

UCH-FC  
MA5-B  
S/12  
C.1

ESTUDIOS SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS QUE EVITAN  
LA AUTORRESTRICCIÓN DEL DNA CROMOSOMAL EN  
BACTERIAS

Tesis entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias con mención en Biología



Facultad de Ciencias  
por  
Claudia Paz Saavedra Sánchez

Abril de 1997

Director de Tesis: Dr. Claudio C. Vásquez G.

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la  
Tesis de Magister presentada por el candidato**

**CLAUDIA PAZ SAAVEDRA SANCHEZ**

**ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de Tesis para  
optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el Exámen de Defensa de Tesis  
rendido el día 21 de Julio de 1997.**

**Director de Tesis:**

**Dr. Claudio Vásquez G.**



**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

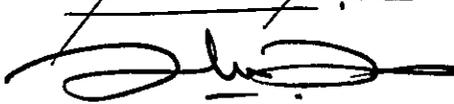
**Dra. Rosalba Lagos**



**Dra. Margarita Carú**



**Dr. Carlos Jerez**



**Dr. Omar Orellana**



## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Claudio Vásquez por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y por su apoyo tanto en lo material como intelectual, especialmente en el manejo de técnicas de biología molecular.

A mis colegas del Instituto de Bioquímica de la Universidad de Talca, en especial al Dr. Enrique González, quien no sólo fue de gran ayuda en la discusión de mi Tesis sino que un gran amigo.

A mi gran amiga Cristina Theoduloz, quien me brindó su apoyo durante el desarrollo de mi Tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, quienes influyeron en mi formación durante la estadía en el Programa. Especial mención merece el Dr. Tito Ureta.

A mis queridas amigas Victoria Guixé y Ana Prella, por su constante estímulo e incondicional apoyo.

A Eduardo Kessi, quien fue un gran compañero y amigo.

A mis amigos Miguel Ríos y Jorge Escobar, por su valiosa amistad y apoyo.

Al Dr. Eugenio Spencer, por su ayuda en la discusión de algunos resultados.

A Claudia Loyola, por su buena voluntad y disposición.

A los Dres. y miembros de la Comisión de Tesis Rosalba Lagos, Margarita Carú, Carlos Jerez y Omar Orellana, por su entusiasta participación durante la corrección de este trabajo.

Finalmente, al Fondo de Ciencia y Tecnología, FONDECYT, por proveer gran parte de los recursos materiales que hicieron posible esta Tesis.

## INDICE DE MATERIAS

	pág.
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumen .....	xii
Summary .....	xiii
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	10
Reactivos generales .....	10
1.- Cultivo de microorganismos.....	10
2.- Cepas y plasmidios utilizados.....	10
3.- Mantenición de las cepas.....	11
4.- Ensayo de actividad de la endonucleasa <i>Bst</i> VI.....	12
5.- Ensayo de protección del DNA sustrato por la metilasa <i>Bst</i> VI.....	12
6.a- Búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa <i>Bst</i> VI....	13
6.b- Búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa <i>Bst</i> VI usando cultivos marcados diferencialmente.....	13
7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	14
8.- Determinación de la concentración de proteínas.....	15
9.- Inmunotransferencia de proteínas.....	15
10.- Preparación de anticuerpos .....	16
11.- Purificación de anticuerpos.....	16

12.- Preparación de esferoplastos.....	17
12.a- Tratamiento de las células con CaCl <sub>2</sub> .....	17
12.b- Tratamiento osmótico.....	18
13.- Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión.....	18
14.- Transformación de células.....	20
15.- Infección de <i>E. coli</i> con bacteriófago $\lambda$ cI857.....	20
16.- Inducción de la esporulación <i>B. stearothermophilus</i> V.....	21
17.- Purificación de RNA.....	21
18.- Análisis de Northern.....	22
<b>RESULTADOS</b>	
1.- Descripción molecular del clon P <sub>1</sub> .....	24
2.- Anticuerpos anti-endonucleasa <i>Bst</i> VI y anti-metilasa <i>M.Bst</i> VI.....	24
3.- Evaluación y búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa <i>Bst</i> VI en <i>E. coli</i> .....	26
4.- Evaluación de la secreción de la endonucleasa <i>Bst</i> VI en <i>E. coli</i> ....	33
5.- Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión en <i>E. coli</i> ...35	
6.- Evaluación de la restricción <i>in vivo</i> por parte del sistema <i>Bst</i> VI en <i>E. coli</i> .....	38
7.- Estudios en <i>B. stearothermophilus</i> V.....	44
7.a- Inducción de la esporulación.....	44
7.b- Cuantificación de las actividades del sistema <i>Bst</i> VI en los distintos estadios del proceso esporulativo de <i>B. stearothermophilus</i> V.....	47
7.c- Expresión <i>in vivo</i> del gen <i>bstVIM</i> en <i>B. stearothermophilus</i> V...47	
DISCUSION.....	52

Estudios en <i>E. coli</i> .....	52
Estudios en <i>B. stearrowthermophilus</i> V.....	59
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	63

## LISTA DE TABLAS

TABLA I.	Evaluación de la secreción de la endonucleasa <i>Bst</i> VI. Tratamiento con CaCl <sub>2</sub> .....	36
TABLA II	Evaluación de la secreción de la endonucleasa <i>Bst</i> VI. Tratamiento con sacarosa.....	37
TABLA III	Determinación de la restricción <i>in vivo</i> por parte del sistema <i>Bst</i> VI.....	40
TABLA IV	Determinación de la restricción <i>in vivo</i> por parte del sistema <i>Bst</i> VI a diferentes temperaturas.....	42
TABLA V	Determinación de la restricción <i>in vivo</i> por parte del SMR de <i>B. stearothermophilus</i> V utilizando como huésped células de <i>E. coli</i> 1301 <i>mutS</i> .....	45

## LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Esquema 1: Mapa de restricción del sistema de modificación-restricción <i>Bst</i> VI.....	7
Figura 1: Análisis de restricción del plasmidio recombinante que contiene el gen <i>bstVIR</i> .....	25
Figura 2: Especificidad de los anticuerpos anti- <i>Bst</i> VI y anti- <i>M. Bst</i> V.....	27
Figura 3: Determinación de la cantidad mínima de endonucleasa <i>Bst</i> VI detectables por inmunotransferencia. ....	28
Figura 4: Determinación de la presencia de <i>M. Bst</i> VI en extractos de clon H <sub>1</sub> (fenotipo r <sup>m+</sup> ), obtenidos de células de <i>E. coli</i> cosechadas en diferentes etapas del ciclo de crecimiento.....	29
Figura 5: Ensayo enzimático de la endonucleasa <i>Bst</i> VI en las fracciones retenidas en DEAE-celulosa. Electroforesis en gel de agarosa (1%).....	30
Figura 6: Determinación de la posible actividad inhibitoria de la endonucleasa <i>Bst</i> VI.....	32
Figura 7: Determinación de una putativa actividad inhibitoria de la enzima <i>Bst</i> VI usando cultivos marcados diferencialmente.....	34

Figura 8: Evaluación de la formación de cuerpos de inclusión.....	39
Figura 9: Determinación de la restricción <i>in vivo</i> por parte del clon E <sub>3</sub> .....	43
Figura 10: Células de <i>B. stearothermophilus</i> V en distintos estadios del ciclo esporulativo.....	46
Figura 11: Determinación de la actividad endonucleasa <i>Bst</i> VI en distintos estadios de esporulación de <i>B. stearothermophilus</i> V.....	48
Figura 12: Determinación de la actividad M. <i>Bst</i> VI en los distintos estadios de esporulación de <i>B. stearothermophilus</i> V.....	49
Figura 13: Expresión <i>in vivo</i> del gen <i>bstVIM</i> en <i>E. coli</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: adenosina 5'-trifosfato
amp	: ampicilina
BCIP	: 5-Br-4-Cl-3-indolilfosfato
BSA	: seroalbúmina de bovino
cmp	: cuentas por min
DTT	: ditioneitol
DOC	: desoxicolato de sodio
DO	: densidad óptica
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
Hepes	: ácido 2-(4-(2-hidroxietil-1-piperazinil)) etenosulfónico
IPTG	: isopropil-tio- $\beta$ -D-galactósido
kb	: kilobases
MDH	: deshidrogenasa málica
NBT	: N,N-dimetilformamida
LDH	: deshidrogenasa láctica
pb	: pares de bases
PEPCK	: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PSA	: persulfato de amonio
SAM	: S-adenosil-L-metionina
SMR	: sistema de modificación-restricción
SDS	: dodecil sulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético

TEMED : N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina  
Tris : ácido tris-(hidroximetil)-aminometano  
U : unidades

## RESUMEN

Durante el subclonamiento en *Escherichia coli* de los genes *bstVIRM* de *Bacillus stearothermophilus* V, se obtuvo clones cuyo fenotipo es r<sup>+</sup>m<sup>-</sup>. Dado que la DNA metil transferasa protege normalmente el DNA cromosomal de la autorestricción, se estudió la posibilidad que mecanismos alternativos a la metilación del DNA pudiesen explicar su viabilidad celular. Se analizó dos hipótesis: la existencia de un inhibidor de la endonucleasa, y una compartimentalización celular de la enzima. Estudios de fraccionamiento de extractos celulares y marcación diferencial de proteínas, permitieron descartar la primera posibilidad. Al analizar la segunda alternativa, se demostró la presencia de *BstVI* mayoritariamente en el citosol (92% del total de la actividad), lo que también descartó esta probabilidad como responsable de la viabilidad de los clones mencionados.

Experimentos de restricción *in vivo* por otro lado, demostraron que la enzima *BstVI* es pobremente funcional en *E. coli*. Probablemente entonces, la viabilidad de los clones r<sup>+</sup>m<sup>-</sup> podría ser consecuencia de al menos dos eventos diferentes, una actividad parcial de *BstVI* a 37°C y la participación de los sistemas de reparación propios del huésped.

Un análisis similar en el huésped homólogo no ha sido posible debido a la carencia de mutantes. Sin embargo, se analizó la expresión de ambos genes durante el ciclo de crecimiento de la bacteria. Ensayos de actividad y experimentos de transferencia "Northern", permitieron concluir que la expresión de ellos disminuye simultáneamente al iniciarse la esporulación.

## SUMMARY

When the *bstVIRM* genes from *Bacillus stearothermophilus* V were subcloned into *Escherichia coli*, clones exhibiting the  $r^+m^-$  phenotype were obtained. Since the DNA methyl transferase normally protects the host chromosome from restriction, the possibility that mechanisms alternative to DNA methylation could explain the viability of these clones was investigated. Two possibilities were considered: the existence of a *BstVI* inhibitor and the cellular compartmentation of the endonuclease. Fractionation of cell-free extracts and differential labeling of proteins, discarded the first possibility. Regarding the second, it was determined that the enzyme was present mainly in the cytosolic fraction (92% of the total activity), indicating that this was also not the answer. On the other hand, *in vivo* restriction experiments showed that *BstVI* restriction endonuclease is poorly functional in *E. coli*. Probably then, the viability of  $r^+m^-$  clones could be a consequence of at least two different events: a partial activity of the enzyme at 37°C and the participation of the repair mechanisms of the host.

Similar studies in the homologous host have been hampered because of the lack of mutants. However, the expression of both, *bstVIM* and *bstVIR* genes was analyzed during sporulation. Determination of enzyme activities and Northern analysis demonstrated that the expression of the whole system is reduced at the onset of the sporulative process.

## INTRODUCCION

La restricción del DNA controlada por el huésped se conoce ya hace varias décadas. En efecto, trabajos pioneros llevados a cabo principalmente por Werner Arber [Arber y Dussoix (1962), Arber (1965), Arber y Linn (1969)] sentaron las bases de lo que hoy se conoce como sistemas de modificación-restricción (SMR) bacterianos. Estos son sistemas biológicos, enzimáticos, que le permiten a la célula hacer una distinción entre su propio DNA y algún DNA foráneo. Están constituidos por dos actividades enzimáticas altamente específicas: una DNA metiltransferasa que modifica el DNA celular y una endonucleasa que degrada cualquier DNA que carezca del patrón de modificación característico del huésped. Ambas enzimas reconocen y actúan sobre una misma secuencia específica de DNA de doble hebra, la que consta generalmente de 4-8 nucleótidos. Esta secuencia puede ser continua o interrumpida, simétrica o asimétrica, única o degenerada, dependiendo del sistema (Boyer, 1971; Brooks y Roberts, 1982; McClelland y Nelson, 1985; Roberts, 1990, Wilson, 1991; Bickle y Krüger, 1993). Mientras la endonucleasa de restricción realiza cortes endonucleolíticos interrumpiendo enlaces fosfodiéster en ambas hebras del DNA, la metilasa de modificación cataliza la transferencia de grupos metilo desde S-adenosil-L-metionina (SAM) a las bases blanco en ambas cadenas del duplex. La hemimetilación incluso es habitualmente suficiente para proteger el DNA de la restricción (Yuan y Hamilton, 1984; Wilson y Murray, 1991).

Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo bacteriano.

Se ha determinado que una de cada cuatro bacterias alberga al menos un SMR (Roberts, 1990; Wilson, 1991). Ellos han sido detectados también en bacterias infectadas por fagos temperados (Humbelin y cols., 1988), así como en células del alga unicelular *Chlorella* infectadas por virus (Xia y van Etten, 1986; Kan y cols., 1992; Zhang y cols., 1992).

Los SMR se clasifican en cuatro tipos, I-IV de acuerdo a la complejidad de la estructura de las enzimas que los componen, a los distintos cofactores que requieren o a la estructura de la secuencia de reconocimiento (Yuan, 1981; Szybalski y cols., 1991; Bickle y Krüger, 1993). Los de tipo I son los más complejos y han sido detectados fundamentalmente en *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Citrobacter* y están constituidos por tres subunidades polipeptídicas distintas. Las subunidades R (restricción), M (modificación) y S (especificidad) se ensamblan en complejos que poseen actividad de endonucleasa y metilasa mutuamente excluyentes. La reacción endonucleolítica requiere de SAM y es dependiente de ATP. Además, el corte se realiza a distancias variables de la secuencia de reconocimiento (Wilson y Murray, 1991; Bickle y Krüger, 1993). Los SMR de tipo III son similares a los de tipo I, constituyen un pequeño grupo y están formados por dos polipéptidos, las subunidades M y R. La reacción de hidrólisis del DNA requiere de ATP y es estimulada por SAM. La subunidad M es responsable de la especificidad de reconocimiento para ambas actividades además de la actividad de modificación. El heterodímero MR posee así las dos actividades enzimáticas, las cuales están en constante competencia (Roberts, 1990; Wilson y Murray, 1991; Bickle y Krüger, 1993).

Los SMR de tipo II son los más numerosos, simples y generalmente mejor

estudiados. Las actividades que lo componen residen en polipéptidos diferentes y poseen requerimientos específicos, la endonucleasa necesita de  $Mg^{2+}$  para su funcionamiento, mientras que la DNA-metiltransferasa utiliza SAM. Dado que la secuencia blanco es esencialmente simétrica, la eficiencia de su reconocimiento por parte de las enzimas involucradas se ve aumentada al poder ser identificada en cualquiera de las dos hebras. Generalmente, las endonucleasas funcionan como homodímeros y las metilasas, como monómeros. La hidrólisis del DNA ocurre habitualmente dentro de la secuencia de reconocimiento generando extremos de una hebra sobresalientes (5' o 3') o de doble hebra parejos.

Se ha descrito también un subgrupo denominado IIS, el cual es similar a los de tipo II aún cuando presenta diferencias importantes (Szybalski y cols., 1991). Las endonucleasas de este tipo hidrolizan el DNA en posiciones específicas pero fuera de la secuencia de reconocimiento. Desde el punto de vista estructural, son esencialmente monoméricas y poseen dos dominios separados que serían responsables de las funciones de reconocimiento e hidrólisis del DNA. Por otra parte, las metilasas IIS sólo metilan una de las hebras del DNA debido a que reconocen secuencias asimétricas (Szybalski y cols., 1991; Li y cols., 1992).

Los denominados SRM de tipo IV, presentan características que difieren de las otras clases. El SRM *Eco57I* por ejemplo, tiene similitud estructural con los SRM de tipo III. No obstante, la endonucleasa *Eco57I* no requiere ATP. La metilasa *Eco57I* por su lado, se comporta como una metilasa de tipo II al modificar ambas hebras del DNA (Janulaitis y cols., 1992a). En base a análisis de estructura primaria, se ha llegado a proponer que este tipo de SRM reflejaría

una forma evolutiva intermedia entre SRM tipo IIS y III (Janulaitis y cols., 1992b).

