



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

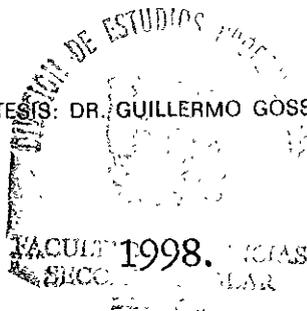
"CARACTERIZACION, CLONACION Y EXPRESION DEL GENE udhA QUE CODIFICA PARA UNA TRANSHIDROGENASA SOLUBLE EN E. coli."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
DIEGO ROMERO PEREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

26 05 80



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Caracterización, clonación y expresión del gene udhA que
codifica para una transhidrogenasa soluble en E. coli."

realizado por Diego Romero Pérez

con número de cuenta 9455587-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Guillermo Gosset L.

Propietario

Dr. Enrique Merino Pérez

Enrique Merino Pérez

Propietario

M.enC. Víctor Manuel Valdés López

Victor Manuel Valdés López

Suplente

Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes

Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes

Suplente

M.enC. Arturo Carlos Bracho

Arturo Carlos Bracho

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A Dios

A mi madre Gloria Nayra

A mis abuelos Gloria y Mario

A mis Tios

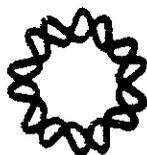
A mis Primos

A mi Universidad

Con un infinito agradecimiento por el apoyo
brindado para la realización del presente
trabajo al Dr. Guillermo Gosset, Dr. Enrique
Merino, Dr. Francisco Bolívar y Dr. Fernando
Valle.

Con un especial agradecimiento a Noemí,
Ramón, Georgina y a todos mis compañeros,
amigos y colaboradores de laboratorio y
de éste tan prestigiado instituto.

Instituto de Biotecnología



Indice

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| I. Transcripción | 3 |
| a) Inicio | 4 |
| b) Elongación | 5 |
| c) Terminación | 6 |
| II. Operón | 6 |
| III. Traducción | 8 |
| a) Inicio | 9 |
| b) Elongación | 9 |
| c) Terminación | 10 |
| IV. Transhidrogenasas | 10 |
| Justificación y objetivos | 19 |
| Materiales y Métodos | |
| Materiales | |
| I. Reactivos | 20 |
| II. Amortiguadores y soluciones | 20 |
| III. Enzimas y proteínas | |
| a) Endonucleasas de restricción | 21 |
| b) Ligasa | 22 |
| c) RNAsa | 22 |
| d) Proteínas | 22 |
| IV. Medios de cultivo | 23 |
| V. Antibióticos | 23 |
| VI. Cepas bacterianas | 23 |
| VII. Plásmidos y DNA | 24 |

Métodos

| | | |
|-------|--|----|
| I. | Amplificación por PCR del Gene <i>udhA</i> del DNA Cromosomal de <i>E. coli</i> y del Templado para la Secuencia del Mismo | 25 |
| II. | Estrategias de Clonación | |
| a) | Clonación en el vector pCR-Blunt. | 25 |
| b) | Clonación en el vector pTrc99A | 27 |
| III. | Extracción de Plásmidos de <i>E. coli</i> por Lisis Alcalina | 27 |
| IV. | Extracción de DNA con Fenol/cloroformo | 29 |
| V. | Digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción | 29 |
| VI. | Electroforesis en Gel | 29 |
| VII. | Extracción de DNA de Geles de Agarosa Empleando una Microcentrífuga | 30 |
| VIII. | Preparación de Células Electrocompetentes | 30 |
| IX. | Electrotransformación | 31 |
| X. | Preparación y Transformación de Células Competentes por Método Químico | 31 |
| XI. | Reacción de Secuenciación | 31 |
| XII. | Corrimiento de Gel para Secuencia | 32 |
| XIII. | Inducción de <i>udhA</i> en el vector pTrc99A con IPTG | 33 |
| XIV. | Extracción de Proteína Soluble | 33 |
| XV. | Medición de Actividad de Transhidrogenasa Soluble para UDHA | 33 |
| XVI. | Determinación de la Concentración de Proteína Soluble | 34 |
| XVII. | Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA en <i>E. coli</i> | 34 |

Resultados

| | | |
|------|--|----|
| I. | Aislamiento del Gene <i>udhA</i> por PCR | 36 |
| II. | Determinación de la Secuencia Nucleotídica de la Región 5' de <i>udhA</i> | 36 |
| III. | Análisis de la Secuencia Nucleotídica de <i>udhA</i> y de la Proteína para la que Codifica | 42 |

| | | |
|-------|---|----|
| IV. | Localización y Análisis Detallado de <i>udhA</i> en el Cromosoma de <i>E. coli</i> | 43 |
| V. | Regiones de Regulación Transcripcional Propuestas para <i>udhA</i> | 45 |
| VI. | Análisis de la Estructura Primaria y Secundaria en la Proteína UDHA de <i>E. coli</i> | 46 |
| VII. | Comparación de UDHA de <i>E. coli</i> con otras Disulfuro-oxidorreductasas | 49 |
| VIII. | Determinación de Actividad para la Transhidrogenasa Soluble UDHA de <i>E. coli</i> | 55 |
| IX. | Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA para <i>E. coli</i> Transformada con el plásmido pTrc99A+ <i>udhA</i> e Inducida con IPTG | 58 |
| | Discusión | 60 |
| | Conclusiones | 68 |
| | Perspectivas | 69 |
| | Bibliografía | 72 |

Resumen

Con el propósito de identificar la función para uno de los genes considerados hipotéticos en el genoma de *E. coli*, se clonó y caracterizó al gene *udhA*, determinándose que codifica para una proteína con actividad de transhidrogenasa soluble. Antes de este trabajo solo se sabía de la existencia de una transhidrogenasa dependiente de energía codificada por los genes *pntAB* en la misma bacteria.

Empleando programas de cómputo, se analizó la secuencia nucleotídica reportada para *udhA*. El análisis de las regiones 5' y 3' reveló la presencia de posibles sitios de regulación transcripcional.

Se aisló el gene *udhA* del DNA cromosomal de *E. coli* por PCR. Se clonó colocándose bajo el control transcripcional del promotor *trc* presente en el plásmido pTrc99A. Se determinaron por secuenciación de su región 5' las primeras 145 bases del mismo. Con base en este análisis, se detectó y corrigió un error en la secuencia previamente reportada para este gene.

Al comparar la estructura primaria entre la transhidrogenasa soluble UDHA de *E. coli* y otras proteínas similares en un alineamiento múltiple, se encontraron dos sitios de unión a nucleótidos que en conjunto forman el pliegue Rossmann, que es el dominio que se une a dinucleótidos de nicotinamida.

Los dos experimentos independientes realizados con extractos de *E. coli* transformada e inducida con el plásmido portador de *udhA*, revelaron que la actividad enzimática del producto es en efecto de transhidrogenasa soluble y que es similar a la reportada para otras bacterias.

Por último, se determinó en geles de acrilamida que una proteína con peso molecular aproximado de 51.5kDa, posiblemente UDHA; constituyó el 1.9% en la concentración total de proteínas de una cepa transformada con el plásmido pTrc99A+*udhA*.

Introducción

Un genoma se define como la totalidad del material genético que presenta un organismo determinado (39). La secuenciación de los genomas completos de distintos organismos y especialmente de aquellos que sirven como modelo experimental, ha hecho posible el estudio de todos sus genes en conjunto para integrar una gran cantidad de conocimiento y poder comprender mejor su fisiología (7). Al contar con la totalidad de la secuencia de los genes y establecer la relación que guardan entre sí en la misma especie o entre especies, también es posible asignar o proponer una función y además, nos brinda la oportunidad de analizar e interpretar la evolución molecular a un nivel más alto que el de los genes por separado (22).

La bacteria *Escherichia coli* es un componente importante de la biósfera, ya que coloniza el intestino grueso de los animales y como aerobio facultativo, tiene la capacidad de sobrevivir al ser liberada en el medio ambiente, lo cual le permite la diseminación y colonización de nuevos huéspedes (7). Algunas cepas patógenas de *E. coli* son responsables de infecciones en aparato gastrointestinal, conductos urinarios, pulmones y sistema nervioso (7). Por otra parte, *E. coli* está considerada como un organismo modelo preferido para el estudio de la bioquímica y biología molecular, así como para su empleo en biotecnología (7).

El genoma de *E. coli* consta de 4,639,221 pares de bases (bp), de las cuales el 87.8% conforman a los 4,288 genes que codifican para proteínas. De estos, solo una tercera parte están bien caracterizados y al 38% restante no se ha atribuido función alguna (7). La identificación de la función de aquellos genes no caracterizados es la meta de un número importante de grupos de investigación en el mundo. El enfoque utilizado para asignar la función a un gene desconocido se basa en tres herramientas generales: 1) análisis computacional, 2) aislamiento y manipulación del gene mediante ingeniería genética y 3) el estudio bioquímico del producto proteínico codificado por el gene bajo estudio.

Las bases de datos que contienen las secuencias de genes y proteínas provenientes de diversos organismos, constituye una fuente muy importante de información para el estudio de la organización genética y la relación estructura-función en proteínas. Combinando el análisis computacional con estudios experimentales, ha sido posible asignar funciones biológicas a secuencias específicas en moléculas de DNA, RNA y proteínas. Estas secuencias se derivan del alineamiento y análisis de varias moléculas con propiedades similares. A partir de varias secuencias similares se deriva una secuencia consenso, que en muchos casos representa las características esenciales para una determinada función biológica. Las secuencias consenso han resultado ser una herramienta muy útil para el análisis computacional predictivo del genoma de organismos. Mediante alineamientos por computadora de las secuencias consenso contra las secuencias desconocidas en un gene o genoma, es posible identificar regiones que pudieran tener una función similar a la que ya ha sido identificada para la secuencia consenso. Posteriormente, el gene o proteína puede ser aislado por medio de las técnicas de ingeniería genética para determinar su actividad biológica.

La ingeniería genética es el conjunto de técnicas que nos permiten la alteración de la constitución en el genoma de una célula o individuo mediante una modificación dirigida y selectiva (39). Este conjunto de

técnicas ha tenido un efecto muy positivo en la investigación básica y aplicada. En la primera nos permite estudiar los fenómenos genéticos que suceden a nivel molecular, en este caso, determinar la función de un gene y en la segunda, la manipulación de genes para el mejoramiento genético de organismos y síntesis de productos con interés industrial (39).

Para poder analizar un gene determinado se requiere aislarlo del genoma y amplificarlo por separado. Ello es posible gracias a la técnica del DNA recombinante, la cual consiste en unir un fragmento de DNA de un organismo al DNA de otro organismo de la misma o distinta especie, para clonar y obtener muchas copias idénticas de esta molécula recombinante (39).

A continuación se describen aspectos generales relacionados con la expresión génica y su regulación bajo condiciones determinadas :

I. Transcripción.

Transcripción se define como el proceso enzimático en el que la información genética contenida en una molécula de DNA de doble hebra es transferida a una molécula de RNA de hebra sencilla (20,24,25,39).

En la transcripción, la hebra de DNA que funciona como molde para síntesis de RNA se denomina hebra templado o hebra (-) y la hebra de DNA complementaria al templado se denomina hebra codificante o hebra (+), que es idéntica a la secuencia del transcrito de RNA, pero con timina en lugar de uracilo (20,24,25,39). Este proceso difiere de la replicación de DNA en que no requiere un cebador, solo involucra segmentos cortos de DNA y solo una de las dos hebras sirve como templado (24).

En procariontes los genes pueden dividirse en tres regiones con respecto a su transcripción (Fig. 1) :

- I. El promotor, la secuencia de DNA adyacente al inicio del gene con la que la RNA polimerasa interactúa y es esta interacción la que determina el sitio de inicio de la transcripción (39).
- II. La región codificante, la secuencia de DNA transcrita por la RNA polimerasa a tRNA, rRNA o mRNA, cuya secuencia codificante será traducida en el ribosoma (39).
- III. El terminador, la secuencia en el transcrito de RNA al final del gene que especifica el sitio en donde termina la transcripción (39).

técnicas ha tenido un efecto muy positivo en la investigación básica y aplicada. En la primera nos permite estudiar los fenómenos genéticos que suceden a nivel molecular, en este caso, determinar la función de un gene y en la segunda, la manipulación de genes para el mejoramiento genético de organismos y síntesis de productos con interés industrial (39).

Para poder analizar un gene determinado se requiere aislarlo del genoma y amplificarlo por separado. Ello es posible gracias a la técnica del DNA recombinante, la cual consiste en unir un fragmento de DNA de un organismo al DNA de otro organismo de la misma o distinta especie, para clonar y obtener muchas copias idénticas de esta molécula recombinante (39).

A continuación se describen aspectos generales relacionados con la expresión génica y su regulación bajo condiciones determinadas :

I. Transcripción.

Transcripción se define como el proceso enzimático en el que la información genética contenida en una molécula de DNA de doble hebra es transferida a una molécula de RNA de hebra sencilla (20,24,25,39).

En la transcripción, la hebra de DNA que funciona como molde para síntesis de RNA se denomina hebra templado o hebra (-) y la hebra de DNA complementaria al templado se denomina hebra codificante o hebra (+), que es idéntica a la secuencia del transcrito de RNA, pero con timina en lugar de uracilo (20,24,25,39). Este proceso difiere de la replicación de DNA en que no requiere un cebador, solo involucra segmentos cortos de DNA y solo una de las dos hebras sirve como templado (24).

En procariontes los genes pueden dividirse en tres regiones con respecto a su transcripción (Fig. 1) :

I. El promotor, la secuencia de DNA adyacente al inicio del gene con la que la RNA polimerasa interactúa y es esta interacción la que determina el sitio de inicio de la transcripción (39).

II. La región codificante, la secuencia de DNA transcrita por la RNA polimerasa a tRNA, rRNA o mRNA, cuya secuencia codificante será traducida en el ribosoma (39).

III. El terminador, la secuencia en el transcrito de RNA al final del gene que especifica el sitio en donde termina la transcripción (39).

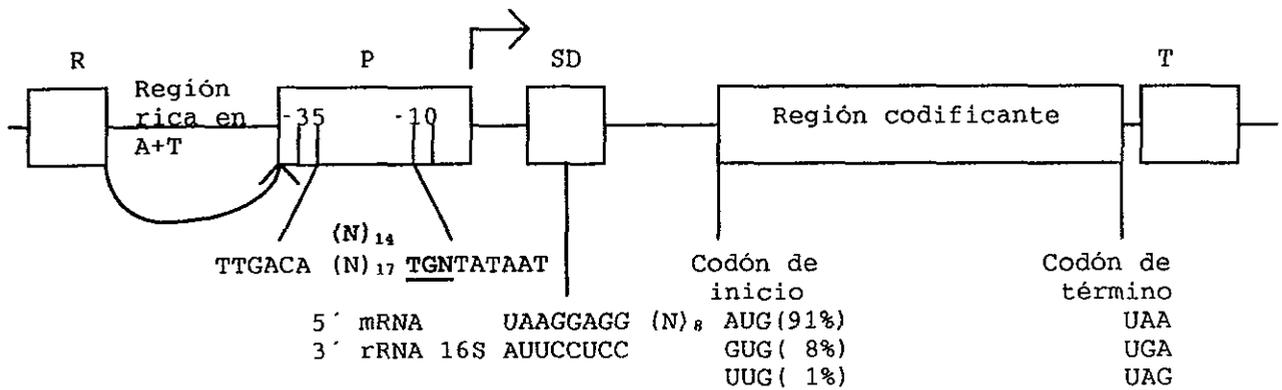


Figura 1. Representación gráfica de los elementos de secuencia que componen a un gene procarionte. El promotor (P) con sus regiones -35 y -10 separadas por 17bp. El sitio de unión al ribosoma (SD), aproximadamente 8bp anteriores al codón de inicio. La región codificante y un terminador (T) posterior al codón de término. En algunos casos, el represor o activador está codificado por otro gene regulador (R) que controla la actividad del promotor (27). En negrita y subrayada aparece una región conservada en la caja -10 descrita por DeHaseh, et. al. (12) y en este caso la separación entre las regiones -35 y -10 sería de 14bp.

El proceso de transcripción puede describirse en tres fases consecutivas :

a) Inicio.

En *E. coli* existe una sola RNA polimerasa grande y compleja (390kDa) que sintetiza todos los tipos de RNA en la bacteria. Esta holoenzima esta compuesta por cinco subunidades principales : La subunidad beta (β) con peso molecular de 150kDa, beta prima (β') de 160kDa, dos subunidades alfa (α) de 40kDa cada una y sigma (σ), la mas común de 70kDa (σ^{70}). Las subunidades β , β' y dos α 's conforman a la enzima núcleo, la subunidad σ solo se une transitoriamente a la enzima núcleo y es esencial para el reconocimiento de promotores (12,20,39). Si el factor σ no se une para formar la holoenzima, la enzima núcleo simplemente se unirá al DNA en varios sitios pero no iniciará la transcripción eficientemente a partir de alguno (20,24,25,39).

