

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL SISTEMA *SalI* DE *Streptomyces albus* G EN UNA MUTANTE TERMOSENSIBLE

Cauich-Sánchez, P. I.¹; M. R. Rodicio²; A.I. Peláez² & R. M. Ribas-Aparicio^{1*}

1. Laboratorio de Producción y Control de Biológicos, Departamento de Microbiología. ENCB-IPN. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo; México, D. F. C. P. 11340. Fax 0157296207.

2. Universidad de Oviedo, España *rribas@redipn.ipn.mx

Palabras clave: *SalI*, mutante termosensible.

Introducción. Chater y Wilde (1) obtuvieron una mutante termosensible del sistema *SalI* de *S. albus* (R⁺M^{ts}), la cual se denominó J1306, ésta estaba afectada en el gen que codifica la metiltransferasa ya que no crece por encima de 34.5°C, porque la enzima de modificación se inactiva, dejando el DNA desprotegido frente a la endonucleasa lo que resulta letal para la célula.

En nuestro grupo de trabajo se han obtenido resultados que demuestran que en el sistema *SalI* la metilasa es indispensable para que *salIR* se exprese, ya que si se elimina la actividad de M.*SalI* la endonucleasa no se expresa, además el gen *salIM* presente en el cromosoma de una cepa R⁺M⁺ o en un plásmido compatible es capaz de restaurar “en *trans*” el fenotipo de restricción en una clona R⁺M⁺ que contenga únicamente a *salIR*. Por estos resultados y la existencia de la mutante termosensible *S. albus* J1306 planteamos la hipótesis de que la metilasa podría tener un papel bifuncional: catalítico (transfiere el grupo metilo a la adenina) y regulador en la activación de la expresión de la endonucleasa (2).

El objetivo del presente trabajo fue analizar a nivel de secuencia nucleotídica los cambios en el sistema *SalI* de la mutante J1306 de *S. albus* G y determinar el fenotipo de modificación de diversas construcciones de este sistema para evaluar su papel en su regulación génica.

Metodología. Obtención de los plásmidos recombinantes de los fragmentos amplificados del sistema *SalI* completo y de *salIM* con o sin sus promotores en pIJ2925, pIAGO y/o pKC796. Transformación y selección de las clonas en *E. coli*. Determinación del fenotipo de modificación a diferentes temperaturas empleando la enzima *SalI* y determinación de la secuencia nucleotídica del sistema *SalI* en *S. albus* J1306.

Resultados y Discusión. Se amplificaron las siguientes regiones del sistema *SalI*:

- 2c4 (comprende la metilasa). El producto amplificado es de 1960 pb.
- 34 (es la región que codifica la metilasa sin su codon de iniciación). El producto de PCR es de 1760 pb
- 1.54 (es el sistema completo *SalI*). El producto amplificado es de 3080 pb.

Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron:

pIJ2925-2c4, pIAGO-2c4, pIJ29254-34, pIAGO-1.54 y pKC796-1.54.

Estos plásmidos se transformaron en *E. coli* y se les determinó el fenotipo de modificación a diferentes temperaturas. Las clonas pIJ2925-2c4 y pIJ2925-34 fueron metilasa positivas a 28°C, 37°C y 42°C; por el contrario en pIAGO-2c4, pIAGO-1.54 y pKC796-1.54 se observó la inactivación de la metiltransferasa de *S. albus* J1306 a 37°C y a 42°C.

Estos resultados indican que el promotor p*Lac* presente en pIJ2925 podría estar interfiriendo o enmascarando la característica de termosensibilidad.

A partir de la clona de pIAGO-1.54 se decidió secuenciar el sistema *SalI* empleando iniciadores universales e internos y se encontró que existe una mutación en la metilasa (base 2881), lo que provoca que haya una treonina en lugar de una alanina, este aminoácido se encuentra cercano a la posible región de reconocimiento específico de DNA por lo que el cambio podría afectar la unión DNA-metilasa a temperaturas arriba de 34.5°C dando lugar a un fenotipo M^{ts}. Estos resultados sugieren la existencia de un dominio regulador de la metilasa independiente del dominio catalítico.

Conclusiones. La mutación responsable del fenotipo M^{ts} en la mutante J1306 de *S. albus* G se encuentra en la base 2881 de *salIM* y puede estar involucrada en el reconocimiento específico de DNA.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por la CGPI-IPN con clave 990237 y por el CONACyT clave 31675N. Cauich-Sánchez P.I. es becaria de COTEPABE-IPN, PROMEP-COSNET. Ribas-Aparicio R. M. es becaria de EDD-IPN, COFAA-IPN y miembro del SNI-CONACYT.

Bibliografía.

1. Chater, K. F. & Wilde, L.C. 1980. *Streptomyces albus* G mutants defective in the *SalGI* Restriction-modification system. *J Gen Microbiol.* 116:323-334
2. Gómez R.A. 1996. Estudios de regulación y de expresión heteróloga del sistema de restricción-modificación *SalI* de *Streptomyces albus* G. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, España.