacteriófagos, cuando observaron las variaciones en las cantidades liberadas de fagos. La explicación molecular a este fenómeno llegó años más tarde, cuando se demostró que los fagos no concluían su desarrollo debido a que el DNA no metilado, era degradado por endonucleasas, mientras que el DNA bacteriano era protegido por un patrón de metilación.

Para este sistema se han descrito por lo menos tres grupos importantes de metiltransferasas que incluyen a aquellas metiltransferasas que se encargan de formar a m6A, m5C y m4C. Se piensa que la función principal de estos sistemas es la protección del DNA bacteriano contra los diferentes elementos de transferencia, como los bacteriófagos.

Por otro lado las metiltransferasas menos estudiadas son las que están involucradas con diferentes señales y que tienen una importancia fisiológica. Este tipo de proteínas no forman parte de un sistema y trabajan en "solitario". Dentro de las más interesantes se encuentran aquellas que se encargan de producir m6A, ya que al parecer estas se encargan de reducir la mutabilidad del DNA, esto debido a que ésta no se desamina con tanta frecuencia como m5C que es llevada a timina. Son importantes también porque están involucradas en el control de la

expresión de factores de virulencia, lo que implica su posible aplicación como antimicrobianos o inhibidores.

Se sabe que varios bacteriófagos contiene en su genoma a la metiltransferasa Dam (m6A), tal es el caso de el fago T4 que contiene una proteína que presenta varias regiones conservadas. Las regiones conservadas que comparte con la Dam de *E. coli*, son la región I, II, III y IV, con una identidad del 45 al 64%. Aunque esto sugiere un ancestro común, los cambios que esta presenta no han sido suficientes para modificar su acción (Hattman, et al, 1985). Otro ejemplo es la codificada en el fago T1, que comparte las regiones II, III y IV con el fago T4 (Schieider-Scherzer, et al, 1990).

En nuestro análisis bioinformático observamos que la posible metiltransferasa proveniente del bacteriófago mEp021, presenta una similitud significativa con las metiltransferasas de fagos relacionados con cepas patógenas de *E. coli* como es el caso de la cepa 933, 933W y Shiga, entre otras. Otra de las similitudes importantes esta dada con la proteína Dam del fago T1, que presenta un valor de $E=7e-05$. Estudios relacionados con esta proteína la relacionan con la producción de m6A en los diferentes DNA, contra los que se ha probado (Schieider-Scherzer, et al. 1990; Aure, et al. 1984). Lo que relaciona la posible función de la proteína proveniente del fago mEp021 con la producción de m6A. El análisis de la Dam del fago mEp021 nos permitió determinar por lo menos 6 de los 8 dominios que podrían ser suficientes para conservar esta función, ya que de acuerdo a lo publicado para las provenientes de los fagos T4 y T1, no es necesaria una identidad fuerte de todos los dominios para su función.

De no encontrar una actividad de metiltransferasa para esta proteína se podría pensar que en algún momento el fago obtuvo este gene del su hospedero (*E. coli*) y que en las posteriores replicaciones se perdió función. El hecho de que se asemeje más a las proteínas Dam de fagos provenientes de cepas patógenas es interesante, ya que el fago fue aislado de materia fecal humana. Esto nos llevaría a pensar que en algún momento tomó este gen de cepas potencialmente patógenas.

7. CONCLUSIONES

- El ORF 5 del fago mEp021 presenta una similitud significativa con otros marcos de fagos relacionados con cepas patógenas.
- El ORF5 presenta por lo menos 6 de las 8 regiones importantes para las metiltransferasas con las que presenta identidad.
- El ORF contiene el sitio catalítico idéntico NPYY
- El análisis bioinformático la ubica dentro de las metiltransferasas productoras de m⁶A.
- La construcción obtenida en pKQV4, no se encuentra en fase, lo que no permite la producción de una proteína.
- De no determinar la función de la metiltransferasa, es probable que las regiones ausentes sean importantes en su función o que se trate de un gen que obtuvo de su hospedero y que con el proceso evolutivo la función se haya perdido.

8. PERSPECTIVAS

- Obtener un mayor número de clonas, para asegurar que puedan expresar la metilasa.
- De ser necesario, expresar esta proteína en un vector de baja copia para asegurar la expresión.
- Determinar la presencia de esta secuencia de DNA en los fagos del grupo no lambdoide, para determinar que porcentaje de este grupo contiene este fragmento.
- Secuenciar los productos amplificados para determinar una posible relación evolutiva.
- Delimitar y clonar los marcos de lectura abiertos de los fagos que presenten este fragmento.
- Determinar si tienen o no una función de metiltransferasa.

9. REFERENCIAS

1. Abeles Ann, Brendlere Therese and Austin Stuart. 1993. Evidence for Two Levels of Control of P1 *oriR* and Host *oriC* Replication Origins by DNA Adenine Methylation. *Journal of Bacteriology*. Vol 175. pp 7801-7807.
2. Auer Bernhard and Schweiger Manfred. 1984. Evidence that *Escherichia coli* Virus TI Induces a DNA Methyltransferase. *Journal of Virology*. Vol 49. pp 588-590.
3. Bachmann B. J. 1972. Pedigree of some mutant strains of *Escherichia coli*. *Bacteriological review*. Vol 36. pp 525-537.
4. Backman Keith. 1980. A cautionary note on the use of certain restriction endonucleases with methylated substrates. *Gene*. Vol 11. pp 169-171.
5. Bakker Andreas and Smith W. Douglas. 1989. Methylation of GATC Sites Is Required for Precise Timing between Rounds of DNA Replication in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol 171. pp 5738-5742.
6. Barbeyron Tristan, Kean Katherine and Forterre Patrick. 1984. DNA Adenine Methylation of GATC Sequences Appeared Recently in the *Escherichia coli* Lineage. *Journal of Bacteriology*. Vol 160. pp 586-590.
7. Bergerat Agnes, Kriebardis Anastasios, and Guschlbauer Wilhelm. 1989. Preferential Site-specific Hemimethylation of GATC Sites in pBR322 DNA by Dam Methyltransferase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 264. pp. 4064-4070.
8. Boye Erik, Marinus M, and Lobner-Olesen Anders. 1992. Quantitation of Dam Methyltransferase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174. pp 1682-1685.
9. Bujnicki Janusz, Radlinska Monika, Zaleski Piotr and Piekarowicz Andrzej. 2001. Cloning of the *Haemophilus influenzae* Dam methyltransferase and analysis of its relationship of the Dam methyltransferase encoded by the HP1 phage. *Acta Biochimica Polonica*. Vol 48. pp 969-983.
10. Burgess-Cassler Anthony and Ordal George W. 1982. Functional Homology of *Bacillus subtilis* Methyltransferase II and *Escherichia coli* *cheR* Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 257. pp 12835-12838.
11. Calmann Melissa, and Marinus M. G. 2003. Regulated Expression of the *Escherichia coli* *dam* Gene. *Journal of Bacteriology*. Vol 185. pp 5012-5014.

12. Camacho M. Eva, Serna Ana, Madrid Cristina, Marques Silvia, Fernández Raúl, De la Cruz Fernando, Juárez Antonio y Casadesús Joseph. 2005. Journal of Bacteriology. Vol 187. pp 5691-5699.
13. Citron Martin, Velleman Mathias, and Schuster Heinz. 1989. Three Additional Operators, Op210, p68, and Op88, of Bacteriophage P1. The Journal of Biological Chemistry. Vol 264. 3611-3617.
14. Dila D, Sutherland E, Moran L, Slatko B and Raleigh E. A. 1990. Genetic and sequence organization of the *mcrBC* locus of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology. Vol 172. pp 4888-4900.
15. Falker Stefan, Schmidt Alexander and Heusipp Gerhard. 2005. DNA methylation in *Yersinia enterocolitica*: role of the DNA adenine methyltransferase in mismatch repair and regulation of virulence factors. Microbiology. Vol 151. pp 2291-2299.
16. García Del Portillo Francisco, Pucciarelli M. Graciela and Casadesús Joseph. 1999. DNA adenine methylase mutant of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci. Vol 96. pp 11578-11583.
17. Geoffrey Wilson. 1991. Organization of restriction-modification systems. Nucleic Acids Research. Vol 19. pp 2539-2566.
18. Hale W. B, Van der Woude M. W, Braaten B. A y Low D. A. 1998. Regulation of Uropathogenic *Escherichia coli* Adhesin Expression by DNA Methylation. Molecular Genetics and Metabolism. Vol 65. pp 191-196.
19. Hanaha D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology. Vol 166. pp 557-580.
20. Hattman Stanley, Wilkinson Jennifer, Swinton David, Schlagman Samuel, Macdonald Paul, and Mosig2 Gisela. 1985. Common Evolutionary Origin of the Phage T4 *dam* and Host *Escherichia coli* *dam* DNA-Adenine Methyltransferase Genes. Journal of Bacteriology. Vol 164. pp 932-937.
21. Hattman Stanley. 1982. DNA methyltransferase-dependent transcription of the phage Mu *mom* gene. Proceeding of the National Academy of Sciences. Vol 79. pp 5518-5521.
22. Heithoff M. Douglas, Sinsheimer L. Robert, Low A. David and Mahan J. Michael. 1999. An Essential Role for DNA Adenine Methylation in Bacterial Virulence. Science. Vol 284. pp 967-970.