En *E. coli* para el inicio de la transcripción se requieren dos secuencias de DNA esenciales en el promotor. Estas secuencias se localizan en dos sitios distintos, anteriores a la primera base que será transcrita, se trata de las regiones -35 y -10. Ambas secuencias se denominan así, ya que es el número aproximado de pares de bases que las separa del punto en el que inicia la transcripción y a esta base se le designa como +1 (20,24,25,39).

En aquellos promotores reconocidos por la RNA polimerasa que contiene a la subunidad σ^{70} , la secuencia consenso para la región -35 es (Fig. 1) :

5' - T T G A C A -3'

La secuencia consenso para la región -10, también conocida como la caja Pribnow es (Fig. 1) :

5' - T A T A A T - 3'

Ambas regiones presentan una separación de 17 pares de bases (12,20,24,25,29,39) y la región -10 comunmente se encuentra 7 pares de bases anteriores del punto +1 en el que inicia la transcripción (25,39).

Aparte de la similitud que presente un promotor con la secuencia consenso para ambas regiones y la distancia que las separa, existen otras dos características que determinan la actividad de éste (Fig. 1) : 1) una secuencia rica en A+T que interactúa con la subunidad α , localizada entre las posiciones -40 y -60 y 2) una secuencia TGN muy conservada precediendo a la caja Pribnow, se ha observado que aquellos promotores que contienen esta región -10 extendida (TGNTATAAT) presentan una actividad óptima aún en ausencia de la región -35 (12).

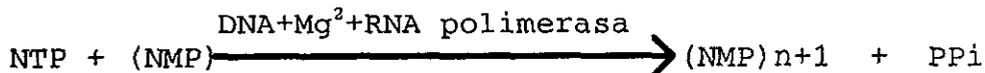
La holoenzima RNA polimerasa se une al promotor en dos fases :

Primero se une débilmente a la región -35 del promotor estando aún el DNA en forma de doble hebra (20,25,39), a esto se le conoce como complejo de promotor cerrado (20). En la segunda fase, se establece una unión mas fuerte entre la RNA polimerasa y el DNA, que a su vez involucra un desenrollamiento de aproximadamente 17 pares de bases del DNA (20,25,39), el equivalente a dos vueltas localizadas en la región -10 y a esto se le conoce como complejo de promotor abierto (12,20). Se ha propuesto que este desenrollamiento del DNA es posible debido a que en la región -10, rica en pares T-A, se tienen solo dos puentes de hidrógeno por par de bases, los cuales resultan más fáciles de separar que los pares G-C al presentar tres puentes de hidrógeno (25,39).

La diferencia en las tasas de expresión de diferentes genes puede atribuirse a que sus promotores difieran ligeramente de las secuencias consenso y de la distancia óptima que separa ambas regiones, lo cual variaría significativamente la eficiencia con la que RNA polimerasa reconoce y se une a ellos (12). Además, existen distintos factores σ que reconocen promotores diferentes y que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica (12,24,39).

b) Elongación.

Durante la síntesis de RNA, siempre en dirección 5'-3'; la RNA polimerasa emplea nucleósido trifosfatos (NTPs) como substrato y la energía para la reacción se deriva del rompimiento del trifosfato de alta energía en monofosfato y difosfatos inorgánicos que son liberados (20) :



Una vez ensamblados nueve nucleótidos de RNA, el factor σ se separa de la enzima núcleo (12), la cual completará la transcripción del gene formando una burbuja similar a la de replicación de DNA. Durante este proceso aproximadamente 17 pares de bases permanecen separadas formando

un híbrido RNA/DNA a una velocidad de 30-50 nucleótidos/seg, conforme la RNA polimerasa avanza (39).

c) Terminación.

La terminación de la transcripción puede ser de dos maneras dependiendo del tipo de terminador que presente un gene.

Los terminadores tipo I, ρ independientes o intrínsecos no requieren de factores auxiliares para el término de la transcripción y presentan dos características evidentes en el templado de DNA : Una secuencia palindrómica, que en el transcrito de RNA corresponde a una estructura secundaria de tallo-asa anterior al final del mismo y un continuo de 4-8 adeninas. La primera es generada en el RNA por el apareamiento de repeticiones invertidas que forman al tallo, separadas por una distancia corta que forma el asa. La longitud del tallo es variable y contiene una región rica en pares G-C cercana a la base. Dicho tallo-asa probablemente induce cierta lentitud en la RNA polimerasa hasta generar una pausa en el proceso, lo cual permite que ambas hebras de DNA separadas y anteriores a la enzima comiencen a hibridar consigo mismas, desplazando al híbrido RNA/DNA y a la polimerasa para que la terminación se lleve a cabo (20,24,25,27,39).

El continuo de pares U-A al final del híbrido RNA/DNA, al ser una combinación inestable de bases, requiere la energía mínima para su disociación en esta región terminal débilmente enlazada (25,39).

Los terminadores tipo II o dependientes de ρ requieren de un factor auxiliar para finalizar la transcripción y presentan una secuencia de 50-90 bases rica en citosinas y pobre en guaninas anterior al final del RNA (25). Dicho factor es una proteína de 46kDa llamada ρ que indica el cese de la transcripción, está compuesta de dos dominios, uno enlaza a ATP, el otro a la enzima núcleo y es activa en forma de hexámero (20,25,39). Durante el proceso ρ enlaza al ATP y es activado por éste para una posible función de RNA/DNA helicasa, ya activado ρ se une a su secuencia de reconocimiento *rut* una vez que haya sido sintetizada en el transcrito de RNA (20). Inmediatamente ρ avanza hasta alcanzar a RNA polimerasa que ha encontrado un pequeño terminador en forma de tallo-asa en el transcrito, pero sin un continuo de uridinas (24), ρ disocia al híbrido RNA/DNA de la burbuja de transcripción y a su vez finaliza el proceso por medio de la translocación del RNA, consiguiendo la liberación de éste de la RNA polimerasa (20,25,27).

En resumen, durante el término de la transcripción se llevan a cabo tres eventos importantes : Se detiene la síntesis de RNA y se liberan la cadena de RNA y la RNA polimerasa del DNA.

II. Operón.

En células procariontes, la variación en la tasa de síntesis de productos derivados de distintos genes involucra mecanismos de regulación que controlan la expresión génica (20,25,39). Un organismo cuenta con una gran cantidad de genes cuyos productos son esenciales para el funcionamiento normal durante su desarrollo, por ello permanecen activos

un híbrido RNA/DNA a una velocidad de 30-50 nucleótidos/seg, conforme la RNA polimerasa avanza (39).

c) Terminación.

La terminación de la transcripción puede ser de dos maneras dependiendo del tipo de terminador que presente un gene.

Los terminadores tipo I, ρ independientes o intrínsecos no requieren de factores auxiliares para el término de la transcripción y presentan dos características evidentes en el templado de DNA : Una secuencia palindrómica, que en el transcrito de RNA corresponde a una estructura secundaria de tallo-asa anterior al final del mismo y un continuo de 4-8 adeninas. La primera es generada en el RNA por el apareamiento de repeticiones invertidas que forman al tallo, separadas por una distancia corta que forma el asa. La longitud del tallo es variable y contiene una región rica en pares G-C cercana a la base. Dicho tallo-asa probablemente induce cierta lentitud en la RNA polimerasa hasta generar una pausa en el proceso, lo cual permite que ambas hebras de DNA separadas y anteriores a la enzima comiencen a hibridar consigo mismas, desplazando al híbrido RNA/DNA y a la polimerasa para que la terminación se lleve a cabo (20,24,25,27,39).

El continuo de pares U-A al final del híbrido RNA/DNA, al ser una combinación inestable de bases, requiere la energía mínima para su disociación en esta región terminal débilmente enlazada (25,39).

Los terminadores tipo II o dependientes de ρ requieren de un factor auxiliar para finalizar la transcripción y presentan una secuencia de 50-90 bases rica en citosinas y pobre en guaninas anterior al final del RNA (25). Dicho factor es una proteína de 46kDa llamada ρ que indica el cese de la transcripción, está compuesta de dos dominios, uno enlaza a ATP, el otro a la enzima núcleo y es activa en forma de hexámero (20,25,39). Durante el proceso ρ enlaza al ATP y es activado por éste para una posible función de RNA/DNA helicasa, ya activado ρ se une a su secuencia de reconocimiento *rut* una vez que haya sido sintetizada en el transcrito de RNA (20). Inmediatamente ρ avanza hasta alcanzar a RNA polimerasa que ha encontrado un pequeño terminador en forma de tallo-asa en el transcrito, pero sin un continuo de uridinas (24), ρ disocia al híbrido RNA/DNA de la burbuja de transcripción y a su vez finaliza el proceso por medio de la translocación del RNA, consiguiendo la liberación de éste de la RNA polimerasa (20,25,27).

En resumen, durante el término de la transcripción se llevan a cabo tres eventos importantes : Se detiene la síntesis de RNA y se liberan la cadena de RNA y la RNA polimerasa del DNA.

II. Operón.

En células procariontes, la variación en la tasa de síntesis de productos derivados de distintos genes involucra mecanismos de regulación que controlan la expresión génica (20,25,39). Un organismo cuenta con una gran cantidad de genes cuyos productos son esenciales para el funcionamiento normal durante su desarrollo, por ello permanecen activos

todo el tiempo independientemente de las condiciones del medio y a estos se les conoce como genes constitutivos, los cuales también pueden formar parte de un operón (20,25,39). Aquellos genes cuya actividad se encuentra bajo control en respuesta a las necesidades del organismo impuestas por el medio, se llaman genes regulados (20,25,39).

En los genes regulados la transcripción se encuentra controlada por la interacción entre elementos *cis* y elementos *trans* (25). Un elemento o factor *trans* es el producto de un gene regulador que puede difundirse en la célula para llegar al gene en donde ejerce su acción (Fig. 1), puede ser una proteína o una molécula de RNA (25). Un elemento *cis* es un sitio en la secuencia de DNA o RNA que funciona al ser reconocido *in situ* por un elemento *trans*, no presenta función codificante y únicamente puede regular aquellas secuencias adyacentes (25).

Algunos genes bacterianos agrupados que codifican para proteínas cuya función se encuentra relacionada, como en el caso de enzimas sucesivas en una ruta metabólica; pueden ser transcritos en forma de mRNA policistrónico o poligénico por la acción de un mismo promotor. El control que se ejerce sobre dicho promotor regulará la expresión de todos los genes agrupados posteriores al mismo (20,25,39).

La transcripción se encuentra controlada por interacciones entre proteínas y la vecindad del promotor, estas favorecen u obstaculizan la habilidad de RNA polimerasa para unirse al promotor e iniciar la transcripción (20,25). Existen dos mecanismos según el tipo de control bajo el que se encuentren los genes regulados: Se dice que un gene está bajo control negativo cuando el elemento *trans* interfiere con la unión de la RNA polimerasa al promotor y un gene está bajo control positivo cuando el elemento *trans* favorece la unión de la RNA polimerasa con el promotor (20,25).

En genes que se encuentran bajo control negativo, las proteínas o elementos *trans* que impiden la unión de RNA polimerasa al promotor e interfieren el inicio de la transcripción se denominan represor, estos actúan sobre secuencias específicas de DNA o elementos *cis* denominadas operador, localizados cerca o anterior al punto de inicio de la transcripción (20,25,39). Los operadores se caracterizan por presentar secuencias cortas y palindrómicas y los represores por reflejar la simetría de estas (25). A las moléculas pequeñas conocidas como efectores que regulan e impiden la unión de los represores a sus operadores se denominan inductor y aquellas que la favorecen se denominan correpresor (25,39). La unión del efector a su represor induce un cambio conformacional en el dominio de unión a DNA y esta regulación alostérica sucede tanto en represores en forma libre, como en los ya enlazados al DNA (25).

En genes que se encuentran bajo control positivo, algunos promotores no se reconocen o son muy débilmente reconocidos por RNA polimerasa. Para que la enzima pueda reconocer dichos promotores, requiere la presencia de proteínas reguladoras específicas o elementos *trans* denominados activador, que al interactuar con RNA polimerasa favorecen el inicio de la transcripción. Para que un activador ejerza su acción, debe estar a su vez previamente activado por un inductor (25).

En conclusión, a un grupo de genes cuya expresión se encuentra conjuntamente regulada por interacciones entre proteínas reguladoras con el operador, incluyendo al operador y el promotor; se denomina operón.

La inducción de un operón se logra cuando un inductor inactiva un represor o activa un activador y la represión, cuando un correpresor activa un represor o inactiva un activador (25). A un grupo de operones que se encuentran bajo control de un mismo regulador transcripcional se denomina regulón y a un conjunto de operones que responden a estímulos impuestos por el medio, independientemente del mecanismo de regulación que presenten; se denomina estimulón (31).

III. Traducción.

La traducción o síntesis de proteínas se define como el proceso de conversión de la información genética contenida en una secuencia de mRNA a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, mediada por el ribosoma (20,24,25,39).

Los ribosomas son partículas de ribonucleoproteínas que contienen moléculas de rRNA (25). En procariontes el ribosoma está conformado por dos subunidades que sedimentan como partículas 50S y 30S y que solo se ensamblan durante la síntesis de proteínas (20,25,39). Cada subunidad contiene moléculas grandes de rRNA 16S y 23S respectivamente, también hay moléculas pequeñas de rRNA 5S en la subunidad grande (25). La mayor parte de las moléculas grandes de rRNA presentan un extenso apareamiento de bases, formando tallos cortos apareados imperfectamente y asas de hebra sencilla (25). Las subunidades se asocian para formar al ribosoma como una partícula 70S y éste presenta en sus subunidades varios sitios activos localizados en el dominio traduccional, es decir, a donde se sintetizan las proteínas (20,25). Los sitios activos principales son : A, P, E, de unión a EF-Tu, EF-G, mRNA y Peptidil transferasa (20,25).

El mRNA enlaza a la subunidad 30S, las moléculas de tRNA enlazan a dos sitios que sobrelapan a ambas subunidades en el ribosoma : El sitio A es el sitio de entrada para el aminoacil-tRNA, una molécula de tRNA ya "cargada" con un aminoácido que será agregado a la cadena peptídica y el polipeptidil-tRNA que porta al polipéptido creciente, enlaza al sitio P (20,39).

Además de los codones de inicio en *E. coli* (AUG, GUG y en ocasiones UUG), para que inicie la síntesis de proteínas en procariontes se requiere de otra información codificada en la secuencia de mRNA anterior al codón de inicio llamada región líder. Dicha secuencia es un sitio de unión al ribosoma y sirve para alinear a éste en el marco de lectura indicado y que la proteína se sintetice correctamente. La mayoría de estos sitios de unión al ribosoma presentan una secuencia consenso G G A G G rica en purinas a una separación corta pero variable de 8-12 nucleótidos anteriores al codón de inicio (20,25,27,39). John Shine y Lynn Dalgarno sugirieron que esta secuencia al igual que algunos nucleótidos adyacentes que pueden variar, son complementarios a una región rica en pirimidinas que siempre presenta la secuencia C C U C C en el extremo 3' del rRNA en la subunidad 16S del ribosoma (20,25,27,39), indicando el alineamiento correcto para la traducción de la proteína (Fig. 1 y 2). Al sitio de unión al ribosoma también se le conoce como Shine-Dalgarno (SD).

La inducción de un operón se logra cuando un inductor inactiva un represor o activa un activador y la represión, cuando un correpresor activa un represor o inactiva un activador (25). A un grupo de operones que se encuentran bajo control de un mismo regulador transcripcional se denomina regulón y a un conjunto de operones que responden a estímulos impuestos por el medio, independientemente del mecanismo de regulación que presenten; se denomina estímulo (31).

III. Traducción.

La traducción o síntesis de proteínas se define como el proceso de conversión de la información genética contenida en una secuencia de mRNA a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, mediada por el ribosoma (20,24,25,39).

Los ribosomas son partículas de ribonucleoproteínas que contienen moléculas de rRNA (25). En procariontes el ribosoma está conformado por dos subunidades que sedimentan como partículas 50S y 30S y que solo se ensamblan durante la síntesis de proteínas (20,25,39). Cada subunidad contiene moléculas grandes de rRNA 16S y 23S respectivamente, también hay moléculas pequeñas de rRNA 5S en la subunidad grande (25). La mayor parte de las moléculas grandes de rRNA presentan un extenso apareamiento de bases, formando tallos cortos apareados imperfectamente y asas de hebra sencilla (25). Las subunidades se asocian para formar al ribosoma como una partícula 70S y éste presenta en sus subunidades varios sitios activos localizados en el dominio traduccional, es decir, a donde se sintetizan las proteínas (20,25). Los sitios activos principales son: A, P, E, de unión a EF-Tu, EF-G, mRNA y Peptidil transferasa (20,25).