Los sistemas de tipo II han resultado ser los más útiles al biólogo molecular y representan un buen modelo para estudiar el fenómeno de interacción DNA-proteína secuencia específica. Así, las endonucleasas de restricción y las metilasas de modificación han sido muy utilizadas como herramientas para aislar y clonar genes. En este sentido, ha emergido un creciente interés por clonar los genes que especifican estas proteínas, los que pueden residir en fagos, plasmidios o DNA cromosomal (Arber, 1974). La información más reciente revela que se han caracterizado bioquímicamente más de 2000 SMR de tipo II (Roberts y Macelis, 1993) y al menos 100 de ellos han sido clonados (Wilson, 1991; Wilson y Murray, 1991). La secuencia de aminoácidos de cerca de 50 endonucleasas y metilasas ha sido deducida e incluso la estructura tridimensional de cuatro enzimas ha sido determinada: *EcoRI* (Rosenberg, 1991), *EcoRV* (Winkler y cols., 1993), *BamHI* (Newman y cols., 1994) y *PvuII* (Athanasiadis y cols., 1994).

En general, los genes estructurales de la endonucleasa y la metilasa de un sistema de restricción-modificación dado, se encuentran en estrecha proximidad. Esta organización, semejante a un operón, no necesariamente implica que ellos correspondan a una unidad transcripcional. De hecho, la orientación de las regiones codificadoras y por tanto, la dirección de transcripción es heterogénea según el sistema, pudiendo ser divergente, convergente o en el mismo sentido (Wilson, 1991; Wilson y Murray, 1991). Durante el clonamiento de los primeros SMR, los genes en cuestión fueron seleccionados por restricción *in vivo* a bacteriófagos (Mann y cols., 1978;

Kossykh y cols., 1980; Walder y cols., 1981; Thériault y Roy, 1982). Genotecas preparadas a partir de una cepa que especificaba un SMR eran transformadas en un huésped permisivo a un fago. Al cabo de un cierto tiempo, se agregaba fago al cultivo y se recuperaban células sobrevivientes, las que teóricamente debieran expresar la endonucleasa respectiva e inhibir así la multiplicación vírica. Este método de selección fue abandonado ya que presentaba ciertos inconvenientes. Por ejemplo el fago debe poseer al menos un sitio de reconocimiento para la endonucleasa en cuestión, lo que no siempre ocurre. También se debe usar una cepa que permita el crecimiento vegetativo del fago, lo cual tampoco siempre es posible. Por último, en el caso que los genes sean clonados en forma conjunta, si el gen de la metilasa se expresa primero existe la posibilidad que proteja al DNA viral de modo que este puede realizar un ciclo lítico, con lo cual se perdería el clon recombinante.

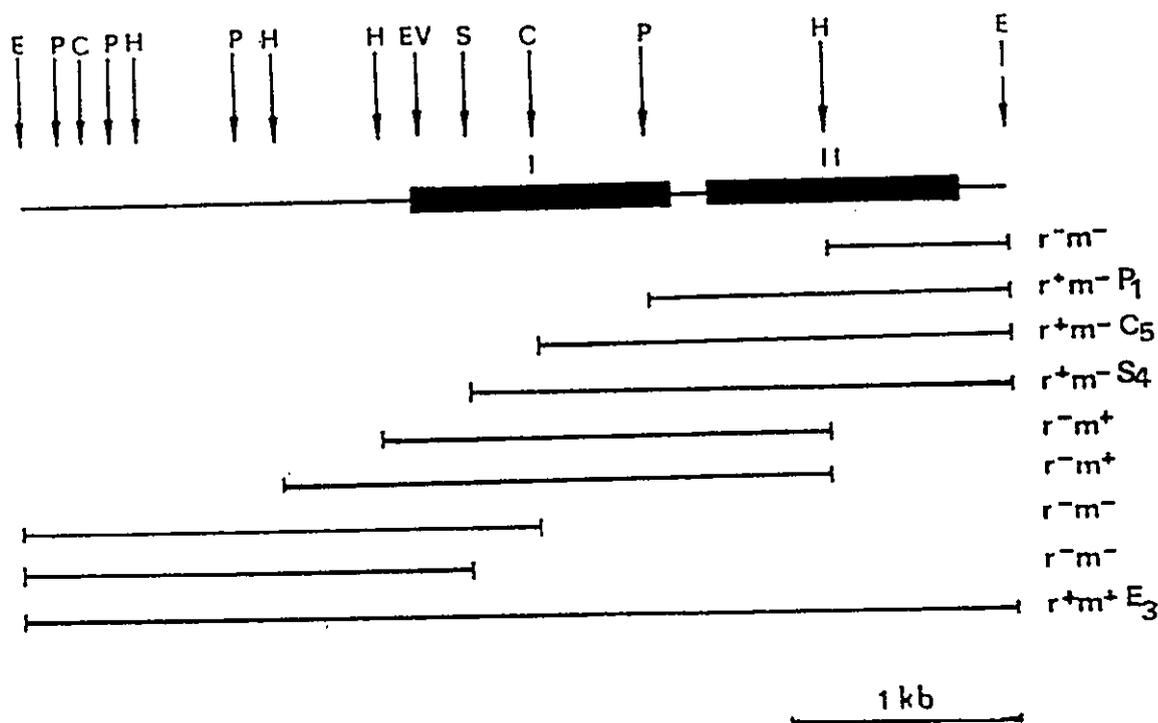
La otra estrategia utilizada, que de hecho ha conducido a los mejores resultados ha sido el llamado "truco húngaro". Este se basa en la selección por un gen de metilasa activo (Lunnen y cols., 1988; Wilson, 1988). Consiste fundamentalmente en propagar una genoteca del productor de SMR en un huésped determinado. En lugar de aislar transformantes, se prepara DNA plasmidial total de células del cultivo. Este DNA es digerido exhaustivamente con la enzima de restricción cuyo gen se desea clonar y las moléculas "sobrevivientes" son rescatadas por transformación en el mismo u otro huésped. Estas moléculas han sido modificadas *in vivo* debido a la expresión del gen de la metilasa del sistema.

Otro punto importante a considerar en el clonamiento de estos genes es la elección del huésped, que generalmente es *E. coli*. Sin embargo, diferentes

cepas de esta bacteria poseen distintos mecanismos moleculares para identificar y destruir DNA exógeno que ingresa por alguna razón a la célula. Así, los sistemas Mcr A, B y C restringen DNAs cuyas citosinas están modificadas (Ehrlich y cols., 1985; Noyer-Weidner y cols., 1986; Raleigh y cols., 1988; Brooks y cols., 1991) y el sistema Mrr, que restringe DNAs que han sido modificados en residuos de adenina (Heitman y Model, 1987).

Debido a la "letalidad" potencial de estos genes en los nuevos huéspedes, a veces es necesario clonarlos en dos etapas: se introduce y se sobreexpresa el gen de la metilasa y luego se clona el gen de la endonucleasa (Howard y cols., 1986; Szynter y cols., 1987; de Backer y Colson, 1991).

Desde hace algunos años, nuestro grupo de trabajo se ha abocado al estudio del SMR presente en la bacteria termotolerante *Bacillus stearothermophilus* V (Vásquez, 1985). Se ha aislado y caracterizado las enzimas del sistema (Vásquez, 1985; Barra y cols., 1988). La endonucleasa *BstVI* resultó ser un isosquizómero de las endonucleasas *XhoI* (Gingeras y cols., 1978) y *PaeR7I* (Jacoby y Sutton, 1977) y por lo tanto, reconoce la secuencia 5'-CTCGAG-3' en el DNA sustrato (Vásquez, 1985). La metilasa *BstVI* ha sido también analizada y fue clasificada como una N<sup>6</sup>-mA metilasa (Barra y cols., 1988). Los genes que especifican las enzimas de este SMR, *bstVIR* y *bstVIM*, están contenidos en un fragmento de DNA cromosomal de *B. stearothermophilus* V *EcoRI-EcoRI* de 4,4 kbp y han sido clonados en *E. coli* JM107 (Vásquez y cols., 1991). Además, se ha logrado obtener subclones que llevan sólo el gen de la endonucleasa (fenotipo r<sup>+</sup>m<sup>-</sup>) o de la metilasa (fenotipo r<sup>+</sup>m<sup>+</sup>). Ambos subclones expresan eficientemente la respectiva proteína codificada, sugiriendo que cada uno de ellos posee un promotor independiente ( ver Esquema 1).



**Esquema 1. Mapa de restricción del sistema de modificación-restricción *BstVI*.** El fragmento de DNA *EcoRI* de 4,4 kb está representado por una línea recta. Utilizando las enzimas de restricción indicadas, diferentes porciones del fragmento fueron subclonadas en *E. coli* JM109. Las actividades de endonucleasa *BstVI* y de metilasa *M.BstVI* fueron determinadas en clones individuales que contenían los fragmentos indicados (líneas bajo el mapa de restricción). Los fenotipos resultantes de cada subclon se muestran a la derecha de cada fragmento. La localización aproximada de cada gen está indicada por las barras gruesas: I, gen *bstVIM*; II, gen *bstVIR*. Los símbolos son: C, *ClaI*; E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*; P, *PstI* y S, *SalI*. También se encuentran indicados los fragmentos contenidos en los plasmidios pP<sub>1</sub>, pC<sub>5</sub>, pS<sub>4</sub> y pE<sub>3</sub>.

También, se ha determinado la secuencia nucleotídica de ambos genes, deduciéndose la estructura primaria de las proteínas respectivas (González y Vásquez, 1993). Se ha determinado una Mr de 65.702 (561 aa) para la metilasa y una Mr de 25.104 (224 aa) para la endonucleasa.

Tradicionalmente se acepta que las cepas productoras de SMR son inmunes a ellos debido a que la metilasa modifica el genoma del huésped. En este sentido, la viabilidad de los subclones que sólo albergan el gen de la endonucleasa *BstVI*, plantea la existencia de un mecanismo(s) distinto(s) a la protección del DNA por metilación.

En esta Tesis se propuso como objetivo general el estudiar y analizar bioquímicamente el clon de fenotipo  $r^+m^-$ , en un intento por definir algún mecanismo alternativo de protección del DNA celular. Se trabajó en varias hipótesis, a saber:

a) Una posibilidad es que podría tratarse de un factor inhibitorio, probablemente de naturaleza proteica. Esta se basa en que durante la purificación de la endonucleasa *BstVI* (Vásquez, 1985), se observó que al cromatografiar un extracto crudo de *B. stearothermophilus* V en DEAE-celulosa, se producía un aumento importante de unidades totales de enzima, las que eran recuperadas en el material no retenido. Esto a su vez sugería la remoción de algún putativo factor inhibitorio. Los antecedentes que existen al respecto se relacionan sólo con SMR de tipo I. Particularmente, se ha observado en *E. coli* la inhibición de los sistemas *EcoB* y *EcoK* por una proteína codificada por los bacteriófagos T<sub>3</sub> y T<sub>7</sub> (Bandyopadhyay y cols., 1985; Krüger y Bickle, 1983). También se ha descrito otras proteínas codificadas por fagos que inhiben la actividad de endonucleasas específicas

sobre DNAs de fagos no modificados (Studier, 1975; Makino y Saito, 1980). La posibilidad de que la enzima fuese inactiva *in vivo*, fue evaluada además por infección viral.

b) Por otro lado, sistemáticamente hemos detectado actividad endonucleásica en los sobrenadantes de cultivos de los clones  $r^+m^+$  y/o  $r^+m^-$ . Esta observación hizo suponer que podría tratarse de un fenómeno de exportación de la proteína. En este sentido, la localización periplásmica de otras endonucleasas de restricción está también documentada en la literatura (Venegas y cols., 1980; Smith y cols., 1976; Walder y cols., 1981).

c) También es probable que la estabilidad génica del huésped  $r^+m^-$  pueda deberse a que la enzima *BstVI* jamás "ve" o "se encuentra" con el DNA cromosomal, pues podría estar formando agregados macromoleculares insolubles, como cuerpos de inclusión. Esto último es lo que en general ocurre clásicamente al sobreexpresar proteínas foráneas en *E. coli* (Schein, 1989).

d) Finalmente y debido a que resultados previos indicaban la expresión diferencial de la metilasa en *B. stearothermophilus* V (Barra y cols., 1988) por un lado, y a que los clones de *E. coli*  $r^+m^+$  producen al menos diez veces más endonucleasa que los clones  $r^+m^-$ , se decidió evaluar la expresión de los genes *bstVIR* y *bstVIM* en su huésped natural durante el proceso esporulativo.

## MATERIALES Y METODOS

### Reactivos generales

De Sigma Chemical Co., se obtuvo ADP, ATP, anti-IGg de conejo preparado en cabra, ácido bórico, acetato de magnesio, agarosa, BCIP, bicarbonato de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, DEAE-celulosa, DTT, EDTA, bromuro de etidio, MDH, 2-mercaptoetanol, NADH, NBT, sacarosa, SDS, sulfato de amonio, TEMED y Tris. De BioRad se obtuvo acrilamida, bisacrilamida, hidroxilapatita, glicina y persulfato de amonio. De Merck se obtuvo ácido acético, cloruro de calcio, cloroformo, etanol, fenol, fosfato monobásico y dibásico de potasio, glicerol, glucosa, hidróxido de sodio, metanol, y sulfato de magnesio. De Difco Lab., se obtuvo agar, casaminoácidos, extracto de levadura y triptona.

### Métodos

#### 1.- Cultivo de microorganismos

Células de *Bacillus stearotherophilus* V fueron crecidas en un medio de cultivo ATTC (6 g de triptona, 4 g de extracto de levadura y 3 g de cloruro de sodio por litro de solución, pH 7,5 ajustado con hidróxido de sodio). Las cepas de *E. coli* utilizadas como huéspedes (JM107, JM109, LE392, DH5 $\alpha$  y ES1301 *mutS*) fueron crecidas en medio de cultivo Luria 1X (Sambrook y cols., 1989).

#### 2.-Cepas *E. coli* y plasmidios utilizados

JM107: ( $\Delta lac-proAB$ ), *thi*, *gyrA96*, *endA1*, *hsdR17* ( $r_k^- m_k^+$ ), *relA1*, *supE44*,

$\lambda^- / F'$ , *traD36*, *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15).

LE392:  $F^-$ , *supE44*, *supF58*, *hsdR514*( $r_k^- m_k^-$ ), *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, *lacY1*,  $\lambda^-$ .

ES1301 *mutS*: *lacZ53*, *mutS201*:: Tn5, *thyA36*, *rha-5*, *metB1*, *deoC*, IN(*rrnD-rrnE*).

El plasmidio p-Bluescript-SK, se compró a Stratagene, USA. Los plasmidios C<sub>5</sub> y S<sub>4</sub> corresponden al vector p-Bluescript-SK, que alberga los fragmentos *ClaI/EcoRI* y *SalI/EcoRI* respectivamente, ambos conteniendo el gen *bstVIR* y parte del gen *bstVIM* (Vásquez y cols., 1991; González y Vásquez, 1993). El bacteriófago  $\lambda$  cI857, fue una generosa donación del Dr. Xavier Jordana, Universidad Católica de Chile.

### 3.-Mantención de las cepas

#### a) Placas de agar

Las cepas mesofílicas se mantuvieron en placas de agar al 2% preparadas en medio Luria (LB) a 4°C. Cuando fue necesario, se agregó además 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.

Las cepas de bacterias termofílicas se mantuvieron en placas de agar al 2% preparadas en medio de cultivo ATTC a 4°C.

#### b) Glicerol 50%

Alícuotas de cultivos crecidos hasta la fase estacionaria, fueron mezclados con un volumen de glicerol 100% estéril, mantenidas a temperatura ambiente por al menos 3 h y luego de permanecer a 4°C durante toda la noche, fueron guardadas a -20°C.

