



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Ciencias

Optimización de la expresión del gen del Fragmento Klenow de la DNA-Polimerasa I bajo el control del Promotor  $P_L$

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de:  
**B I O L O G O**  
Presenta

**B A O L I Z H U**



México, D. F.

1985



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

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

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

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

## INDICE

INTRODUCCION - - - - -	1
ANTECEDENTES - - - - -	9
1). Sistemas de expresión genética - - - - -	9
2). Importancia y propiedades generales de la DNA-polimerasa I - - - - -	16
3). Introducción sobre el plásmido pCJ55- - - - -	21
4). Métodos de inducción para el promotor P L - - - - -	24
MATERIALES Y METODOS - - - - -	28
I. MATERIALES - - - - -	28
1). Reactivos - - - - -	28
2). Cepas bacterianas - - - - -	29
3). Medios de cultivo - - - - -	29
4). Cajas de medio sólido - - - - -	30
II. Métodos - - - - -	32
1). Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida para análisis de proteínas- - - - -	32
2). Microensayo de DNA del plásmido - - - - -	34
RESULTADOS - - - - -	37
1). Inducción de la biosíntesis del Fragmento Klenow - - - - -	37
2). Curva de crecimiento celular a 30 °C y a 42 °C - - - - -	39
3). Inducción a diferentes puntos de densidad celular - - - - -	41
DISCUSION Y CONCLUSION - - - - -	52
REFERENCIAS - - - - -	56

OPTIMIZACION DE LA EXPRESION DEL GEN DEL  
"FRAGMENTO KLENOW" DE LA DNA-POLIMERASA I  
BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR P L

INTRODUCCION:

Desde que Watson y Crick propusieron el modelo de la estructura tridimensional del DNA, y con los avances de los últimos treinta años en la rama de la biología molecular y la genética, los científicos de hoy han logrado un amplio y profundo entendimiento de la naturaleza química del gen y de su función biológica.

Gracias a dos acontecimientos importantes durante la última década en la biología molecular, ha sido posible aislar fragmentos específicos de DNA de un organismo dado en forma reproducible, y abriendo así una nueva dimensión en el estudio de los materiales genéticos. El primero de ellos es el descubrimiento de las endonucleasas de restricción del DNA (1,2) las cuales son enzimas que pueden reconocer y cortar secuencias específicas del DNA generando, de esta manera, pequeños fragmentos. Generalmente, las secuencias que pueden ser reconocidas por las endonucleasas de restricción son de 4 a 6 pares de bases de tamaño y son palindrómicas. Dependiendo del tipo de enzima, los extremos de corte resultantes pueden ser "cohesivos" que tienen 5' o 3' terminal de cadena sencilla sobresaliente o pueden ser "rasurados" que no tienen algún terminal sobresaliente. En la figura 1 se ejemplifican algunos de estos fragmentos.

Ahora, los fragmentos resultantes de una digestión enzimática pueden ser vueltos a unir gracias a la acción de la enzima DNA-ligasa, dando como resultado, diferentes formas de combinación de

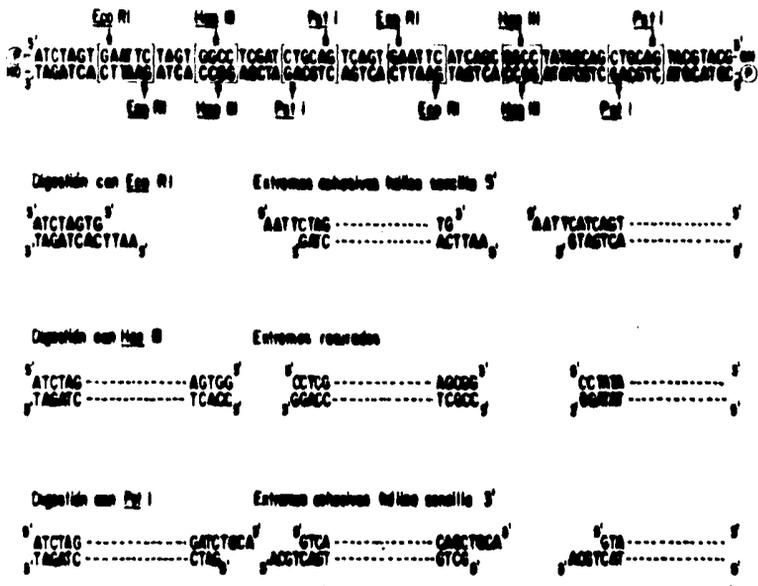


Fig.1 Las enzimas de restricción son, en realidad, endonucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas en el DNA. Estas secuencias están compuestas normalmente de cuatro a seis pares de bases que, en su mayoría, son secuencias palindrómicas, es decir que la secuencia de las bases que la integran es la misma en ambas hélices complementarias cuando se lee en la misma dirección de 5' a 3' o viceversa. En la figura, las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción están encuadradas y las flechas indican los sitios de corte. Los extremos resultantes del corte pueden ser rasurados o cohesivos según el tipo de enzima. Por ejemplo, del corte de EcoRI resultan extremos cohesivos con terminal 5', del de PstI, con terminal 3' y del de HaeIII, de extremos rasurados.

los fragmentos. Este proceso puede realizarse "in vitro" y por lo tanto, recibe el nombre de "RECOMBINACION DE DNA in vitro" (fig.2).

El otro acontecimiento es el descubrimiento de los elementos genéticos extracromosómicos: transposones, episomas y plásmidos, y con base en los cuales, se hizo la construcción del plásmido pBR322 (3) como un vehículo molecular que permitió dar un paso firme en el desarrollo de la ingeniería genética.

Un plásmido es una molécula circular de DNA de doble cadena, de tamaño variable y que tiene la capacidad de auto-duplicación dentro de la célula huésped en forma independiente del DNA cromosómico. Ahora, el plásmido pBR322 tiene varias ventajas para utilizarse como un vehículo molecular, que son: este plásmido tiene un tamaño relativamente pequeño con 4300 pares de bases, tiene dos marcas fenotípicas que son: resistencia a ampicilina y a tetraciclina y lleva varios sitios únicos de corte de enzimas de restricción, los cuales permiten la inserción de fragmentos de DNA heterólogo y la identificación de las moléculas híbridas por el número de estos sitios.(3)

Por lo general, la inserción de algún fragmento de DNA heterólogo en el plásmido se realiza de la siguiente manera: el plásmido y el DNA heterólogo que se desea insertar son digeridos con una endonucleasa de restricción, lo cual genera moléculas lineales del vehículo y del DNA heterólogo con extremos complementarios, estos fragmentos pueden ser ligados entre sí por la acción de la enzima DNA ligasa. Posteriormente, estas nuevas moléculas híbridas son introducidas en las células bacterianas por un proceso llamado

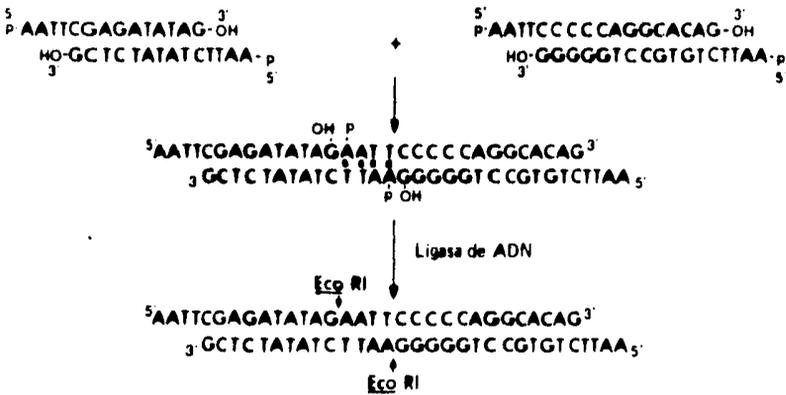


Fig.2 Recombinación de DNA in vitro. El DNA de cualquier origen al ser digerido con una enzima de restricción que en este caso es EcoRI, que genera pequeños fragmentos con los extremos de corte idénticos. Esta propiedad permite "alinear" dos segmentos a través de los puentes de hidrógeno que se pueden formar entre las bases complementarias. Finalmente, con la acción de la ligasa de DNA, se puede formar la unión covalente fosfodiéster entre los extremos de los dos segmentos, dando así como resultado una nueva molécula la híbrida, que recibe el nombre de DNA RECOMBINANTE.

TRANSFORMACION (4), y las colonias bacterianas portadoras del plásmido deseado son seleccionadas por las marcas fenotípicas del plásmido o por sus sitios únicos de restricción. De esta forma, el DNA heterólogo o recombinante es propagado con gran velocidad mediante el cultivo bacteriano. Esta metodología recibe el nombre de CLONACION MOLECULAR DE DNA, que junto con la técnica de Recombinación de DNA in vitro están englobadas en el término de INGENIERIA GENETICA y de ahí el nacimiento de esta nueva disciplina.

Con la aparición de la ingeniería genética, se abrieron nuevos caminos para muchas ramas de investigación, tales como: la biología, la medicina la agricultura etc. Actualmente, se ha logrado purificar genes de organismos superiores, inclusive humanos y expresarlos en células bacterianas como *Escherichia coli*. La metodología consiste en: purificar el mRNA del gen deseado y mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, se hace el DNA complementario (cDNA) del mRNA purificado, Y finalmente el cDNA puede ser clonado en algún vehículo molecular mediante una serie de manipulaciones como se muestra en la figura 4. Con este método se han obtenido cantidades considerables de proteínas activas, tales como la somatostatina (5), la insulina(6), el interferón(7,8) y la hormona de crecimiento(9), que son de suma importancia en medicina, y que con los métodos convencionales no se puede obtener fácilmente en buena cantidad.

Sin embargo, la obtención de una determinada proteína en células bacterianas depende también de la adecuada manipulación de las señales regulatorias que reconocen las bacterias. Quizás las señales que más atención han recibido por parte de los investigadores son los promotores. Es en este sentido lido que el presente trabajo está enmarcado, ya que tiene como objetivo de optimizar la expresión

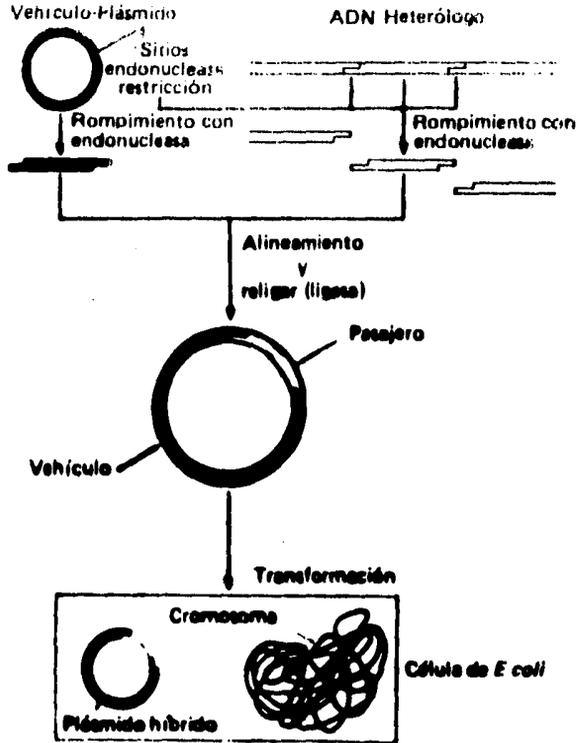


Fig.3 Clonación molecular. El vehículo molecular, en este caso un plásmido, y el DNA heterólogo que se desea clonar son digeridos con una endonucleasa de restricción. Esta digestión genera moléculas lineales con extremos de corte idénticos que, en presencia de la ligasa de DNA, se unen covalentemente. De esta manera el fragmento de DNA heterólogo (pasajero) es unido al vehículo y puede ser introducido en las bacterias como E.coli mediante el mecanismo de transformación.