El mRNA enlaza a la subunidad 30S, las moléculas de tRNA enlazan a dos sitios que sobrelapan a ambas subunidades en el ribosoma: El sitio A es el sitio de entrada para el aminoacil-tRNA, una molécula de tRNA ya "cargada" con un aminoácido que será agregado a la cadena peptídica y el polipeptidil-tRNA que porta al polipéptido creciente, enlaza al sitio P (20,39).

Además de los codones de inicio en *E. coli* (AUG, GUG y en ocasiones UUG), para que inicie la síntesis de proteínas en procariontes se requiere de otra información codificada en la secuencia de mRNA anterior al codón de inicio llamada región líder. Dicha secuencia es un sitio de unión al ribosoma y sirve para alinear a éste en el marco de lectura indicado y que la proteína se sintetice correctamente. La mayoría de estos sitios de unión al ribosoma presentan una secuencia consenso G G A G G rica en purinas a una separación corta pero variable de 8-12 nucleótidos anteriores al codón de inicio (20,25,27,39). John Shine y Lynn Dalgarno sugirieron que esta secuencia al igual que algunos nucleótidos adyacentes que pueden variar, son complementarios a una región rica en pirimidinas que siempre presenta la secuencia C C U C C en el extremo 3' del rRNA en la subunidad 16S del ribosoma (20,25,27,39), indicando el alineamiento correcto para la traducción de la proteína (Fig. 1 y 2). Al sitio de unión al ribosoma también se le conoce como Shine-Dalgarno (SD).

A U U C C U C C (3' rRNA 16S)

- - - - -

U A A G G A G G (5' mRNA)

Figura 2. Secuencia consenso del sitio Shine-Dalgarno indicando la complementariedad existente entre el mRNA y el extremo 3' del rRNA en la subunidad 16S del ribosoma. En negrita se indican las secuencias palindrómicas comunes a la subunidad 16S en todos los ribosomas analizados y en la mayoría de mRNA's.

También se requiere que las moléculas de tRNA se encuentren ya "cargadas". En el primer paso, catalizado por Aminoacil-tRNA Sintetasa; el aminoácido reacciona con ATP para producir un complejo aminoacil-AMP. En el segundo paso, también catalizado por Aminoacil-tRNA Sintetasa; el complejo aminoacil-AMP reacciona con el tRNA indicado para producir un aminoacil-tRNA. El aminoácido queda enlazado al extremo 3' del tRNA por la unión de su grupo carboxilo al grupo hidroxilo 3' o 2' en la ribosa del adenin-nucleótido, al final del tRNA (39).

El proceso de traducción o síntesis de proteínas también puede ser descrito en tres fases consecutivas : Inicio, elongación y término.

a) Inicio.

Además del mRNA, el ribosoma y las moléculas de tRNA, este proceso requiere de otros factores llamados factores de inicio IF1, IF2 e IF3 y de fMET-tRNA, ya que en *E. coli* y otros procariontes el primer aminoácido en una cadena polipeptídica recientemente sintetizada es N-formilmietionina, aunque pueda ser removido posteriormente (20,39).

El proceso comienza con el enlace del mRNA a la subunidad 30S, favorecido por el factor de inicio IF3. Luego, el factor de inicio IF2 enlaza a GTP y a fMET-tRNA, favoreciendo su unión al complejo 30S, lo cual deja a fMET-tRNA en el sitio P. Finalmente, con la hidrólisis de GTP enlazado a IF2, se consigue el ensamble de ambas subunidades ribosomales y entonces IF2 e IF3 son liberados. El papel exacto de IF1 no se ha esclarecido por completo aún (20,39).

b) Elongación.

Para esta fase del proceso se requieren de tres factores de elongación : EF-Tu, EF-Ts y EF-G (20,39).

El factor de elongación EF-Tu es el que permite la entrada de las moléculas de aminoacil-tRNA al sitio A. Primero EF-Tu enlaza a GTP, este complejo activado EF-Tu - GTP a su vez enlaza al tRNA y con la hidrólisis del GTP a GDP, se favorece el enlace del aminoacil-tRNA al sitio A y EF-Tu es liberado. El factor de elongación EF-Ts es el encargado de la liberación de EF-Tu - GDP del ribosoma y de la regeneración del complejo activo EF-Tu - GTP. Durante la translocación se lleva a cabo la transferencia de la cadena polipeptídica del peptidil-tRNA al aminoacil-tRNA en el sitio A, catalizada por la Peptidil-transferasa. El ribosoma entonces avanza un codón en el mRNA en dirección 5'-3', favorecido por el

factor de elongación EF-G que hidroliza GTP a GDP y con ello el tRNA "descargado" pasa del sitio P al sitio E a donde es liberado y el recién formado peptidil-tRNA se transfiere del sitio A al sitio P (20,39). El enlace de los factores EF-Tu y EF-G al ribosoma es mutuamente excluyente, lo cual asegura que cada paso finalice antes de que inicie el siguiente (25). Este proceso se repite hasta encontrar un codón de término y varios ribosomas pueden estar traduciendo simultáneamente una molécula de mRNA formando un complejo llamado polisoma (39).

c) Términación.

En esta última fase, el ribosoma requiere factores de liberación (RF) para finalizar el proceso, ya que no existen moléculas de tRNA con anticodones que reconozcan a codones sin sentido. RF1 y RF2 si reconocen codones de término. RF1 reconoce UAA y UAG, y RF2 reconoce UAA y UGA. RF3 no reconoce codones sin sentido, pero favorece la terminación del proceso (20,39). Cuando el peptidil-tRNA se encuentra en el sitio P, los factores de liberación en respuesta a los codones de término enlazan al sitio A y la hidrólisis de GTP favorece la liberación del polipéptido del sitio P y la disociación de las subunidades ribosomales, finalizando el proceso (20).

IV. Transhidrogenasas.

Las transhidrogenasas de piridin-nucleótidos catalizan la transferencia de equivalentes reductores entre los cofactores NAD y NADP, que en este caso funcionan como sustratos (10,14,16,19,21,45,46). Por equivalente reductor se entiende cualquier electrón o equivalente-electrón en la forma de un átomo de hidrógeno o ión hidruro que sea transferido en una reacción de óxido-reducción (24). Los dinucleótidos de nicotinamida NAD y NADP son acarreadores auxiliares solubles de electrones, omnipresentes en los sistemas vivientes y funcionan como cofactores de las oxidorreductasas, comúnmente llamadas deshidrogenasas, con las que se asocian reversiblemente (3,5,24,26). En las reacciones de óxido-reducción en las que participan, dichos cofactores experimentan la transferencia reversible de iones hidruro de la posición C-4 del anillo de la nicotinamida (3). Cuando este ión hidruro es transferido al frente del anillo plano de la nicotinamida, se dice que la transferencia es de tipo A y cuando es transferido a la parte posterior del mismo, se dice que la transferencia es de tipo B (5,24).

En general, los procesos de degradación oxidativa se asocian a NAD, que transporta los electrones derivados de reacciones catabólicas al punto de entrada de la cadena respiratoria (3,24,45), mientras que la especificidad de enzimas por NADP, que provee los electrones para reacciones anabólicas, está restringida a reacciones biosintéticas reductivas, salvo unas pocas excepciones (3,24,45). El NADP difiere del NAD solo en la esterificación de un fosfato adicional en el grupo 2' hidroxilo del anillo de ribosa unido a la adenina (3,24).

En los organismos estudiados hasta ahora han sido reportados dos tipos de transhidrogenasas de piridin-nucleótidos :

I.- La transhidrogenasa dependiente de energía, una proteína integral de membrana carente de flavina. Esta enzima se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana citoplásmica de algunas

factor de elongación EF-G que hidroliza GTP a GDP y con ello el tRNA "descargado" pasa del sitio P al sitio E a donde es liberado y el recién formado peptidil-tRNA se transfiere del sitio A al sitio P (20,39). El enlace de los factores EF-Tu y EF-G al ribosoma es mutuamente excluyente, lo cual asegura que cada paso finalice antes de que inicie el siguiente (25). Este proceso se repite hasta encontrar un codón de término y varios ribosomas pueden estar traduciendo simultáneamente una molécula de mRNA formando un complejo llamado polisoma (39).

c) Términación.

En esta última fase, el ribosoma requiere factores de liberación (RF) para finalizar el proceso, ya que no existen moléculas de tRNA con anticodones que reconozcan a codones sin sentido. RF1 y RF2 si reconocen codones de término. RF1 reconoce UAA y UAG, y RF2 reconoce UAA y UGA. RF3 no reconoce codones sin sentido, pero favorece la terminación del proceso (20,39). Cuando el peptidil-tRNA se encuentra en el sitio P, los factores de liberación en respuesta a los codones de término enlazan al sitio A y la hidrólisis de GTP favorece la liberación del polipéptido del sitio P y la disociación de las subunidades ribosomales, finalizando el proceso (20).

IV. Transhidrogenasas.

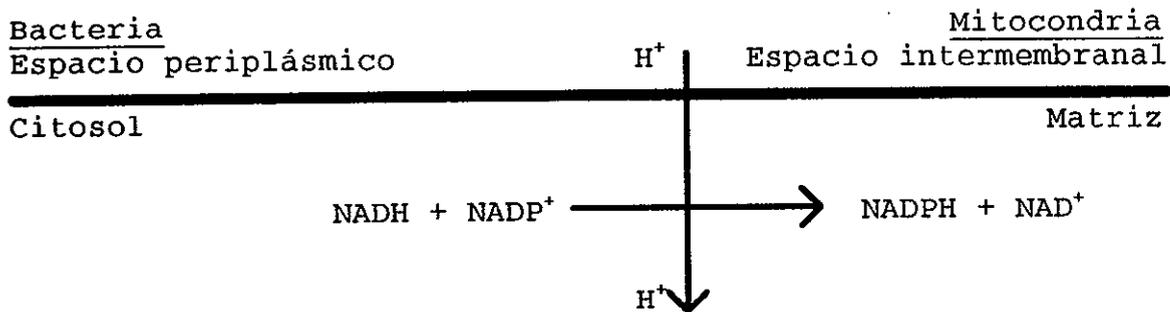
Las transhidrogenasas de piridín-nucleótidos catalizan la transferencia de equivalentes reductores entre los cofactores NAD y NADP, que en este caso funcionan como sustratos (10,14,16,19,21,45,46). Por equivalente reductor se entiende cualquier electrón o equivalente-electrón en la forma de un átomo de hidrógeno o ión hidruro que sea transferido en una reacción de óxido-reducción (24). Los dinucleótidos de nicotinamida NAD y NADP son acarreadores auxiliares solubles de electrones, omnipresentes en los sistemas vivientes y funcionan como cofactores de las oxidorreductasas, comunmente llamadas deshidrogenasas, con las que se asocian reversiblemente (3,5,24,26). En las reacciones de óxido-reducción en las que participan, dichos cofactores experimentan la transferencia reversible de iones hidruro de la posición C-4 del anillo de la nicotinamida (3). Cuando este ión hidruro es transferido al frente del anillo plano de la nicotinamida, se dice que la transferencia es de tipo A y cuando es transferido a la parte posterior del mismo, se dice que la transferencia es de tipo B (5,24).

En general, los procesos de degradación oxidativa se asocian a NAD, que transporta los electrones derivados de reacciones catabólicas al punto de entrada de la cadena respiratoria (3,24,45), mientras que la especificidad de enzimas por NADP, que provee los electrones para reacciones anabólicas, está restringida a reacciones biosintéticas reductivas, salvo unas pocas excepciones (3,24,45). El NADP difiere del NAD solo en la esterificación de un fosfato adicional en el grupo 2' hidroxilo del anillo de ribosa unido a la adenina (3,24).

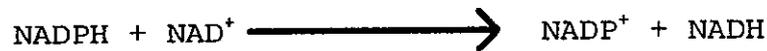
En los organismos estudiados hasta ahora han sido reportados dos tipos de transhidrogenasas de piridín-nucleótidos :

I.- La transhidrogenasa dependiente de energía, una proteína integral de membrana carente de flavina. Esta enzima se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias y en la membrana citoplásmica de algunas

bacterias heterótrofas como *E. coli* y fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum* (45). La enzima se considera dependiente de energía ya que responde a la fuerza electromotriz de protones a través de la membrana en la que se localiza. Cataliza la siguiente reacción :



II.- La transhidrogenasa no dependiente de energía, una flavoproteína soluble que se encuentra en el citoplasma de ciertas bacterias heterótrofas como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* y *Azotobacter vinelandii* (45). Cataliza la siguiente reacción :



Se ha encontrado que el grado de reducción de NADP en compartimentos cerrados de membrana siempre es mas alto que el de NAD ($r' NADP(H) > r' NAD(H)$), independientemente del tipo de transhidrogenasa que ahí se encuentre. En *E. coli* este valor es $r' NADP(H)=0.45$ y $r' NAD(H)=0.05$, es decir, existe nueve veces mas NADPH que NADH, independientemente de las condiciones de crecimiento. De esta manera es posible explicar el requerimiento de energía para la transhidrogenasa componente de membrana (45).

Se cree que el papel fisiológico de la transhidrogenasa soluble no dependiente de energía mas recientemente descrita, STH de *Pseudomonas fluorescens*, es la conversión de NADPH generado por rutas catabólicas periféricas a NADH, el cual puede ser oxidado para generación de energía (16). Enzimas similares han sido previamente reportadas en *Pseudomonas aeruginosa* (16,21,45) y *Azotobacter vinelandii* (16,44,45). En esta última, se ha propuesto que el papel fisiológico de la transhidrogenasa es la regulación del estado de reducción de NADP y de la ferredoxina. La ferredoxina ya reducida podría ser empleada para fijación de nitrógeno y otras reacciones biosintéticas (21).

Las transhidrogenasas solubles como STH son muy similares en su composición a las flavoproteínas de la familia disulfuro-oxidoreductasas, especialmente a dihidrolipoamida deshidrogenasas, reductasas mercuricas, glutatión-reductasas y tripanotión-reductasas. Dichas enzimas presentan dos residuos de cisteína altamente conservados en la región amino-terminal que forman un enlace disulfuro activo-reductor (16). En general, las deshidrogenasas están compuestas por tres unidades estructurales independientes o dominios : Un dominio que enlaza a flavina en la región amino-terminal, un dominio central que enlaza a dinucleótidos y un dominio de dimerización en la región carboxilo-terminal (16).

Las proteínas que se asocian y enlazan a dinucleótidos juegan un papel esencial en la producción, intercambio y consumo de energía. Estas proteínas, al igual que las transhidrogenasas solubles antes mencionadas; presentan dos sitios de unión a nucleótidos, uno en la región amino-terminal y otro en la parte central, cada uno compuesto por una estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta$ (Fig. 3a y 3b). Se ha propuesto que el primero actúa como un sitio catalítico y el segundo como un sitio regulador (16,21). Ambos sitios se asocian para formar al dominio central de unión a dinucleótidos conocido como el pliegue Rossmann que enlaza al cofactor (5,14,26,38,43,47,48).