#### **4.-Ensayo de actividad de la endonucleasa *Bst*VI**

Uno a dos  $\mu\text{g}$  del DNA sustrato, fueron incubados durante 15 min a  $65^\circ\text{C}$  con 2  $\mu\text{l}$  de enzima (0,15 mg/ml) en un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y NaCl 50 mM en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ . La reacción fue detenida con una mezcla de detención, que consistió de 2  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, glicerol 50% (v/v) y azul de bromofenol 0,010% (p/v). Luego del ensayo, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% (p/v) y se desarrolló la electroforesis horizontal en condiciones estándar (Sambrook y cols., 1989). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir la digestión completa de 1  $\mu\text{g}$  de DNA sustrato en 1 h, a  $65^\circ\text{C}$ , en un volumen de reacción de 15  $\mu\text{l}$ .

#### **5.- Ensayo de protección del DNA sustrato por la metilasa *Bst*VI**

Se incubó 1-2  $\mu\text{g}$  de DNA sustrato con *M.Bst*VI a  $50^\circ\text{C}$  por 30 min en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 10 mM y SAM 100  $\mu\text{M}$ . A continuación, se adicionó 2,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  100 mM y 10  $\mu\text{l}$  de endonucleasa *Bst*VI (0,15 mg/ml) y se incubó por 20 minutos adicionales a  $65^\circ\text{C}$ . La reacción se detuvo con 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de detención y fue analizada por electroforesis en geles de agarosa, como se describió más arriba. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que protege totalmente 1  $\mu\text{g}$  de DNA sustrato de la digestión por *Bst*VI, en 1 h a  $50^\circ\text{C}$  en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ .

### **6.-a) Búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa *Bst*VI**

51 g de células recombinantes (peso húmedo) del clon JM107/P<sub>1</sub> (r<sup>+</sup>m<sup>-</sup>) (crecidas hasta una DO<sub>660</sub> de 1.0-1.2), fueron resuspendidas en 200 ml de un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 2 mM, NaCl 150 mM y rotas por sonicación a máxima intensidad 10 veces por períodos de 30 seg, dejando intervalos de 1 min entre cada pulso de sonicación. El proceso se llevó a cabo manteniendo en todo momento la muestra a 0°C. Los restos celulares se descartaron por dos centrifugaciones sucesivas de 15 minutos a 10.000 x g. El sobrenadante obtenido fue tratado con sulfato de estreptomicina al 1% (concentración final) y mantenido en hielo por 10 min. Los ácidos nucleicos fueron sedimentados a 10.000 x g y el nuevo sobrenadante aplicado directamente en una columna de DEAE-celulosa (90 ml) equilibrada previamente en el mismo amortiguador. Las proteínas adsorbidas a la resina fueron eluidas con soluciones salinas sucesivas (100 ml cada uno) de 0,2, 0,3, 0,6, 0,8 y 1,0 M NaCl. Cada fracción fue dializada y alícuotas de ellas fueron combinadas con 2 unidades de endonucleasa *Bst*VI purificada y se preincubaron a 60°C por diferentes períodos de tiempo previo al ensayo endonucleolítico, que se realizó en las condiciones descritas en el punto 3 de Métodos.

### **b) Búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa *Bst*VI usando cultivos marcados diferencialmente**

Células de *E. coli* que portaban el plasmidio P<sub>1</sub> y células que portaban el vector pBluescript-SK fueron cultivadas separadamente (100 ml cada uno)

hasta una  $DO_{600}$  de 0.8 y se les adicionó 1 mCi de glicina- $^3H$  y/o 1 mCi glicina- $^{14}C$ , respectivamente. Luego de 3 h, los cultivos fueron centrifugados y los sedimentos celulares combinados y rotos por sonicación. Se preparó un extracto que fue cargado en una columna DEAE-celulosa (3 ml), seguida inmediatamente por una columna de hidroxilapatita (2 ml). A continuación, se lavaron ambas columnas, se separaron y se eluyeron independientemente con gradientes salinos apropiados. La radiactividad fue determinada en alícuotas de cada fracción por centelleo líquido y ensayadas para actividad *Bst*VI.

#### **7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS**

Se utilizó la técnica descrita por Laemmli (1970) modificada para minigeles. El gel de separación se preparó colocando 4 ml de una solución de acrilamida al 12% (p/v), bisacrilamida 0,32 % (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH 8,0, SDS 0,1% (p/v), persulfato de amonio 0,05% (p/v) y TEMED 0,003% (v/v), entre placas de vidrio (8 x 10 cm) separadas por espaciadores de 0,8 mm. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente. A continuación, se preparó el gel de concentración, agregando 1,5 ml de una solución que contenía acrilamida 3% (p/v), bisacrilamida 0,08% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfato de amonio 0,013% (p/v) y TEMED 0,06% (v/v). El amortiguador de corrida fue una solución de Tris-HCl 125 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). La muestra fue mezclada 1:1 con el amortiguador de carga (Tris-HCl 0,135 M pH 6,8, SDS 5% (p/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,001% (p/v), y hervida por 2 min a baño maría previo a su carga en el gel.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 mA (corriente constante) durante 30 a 40 min a temperatura ambiente. El gel fue teñido a temperatura ambiente con una solución que contenía isopropanol 25% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y azul de Coomassie 0,1% (p/v). Para desteñir el gel, se utilizó ácido acético 10% (p/v).

### **8.- Determinación de la concentración de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). Este fue aplicado para determinar el contenido de proteínas de los extractos crudos, fracciones obtenidas luego del paso por la columna DEAE-celulosa e hidroxilapatita, así como también en las soluciones de *BstVI* empleadas como antígeno. Como patrón se utilizó lisozima de huevo.

### **9.-Inmunotransferencia de proteínas**

Las proteínas se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturantes, como está descrito en el punto 6 de Métodos y luego se siguió el protocolo descrito por Harlow y Lane (1988), con algunas modificaciones. El gel con las proteínas se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (9 x 5 cm), a una corriente constante de 100 mA en una solución de Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 0,93 M y metanol 20% (v/v) durante 1 h. La membrana, fue luego bloqueada durante 1 h con leche descremada 2% (p/v) preparada en PBS 1X. Luego se incubó la membrana con el primer anticuerpo (suero anti-endonucleasa *BstVI* o suero anti-metilasa *BstVI*, según el caso) a 37°C por 1 h, utilizando las diluciones predeterminadas preparadas en PBS (NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l pH 7,4)1X. Después, se sometió a varios lavados con una solución de Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS 1X, para luego adicionar el segundo anticuerpo, anti-IGg de conejo conjugado con fosfatasa alcalina preparado en cabra, a una dilución 1:1000 y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación. La membrana fue lavada y finalmente se reveló con 20 ml de una solución que contenía tampón sustrato de la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) más NBT 0,1 mg/ml y BCIP 0,05 mg/ml, sumergiéndola de 5 a 10 min. Como controles positivos se utilizó enzimas puras (*Bst*VI y/o *M. Bst*VI).

#### **10.- Preparación de anticuerpos**

Se tomó 2 conejos de experimentación (3 kg cada uno adquiridos en el Instituto de Salud Pública) y fueron inoculados (uno con 850 µg de *Bst*VI y otro con 550 µg de *M. Bst*VI) cada 10 días respectivamente durante un mes, la primera inoculación se realizó con coadyuvante de Freund completo y las siguientes con coadyuvante incompleto luego de lo cual se esperó 10 días más para obtener aproximadamente 100 ml de sangre de cada uno de ellos por sección de la yugular. La sangre se dejó 3 h a 37°C hasta que se retrajo el coágulo. El suero fue extraído y después se centrifugó a 27.000 x g por 15 min, recuperándose 30 ml de suero.

#### **11.- Purificación de los anticuerpos**

Se tomó 10 ml de suero y se centrifugó durante 30 min a 5.000 x g. El precipitado se descartó y el sobrenadante se agitó suavemente a temperatura ambiente mientras se le adicionaba lentamente 1/2 volumen de una solución

de sulfato de amonio saturado 33% (previamente ajustado a pH 7,0) en PBS 5 mM. Esta mezcla se dejó toda la noche con agitación suave a 4°C. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 30 min y nuevamente se descartó el precipitado. El sobrenadante fue tratado otra vez con sulfato de amonio saturado 33% en las mismas condiciones. La diferencia en este caso es que la mezcla se dejó sin agitación a 4°C durante 6 h y se centrifugó a 5.000 x g por 30 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y se conservó el sedimento, el cual fue resuspendido en 1 ml de una solución de PBS 1X y dializado toda la noche contra el mismo amortiguador.

## **12.- Preparación de esferoplastos**

### **a) Tratamiento de las células con CaCl<sub>2</sub>**

Se cultivó 500 ml de células de *E. coli* recombinantes (clones P<sub>1</sub>, S<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) como se describe en el punto 1 de Métodos. El cultivo fue crecido hasta una DO<sub>660</sub> de 1.2-1.4 y se centrifugó a 3.000 x g por 10 min, obteniéndose 1 g de células (peso húmedo). Estas fueron inmediatamente suspendidas en 1 ml de tampón A (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, 2-ME 1 mM) y se les adicionó 2 ml de una solución fresca de CaCl<sub>2</sub> 50 mM dejándose 30 min en hielo. Luego se centrifugaron a 4.000 x g por 10 min. El sobrenadante, correspondiente a la fracción periplásmica, se dializó contra tampón A por 3 h y luego se procedió a determinar la actividad de *Bst*VI (Métodos, sección 4), PEPCK y LDH (en las condiciones recomendadas por los proveedores). El sedimento obtenido fue resuspendido en el mismo tampón y la suspensión se sonicó a máxima intensidad 10 veces por períodos de 30 s, dejando intervalos de 1 min entre cada pulso de sonicación. Los restos celulares fueron

eliminados por centrifugación durante 15 min a 7.500 x g. El sobrenadante obtenido en este caso (conteniendo las proteínas de los esferoplastos) fue utilizado para determinar las actividades enzimáticas indicadas más arriba. Como control, se utilizó las mismas células sin tratar con la solución de  $\text{CaCl}_2$  50 mM, las que fueron directamente suspendidas y rotas por sonicación como se describió.

#### **b) Tratamiento osmótico**

Células (1 g peso húmedo) de los clones  $P_1$  y SK, fueron resuspendidos en tampón A que contenía sacarosa 20% (p/v) y se agitaron suavemente por 20 min a temperatura ambiente. Luego, las células fueron centrifugadas a 6.000 x g por 10 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se suspendió en una solución de  $\text{MgCl}_2$  0.1 mM y se agitó suavemente durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las células se centrifugaron a 4.000 x g por 10 min y el sobrenadante (conteniendo las proteínas periplásmicas), fue utilizado para la determinación de las actividades enzimáticas *Bst*VI, PEPCK y LDH como se describió en el punto anterior. El sedimento fue resuspendido y roto por sonicación como se describió en el punto anterior y en el sobrenadante (conteniendo las proteínas de los esferoplastos) también fueron determinadas las actividades enzimáticas mencionadas. El control en este caso fueron células sin tratar con las soluciones de 20% (p/v) sacarosa y de  $\text{MgCl}_2$  0.1 mM.

#### **13.- Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión**

Se utilizó la metodología descrita por Harlow y Lane (1988), descrita para

aislar proteínas desde sistemas bacterianos que las sobreexpresan como cuerpos de inclusión.

Cultivos bacterianos (500 ml) de los clones P<sub>1</sub> y SK, fueron centrifugados independientemente a 7.000 x g durante 5 min. Las células se resuspendieron en 10 ml de tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) conteniendo 1 mg/ml de lisozima, y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Se sedimentaron otra vez a 5.000 x g por 10 min. El sobrenadante se guardó para determinar actividad *Bst*VI (fracción periplásmica). Los esferoplastos se resuspendieron en 5 ml de tampón B más DOC 0,1 % (p/v) y se dejaron en hielo por 10 min con agitación ocasional. Luego de esto, se les adicionó MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 8 mM y 4 µl de DNAasa I (10 µg/ml). La mezcla se incubó a 4°C hasta que desapareció la viscosidad y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. Este nuevo sobrenadante (fracción citosólica soluble) se calentó a 60°C por 10 min para inactivar la DNAasa I y coagular las proteínas mesofílicas de *E. coli*, se centrifugó como antes y se guardó para determinar actividad *Bst*VI. El sedimento, conteniendo teóricamente cuerpos de inclusión, se lavó con 6 ml de tampón B que contenía Tritón X-100 1% (v/v). Después de centrifugar a 5.000 x g, el sobrenadante se guardó para determinar actividad enzimática.

A continuación, el sedimento se suspendió en 500 µl de tampón B y se sonicó a máxima intensidad 10 veces por períodos de 1 min, dejando intervalos de 30 s entre cada pulso de sonicación. Luego se centrifugó a 4°C en una microcentrífuga Eppendorf durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado para determinación de actividad enzimática *Bst*VI.

#### 14.- Transformación de células

Inóculos de células de *E. coli* JM107, LE392 y/o ES1301*mutS* fueron crecidos toda la noche. Un ml de estos cultivos fueron utilizados para inocular 50 ml de medio de cultivo Luria y se incubaron con agitación a 37°C hasta que alcanzaron una  $DO_{660}$  de 0.6-0.7 (aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/ml). Las células fueron enfriadas en un baño de hielo y centrifugadas a 8.000 x g por 5 min. El sedimento celular fue suspendido en una solución estéril y fría de  $CaCl_2$  50 mM y luego de 20 min en hielo, se centrifugó en las mismas condiciones. Las células competentes se suspendieron en 1 ml de  $CaCl_2$  50 mM.

El proceso de transformación se llevó a cabo mezclando 200  $\mu$ l de células competentes con 0,5-1  $\mu$ g de DNA. Esta mezcla se incubó durante 30 min en un baño de hielo y posteriormente, fue sometida a un pulso térmico de 1 min a 42°C. Finalmente, fue inoculada en 2 ml de medio Luria y se incubó 1 h a 37°C con agitación. Una alícuota de la mezcla se rastrilló en una placa Luria con ampicilina 100  $\mu$ g/ml y se incubó toda la noche a 37°C. Las colonias transformantes se traspararon a placas frescas para luego verificar la transformación por determinación de actividad *Bst*VI o *M.Bst*VI y por minipreparaciones de DNA.

#### 15.- Infección de *E. coli* con bacteriófago lambda cI857

Dos ml de medio de cultivo Luria-ampicilina (100  $\mu$ g/ml) suplementado con sacarosa 0,2% y  $MgSO_4$  10 mM, fueron inoculados con 2  $\mu$ l de una suspensión celular (LE392, LE392/SK, LE392/P<sub>1</sub>, LE392/E<sub>3</sub>, LE392/C<sub>5</sub>, *mutS*/SK, *mutS*/P<sub>1</sub>, *mutS*/E<sub>3</sub>), y se crecieron hasta una  $DO_{660}$  de 0.6. A una

alícuota de 100 µl de estas células, se agregó 100 µl de una dilución del fago (1:50.000), se mezcló y se dejó a 37°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de adsorción del fago, se procedió a adicionarle 3 ml de agar blando (preincubado a 45-50°C) y la mezcla se vertió sobre una placa de Luria-ampicilina, se dejó solidificar y se incubó toda la noche a 37°C.

#### **16.- Inducción de la esporulación de *B. stearrowthermophilus* V**

Se cultivó *B. stearrowthermophilus* V en 500 ml de medio Müeller-Hinton con una agitación vigorosa a 65°C hasta una  $DO_{660}$  de 1-2. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5.000 x g y transferidas a medio de esporulación, el que contenía  $K_2HPO_4$  (6 g/l),  $(NH_4)_2SO_4$  (1 g/l),  $MnSO_4$  (g/l),  $KNO_3$  (1 g/l) y NaCl (5 g/l). Una alícuota de la suspensión celular fue extraída inmediatamente, sedimentada por centrifugación y guardada a -20°C (células vegetativas). El resto del cultivo se siguió incubando a 37°C con agitación y se tomó muestras a intervalos de tiempo de 2 h. El proceso de esporulación fue seguido por microscopía óptica, utilizando tinción con verde de malaquita.

#### **17.- Purificación de RNA**

RNA total de *B. stearrowthermophilus* V fue aislado de acuerdo al método fenol/guanidinio descrito por Sambrook y cols. (1989), con modificaciones menores.