23. Herman Gail and Modrich Paul. 1981. *Escherichia coli* K-12 Clones That Overproduce *dam* Methylase Are Hypermutable. *Journal of Bacteriology*. Vol 145. pp 644-646.
24. Humbelin Markus, Suri Bruno, Rao Desirazu, Hornby David, Eberle Helen, Pripfl Theres, Kenel Susanne and Bickle Thomas. 1988. Type III DNA restriction and modification systems *EcoP1* and *EcoP15*. *Journal Molecular Biology*. Vol 200. pp 23-29.
25. Kameyama Luis, Fernández Leonor, Calderón Jesús, Ortiz-Rojas Adriana and Patterson Thomas. 1999. Characterization of wild Lambdoid Bacteriophages: Detection of a Wide Distribution of Phage Inminity Groups and Identification of a Nus-Dependent, Nonlambdoid Phage Group. *Virology*. Vol 263. pp 100-111.
26. Karma J.D, Drake J. W, Kreuzer K. N, Mosing M, Hall D. H, Eiserling F.A. Black L.W, Spicer E.K, Kutter E, Carlson K, Miller E.S. 1994. *Molecular Biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology. USA pp 491-519.
27. Kossykh Valeri, Schlagman Samuel, and Hattman Stanley. 1995. Phage T4 DNA [*N*⁶-adenine] Methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 270. pp 14389-14393.
28. Lauster Roland, Kriebardis Anastasios and Guschlbauer. 1987. The GATATC-modification enzyme *EcoRV* is closely related to the GATC-recognizing methyltransferases *DpnII* y *dam* from *E.coli* and phage T4. *FEBS*. Vol 220. pp 167-176.
29. Lewin Roger, Lewin Benjamin. 2003. *Genes VIII*, 8 Ed. Prentice Hall, Canada, U.S, Germany. pp 447,604.
30. Løbner-Oleson A, Boye E and Marinus M.G. 1992. Expression of the *Escherichia coli dam* gene. *Molecular Microbiology*. Vol 6. 1841-1851.
31. López Georgina. 1997. Metilación diferencial del DNA durante el desarrollo de hongos dimorficos. Doctora. Centro de Estudios de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética Irapuato, México.
32. Martínez-Peñafiel Eva. 2003. Caracterización molecular de la región de DNA del bacteriófago mEp021, relacionado con la expresión de la hemolisina *SheA* de *Escherichia coli* K-12. Maestro en ciencias químicas biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Escuela de Ciencias Biológicas. México D.F.
33. Mashhoon Neda, Carroll Michael, Pruss Cynthia, Eberhard Joerg, Ishikawa Sawako, Estabrook R. August, and Reich Norbert. 2004.

- Functional Characterization of *Escherichia coli* DNA Adenine Methyltransferase, a Novel Target for Antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279. pp. 52075–52081.
34. Miner Zoe and Hattman Stanley. 1988. Molecular Cloning, Sequencing, and Mapping of the Bacteriophage T2 *dam* Gene. *Journal of Bacteriology*. Vol 170. pp 5177-5184.
 35. Ogden G. B and Schaechter M. 1988. The replicative origin of the *Escherichia coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell*. Vol 54. pp 127-135.
 36. Palmer B,R and Marinus M, G. 1994. The *dam* and *dcm* Strains of *Escherichia coli*-a review. *Gene*. Vol 143. pp 1-12.
 37. Plumbridge Jacqueline. 1987. The role of *dam* methylation in controlling gene expression. *Biochimie*. Vol 69. pp 439-443.
 38. Rebeck G. William, Coons Susan, Carroll Patrick, and Samson Leona. 1988. A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. Vol85. pp 3039-3043.
 39. Reisenauer Ann, Sue kahng Lyn, Mccollum Susan, and Shapiro Lucy. 1999. Bacterial DNA Methylation: a Cell Cycle Regulator?. *Journal of Bacteriology*. Vol 181. pp 5135-5139.
 40. Rinquist S and Smith C. L. 1992. The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. Vol 89. 4539-4543.
 41. Robbins-Manke Jennifer, Zdraveski Zoran, Marinus Martin, and Essigmann John M. 2005. Analysis of Global Gene Expression and Double-Strand-Break Formation in DNA Adenine Methyltransferase- and Mismatch Repair-Deficient *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol 187. pp 7027-7037.
 42. Sambrook J. Maniatis T, Fritsch E. F. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory*. Cold Spring Harbor N.Y.
 43. Scavetta Robert, Thomas Chad, Walsh Martin, Szegedi Sandra, Joachimiak Andrzej, Gumpert Richard and Churchill Mair. 2000. Structure of *RsrI* methyltransferase, a member of the *N6*-adenine β class of DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research*. Vol 28. pp3950-3961
 44. Scherzer Elisabeth, Auer Bernhard, and Schweiger Manfred. 1987. Identification, Purification, and Characterization of *Escherichia coli* Virus T 1 DNA Methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 262. pp 15225-15231

45. Schlagman Samuel, Hattman Stanley, and Marinus G. 1986. Direct Role of the *Escherichia coli* Dam DNA Methyltransferase in Methylation-Directed Mismatch Repair. *Journal of Bacteriology*. Vol 165. pp 896-900.
46. Schneider-Scherzer Elisabeth, Auer Bernhard, Groot Egon and Schweiger Manfred. 1990. Primary Structure of a DNA (*N*⁶-adenine)-methyltransferase from *Escherichia coli* Virus T1. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 265. pp 6086-6091.
47. Sohail A, Lieb M, Dar M and Bhagwat A.S. 1990. A gene required for very short patch repair in *Escherichia coli* is adjacent to the DNA cytosine methylase gene. *Journal of Bacteriology*. Vol 172. pp 4214-4221.
48. Stephens Craig, Reisenauer Ann, Wright Rachel, and Shapiro Lucy 1996. A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. Vol 93. pp 1210-1214.
49. Strauch M. A, Spiegelman G. M, Perego W.C. Johnson, Burbulys D and Hoch J. A. 1989. The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *EMBO Journal*. Vol 8. pp 1615-1621.
50. Sun Weiyong and Hattman Stanley. 1996. *Escherichia coli* OxyR protein represses the unmethylated bacteriophage Mu *mom* operon without blocking binding of the transcriptional activator C. *Nucleic Acids Research*. Vol 24. pp 4042-4049.
51. Taylor L. Victoria, Titball W. Richard and Oyston F. C. Petra. 2005. Oral immunization with a *dam* mutant of *Yersinia pseudotuberculosis* protects against plague. *Microbiology*. Vol 151. pp 199-1926.
52. Wahnou D.C, Shier Vincent and Benkovic Stephen 2001. Mechanism-Based Inhibition of an Essential Bacterial Adenine DNA Methyltransferase: Rationally Designed Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*. Vol 123. pp 976-977.
53. Wang M. X and Church G. J. 1992. A whole genome approach to in vivo DNA-protein interaction in *E.coli*. *Nature*. Vol 360. pp 606-610.
54. Wion Didier and Casades Josep. 2006. N⁶-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Publishing Group*. Vol 4. pp 183-192.
55. Wilson G. Geoffrey. 1991. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*. Vol 19. pp 2539-2566.

56. Wright Rachel, Stephens Craig and Shapiro Lucy. 1997. The CcrM DNA Methyltransferase Is Widespread in the Alpha Subdivision of Proteobacteria, and Its Essential Functions Are Conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 179. pp. 5869–5877.
57. Yang Zhe, Horton John, Zhang Xu Jia, Dong Aiping, Zhang Xing, Schlagman Samuel, Kossykh Valeri. 2003. Structure of the bacteriophage T4 DNA adenine methyltransferase. *Nature Structural Biology*. Vol 10. pp 849-855.
58. Zaleski Piotr, Wojciechowski Marek and Piekarowicz Andrzej. 2005. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology*. Vol 151. pp 3361-3369.
59. Zinoviev Victor, Evdokimov Alexey, Malygin Ernst, Schlagman Samuel, and Hattman Stanley. 2002. Bacteriophage T4 Dam DNA-(N⁶-adenine)-methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278. pp 7829-7833.

ANEXOS

ANEXO 1 Determinación del punto isoeléctrico.