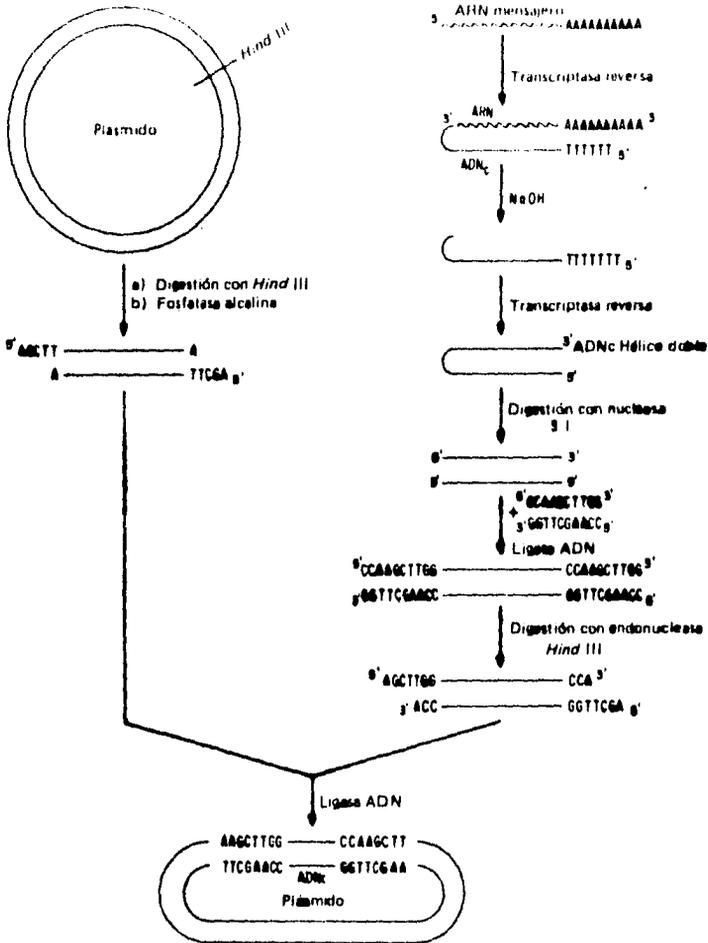


Fig.4 Clonación Molecular de DNA complementario a mRNA de genes eucariontes. Una vez que se tiene el mRNA de un gene eucarionte de interés, se sintetiza el DNA complementario (cDNA) del mRNA mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa. Para iniciar la reacción enzimática, la transcriptasa reversa requiere de la presencia de un primero, lo cual se logra por la adición de un oligo-dT que se asocia con la región poli-A del mensajero. La primera copia sintetizada, complementaria al mRNA, se termina con la formación de un 'gancho' o 'pasador' con el mRNA. El híbrido de RNA-DNA puede ser separado tratando con una solución de NaOH, y el DNA de cadena sencilla resultante es utilizado como molde para la segunda copia del cDNA. Finalmente, el cDNA puede ser tratado con la nucleasa S1 y clonado en un vehiculo molecular.

del gen que codifica para el fragmento klenow de la DNA-polimerasa I de E. coli K12. Esta optimización se realizó utilizando el promotor P<sub>L</sub> del bacteriófago lambda. Para una mejor comprensión de este proyecto, a continuación se darán una serie de antecedentes.

## ANTECEDENTES.

### I. SISTEMAS DE EXPRESION GENETICA

La expresión eficiente de un gen recombinante en células procariontes requiere una eficiente y específica transcripción del DNA, traducción del RNA mensajero, y depende de otros factores más. Por tanto, es interesante e importante hacer una revisión sobre algunos de los sistemas de expresión, para que se tenga una idea clara de los factores que afectan la expresión de un gen recombinante.

El primer paso de la expresión genética es la transcripción donde la RNA-polimerasa se une al promotor e inicia la transcripción. La eficiencia de este proceso depende de la afinidad de la RNA-polimerasa por el promotor, y esta afinidad está relacionada con la secuencia nucleotídica del promotor. Los análisis de secuencias nucleotídicas de muchos promotores de E.coli revelan la presencia de dos regiones altamente conservadas que están localizadas alrededor de 35 pares de bases (región -35) y 10 pares de bases (región -10) antes del sitio de iniciación transcripcional y cuyas secuencias consenso son: TTGACA para la región -35 y TATAAT para la región -10 respectivamente(10, 11). Con base en estos estudios se ha demostrado que la eficiencia de transcripción es mayor cuando la secuencia nucleotídica de las dos regiones del promotor es más semejante a la secuencia consenso, lo cual nos puede brindar una ayuda en seleccionar promotores "fuertes" para ser utilizados en la expresión de genes heterólogos. No obstante, la utilidad de un promotor en

TABLA I. los promotores más utilizados en la ingeniería genética

NOMBRE DEL PROMOTOR	SECUENCIA NUCLEOTIDICA	VEHICULO MOLECULAR	MEDIO DE REGULACION
secuencia consenso	-35 -10 TTGACA...TATAAT	-----	-----
Lac-UVS	TTTACA...TATAAT	pOP203-13 (12)	Ausencia de lactosa. Inducción con IPTG
Trp	TTGACA...TTAACT	pTrpEBS-1 (13)	Inducción con ácido 3-indolacrílico o ausencia de triptofano
P L	TTGACA...GATACT	pPLc24, pPLc26, pPLa2311 (15), pKC30 (16), p 6 (17)	Temperatura (42 C)
TacI	TTGACA...TATAAT	pHGH807TacI (14)	Inducción con IPTG o ausencia de lactosa.
TacII	TTGACA...TTTAAAT	pHGH907TacII (14)	Inducción con IPTG o ausencia de lactosa.
rac5-1b	TTGTCA...TATAAT	-----	-----

expresar genes recombinantes no sólo está determinada por la eficiencia de transcripción, sino también por la facilidad de su regulación. En la tabla I se muestran los promotores más utilizados como sistemas de expresión para expresar genes recombinantes.

El promotor Lac-UVS es un derivado del promotor Lac silvestre de *E. coli* que contiene una mutación, la cual aumenta la eficiencia de la transcripción. En comparación con el promotor silvestre, este promotor presenta solamente un tipo de regulación, pues, en ausencia de la lactosa u otro inductor, el promotor se mantiene "apagado" por la unión del represor Lac al operador. El promotor funciona cuando la célula se halla en presencia de lactosa o por la adición al medio de cultivo, de un inductor gratuito como el IPTG (isopropil- $\beta$ -galactosido), el cual se une al represor Lac y lo desprende del operador (18).

El promotor lac es el sistema más utilizado hasta ahora, aunque es débil. Esto se debe a que es muy fácil de regular (19).

En comparación con el promotor lac, el promotor trp es cuatro veces más fuerte. La expresión génica mediante este promotor está regulada por un mecanismo de represor-operador similar al del sistema lac. El inductor gratuito en este caso es el ácido 3-indolacrílico. Por otro lado, la inducción también se puede hacer en ausencia de triptófano en el medio de cultivo. Pero, con este método la inducción no es muy fácil de lograrse, debido a que en ausencia del inductor, una sola copia del gen del represor trp puede producir suficientes represores para mantener reprimido el promotor, a pesar del incremento del número de copias del operador (20).

El promotor P<sub>L</sub> es un promotor del bacteriófago lambda que, en su ciclo de infección, promotor dirige la transcripción temprana del

DNA en dirección hacia la izquierda desde el gen N hasta el gen int (21). P L es un promotor bastante fuerte y está regulado de varias maneras. La más importante de ellas es, el promotor puede ser reprimido por el producto del gen cI ( represor cI ) en la fase temprana de infección y en la fase tardía, por la proteína del gen cro. Por otro lado, el sitio NutL, localizado 44 pares de bases después del promotor, puede interactuar con la RNA-polimerasa en asociación con la proteína del gen N, lo cual no permite la terminación de la transcripción en terminadores N sensibles. Esto, en algunos casos, aumenta considerablemente la eficiencia de transcripción de un determinado gen (21).

El sistema de expresión con P L más utilizado, se basa en la existencia de un fago lambda mutante que además es lisógeno, lleva el gen cI mutado ( cI857 ) que codifica para la formación de un represor termosensible. Este represor es capaz de reprimir la transcripción a 28 °C y no a 42 °C, pues el represor se inactiva a esta temperatura(22).

Otros sistemas de expresión son los que se basan en los promotores híbridos. Dos de ellos son los llamados TacI y TacII, los cuales fueron contruidos químicamente uniendo la región -35 del promotor trp y la región -10 del promotor lac junto con su operador, y lograndose así la secuencia consenso en las dos regiones del promotor ( TTGACA en la región -35 y TATAAT en la región -10 ). La diferencia entre los promotores TacI y TacII se encuentra en el número de nucleótidos espaciadores entre la región -35 y la región -10, que es de 16 pares de bases para el TacI y 17 pares de bases para el TacII. Además, el TacII contiene una mutación en la región -10.

La construcción del promotor híbrido  $\rho 301$  es similar a la de  $\text{facI}$  y  $\text{facII}$ , solo que este promotor, en lugar de la región  $-35$  del promotor  $\text{trp}$  contiene la región  $-35$  del promotor silvestre de  $\text{rRNA-ribosomal}$  y al igual que  $\text{facI}$  y  $\text{facII}$ , lleva también la región  $-10$  del promotor  $\text{lac}$  y su operador.

Se ha comprobado que estos promotores híbridos son mucho más fuertes que sus promotores parentales y son igualmente fáciles de regular como el promotor  $\text{lac}$ , puesto que llevan el operador  $\text{lac}$ . Sin embargo, uno de los grandes problemas de utilizar los promotores híbridos, es que estos promotores son tan fuertes que pueden interferir con la duplicación del plásmido, de modo que es difícil de clonarlos. Este problema todavía no ha sido resuelto a satisfacción hasta ahora, por tanto, los promotores más utilizados actualmente en expresar genes recombinantes son:  $\text{lac}$ ,  $\text{trp}$  y  $\text{P}_L$ .