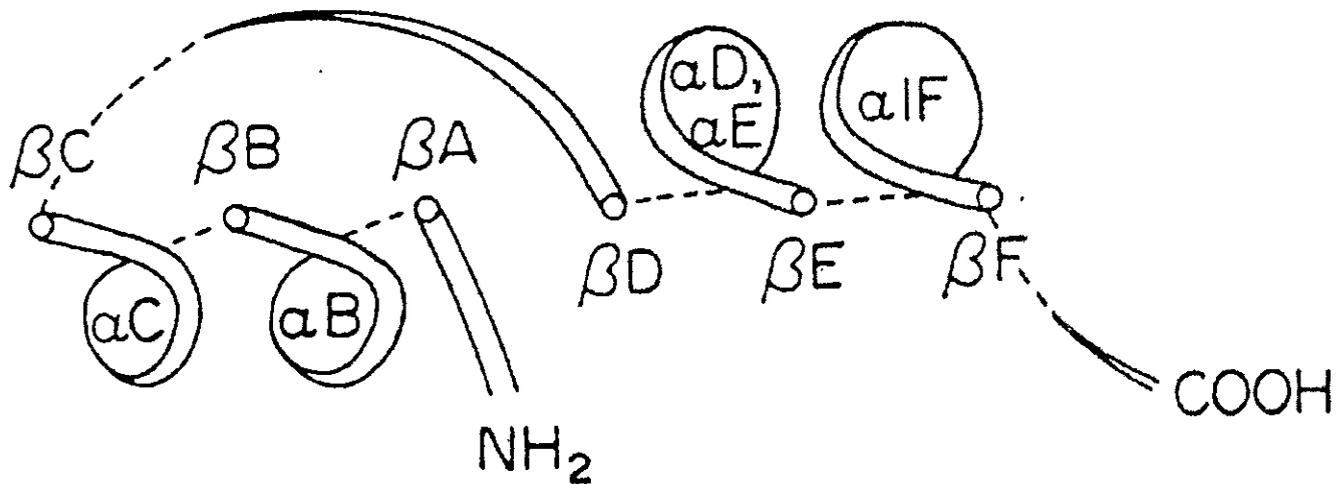


Figura 3a. Representación gráfica de una proteína que se une a dinucleótidos con sus dos estructuras supersecundarias $\beta\alpha\beta$, una en la región amino-terminal ($\beta A, \alpha B, \beta B, \alpha C, \beta C$) y otra en la región carboxilo-terminal ($\beta D, \alpha D, \alpha E, \beta E, \alpha F, \beta F$). Esta estructura se dedujo a partir de una lactato deshidrogenasa (LDH). Debido a que existe mayor conservación en las conformaciones β que en las hélices, αD se pierde en alcohol-deshidrogenasa (LADH) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), pero en LDH y malato-deshidrogenasa (s-MDH) forma parte de una vuelta flexible que hace que la enzima experimente un importante cambio conformacional durante su actividad (38,43).

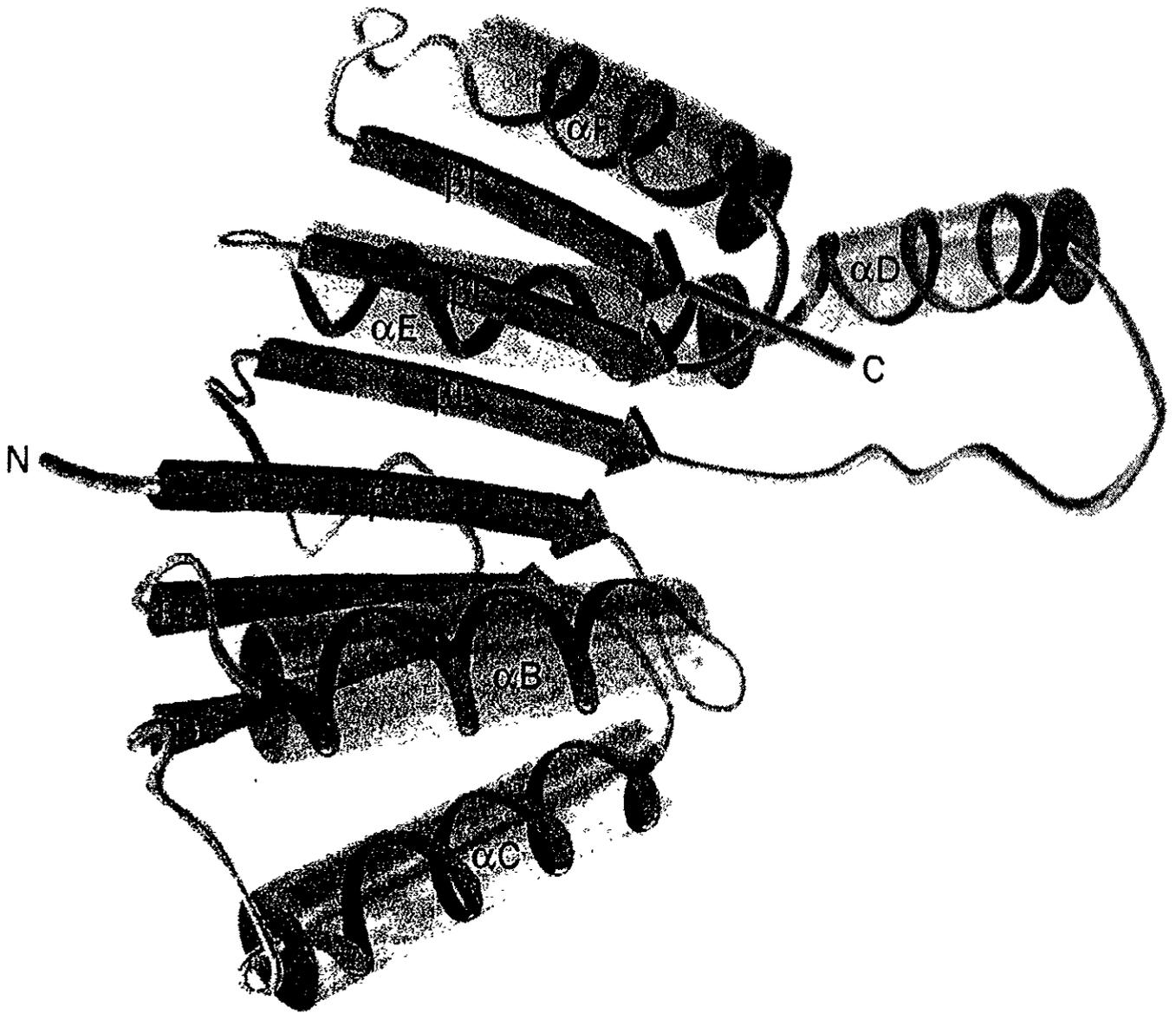


Figura 3b. Representación tridimensional del pliegue Rossmann en 3a. Cada estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ enlaza un nucleótido de NAD^+ , formando en conjunto este dominio de unión a dinucleótidos en las deshidrogenasas (43).

A pesar de que la composición de aminoácidos que forman los sitios de unión a nucleótidos varía, estos conservan su estructura gracias a que sus residuos comparten las mismas propiedades. Los primeros 29-35 aminoácidos de una estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta$ se conocen como la región núcleo (Fig. 4) y reflejan la presencia de la primeras dos conformaciones β y hélice α del sitio de unión a nucleótidos en la proteína (5,14,47,48).

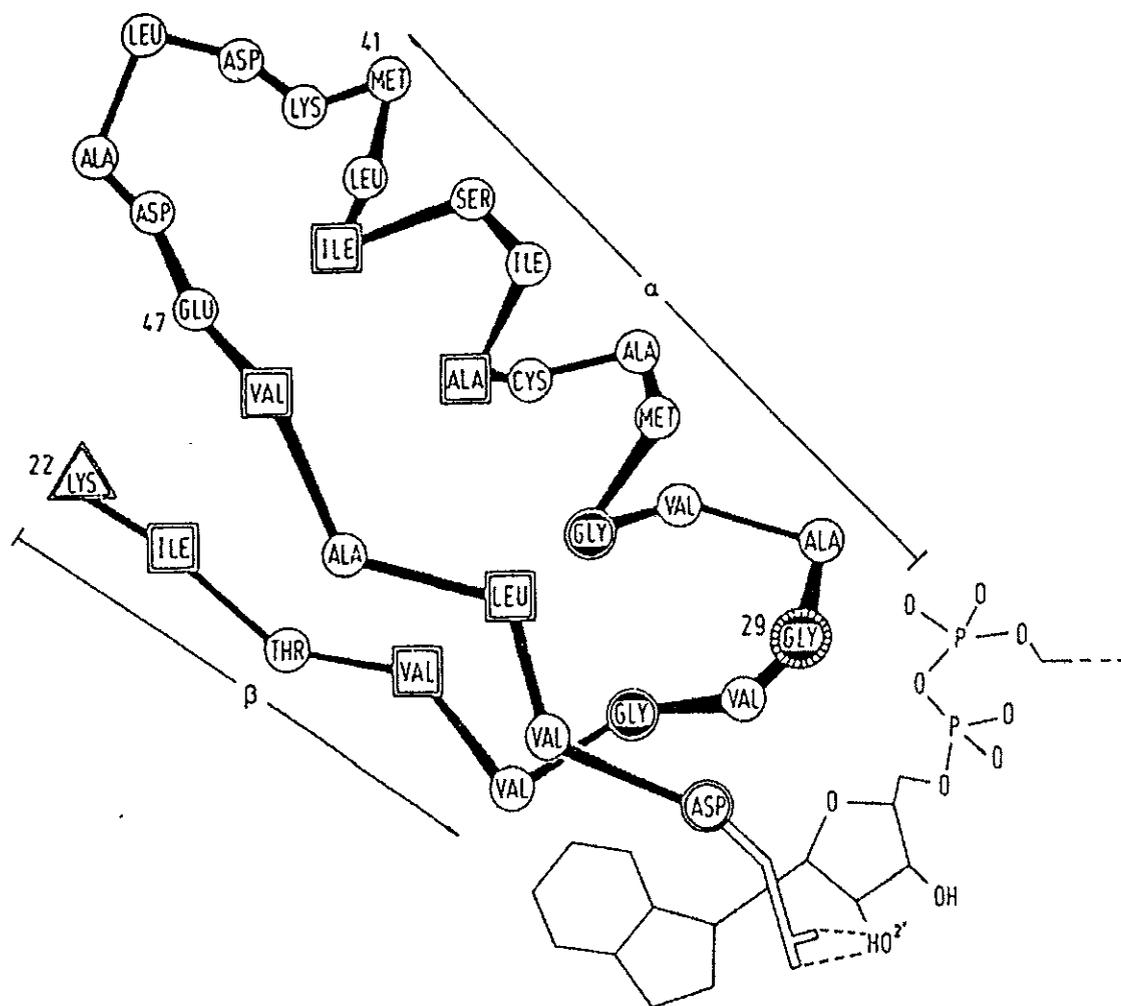


Figura 4. Representación gráfica de la región núcleo $\beta\alpha\beta$ de un sitio de unión a nucleótidos en una M-lactato-deshidrogenasa. Esta región núcleo está formada por 31 residuos y los símbolos indican el tipo y posición de los mismos. Δ =Básico o hidrofílico, \square =Pequeño e hidrofóbico. Las once posiciones esenciales que determinan la formación de esta estructura se encuentran incluidas en una figura de doble línea. Gly29 permite una interacción mas próxima entre el pirofosfato del cofactor y la región amino-terminal de la hélice α . Los residuos 43, 44, 45 y 46 permiten la vuelta entre la hélice α y la segunda conformación β (48).

Existen cuatro aspectos que caracterizan a la región núcleo (Fig. 4):

I. Una secuencia consenso (GXGXXG) de unión a fosfato compuesta por tres residuos de glicina altamente conservados conectando a la primera conformación β con la primera hélice α . La primera de estas glicinas está completamente conservada en todas las estructuras conocidas y permite una vuelta muy justa de la cadena principal, a su vez muy importante para posicionar a la segunda glicina. Esta última, debido a que carece de una cadena lateral, permite un contacto más cercano entre la cadena principal y el difosfato de NAD(P). La tercer glicina provee el espacio para una interacción más cercana entre las conformaciones β y hélices α . Esta glicina es la menos conservada, ya que en algunos casos muy particulares de enzimas que solo emplean NADP como cofactor en lugar de NAD, puede ser substituida por alanina, serina o prolina (3,5,14,47,48).

II. El núcleo hidrofóbico de la primera región $\beta\alpha\beta$ está compuesto por seis aminoácidos hidrofóbicos pequeños. Estos residuos se requieren para las interacciones estéricas en los elementos de la estructura secundaria, específicamente el posicionamiento de las conformaciones β y hélices α (5,14,47,48).

III. Un residuo conservado, cargado negativamente en el extremo carboxilo terminal de la segunda conformación β . Este residuo de ácido aspártico o ácido glutámico forma puentes de hidrógeno con el grupo 2'-hidroxil de la adenina (5,14,47,48).

IV. Un residuo conservado, cargado positivamente e hidrofílico en el extremo de la región amino-terminal de la primera conformación β , principalmente lisina o arginina, cuyo papel no se entiende completamente (5,14,47,48).

La determinación para el resto de la estructura $\beta\alpha\beta$ posterior a la región núcleo, la segunda hélice α y tercera conformación β ; se basa principalmente en comparaciones con otras deshidrogenasas respecto a ciertos residuos conservados y predicciones de sus estructuras secundarias (14).

Se ha encontrado que la segunda hélice α siempre se encuentra anterior a un residuo de glicina altamente conservado, al igual que en la primera hélice α . Entre esta glicina y el residuo de ácido aspártico o glutámico, al final de la región núcleo, existe una separación de doce aminoácidos. Estas glicinas se consideran muy importantes al permitir las vueltas que favorecen un plegamiento correcto de la proteína (14).

La determinación de una tercera conformación β en sitios de unión a nucleótidos de distintas deshidrogenasas solo se basa en la posición y comparación entre residuos, así como la identidad que guarden entre sí (14).

Cabe mencionar que entre las descripciones de Fjellstrom, et. al. (14) y Wierenga, et. al. (48) existe una diferencia con respecto al número de residuos que separan a la primera hélice α con la segunda conformación β de la región núcleo. Mientras que el primero propone al residuo ácido en la posición 29, el segundo lo hace para la posición 32. De cualquier forma, el final de la segunda conformación β estará indicado por la presencia de un residuo ácido (14,48).

Para las flavoproteínas dependientes de NAD(P), provenientes de un amplio rango de clases funcionales, existe un muy alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos del dominio que enlaza al cofactor. La identidad total entre secuencias asociadas a éste varía entre 12-36% y es aún mas alta si los aminoácidos se aparean considerando su tamaño, carga, hidrofobicidad, etc, llegando hasta 30-52% de similitud entre la secuencia de disulfuro-oxidoreductasas (glutación-reductasas, tripanotión-reductasas, tiorredoxin-reductasas, dihidrolipoamida deshidrogenasas, reductasas mercúricas, nitrito-reductasas, alquilo-hidroperoxidadas, monooxigenasas y dioxigenasas). Se ha propuesto a una duplicación de genes como el origen común de al menos parte del dominio que enlaza al cofactor en dichas enzimas (28). Es decir, que éste sea producto de genes parálogos (22). También, existe la posibilidad de que provenga de genes ortólogos al haber evolucionado a partir de un ancestro común (22,37,38), así como también el proceso biológico del transporte de electrones (38), o que sea producto de una fusión génica (22). Además, existe mayor conservación en las regiones β que en las hélices α (38,43).

Se ha encontrado que la transhidrogenasa soluble de *Pseudomonas aeruginosa* solo presenta actividad *in vitro* cuando después de purificarse y disgregarse en una población homogénea de 34S, forma una estructura polimérica de 1.6MDa. Dicho polímero está compuesto por treinta protómeros idénticos de 54kDa cada uno y se agrega para formar filamentos que exceden 500nm de longitud (16,46). Al purificarse STH, también se encontró que protómeros de 54kDa forman grandes polímeros de 10nm de diámetro y mas de 500nm de longitud (16). Se cuenta con evidencia que propone que en la transhidrogenasa de *P. aeruginosa* existe un solo sitio catalítico por protómero sucesivamente ocupado por las formas oxidada y reducida del cofactor, lo cual concuerda con el mecanismo de ping-pong o doble desplazamiento en enzimas con sitios birreactantes únicos, dichas enzimas se caracterizan por la liberación de al menos un producto antes de haber enlazado a todos los substratos (16,21,46). Al parecer, también existe un solo sitio regulador por protómero, ya sea para activación o inhibición y es muy posible que NADPH se una a ambos sitios (catalítico y regulador), debido a que existen estudios que han demostrado que NADPH muestra afinidad significativa por éste último (46). Por otra parte, la enzima pierde actividad cuando se encuentra altamente diluida en ausencia de agentes estabilizadores y se ha observado que FAD^+ y mercaptoetanol proveen una eficiente protección contra este proceso de inactivación (46).

Las transhidrogenasas solubles de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se encuentran bajo regulación alostérica directa del producto NADP⁺, el cual inhibe su actividad (16,46). Ello asegura uniformidad con el requerimiento fisiológico de catálisis unidireccional y por lo tanto, podría existir alguna similitud entre los sitios catalítico y regulador (46). En enzimas con mecanismo de ping-pong, la inhibición por substrato causada por altos niveles del segundo substrato, puede explicarse por la competencia entre ambos por el sitio catalítico en su estado primario (46). La cinética de reacción para la transhidrogenasa de *P. aeruginosa* se considera histerética, es decir, se comporta igual a las enzimas que responden lentamente a cambios rápidos en la concentración de ligando, ya sea por isomerización o por desplazamiento del ligando fuertemente enlazado (17,46). Estas enzimas, al encontrarse en puntos críticos de rutas metabólicas, juegan un papel regulador muy importante (46).