Protéine : M.M., pI, composition, titrage

Longueur de la séquence : **108** amino acides

Masse moléculaire : **12108,74**

Coefficient d'extinction molaire à 280 nm (1cm) : **23470**

- en prenant en compte toutes les cystéines : **23590**

Absorption 0,1% (1g/l) à 280 nm (1cm) : **1,938**

- en prenant en compte toutes les cystéines : **1,948**

Point isoélectrique théorique :

- classique : **5,03**

- en prenant en compte toutes les cystéines : **5,03**

Index aliphatique : **76,85**

MDREFEFVAD VAANKENALV PRYITEEMDT LHYPWGAVAM PGEYVWLNPP
YSKPGPFVEK AALEHQRNHI GCVMLLPADI LVSWFMNGVD TANECHYHAP
AGGLHAAR

ANEXO 2 Determinación de la masa molecular y comprobación del punto isoelectrico

EXPASy: get pI/Mw - Mozilla (Build ID: 2004052009)

Back Forward Reload Stop

Home Bookmarks

http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool

EXPASy Home page Site Map Search EXPASy Contact us Proteomics tools Swiss-Prot

Search Swiss-Prot/TEMBL for Go Clear

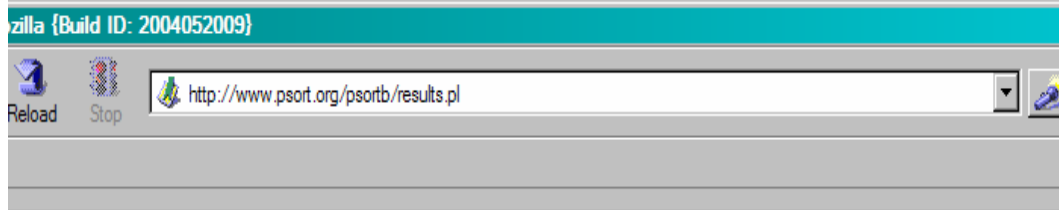
Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

10 20 30 40 50 60
MDREFFVAD VAANKENALV PRYTEEMDI IHYFGAVAM PGEYVWLNPP YSKRGPFTVK
70 80 90 100
AALEHQRNHI GCVMLLPADI IYSWFANGVD TANECHYHAP AGGILHAAR

Theoretical pI/Mw: 5.17 / 12108.77

ANEXO 3 Determinación de la ubicación de la proteína.



[Submit Sequences](#) | [Documentation](#) | [Resources](#) | [Contact](#) | [Updates](#)

PSORTb Results ([Click here for an explanation of the output formats](#))

SeqID: ORF5.

Analysis Report:

CMSVM-	Unknown	[No details]
CytoSVM-	Cytoplasmic	[No details]
ECSVM-	Unknown	[No details]
HMMTOP-	Unknown	[No internal helices found]
Motif-	Unknown	[No motifs found]
CMFMotif-	Unknown	[No motifs found]
CMSVM-	Unknown	[No details]
PPSVM-	Unknown	[No details]
Profile-	Unknown	[No matches to profiles found]
SCL-BLAST-	Unknown	[No matches against database]
SCL-BLASTe-	Unknown	[No matches against database]
Signal-	Unknown	[No signal peptide detected]

Localization Scores:

Cytoplasmic	8.96
CytoplasmicMembrane	0.51
Periplasmic	0.26
OuterMembrane	0.01
Extracellular	0.26

Final Prediction:

Cytoplasmic	8.96
-------------	------

ANEXO 4

Determinación de la familia a la que pertenece la proteína del ORF5.

Interactive 3D-JIGSAW [legend](#) [home](#) [disclaimer](#) [contact us](#)

10 20 30 40 50
MDREFVADVAANKENALVPPYITEERDTLHYFPGAVANPGEYVGLNPPYSKPPF
CCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHCCCCCHNCCCCCEEEEECCCCCCCCHH

Pfamily:
(pf05869.1)
DNA N-6-adenine-methyltransferase (Dam)
identity 38%
e-value 9e-36,
[more info](#)

Pfamily hit:
[Q4A1M4_9VIRU/2-17](#)

No good structural templates in PDB

truncated alignments? PDB code (1eco) chain (-) first residue (-)
wrong templates?

ANEXO 5 Análisis de la estructura secundaria de la proteína pFMM

r/cgi-bin/secpred_hnn.pl

Hierarchical Neural Network result for : UNK_76580

[Abstract](#) Guerneur, Y. PhD Thesis

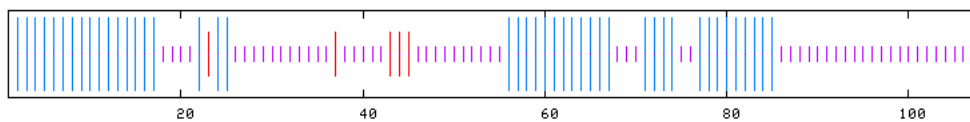
View HNN in: [\[MPSA \(Mac, UNIX\) , About...\]](#) [\[AnTheProt \(PC\) , Download...\]](#) [\[HELP\]](#)

```
          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
MDREFEEFVADVAANKENALVPRYITEEMDTLHYPWGAVAMPGEYVWLNPPYSKPGPFVEKAALAHQRNHI
cchhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccchehhccccccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhcc
GCVMLLPADILVSWFMNGVDTANECHYHAPAGGLHAAR
chhhhccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
```

Sequence length : 108

HNN :

Alpha helix	(Hh)	:	44	is	40.74%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	5	is	4.63%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	59	is	54.63%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%



ANEXO 6 Secuencia con el oligo Met-Rev del candidato 3 clonado en pKQV4

Data Collection
 File: ORF5METILASASample5
 Sample: ORF5METILASA rev
 Inj. Number: 5
 Number of Points: 10200
 Length: 627
 Start Run: 10/19/2006, 22:16
 Stop Run: 10/20/2006, 01:02
 Start Collection: 10/19/2006, 23:02
 Stop Collection: 10/20/2006, 01:02
 Dyeset/Primer: DT310POP6{BDv3}v1.mob
 Medium Lot #:
 Medium Exp Date:
 Instrument Name: ABI PRISM™ 310
 Collect Vers.: ABI PRISM 310 Collection 1.2.2

Data Analysis
 Base Call Start: 1769
 Base Call End: 10200
 Peak 1 Location: 1769
 Ave. Signal Intensity: G (296), A (351), T (338), C (401)
 Matrix Name: Matrix_17/05/05
 Basecaller: ABI-CE1
 Basecaller Version: Version 3.2
 Base Spacing Used: 13.30
 Base Spacing Calculated: 13.30
 Length to Detector: 30
 Tube Position: A7
 Module File Name: Seq POP6 (1 mL) E

```

1  NNGCGGGCCC GTGNTATCGG TTCGTTGCGT ACCCGCCGTT CATAACEAGC TAACAGAATG 60
61  TCAGCGGGCA ACAGCATTAC ACAGCCAATG TGATTTGCGT GATGTTCTAA TGCCGCCTTC 120
121 TCAACGAATG GCCCCGGTTT AGAATATGGC GGATTAAGCC AGACATACTC ACCAGGCATT 180
181 GCCACAGCTC CCCACGGATA ATGCAACGTG TCCATTTCTT CCGTTATATA CCGAGGAAC 240
241 TAGCGCATT TCTTGTTTG CCGCCACGTC AGCGACAAAT TCAAATTCGC GGTCCATGNA 300
301 ATTCTGTTT CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACATTAT ACGAGCCGAT 360
361 GATTAATTGT CAACAGCTCA TTTCAGAATA TTTGCCAGAA CCGTTATGAT GTCGGCGCCA 420
421 AAAAACATTA TCCAGAACGG GGAGTGCGCC TTGGAGCGAA CACCGAAATT ATGCAGTGG 480
481 TTTACGACCT GCACAGCCAT ACCACAGCTT CCGATGGCTG CCTGACGCCA GAAGCATTGG 540
541 GTGGCACCGT GCAATCCGAA TAAGCCCGGG ATCCTCTTAC GCCGGMACGC ATCGTGGGCC 600
601 CGGCANTCAC CCGGGCGNCC ACANGGT 660
  