Ahora bien, para obtener un alto nivel de la expresión genética, se necesita también una traducción eficiente del  $\text{RNA}$  mensajero, lo cual requiere la presencia del Sitio de Unión al Ribosoma en  $\text{E. coli}$ . Para la mayoría de los  $\text{mRNAs}$  de  $\text{E. coli}$ , el Sitio de Unión al Ribosoma está compuesto de dos partes importantes: el codón de iniciación  $\text{AUG}$  y una secuencia de 3 a 9 pares de bases antes del codón  $\text{AUG}$ , llamado secuencia de Shine-Dalgarno ( $\text{SD}$ ) que es complementaria a la secuencia del terminal 3' del  $\text{RNA}$  ribosomal  $16\text{S}$  (23). La secuencia Shine-Dalgarno no es igual en todos los  $\text{mRNAs}$  de  $\text{E. coli}$ , pero si se ha identificado una secuencia conservada como en el caso de la secuencia consenso de los promotores. La unión de  $\text{mRNA}$  al ribosoma es facilitada cuando la secuencia  $\text{SD}$  se asemeja más a la secuencia consenso y por supuesto, resulta una traducción eficiente.

Por otra parte, esta unión es probablemente modulada por la estructura secundaria en el extremo 5' del kNA mensajero, puesto que si la secuencia SD y el codón son más accesible y con mayor libertad a la subunidad 30S, la traducción es más eficiente(24).

Estos factores de regulación traduccional constituyen la mayor parte de los problemas para la expresión de un gen heterólogo en E.coli, sobre todo cuando el gen es eucariote, debido a que el mRNA eucariote no tiene un equivalente de la secuencia SD que está presente en el mRNA de los procariontes(25).

Para resolver estos problemas, se ha clonado la secuencia SD de la replicasa del virus MS2 fusionando el codón AUG con el del gen heterólogo para tener un frente de lectura correcto(15). También se ha utilizado el sitio de unión al ribosoma del gen cII del bacteriófago lambda para la expresión del gen rho (29). Otra alternativa más eficiente, quizás, para la traducción de un gen eucariote en E.coli, es la de utilizar un Sitio de Unión al Ribosoma sintético. Con lo cual se han obtenido buenos resultados para la expresión del gen de alfa-interferón humano (30).

Por otro lado, existe otro factor que afecta la eficiencia de traducción del mRNA, y que es: el uso y el desuso de los codones. Sabemos que, en la mayor parte, existen 2,4 o 6 codones para codificar un sólo aminoácido. Se ha visto que la célula selecciona el uso o desuso de alguno de estos codones, es decir, para un aminoácido determinado se usa preferentemente un codón determinado y no todos los codones que codifican para el mismo aminoácido (26). Esta preferencia está correlacionada con la abundancia de las diferentes especies de RNAs de transferencia, ya que cada codón tiene su propio RNA de transferencia y la abundancia de las diversas especies de RNA

de transferencia es diferente en las células eucariontes que en las células procariontes (27). En tanto que un codón en el mRNA eucarionte es preferido en su estado natural y puede ser discriminado cuando este sea introducido en las células procariontes y a causa de lo cual, la eficiencia de traducción puede ser afectada seriamente. Para evitar este problema, se pueden utilizar genes sintetizados químicamente con los codones optimizados, y de esta manera se ha sintetizado el gen de alfa-interferón (28). Sin embargo, este problema no puede ser resuelto totalmente, ya que la síntesis química de un gen es muy complicada, sobre todo cuando se trata de un gen muy grande.

Finalmente, varios problemas adicionales tienen que ser considerados, cuando se desea expresar un gen heterólogo a un buen nivel en E.coli. Uno de ellos es el de las cepas receptoras, pues se ha visto que, los niveles de expresión de un gen varían en diferentes cepas. Por ejemplo, en la síntesis de interferón en cepas de E.coli 294 y E.coli PR13 puede haber una diferencia de más de ocho veces de una cepa a otra (19). La razón de esta variación no se conoce bien aun, probablemente puede ser por la capacidad de degradación de proteínas y/o mRNA de diferentes cepas (19).

La estabilidad del vehículo molecular, por otro lado, también puede jugar un papel importante en la expresión génica, ya que la baja estabilidad del vehículo trae consigo la evidente baja cantidad de mRNA y por lo tanto, del producto proteico deseado.

Resumiendo podemos decir que, cuando se desea optimizar la expresión de un determinado gen en E.coli, es necesario considerar los siguientes puntos:

1.- Tener un promotor fuerte pero que sea regulable

2.- Que el gen que se desea expresar posea las señales optimas

para la traducción eficiente del mRNA.

3.- Que el vehículo molecular que lleva el promotor y el gen en

cuestión sea estable.

4.- Seleccionar cepas receptoras adecuadas.

## II. IMPORTANCIA Y PROPIEDADES GENERALES DE LA DNA-POLIMERASA I

Dado que el presente trabajo se tratará de la expresión del gene que codifica para el Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I, es necesario mencionar brevemente la importancia y algunas de sus propiedades fisicoquímicas y enzimáticas.

La DNA-polimerasa I es una de las enzimas más importantes y más estudiadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, desempeña un papel esencial durante la duplicación y la reparación del DNA (31 a 34). Y viene siendo cada vez más importante como una herramienta analítica y preparativa en la química de los ácidos nucleicos y la biología molecular. Algunos de estos ejemplos son: la síntesis química de oligonucleótidos o de genes completos, , la secuenciación del DNA etc.

Entre las enzimas de la síntesis de DNA, la DNA-polimerasa I es la más abundante, puesto que existen 350 copias de esta molécula por cada célula de tipo silvestre (35). La enzima consiste de una

cadena simple de polipeptidos que esta compuesta de alrededor de 1,000 residuos de aminoácidos y que tiene un peso molecular de 109,000. La molecula de la DNA-polimerasa I contiene sólo un puente de disulfuro y un grupo disulphyryl, el cual puede unirse a un átomo de mercurio sin que se afecte la actividad enzimática(36) Bajo las condiciones standard, una molécula de la enzima puede polimerizar aproximadamente 700 nucleótidos por minuto a 37 C° (35).

La DNA-polimerasa I tiene cinco funciones enzimáticas que incluyen las de: DNA-polimerasa(37), exonucleasa 3'-- 5' (exonucleasa II)(38,39), exonucleasa 5'-- 3' (exonucleasa VI)(40,41), pirofosfordólisis y actividad de intercambio de pirofosfato (42). La principal función de la enzima es la de polimerasa, que cataliza la condensación de los trifosfato-5'- deoxiribonucleótidos (dNPPP) en DNA:



Esta reacción necesita la presencia absoluta de un templado de DNA y un soporte ( primer ) de DNA o RNA con un extremo terminal 3'-OH abierto.

La actividad de exonucleasa 3'-- 5' es muy importante para copiar el templado de DNA con alta fidelidad, ya que esta actividad intrínseca de la enzima remueve y degrada los nucleótidos no apareados en la cadena creciente del DNA en el extremo terminal 3'-OH. El producto de esta reacción es exclusivamente 5'-monofosfato (fig.5).

La actividad de exonucleasa 5'-- 3' degrada la cadena sencilla mal apareada de menos de 100 nucleótidos, desde el extremo terminal 5' y se liberan mono- u oligonucleótidos (fig.6). Cuando el numero de

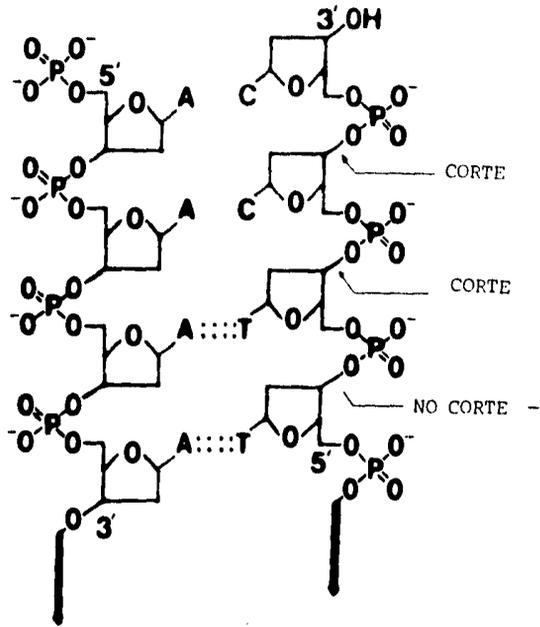


Fig.5 Patrón de corte de exonucleasa 3'-5' de la DNA-polimerasa I. Esta actividad difiere de la de exonucleasa 5'-3' en la dirección de digestión y que corta solamente las bases no apareadas.



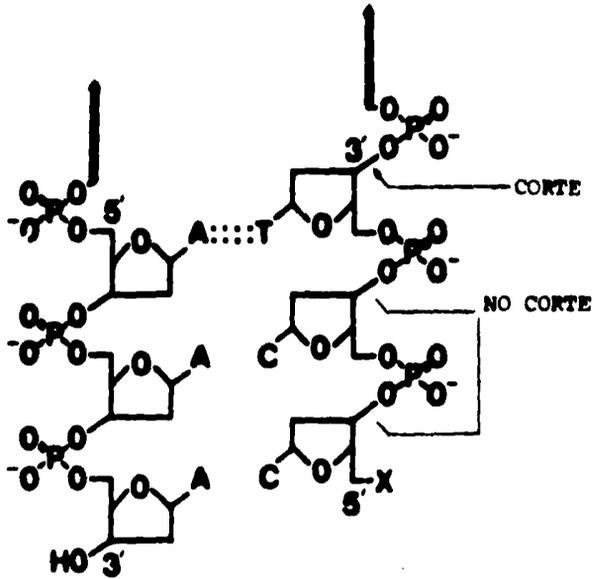


Fig.6 Patrón de corte de exonucleasa 5'-3' de la DNA-polimerasa I. Esta actividad digiere las bases apareadas con la cadena " líder " del DNA molde.

polimerización de nucleótidos en DNA que implica la duplicación del DNA. En condiciones favorables, las otras funciones no son indispensables.

El Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I es el fragmento grande con terminal carboxilica, que resulta por la proteólisis de la DNA-polimerasa I, en la cual, la DNA-polimerasa I es cortada en dos fragmentos que son enzimáticamente activos. El fragmento grande, llamado Fragmento Klenow, conserva las dos funciones esenciales de la DNA-polimerasa I, que son las de polimerasa y de 3'--5' exonucleasa, el fragmento pequeño también es enzimáticamente activo, pero sólo contiene la actividad de 5 -- 3' exonucleasa (45,46). La obtención del Fragmento Klenow nos da las facilidades en la purificación por su tamaño relativamente pequeño, y las facilidades de utilizarlo en secuenciación del DNA por el hecho de que el Fragmento Klenow sólo contiene dos funciones enzimáticas.