50 ml de cultivo fueron sedimentados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. El sedimento celular fue suspendido en 1 ml de solución estéril Tris-HCl pH 7,6 100 mM, EDTA 20 mM, 2-ME 100 mM e isotiocianato de

guanidinio 4M. Se adicionó 1 volumen de fenol saturado frío y se mezclaron las fases por agitación en un vórtex. Para destruir el DNA, la mezcla fue pasada varias veces a través de una jeringa y centrifugada a 10.000 x g por 10 min. La fase acuosa fue recuperada y transferida a un tubo estéril y extraída 2 veces con fenol/CHCl<sub>3</sub> (1.1 v/v). Los ácidos nucleicos fueron precipitados agregando 3 volúmenes de etanol 95% (v/v). Después de 2 h a -20°C, la mezcla fue centrifugada a 12.000 x g por 15 min. El sedimento fue secado y resuspendido en 0,5 ml de agua estéril. Además, el RNA fue purificado por precipitaciones selectivas con una solución de acetato de sodio 3 M pH 5,2. Finalmente, el RNA se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

### **18.-Análisis de Northern**

El método utilizado fue el descrito por Sambrook y cols. (1989). Se preparó un gel de agarosa al 1,8% (p/v), disolviendo 5,4 g de agarosa en 30 ml de tampón MOPS 1 X (0,2 M ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico, 0,05 M acetato de sodio pH 7,0, EDTA 0,01 M), y 216 ml de agua destilada estéril. Se fundió la agarosa y se dejó enfriar hasta 50°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se adicionaron 54 ml de formaldehído 38% (v/v), después se agitó y se vertió sobre el lecho de la cámara electroforética. Una vez gelificada la agarosa, la electroforesis se desarrolló a 80 V en un sistema tamponante MOPS 1 X.

RNA total (10 µg) obtenido de células en los distintos estadios de esporulación en 20 µl de tampón de muestra (1X MOPS, formamida 50% (v/v), formaldehído 2,2 M), fueron incubados a 65°C por 5 min y luego, enfriados rápidamente en hielo. Se adicionó a cada muestra 4 µl de tampón

de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0.25% (p/v), ficoll 15% (p/v)) y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído. Luego, el gel fue embebido en tampón 20 X SSC (NaCl 175,3 g/l, citrato de sodio 88,2 g/l pH 7.0) por 30 min. Luego fue transferido a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>), mediante capilaridad, utilizando como fase móvil tampón 20 X SSC durante 16 h.

El RNA fue inmovilizado a la membrana por exposición a luz UV (254 nm) en un transiluminador Fotodyne durante 15 s. Luego, la membrana fue prehibridada por 3 h a 42°C sumergiéndola en una solución que contenía formamida 50% (v/v), SSC 6X, Denhardt 5 X (Denhardt, 1966), SDS 1% (p/v) y DNA de espermio de salmón desnaturado a una concentración final de 100 µg/ml. Luego de este procedimiento, la solución de prehibridación fue suplementada con una sonda marcada con <sup>32</sup>P que correspondió a un fragmento de DNA *SalI-PstI* de 809 pb que contiene una zona del gen *bstVIM* (Vásquez y cols., 1991; González y Vásquez, 1993). La hibridación se mantuvo durante 14 h a 42°C. Una vez hibridadas, las membranas fueron lavadas con SSC 2X, SDS 0,1% (p/v) y luego, con SSC 0,5 X, SDS 0,1% (p/v), ambos lavados durante 30 min cada uno a 65°C. Finalmente, la membrana fue puesta en contacto con una película de rayos X. La exposición se prolongó por un período de 24 - 48 h a -80°C.

## RESULTADOS

### 1.- Descripción molecular del plasmidio pP<sub>1</sub>

Con la finalidad de descartar completamente la presencia de actividad metilásica *M.BstVI* en el clon P<sub>1</sub>, se realizaron varias aproximaciones experimentales para demostrar la condición r<sup>+</sup>m<sup>-</sup> del mismo. Por un lado, extractos crudos de esta bacteria no mostraron actividad *M.BstVI* (no mostrado). Por otro, se preparó DNA del plasmidio pP<sub>1</sub> y se analizó con enzimas de restricción. Como se observa en la Figura 1, al digerir pP<sub>1</sub> en forma independiente con las enzimas isosquizoméricas *XhoI* y *BstVI*, en ambos casos se obtuvo la forma lineal del plasmidio. Este resultado indicó que no existen sitios de reconocimiento 5'-CTCGAG-3' en el fragmento clonado y que la forma lineal se obtiene por hidrólisis del único sitio blanco presente en el vector pBluescript-SK. Dado que el plasmidio pP<sub>1</sub> contiene también una pequeña porción de la región carboxilo terminal de la metilasa *M.BstVI* (Vásquez y cols., 1991) y aún cuando se desconoce si ésta se transcribe y/o traduce, estos resultados además demostraron que este DNA recombinante no fue modificado *in vivo*. El elemento extracromosomal fue digerido a continuación con las enzimas *EcoRI* y *PstI*, liberándose el fragmento de 1.44 kb predicho por la secuencia de DNA (Figura 1c). Una digestión triple *EcoRI/PstI/HindIII* generó los dos fragmentos de 792 y 651 pb correspondientes.

### 2.- Anticuerpos anti-endonucleasa *BstVI* y anti-metilasa *M.BstVI*

Con la finalidad de disponer de otra herramienta que permitiera estudiar estas proteínas, se preparó en conejo anticuerpos contra las enzimas del SMR de



**Figura 1: Análisis de restricción del plasmidio recombinante que contiene el gen *bstVIR***

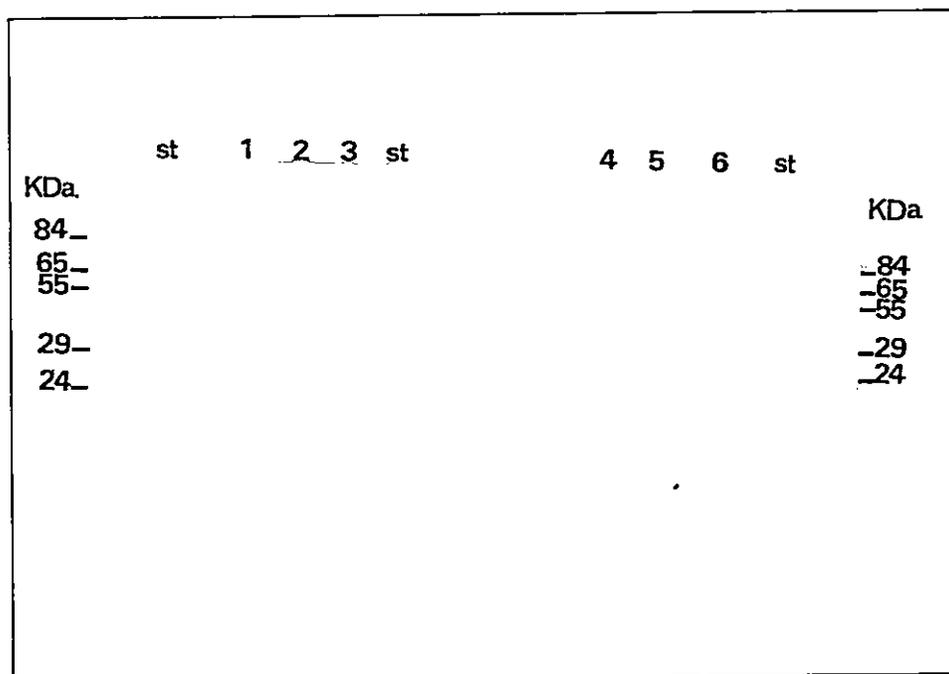
Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de digestión del plasmidio pP<sub>1</sub> con c) *Xho*I; d) *Bst*VI; e) *Eco*RI + *Pst*I; f) e + *Hind*III. El carril a) contiene estándares de tamaño (1kb ladder) y b) contiene plasmidio pP1 sin digerir.

*B. stearothermophilus* V como se describió en Métodos, sección 10. Ello se logró inyectando enzimas puras obtenidas de células de *E. coli* recombinantes. En la Figura 2, se muestra la especificidad de los anticuerpos obtenidos.

El número mínimo de unidades de endonucleasa que resultaron detectables con el anticuerpo fue de 700, suponiendo que la enzima es 100% activa. Esta cantidad de unidades correspondió a 5 µg de la preparación de enzima purificada (Figura 3). La dilución del anticuerpo utilizada fue de 1: 10.000. Dado que evidencias previas del laboratorio habían sugerido una expresión regulada del gen *bstVIM* en *B. stearothermophilus* V (Barra y cols., 1988), la presencia de la metilasa *M.BstVI* fue monitoreada con el anticuerpo específico en células recombinantes (clon H<sub>1</sub>) que habían sido cosechadas en diferentes etapas del ciclo de crecimiento. Como se observa en la Figura 4, una cantidad equivalente de metilasa fue detectable en los diferentes extractos. Estos datos indican una expresión aparentemente constitutiva de la enzima en *E. coli*, sugiriendo una pérdida de la regulación de la expresión de esta enzima, a diferencia de lo que ocurre en el huésped homólogo.

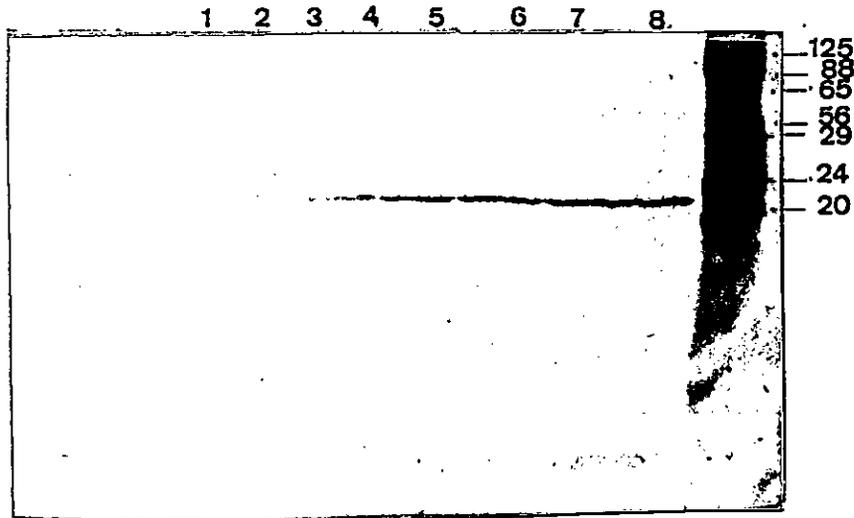
### **3.- Evaluación y búsqueda de una actividad inhibitoria de la endonucleasa *BstVI* en *E. coli***

Resultados obtenidos en el laboratorio, indicaban que al cromatografiar extractos de clones productores de endonucleasa *BstVI* en columnas de DEAE-celulosa, la proteína no era retenida y la actividad se recuperaba en el material no adsorbido (Figura 5, carril c). Al titular la actividad endonucleásica en esta fracción, se recuperaba un 20-25 % más de unidades que las que se habían cargado originalmente en la columna. De este modo, se



**Figura 2: Especificidad de los anticuerpos anti-*BstVI* y anti-*M.BstVI***

Las enzimas *M.BstVI* (carril 1) y *BstVI* (carril 5) purificadas y extractos de los clones  $r^{+}m^{+}$  (carril 3),  $r^{+}m^{-}$  (carril 4) y  $r^{-}m^{-}$  (carriles 2 y 6) fueron sometidos a electroforesis en geles PAGE-SDS y transferidos a membranas de nitrocelulosa, como se describió en Métodos sección 9, y tratadas con anticuerpos anti-*M.BstVI* (A) o anti-*BstVI* (B). Los carriles que contienen estándares de peso molecular se encuentran indicados (St).



**Figura 3: Determinación de la cantidad mínima de endonucleasa *Bst*VI detectable por inmunotransferencia.**

Concentraciones crecientes de la endonucleasa purificada fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% en presencia de SDS, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas con anticuerpos policlonales anti-*Bst*VI preparados en conejo. Carriles 1-8: 1, 2, 5, 8, 16, 20, 24 y 30  $\mu$ g de proteína pura. (AE = 143.290). A la derecha se muestran estándares de peso molecular.



**Figura 5: Ensayo enzimático de la endonucleasa *Bst*VI en las fracciones retenidas y no retenidas en DEAE-celulosa. Electroforesis en gel de agarosa (1%).**

Carriles: a, fracción eluída de la columna con un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contuvo NaCl 0,5 M; b) fracción eluída de la columna con un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 que contuvo NaCl 1,0 M; c) fracción no retenida en DEAE celulosa; d) control positivo de digestión con 1 U de *Bst*VI purificada. El DNA sustrato correspondió al plasmidio híbrido pBR322-pTF62 (Vásquez y cols., 1981).

decidió indagar la existencia de algún factor de tipo inhibitorio que pudiese haber quedado retenido. Con este objeto y tratando de enriquecer la preparación en el putativo factor inhibitorio, se trabajó con un extracto crudo preparado a partir 51 g de células de clon P1 ( $50 \times 10^6$  U de *Bst*VI), lo que representa 5-6 veces la cantidad de material con el que se inicia rutinariamente la preparación de la enzima. Como se esperaba, la actividad endonucleolítica no se retuvo en la columna de DEAE-celulosa y fue recuperada en el eluido no retenido. El material retenido por otra parte, fue liberado con lavados salinos y cada una de estas fracciones, fue ensayada para una actividad inhibitoria en presencia de 2 U de endonucleasa purificada. Se realizaron preincubaciones fracción-endonucleasa tanto a 37°C como a 60°C previo al ensayo de digestión propiamente tal (Métodos, sección 4). Los resultados se muestran en la Figura 6 e indican, por lo menos en estas condiciones, la ausencia de un inhibidor detectable de la endonucleasa *Bst*VI. Estos experimentos fueron repetidos con las muestras dializadas y/o calentadas con idénticos resultados. Tratando de evitar la dilución inherente del putativo inhibidor en el volumen de cada lavado salino (100 ml), columnas equivalentes fueron desarrolladas con gradientes salinos lineales, colectándose fracciones de 2 ml. Sin embargo, aun así no fue posible detectar una actividad inhibitoria de la endonucleasa.

Considerando lo anterior, se decidió recurrir a otro protocolo experimental con el mismo propósito. Se marcó diferencialmente dos cultivos de *E. coli*, uno con glicina-<sup>3</sup>H que contenía células que portaban el plasmidio pP<sub>1</sub> y otro con glicina-<sup>14</sup>C, correspondiente a células que llevaban el vector p-Bluescript-SK como se indicó en Métodos, sección 5. Ambos sedimentos celulares fueron combinados y se preparó un extracto crudo, el que fue cromatografiado



**Figura 6: Determinación de una posible actividad inhibitoria de la endonucleasa *Bst*VI.**

51g de células del clon P<sub>1</sub> fueron suspendidas en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 2 mM, NaCl 150 mM y rotas por sonicación. Los restos celulares fueron descartados por centrifugación. Los ácidos nucleicos fueron sedimentados a 10.000 x g y el nuevo sobrenadante cargado en una columna de DEAE-celulosa (90 ml). Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con lavados salinos sucesivos (100 ml c/u) de 0,2, 0,3, 0,6,0,8,1,0 M NaCl y posteriormente con fosfato de potasio 1,0 M. Cada fracción fue combinada con 2 U de endonucleasa *Bst*VI purificada y preincubada a 60°C previo al ensayo endonucleolítico. Carriles 1 y 4: controles no digeridos; carril 2: control positivo de digestión ; carril 3: fracción 0,3 M NaCl; carril 5: fracción 0,6 M NaCl; carril 6: fracción 0,8 M NaCl. En los carriles 1-3, el sustrato fue DNA de fago lambda digerido con *Hind*III y en los carriles 4-6, DNA de fago lambda no digerido con *Hind*III.