```

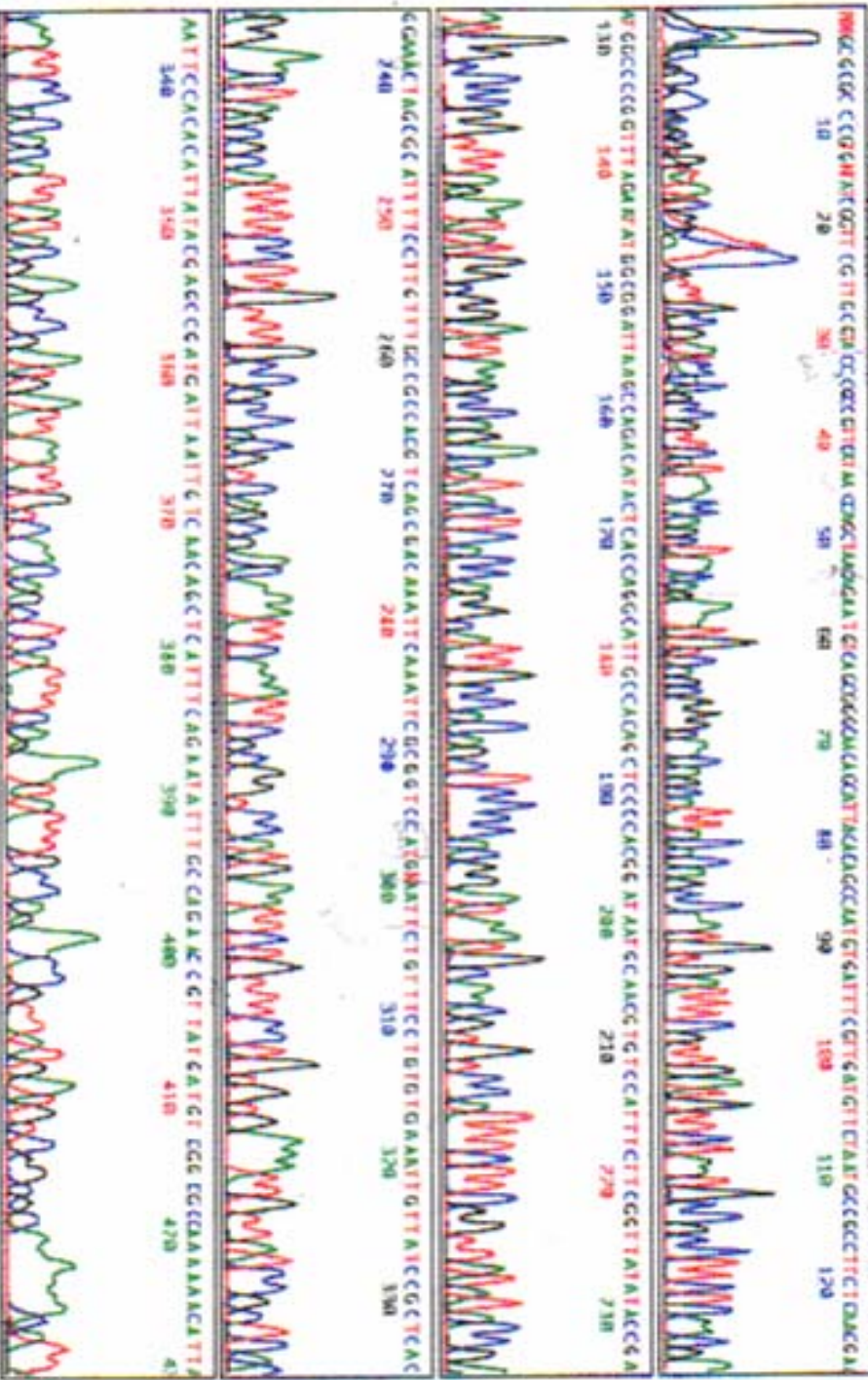



Model 310
Version 3.1
N11421
Version 0.2

ORGANITILUASampur
ORGANITILUAS
Lane 5

Signal 0.2000 A351 T.000 C.401
D:\3000\ORGANITILUAS
Master_17053005
Pulse 1795 to 18000 Pk 1 Loc 1799

Page 1 of 2
Thu, Oct 20, 2000 10:07 AM
Thu, Oct 19, 2000 10:18 PM
Sequence: 132019202



ANEXO 7 Secuencia con el oligo Met-Fwd del candidato 3 clonado en pKQV4

```

Data Collection
File:                orf 5metilasaSample12
Sample:              orf 5metilasa
Inj. Number:        12
Number of Points:   10200
Length:              821
Start Run            10/28/2006, 17:12
Stop Run             10/28/2006, 19:57
Start Collection     10/28/2006, 17:57
Stop Collection      10/28/2006, 19:57
Dyeset/Primer:      DT310POP6{BDw3}v1.mob
Medium Lot #:
Medium Exp Date:
Instrument Name:     ABI PRISM™ 310
Collect Vers.:      ABI PRISM 310 Collection 1.2.2
    
```

```

Data Analysis
Base Call Start:    300
Base Call End:      10200
Peak 1 Location:    300
Ave. Signal Intensity: G (955), A (866), T (809), C (755)
Matrix Name:        Matrix_17/05/05
Basecaller:         ABI-CE1
Basecaller Version: Version 3.2
Base Spacing Used:  12.49
Base Spacing Calculated: 12.49
Length to Detector: 30
Tube Position:      B10
Module File Name:   Seq POP6 (1 mL) E
    
```

```

1  CGNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 60
61  NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNATAA GCCTGCATGG 120
121 CGGCAAACAN GCCAATGCGC TAGTTCCTCG GTATATNACC GAANNAANGG ACACGTTGCA 180
181 TTATCCGTGG GGAGCTGTGG CAAATGCCTG GTGAGTATGT CTGGCTTAAT CCGCCATATT 240
241 CTAACCCGGG GCCATTCGTT GAAGAAGGCG GCATTAGAAA CATCAACGAA AATCACATTG 300
301 GCTGTGTAAT GCTGTTGCCC GCTGACATTT CTGTTAGCTG GTTTATGAAA CGGCGTGGAA 360
361 TACGGCAAAC GAATGCCGAT TAATCACGCG CGGGCGGCTG GCGTTTACAT GCTGCAEGGT 420
421 AAGCTTGGCT GTTTTGGCGG ATGAAGAGAA GATTTTCAGC CTGATACAGA TTAATCCAG 480
481 AACGCAAGAA GCGGTCCTGA TAAAACAGAA ATTTGCCTGG GCGGCCAAGT AGCGCGGGTG 540
541 GGTCCCACCT GGAACCCCAT GCCGAAACTC AGAAA GTGGA AAACGCCCGT AACGCCGAAT 600
601 GGGTNAGTGT GGGGGGTCTC CCCATGCCGA AGAGTTAAGG GAAACCCTTG CAGGCATCCA 660
661 AAATAAAAAA GAAAAAGGCT CCACTCCAAA AAGACTGGGG NCCTTTCGGT TTTATCTGGT 720
721 NGTTTNGNCC GGGGGAAACC CTTCTNCTG AAGTAGGGAC AAATCCGCCC GGGGNACCGG 780
781 NAATTTTAAA CCGTTTTCGA AAAACNACCG NCCCCGGGAN G 840
    
```


ANEXO 8 Secuencia con el oligo Met-Rev de la clona religa



S/N:G:141 A:94 T:111 C:151
 KB Jobp
 KB 1.2 Cap:2

Metasa-5 (3.1)12-14-06-3-17 PM
 Metasa-5 (3.1)
 KB_310_POPE_BDTv3_36Rapid.mob
 Pts 1414 to 8495 Pk1 Loc:1414
 Version 5.2 Patch2 HSCV Bases: 576 EVA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 31C
 Dec 14,2006 03:17PM, GMT -06:0C
 Dec 14,2006 03:38PM, GMT -06:0C
 Spacing:12.6

Plate Name: Unassigned

1	CACGCCAGCC	GCCCCGCCGT	GATTATCGGC	ATTCGTTTGC	CGTATCCACG	CCGTTTCAATA	ACCAGCTAAC	70
71	AGAAATGTCA	GGGGGCAACA	GCATTACACA	GCCAATGTGA	TTTCGTTGAT	GTTCATAATGC	CGCCTTCTCA	140
141	ACGAATGGCC	CCGGTTTAGA	ATATGGCGGA	TTAAGCCAGA	CATTACTCAC	AGGCATTTGCC	ACAGCTCCCC	210
211	ACGGATTAATG	CAACGTGTCC	ATTTCTTCCG	TTATATACCG	AGGAACITAGC	GCATTTTCCCT	TGTTTGCCGC	280
281	CACGTCAGCG	ACAATTTCAA	ATTCGCGGTC	CATGAATTTCT	GTTTCCITGTG	TGAATTTGTT	ATCCGCTCAC	350
351	AAATCCACAC	ATTATACGAG	CCGATGATTA	ATTGTCAACA	GCTCATTTTCA	GAATATTTGC	CAGAACCCTT	420
421	ATGATGTCGG	CGCAAAAAMAC	ATTATCCAGA	ACGGGAGTGC	GCCTTGAGCG	ACAACGAATTA	TGCAGTGATT	490
491	TACGACCTGC	ACAGCCATAC	CACAGCTTCC	GATGGCTGCC	TGACGCCAGA	AGCATTGGTG	CAOCGTGCAG	560
561	TGATAAAGCC	CGGGATCCTC	TACGCCGGAC	GCATCGGGCC	GGCATCACGG	CGCCACACAGT	GCGGTTGCTG	630
631	GCGCCTATAT	CGCCGAACCTT	CAOCGATAGA	GGGAAATCCG	GGCTCGCCAC	TTCCGGGCGCT	CTATGAACCC	700

Applied Biosystems

S/N G:141 A:94 T:111 C:151

KB_bcp

KB 12

Cap2

505

517

529

541

553

565

577

599

601

613

625

Metasa-5 (3.1)12-14-06-3-17 PM

Metasa-5 (3.1)

KB_310_POP6_BDTV3_36Rapid.mob

Pos 1414 to 8495 Pk1 Loc:1414

Version 5.2 Patch2. HISQV Bases: 576 EVA

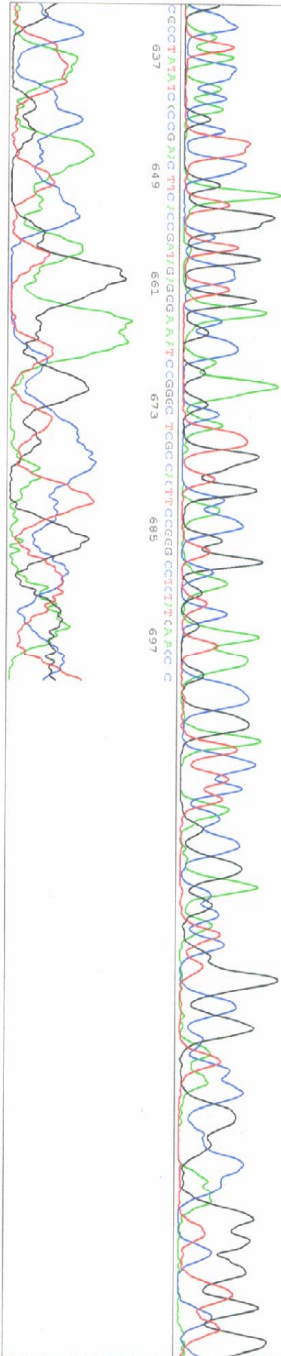
Inst Model/Name: 310 /ABI PRISM 310

Dec 14, 2006 03:17PM, GMT-06:00

Dec 14, 2006 03:38PM, GMT-06:00

Spacing: 12.61 Pts/Panel: 500

Plate Name: Unassigned



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA POSIBLE
METILTRANSFERASA DAM PROVENIENTE DEL BACTERIOFAGO NO
LAMBDOIDE mEp021

Edith Alvarado edith.alvarado@javeriana.edu.co, Eva Martínez
evamartinez@cinvestav.mx, Rosa Bermúdez roberm@cinvestav.mx.

*Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del IPN, México D.F.- Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 40
- 62, Bogotá, Colombia.*

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizó el marco de lectura abierto 5, del bacteriófago mEp021 no lambdoide, el cual presentó una identidad significativa ($E=5e-14$, $E=7e-11$ y $E=4e-10$ por blast regular) con las secuencias de metiltransferasas de fagos. Por tanto se extrajo el DNA del fago mEp021. Se diseñaron los oligonucleótidos a partir de la secuencia correspondiente y se amplificó por PCR el gen de la metiltransferasa con un tamaño esperado de 348 pb, fue clonado en un vector transitorio TOPO TA. La identificación de clonas positivas se realizó por patrones de restricción y PCR. Una vez verificada la presencia del inserto en este vector se purificó del gel y se clonó en el vector pKQV4. Se obtuvo una clona que contenía el fragmento, pero se encontraba lejos de la región Shine-Dalgarno, razón por la cual, no permitió la expresión de la posible proteína. Posteriormente, se reclonó este producto y se realizó la inducción con IPTG de las clonas positivas y se montó un gel de proteínas totales para observar la presencia de la proteína. Se aisló el DNA plasmídico comprobando así por patrones de restricción la modificación del DNA generada por la expresión del gen de la metiltransferasa. Pero, nuevamente cotejamos por gels de acrilamida tipo

SDS/PAGE la ausencia de la metiltransferasa. Estos resultados nos indican que el trabajo no está concluido y servirá para análisis posteriores que nos permitan confirmar la función de este gen.

Palabras claves: Bacteriófago, metiltransferasa, no lambdaoide.

ABSTRACT

In this work was determined the frame of open lecture 5, of bacteriophage mEp021 not lambdaoide, which show a significant identity ($E=5e-14$, $E=7e-11$ y $E=4e-10$ by regular blast) with the sequences methyltransferases of phages. Therefore it was extracted the DNA of phages mEp021. The primers was designed from its corresponding sequence then simplified by PCR the methyltransferase gen with an awaited size of 348 pb, it was cloned in a transitory vector TOPO TA. The identification of positive clones was made using patrons des restriction and PCR. Once verified the presence of insert in this vector the gel was purified and then cloned in the pKQV4 vector. A clone was obtained which contained the fragment, but it was far from the Shine-Dalgarno region, due to this, it didn't allow the expression of the possible protein. Afterward, this product was cloned again and an induction with IPTG of the positive clones was done, and a gel of total proteins was used to observe the presence of the protein. The plasmid DNA was isolated verifying in this way that using patrons of restriction the modification of DNA generated by the expression of the gene of methyltransferase. A new collate was made using gel of acrilamida SDS/PAGE kind, and the absence of the methyltransferase was observed. These results shows that this work isn't finished, but it'll be useful for further analysis which allow to determinate the function of this gene.

INTRODUCCIÓN

La metilación del DNA es un proceso llevado a cabo en diferentes organismos, por un grupo de proteínas conocidas como metiltransferasas. En procariontes este tipo de proteínas forman parte de los sistemas de restricción modificación y por lo general dependen de las enzimas de restricción para la función del sistema. Sin embargo, algunas de éstas no están asociadas a enzimas de restricción, tal es el caso de la DNA adenina Metiltransferasa (Dam) de *Escherichia coli*. Estas reconocen a la secuencia de DNA, GATC (preferentemente) y metilan el átomo de nitrógeno del grupo amino de la adenina en la posición N6, lo que permite a la bacteria distinguir entre su propio DNA y el DNA exógeno, ya que al no estar metilado es degradado por las enzimas de restricción.

Otras funciones importantes de algunas Dam bacterianas es regular algunos procesos vitales tales como la replicación del DNA, la reparación por apareamiento erróneo y la expresión de genes, entre otras. Es por esto que nos interesa analizar y caracterizar a la posible enzima *dam* del fago mEp021, ya que este fago no comparte homología con los fagos lambdoides. En un estudio previo, se clonó un fragmento del genoma de este fago y se encontraron 5 marcos de lectura abiertos. De los 5 marcos solo el 5 presentó una similitud significativa con secuencias de la metiltransferasa de fagos.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es estudiar esta enzima Dam y sus propiedades, mediante su aislamiento por medio de técnicas moleculares como PCR, clonación y secuenciación, así como la confirmación de su función.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de lisados bacteriofágicos

Se tomo una placa aislada del fago y se coloco en un Erlenmeyer con 0.5 ml de la cepa W3110. Después de 15 minutos se adicionaron 10 ml de medio TB líquido y se incubo durante 6 a 8 horas en agitación a 200rpm hasta obtener lisado celular. Posteriormente se agrego 0.1ml de cloroformo al sobrenadante y se agito de nuevo durante 5 minutos. La muestra se centrifugo a 7,150g por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante libre de restos celulares a un tubo estéril y se almaceno a 4°C.

Aislamiento del DNA del bacteriófago

Se tomaron 25 ml del lisado fágico (con un título aproximado de 10^{10} UFP/ml), se le agrego una solución DEAE celulosa (pH 7) y se agito por 30 minutos. Se elimino la DEAE celulosa por centrifugación a 16,090 g por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se le agregaron 6.5g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta la disolución total, luego se centrifugo a 11,180g durante 30 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1M pH 8). Se adiciono un volumen igual de fenol:cloroformo y se mezclo en vortex, luego se centrífugo a 7,150g por 5 minutos. Se tomo la fase acuosa y se resuspendió en vortex con un volumen igual de cloroformo, se centrifugo a 7,150g durante 5 minutos. Se tomo la fase acuosa y se ajusto a una concentración de 0.3M con acetato de sodio 3 M y se resuspendió en dos volúmenes iguales con etanol o con uno de isopropanol. Se centrifugo a 11,180g por 30 minutos para recuperar la pastilla de DNA y luego la pastilla se lavo con etanol al 70% y se dejo secar a baja temperatura. Después se resuspendió en 50 μ l de TE 1X.

Aislamiento del DNA plásmidico

Se inoculo una colonia de la bacteria conteniendo el plásmido pKQV4 en 5 ml de medio LB con antibiótico (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se incubo en rotación continua a 200 rpm a 37°C durante toda la noche. Se centrifugo 1.5 ml del cultivo a 6,280g durante 5 minutos. La pastilla se resuspendió en 100 μl de la solución I fría (glucosa 50mM, Tris -HCl 10nM (pH 8), EDTA 10mM (ph8)). Se mezclo hasta formar una emulsión homogénea y se mantuvo en hielo hasta agregar la solución II (SDS al 1% y NaOH 0.2N). Se agregaron 200 μl de la solución II. Se mezclo en hielo hasta agregar la solución III (acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial). Se agregaron 10 μl de RNasa A (10 mg/ml) por 15 minutos. Se agregaron 150 μl de la solución III. Se mezclo por inversión y se dejo reposar en hielo por 10 minutos. Se centrifugo a 11,180g durante 15 minutos. Se tomo la fase acuosa y se agrego volumen a volumen una mezcla de fenol:cloroformo. Se mezclo por 30 segundos con vortex y se centrifugo a 16,090g durante 5 minutos. La fase acuosa se mezclo con cloroformo volumen a volumen y se centrifugo a 11,180g durante 5 minutos. La fase acuosa se equilibrio con acetato de potasio 3M hasta una concentración de 0.3M de acetato de potasio. El DNA se precipito con dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezclo suavemente y se dejo reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifugo a 16,090g durante 15 minutos. El sobrenadante se decanto y el DNA se lavo con etanol al 70%. Se centrifugo a 11,180g durante 10 minutos. La pastilla se dejo secar y se resuspendió en 100 μl de TE 1X estéril (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM, pH 8).

Amplificación por PCR del marco de lectura abierto (ORF) 5 a partir del DNA del fago mEp021.

El ORF 5 se amplificó y clonó: para la amplificación se preparó una mezcla que contiene 23.3 µl de agua destilada estéril, 5.0 µl del regulador 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, KCl 500mM; Invitrogen®), 2.0 µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen®), 1.5 µl de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's GibcoBR®) 2.5mM, el iniciador Met-Fwd (500 ng), el iniciador Met-Rev (500 ng), 0.2 µl de Platinum Taq DNA polimerasa (Applied Biosystem®) 5 U/µl y 2 µl de DNA, en un volumen final de 50 µl. Las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) y se sometieron a un ciclo inicial de 94°C/5 minutos. Posteriormente se realizaron 35 ciclos de 94°C/60 segundos, 58.9°C/30 segundos y 72°C/45 segundos. Mantener a 4°C. Luego se realizó un corrimiento electroforético de las muestras junto con un marcador de peso molecular en un gel de agarosa al 1%.

