

# "USO DE FUSIONES GÉNICAS EN EL ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL SISTEMA *SalI* A NIVEL DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN"

Alvarez-Anell, N.<sup>1</sup>; Rodicio, M.R.<sup>2</sup>; Peláez, A.I.<sup>2</sup>. & R.M. Ribas-Aparicio<sup>1\*</sup>

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: *xyE*, dominios HTH, fusiones traduccionales.

**Antecedentes:** El sistema de restricción y modificación *SalI* de *Streptomyces albus* G, codifica la endonucleasa *R.SalI* y la metilasa *M.SalI*; su secuencia blanco es 5'-GTCGAC-3', donde *R.SalI* corta entre GT y *M.SalI* actúa metilando el nitrógeno 6 de la adenina (Álvarez *et al.*, 1993). En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que *M.SalI* es indispensable para la expresión de *salIR*, sin embargo aún se desconoce el (los) mecanismo (s) involucrado(s). En 1994 Lubys *et al* reportaron que en el sistema *Cfr9I* se forma una estructura secundaria, la cual involucra la región Shine-Dalgarno del gen de la endonucleasa *Cfr9IR* y aproximadamente 60 pb río abajo del codón de inicio de la traducción, con lo cual proponen que la regulación pueda llevarse a nivel de traducción. Tomando como modelo lo reportado por Lubys se ha planteado la hipótesis de que el sistema *SalI* se regule a nivel de traducción.

**Objetivo:** Estudiar la regulación a nivel de traducción del sistema *SalI* mediante fusiones génicas con *xyE*.

**Metodología:** A partir de los plásmidos pIJ4461 (el cual posee el sistema *SalI* completo), pIJ4467 (el cual carece de la región -35 y -10 del promotor pRI) y pIJ4467\* (sólo posee una región de aproximadamente 100 pb río abajo del sitio de inicio de la traducción) se obtuvieron por PCR tres diferentes regiones localizadas río arriba del codón de inicio de la traducción para fusionarlas a *xyE* y clonarlas en pIJ2925; posteriormente se secuenciaron por métodos automatizados y se procedió al análisis de la secuencia utilizando el programa BLAST. Se amplificó por PCR el gen *salIM* así como también el sistema completo *SalI*, ambos se clonaron dentro del plásmido pACYC184, verificándose el fenotipo de modificación para el plásmido portador de *salIM*. Se realizó la determinación de la actividad enzimática de la catecol 2,3 dioxigenasa, la cual está codificada dentro del gen *xyE* (Ingrat *et al.*, 1989). Por último se procedió a realizar un análisis de la secuencia aminoacídica de *M.SalI* en busca de dominios HTH característico de proteínas reguladoras de sistemas RM tipo II.

**Resultados y discusión:** Al medir la actividad enzimática de las tres diferentes fusiones con *xyE* se observó que en ausencia de *salIM* es significativamente menor comparando con la determinada para el control pIJ29*xyE*; sin embargo en presencia de *salIM* la actividad no aumenta, esto puede deberse a que el fenotipo de

modificación indica que hay una expresión parcial de la proteína *SalIM*, por lo cual no hay suficiente expresión de ésta como para desdoblarse dicha estructura si esta existiera. Sin embargo, analizando la secuencia se encontró una ORF dentro de la región de *SalI*, la cual pudiera participar en la regulación desdoblándose la posible estructura secundaria; como resultado preliminar se midió la actividad enzimática en presencia del sistema completo *SalI* observándose resultados similares. Realizando un análisis de la secuencia de la fusión más pequeña utilizando el programa RNA Draw, se predijo la formación de dos posibles estructuras secundarias comprendidas entre el GTG de inicio y las primeras 100 pb localizadas río abajo de este mismo codón. El análisis de la secuencia aminoacídica no reporta la posible existencia de dominios HTH, con lo cual se refuerza lo planteado con respecto a la existencia de un elemento auxiliar en la regulación de *SalI*.

## Conclusiones.

\*Se obtuvieron tres diferentes fusiones traduccionales del extremo 5' de *SalI*.

\*Los resultados obtenidos sugieren la formación de una estructura secundaria que impide la expresión de *salIR*, así como la existencia de un posible elemento coregulador.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por la CGPI-IPN con clave 990237 y por el CONACyT clave 31675N. Alvarez-Anell, Nelson es becario del CONACyT y del PIFI-IPN. Ribas-Aparicio R. M. es becaria de EDD-IPN, COFAA-IPN y miembro del SNI-CONACyT

## Bibliografía.

- 1) Alvarez, M.A., Chater, K.F. & M.R. Rodicio. 1993. Complex transcription of an operon encoding the *SalI* restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. Mol. Microbiol. 8(2):243-252.
- 2) Ingram, Ch., Brawner, M., Youngman, P. & J. Westpheling. 1989. *xyE* functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: Use for the study of gal P1 a catabolite-controlling promoter. J. Bacteriol. 171 (12):6617-6624
- 3) Lubys, A., Menkevicius, S., Timinskas, A., Butkus, V. & A. Janulaitis. 1994. Cloning and analysis of translational control for genes encoding the *Cfr9I* restriction-modification system. Gene 141:85-89

Castelán-Vega, J. A.<sup>1</sup>; M. R. Rodicio<sup>2</sup>; Peláez, A. I.<sup>2</sup> & R. M. Ribas-Aparicio<sup>1\*</sup>

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 \*tribas@redipn.ipn.mx

Palabras clave: *Sall*, *mutantes*, *Streptomyces*.