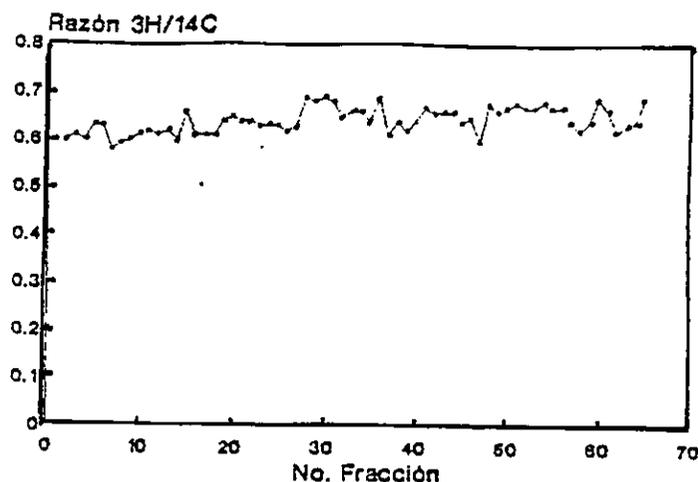
en DEAE-celulosa. El material adsorbido fue eluído con un gradiente salino lineal. La fracción no retenida (conteniendo la actividad endonucleásica) en cambio, se cargó inmediatamente en una columna de hidroxilapatita y se resolvió con un gradiente de fosfato. Los resultados de ambas cromatografías se muestran en la Figura 7. Se esperaba que la expresión selectiva de alguna(s) proteína(s) en el clon P1, pudiese ser evidenciada como una desviación positiva de la razón  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ . Como se puede apreciar en la Figura 7, no se encontró desviaciones significativas de ella, salvo en aquella zona del gradiente de la columna de hidroxilapatita que contiene la actividad endonucleásica (fracciones 36-48).

No obstante los resultados anteriores, cada fracción de ambas columnas fue ensayada para una actividad inhibitoria como se indicó más arriba. En estas condiciones, tampoco fue posible detectar una actividad inhibitoria de la enzima *Bst*VI que ayudase a explicar la viabilidad de los clones  $r^+m^-$ .

#### **4.- Evaluación de la secreción de la endonucleasa *Bst*VI en *E. coli***

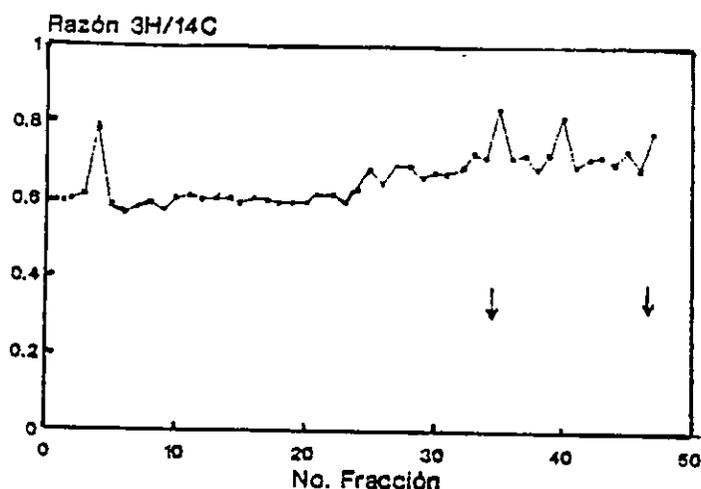
Otro mecanismo posible de protección del DNA celular en células cuyo fenotipo es  $r^+m^-$ , podría estar representado por la exportación de la endonucleasa, ya sea al espacio periplásmico o al medio extracelular. De este modo, la célula evitaría así la interacción de la enzima con el DNA cromosomal y por lo tanto, su consiguiente degradación (autorrestricción). Ya que observaciones preliminares habían permitido detectar actividad endonucleolítica en los medios sobrenadantes de los cultivos celulares luego de sedimentar las células por centrifugación, se decidió entonces evaluar la secreción de la enzima para lo cual se preparó esferoplastos mediante tres aproximaciones experimentales diferentes: tratamiento de las células con

## DEAE-CELULOSA RAZON 3H/14C



34

## HIDROXILAPATITA RAZON 3H/14C



**Figura 7: Determinación de la putativa actividad inhibitoria *BstVI* usando cultivos diferencialmente marcados.**

Células de *E. coli* que portaban el plasmidio P<sub>1</sub> o el vector p-Bluescript-SK fueron cultivadas (100 ml c/u) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,8 y se les adicionó 1mCi de glicina-<sup>3</sup>H y glicina-<sup>14</sup>C, respectivamente. Luego de 3 h a 37°C con agitación, los cultivos fueron centrifugados, los sedimentos mezclados y rotos por sonicación. Se preparó un extracto de acuerdo a lo descrito en Métodos, sección 5 y se cargó en una columna de DEAE-celulosa (3 ml), seguida por una columna de hidroxilapatita (2 ml). Luego de lavar, se eluyeron en forma independiente con gradientes salinos adecuados. La radiactividad en alícuotas de cada fracción fue determinada por centelleo líquido y ensayadas para actividad *BstVI*. Asimismo, cada fracción fue ensayada para una actividad inhibitoria de la endonucleasa como se describió antes. Las flechas indican la zona de elución de la endonucleasa *BstVI*(fracciones 36-48).

lisozima, soluciones de cloruro de calcio 50 mM (Tabla I) y golpes osmóticos (Tabla II), de acuerdo a lo descrito en Métodos, sección 12.

Como se observa en la Tabla I, la casi totalidad de la actividad endonucleásica se encuentra en la fracción particulada (correspondiente a los esferoplastos) y sólo un 4% en el espacio periplásmico. El mismo porcentaje de la actividad total se encontró presente en el medio extracelular. Con la finalidad de descartar la posible contribución de una ruptura celular involuntaria a estas cifras, en las mismas fracciones se ensayó la actividad de enzimas citosólicas como PEPCCK y LDH. Los datos indicaron que las células no se estarían rompiendo en estas condiciones experimentales. Resultados idénticos a los mostrados en la Tabla I fueron obtenidos al preparar esferoplastos con lisozima.

En lo relativo a los golpes osmóticos y al igual que en la situación anterior, en la Tabla II se observa que un 90% de la actividad de la endonucleasa *Bst*VI se encuentra en el interior de las células y sólo un 4% de ella en la fracción periplásmica. De este modo entonces, si bien es cierto que un fenómeno de secreción de la enzima podría contribuir en parte a la integridad del genoma celular, los resultados mostrados en esta sección no apuntan a este mecanismo como el principal responsable de la viabilidad de células r<sup>+</sup>m<sup>-</sup>.

##### **5.- Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión en *E. coli***

A pesar que la endonucleasa se detecta en la fracción soluble por un lado, y dado que muchas proteínas foráneas se insolubilizan al ser sobreexpresadas en huéspedes heterólogos por otro (Mitraki y King, 1989; Schein, 1989; Kirfhaber y cols., 1991), se exploró la posibilidad que una gran parte de la enzima se encontrase formando agregados en la célula que podrían

## Tabla I

### Evaluación de la secreción de la endonucleasa *Bst*VI Tratamiento con CaCl<sub>2</sub>

Fracción	<i>Bst</i> VI (U/mg)	% actividad	PEPCK (U/mg)	LDH (U/mg)
Control 1	0	0	0,048	0,031
Control 2	2162	100	0,052	0,027
Sedimento	2500	116	0,056	0,031
Sobrenadante	111	4	0,008	0,003

Las células fueron tratadas con una solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y los esferoplastos sedimentados por centrifugación, como se describió en Métodos, sección 12. El sobrenadante conteniendo las proteínas periplásmicas fue utilizado para la determinación de las actividades enzimáticas mostradas en la Tabla. Control 1: extracto de células clon SK, conteniendo sólo el vector; control 2: extracto de células de clon P<sub>1</sub> sin tratar con CaCl<sub>2</sub>.

## Tabla II

### Evaluación de la secreción de la endonucleasa *Bst*VI Tratamiento con sacarosa

Fracción	<i>Bst</i> VI (U/mg)	% Actividad	PEPCK (U/mg)	LDH (U/mg)
Control 1	0	0	ND	0,023
Control 2	7401	100	0,022	0,021
Sedimento	6546	89	0,021	0,018
Sobrenadante	250	4	0,004	0,005

Células de clon P<sub>1</sub> fueron tratadas con una solución de sacarosa (20%) tamponada, centrifugadas y resuspendidas en una solución de MgCl<sub>2</sub> 0,001 M. Luego de 20 min de agitación a 25°C, se centrifugaron y el sobrenadante conteniendo proteínas periplásmicas fue utilizado para la determinación de las actividades enzimáticas. El sedimento fue sonicado y en el sobrenadante también fueron determinadas las actividades enzimáticas mostradas en la Tabla. Control 1: extracto de células clon SK; control 2: extracto de células de clon P<sub>1</sub> no sometidas al tratamiento osmótico.

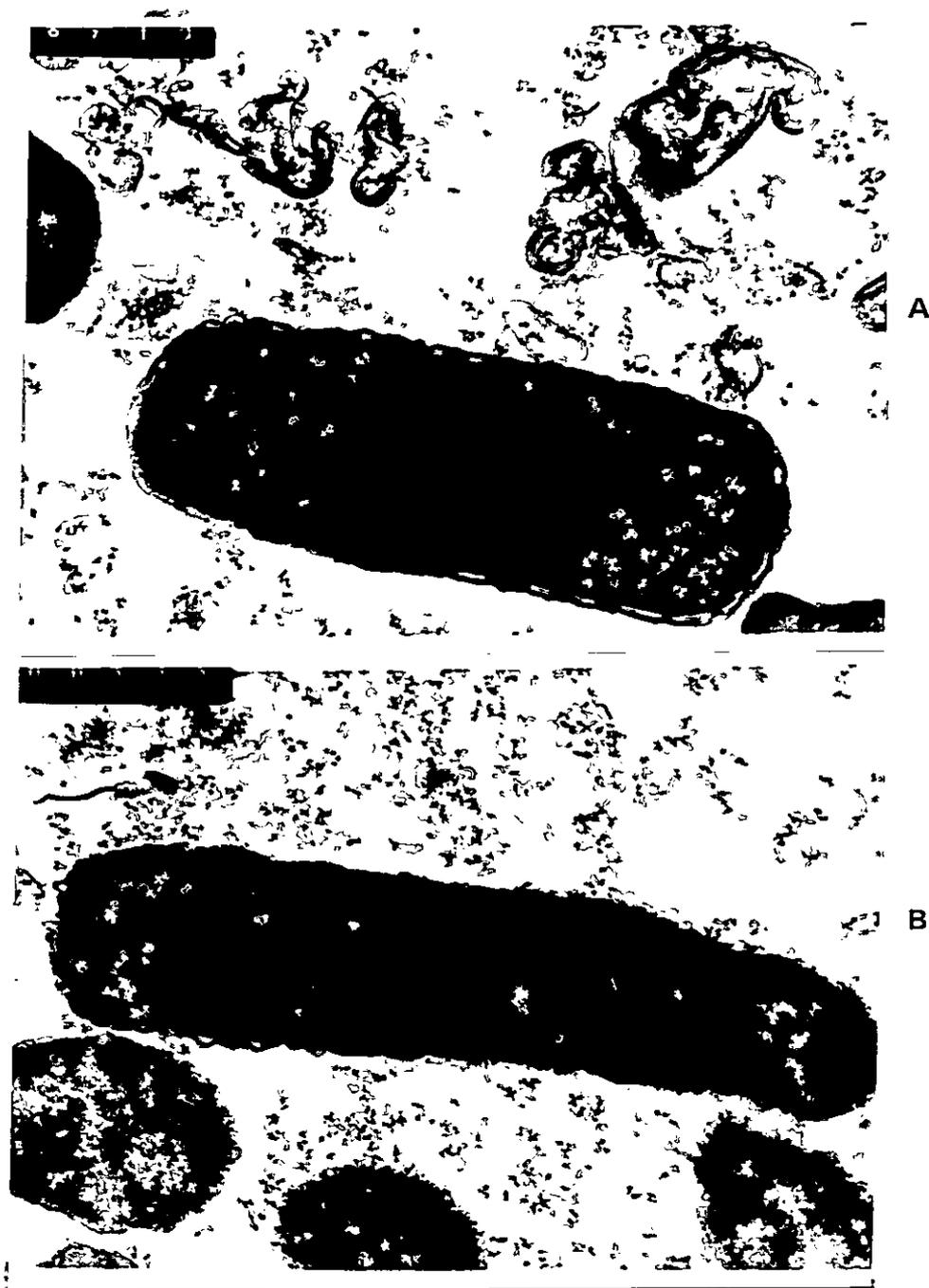
solubilizarse después de la ruptura. Micrografías electrónicas de preparaciones de células que albergan sólo el vector p-Bluescript-SK y de células que portan el gen *bstVIR*, no presentaron evidencias de la formación de cuerpos de inclusión (Figura 8). Tampoco se encontró este tipo de agregados cuando se recurrió a un protocolo estándar de purificación (Métodos, sección 13).

#### 6.- Evaluación de la restricción *in vivo* por parte del sistema *BstVI* en *E. coli*

Una serie de observaciones hechas con los cultivos indicaban que el clon P<sub>1</sub> crecía más lento que la bacteria que porta sólo el vector de clonamiento. Como esto era indicativo de que el sistema de modificación-restricción podría estar funcionando aunque no óptimamente, se decidió evaluar el comportamiento de la actividad endonucleásica *in vivo* mediante un ensayo de restricción a la infección por bacteriófago lambda.

Para poder realizar estos experimentos, fue necesario en una primera etapa transferir por transformación el sistema *bstVIRM* ya sea completo ( $r^+m^+$ ) o el plásmido P<sub>1</sub> ( $r^+m^-$ ), además del vector control desde *E. coli* JM107 (o *E. coli* JM109) a células que fuesen permisivas a este fago. Se utilizó en estos ensayos la cepa de *E. coli* LE392.

Como se observa en la Tabla III, la eficiencia de plaqueo obtenida cuando se infectó diferentes clones  $r^+m^-$  (clones P<sub>1</sub>, C<sub>5</sub> y S<sub>4</sub>), fue indistinguible de la de los controles  $r^-m^-$ . Una argumento para explicar la casi nula restricción observada podría ser que la enzima termoestable no esté funcionando a su



**Figura 8: Evaluación de la formación de cuerpos de inclusión**

A: Micrografía electrónica de células de *E. coli* JM107 conteniendo el vector p-Bluescript-SK; B: Micrografía electrónica de células del clon recombinante JM107/P<sub>1</sub> (aumento 20.000 X).

**Tabla III**  
**Determinación de la restricción *in vivo* por parte del sistema *BstVI***

Cepa huésped	% del Control
LE 392 (r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> )	100%
LE 392/ SK (r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> )	115%
LE 392/ P <sub>1</sub> (r <sup>+</sup> m <sup>-</sup> )	98%
LE 393/ C <sub>5</sub> (r <sup>+</sup> m <sup>-</sup> )	95%
LE 392/ S <sub>4</sub> (r <sup>+</sup> m <sup>-</sup> )	97%

Células de *E. coli* LE392 fueron infectadas con bacteriófago lambda cI857 en condiciones estándar descritas en Métodos e incubadas a 37°C por 16 h, luego de lo cual se contabilizaron las placas de lisis. Los resultados representan la media de 4 determinaciones independientes.

temperatura más adecuada en *E. coli*. Esto se investigó introduciendo cambios en la temperatura de adsorción del fago a las células, incluyéndose en este caso también ensayos de infección a células que albergan el sistema de restricción-modificación completo (clon  $E_3$ ,  $r^+m^+$ ).

Al igual que en el caso anterior, no se observó restricción por parte del clon  $P_1$  a  $37^\circ\text{C}$ , la que sin embargo, aumentó en un 10 y 20% con respecto al control cuando la adsorción del fago se llevó a cabo a  $42$  y a  $47^\circ\text{C}$ , respectivamente (Tabla IV). En el caso del clon  $E_3$ , la eficiencia de plaqueo disminuyó a un 70, 58 y 30% de la del control cuando la experiencia se realizó a  $37$ ,  $42$  y  $47^\circ\text{C}$ , respectivamente (Tabla IV, Figura 9).