Clonación del ORF 5 en vector transitorio TOPOTA

El producto de PCR obtenido se clonó en el vector TOPO TA (Invitrogen). El cual contiene la topoisomerasa I. Esta enzima permite la unión de las bases de adenina al producto de PCR, con los extremos del vector que contienen timinas. Para esto se hizo una mezcla de reacción que contenía: 4µl del producto de PCR, 1µl de solución de sales y agua estéril para un volumen final de 5µl, posteriormente se adicionó 1µl del vector TOPO TA. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para transformar en quimiocompetentes de DH5α 3 µl de la mezcla de reacción. Para la transformación se incubó en hielo durante 30 minutos y se le dio un shock térmico a

42°C por 30 segundos. Se le adiciono LB y se deajo incubando en agitación a 37°C por 1 hora, se centrifugó por 2 minutos, se resuspendió la pastilla y se plaqueó en cajas de LB ampicilina, para incubarla toda la noche a 37°C.

Clonación del ORF 5 en el plásmido pKQV4

Se empleo el vector pKQV4 y las clonas se seleccionaron por PCR y por corte con enzimas de restricción.

Digestión del vector

El DNA del plásmido pKQV4 se corto con *EcoRI* y con *HindIII*. La reacción consistió en: 3 µg del vector, 2.0 µl del regulador (50mM de acetato de potasio, 20mM de Tris- acetato, 10mM de acetato de magnesio. 1mM de ditiotritol), 1.0 µl de la enzima (5 U/µl) y agua estéril para llevar la mezcla a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubo a 37°C durante toda la noche.

Extracción fenólica

El vector digerido y linearizado se sometió a una extracción fenólica con un volumen igual de fenol:cloroformo (volumen a volumen), y finalmente se precipito con dos volúmenes de etanol absoluto frío y se centrifugo a 21,910g durante 20 minutos. La pastilla se lavo con etanol al 70% frío, se centrifugo nuevamente y se resuspendió en el regulador TE 1X.

Digestión del producto de PCR del ORF 5

El fragmento de DNA amplificado por PCR que contiene el ORF 5 del fago mEp021 fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la siguiente forma: se mezclaron 300 ng de DNA del fago, 1µl del regulador 10 X (50mM de acetato de potasio, 20mM de Tris-acetato, 10mM de acetato de magnesio, 1mM de ditiotreitil), 1µl de enzima

(1U/ μ l) y agua estéril hasta un volumen final de 20 μ l. Se incubo durante 2 horas con 1U/ μ l de la enzima *EcoRI* y 2 horas más con 1U/ml de la enzima *HindIII*.

Reacción de ligación

Se tomaron 50 ng del plásmido pKQV4, 5.72 ng del producto de PCR amplificado a partir del DNA del fago mEp021: 4.0 μ l del regulador de ligación 5X (Tris-HCl (pH 7.5) 50mM, MgCl₂ 10mM, ditioneitol 10mM, ATP 1mM, 25 μ g/ml de albúmina sérica bovina) y agua estéril para llevarla a un volumen final de 20 μ l, se adiciona 1 μ l de la enzima ligasa del fago T4. Se incubo a 28°C por toda la noche. La cepa de *E.coli* DH5 α , tratada con cloruro de rubidio, se transformó con la mezcla de ligación y se sembró en cajas de agar LB con ampicilina al 100 ug/ml para la selección de recombinantes.

Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Se inoculo una colonia de la cepa DH5 α en 10 ml de caldo LB y se dejo incubar toda la noche a 37°C a 150rpm. Se inocularon 4 ml del cultivo de toda la noche, en 400 ml de caldo LB, se mantuvieron en agitación hasta que alcanzo una DO₅₅₀=0.8. Las células se obtuvieron por centrifugación a 5,470g durante 10 minutos. Dichas células se resuspendieron en 500 ml de glicerol al 10% a 4°C. Este proceso se repitió 2 veces, para posteriormente resuspender la pastilla en un volumen final de 2 ml. Estas células se guardaron en alícuotas de 120 μ l a -70°C. Para la transformación se colocaron alícuotas de 20 μ l de las células previamente tratadas en tubos estériles de microcentrífuga, se agrega 1 μ l de DNA y se mezcla con una micropipeta. Se colocó cada mezcla de células y DNA entre los electrodos de la cámara de electroporación. Las condiciones de pulso que se utilizaron fueron 2.4kV y 4k Ω .

Preparación de las células quimiocompetentes con cloruro de rubidio y transformación

Se tomo una colonia de la cepa DH5 α y se creció en medio líquido SOB con Magnesio (20mM) durante toda la noche. Se inoculo 1ml en medio SOB con Magnesio (20mM) en 100ml de medio, hasta una densidad de 0.3-0.4 a 550nm. Se incubo en hielo 15 minutos, y se centrifugo a 4,020g durante 5 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 16 ml de la solución TFB I (RbCl 100mM, MnCl₂ 50mM, KAc 30mM, CaCl₂ 10mM, glicerol 15%, pH 5.8), se incubo a 4°C durante 15 minutos. La mezcla se centrifugo a 4,020g a 4°C durante 10 minutos y la pastilla obtenida se resuspendió en 4ml de la solución TFB II (MOPS 10mM, RbCl 10mM, CaCl₂ 75mM, glicerol al 15% pH 8). Se hicieron alícuotas de 200 μ l y se congelaron a -72°C hasta su uso (Hanahan et al., 1983).

Determinación de candidatos positivos mediante PCR y corte con enzimas de restricción enzimática

La selección se hizo por PCR y la identidad se confirmo mediante corte con enzimas de restricción. Tomando 10 μ l del DNA del candidato, 2 μ l del buffer de la enzima (10x), 1U/ μ l de la enzima ya sea *EcoRI* (Biolabs) ó *HindIII* (Biolabs) y 7 μ l de agua para un volumen final de 20 μ l. Luego se dejo cortando a 37°C por toda la noche.

Secuenciación del fragmento clonado en el plásmido pKQV4

Se colocaron 500 ng de plásmido pKQV4 con el inserto (ORF5), el iniciador Met-Rev a una concentración final de 10 pM, 8 μ l de la mezcla de secuenciación (terminador Dye-A marcado con dicloro (R6G), terminador Dye-C marcado con dicloro (TAMRA), terminador Dye-G marcado con dicloro (R110), terminador Dye-

T marcado con dicloro (ROX), desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dITP, y dTTP), Ampli Taq DNA polimerasa con pirofosfatasa termoestable, MgCl₂ 3 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9) y agua estéril para llevarlo a un volumen final de 20 µl (protocolo para ABI PRISM™ “dRhodamine Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit”). Posteriormente se llevaron a 30 ciclos de: 96°C/10segundos, 45°C durante 5 segundos y 4°C por 7 minutos. Los productos de secuenciación se purificaron con columnas CENTRI SEP (Princeton® Separations, Applied Biosystems) y se secaron al vacío durante 30 minutos. Los productos ya purificados se analizaron en un secuenciador automático Perkin Elmer™ ABI PRISM™310 (En la unidad de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV).

SDS-PAGE de proteínas citoplasmáticas

Se inoculo una colonia de la cepa DH5α que contenía el vector vacío pKQV4 en tubos con 5 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml), durante toda la noche. La bacteria se centrifugo por un minuto para empastillar; y se agregaron 50 µl del amortiguador de muestra (Tris-HCl 50mM, pH 6.8, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.05%). Dichas muestras se hirvieron a 100°C durante 4 minutos. Finalmente las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, el cual se preparo de acuerdo con lo descrito por (Sambrook et al., 1989) y se tiño con una solución de azul de Coomassie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se verificó mediante métodos bioinformáticos, que la secuencia a clonar no contuviera los sitios de las enzimas a utilizar. En este caso el programa utilizado fue el NebCutter Versión 2 disponible en la página de Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Por los resultados obtenidos se determinó que los sitios para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* se podían utilizar, ya que la secuencia de DNA del ORF5 no los contiene. Luego se diseñaron los oligos con el programa (OLIGO DNA/RNA PRIMER ANALYSIS SOFTWARE VERSION 4.1). Se adicionaron las secuencias de los sitios de restricción de cada enzima para producto final de 348-pb (Fig. 1). Otras condiciones que se tuvieron en cuenta para amplificar fueron el porcentaje de GC de met-F de 48% y de met-R de 52% para un promedio de 50.9%, una temperatura de alineamiento de 58.9, con una diferencia entre los iniciadores de 3.2 y un producto con una longitud original de 327pb.

Secuencia de DNA (348 pb)

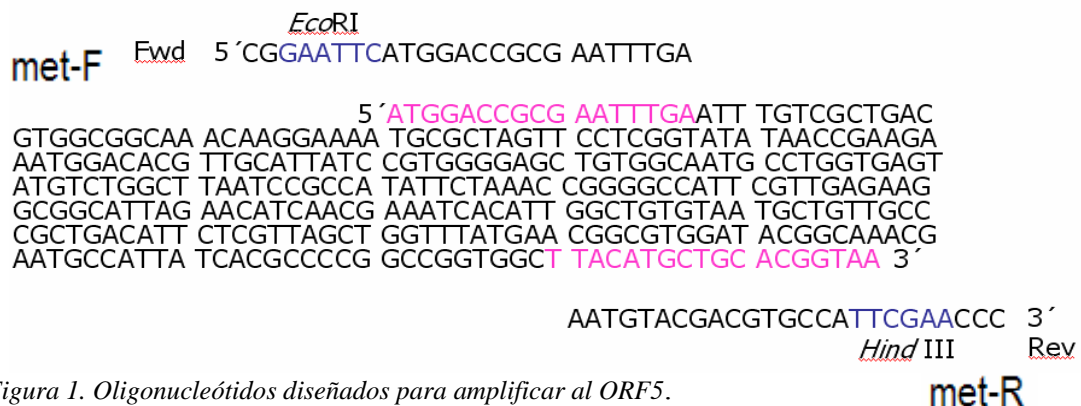


Figura 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar al ORF5.