### 3. INTRODUCCION SOBRE EL PLASMIDO pCJ55

Como ya había descrito anteriormente, el promotor  $P_L$  es un promotor muy fuerte que dirige la transcripción temprana en el ciclo de infección del bacteriófago lambda, y que puede ser controlado fácilmente por medio del represor  $\lambda$  termosensible. En la figura 7 se muestra la secuencia nucleotídica del promotor  $P_L$ , en donde se puede observar que el  $P_L$  tiene 3 operadores. El operador 1, denominado O11, está situado en la región de -9 a -20 que se sobrepone con la región -10 del propio promotor; el operador O12 se encuentra ubicado en la región de -33 a -55 que se sobrepone con la región -35 del promotor;

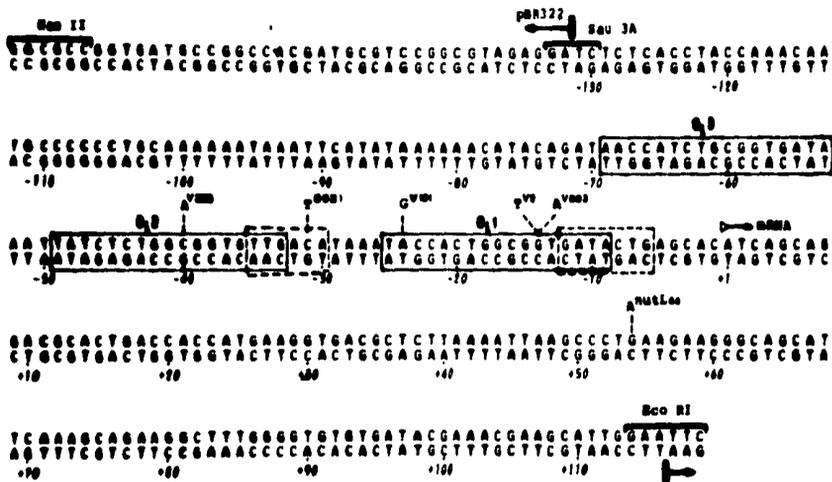


Fig.7 La secuencia nucleotídica de la región PL-OL del bacteriófago lambda clonado en el plásmido pLe2311. Nótese que los tres operadores están marcados con cuadros y las dos regiones del promotor están marcadas con cuadros de líneas punteada. El sitio se localiza a +34 de pares de bases y el inicio de la transcripción del gene II se encuentra en la posición +1.

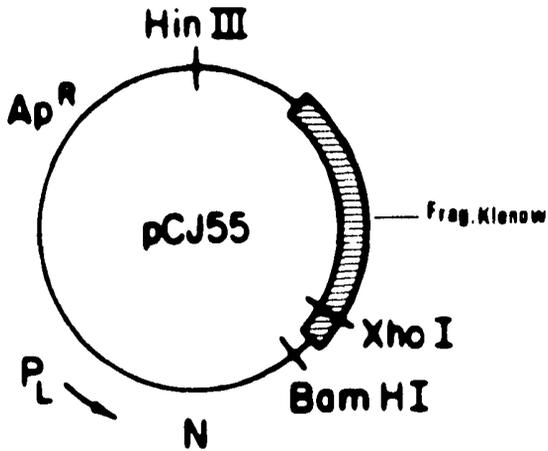


Fig.8 Mapa de restricción del plásmido pCJ55. El Fragmento Klenow está clonado bajo el control de P por dos sitios únicos de restricción HindIII (Hin) y BamHI (Bam), y en el sentido contrario de la manecilla de reloj. Nótese la presencia del gene N completo.

y finalmente, el operador O<sub>L3</sub> se localiza en la region de -53 a -69 (15). El represor  $\lambda$  puede unirse a los 3 operadores con distintas afinidades moleculares permitiendo de esta manera, una regulacion fina de la expresi3n de algun gene a trav3s de P<sub>L</sub>, ya que la transcripci3n ocurre cuando los 3 operadores est3n totalmente libres.

Actualmente, existen varios vehiculos moleculares que llevan el promotor P<sub>L</sub> ( ver la Tabla I ), tales como: pPLa2311, pPLc24, pPLc28, pKC30 y p $\lambda$ B, los cuales han sido construido con diferentes estrategias y finalidades.

Los pl3smidos pKC30 y p $\lambda$ B fueron construidos de tal manera que ambos contienen el fragmento O<sub>L</sub>-P<sub>L</sub> junto con el gene N completo, s3lo que el pKC30 tiene el promotor insertado en el mismo sentido de la manecilla de reloj, y el p $\lambda$ B lo tiene en el sentido contrario. Debido a la presencia del gene N completo en estos pl3smidos, la eficiencia de transcripci3n se aumenta considerablemente en algunos casos (16).

Ahora bien, el vehiculo que lleva el gene que codifica para la formaci3n del Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I bajo el control de P<sub>L</sub>, llamado pCJ55, es derivado de los pl3smidos p $\lambda$ B y pCJ53 que llevan el promotor P<sub>L</sub> m3s el gene N completo, y el gene para el Fragmento Klenow respectivamente. Un esquema de este pl3smido se muestra en la figura 8.

#### 4. METODOS DE INDUCCION PARA EL PROMOTOR P<sub>L</sub>

Con base en la existencia del represor  $\text{cI}$  termosensible, ha varios métodos que se utilizan para inducir el promotor  $P_L$ . El más sencillo de ellos es el de transferir a las células en el medio de cultivo de  $30^\circ\text{C}$  a  $42^\circ\text{C}$  y el proceso consiste en crecer las células a  $30^\circ\text{C}$  hasta que llegue a una densidad celular deseada y se transfieren a  $42^\circ\text{C}$ . Con este método, Remaut et al (15) han obtenido una producción de 4 % de B-interferón bajo el control de  $P_L$ . Por otro lado, la inducción también puede ser lograda por agregar un volumen de medio de cultivo a  $60^\circ\text{C}$  que debe ser el mismo medio de cultivo en el que crecen las células, al medio de cultivo donde crecen las células a  $30^\circ\text{C}$ , y se continúan incubando a  $42^\circ\text{C}$ . Catherine Joyce et al (47) también han obtenido buenos resultados con este método en la expresión del gene del Fragmento Klenow.

Otro método, como una alternativa para la inducción del  $P_L$  es por medio de agregar al cultivo un agente químico llamado ácido nalidixico, el cual induce la respuesta SOS en *E. coli*. La adición de este agente ocasiona, entre otras cosas, la biosíntesis de la enzima *recA*, la cual degrada al represor  $\text{cI}$  y lo inactiva permitiendo, de esta manera, la transcripción a partir de  $P_L$  (48).

Se ha demostrado que se obtiene mayor eficiencia de inducción con el ácido nalidixico cuando la cepa receptora lleva el gene  $\text{cI}$  silvestre. Esto se debe a que el gene  $\text{cI}$  que codifica para el represor termosensible está mutado y en consecuencia, el producto no puede ser procesado por la enzima *recA*.

Todos los métodos mencionados anteriormente son factibles para

la inducción del  $I_L$ , sin embargo, quedan varias preguntas que deben ser respondidas.

Sabemos que, normalmente el crecimiento de las bacterias en condiciones propicias se divide en 3 fases y que son: la fase inicial, la fase exponencial y la fase estacionaria. La fase inicial es la fase de adaptación de las células al medio de cultivo, en la cual las bacterias crecen lentamente. Evidentemente, la densidad celular en esta fase es menor. En la fase exponencial, las bacterias son más activas y crecen con una velocidad mayor hasta que los nutrientes se acaban o el medio deja de ser propicio por ausencia del oxígeno, cambios de pH etc. En esta fase, se alcanza la máxima densidad celular. La siguiente fase, llamada fase estacionaria, es donde las bacterias prácticamente ya no crecen. Este patrón de crecimiento refleja o implica, de alguna manera, que el estado fisiológico de las células es diferente en diferentes fases de crecimiento. De ahí, se puede formular las siguientes preguntas: en que densidad celular se inducen las células para que se obtenga mayor cantidad de la proteína deseada ?, como afecta la inducción el crecimiento de la población ?

El objetivo del presente trabajo es el de tratar de contestar algunas de estas preguntas y que son:

1.- Determinar en que punto de densidad celular inicial se obtiene la mayor cantidad del Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I cuando la expresión de este gen está controlado por el promotor P<sub>L</sub> del bacteriófago lambda.

2.- Conocer el comportamiento de la biosíntesis del Fragmento Klenow en diferentes puntos de densidad celular inicial en los que se

inducen las células bacterianas.

3.- Conocer el comportamiento del crecimiento celular en condiciones de inducción.

## MATERIALES Y METODOS.

### 1.- MATERIALES.

#### 1.- REACTIVOS.

Los reactivos utilizados durante este trabajo fueron principalmente los siguientes:

Agarosa, azul de Coomassie, B-mercaptoetanol, persulfato de amonio, acrilamida, bisacrilamida, BTT (ditiotreitól), SDS (dodecil-sulfato de sodio), resina Dowex50W-X8, de Bio-Rad Laboratories. USA.

Azul de bromofenol, de J.T.Baker de USA.

Ioduro de propidio, de Calbiochemicals Laboratories.

Bacto-agar bacteriológico, aminoácidos purificados, glicina, Tris (aminomethyl-idintrimetanol), de Merck de Mexico.

Bacto-agar MacConkey, bacto-triptona, extracto de levadura, bromuro de etidio, cloranfenicol, cloruro de cesio, aceite de parafina, tetraciclina, lisozima, de Sigma de Mexico.

Ampicilina, de Bayer de Mexico.

Los endonucleasas de restriccion fueron obtenidos principalmente de Bethesda Research Laboratories.

Todos los demás reactivos y solventes fueron obtenidos de J.T.Baker de México.

## 2.- Cepas Bacterianas.

N-4830: SI ΔB ( ΔBAM ΔHI ) N+ t<sup>y</sup>  
(ref.51).

N-4831: SI ΔB ( ΔBAM ΔHI ) N- t<sup>y</sup>  
(ref.51).

ad 10

## 3.- Medios de Cultivo.

### a). Medio Luria

Bacto-triptona 10 g

Extracto de Levadura 5 g

Cloruro de sodio NaCl 10 g

Aforar a un litro con agua destilada ajustando el pH a 7.4 y esterilizar por 20 minutos.

### b). Medio Mínimo M9

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g

NaCl 0,5 g

NH<sub>4</sub>Cl 1 g

Ajustar el pH a 7.5 y llevarle a un litro con agua destilada.

Esterilizar por 20 minutos y agregar las siguientes soluciones:

\* MgSO<sub>4</sub> 1 M 2 ml

\* CaCl<sub>2</sub> 0.1 M 1 ml

\* Glucosa al 20 % 10 ml

\* Estas soluciones son esterilizadas en separado previamente.

c). Medio Mínimo M9-CA

Es medio mínimo M9 complementado con casaminoácidos a una concentración final de 0.2 % (p/v).

4.- Cajas con Medio Sólido.

a). Cajas de Medio Luria con Agar

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	20 g

Aforar a un litro a pH 7.4 y esterilizar por 20 minutos. Y después

se vacían 20 ml de medio por caja aproximadamente.

b). Cajas de M9 con Agar

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
Bacto-agar	20 g

Llevarse a un litro con agua destilada a pH 7.5 y esterilizar por

20 minutos. Antes de que se enfríe el medio, se agregan:

MgSO <sub>4</sub>	1 -	2 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.1 M	1 ml
Glucosa al 20 %		10 ml

con el propósito de examinar la auxotrofia en aminoácidos de las cepas bacterianas, se preparan las cajas de esta manera y se pitean 100 ul de la solución de aminoácidos en cada caja (la solución de aminoácidos se prepara al 0.5 % y es esterilizada previamente).

c). Cajas de Medio Sólido con Antibióticos.