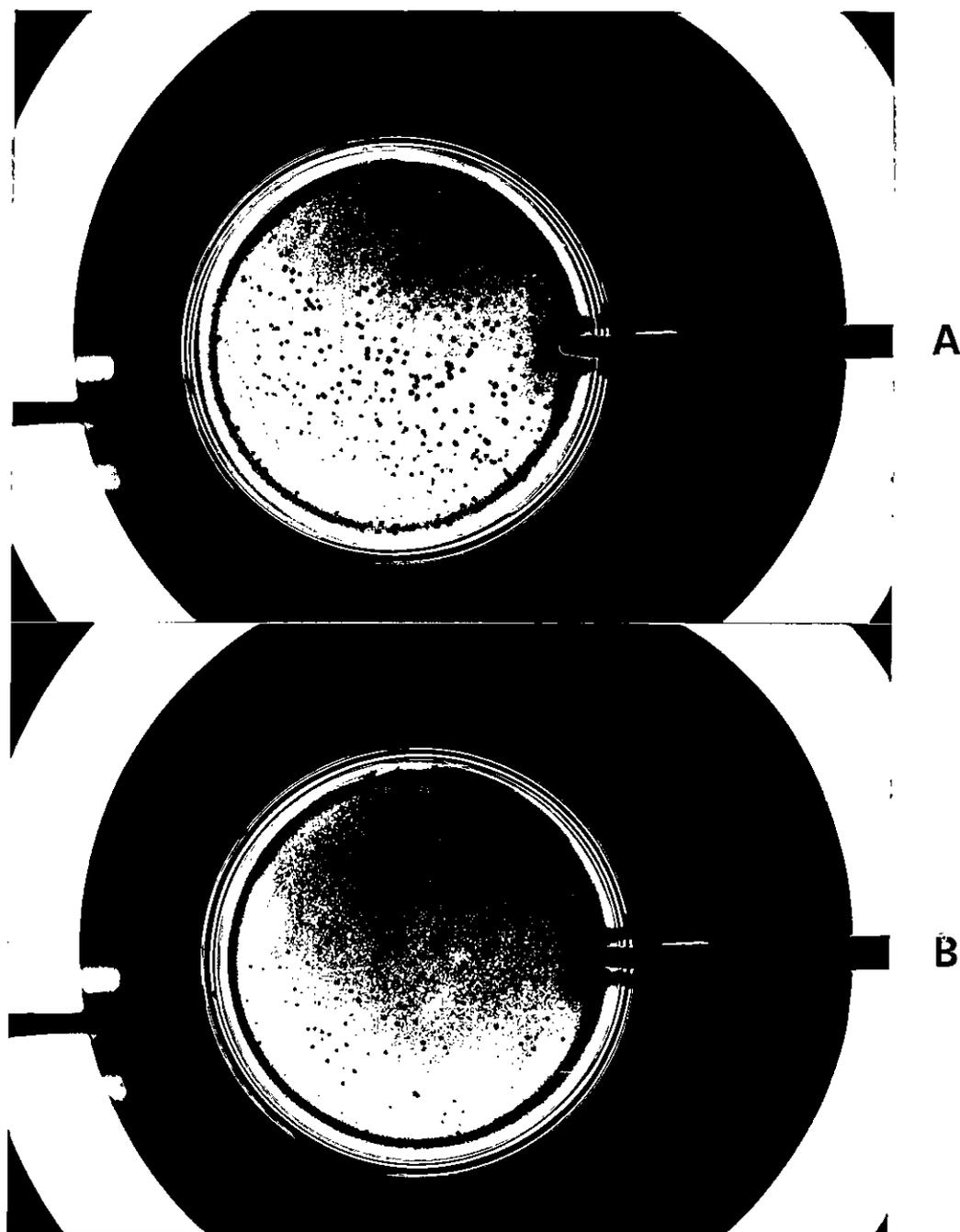
Estos resultados sugieren que al adsorber el fago a temperaturas cada vez mayores, la enzima termofílica tendría consecuentemente una mayor posibilidad de degradar el DNA viral entrante, lo cual se vería reflejado en una disminución de la eficiencia de plaqueo (aumento de la restricción en este caso). Sin embargo, ellos no explican las diferencias observadas entre los clones  $P_1$  y  $E_3$ .

Razonando que el sistema de reparación de DNA del huésped podría ser un factor determinante que podría contribuir a la viabilidad de los clones  $r^+m^-$ , se utilizó otra estrategia para evaluar la restricción *in vivo* por parte del sistema *Bst*VI. Esta consistió en utilizar como huéspedes a células de *E. coli mutS* (deficientes en el sistema de reparación del DNA). De este modo, se transformaron independientemente células de *E. coli* 1301*mutS* con DNA de los clones  $E_3$  y  $P_1$ . Aún cuando teóricamente este tipo de transformantes no sería viable, se obtuvo clones con baja eficiencia ( $7,3 \times 10^{-3}$  y  $2,7 \times 10^{-3}$  para

**Tabla IV**  
**Determinación de la restricción *in vivo* por parte del sistema *Bst*VI a diferentes temperaturas**

<i>E. coli</i>	Eficiencia de plaqueo (% del control)		
	37°C	42°C	47°C
LE 392 (r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> )	100%	100%	100%
LE 392/ SK (r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> )	105%	100%	102%
LE 392/ E <sub>3</sub> (r <sup>+</sup> m <sup>+</sup> )	70%	58%	30%
LE 392/ P <sub>1</sub> (r <sup>+</sup> m <sup>-</sup> )	101%	90%	81%

Las distintas cepas huésped fueron infectadas con bacteriófago  $\lambda$  cI857, en las condiciones descritas en Métodos, sección 15. 100  $\mu$ l de células se mezclaron con 100  $\mu$ l de una dilución del fago (1:50.000) y se preincubó a 37°C durante 30 min. A continuación, se continuó con la adsorción del fago a 37, 42 y 47°C por otros 15 min. Transcurrido este tiempo, se agregó agar blando y la mezcla se vació sobre una placa de agar (2%) preparada en medio Luria conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml), se dejó solidificar y se incubó toda la noche a 37°C. Los valores mostrados en la Tabla representan el promedio de 4 determinaciones independientes.



**Figura 9:** Determinación de la restricción *in vivo* por parte del clon E<sub>3</sub> (r<sup>+</sup>m<sup>-</sup>)

La adsorción del fago se llevó a cabo a 37°C (A) y a 47°C (B).

los plasmidios pE<sub>3</sub> y pP<sub>1</sub>;frec.transf.SK10<sup>4</sup>transf./μgDNA) en que la presencia de estos plasmidios recombinantes fue confirmada por análisis de restricción. Por otro lado, en extractos crudos de estos clones se identificó las actividades enzimáticas *in vitro* M.BstVI (células/pE<sub>3</sub>) y BstVI (células/pP<sub>1</sub> y células/pE<sub>3</sub>). Para analizar la situación *in vivo*, se recurrió a infectar independientemente ambos tipos de células con el bacteriófago λ, como se describió antes. Los resultados se muestran en la Tabla V. En este caso, se observó una fuerte restricción por parte de ambos clones, en que la eficiencia de plaqueo disminuyó a 1,4 y a 3,5 % de la del control, respectivamente.

## **7.-Estudios en *B. stearothermophilus* V**

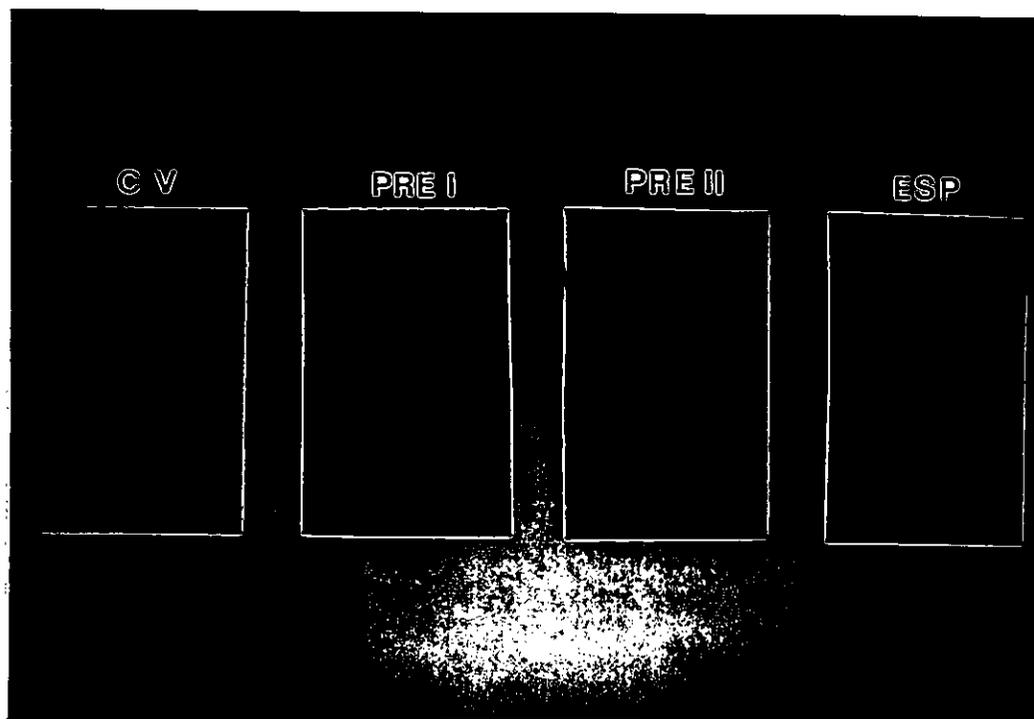
### **a.- Inducción de la esporulación**

La esporulación no ha sido caracterizada ni genética ni bioquímicamente en esta bacteria. Sin embargo, innumerables intentos llevaron a que la inducción de la esporulación resultase en un evento altamente sincrónico, obteniéndose un rendimiento del 90% de las células en el estado deseado siguiendo las condiciones descritas en Métodos, sección 16. Utilizando microscopía óptica, se pudo definir cuatro estadios bien característicos del proceso: células vegetativas (CV) y células en estadios temprano (PRE I), intermedio (PRE II) y tardíos de esporulación (ESP). En el estadio PRE I, las células se presentaban parejamente teñidas y agrupadas al azar. En el estadio PRE II, las bacterias se caracterizaron por una acumulación de colorante en los polos y adoptaron una disposición más o menos de cadena. Finalmente, en el estadio ESP, la endospora resultaba claramente visible y las células se arreglaban en forma de empalizada (Figura 10). Por estos criterios, los

**Tabla V**  
**Determinación de la restricción *in vivo* del SMR de *B. stearothermophilus* V utilizando como huésped células de *E. coli mutS***

<i>E. coli</i>	% del Control
<i>mutS</i> /SK ( $r^-m^-$ )	100,0
<i>mutS</i> /P <sub>1</sub> ( $r^+m^-$ )	3,5
<i>mutS</i> /E <sub>3</sub> ( $r^+m^+$ )	1,4

Las células de *E. coli* ES1301*mutS* recombinantes fueron infectadas con bacteriófago  $\lambda$  cI857, en las condiciones descritas en Métodos, sección 15 e incubadas a 37°C por 12 h. Luego se contabilizaron las placas de lisis. Los resultados representan la media de 4 determinaciones independientes.



**Figura 10: Células de *B. stearothermophilus* V en distintos estadios del ciclo esporulativo**

Células vegetativas (CV) y células en estadios tempranos (PRE I), intermedio (PRE II) y esporulado (ESP), teñidas con verde de malaquita y safranina, como lo indican las flechas (aumento 10.000 X).

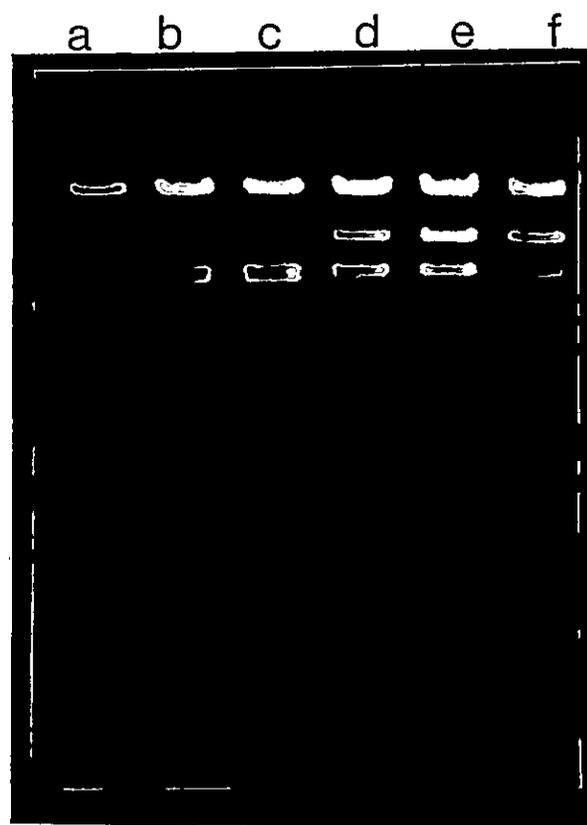
estadios PRE I, PRE II y ESP de *B. stearothermophilus* V (los cuales ocurren a las 12, 36 y 60 h después del inicio de la inducción de la esporulación), resultan equivalentes a los estadios de esporulación I, III-IV y VI-VII de *B. subtilis*, respectivamente (Piggot y Coote, 1976; Losick y cols., 1986; Errington, 1993).

#### **b.- Cuantificación de las actividades del sistema *BstVI* en los distintos estadios del proceso esporulativo de *B. stearothermophilus* V**

Las actividades enzimáticas del sistema *BstVI* fueron ensayadas en extractos preparados a partir de células cosechadas en los distintos estadios de esporulación definidos anteriormente. Ambas actividades fueron detectadas sólo en células en estadio vegetativo CV ( Figuras 11 y 12, carril c). Al titular la enzima en ellos, se obtuvo actividades específicas de  $15.000 \pm 1.500$  para la endonucleasa y de  $600 \pm 64$  para la metilasa. Sólo un 10% de estos valores se encontraron en células en estadio PRE I (Figuras 11 y 12, carril d). Estos resultados podrían reflejar la inusual resistencia a la desnaturación de estas enzimas o bien, la presencia de pequeñas cantidades de células aún en estado CV. No se detectó actividad de endonucleasa o metilasa en extractos celulares obtenidos de células en estadios PRE II o ESP ( Figuras 11 y 12, carriles e y f).

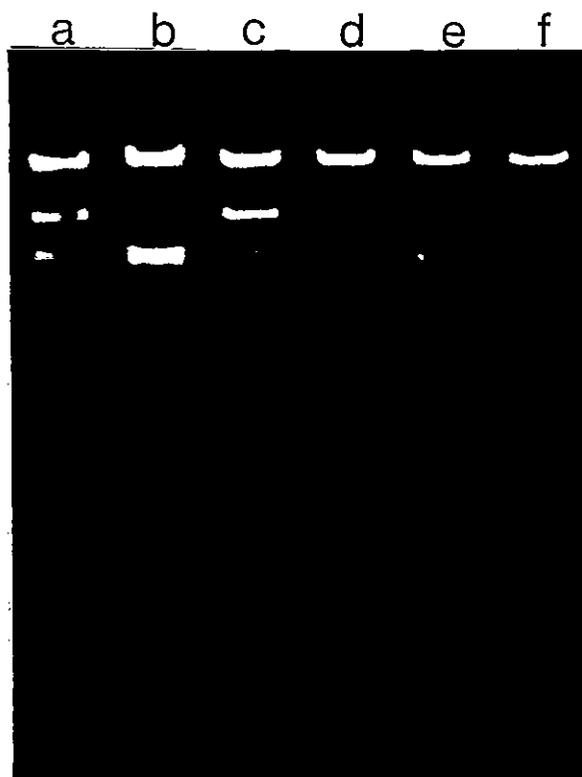
#### **c.- Expresión *in vivo* del gen *bstVIM* en *B. stearothermophilus* V**

La expresión *in vivo* del gen *bstVIM* fue investigada por la técnica de hibridación Northern, de acuerdo a lo descrito en Métodos, sección 18. Las



**Figura 11: Determinación de la actividad endonucleasa *Bst*VI en distintos estadios de esporulación de *B. stearothermophilus* V**

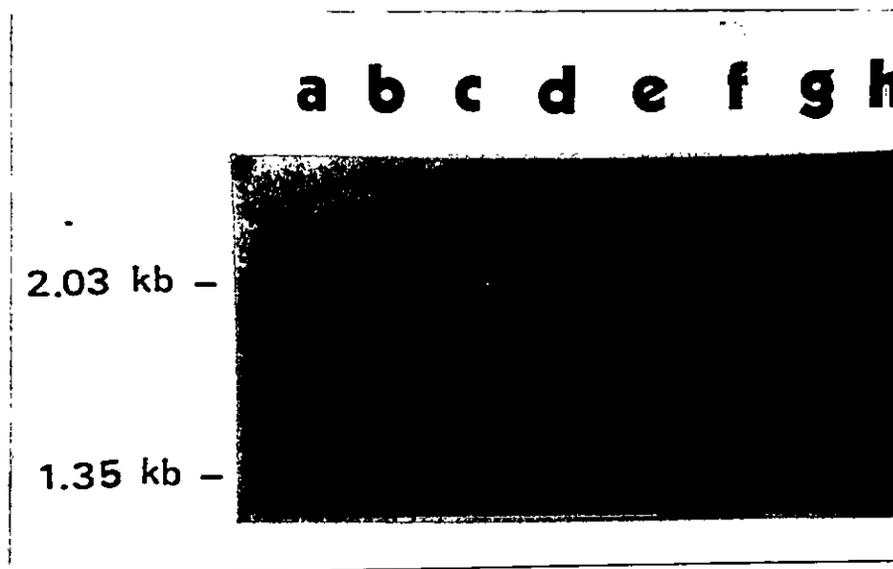
El DNA sustrato fue DNA de fago  $\lambda$  digerido con endonucleasa *Hind*III. Carriles a) control sin digerir; b) control positivo de digestión; c) - f) digestión con extractos obtenidos a partir de células en estadios vegetativo (CV), temprano (PRE I), intermedio (PRE II) y esporulado (ESP), respectivamente.