Aislamiento y clonación del fragmento de 348-pb correspondiente al ORF5 del bacteriófago mEp021 responsable de la metilación del DNA.

Luego se extrajo el DNA del bacteriófago mEp021 para amplificar el gen de la metiltransferasa por PCR (fig. 2). 1 2 3

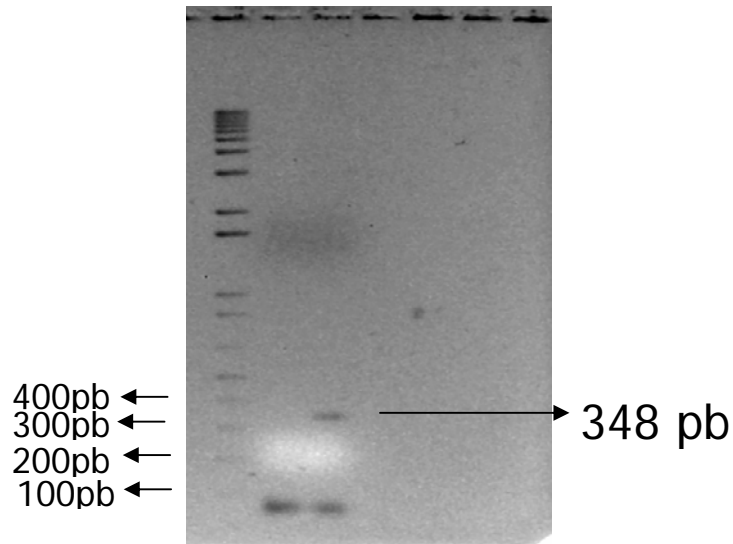


Figura 2. Electroforesis del producto de PCR (DNA del bacteriófago mEp021) en gel de Agarosa al 1%. Carril1, MPM 100 pb plus (Invitrogen). Carril2, Control negativo (Oligos). Carril3, producto amplificado de 348pb.

Observándose del producto de PCR en el carril 3 un fragmento amplificado de 348-pb, correspondiente al inserto esperado del gen de la metiltransferasa y en el carril 2 como control negativo (únicamente oligos).

Una vez obtenidos los fragmentos tanto del vector como del inserto, se procedió a la clonación del inserto en un vector transitorio (TOPO TA, Invitrogen) debido a que la Taq polimerasa le adiciona al producto de PCR adeninas para que se una de forma eficiente a las timinas del vector y así facilitar la subclonación en pKQV4. Este vector no requiere de ligasa, porque contiene unida covalentemente en sus extremos, una Topoisomera encargada de hacer la unión ya que rompe el enlace fosfodiéster y forma un enlace covalente entre su residuo de tirosina y el fósforo pero en el

momento en que se encuentra con el grupo OH del inserto se desprende dejando el inserto ligado al vector. Mediante esta estrategia se lograron distinguir las clonas que tenían el inserto de las que no debido a que este vector posee un gen de resistencia a ampicilina y el gen $LacZ$ de la β -galactosidasa que al expresarse por la adición del inductor IPTG toma el sustrato X-gal y dio una coloración azul, pero al interrumpirse la expresión de este gen por el acoplamiento del inserto al vector toma una coloración blanca por lo cual se seleccionaron los candidatos que presentaban una coloración blanca (Fig. 3). Se realizaron dos clonaciones en este vector iguales, una llamada TOPO TA y la otra TOPO N.

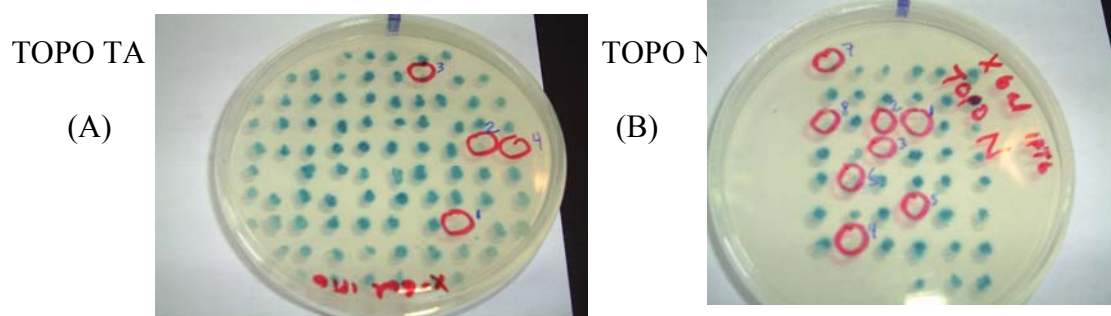


Figura 3. Clonación en vector transitorio TOPO TA, transformada en bacterias competentes DH5 α y espatulada en cajas de LB-Ampicilina (100 μ g/ml) Con círculo rojo se indican A) 4 Candidatos blancos de un fondo de 85, (B) 8 Candidatos blancos de un fondo de 45.

De la clonación en TOPO TA se encontraron 4 candidatos blancos debido a la interrupción de la expresión del gen de la β -galactosidasa de un fondo de 85 azules correspondientes a la expresión del gen y su crecimiento fue debido al gen de resistencia a ampicilina y a que el genotipo de las bacterias DH5 α en las cuales se transformaron son $recA^-$ y por lo tanto no hibrida o recombina el DNA permitiendo así que la clonación original permanezca en la bacteria, al igual que el IPTG inductor de la expresión del gen de la metiltransferasa el cual metila el DNA y así la bacteria

lo reconoce como propio y no como exógeno y por lo tanto no lo degrada. Y en TOPO N se encontraron 8 candidatos blancos de un fondo de 45 azules. Obtenidos los candidatos blancos con el posible inserto se procedió a la extracción de DNA plasmídico de cada uno y se seleccionaron el 6 y el 8 de TOPO N y el 4 de TOPO TA. Los cuales se cortaron con la enzima *XhoI* ya que solo tiene un sitio de corte en el vector. (Fig. 4).

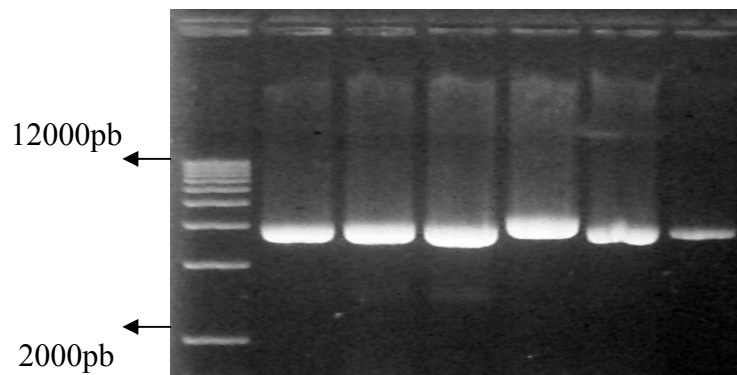


Figura 4. Linearización de candidatos mediante restricción con *XhoI*. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Candidato 6 de TOPO N. Carril 3, Candidato 8 de TOPO N. Carril 4, Control (colonia azul) de TOPO N. Carril 5, Candidato 4 de TOPO TA. Carril 6, Control (colonia azul) de TOPO TA. Carril 7, DNA restringido con *XhoI*.

Y al cortarse con esta enzima el plasmido queda lineal y aquel candidato que contiene el inserto presenta un mayor peso molecular, es por ello que se escogió el candidato 4 de TOPO TA. Se realizó el corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para determinar la presencia del inserto (Fig. 5)

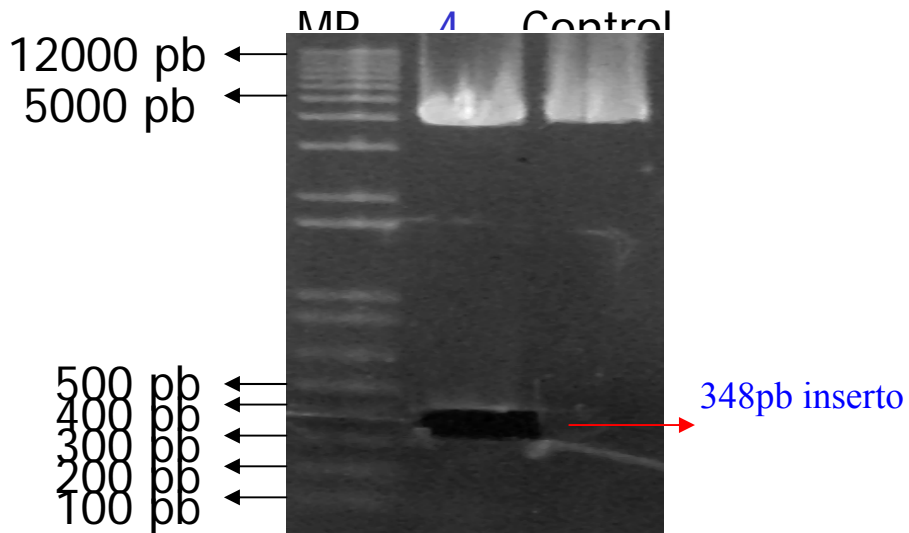


Figura 5. Restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* del candidato 4 de TOPO TA y su control. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Candidato 4 de TOPO TA. Carril 3, Control (colonia azul) de TOPO TA.