Se prepara el medio con agar de la manera descrita anteriormente, después de esterilizar, se deja enfriar hasta 50 o 60 C y se agrega el antibiótico a una concentración calculada según las siguientes formulas:

200 µg / ml para ampicilina;

30 µg / ml para tetraciclina;

## II.- METODOS.

### 1.- ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA PARA ANALISIS DE PROTEINAS

De acuerdo al método descrito por Laemmli (50), los geles se preparan según las siguientes fórmulas:

Gel inferior (gel separador) 15 %

Acrilamida+bisacrilamida	11.25 ml
Tris-HCl 2 M pH 8.8	4.5 ml
SDS al 10 %	0.113 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.100 ml
TEMED	15 $\mu$ l

Gel superior (gel espaciador)

Acrilamida+bisacrilamida	1.75 ml
Tris-HCl 2 M pH 6.8	0.325 ml
SDS al 10 %	0.05 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.10 ml
TEMED	5 $\mu$ l

La solución de acrilamida+bisacrilamida es preparada en 29.2 % y 0.8 % respectivamente.

El buffer de corrida es preparado de la siguiente manera: se disuelven 12 g de Tris y 57.6 g de glicina en agua y aforar a un litro ajustando el pH a 8.4. Tomar 200 ml de esta solución y llevarse a un litro con agua, se le agregan 8 ml de SDS al 10 % y este buffer diluido ya está listo para utilizar.

Para el analisis de las proteinas totales de la bacteria, se necesitan lisar la celulas, el procedimiento es como sigue:

1).Se colectan las bacterias en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar en la microfuga (Beckman) a su maxima velocidad.

2).Tirar el sobrenadante y secar bien la pared interior del tubo con una toalla de papel sin tocar el boton de celulas. Se almacenan las células a  $-20^{\circ}\text{C}$  de ser necesario.

3).Se resuspenden las células en Mezcla Lítica en un volumen calculado segun las siguientes proporciones: por cada 2 ml de células con una densidad óptica de 0,3, se agregan 50 ul de Mezcla Lítica. Se agita bien en Vortex.

#### La Mezcla Lítica:

Tris-HCl pH 6,8	0.063 M
SDS	2.3 %
B-Mercaptoetanol	5 %
Glicerol	10 %

Y un poco de azul de bromofenol.

4).Se dejan las muestras en agua hirviendo durante 5 minutos y centrifuga en la microfuga durante 2 minutos. Luego se dejan en hielo por 10 minutos.

5).Sonicar las muestras en un sonicador Soniprep 150 con su maxima potencia en 3 pulsos durante 15 segundos.

6).Se hierven las muestras por 1 minutos para realizar la electroforésis.

7).Se aplican 15 ul de las muestras preparadas de esta manera a cada carril del gel.

La electroforesis se lleva a cabo en wattaje constante: 5 W para el gel superior y 10 W para el gel inferior.

La tinción del gel se realiza con una solución de azul de Coomassie (30 % de metanol, v/v; 10 % de ácido acético glacial, v/v; 0,06 % de azul de Coomassie, p/v.) a 80 °C durante 15 minutos con agitación lenta. Se destina el gel con ácido acético al 10 % con 3 cambios durante una hora.

Se seca el gel sobre el papel filtro Whatman 3 mm con vacío y calor durante una hora.

## 2.-MICRONESAYO DE DNA DE PLÁSMIDO.

El método utilizado es descrito por Maniatis (50), y consiste en la semipurificación del plásmido en pequeñas cantidades con el fin de caracterizar o identificar el plásmido rápidamente.

1). Se inoculan 5 ml de medio Luria que contiene un antibiótico apropiado a partir de una sola colonia de bacterias e incubar durante toda la noche a 37 °C

2). Se toman 1.5 ml de este cultivo y pasar en un tubo Eppendorf. Centrifugar en la microfuga por 2 minutos.

3). Remover el medio y secar la pared interior del tubo con una toalla de papel sin tocar el botón de células.

4). Resuspender las células en 100 µl de una solución fría que

. contenga:

50 mM glucosa

25 mM Tris-HCl pH 8.0

~~10~~ mM EDTA

Se le agrega la lisozima a una concentración final de 5 mg/ml,

se agita bien en Vortex y se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

5). Se agregan 200  $\mu$ l de una solución fría y recién preparada que contiene: 0.2 N de NaOH y 1 % de SDS. Mezclar el contenido por inversión e incubar en hielo por 5 minutos.

6). Se añaden 150  $\mu$ l de la solución de acetato de potasio 5 M (pH 4.8) que es preparada de la siguiente manera: a 60 ml de acetato de potasio 5 M, se le agregan 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. Agitar en Vortex por 30 segundos e incubar en hielo durante 10 minutos.

7). Centrifugar en la microfuga durante 8 minutos a su máxima velocidad

8). Tomar el sobrenadante con una pipeta de plástico y se pasa en tubo Eppendorf limpio.

9). Se le agregan a este tubo un volumen de fenol saturado con agua y agitar en Vortex por 10 segundos, añadirle otro volumen de cloroformo y agitar nuevamente en Vortex.

10). Centrifugar en la microfuga por 2 minutos y transferir la fase acuosa en otro tubo Eppendorf limpio.

11). Añadir 1/25 de cloruro de sodio 5 M y después 2.5 volúmenes

de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcla el contenido suavemente en Vortex y se mantiene 2 minutos a temperatura ambiente.

12).Precipitar el DNA por centrifugación en la microfuga durante 8 minutos.

13).Decantar el sobrenadante y mantener el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel hasta que todo el líquido residual se salga del tubo.

14).Añadir 1 ml de etanol al 70 %, agitar suavemente en Vortex y centrifugar de nuevo en la microfuga.

15).Desechar el sobrenadante y secar el precipitado de DNA en vacío.

16).Resuspender en 50 µl de agua junto con 1 µl de ribonucleasa pancreática (10 mg/ml) e incubar a 37 C durante 1 o 2 horas.

17).Se almacena el DNA a -20 °C.

## RESULTADOS:

### 1.- INDUCCION DE LA BIOSINTESIS DEL FRAGMENTO KLENOW.

Como una prueba para determinar que el plásmido pCJ55 está expresando el gene que codifica para la formación del Fragmento Klenow, se hizo la inducción con la cepa ( N4830 de E.coli ) que contiene el plásmido y también con la misma cepa, pero sin el plásmido. Ambas cepas fueron sometidas en las mismas condiciones: las células fueron crecidas primero, a 30 °C hasta llegar a una densidad óptica de 0.3 a 600 nm y luego fueron transferidas a 42 °C para ser inducidas. Se tomaron muestras de 1.5 ml en diferentes intervalos de tiempo y estas muestras fueron lisadas de acuerdo con el método descrito en la metodología para hacer el análisis de proteínas totales por medio de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. El resultado de este experimento se muestra en la figura 9.

La proteína del Fragmento Klenow debe migrar en el gel a la misma altura que la albumina (A80) (47). En la figura 9, como se puede observar, en todos los carriles ( carriles 4, 6, 8 ) con muestras de las células inducidas de la cepa con pCJ55 aparece la banda de la proteína esperada a la altura de la albumina, indicada por una flecha. Esta proteína no aparece en ninguno de los carriles con muestras de la cepa sin el plásmido aun cuando las células fueron inducidas ( carriles 3, 5 , 7 ). Lo anterior nos confirma que el plásmido pCJ55 sí está expresando el gene del Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I.

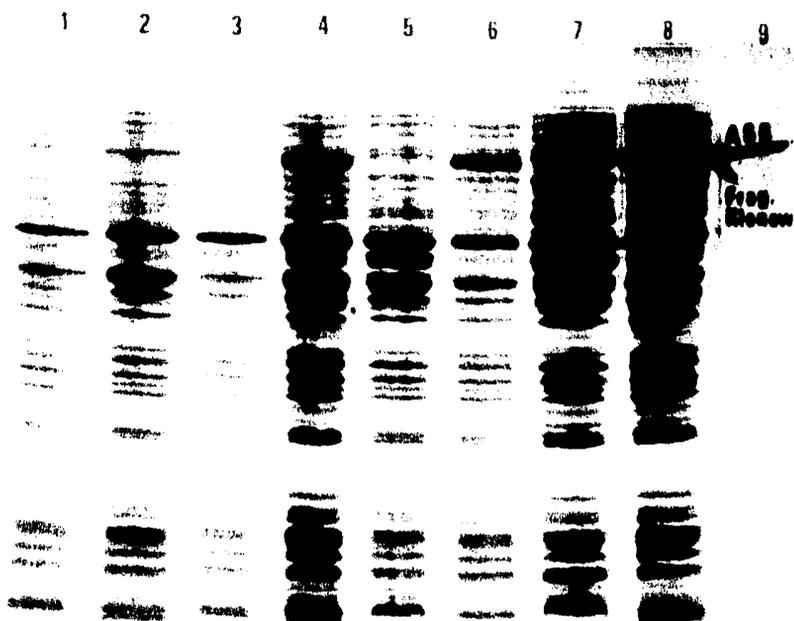


Fig.9 El análisis de proteínas totales de las muestras de inducción con cepas con el plásmido y sin plásmido mediante la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. El carril 1 es la muestra tomada en el inicio de la inducción de la cepa (N4830) sola; el carril 2, tiempo 0 y cepa con el plásmido pCJ55; carril 3, muestra de 30 minutos de inducción y cepa sola; carril 4, de 30 minutos y cepa con el pCJ55; carril 5, de 1 hora y cepa sola; el carril 6, de 1 hora y cepa con pCJ55; carril 7, de 2 horas y cepa sola; carril 8, de 2 horas y cepa con pCJ55; y finalmente el carril 9 es la albúmina.

## 2.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CELULAS A 30 °C Y A 42 °C .

Por lo general, cuando las bacterias están obligadas a sintetizar una proteína "extrana", sobre todo cuando la expresión del gene de dicha proteína está controlada por un promotor fuerte, el crecimiento celular es afectado seriamente (15). Esto se debe a que, muy probablemente, cuando existe una producción excesiva de la proteína extraña por parte de la maquinaria de biosíntesis bacteriana, la bacteria ya no puede sintetizar suficientes proteínas que son vitales para su crecimiento normal, ya que la maquinaria de biosíntesis está parcialmente ocupada para producir proteínas que no pueden ser aprovechadas por la bacteria. Es más, frecuentemente esta proteína extraña puede ser tóxica para la bacteria.

Con el fin de examinar el efecto de la biosíntesis del Fragmento Klenow sobre el crecimiento de las bacterias, se hizo una curva de crecimiento en condiciones de inducción (a 42 °C) y sin inducción (a 30 °C). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se crecieron las células a 30 °C en 200 ml de medio Luria en un matraz hasta cuando la densidad óptica llegó a 0.3 a 600 nm, luego se dividió el medio de cultivo en dos partes, una parte fue transferida a 42 °C y la otra parte se siguió creciendo a 30 °C . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II y la gráfica 1.