**Figura 12: Determinación de la actividad M.BstVI en los distintos estadios de esporulación de *B. stearrowthermophilus* V**

El DNA sustrato fue DNA de fago  $\lambda$  digerido con la endonucleasa *Hind*III. Carriles a) control positivo de metilación; b) control positivo de digestión c) - f) metilación con extractos obtenidos a partir de células en estadios vegetativo (CV), temprano (PRE I), intermedio (PRE II) y esporulado (ESP), respectivamente.

muestras de RNA total fueron obtenidas a partir de bacterias cosechadas en los distintos estadios de esporulación mencionados más arriba. Alícuotas de preparaciones independientes de RNA obtenido de células en cada uno de los estadios, fueron sometidas a electroforesis en paralelo en geles de agarosa-formaldehído y fueron transferidos a membranas de nylon. Como sonda se utilizó un fragmento de DNA *SalI-PstI* de 809 pb marcado con  $^{32}\text{P}$ , el que contiene parte de la región codificante del gen *bstVIM* (Vásquez y cols., 1991; nucleótidos 479-1288 en Figura 1 de González y Vásquez, 1993). Se encontró señales de hibridación positiva sólo con RNA total aislado de células en estadio vegetativo (Figura 13, carriles a y b). La banda en cuestión representa un transcrito de aproximadamente 1900 nucleótidos, tamaño esperado para el mRNA de la metilasa *M.BstVI*. No se detectó hibridación de la sonda con muestras de RNA de bacterias aisladas de los estadios PRE I, PRE II o ESP (Figura 13, carriles c-h). Este resultado por lo tanto, sugiere fuertemente que la expresión *in vivo* del gen *bstVIM* está restringida al estadio de crecimiento vegetativo de *B. stearothermophilus* V.



**Figura 13: Expresión *in vivo* del gen *bstVIM* en *E. coli***

Muestras de RNA total de *B. stearothermophilus V* colectadas en estadios vegetativo CV (a-b), intermedio PRE I (e-f) y esporulado ESP (g-h) fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1,8% y procesados para autoradiografía como se indicó en Métodos, sección 18. A la izquierda se indican estándares de peso molecular.

## DISCUSION

Dada la utilidad que las endonucleasas de restricción han ofrecido desde su descubrimiento a los investigadores, el interés en el clonamiento de sus genes estructurales ha tenido prácticamente dos vertientes: una académica y una económica. Así, aún cuando técnica y teóricamente es más "fácil obtener" los genes de DNA metil transferasas, la carrera por clonar clones productores de endonucleasas de restricción ha seguido una dinámica más acelerada que aquella que se ha dado en el caso de sus correspondientes metilasas homólogas.

### ESTUDIOS EN *E. coli*

En nuestro laboratorio, y dada la estrecha proximidad de *bstVIR* y *bstVIM*, fue posible obtener ambos genes del sistema de modificación-restricción *BstVI* en un segmento de DNA cromosomal único de *Bacillus stearothermophilus* V de 4,4 kpb (Vásquez y cols., 1991; González y Vásquez, 1993). Durante el posterior subclonamiento de dichos genes en *E. coli*, se obtuvo sorprendentemente clones cuyo fenotipo era  $r^+m^-$ . Sorprendentemente, porque en el contexto de la teoría del funcionamiento de los SMR, la viabilidad de estos clones no sería posible. De hecho, una idea bien aceptada es que toda bacteria productora de endonucleasa(s) de restricción debiese especificar la(s) metilasa(s) de modificación correspondiente(s), de modo de proteger así el DNA cromosomal del huésped de la autorrestricción inminente (Roberts, 1990; Wilson, 1991;

Bickle y Krüger, 1993). De este modo, los objetivos de esta Tesis estuvieron enfocados a tratar de identificar mecanismo(s) alternativo(s) a la modificación del DNA por metilación, para explicar la protección del DNA cromosomal de *E. coli* frente a la potencial restricción por parte de la endonucleasa de restricción heteróloga *BstVI*.

Dado que resultados preliminares obtenidos durante la purificación de la enzima así lo aconsejaban, en primer lugar se realizó una búsqueda de un posible inhibidor de la actividad endonucleásica. Esta aproximación resultaba razonable ya que en la literatura existen datos sobre mecanismos de antirrestricción desarrollados por algunos bacteriófagos, particularmente los fagos T3 y T7. En ellos, el producto del gen 0.3 codifica para una proteína inhibitoria, llamada Ocr. Esta proteína se une a las enzimas de tipo I y bloquea ambas actividades, tanto la endonucleásica como la metilásica. Sin embargo, ella resulta inactiva contra enzimas de tipo II (Bogdarina y cols., 1983; Bandyopadyay y cols., 1985).

Brevemente, la enzima *BstVI* no es retenida en resinas cromatográficas como DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex (Figura 5). Por el contrario, la actividad endonucleásica se recupera en el material no retenido y en un número mayor de unidades (20-25%) que las aplicadas originalmente a la columna. Esto sugirió la retención en ella de algún tipo de factor inhibitorio de la actividad, probablemente de naturaleza proteica. En este contexto, es necesario puntualizar dos cosas: primero, el putativo inhibidor debiese estar codificado en el fragmento de *B. stearothermophilus* V clonado. Es poco probable que alguna proteína de *E. coli* juegue un rol de antirrestricción y precisamente de ésta especificidad en particular. Segundo, para obviar la posibilidad que este

inhibidor se encontrase en muy baja cantidad, se inició su búsqueda a partir de un mayor número de células de *E. coli* recombinantes (5-6 veces más que las utilizadas normalmente para purificar la endonucleasa *BstVI*).

Las proteínas retenidas en la columna de DEAE-celulosa fueron eluidas mediante lavados o gradientes salinos y cada fracción obtenida, luego de ser desalinizada, fue ensayada para detectar una actividad inhibitoria al ser adicionada a ensayos de restricción con la enzima *BstVI* purificada. En todas las condiciones ensayadas que incluyeron diferentes temperaturas, tiempos, extractos de proteína, no permitieron detectar actividad inhibitoria (Figura 6).

Otra aproximación experimental abordada para identificar un inhibidor de la enzima, fue la marcación diferencial *in vivo* de proteínas. Cultivos del clon P<sub>1</sub> y de células que contenían solamente el vector de clonamiento, fueron crecidos en presencia de glicina-<sup>3</sup>H y de glicina-<sup>14</sup>C, respectivamente. Los extractos celulares obtenidos fueron combinados y cromatografiados en columnas de intercambio iónico. Las fracciones obtenidas se monitorearon para la detección de <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C y se calculó la razón <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C. La idea era que la expresión diferencial de un polipéptido inhibitorio en el clon P1 pudiese ser detectada por desviaciones positivas de ésta razón. Sin embargo, la razón fue constante para la gran mayoría de las fracciones, excepto y como se esperaba, para aquella región del gradiente de la columna de hidroxilapatita donde eluye la endonucleasa *BstVI* (Figura 7, fracciones 36-48). Los resultados de estos estudios no permitieron detectar la presencia de elementos inhibitorios de *BstVI* en éstas condiciones (Resultados, sección 3).

Por otro lado, se evaluó si existía por parte de *E. coli* una secreción de la endonucleasa hacia el medio externo o una compartimentalización de la

misma en el espacio periplásmico. Esta podría representar una estrategia para proteger el genoma de la enzima *BstVI*. Existen antecedentes que avalan esta posibilidad, como es el caso de las endonucleasas *TthI* y *PstI*, las que son rápida y fácilmente purificadas luego de tratamientos osmóticos (Venegas y cols., 1980; Walder y cols., 1981). En nuestro caso, se recurrió a la obtención de esferoplastos a partir del Clon P<sub>1</sub> mediante tratamientos con CaCl<sub>2</sub> (o lisozima) y osmóticos, utilizando sacarosa. El CaCl<sub>2</sub> se ha utilizado clásicamente para preparar células competentes de *E. coli*. Durante el tratamiento, se ha comunicado que se produce una extensiva pérdida de material periplásmico (Bergmans y cols., 1981). En ambos casos, fue posible detectar actividad enzimática en la fracción correspondiente al espacio periplásmico. No obstante, ella no fue superior al 4% de la actividad remanente en el interior de las células. Estos resultados descartaron este compartimento como el sitio principal de almacenamiento de esta enzima (Tablas I y II).

Aun cuando la endonucleasa *BstVI* fue encontrada sistemáticamente en la fracción soluble de los extractos, la posibilidad que ésta enzima forme en algún grado cuerpos de inclusión (CI), fue igualmente investigada. Esto se realizó pensando en el hecho que proteínas foráneas sobreexpresadas en huéspedes heterólogos pueden ser concentradas en estructuras intracelulares como CI (Schein, 1989; Kirfhaber y cols., 1991; Moore y cols., 1993). Luego de reiterados intentos de detección de los posibles agregados macromoleculares, no fue posible observar CI, lo que concuerda con la presencia de la enzima en las fracciones solubles. Además, como en teoría los CI son fácilmente identificables por microscopía electrónica, se recurrió

también a esta técnica para corroborar lo anterior. Las micrografías electrónicas correspondientes no evidenciaron la presencia de CI (Figura 8 A y B). La posibilidad de la formación de microagregados sin embargo, no puede ser descartada. En este sentido, la disponibilidad de *BstVI* marcada con agentes opacos a los electrones, permitiría la investigación de este punto mediante inmuno microscopía electrónica.

Tomando en cuenta que no fue posible detectar una actividad inhibitoria y que tampoco se trataría aparentemente de un fenómeno de secreción de la endonucleasa, se exploró la alternativa de que la proteína fuese inactiva *in vivo*. Para ello se recurrió a un ensayo de restricción a la infección por fago lambda. Con este propósito, tanto el vector de clonamiento como diversas construcciones plasmidiales conteniendo el gen *bstVIR*, fueron transferidas individualmente por transformación a *E. coli* LE392. Se obtuvo una alta y muy similar eficiencia de plaqueo del fago en todos los casos (la restricción a la infección fue de sólo un 2-5%, Tabla III). Estos valores son relativamente bajos comparados con sistemas que restringen fuertemente la propagación de bacteriófagos. Este resultado sugiere fuertemente que la enzima es incapaz de degradar el DNA viral, así como tampoco el DNA cromosomal y/o plasmidial del huésped. De este modo, ella no estaría cumpliendo el rol fisiológico de defensa que se supone este tipo de enzimas tiene (Bickle y Krüger, 1993; Roberts y Macelis, 1997). Sin embargo, como se trata de un huésped heterólogo y el gen *bstVIR* provino de una bacteria termofílica, es probable que la enzima exhibiese a la temperatura de crecimiento del huésped (37°C), solo una fracción de la actividad que exhibe a su temperatura óptima de funcionamiento *in vitro* (60-65°C). Cabe hacer notar que la temperatura

óptima de crecimiento del huésped homólogo, *B. stearothermophilus* V, es precisamente 65°C (Vásquez, 1985).

En virtud de lo anterior, se realizó el mismo experimento de infección, pero ésta vez se aumentó la temperatura durante el período de adsorción del fago, con el objeto de permitirle a la enzima una mayor oportunidad de restringir el DNA viral. Los resultados indicaron que efectivamente la enzima restringe mejor mientras mayor es la temperatura a la cual se realiza la adsorción del virus (Tabla IV). Dado que el clon  $r^+m^+$  produce 10 veces más endonucleasa que el clon  $P_1$  (Vásquez, resultados no publicados), se esperaba un valor de restricción aproximadamente 10 veces mayor en el primero. Como se observa en la Tabla IV, éste apenas superó las 3 veces. Esta discrepancia puede tener una explicación en el hecho que algunas partículas virales podrían ser metiladas por la enzima *M.BstVI* presente en el clon  $E_3$ , evitando así la restricción y permitiendo la propagación de ellas. Estos mismos resultados fueron avalados más tarde por ensayos de restricción *in vitro*, en los cuales se demostró que la enzima *BstVI* exhibe a 37°C aproximadamente un 10% de la actividad que tiene a 60°C (Vásquez, resultados no publicados).

La viabilidad de las células  $r^+m^-$  entonces, se podría explicar en parte debido a que a la temperatura de crecimiento del huésped heterólogo, la enzima exhibiría sólo una fracción pequeña de su actividad. En este sentido se hace necesario mencionar que probabilísticamente existen al menos 250 sitios *BstVI* (CTCGAG) en el DNA cromosomal de *E. coli*, es decir, más o menos uno cada 4.096 pb. Todo esto sin considerar que existe uno de estos sitios por cada molécula de plasmidio  $pP_1$  o  $pE_3$ . De este modo, aun cuando la enzima esté actuando con un 10% de eficiencia, la posibilidad de encontrar un sitio

blanco en todo momento es grande. En este punto podrían tener importancia los mecanismos de reparación del DNA, los cuales sí se encontrarían trabajando a su temperatura "normal" de funcionamiento en *E. coli*. Para investigar la posible participación de alguno de estos mecanismos en el fenómeno observado, se decidió utilizar la misma aproximación experimental anterior, pero utilizando esta vez una cepa de *E. coli* defectuosa en reparación de DNA que se encontraba disponible en el laboratorio.

Fue necesario entonces transferir primero y en forma individual los plasmidios pP<sub>1</sub> y pE<sub>3</sub> a esta nueva cepa. La gran dificultad inicial observada en la transformación de *E. coli* 1301*mutS* con estos plasmidios, sugería fuertemente que la endonucleasa estaba causando algún grado de daño en la célula. Sin embargo, teniendo en cuenta las bajas frecuencias de transformación obtenidas, la posibilidad que se haya seleccionado un mutante defectuoso en la producción de endonucleasa y/o resistente al fago no puede ser descartada. Aun cuando la experiencia se llevó a cabo a 37°C (temperatura a la cual la enzima casi no restringe, ver más arriba) por un lado, y a que la cepa utilizada no era la más apropiada por otro, los resultados obtenidos fueron sorprendentes. Ellos indicaron que la restricción al fago aumentó significativamente, tanto por parte del clon r<sup>+</sup>m<sup>-</sup> como por parte del clon que alberga el SRM completo (Tabla V). Para el análisis de los resultados, es necesario tener también en cuenta que las lesiones introducidas por la endonucleasa *in vivo* son supuestamente cortes en ambas hebras en la secuencia blanco, con la concomitante generación de segmentos de DNA de una hebra (4 bases 5' salientes). Como esto representa más de una señal de daño al genoma, la concurrencia de otros sistemas de reparación en los

resultados obtenidos, no puede ser tampoco descartada. En este sentido, se requeriría realizar experimentos de transformación con cepas cuyas características genotípicas permitan obtener conclusiones más claras con respecto a la participación del sistema de reparación del DNA en los resultados obtenidos. Células de *E. coli* con deficiencias en el sistema de escisión-reparación (por ejemplo mutantes en los genes *uvrA*, *B* y/o *C*) por un lado, podrían representar una alternativa viable. Otra posibilidad sería utilizar células del tipo *lexA*<sup>-</sup>. Sin embargo, éstas no serían las más adecuadas, dada la amplia participación de este represor transcripcional en el fenómeno de reparación del DNA.

Finalmente, cabe destacar que aún cuando se utilicen las cepas adecuadas, no está garantizado que éstas resulten viables al ser transformadas con los plasmidios que codifican el gen *bstVIR*.