En *E. coli* ya fueron secuenciados y clonados los genes que componen al operón *pntAB* y que codifican para la transhidrogenasa dependiente de energía, cuya estructura tridimensional para el pliegue Rossmann ya ha

sido propuesta (Fig. 5). Los genes *pntA*(1,506bp) y *pntB*(1,386bp) codifican para las subunidades α (50kDa) y β (47kDa) respectivamente. Ambas secuencias codificantes son co-transcritas al encontrarse bajo control de un solo promotor y son traducidas independientemente, ya que cada una cuenta con su propio sitio de unión al ribosoma. Ninguna de las dos subunidades muestra por separado actividad de transhidrogenasa (10,31).



Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional para el dominio del pliegue Rossmann que enlaza al NAD^+ en la transhidrogenasa dependiente de energía de *E. coli*. El cofactor se encuentra representado como un modelo "ball-stick" (14).

Esta transhidrogenasa dependiente de energía cataliza la transferencia de un ion hidruro entre NADH y NADP' mediante la translocación de protones, permitiendo que la bacteria reponga el suministro de NADPH independientemente de la vía de las pentosas (1,31). Además, cumple la función de generar un gradiente de protones en ausencia de otros componentes en sistemas para transferencia de electrones y conservación de energía, como en el caso de citocromos y ATPasa. Se cree que ambas funciones están relacionadas, ya que con la adición de N,N'-diciticlocarbodimida se demuestra la inhibición de su actividad catalítica y translocación de protones (10).

Ambos genes *pnt* contienen al codón de inicio ATG. El gene *pntA* presenta TGA y *pntB* a TAA como codones de término. Ambos contienen en la región líder el sitio de unión al ribosoma a 7bp anteriores del codón de inicio. El promotor contiene su región -10 o caja Pribnow separada de la región -35 por 19bp. Entre el codón de término de *pntA* y el codón de inicio de *pntB* existe una separación de 30bp en las que no se detectó algún posible promotor, por lo que es posible pensar que ambos son co-transcritos. Estos genes no indican la presencia de un posible terminador evidente en la región 3' clonada (10).

La transhidrogenasa dependiente de energía contiene dos sitios de unión a nucleótidos en ambas subunidades que cumplen con los criterios propuestos por Fjellstrom, et. al.(14) y Wierenga, et. al.(48). En el caso de la subunidad α , este sitio se encuentra mas próximo al extremo de la región amino-terminal que en la subunidad β .

El operón *pntAB* forma parte del regulón Leucina/Lrp de *E. coli* (31). En éste, el regulador trascricional Lrp (proteína reguladora de respuesta a leucina) controla la expresión de aproximadamente treinta y cinco operones, activando y reprimiendo una serie de funciones metabólicas cuya actividad se ve afectada en presencia de L-leucina exógena, que al unirse a Lrp debilita su función como activador o represor (11,31). La transcripción del operón *pntAB* que codifica para esta transhidrogenasa muestra una represión cinco veces mayor por leucina en el medio y se encuentra regulada en conjunto con sistemas para transporte de leucina, lo cual sugiere que podría funcionar también en la internalización del aminoácido. En conclusión, en este regulón el operón *pntAB* se induce por Lrp y se reprime por altas concentraciones de leucina en el medio (1,19,31,32).

Se ha sugerido que la función del regulón Leucina/Lrp es la distinción entre los hábitats intestinal y externo de *E. coli*, favoreciendo actividad catabólica en un medio rico del tracto digestivo y actividad anabólica en un medio externo deficiente en nutrientes (11).

Mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética ya ha sido clonado y expresado en *E. coli* el gene *sth* de *P. fluorescens* que codifica para la transhidrogenasa soluble en este organismo (16). Además, existen estudios previos de transhidrogenasas solubles provenientes de *P. aeruginosa* (21) y *A. vinelandii* (44) que describen algunas características y propiedades comunes a dichas enzimas. Estas transhidrogenasas podrían ser empleadas en procesos de biotransformación en los que participen otras enzimas que igualmente utilicen cofactores de nicotinamida y cuya limitante esté dada por la disponibilidad de estos cofactores en etapas avanzadas (15).

Se ha encontrado que los microorganismos estudiados hasta ahora presentan un solo tipo de transhidrogenasa, ya sea soluble o dependiente de energía. También, se ha encontrado que el tipo de enzima presente está determinado por las características del metabolismo y a la fecha no se ha reportado alguno que presente ambos tipos de transhidrogenasa codificadas en su genoma. En el caso de *E. coli*, solo se ha detectado la actividad de transhidrogenasa dependiente de energía, la cual es codificada por los genes *pntAB*.

Mediante un análisis computacional se detectó en *E. coli* la presencia de un gene (*udhA*), el cual presenta similitud hacia el gene *sth* que codifica para una transhidrogenasa soluble en *Pseudomonas fluorescens*.

El objetivo de este trabajo consiste en determinar si el gene *udhA* codifica para una proteína con actividad de transhidrogenasa soluble en *E. coli*.

Se clonará y expresará el gene *udhA* a partir de un promotor fuerte. Se intentará determinar la presencia de actividad de transhidrogenasa soluble en extractos celulares de una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido portador de *udhA*. También se realizará un análisis computacional de las secuencias de DNA y de la proteína codificada por *udhA*.

Materiales

I. Reactivos.

A continuación se indican los reactivos y kits empleados en este trabajo :

- Agar, Caldo Nutritivo, Extracto de Levadura, Triptona (Difco, USA)
- Agarosa (Research Organics Inc., USA)
- Azul de Coomassie R-250 (Hoefer, USA)
- Sodio Duodecil Sulfato (BioRad, USA)
- Kit ELONGASE para amplificación de DNA por PCR (GIBCO BRL, USA)
- Kit QIAquick para extracción de DNA de geles de agarosa (QIAGEN, AI)
- Kit Zero Blunt para clonación de productos de PCR (Invitrogen, USA)
- Kit THERMOsequenase para secuencia de DNA (Amersham Life Science, USA)
- Kit Protein Assay para determinar concentración de proteína soluble (BioRad, USA)
- Los demás reactivos se obtuvieron de J.T.Baker, Merk y Sigma.

II. Amortiguadores y soluciones.

Amortiguador TE

Se emplea para resuspender DNA, está compuesto por hidroximetilaminometano (trizma base) 10mM pH 7.6 y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM pH 8.0.

Amortiguador TBE

Se emplea en corrida de geles de agarosa y acrilamida. Para obtener una solución 10x se disuelve en 1l de agua bidestilada 108g de trizma base, 55g de ácido bórico y 40ml de EDTA 0.5M pH 8.0.

Amortiguador de lisis 2x

Diluir en agua destilada 10% Tris-HCl 0.25M pH 6.8, 4.6% SDS, 20% glicerol y 10% β -mercaptoetanol.

Amortiguador Tris-glicina

Se emplea en corrida de geles para proteínas. La solución stock 5x se prepara con Tris 12% y glicina 57.6% en agua desionizada. Al diluirlo 1x, se agrega 0.8% de SDS 10%.

Solución I (Amortiguador SET)

Sacarosa 20%, EDTA 50mM, Tris-HCl 50mM pH 7.6.

Solución II (Solución lítica)

SDS 2%, NaOH 0.4N (1:1)

Materiales

I. Reactivos.

A continuación se indican los reactivos y kits empleados en este trabajo :

- Agar, Caldo Nutritivo, Extracto de Levadura, Triptona (Difco, USA)
- Agarosa (Research Organics Inc., USA)
- Azul de Coomassie R-250 (Hofer, USA)
- Sodio Duodecil Sulfato (BioRad, USA)
- Kit ELONGASE para amplificación de DNA por PCR (GIBCO BRL, USA)
- Kit QIAquick para extracción de DNA de geles de agarosa (QIAGEN, Al)
- Kit Zero Blunt para clonación de productos de PCR (Invitrogen, USA)
- Kit THERMOsequenase para secuencia de DNA (Amersham Life Science, USA)
- Kit Protein Assay para determinar concentración de proteína soluble (BioRad, USA)
- Los demás reactivos se obtuvieron de J.T.Baker, Merk y Sigma.

II. Amortiguadores y soluciones.

Amortiguador TE

Se emplea para resuspender DNA, está compuesto por hidroximetilaminometano (trizma base) 10mM pH 7.6 y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM pH 8.0.

Amortiguador TBE

Se emplea en corrida de geles de agarosa y acrilamida. Para obtener una solución 10x se disuelve en 1l de agua bidestilada 108g de trizma base, 55g de ácido bórico y 40ml de EDTA 0.5M pH 8.0.

Amortiguador de lisis 2x

Diluir en agua destilada 10% Tris-HCl 0.25M pH 6.8, 4.6% SDS, 20% glicerol y 10% β -mercaptoetanol.

Amortiguador Tris-glicina

Se emplea en corrida de geles para proteínas. La solución stock 5x se prepara con Tris 12% y glicina 57.6% en agua desionizada. Al diluirlo 1x, se agrega 0.8% de SDS 10%.

Solución I (Amortiguador SET)

Sacarosa 20%, EDTA 50mM, Tris-HCl 50mM pH 7.6.

Solución II (Solución lítica)

SDS 2%, NaOH 0.4N (1:1)

Solución III (Acetato de sodio)

Disolver en 100ml de agua 40.83g de acetato de sodio y 30ml de ácido acético pH 4.8.

Solución de azul de bromofenol 1%

Disolver en 100ml de agua 1g de azul de bromofenol.

Solución stop

Disolver en agua 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol y 30% glicerol.

Solución de bromuro de etidio 10mg/ml

Disolver en 100ml de agua 1g de bromuro de etidio. Almacenar envuelto a 4°C.

Solución de azul de Coomassie R-250

Diluir en agua 12.5% azul de Coomassie R-250 1%, 50% metanol y 10% ácido acético.

Solución de IPTG 100mM

Disolver en 10ml de agua desionizada 0.238g de IPTG. Preparar alícuotas y almacenar a -20°C.

Solución de tNAD' 10mM

Disolver 0.00679g de tNAD' en 1ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0

Solución de β -NADPH 10mM

Disolver 0.00833g de β -NADPH en 1ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0.

III. Enzimas y proteínas.

Las enzimas y amortiguadores empleados en este trabajo se adquirieron de New England Biolabs, USA.

a) Endonucleasas de restricción.

A continuación se indican las enzimas y amortiguadores 10x utilizados, así como la composición de estos :

Solución III (Acetato de sodio)

Disolver en 100ml de agua 40.83g de acetato de sodio y 30ml de ácido acético pH 4.8.

Solución de azul de bromofenol 1%

Disolver en 100ml de agua 1g de azul de bromofenol.

Solución stop

Disolver en agua 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol y 30% glicerol.

Solución de bromuro de etidio 10mg/ml

Disolver en 100ml de agua 1g de bromuro de etidio. Almacenar envuelto a 4°C.

Solución de azul de Coomassie R-250

Diluir en agua 12.5% azul de Coomassie R-250 1%, 50% metanol y 10% ácido acético.

Solución de IPTG 100mM

Disolver en 10ml de agua desionizada 0.238g de IPTG. Preparar alicuotas y almacenar a -20°C.

Solución de tNAD⁺ 10mM

Disolver 0.00679g de tNAD⁺ en 1ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0

Solución de β -NADPH 10mM

Disolver 0.00833g de β -NADPH en 1ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0.

III. Enzimas y proteínas.

Las enzimas y amortiguadores empleados en este trabajo se adquirieron de New England BioLabs, USA.

a) Endonucleasas de restricción.

A continuación se indican las enzimas y amortiguadores 10x utilizados, así como la composición de estos :

| | |
|-----------------|---|
| <i>BamH</i> I | (NEBuffer <i>BamH</i> I : NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM, MgCl ₂ 10mM, ditiotreititol (DTT) 1mM, a pH 7.0). |
| <i>EcoR</i> I | (NEBuffer <i>EcoR</i> I : NaCl 50mM, Tris-HCl 100mM, MgCl ₂ 10mM, Tritón X-100 0.025%, a pH 7.0) |
| <i>EcoR</i> V | (NEBuffer 2 : NaCl 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 1mM, a pH 7.9) |
| <i>Hind</i> III | (NEBuffer 2) |
| <i>Nco</i> I | (NEBuffer 4 : Acetato de potasio 50mM, Tris-acetato 20mM, acetato de magnesio 10mM, DTT 1mM, a pH 7.9) |
| <i>Nde</i> I | (NEBuffer 4) |
| <i>Nsi</i> I | (NEBuffer <i>Nsi</i> I : NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 1mM, a pH 8.4) |
| <i>Sca</i> I | (NEBuffer <i>Sca</i> I : NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 1mM, a pH 7.4) |
| <i>Ssp</i> I | (NEBuffer <i>Ssp</i> I : NaCl 50mM, Tris-HCl 100mM, MgCl ₂ 10mM, Tritón X-100 0.025%, a pH 7.5) |
| <i>Xba</i> I | (NEBuffer 2) |
| <i>Xmn</i> I | (NEBuffer 2) |

b) Ligasa.

Se emplea para unir fragmentos de DNA con extremos complementarios o rasurados previamente digeridos con endonucleasas de restricción.

T4 DNA Ligasa (Amortiguador de ligasa T4 : Tris-HCl 50mM pH 7.5, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 1mM, 25µg/ml de BSA).

c) RNAsa.

Se emplea para eliminar RNA en extracciones de DNA y se prepara en la siguiente mezcla : Ribonucleasa pancreática A 10mg/ml, acetato de sodio 100mM y EDTA 0.3mM. Se lleva a pH 4.8 y activa calentando a 80°C por 10min.

d) Proteinas.

Albúmina de Suero Bovino (BSA). (New England BioLabs, USA)

Se emplea para estabilizar endonucleasas de restricción que así lo requieran. La reacción de digestión se prepara a una concentración final de BSA 100µg/ml.

Albúmina bovina (Sigma)

Se utilizó como marcador de peso de 66kDa.

Se utilizó como marcador de peso de 45kDa.

IV. Medios de Cultivo.

El medio de cultivo empleado para inóculos y crecimiento celular es Medio Luria-Bertani (LB) :

Bacto-Triptona (Difco) 1.0%, Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 0.5%, NaCl 1.0% y con NaOH 2.5N ajustar a pH 7.5. Esterilizar en autoclave 20min a 15lbs/inch. Para amplificar vectores, plásmidos ó aislar colonias se agrega antibiótico : Ampicilina 200µg/ml ó kanamicina 30µg/ml.

El medio para preparar células electrocompetentes es Medio libre de sales YENB :

Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 0.75% y Bacto-Caldo Nutritivo (Difco) 0.8%. Esterilizar en autoclave.

El medio para recuperar células electrotransformadas es Medio YT 2x :

Bacto-Triptona (Difco) 1.6%, Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 1.0%, NaCl 0.5% y con NaOH 1N ajustar a pH 7.0. Esterilizar en autoclave.

Para obtener medio sólido se agrega Bacto-Agar (Difco) 2.0%, se esteriliza en autoclave y deja enfriar hasta 50°C antes de agregar el antibiótico. Vertir 20ml a cada caja de Petri de 90mm y una vez solidificado, se guarda a 4°C. Antes de usar se secan en campana de flujo laminar 20min.

V. Antibióticos.

Ampicilina(Ap) : Disolver 500mg en 5ml de agua bidestilada (100mg/ml final), filtrar con Millipore de 0.45µm y almacenar a -20°C. Para selección de colonias preparar el medio a una concentración final de 200µg/ml.

Kanamicina(Km) : Disolver 150mg en 5ml de agua bidestilada (30mg/ml final), filtrar y almacenar en frío. Para selección, preparar el medio a 30µg/ml.

VI. Cepas Bacterianas.

Las células empleadas como vehiculos de clonación y expresión son tres cepas de *E. coli* K-12 :

| | |
|---------------|---|
| MM294 | <i>endA1, hsdR17, supE44, thi-1</i> |
| XL1-Blue MRF' | $\Delta(mcrA) 183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacI'ZAM15, Tn10, (Tet')]$ |
| W3110 | $\lambda-, IN(rrnD-rrnE) 1, rph-1$ |

Albúmina de huevo (Sigma)

Se utilizó como marcador de peso de 45kDa.

IV. Medios de Cultivo.

El medio de cultivo empleado para inóculos y crecimiento celular es Medio Luria-Bertani (LB) :

Bacto-Triptona (Difco) 1.0%, Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 0.5%, NaCl 1.0% y con NaOH 2.5N ajustar a pH 7.5. Esterilizar en autoclave 20min a 15lbs/inch. Para amplificar vectores, plásmidos ó aislar colonias se agrega antibiótico : Ampicilina 200µg/ml ó kanamicina 30µg/ml.

El medio para preparar células electrocompetentes es Medio libre de sales YENB :

Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 0.75% y Bacto-Caldo Nutritivo (Difco) 0.8%. Esterilizar en autoclave.