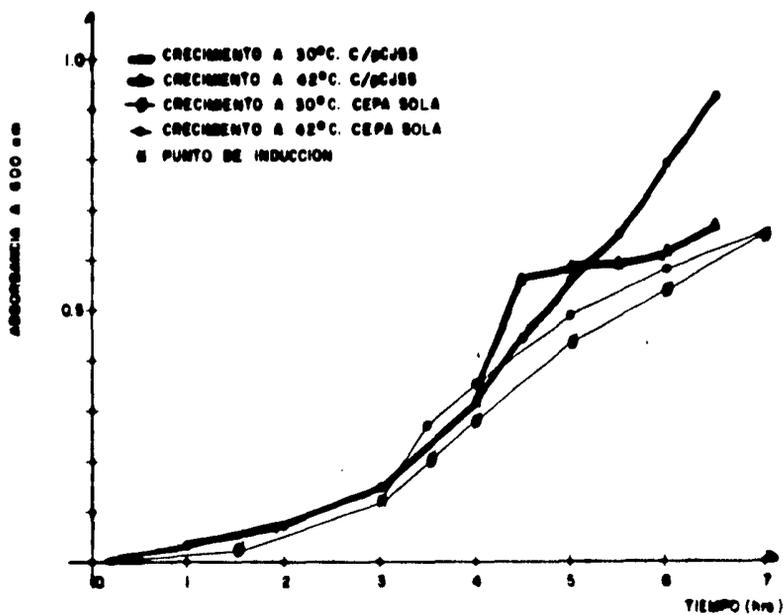
Como se puede apreciar en la gráfica 1, la densidad celular aumentó considerablemente a 30 minutos de inducción ( aumento neto de 0.243 ) y después la velocidad de crecimiento disminuyó de una forma

Tabla II resultados de la curva de crecimiento.

tiempo (hrs)	H. L. O. cepa N4830 c/pCJ55		tiempo (hrs)	D. O. cepa N4830 sola	
	30 C	42 C		30 C	42 C
0	0		0	0	
1	0.035		1.5	0.027	
2	0.070		3	0.120	0.120*
3	0.140		3.5	0.202	0.272
4	0.317	0.317*	4	0.285	0.354
4.5	0.445	0.560	5	0.438	0.493
5	0.560	0.582	6	0.547	0.579
5.5	0.650	0.592	7	0.657	0.654
6	0.795	0.615			
6.5	0.937	0.670			

0 densidad optica

\* punto en donde se hizo la induccion.



GRAFICA I

muy drástica que, durante una hora y media de incubación la densidad óptica solo aumento 0.055. Este cambio drástico puede deberse a que, a 30 °C las células no pueden crecer bien por la baja temperatura y cuando son transferidas a 42 °C, el crecimiento de las células "se dispara" ocasionando de esta manera, el aumento drástico en la densidad celular en poco tiempo. Sin embargo, este ritmo de crecimiento no puede mantenerse por mucho tiempo por el hecho de que las células están inducidas para producir el Fragmento Klenow, y en un momento dado el efecto de la biosíntesis de esta proteína puede superar al efecto del aumento de la temperatura. Tal vez por esta razón, durante este experimento, las células casi detuvieron su crecimiento después de 30 minutos de inducción.

### 3.- INDUCCION A DIFERENTES PUNTOS DE DENSIDAD CELULAR.

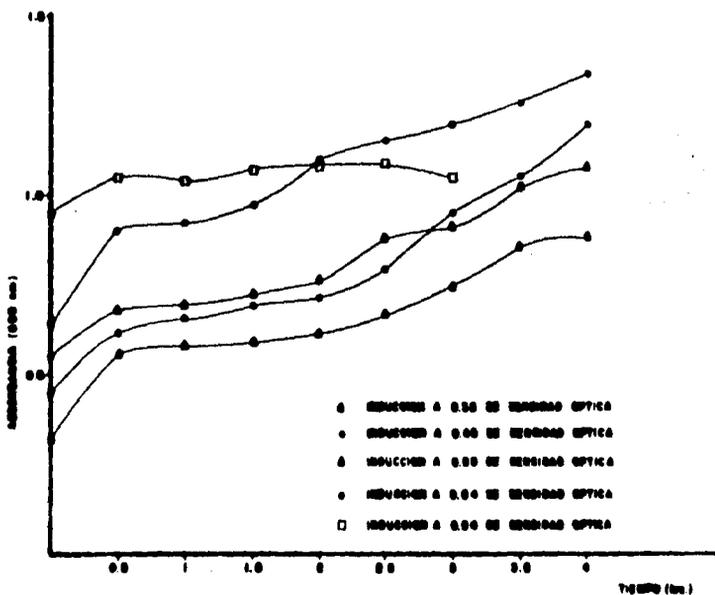
Con fines de determinar en qué densidad óptica inicial se inducen las células para que se obtenga mayor cantidad del Fragmento Klenow, se hicieron otros experimentos en los que se indujeron las células a diferentes densidades ópticas iniciales ( 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.9 ). Para obtener datos más precisos, se realizó el proceso de la siguiente manera: se crecieron las células a 30 °C en 500 ml de medio Luria en un matraz de 1 litro, cuando la densidad óptica llegara a la deseada, se tomaron cada vez 100 ml de este medio de cultivo y se pasaron a un matraz de 250 ml para hacer la inducción. Los resultados se muestran en la Tabla III y la gráfica 2.

Como es de esperarse, en todos los puntos de inducción, la velocidad de crecimiento aumento momentaneamente durante los primeros

Tabla 17. Resultados de la inducción a diferentes puntos de densidad óptica.

tiempo (hrs)	numero de matraces				
	1	2	3	4	5
0	0.32	0.45	0.55	0.64	0.94
0.5	0.56	0.62	0.68	0.90	1.05
1	0.58	0.66	0.69	0.92	1.04
1.5	0.59	0.69	0.72	0.96	1.07
2	0.61	0.71	0.76	1.10	1.09
2.5	0.67	0.79	0.88	1.15	1.09
3	0.86	0.95	0.90	1.20	1.05
3.5	0.88	1.05	1.04	1.26	----
4	1.02	1.20	1.08	1.34	----

Matraz # 1 : inducción a 0.32 de densidad óptica inicial  
 Matraz # 2 : inducción a 0.45 de densidad óptica inicial  
 Matraz # 3 : inducción a 0.55 de densidad óptica inicial  
 Matraz # 4 : inducción a 0.64 de densidad óptica inicial  
 Matraz # 5 : inducción a 0.94 de densidad óptica inicial



Gráfica 2

3 minutos y luego disminuye, como el caso descrito anteriormente. Ahora, ¿qué sucedería con la biosíntesis del Fragmento Klenow? Las figuras 10, 11, 12, 13 y 14 muestran los análisis de proteínas totales de la bacteria de las muestras en diferentes puntos de inducción mediante la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%.

La figura 10 nos muestra el análisis de proteínas totales cuando se indujeron las células a 0.32 de densidad óptica inicial. La banda del fragmento klenow está indicada por una flecha a la altura de la albumina. Como se puede observar, la banda aparece en cantidad considerable a 30 minutos de inducción (carril 3). Y a partir de este momento, la cantidad de esta proteína empieza a aumentar hasta que a la cantidad máxima, que corresponde a 2 horas de inducción (carril 6). y después de esta hora, empieza a reducir progresivamente. El patrón de biosíntesis del Fragmento Klenow al inducir las células a 0.45 de densidad óptica es similar al de la inducción realizada a 0.32, salvo que en el primer caso, la proteína aparece en mayor cantidad a 1 hora de inducción y empieza a reducirse inmediatamente después de la hora en la que aparece la cantidad máxima (2 horas de inducción) (ver fig.11).

Si se comparan los patrones de biosíntesis del Fragmento Klenow en los diferentes puntos de inducción, se puede apreciar una tendencia de que, la banda del Fragmento Klenow llega a la cantidad máxima cada vez más rápido conforme va aumentando la densidad óptica en la que se inducen las células. Por ejemplo, la cantidad máxima llegó a 2 horas de inducción cuando se indujeron las células a 0.32 y a 0.45 de densidad óptica, y cuando se hizo la inducción a 0.55 y a 0.64, la cantidad máxima se alcanzó a 1 hora de incubación y

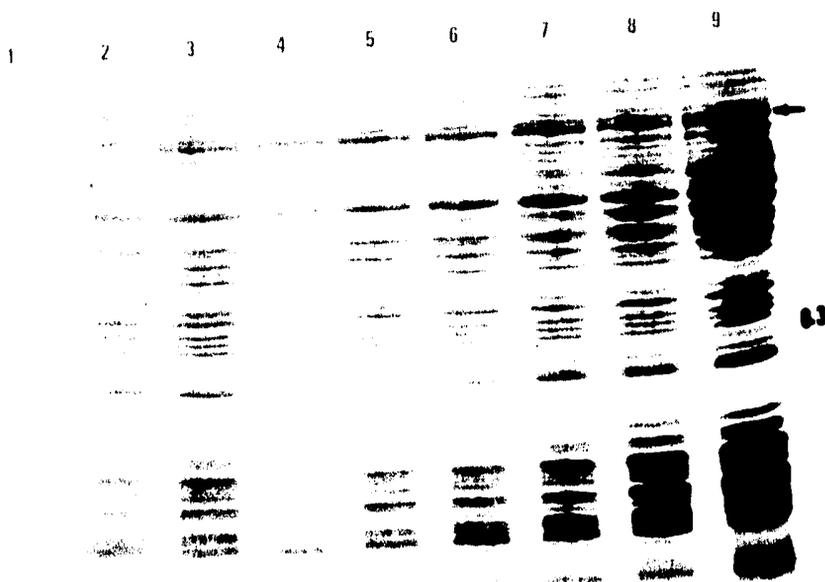


Fig.10 El analisis de proteínas totales de las muestras de inducción a 0.32 de densidad óptica inicial. El carril 1 es la albumina, el carril 2 corresponde a la muestra tomada en el inicio de la inducción (tiempo 0); el carril 3, muestra tomada en 30 minutos de inducción; el carril 4, 1 hora; el carril 5, 1.5 horas; el carril 6, 2 horas; el carril 7, 3 horas; el carril 8, 4 horas; y el carril 9, 5 horas de inducción.

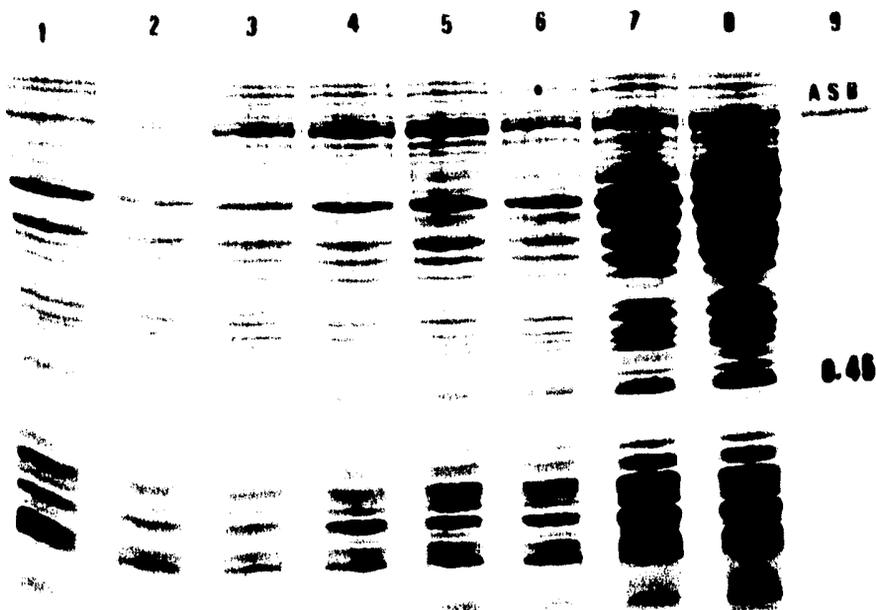


Fig.11 El análisis de proteínas totales de las muestras de inducción a 0.45 de densidad óptica inicial mediante la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. El carril 1 corresponde a la muestra tomada en el inicio de la inducción; el carril 2 es la muestra tomada en el inicio de la inducción; el carril 3, de 1 hora; el carril 4, de 1.5 horas; el carril 5, de 2 horas; el carril 6, de 3 horas; el carril 7, de 4 horas; el carril 8, de 5 horas y el carril 9 es la albumina.