### ESTUDIOS EN *B. stearothermophilus* V

Experiencias previas desarrolladas en nuestro laboratorio, sugerían una expresión modulada del gen *bstVIM*, ya que mostraban que la actividad metilásica estaba restringida al crecimiento exponencial de la bacteria (Barra y cols., 1988). Este antecedente, sumado al hecho que los clones *r*<sup>+</sup>*m*<sup>+</sup> de *E. coli* producen diez veces más endonucleasa que los clones *r*<sup>+</sup>*m*<sup>-</sup> por un lado, y a que los experimentos de restricción *in vivo* (realizados a temperaturas superiores a 37°C) mostraron que ésta aumentó en el caso del clon *r*<sup>+</sup>*m*<sup>+</sup> (Tabla V), se decidió estudiar la expresión de estos genes en el huésped homólogo durante el proceso esporulativo (esta decisión estuvo postergada

debido a la carencia de mutantes  $r^m^+$  y/o  $r^m^-$  de *B. stearothermophilus* V). La modulación de la expresión génica durante el ciclo de vida de la bacteria, es un fenómeno común a individuos del género *Bacillus*. En *B. subtilis* por ejemplo, están bien definidos los patrones de expresión diferencial de los genes en el proceso de esporulación (Piggot y Coote, 1976; Losick y cols., 1986). El fenómeno involucra la existencia de diferentes estructuras de promotor, las cuales son reconocidas por factores sigma específicos de la RNA polimerasa (Losick y Pero, 1981; Losick y cols., 1986; Helmann y Chamberlin, 1988; Errington, 1993).

Una vez que se determinó la secuencia nucleotídica del sistema *BstVI*, se identificó dos tipos de promotor río arriba de los genes *bstVIR* y *bstVIM* (González y Vásquez, 1993). Uno de ellos tiene una alta similitud con el promotor reconocido por el factor  $\sigma^E$  y el otro con el reconocido por el factor  $\sigma^A$  de la RNA polimerasa de *B. subtilis* (Helmann y Chamberlin, 1988). La presencia de promotores  $P^A$  y  $P^E$  sugería que los genes podrían expresarse en diferentes etapas del ciclo de vida de *B. stearothermophilus* V. Se supuso entonces que un mecanismo regulatorio similar al de *B. subtilis* (Losick y Pero, 1981; Losick y cols., 1986) podría tener lugar en *B. stearothermophilus* V para los genes del sistema *BstVI*.

Al determinar las actividades enzimáticas tanto de la metilasa como de la endonucleasa del sistema en los diferentes estados de esporulación, se observó que ellas eran detectables sólo en el estadio de crecimiento vegetativo. No fue posible identificarlas en células que habían alcanzado estadios intermedios o tardíos de esporulación (Figura 12).

Al investigar la expresión *in vivo* al menos del gen *bstVIM*, se detectó un

transcrito de aproximadamente 1.900 nucleótidos, tamaño esperable para un mRNA cuya secuencia parte cercana al bloque -10 del putativo promotor P<sup>A</sup> y termina en el terminador rho-independiente de este gen (González y Vásquez, 1993, Figura 12). Por lo tanto, la transcripción del gen *bstVIM* *in vivo* estaría restringida al estadio vegetativo del ciclo de crecimiento. Las razones en las cuales el putativo promotor P<sup>E</sup>, identificado para este gen no estaría funcional en *B. stearothermophilus* V, no fueron investigadas. Experimentos en esta y otras direcciones están siendo llevados a cabo actualmente en el laboratorio, particularmente en relación con la identificación de sitios funcionales en ambas enzimas por medio de la técnicas de mutagénesis sitio-dirigida y de la polimerasa en cadena (PCR).

## CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de Tesis son las siguientes:

- 1.- En nuestras condiciones, no fue posible asociar la viabilidad celular de los clones con la existencia de un inhibidor, un fenómeno de secreción o exportación de la proteína y/o con una compartimentalización de la endonucleasa *BstVI*.
- 2.- La endonucleasa *BstVI* restringe pobremente la multiplicación del bacteriófago lambda *in vivo* a 37°C, lo cual mejora notablemente al aumentar la temperatura de adsorción del fago.
- 3.- La expresión de ambas enzimas del SMR disminuye notablemente cuando las células de *B. stearothermophilus* V son inducidas a esporular.

## BIBLIOGRAFIA

Arber, W. y Dussoix, D. (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 5: 18-36.

Arber, W. (1965) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* V. The role of methionine in the production of host specificity. J. Mol. Biol. 11: 247-256.

Arber, W. y Linn, S. (1969) DNA modification and restriction. Annu. Rev. Biochem. 38: 467-500.

Arber, W. (1974) En "Progress in nucleic acid research and molecular biology", Chon, W.E., ed. (Academic Press, New York). Vol. 14, pp. 1-37.

Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P., Wilson, K. y Kokkinidis, M. (1994) Crystal Structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homology to *EcoRV*. Nature Struct. Biol. 1: 469-475.

Bandyopdhyay, P. y Studier, W. (1985) Inhibition of the type I restriction-modification enzymes *EcoB* and *EcoK* by the gene 0.3 protein bacteriophage T7. J. Mol. Biol. 182: 567-578.

Barra, R., Chiong, M., González, E. y Vásquez, C. (1988) A DNA-modification methylase from *Bacillus stearothermophilus* V. Biochem. J. 255: 699-703.

Bergmans, H., van Die, I. y Hoekstra, P. (1981) Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. J. Bacteriol. 146: 564-570.

Bickle, T. y Krüger, D. (1993) Biology of DNA Restriction. Microbiol. Rev. 57: 434-450.

Bogdarina, I., Reuter, M., Krüger, D., Buryanov, Y. y Baev, A. (1983) Methylation of DNA of phages T3 and T7 by various types of DNA-adenine methylases and inhibition of the *EcoK* methylase by the OCR protein. Dokl.

Akad. Nauk SSSR 273:234-237.

**Boyer, H. (1971)** DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 25: 153-176.

**Brooks, J. y Roberts, R. (1982)** Modification profiles of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 10: 913-934.

**Brooks, J., Landry, D., Szynter, L., Waite-Rees, P., Ives, C., Moran, L., Slatko, B. y Benner, J. (1991)** Characterization of the cloned *Bam*HI restriction-modification system: its nucleotide sequence, properties of the methylase, and expression in heterologous hosts. *Nucl. Acids Res.* 19: 841-850.

**Davis, L. y Harlow, E. (1988)** Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

**De Backer, O. y Colson, C. (1991)** Two-step cloning and expression in *Escherichia coli* of the DNA restriction-modification system *Sty*LTI of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173: 1321-1327.

**Denhart, D. (1966)** A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23:641-642.

**Ehrlich, M., Gama-Soza, M., Carreira, L., Ljungdahl, L., Kuo, K. y Gehrke, C. (1985)** DNA methylation in thermophilic bacteria: N-4 methylcytosine, 5-methylcytosine and N-6 methyladenine. *Nucl. Acids Res.* 13: 1399-1412.

**Erdmann, D., Horst, G., Düsterhöft, A. y Kröger, M. (1992)** Step-wise cloning and genetic organization of the seemingly unclonable *Hci*II restriction-modification system from *Herpetosiphon giganteus* strain *Hpg* using PCR technique. *Gene* 117: 15-22.

**Errington, J. (1993)** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of the gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57: 1-33.

**Giulian, G. (1985)** Resolution of low molecular weight polypeptides in a non-

urea sodium dodecyl sulfate slab polyacrylamide gel system. *Fed. Proc.* **44**: 686.

**Giulian, G., Moss, R. y Greaser, M. (1983)** Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. *Anal. Biochem.* **129**: 227-287.

**González, E., Padilla, C., Saavedra, C. y Vásquez, C. (1994)** The expression of the *bstVIM* gene from *Bacillus stearothermophilus* V is restricted to vegetative cell growth. *Microbiology* **140**: 1337-1340.

**González, E. y Vásquez, C. (1993)** Characterization of the *bstVIRM* genes encoding the *Bacillus stearothermophilus* V restriction-modification system. *Gene* **131**: 103-106.

**Harlow, E. y Lane, D. (1988).** *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.

**Heitman, J. y Model, P. (1987)** Site-specific methylases induced SOS DNA repair response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 3243-3250.

**Howard, K., Card, C., Benner, J., Callahan, H., Maunus, R., Silver, K., Wilson, G. y Brooks, J. (1986)** Cloning the *DdeI* restriction-modification system using a two-step method. *Nucl. Acids Res.* **20**: 7939-7951.

**Hümbelin, M., Suri, D., Rao, D., Hornby, H., Eberle, T., Pripfl, S., Kenel, S y Bickle, A. (1988)** Type III DNA restriction and modification system *EcoP1* and *EcoP15*. Nucleotide sequence of the *EcoP1* operon, the *EcoP15* mod gene and some *EcoP1* mod mutants. *J. Mol. Biol.* **200**: 23-29

**Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimasauskas, S. y Butkus, V. (1992a)** Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV). *Nucl. Acids Res.* **20**: 6043-6049.

**Janulaitis, A., Vaisvila, R., Timiskas, A., Klimasauskas, S. y Butkus, V.** Cloning and sequence analysis of the genes coding for *Eco57I* type IV restriction-modification system. *Nucl. Acids Res.* **20**: 6051-6056.

Jeltsch, A., Kröger, M. y Pingoud, A. (1995) Evidence for an evolutionary relationship among type-II restriction endonucleases. *Gene* 160: 7-16.

Kan, T-N., Li, L. y Chandrasegaran, S. (1992) Cloning, sequencing, overproduction and purification of M CviBI (GANTC) methyltransferase from *Chlorella* virus NC-1A. *Gene* 121:1-7.

Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. y Buchner, J. (1991) Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotech.* 9:825-829.

Kosykh, V., Buryonov, Y. y Bayev, A. (1980) Molecular cloning of *EcoRII* endonuclease and methylase genes. *Molec. Gen. Genet.* 178: 717-718.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Li, L., Wu, L. y Chandrasegaran, S. (1992) Functional domains in *FokI* restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4275-4279.

Losick, R. y Pero, J. (1981) Cascades of sigma factors. *Cell* 25: 295-298.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Lunnen, K., Barsomian, J., Camp, R., Card, C., Chen, S., Croft, R., Looney, M., Meda, M., Moran, L., Nwankwo, D., Slatko, B., van Cott, E. y Wilson, G. (1988) Cloning type-II restriction and modification genes. *Gene* 74: 25-32.

Mann, M., Rao, R. y Smith, H. (1978) Cloning of restriction and modification genes in *Escherichia coli*: The *HhaII* system from *Haemophilus haemolyticus*. *Gene* 3: 97-112.

Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxiribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.

McClelland, M. y Nelson, M. (1985) The effect of site-specific methylation

on restriction endonuclease digestion. *Nucl. Acids Res.* **13**: suppl. 201-207.

**Michaelis, S. Y Becwith, J. (1982)** Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 435-464.

**Mitraki, A. y King, J. (1989)** Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotech.* **7**:690-697.

**Moore, J., Uppal, A., Maley, F. y Maley, G. (1993)** Overcoming inclusion body formation in a high-level. *Prot. exp. pur.* **4**: 160-163.

**Noyer-Weidner, M., Diaz, R. y Reiners, L. (1986)** Cytosine-specific DNA modification interferes with plasmid establishment in *Escherichia coli* K12: Involvement of *rglB*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 469-475.

**Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I. y Aggarwal, A. (1994)** Structure of restriction endonuclease *Bam*HI and its relationship to *Eco*RI. *Nature* **368**: 660-664.

**Petrusyte, M. y Janulaitis, A. (1982)** Isolation and some properties of the restriction endonuclease *Bcn*I from *Bacillus centrosporus*. *Eur. J. Biochem.* **121**: 377-381.

**Piggot, P. y Coote, J. (1976)** Genetic aspect of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.* **40**: 908-962.

**Raleigh, E., Murray, N., revel, H., Blumenthal, R., Westaway, D., Reith, A., Rigby, P., Elhai, J. y Hanahan, D. (1988)** *Mcr*A and *Mcr*B restriction phenotypes of some *Escherichia coli* strains and implications for gene cloning. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1563-1575.

**Roberts, R. (1990)** Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucl. Acids Res.* **18**: suppl. 2331-2365.

**Roberts, R. y Macelis, D. (1997)** REBASE-restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* **25**: 248-262.

**Rosenberg, J. (1991)** Structure and function of restriction endonucleases. *Curr.*

Opin. Struct. Biol. 1: 104-113.

**Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour Press, New York.

**Schein, H. (1989)** Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Biotech. 7:1141-1149.

**Silhavy, T., Benson, S. y Emr, S. (1983)** Mechanism of protein localization. Microbiol. Rev. 47: 313-344.

**Studier, W. (1975)** Gene 0.3 of bacteriophage T7 at to overcome the DNA restriction system of the host. J. Mol. Biol. 94: 283-295.

**Smith, D., Blattner, F. y Davis, J. (1976)** The isolation and characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii*. Nucl. Acids Res. 3: 343-353.

**Snyter, L., Slatko, B., Moran, L., O'Donnell, K. y Brooks, J. (1987)** Nucleotide sequence of the *DdeI* restriction-modification system and characterization of the methylase protein. Nucl. Acids Res. 15: 8249-8266.

**Szybalski, W., Kim, S., Hassan N. y Podhajaska, A. (1991)** Class-IIs restriction enzymes-a review. Gene 100: 13-26.

**Thériault, G. y Roy, P. (1982)** Cloning of *Pseudomonas* plasmid pMG7 and its restriction-modification system in *Escherichia coli*. Gene 19: 355-359.

**Thériault, G., Roy, P., Howard, K., Benner, J., Brooks, J., Waters, A. y Gingeras, T. (1985)** Nucleotide sequence of the *PaeR7* restriction-modification system and partial characterization of it protein products. Nucl. Acids Res. 13: 8441-8461.

**Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

Vásquez, C., Venegas, A. y Vicuña, R. (1981) Characterization and cloning of a plasmid isolated from the extreme thermophile *Thermus flavus* AT-62. *Biochem. Intern.* 3: 291-299.

Vásquez, C. (1985) Isolation and partial characterization of *Bst*VI, a thermo stable isoschizomer of *Xho*I. *Biochem. Intern.* 10: 655-662.

Vásquez, C. y González, E. (1993) Characterization of the *bstVIRM* genes encoding the *Bacillus stearothermophilus* V restriction-modification system. *Gene* 131:103-106.

Vásquez, C., Saavedra, C. y González, E. (1991) Cloning the *Bst*VI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Gene* 102: 83-85.

Venegas, A., Vicuña, R., Alonso, A., Valdés, F. y Yudelevich, A. (1980) A rapid procedure for purifying a restriction endonuclease from *Thermus thermophilus* (*Tth*I). *FEBS Lett.* 109: 156-158.

Walder, R., Hartley, J., Donelson, J. y Walder, J. (1981) Cloning and expression of the *Pst*I restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1503-1507.

Walder, R., Walder, J. y Donelson, J. (1984) The organization and complete nucleotide sequence of the *Pst*I restriction-modification system. *J. Biol. Chem.* 259: 8015-8026.

Wilson, G. (1988) Cloned restriction-modification systems a review\*. *Gene* 74: 281-289.

Wilson, G. (1991) Organization of restriction-modification systems. *Nucl. Acids Res.* 19: 2539-2566.

Wilson, G. y Murray, N. (1991) Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* 35: 585-627.

Winkler, F., Banner, D., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R., Heathman, S., Bryan, R., Martin, P., Petratos, K. y Wilson, K. (1993) The crystal structure of *Eco*RV endonuclease and of its complexes with cognate and

non-cognate DNA fragments. EMBO J. **12**: 1781-1795.

**Xia, Y. y van Etten, J. (1986)** DNA methyltransferase induced by PBCV-1 virus infection of *Chlorella*-like green alga. Mol. Cell. Biol. **6**: 1440-1445.

**Yuan, R. (1981)** Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. Annu. Rev. Biochem. **50**: 285-315.

**Yuan, R. y Hamilton, D. (1984)** En "DNA methylation: biochemistry and biological significance". Razin, A., Cedar, H. y Riggs, A., Eds. Springer-verlag, NY, pp. 11-37.

**Zhang, Y., Nelson, M., Nietfeldt, J., Burbank, D. y Van Etten, J. (1992)** Characterization of *Chlorella virus* PBCV-1 *CviAII* restriction and modification system. Nucl. Acids Res. **20**: 5351-5356.