El cual se encontró entre 300y 400-pb, la banda obtenida se cortó y purifico para ser clonado en el vector pKQV4 y cortado posteriormente se realizo una amplificación por PCR del inserto (Fig 6).

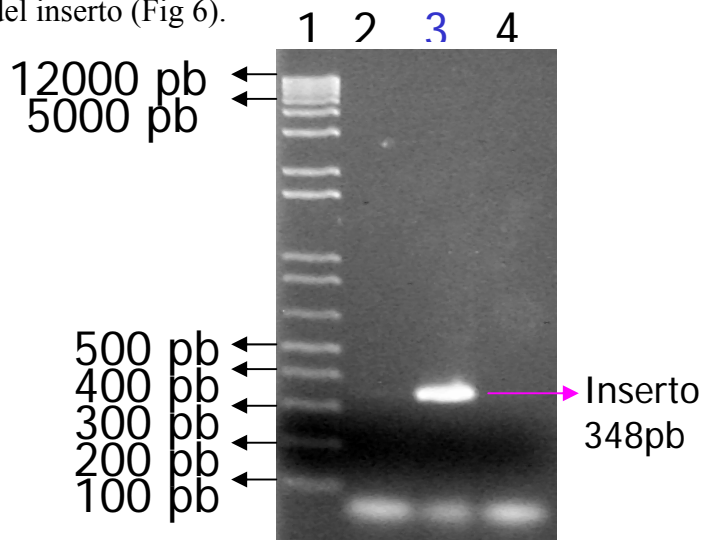


Figura 6. PCR del candidato 3 para determinar la presencia del inserto. Carril 1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril 2, Vector (Control). Carril 3, Candidato 3. Carril 4, Oligos.

Obtenido el inserto en el candidato 3 para comprobar la construcción pFMM (plásmido Fago Metiltransferasa Mexican) se secuenció.

Luego se procedió a cortar tanto el vector como el inserto con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Fig 7) para determinar si el inserto correspondía al tamaño del ORF5 que es de 348 pb. Se observo en el carril 2 un fragmento de 5700-pb del vector pKQV4 y en el carril 3 un fragmento de 348-pb, correspondiente al inserto cortado con *EcoRI* y *HindIII* (ORF5).

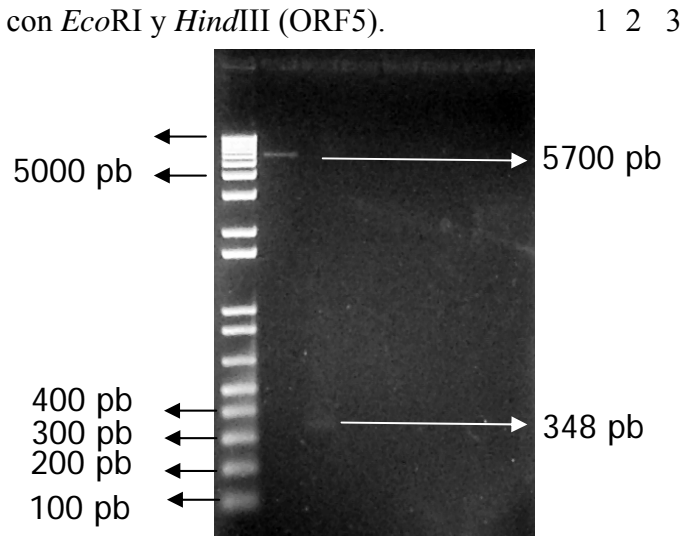


Figura 7. Electroforesis del corte con enzimas de restricción (*EcoRI* y *HindIII*) del vector pKQV4 y del inserto (348-pb) en gel de Agarosa al 1%. Carril1, MPM 100 pb DNA plus (Invitrogen). Carril2, pKQV4. Carril3, inserto de 348-pb.

El inserto obtenido se ligó con el vector pKQV4, sin embargo la secuencia no fue del todo parecida a la ya determinada (secuencia del ORF5) y también la región Shine-Dalgarno (SD) no quedo a la distancia adecuada. Esto debido a que al realizar la doble digestión en el vector transitorio (TOPO TA) con las enzimas de restricción se genero un corte parcial del inserto que permitió que se arrastrarán bases de mas que no permiten una buena traducción del transcrito. Para corroborar este resultado se realizo un gel de proteínas con y sin IPTG (Fig. 8).

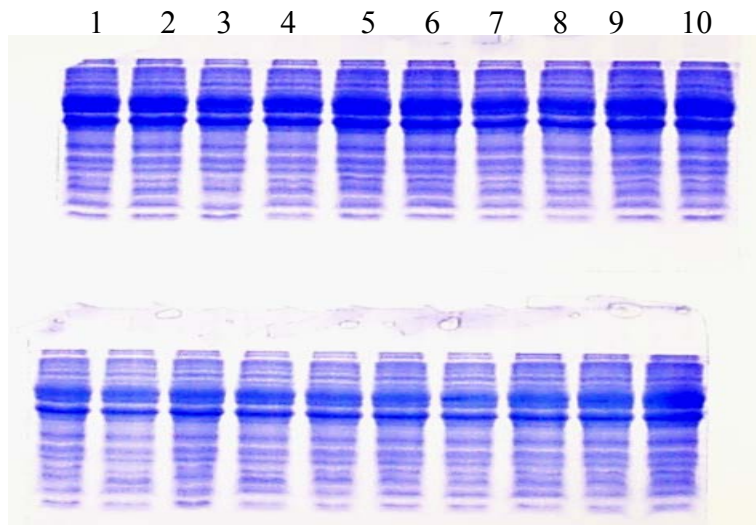


Fig 8. Gel de proteínas. Carril 1, 3, 5, y 9, sin IPTG. Carril 2, 4, 6, 8 y 10 con IPTG

El cual mostró que con y sin inductor no hay producto de traducción, por lo que se infiere que las bases de mas agregadas al inserto por el corte parcial de este influyeron para que no hubiera producto. Para obtener una mejor construcción se obtuvieron los fragmentos de novo y se religo el plásmido pKQV4 y el inserto proveniente del vector transitorio. De las clonas obtenidas se seleccionaron dos candidatos, para ser secuenciados de acuerdo a la metodología ya descrita. Una de las clonas mostró una secuencia igual a la ya determinada para el ORF5 y una distancia adecuada a la región SD. Desafortunadamente la actividad de esta nueva construcción no pudo ser determinada. Es por esto que, aún no se puede saber si el gen de la metiltransferasa es funcional.

De no encontrar una actividad de metiltransferasa para esta proteína se podría pensar que en algún momento el fago obtuvo este gene del su hospedero (*E. coli*) y que en las posteriores replicas se perdió función. El hecho de que se asemeje más a las proteínas Dam de fagos provenientes de cepas patógenas es interesante, ya que el

fago fue aislado de materia fecal humana. Esto nos llevaría a pensar que en algún momento tomó este gen de cepas potencialmente patógenas.

AGRADECIMIENTOS

Rosa Bermúdez, Eva Martínez, Luis Kameyama, al Centro de investigación y estudios avanzados del IPN de México D.F.

BIBLIOGRAFIA

Auer Bernhard and Schweiger Manfred. 1984. Evidence that *Escherichia coli* Virus T1 Induces a DNA Methyltransferase. *Journal of Virology*. Vol 49. pp 588-590.

Calmann Melissa, and Marinus M. G. 2003. Regulated Expression of the *Escherichia coli dam* Gene. *Journal of Bacteriology*. Vol 185. pp 5012-5014.

Hanahan D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. Vol 166. pp 557-580.

Heithoff M. Douglas, Sinsheimer L. Robert, Low A. David and Mahan J. Michael. 1999. An Essential Role for DNA Adenine Methylation in Bacterial Virulence. *Science*. Vol 284. pp 967-970.

Kameyama Luis, Fernández Leonor, Calderón Jesús, Ortiz-Rojas Adriana and Patterson Thomas. 1999. Characterization of wild Lambdoid Bacteriophages: Detection of a Wide Distribution of Phage Inminity Groups and Identification of a Nus-Dependent, Nonlambdoid Phage Group. *Virology*. Vol 263. pp 100-111.

Martínez-Peñañiel Eva. 2003. Caracterización molecular de la región de DNA del bacteriófago mEp021, relacionado con la expresión de la hemolisina *SheA* de *Escherichia coli* K-12. Maestro en ciencias químicas biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Escuela de Ciencias Biológicas. México D.F.

Sambrook J. Maniatis T, Fritsch E. F. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory*. Cold Spring Harbor N.Y.

Schneider-Scherzer Elisabeth, Auer Bernhard, Groot Egon and Schweiger Manfred. 1990. Primary Structure of a DNA (N^6 -adenine)-methyltransferase from *Escherichia coli* Virus T1. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 265. pp 6086-6091.

Wion Didier and Casadesus Josep. 2006. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Publishing Group*. Vol 4. pp 183-192.