El medio para recuperar células electrotransformadas es Medio YT 2x :

Bacto-Triptona (Difco) 1.6%, Bacto-Extracto de Levadura (Difco) 1.0%, NaCl 0.5% y con NaOH 1N ajustar a pH 7.0. Esterilizar en autoclave.

Para obtener medio sólido se agrega Bacto-Agar (Difco) 2.0%, se esteriliza en autoclave y deja enfriar hasta 50°C antes de agregar el antibiótico. Vertir 20ml a cada caja de Petri de 90mm y una vez solidificado, se guarda a 4°C. Antes de usar se secan en campana de flujo laminar 20min.

V. Antibióticos.

Ampicilina(Ap) : Disolver 500mg en 5ml de agua bidestilada (100mg/ml final), filtrar con Millipore de 0.45µm y almacenar a -20°C. Para selección de colonias preparar el medio a una concentración final de 200µg/ml.

Kanamicina(Km) : Disolver 150mg en 5ml de agua bidestilada (30mg/ml final), filtrar y almacenar en frío. Para selección, preparar el medio a 30µg/ml.

VI. Cepas Bacterianas.

Las células empleadas como vehiculos de clonación y expresión son tres cepas de *E. coli* K-12 :

| | |
|---------------|---|
| MM294 | <i>endA1, hsdR17, supE44, thi-1</i> |
| XL1-Blue MRF' | $\Delta(mcrA) 183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacI'Z\Delta M15, Tn10, (Tet')]$ |
| W3110 | $\lambda-, IN(rrnD-rrnE) 1, rph-1$ |

MM294 y XL1-Blue MRF' se emplean para estrategias de clonación, ya que son cepas deficientes en sistemas de recombinación y permiten la transformación y permanencia de DNA modificado *in vitro*. W3110 se emplea para la expresión de proteínas recombinantes y como cepa de referencia al considerarse silvestre (31).

VII. Plásmidos y DNA.

Los vectores empleados para la clonación y expresión del gene *udhA* son :

| | | |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|
| pCR-Blunt | Km ^r , Zeo ^r | Invitrogen, USA |
| pTrc99A | Ap ^r | Pharmacia Biotech, Suecia |

pCR-Blunt (3.5kb) se emplea para clonar productos de PCR con extremos rasurados, elimina el fondo de vector sin inserto mediante selección positiva por disrupción del gene letal *ccdB* (control de muerte celular), sin inserto este gene se expresa matando la célula. pTrc99A (4.1kb) se emplea para la producción de proteínas recombinantes, presenta un promotor híbrido de triptofano y lactosa (*trc*) muy fuerte, el sitio de unión al ribosoma de *lacZ*, un terminador transcripcional fuerte (*rrnB*) y el gene *lacI'*, cuyo represor evita que el gene se exprese hasta la adición de IPTG aún en cepas carentes del mismo (2).

| | |
|----------------------|--|
| λ <i>BstE</i> II | (New England Bio Labs, USA) Marcador de DNA de catorce fragmentos, desde 117bp hasta 8,454bp. |
| Marcador X | (Boehringer-Mannheim, Al) Marcador de DNA de veintidos fragmentos, desde 134bp hasta 12,216bp. |
| Oligo <i>udhA5</i> | (IBt, UNAM) 5'-CAT-GCC-ATG-GCA-CAT-TCC-TAC-GAT-TAC-3' Se utilizó para amplificar por PCR a <i>udhA</i> del DNA cromosomal de <i>E. coli</i> e insertar un sitio <i>Nco</i> I con el codón de inicio ATG del mismo (Fig. 6). |
| Oligo <i>udhA3</i> | (IBt, UNAM) 5'-CGG-GAT-CCA-TTG-GCC-TGG-TTT-ATC-GTC-CT-3' Se utilizó para amplificar <i>udhA</i> e insertar un sitio <i>Bam</i> H I a 99bp posteriores al codón de término TAA del mismo (Fig. 6). |
| Oligo <i>ptrc152</i> | (IBt, UNAM) 5'-CGA-CAT-CAT-AAC-GGT-TCT-GGC-3' Se utilizó para amplificar por PCR el templado a secuenciar del plásmido pTrc99A+ <i>udhA</i> . Hibrida 20bp anteriores a la región -35 del promotor en el vector pTrc99A. |

I. Amplificación por PCR del Gene *udhA* del DNA Cromosomal de *E. coli* y del Templado para la Secuencia del Mismo.

Los oligos se resuspendieron en TE y diluyeron hasta alcanzar una concentración de 30pM/ μ l. Los dNTP's se prepararon a una concentración de 0.25mM con MgCl, 1.6mM.

Para amplificar *udhA* del DNA cromosomal se colocaron 50 μ l de reacción para PCR con los siguientes componentes :

31.5 μ l de agua bidestilada
4.0 μ l de amortiguador A
6.0 μ l de amortiguador B
1.0 μ l de DNA cromosomal de *E. coli* (0.5 μ g/ μ l)
1.0 μ l de oligo *udhA5*
1.0 μ l de oligo *udhA3*
5.0 μ l de dNTP's
0.5 μ l de Elongasa (DNA polimerasa)

Después de una temperatura inicial de 95°C/10min para desnaturalizar al DNA, se programaron treinta ciclos con las siguientes temperaturas cada uno : 95°C/1min (desnaturalización del DNA de doble hebra), 55°C/1min (hibridación de los oligos con el DNA templado) y 68°C/2.5min (polimerización). Como resultado se obtuvo un producto de 1,505bp (*udhA*) que posteriormente aisló y purificó en gel de agarosa al 1%.

Para amplificar el templado de secuencia aislado del plásmido pTrc99A+*udhA*, se colocaron 50 μ l de reacción para PCR con los siguientes componentes :

27.5 μ l de agua bidestilada
4.0 μ l de amortiguador A
6.0 μ l de amortiguador B
1.0 μ l de DNA del plásmido pTrc99A+*udhA* (0.3 μ g/ μ l)
1.0 μ l de oligo ptrc152
1.0 μ l de oligo *udhA3*
5.0 μ l de dNTP's
0.5 μ l de Elongasa (DNA polimerasa)

Las condiciones de reacción fueron similares a las descritas anteriormente. Esta amplificación se realizó con la finalidad de analizar detalladamente digiriendo por separado con : *Ssp* I, *Nsi* I, *Nde* I, *EcoR* V y *EcoR* I al templado *udhA*(ptrc152-*BamH* I) de 1.6kb, previo a la reacción de secuencia.

II. Estrategias de Clonación.

a) Clonación en el vector pCR-Blunt.

Se ligó *udhA* de PCR al vector pCR-Blunt. Esta ligación se electrotransformó a la cepa MM294 (Fig. 6) y una vez obtenida la construcción pCR-Blunt+*udhA* se digirió con *BamH* I para determinar su orientación. Posteriormente se digirió esta misma con *Hind* III y *Xba* I para extraer de gel de agarosa al 1% una banda de 1.6kb conteniendo a *udhA* flanqueado por 107bp del vector. Dicho fragmento se digirió con *BamH*

Métodos

I. Amplificación por PCR del Gene *udhA* del DNA Cromosomal de *E. coli* y del Templado para la Secuencia del Mismo.

Los oligos se resuspendieron en TE y diluyeron hasta alcanzar una concentración de 30pM/μl. Los dNTP's se prepararon a una concentración de 0.25mM con MgCl₂ 1.6mM.

Para amplificar *udhA* del DNA cromosomal se colocaron 50μl de reacción para PCR con los siguientes componentes :

- 31.5μl de agua bidestilada
- 4.0μl de amortiguador A
- 6.0μl de amortiguador B
- 1.0μl de DNA cromosomal de *E. coli* (0.5μg/μl)
- 1.0μl de oligo *udhA5*
- 1.0μl de oligo *udhA3*
- 5.0μl de dNTP's
- 0.5μl de Elongasa (DNA polimerasa)

Después de una temperatura inicial de 95°C/10min para desnaturalizar al DNA, se programaron treinta ciclos con las siguientes temperaturas cada uno : 95°C/1min (desnaturalización del DNA de doble hebra), 55°C/1min (hibridación de los oligos con el DNA templado) y 68°C/2.5min (polimerización). Como resultado se obtuvo un producto de 1,505bp (*udhA*) que posteriormente aisló y purificó en gel de agarosa al 1%.

Para amplificar el templado de secuencia aislado del plásmido pTrc99A+*udhA*, se colocaron 50μl de reacción para PCR con los siguientes componentes :

- 27.5μl de agua bidestilada
- 4.0μl de amortiguador A
- 6.0μl de amortiguador B
- 1.0μl de DNA del plásmido pTrc99A+*udhA* (0.3μg/μl)
- 1.0μl de oligo ptrc152
- 1.0μl de oligo *udhA3*
- 5.0μl de dNTP's
- 0.5μl de Elongasa (DNA polimerasa)

Las condiciones de reacción fueron similares a las descritas anteriormente. Esta amplificación se realizó con la finalidad de analizar detalladamente digiriendo por separado con : *Ssp* I, *Nsi* I, *Nde* I, *EcoR* V y *EcoR* I al templado *udhA*(ptrc152-*BamH* I) de 1.6kb, previo a la reacción de secuencia.

II. Estrategias de Clonación.

a) Clonación en el vector PCR-Blunt.

Se ligó *udhA* de PCR al vector PCR-Blunt. Esta ligación se electrotransformó a la cepa MM294 (Fig. 6) y una vez obtenida la construcción PCR-Blunt+*udhA* se digirió con *BamH* I para determinar su orientación. Posteriormente se digirió esta misma con *Hind* III y *Xba* I para extraer de gel de agarosa al 1% una banda de 1.6kb conteniendo a *udhA* flanqueado por 107bp del vector. Dicho fragmento se digirió con *BamH*

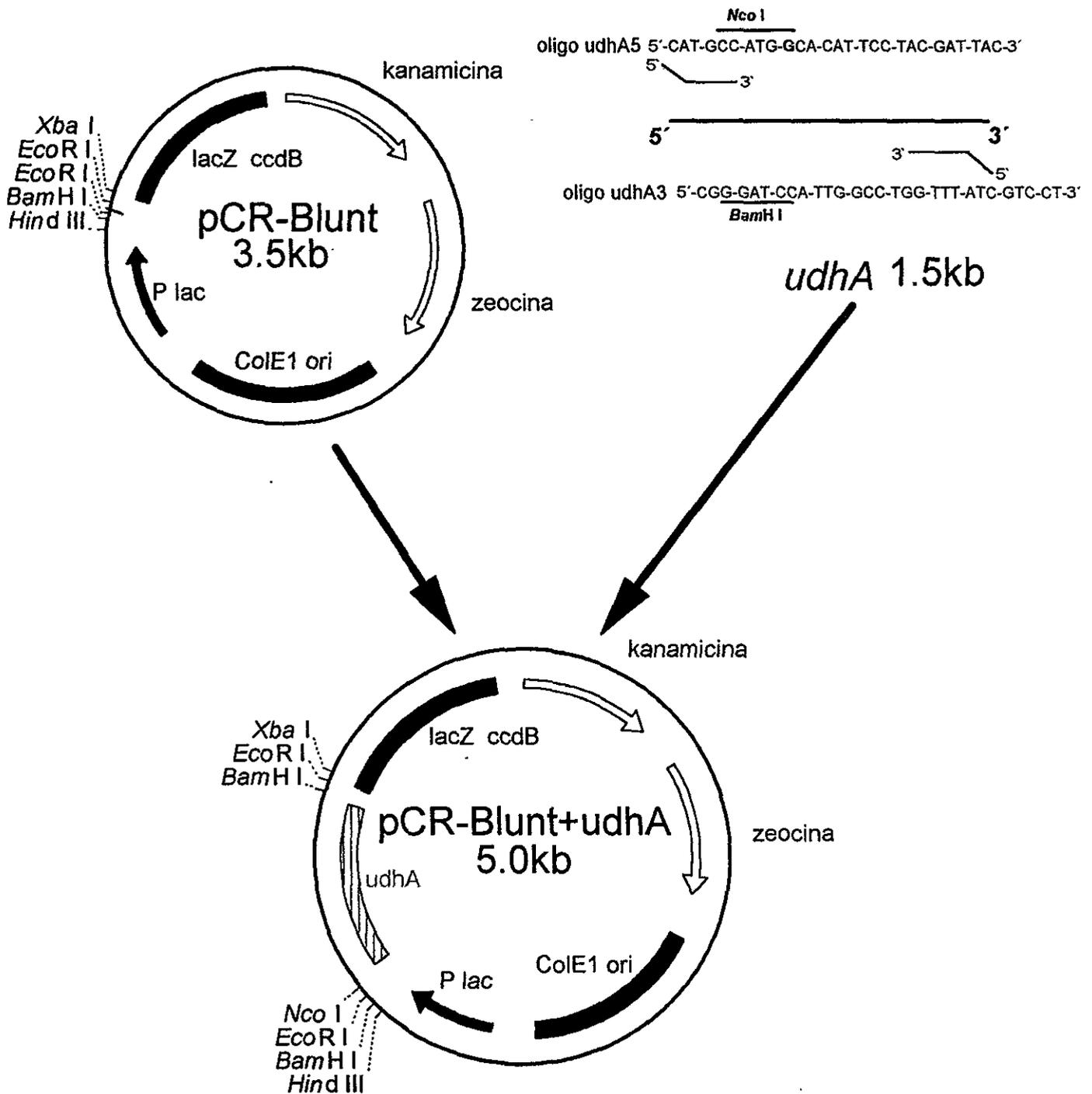


Figura 6. Ligación del producto de PCR *udhA* en pCR-Blunt. En **negrita** aparece una sustitución de G en lugar de C por mutagénesis dirigida con el oligo udhA5 para insertar el sitio *Nco* I. El codón CCA de prolina en la silvestre cambió por GCA de alanina.

I y Nco I para extraer solo la banda *udhA* de 1.5kb con extremos complementarios al vector pTrc99A ya digerido.

b) Clonación en el vector pTrc99A.

udhA digerido con BamH I y Nco I se ligó al vector pTrc99A igualmente digerido (Fig. 7) en la siguiente reacción de 20µl :

- 7.0µl de agua bidestilada
- 2.0µl de amortiguador para T4 DNA Ligasa
- 5.0µl de *udhA* (BamH I-Nco I)
- 5.0µl de vector pTrc99A (BamH I-Nco I)
- 1.0µl de T4 DNA Ligasa

Ambas ligaciones incubaron a 16°C durante la noche. Antes de transformar, se desnaturalizó la enzima a 65°C/10min y extrajo con fenol/cloroformo.

Esta ligación se electrotransformó a la cepa XL1-Blue MRF'. Una vez obtenida la construcción pTrc99A+*udhA*, se verificó su orientación digiriendo por separado con : EcoR I-Hind III, EcoR V, Nde I, Nsi I, Sca I, Ssp I y Xmn I. Se analizó en gel de agarosa al 1%.

El plásmido pTrc99A+*udhA* se transformó por método químico y clonó en la cepa W3110 para posteriormente inducir con IPTG y obtener la proteína UDHA. Como testigo se empleó la misma cepa transformada con el vector pTrc99A solo.

III. Extracción de Plásmidos de *E. coli* por Lisis Alcalina.

Se empleó la técnica descrita por Rodriguez y Tait (36).

1. Inocular 3ml de medio con una colonia bacteriana. Agregar el antibiótico adecuado e incubar durante la noche a 37°C con agitación vigorosa (300 rpm). El cultivo debe alcanzar fase estacionaria.
2. Centrifugar este cultivo en un tubo eppendorf de 1.5ml por 1min. Aspirar sobrenadante.
3. Lavar el botón resuspendiéndolo en 1ml de solución I fría con vórtex.
4. Centrifugar 2min. Aspirar sobrenadante.
5. Resuspender en 150µl de solución I con 5µl de RNasa y mezclar con vórtex
6. Agregar 350µl de solución II fresca a temperatura ambiente y mezclar por inversión vigorosa (no en vórtex) hasta volverlo viscoso.
7. Incubar 10min en hielo.
8. Agregar 250µl de solución III fría y mezclar por inversión vigorosa hasta que desaparezca la viscosidad.
9. Incubar 30min en hielo.
10. Centrifugar 15min.
11. Decantar sobrenadante a tubos eppendorf limpios.
12. Adicionar un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión vigorosa.
13. Centrifugar 15min, remover sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre papel absorbente para secarlo lo mejor posible.
14. Lavar dos veces en 1ml de etanol 70% a temperatura ambiente y vórtex breve.
15. Centrifugar 10min. Remover sobrenadante y secar el botón a temperatura ambiente o durante 10min al vacío.