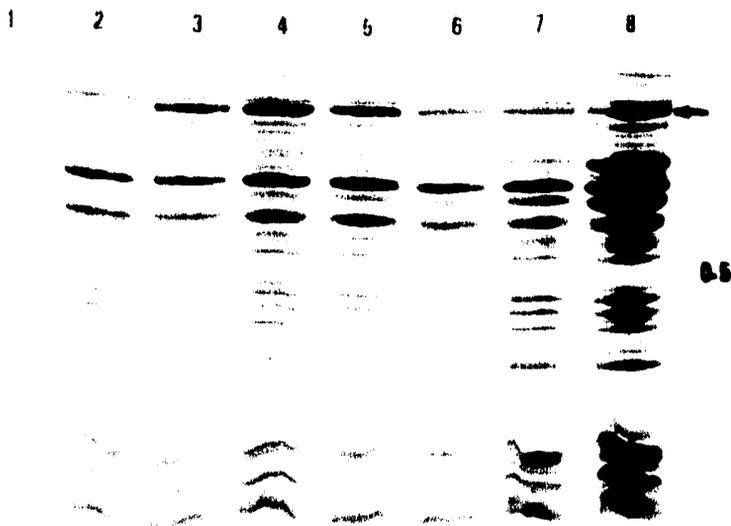


Fig.12 El analisis de proteínas totales de las muestras de induccion a 0.55 de densidad optica inicial. El carril 1 es la albumina, el carril 2 es la muestra tomada al inicio de la induccion; el carril 3, muestra tomada a 30 minutos de induccion; carril 4, de 1 hora de induccion; carril 5, de 1.5 horas; carril 6, de 2 horas; carril 7, de 3 horas; y el carril 8, de 4 horas.

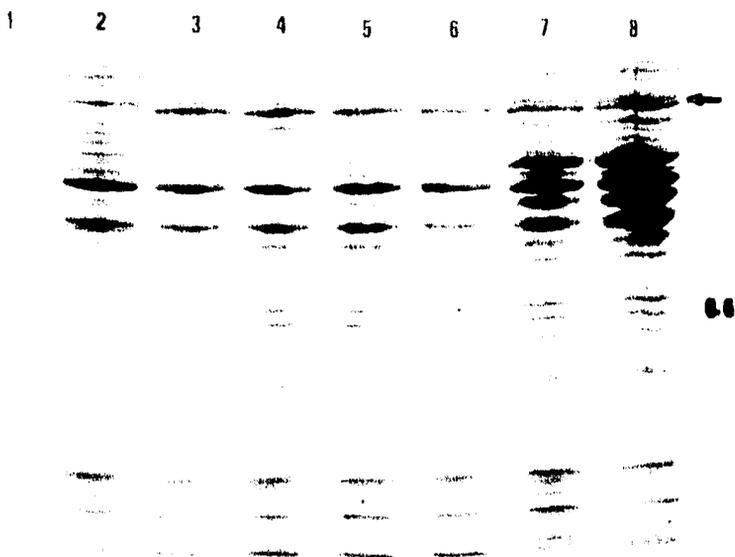


Fig.13 El analisis de proteínas totales de las muestras de inducción a 0.64 de densidad óptica inicial. El carril 1 es la albumina; el carril 2 es la muestra tomada al inicio de la inducción; carril 3, muestra de 30 minutos de inducción; carril 4, de 1 hora; carril 5, de 1.5 horas; carril 6, de 2 horas; carril 7, de 3 horas; y el carril 8, de 4 horas.

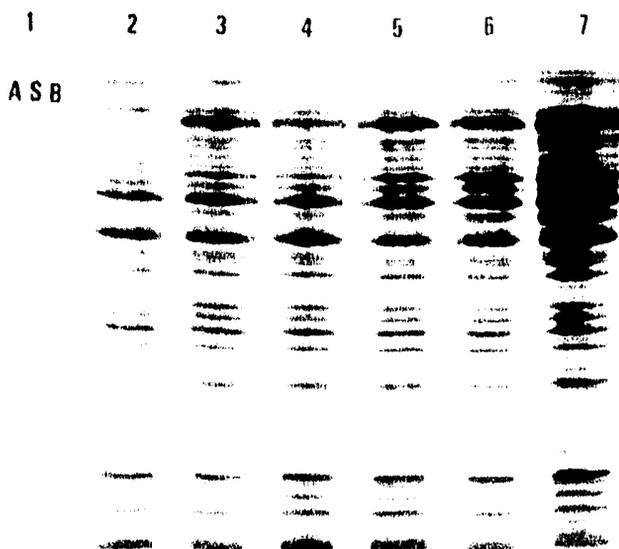


Fig.14 El analisis de proteínas totales de las muestras de inducción a 0.94 de densidad optica inicial. El carril 1 es la albúmina; el carril 2 corresponde a la muestra tomada al inicio de la inducción; el carril 3 es la muestra tomada 30 minutos despues de la inducción; carril 4, de 1 hora de inducción; carril 5, de 1.5 horas; carril 6, de 2 horas; y el carril 7, de 3 horas.

solamente se necesitaron 30 minutos para llegar a la cantidad máxima cuando se realizó la inducción a 0.94. (ver figuras 10, 11, 12, 13, y 14.). A consecuencia de lo anterior es la tendencia de empezar a reducir la cantidad de la proteína cada vez más temprana conforme va aumentando la densidad óptica inicial de inducción, excepto cuando se hizo la inducción a 0.94 D.O inicial.

La inducción realizada a 0.94 de densidad óptica inicial es un caso muy curioso. El máximo valor de la biosíntesis del Fragmento Klenow se alcanzó prácticamente con 30 minutos de inducción y durante las horas posteriores de incubación, se mantenía casi en la misma cantidad. Los datos de la Tabla III y la gráfica 2 nos indican que cuando se hizo la inducción a 0.94, después de 30 minutos de incubación a 42 °C las bacterias prácticamente ya no crecían durante las horas posteriores. La causa de lo cual bien podría ser por falta de nutrientes en el medio de cultivo, ya que en el momento de inducir las células, la densidad óptica era de 0.94, lo cual implica que en el medio ya había una gran cantidad de células.

Posteriormente, se hizo una comparación de los puntos en donde se produjo la cantidad máxima de la proteína en los diferentes puntos de inducción en un gel de SDS-poliacrilamida como muestra la figura 15. Estas muestras son: la de la inducción a 0.32 de densidad óptica inicial con 2 horas de incubación a 42 °C ( carril 2 ); de la inducción a 0.45 con 2 horas de incubación (carril 3); de la inducción a 0.55 con 1 hora de incubación (carril 4); de la inducción a 0.64 con 1 hora de incubación (carril 5) y la de la inducción a 0.94 con 30 minutos de incubación (carril 6). En esta figura se puede apreciar que la banda del Fragmento Klenow más intensa se encuentra en el carril 4 que corresponde a la muestra de la inducción

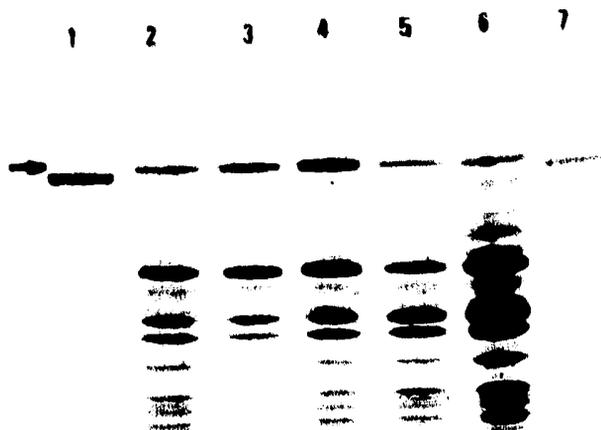


Fig.15 Comparación de los puntos máximos en cantidad del fragmento klonex en diferentes puntos de inducción en un gel de SBS-poliacrilamida al 11%. Los carriles 1 y 7 son de la albumina, el carril 2 corresponde a la muestra de 2 horas de inducción a 0,32 de densidad óptica inicial; carril 3, de 2 horas, a 0.45; carril 4, de 1 hora, a 0.55; carril 5, de 1 hora, a 0.6; y el carril 6, de 30 minutos, a 0.94 .

realizada a 0.55 de densidad óptica inicial con 1 hora de incubación. Aunque en el carril de la banda también es muy intensa, en general todas las bandas de este carril se ven más intensas. Es decir, en comparación con las proteínas totales, esta banda no se destaca mucho.

Por el hecho de que cuando las células crecen a temperatura muy alta, como en este caso, a  $42^{\circ}\text{C}$ , puede haber una inhibición de la biosíntesis proteica, se probó inducir las células a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y luego se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ . En este caso, no se obtuvo una mayor eficiencia en la expresión del gen del Fragmento Klenow, sino al contrario, la eficiencia era menor debido a que, a  $37^{\circ}\text{C}$ , el represor CI no se mantenía totalmente inactivo.

Por otro lado, también se ha probado inducir la expresión génica del Fragmento Klenow por adicionar un volumen de medio de cultivo a  $60^{\circ}\text{C}$ , en este caso fue medio Luria, y no se ha visto alguna diferencia significativa en comparación con el método de inducción convencional que es por el aumento de temperatura a  $42^{\circ}\text{C}$ .

Por lo último, cabe mencionar que durante la realización de este trabajo, varios problemas han sido los limitantes para obtener resultados más cuantitativos, tales como: por la propiedad de la enzima no se pudo medir la actividad enzimática; por la gran cantidad de las proteínas presentes, dificultó cuantificar el fragmento klenow por densitometría.

## DISCUSION Y CONCLUSION:

Existen algunos puntos a considerar cuando se desea optimizar la expresion de un gene una vez que éste ya ha sido clonado y puesto bajo control de señales regulatorias adecuadas. Uno de ellos es el de obtener mayor producción de la proteína y a la vez mayor cantidad de células por litro de cultivo; otro es el de considerar los costos de mantenimiento de la fermentación, inducción, etc.