I y Nco I para extraer solo la banda *udhA* de 1.5kb con extremos complementarios al vector pTrc99A ya digerido.

b) Clonación en el vector pTrc99A.

udhA digerido con BamH I y Nco I se ligó al vector pTrc99A igualmente digerido (Fig. 7) en la siguiente reacción de 20µl :

- 7.0µl de agua bidestilada
- 2.0µl de amortiguador para T4 DNA Ligasa
- 5.0µl de *udhA* (BamH I-Nco I)
- 5.0µl de vector pTrc99A (BamH I-Nco I)
- 1.0µl de T4 DNA Ligasa

Ambas ligaciones incubaron a 16°C durante la noche. Antes de transformar, se desnaturalizó la enzima a 65°C/10min y extrajo con fenol/cloroformo.

Esta ligación se electrotransformó a la cepa XL1-Blue MRF'. Una vez obtenida la construcción pTrc99A+*udhA*, se verificó su orientación digiriendo por separado con : EcoR I-Hind III, EcoR V, Nde I, Nsi I, Sca I, Ssp I y Xmn I. Se analizó en gel de agarosa al 1%.

El plásmido pTrc99A+*udhA* se transformó por método químico y clonó en la cepa W3110 para posteriormente inducir con IPTG y obtener la proteína UDHA. Como testigo se empleó la misma cepa transformada con el vector pTrc99A solo.

III. Extracción de Plásmidos de *E. coli* por Lisis Alcalina.

Se empleó la técnica descrita por Rodriguez y Tait (36).

1. Inocular 3ml de medio con una colonia bacteriana. Agregar el antibiótico adecuado e incubar durante la noche a 37°C con agitación vigorosa (300 rpm). El cultivo debe alcanzar fase estacionaria.
2. Centrifugar este cultivo en un tubo eppendorf de 1.5ml por 1min. Aspirar sobrenadante.
3. Lavar el botón resuspendiéndolo en 1ml de solución I fría con vórtex.
4. Centrifugar 2min. Aspirar sobrenadante.
5. Resuspender en 150µl de solución I con 5µl de RNasa y mezclar con vórtex
6. Agregar 350µl de solución II fresca a temperatura ambiente y mezclar por inversión vigorosa (no en vórtex) hasta volverlo viscoso.
7. Incubar 10min en hielo.
8. Agregar 250µl de solución III fría y mezclar por inversión vigorosa hasta que desaparezca la viscosidad.
9. Incubar 30min en hielo.
10. Centrifugar 15min.
11. Decantar sobrenadante a tubos eppendorf limpios.
12. Adicionar un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión vigorosa.
13. Centrifugar 15min, remover sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre papel absorbente para secarlo lo mejor posible.
14. Lavar dos veces en 1ml de etanol 70% a temperatura ambiente y vórtex breve.
15. Centrifugar 10min. Remover sobrenadante y secar el botón a temperatura ambiente o durante 10min al vacío.

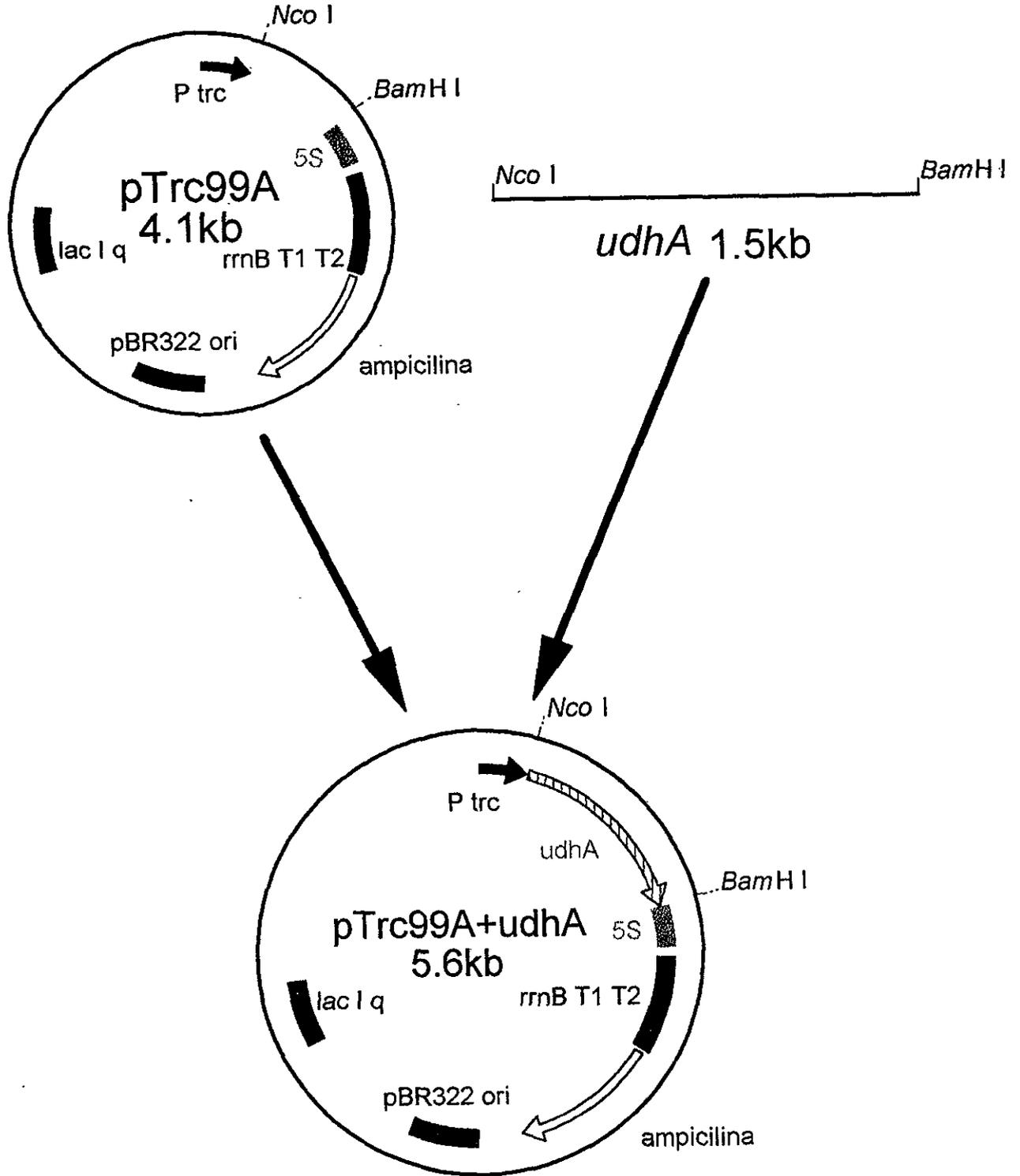


Figura 7. Ligación de *udhA* en pTrc99A.

16. Resuspender en 50µl de TE pH 8.0. La concentración de DNA recuperado empleando esta técnica es de aproximadamente 0.3µg/µl. Para cada reacción de digestión se emplean 5µl (1.5µg de DNA).

IV. Extracción de DNA con Fenol/cloroformo.

Este procedimiento elimina las proteínas previamente adicionadas al DNA para posterior análisis, digestión, transformación y tratamiento del mismo.

1. Agregar un volumen de fenol saturado.
2. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
3. Recuperar fase acuosa.
4. Agregar un volumen de cloroformo.
5. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
6. Recuperar fase acuosa.
7. Agregar 1/10 de volumen de NaCl 5M, 2.5 volúmenes de etanol frío y 5µl de glicógeno 10mg/ml.
8. Mezclar y dejar en hielo seco 15min.
9. Centrifugar 15min, remover sobrenadante.
10. Agregar 1ml de etanol 70%.
11. Mezclar y centrifugar 5min, remover sobrenadante.
12. Secar al vacío y resuspender en TE.

V. Digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción.

Se siguieron las recomendaciones indicadas por el proveedor.

La mezcla se prepara agregando en tubo eppendorf DNA resuspendido en TE o agua, 1/10 de volumen del amortiguador 10x indicado, una concentración de enzima no mayor al 10% y 1/10 de volumen de BSA cuando así se requiera. Las reacciones en este caso se incuban a 37°C/2-18hrs según el tiempo necesario para una digestión completa. Algunas enzimas requieren inactivación con calor a 65°C/20min o solución stop antes de correr en gel. Al realizar una doble digestión, se preparan las condiciones indicadas para ambas enzimas empleando siempre el amortiguador con menor concentración de sales. Si las digestiones se realizan por separado, extraer al DNA de gel de agarosa o con fenol/cloroformo entre cada reacción.

VI. Electroforesis en Gel.

Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido digerido se realizó la técnica en agarosa descrita por Sambrook, et. al. (40).

El gel se prepara fundiendo 1% de agarosa en amortiguador TBE 1x y antes de dejar solidificar, agregar solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.2µg/ml. Colocar el peine y vertir en la cámara, una vez solidificado con los pozos ya formados, cubrir con amortiguador TBE 1x. Agregar a las muestras de DNA 10% de solución stop y cargar el gel junto con el marcador (en este caso λ BstE II). Colocar los electrodos con el negativo en el mismo extremo que las muestras y correr a un voltaje de 2-5v/cm de la longitud del gel, hasta que el colorante esté próximo a salir. Observar en transiluminador de luz UV.

Para fragmentos de DNA relativamente pequeños se preparó y corrió gel de acrilamida al 7.5% en condiciones similares a las anteriores :

16. Resuspender en 50µl de TE pH 8.0. La concentración de DNA recuperado empleando esta técnica es de aproximadamente 0.3µg/µl. Para cada reacción de digestión se emplean 5µl (1.5µg de DNA).

IV. Extracción de DNA con Fenol/cloroformo.

Este procedimiento elimina las proteínas previamente adicionadas al DNA para posterior análisis, digestión, transformación y tratamiento del mismo.

1. Agregar un volumen de fenol saturado.
2. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
3. Recuperar fase acuosa.
4. Agregar un volumen de cloroformo.
5. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
6. Recuperar fase acuosa.
7. Agregar 1/10 de volumen de NaCl 5M, 2.5 volúmenes de etanol frío y 5µl de glicógeno 10mg/ml.
8. Mezclar y dejar en hielo seco 15min.
9. Centrifugar 15min, remover sobrenadante.
10. Agregar 1ml de etanol 70%.
11. Mezclar y centrifugar 5min, remover sobrenadante.
12. Secar al vacío y resuspender en TE.

V. Digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción.

Se siguieron las recomendaciones indicadas por el proveedor.

La mezcla se prepara agregando en tubo eppendorf DNA resuspendido en TE o agua, 1/10 de volumen del amortiguador 10x indicado, una concentración de enzima no mayor al 10% y 1/10 de volumen de BSA cuando así se requiera. Las reacciones en este caso se incuban a 37°C/2-18hrs según el tiempo necesario para una digestión completa. Algunas enzimas requieren inactivación con calor a 65°C/20min o solución stop antes de correr en gel. Al realizar una doble digestión, se preparan las condiciones indicadas para ambas enzimas empleando siempre el amortiguador con menor concentración de sales. Si las digestiones se realizan por separado, extraer al DNA de gel de agarosa o con fenol/cloroformo entre cada reacción.

VI. Electroforesis en Gel.

Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido digerido se realizó la técnica en agarosa descrita por Sambrook, et. al. (40).

El gel se prepara fundiendo 1% de agarosa en amortiguador TBE 1x y antes de dejar solidificar, agregar solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.2µg/ml. Colocar el peine y vertir en la cámara, una vez solidificado con los pozos ya formados, cubrir con amortiguador TBE 1x. Agregar a las muestras de DNA 10% de solución stop y cargar el gel junto con el marcador (en este caso λ BstE II). Colocar los electrodos con el negativo en el mismo extremo que las muestras y correr a un voltaje de 2-5v/cm de la longitud del gel, hasta que el colorante esté próximo a salir. Observar en transiluminador de luz UV.

Para fragmentos de DNA relativamente pequeños se preparó y corrió gel de acrilamida al 7.5% en condiciones similares a las anteriores :

16. Resuspender en 50µl de TE pH 8.0. La concentración de DNA recuperado empleando esta técnica es de aproximadamente 0.3µg/µl. Para cada reacción de digestión se emplean 5µl (1.5µg de DNA).

IV. Extracción de DNA con Fenol/cloroformo.

Este procedimiento elimina las proteínas previamente adicionadas al DNA para posterior análisis, digestión, transformación y tratamiento del mismo.

1. Agregar un volumen de fenol saturado.
2. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
3. Recuperar fase acuosa.
4. Agregar un volumen de cloroformo.
5. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
6. Recuperar fase acuosa.
7. Agregar 1/10 de volumen de NaCl 5M, 2.5 volúmenes de etanol frío y 5µl de glicógeno 10mg/ml.
8. Mezclar y dejar en hielo seco 15min.
9. Centrifugar 15min, remover sobrenadante.
10. Agregar 1ml de etanol 70%.
11. Mezclar y centrifugar 5min, remover sobrenadante.
12. Secar al vacío y resuspender en TE.

V. Digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción.

Se siguieron las recomendaciones indicadas por el proveedor.

La mezcla se prepara agregando en tubo eppendorf DNA resuspendido en TE o agua, 1/10 de volumen del amortiguador 10x indicado, una concentración de enzima no mayor al 10% y 1/10 de volumen de BSA cuando así se requiera. Las reacciones en este caso se incuban a 37°C/2-18hrs según el tiempo necesario para una digestión completa. Algunas enzimas requieren inactivación con calor a 65°C/20min o solución stop antes de correr en gel. Al realizar una doble digestión, se preparan las condiciones indicadas para ambas enzimas empleando siempre el amortiguador con menor concentración de sales. Si las digestiones se realizan por separado, extraer al DNA de gel de agarosa o con fenol/cloroformo entre cada reacción.

VI. Electroforesis en Gel.

Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido digerido se realizó la técnica en agarosa descrita por Sambrook, et. al. (40).

El gel se prepara fundiendo 1% de agarosa en amortiguador TBE 1x y antes de dejar solidificar, agregar solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.2µg/ml. Colocar el peine y vertir en la cámara, una vez solidificado con los pozos ya formados, cubrir con amortiguador TBE 1x. Agregar a las muestras de DNA 10% de solución stop y cargar el gel junto con el marcador (en este caso λ BstE II). Colocar los electrodos con el negativo en el mismo extremo que las muestras y correr a un voltaje de 2-5v/cm de la longitud del gel, hasta que el colorante esté próximo a salir. Observar en transiluminador de luz UV.

Para fragmentos de DNA relativamente pequeños se preparó y corrió gel de acrilamida al 7.5% en condiciones similares a las anteriores :

16. Resuspender en 50µl de TE pH 8.0. La concentración de DNA recuperado empleando esta técnica es de aproximadamente 0.3µg/µl. Para cada reacción de digestión se emplean 5µl (1.5µg de DNA).

IV. Extracción de DNA con Fenol/cloroformo.

Este procedimiento elimina las proteínas previamente adicionadas al DNA para posterior análisis, digestión, transformación y tratamiento del mismo.

1. Agregar un volumen de fenol saturado.
2. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
3. Recuperar fase acuosa.
4. Agregar un volumen de cloroformo.
5. Mezclar en vórtex y centrifugar 2min.
6. Recuperar fase acuosa.
7. Agregar 1/10 de volumen de NaCl 5M, 2.5 volúmenes de etanol frío y 5µl de glicógeno 10mg/ml.
8. Mezclar y dejar en hielo seco 15min.
9. Centrifugar 15min, remover sobrenadante.
10. Agregar 1ml de etanol 70%.
11. Mezclar y centrifugar 5min, remover sobrenadante.
12. Secar al vacío y resuspender en TE.

V. Digestión de DNA con Endonucleasas de Restricción.

Se siguieron las recomendaciones indicadas por el proveedor.

La mezcla se prepara agregando en tubo eppendorf DNA resuspendido en TE o agua, 1/10 de volumen del amortiguador 10x indicado, una concentración de enzima no mayor al 10% y 1/10 de volumen de BSA cuando así se requiera. Las reacciones en este caso se incuban a 37°C/2-18hrs según el tiempo necesario para una digestión completa. Algunas enzimas requieren inactivación con calor a 65°C/20min o solución stop antes de correr en gel. Al realizar una doble digestión, se preparan las condiciones indicadas para ambas enzimas empleando siempre el amortiguador con menor concentración de sales. Si las digestiones se realizan por separado, extraer al DNA de gel de agarosa o con fenol/cloroformo entre cada reacción.

VI. Electroforesis en Gel.

Para el análisis y aislamiento de DNA de plásmido digerido se realizó la técnica en agarosa descrita por Sambrook, et. al. (40).