Con base en los resultados presentados en este trabajo, parece ser fácil llegar a la conclusión de que, se obtiene la mayor cantidad del fragmento klenow cuando se inducen las células a 0.55 de densidad óptica(D.D) inicial a 600 nm y con un tiempo de incubación a 42 C de dos horas. Sin embargo, uno puede preguntarse que si es el mejor punto para coleccionar las células y obtener el máximo rendimiento en la producción de la enzima tomando en cuenta la diferencia de densidad celular en los diferentes puntos de inducción. Evidentemente, las inducciones realizadas a densidades ópticas iniciales de 0.32 y 0.45 no han sido las mejores, ya que después de 2 horas de incubación a 42 C donde se alcanzó la cantidad máxima de la enzima, la densidad celular no fue mayor que la de la inducción realizada a 0.55 de densidad óptica inicial a 600nm (D.O.I) y con un tiempo de incubación de una hora. La inducción realizada a 0.64 D.O.I no puede ser el mejor punto de inducción aunque la densidad celular fue mayor después de una hora de inducción, puesto que la banda de la proteína se ve menos intensa. Quizas,

el punto de discusión está entre la inducción a 0.55 D.O.I y la inducción a 0.94 D.O.I. Cuando se indujeron las células a 0.94 D.O.I,

el fragmento klenow apareció como máximo en 30 minutos de inducción y no se observa algún decremento en cantidad de esa proteína durante las horas posteriores de incubación y la banda se ve bastante intensa en todos los carriles (ver fig.14). Al comparar este resultado con los demás puntos de inducción (fig.15), se ve la banda de la proteína es poco intensa que la observada al inducir las células a 0.55 D.O.I durante una hora de incubación, sin embargo, es más intensa que las bandas obtenidas en los otros puntos de inducción. Además, la densidad celular es mayor ( 1.05 en 30 minutos de inducción ) en el caso de inducir las células a 0.94 D.O.I, y la diferencia de la densidad óptica entre las muestras de inducción a 0.55 con una hora de incubación y a 0.94 con 30 minutos de incubación es de 0.35, que es una cifra bastante significativa en el sentido de que esta cifra implica 200 millones de células/ml aproximadamente. Tal vez, desde el punto de vista del aprovechamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, sobre todo cuando se quiere hacer la inducción en volúmenes grandes, el inducir las células a 0.94 D.O.I es mejor. Además, a tal punto de inducción, el máximo valor se alcanza en 30 minutos de inducción, por lo que sólo se necesitará este tiempo para mantener el fermentador a 42 °C .

Un punto que es necesario hacer notar es que cuando se indujeron las células a 0.32 D.O.I como densidad óptica inicial, la biosíntesis del Fragmento Klenow se alcanzó su máximo valor en dos horas de inducción y desde este momento empezó el decremento de esta proteína en cantidad, justamente con el decremento, las células empezaron a crecer con una velocidad mayor. Los cálculos nos indican que el aumento promedio de la densidad óptica por media hora es de 0.016 durante las primeras 2 horas de inducción, menos la primera

media hora. Por otro lado, el aumento de la densidad óptica a partir de 2 horas a 2.5 horas de inducción es de 0.06 y el aumento promedio es mayor que 0.06 durante las horas posteriores de incubación. Estos datos significan que a partir de 2 horas de inducción donde se alcanzó el máximo valor de la biosíntesis del fragmento klenow, las células empezaron a crecer 3 veces más rápido. Esta coincidencia sucedió en todos los puntos de inducción, especialmente en el caso de la inducción realizada a 0.94 D.O.I. en donde no se observa el decremento en la cantidad de la enzima durante dos horas y media de incubación a 42 C y el crecimiento celular fue prácticamente cero. Esto pudiera sugerir que cuando la síntesis del fragmento klenow es muy activa, la enzima se acumula alterando de esta forma el metabolismo de la bacteria y la hace dejar de crecer. Y en un tiempo determinado, muy probablemente, la bacteria activa un sistema de degradación del fragmento klenow que ocasiona la disminución de la concentración de esta enzima y la célula vuelve a crecer. Esta parece ser la respuesta de la bacteria a la biosíntesis del fragmento klenow, pues todos los casos excepto cuando se indujo a 0.94, la intensidad de la banda de la enzima alcanzó un máximo y posteriormente decreció (ver fig. 10,11,12,13, y 14). El hecho de que no se observa un decremento en los niveles de la enzima ni un crecimiento celular cuando se inducen las células a 0.94 D.O.I., probablemente se debe a que, a esta densidad óptica ya hay una gran cantidad de células y por la falta de nutrientes, oxígeno etc, las células no puede activar un sistema para la degradación.

Finalmente, se pueden resumir los principales resultados de este trabajo en los siguientes puntos:

1.- Se puede obtener la máxima producción del Fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I cuando se realiza la inducción de las células con una densidad óptica inicial de 0.55 D.O.I. a 600 nm.

2.- Desde el punto de vista del aprovechamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, se obtiene mayor rendimiento en producir el Fragmento Klenow cuando se inducen las células a 0.94 de densidad óptica inicial a 600 nm, ya que se obtienen mayor número de células en el orden de un 40 % más.

3.- Conforme va aumentando la densidad óptica inicial en la se que hace la inducción, la biosíntesis del Fragmento Klenow alcanza su valor máximo cada vez más rápido, es decir, se utiliza cada vez menos tiempo de inducción.

4.- La biosíntesis inducida del Fragmento Klenow bajo el control del promotor  $P_L$  afecta evidentemente el crecimiento normal de las células.

## REFERENCIAS:

- 1.- Smith H y Wilcox K W, (1970). *J.Mol.Biol.* (51) pp-379.
- 2.- Roberts R J (1976). *Critical. Rev. Biochem.* (4) pp-123.
- 3.- Bolivar F, Rodríguez R, Greene P J, Betlach M, Heynecker H, Boyer A W, Crosa J, y Falco S (1977). *Gene* (2) pp-95.
- 4.- Cohen S N, Chang A, Hsu C. (1973). Transformation of an *E.coli* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (70) pp-3240.
- 5.- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs A, Heynecker H, Bolivar F, y Boyer A W. (1977) *Science* (198) pp-1056.
- 6.- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter W J, y Goodman H M. (1977). *Science* (196) pp-1313.
- 7.- Goeddel D V, Yelverton E, Ullrich A, Heynecker H, Miozzari G, Holmes U, Seeburg P H, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Wada S, McCandliss M, Sloma A, Tabar J M, Gross M, Familletti P C, y Peetka S. (1980). *Nature* (287) PP-411.
- 8.- Goeddel D V, Shepard M M, Yelverton E, Leung D y Crea R. (1980). *Nucleic Acids Res.* (8) pp-4057
- 9.- Seeburg P, Shine J, Martial J A, Ivarie R D, Morris J A, Ullrich A, Baxter J D y Goodman H M. (1977). *Nature* (270) pp-494.
- 10.- Rosenberg M y Court D. (1979). *Ann. Rev. Genetics.* (13) pp-319.
- 11.- Sibenlist U, Simpson R B, y Gilbert W. (1980). *Cell.* (20) pp-269.
- 12.- Fuller F. (1981). Ph.D. thesis.  
Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
- 13.- Tacon U, Carey M, y Emtage S. (1980). *Mol. Gen. Genet.* (177) pp-427.
- 14.- de Boer H A, Comstock L J, Yansura D G, y Heynecker H. (1982). " Promoter structure and function " ( Rodríguez R L and Chamberlin M. eds.) Praeger Publishers, New York.
- 15.- Renaut E, Stanssens P, y Fiers W. (1981). *Gene* (15) pp-81.
- 16.- Shimatake H y Rosenberg M. (1981). *Nature* (292) pp-128.
- 17.- Reed R R. (1981). *Cell* (25) pp-713
- 18.- Miller J H (1972). *Experiments in Molecular Genetic.* pp-3.  
Ed: Cold Spring Harbor Laboratory.

- 19.- de Boer H A, y Shepard H M. (1983). Gene structure and expression  
Kroon A M. Ed: John Wiley and sons Ltd. p-205.
- 20.- Yanofsky C, Platt T, Grawford I P, Nichols B P, Christie G E,  
Horowitz H, Van Cleemput M y Wu A M. (1981).  
Nucleic Acids Res. (9) pp-6647.
- 21.- Szybalski y Szybalski. (1979). A comprehensive molecular map  
of bacteriophage lambda. Gene (7) pp-217.
- 22.- Bernard H U, Remaut E, Hershfield M V, Das H K, Helinski D R,  
Yanofsky C, y Franklin N. (1979). Gene (5) pp-59.
- 23.- Shine y Dalgarno, (1975). Nature (254) pp-34.
- 24.- Iserentant D, y Fiers W, (1980). Gene (9) pp-1.
- 25.- Kozak M, (1981). Nucleic Acids Res, (9) pp-5233.
- 26.- Grantham D V et al (1981). Nucleic Acids Res (9) pp-443.
- 27.- Ikemura T, (1981). J. Mol. Biol. (146) pp-1.
- 28.- De Maeyer E, Skup B, Prasad K S M, De Maeyer-Guignard J,  
Williams B, Sharp G, Pioli D, Hennam J, Schuch U, y Atherton K T,  
(1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (79) pp-4256.
- 29.- Mott J E, Grant R A, Ho Y S, y Platt T, (1985).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (82) pp-88.
- 30.- Shepard H M, Yelverton E, y Goeddel D V, (1982).  
DNA (1) PP-125.
- 31.- Gross J, y Gross M, (1969). Nature (224) pp-1166.
- 32.- Kato T, y Kondo S, (1970). J. Bact. (104) pp-871.
- 33.- Town C D, Smith K C, y Kaplan H S, (1971). Science (172) pp-851.
- 34.- Cooper P K, y Hanawalt P C, (1972).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (69) pp-1156.
- 35.- Kornberg A, (1980). DNA replication. W. H. Freeman and Company.
- 36.- Jovin T M, Englund P T, y Bertsch L L, (1969).  
J. Biol. Chem. (244) pp-2996.
- 37.- Lehman I R, Bessman M J, Simms E S, y Kornberg A, (1958).  
J. Biol. Chem. (233) pp-163.
- 38.- Brutlag D, y Kornberg A, (1972). J. Biol. Chem. (254) pp-241.
- 39.- Lehman I R, y Richardson C C, (1964). J. Biol. chem. (239) pp-233.
- 40.- Klett R P, Cerami A, y Reich E, (1968).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (60) pp-943.

- 41.- Cozzarelli M R, Kelly K B, y Kornberg A, (1969).  
J. Biol. Chem. (45) pp-513.
- 42.- Deutscher M P, y Kornberg A, (1969). J. Biol. Chem. (244) pp-3019.
- 43.- Atkinson M R, Deutscher M P, Kornberg A, Russel A F, y Moffatt  
J G, (1969). Biochemistry. (8) pp-4897.
- 44.- Jack G Chirikjian y Takis S Papas, (1981).  
Gene amplification and analysis Vol 2, " structural analysis  
of nucleic acids ", pp-23. Ed. Elsevier/North-Holland.
- 45.- Brutlag D, Atkinson M R, Setlow P, y Kornberg A, (1969).  
Biochem. Biophys. Res. Commun. (37) pp-982.
- 46.- Klenow H, y Henningsen I, (1970).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (65) pp-168.
- 47.- Catherine M Joyce, y Nigel F Grindley (1983).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (80) pp-1830.
- 48.- Linus L Shen, y Andre G Pernet (1985).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (82) pp-307.
- 49.- Gottesman M E, et al (1980). Transcription antitermination  
by bacteriophage lambda N gene product  
Mol. Biol. (140) pp-57.
- 50.- Maniatis T, Fritsch E F, y Samborook J, (1982).  
MOLECULAR CLONING a laboratory manual.  
Ed: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 51.- Laemli V K, (1970), Cleavage of structural proteins during  
the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Mature (227) pp-680.