El gel se prepara fundiendo 1% de agarosa en amortiguador TBE 1x y antes de dejar solidificar, agregar solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.2µg/ml. Colocar el peine y vertir en la cámara, una vez solidificado con los pozos ya formados, cubrir con amortiguador TBE 1x. Agregar a las muestras de DNA 10% de solución stop y cargar el gel junto con el marcador (en este caso λ BstE II). Colocar los electrodos con el negativo en el mismo extremo que las muestras y correr a un voltaje de 2-5v/cm de la longitud del gel, hasta que el colorante esté próximo a salir. Observar en transiluminador de luz UV.

Para fragmentos de DNA relativamente pequeños se preparó y corrió gel de acrilamida al 7.5% en condiciones similares a las anteriores :

- 4.90ml de agua destilada
- 1.90ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 0.75ml de amortiguador TBE 10x
- 37.50µl de persulfato de amonio 10%
- 3.75µl de TEMED

VII. Extracción de DNA de Geles de Agarosa Empleando una Microcentrífuga. (Kit QIAquick)

Con este protocolo se puede extraer y purificar DNA desde 100bp hasta 10kb de gel de agarosa.

1. Extraer el fragmento de DNA del gel de agarosa con una navaja limpia y remover la agarosa extra para minimizar el tamaño de la rebanada.
2. Pesar esta rebanada de gel a tubo eppendorf. Agregar tres volúmenes de amortiguador QX1 por cada volumen de gel (100mg=100µl). Para geles de agarosa mayor al 2% agregar seis volúmenes.
3. Incubar a 50°C/10min o hasta que el gel haya sido disuelto por completo. Para ayudar a disolverlo mezclar el tubo en vórtex cada 3min durante la incubación.
4. Agregar el mismo volumen de isopropanol que el del gel (100mg=100µl) a la muestra y mezclar.
5. Colocar una columna de centrifuga QIAquick en uno de los tubos colectores de 2ml.
6. Para retener el DNA, agregar la muestra a la columna y centrifugar 1min. Desechar el líquido colectado y volver a colocar la columna en el mismo tubo colector.
7. (Opcional). Agregar 0.5ml de amortiguador QX1 a la columna y centrifugar 1min. Este paso elimina residuos de agarosa y solo se requiere para secuenciación directa, transcripción in vitro o microinyección.
8. Lavar agregando 0.75ml de amortiguador PE a la columna y centrifugar 1min.
9. Desechar el líquido colectado y centrifugar la columna por 1min adicional.
10. Colocar la columna en tubo eppendorf limpio de 1.5ml.
11. Para eluir el DNA, agregar 30µl de amortiguador de elusión al centro de la columna, dejar reposar 1min y centrifugar 1min. También se puede agregar 50µl de Tris-HCl 10mM pH 8.5 o agua

VIII. Preparación de Células Electrocompetentes.

1. Crecer durante la noche un cultivo fresco en medio líquido YENB. Este medio descarta los pasos requeridos para remoción de sales, ya que estas reducen la eficiencia de electrotransformación y causan arqueamiento en la celda de electroporación.
2. Inocular 1l de medio YENB fresco con 5ml del cultivo crecido durante la noche y incubar las células a 37°C con agitación (300rpm). Las células deben cultivarse a OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.9 (si las células rebasan este nivel, diluir de nuevo y volver a crecer a la densidad óptica indicada). No sobrecrecer en tiempo ya que las células engrosan su pared y se dificulta su transformación.
3. Para cultivar las células, colocarlas en hielo 5min y centrifugar a 4°C 4,000gx 10min. Si se aplica una fuerza mayor por un tiempo mas largo se reduce la viabilidad del cultivo, lo cual a su vez reduce la eficiencia de electrotransformación.
4. Remover y desechar el medio. Lavar el botón dos veces en 100ml de agua fría y centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.

- 4.90ml de agua destilada
- 1.90ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 0.75ml de amortiguador TBE 10x
- 37.50µl de persulfato de amonio 10%
- 3.75µl de TEMED

VII. Extracción de DNA de Geles de Agarosa Empleando una Microcentrifuga. (Kit QIAquick)

Con este protocolo se puede extraer y purificar DNA desde 100bp hasta 10kb de gel de agarosa.

1. Extraer el fragmento de DNA del gel de agarosa con una navaja limpia y remover la agarosa extra para minimizar el tamaño de la rebanada.
2. Pesar esta rebanada de gel a tubo eppendorf. Agregar tres volúmenes de amortiguador QX1 por cada volumen de gel (100mg=100µl). Para geles de agarosa mayor al 2% agregar seis volúmenes.
3. Incubar a 50°C/10min o hasta que el gel haya sido disuelto por completo. Para ayudar a disolverlo mezclar el tubo en vórtex cada 3min durante la incubación.
4. Agregar el mismo volumen de isopropanol que el del gel (100mg=100µl) a la muestra y mezclar.
5. Colocar una columna de centrifuga QIAquick en uno de los tubos colectores de 2ml.
6. Para retener el DNA, agregar la muestra a la columna y centrifugar 1min. Desechar el líquido colectado y volver a colocar la columna en el mismo tubo colector.
7. (Opcional). Agregar 0.5ml de amortiguador QX1 a la columna y centrifugar 1min. Este paso elimina residuos de agarosa y solo se requiere para secuenciación directa, transcripción *in vitro* o microinyección.
8. Lavar agregando 0.75ml de amortiguador PE a la columna y centrifugar 1min.
9. Desechar el líquido colectado y centrifugar la columna por 1min adicional.
10. Colocar la columna en tubo eppendorf limpio de 1.5ml.
11. Para eluir el DNA, agregar 30µl de amortiguador de elusión al centro de la columna, dejar reposar 1min y centrifugar 1min. También se puede agregar 50µl de Tris-HCl 10mM pH 8.5 o agua

VIII. Preparación de Células Electrocompetentes.

1. Crecer durante la noche un cultivo fresco en medio líquido YENB. Este medio descarta los pasos requeridos para remoción de sales, ya que estas reducen la eficiencia de electrotransformación y causan arqueamiento en la celda de electroporación.
2. Inocular 1l de medio YENB fresco con 5ml del cultivo crecido durante la noche y incubar las células a 37°C con agitación (300rpm). Las células deben cultivarse a OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.9 (si las células rebasan este nivel, diluir de nuevo y volver a crecer a la densidad óptica indicada). No sobrecrecer en tiempo ya que las células engrosan su pared y se dificulta su transformación.
3. Para cultivar las células, colocarlas en hielo 5min y centrifugar a 4°C 4,000gx 10min. Si se aplica una fuerza mayor por un tiempo mas largo se reduce la viabilidad del cultivo, lo cual a su vez reduce la eficiencia de electrotransformación.
4. Remover y desechar el medio. Lavar el botón dos veces en 100ml de agua fría y centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.

- 4.90ml de agua destilada
- 1.90ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 0.75ml de amortiguador TBE 10x
- 37.50µl de persulfato de amonio 10%
- 3.75µl de TEMED

VII. Extracción de DNA de Geles de Agarosa Empleando una Microcentrifuga. (Kit QIAquick)

Con este protocolo se puede extraer y purificar DNA desde 100bp hasta 10kb de gel de agarosa.

1. Extraer el fragmento de DNA del gel de agarosa con una navaja limpia y remover la agarosa extra para minimizar el tamaño de la rebanada.
2. Pesar esta rebanada de gel a tubo eppendorf. Agregar tres volúmenes de amortiguador QX1 por cada volumen de gel (100mg=100µl). Para geles de agarosa mayor al 2% agregar seis volúmenes.
3. Incubar a 50°C/10min o hasta que el gel haya sido disuelto por completo. Para ayudar a disolverlo mezclar el tubo en vórtex cada 3min durante la incubación.
4. Agregar el mismo volumen de isopropanol que el del gel (100mg=100µl) a la muestra y mezclar.
5. Colocar una columna de centrifuga QIAquick en uno de los tubos colectores de 2ml.
6. Para retener el DNA, agregar la muestra a la columna y centrifugar 1min. Desechar el líquido colectado y volver a colocar la columna en el mismo tubo colector.
7. (Opcional). Agregar 0.5ml de amortiguador QX1 a la columna y centrifugar 1min. Este paso elimina residuos de agarosa y solo se requiere para secuenciación directa, transcripción *in vitro* o microinyección.
8. Lavar agregando 0.75ml de amortiguador PE a la columna y centrifugar 1min.
9. Desechar el líquido colectado y centrifugar la columna por 1min adicional.
10. Colocar la columna en tubo eppendorf limpio de 1.5ml.
11. Para eluir el DNA, agregar 30µl de amortiguador de elusión al centro de la columna, dejar reposar 1min y centrifugar 1min. También se puede agregar 50µl de Tris-HCl 10mM pH 8.5 o agua

VIII. Preparación de Células Electrocompetentes.

1. Crecer durante la noche un cultivo fresco en medio liquido YENB. Este medio descarta los pasos requeridos para remoción de sales, ya que estas reducen la eficiencia de electrotransformación y causan arqueamiento en la celda de electroporación.
2. Inocular 1l de medio YENB fresco con 5ml del cultivo crecido durante la noche y incubar las células a 37°C con agitación (300rpm). Las células deben cultivarse a OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.9 (si las células rebasan este nivel, diluir de nuevo y volver a crecer a la densidad óptica indicada). No sobrecrecer en tiempo ya que las células engrosan su pared y se dificulta su transformación.
3. Para cultivar las células, colocarlas en hielo 5min y centrifugar a 4°C 4,000gx 10min. Si se aplica una fuerza mayor por un tiempo mas largo se reduce la viabilidad del cultivo, lo cual a su vez reduce la eficiencia de electrotransformación.
4. Remover y desechar el medio. Lavar el botón dos veces en 100ml de agua fría y centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.

5. Resuspender en 20ml de glicerol 10 % frío. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.
6. Resuspender las células (de 1l de cultivo) en un volumen final de 3ml de glicerol 10% frío. Estas células electrocompetentes pueden usarse frescas o ser congeladas hasta por dos años.
7. Para congelar las células electrocompetentes preparar alicuotas y colocarlas en hielo seco hasta que la suspensión se congele. Guardar a -70°C.

IX. Electrotransformación.

1. Descongelar en hielo una alicuota de células electrocompetentes y agregarles 1-5µl de DNA resuspendido en amortiguador de bajo stress iónico (TE) o agua. Mezclar bien y dejar en hielo 1min.
2. Transferir la mezcla de células y DNA a una celda de electroporación de 0.2cm fría y aplicar un pulso de 2,500v. Este debe producir una constante de tiempo de 4-5mseg que indica una alta eficiencia de electroporación.
3. Remover la celda de la cámara e inmediatamente agregar 1ml de medio YENB, YT 2x ó SOC.
4. Resuspender las células y transferir la suspensión a tubo de vidrio estéril. Incubar con agitación (300rpm) a 37°C/1hr.
5. Platear las células en cajas con medio selectivo YENB, YT 2x ó SOC con antibiótico e incubar a 37°C durante la noche.

X. Preparación y Transformación de Células Competentes por Método Químico.

1. Crecer un cultivo durante la noche en 3ml de medio Luria.
2. Agregar 0.2 - 1.0ml de este cultivo a 30ml de medio Luria y crecer hasta 40 kletts.
3. Centrifugar a 4°C 10k 5min.
4. Decantar y resuspender en 10ml de NaCl isotónico (10mM ó 0.9%) frío.
5. Centrifugar como en el paso 3. Decantar y resuspender en 15ml de CaCl₂ 30 mM frío.
6. Incubar en hielo 20min. Centrifugar a 4°C 5k 10min (el botón debe ser anular)
7. Decantar y resuspender en 3ml de CaCl₂ 30mM frío. Para transformar se pasan 200µl a tubo de vidrio estéril.
8. Agregar el DNA y mezclar.
9. Agitar en hielo suavemente 1hr. Aplicar un choque térmico a 42°C/70seg y pasar a hielo 5min.
10. Agregar 3ml de medio Luria y dejar recuperando a 37°C/1hr con agitación (300rpm).
11. Platear en cajas con Luria y antibiótico.

XI. Reacción de Secuenciación. (Kit THERMOSequenase)

Se preparó suficiente reacción para tres secuencias :

1. Escoger la mezcla maestra apropiada (dGTP o dITP) para la secuencia. En este caso dGTP.
2. Preparar las cuatro mezclas de terminación empleando 2.0µl de la mezcla maestra y 0.5µl de cada uno de los cuatro ddNTP marcados.

5. Resuspender en 20ml de glicerol 10 % frío. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.
6. Resuspender las células (de 1l de cultivo) en un volumen final de 3ml de glicerol 10% frío. Estas células electrocompetentes pueden usarse frescas o ser congeladas hasta por dos años.
7. Para congelar las células electrocompetentes preparar alicuotas y colocarlas en hielo seco hasta que la suspensión se congele. Guardar a -70°C.

IX. Electrotransformación.

1. Descongelar en hielo una alicuota de células electrocompetentes y agregarles 1-5µl de DNA resuspendido en amortiguador de bajo stress iónico (TE) o agua. Mezclar bien y dejar en hielo 1min.
2. Transferir la mezcla de células y DNA a una celda de electroporación de 0.2cm fría y aplicar un pulso de 2,500v. Este debe producir una constante de tiempo de 4-5mseg que indica una alta eficiencia de electroporación.
3. Remover la celda de la cámara e inmediatamente agregar 1ml de medio YENB, YT 2x ó SOC.
4. Resuspender las células y transferir la suspensión a tubo de vidrio estéril. Incubar con agitación (300rpm) a 37°C/1hr.
5. Platear las células en cajas con medio selectivo YENB, YT 2x ó SOC con antibiótico e incubar a 37°C durante la noche.

X. Preparación y Transformación de Células Competentes por Método Químico.

1. Crecer un cultivo durante la noche en 3ml de medio Luria.
2. Agregar 0.2 - 1.0ml de este cultivo a 30ml de medio Luria y crecer hasta 40 kletts.
3. Centrifugar a 4°C 10k 5min.
4. Decantar y resuspender en 10ml de NaCl isotónico (10mM ó 0.9%) frío.
5. Centrifugar como en el paso 3. Decantar y resuspender en 15ml de CaCl₂ 30 mM frío.
6. Incubar en hielo 20min. Centrifugar a 4°C 5k 10min (el botón debe ser anular)
7. Decantar y resuspender en 3ml de CaCl₂ 30mM frío. Para transformar se pasan 200µl a tubo de vidrio estéril.
8. Agregar el DNA y mezclar.
9. Agitar en hielo suavemente 1hr. Aplicar un choque térmico a 42°C/70seg y pasar a hielo 5min.
10. Agregar 3ml de medio Luria y dejar recuperando a 37°C/1hr con agitación (300rpm).
11. Platear en cajas con Luria y antibiótico.

XI. Reacción de Secuenciación. (Kit THERMOSequenase)

Se preparó suficiente reacción para tres secuencias :

1. Escoger la mezcla maestra apropiada (dGTP o dITP) para la secuencia. En este caso dGTP.
2. Preparar las cuatro mezclas de terminación empleando 2.0µl de la mezcla maestra y 0.5µl de cada uno de los cuatro ddNTP marcados.

5. Resuspender en 20ml de glicerol 10 % frío. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.
6. Resuspender las células (de 1l de cultivo) en un volumen final de 3ml de glicerol 10% frío. Estas células electrocompetentes pueden usarse frescas o ser congeladas hasta por dos años.
7. Para congelar las células electrocompetentes preparar alicuotas y colocarlas en hielo seco hasta que la suspensión se congele. Guardar a -70°C .

IX. Electrotransformación.

1. Descongelar en hielo una alicuota de células electrocompetentes y agregarles 1-5 μl de DNA resuspendido en amortiguador de bajo stress iónico (TE) o agua. Mezclar bien y dejar en hielo 1min.
2. Transferir la mezcla de células y DNA a una celda de electroporación de 0.2cm fría y aplicar un pulso de 2,500v. Este debe producir una constante de tiempo de 4-5mseg que indica una alta eficiencia de electroporación.
3. Remover la celda de la cámara e inmediatamente agregar 1ml de medio YENB, YT 2x ó SOC.
4. Resuspender las células y transferir la suspensión a tubo de vidrio estéril. Incubar con agitación (300rpm) a $37^{\circ}\text{C}/\text{1hr}$.
5. Platear las células en cajas con medio selectivo YENB, YT 2x ó SOC con antibiótico e incubar a 37°C durante la noche.

X. Preparación y Transformación de Células Competentes por Método Químico.

1. Crecer un cultivo durante la noche en 3ml de medio Luria.
2. Agregar 0.2 - 1.0ml de este cultivo a 30ml de medio Luria y crecer hasta 40 kletts.
3. Centrifugar a 4°C 10k 5min.
4. Decantar y resuspender en 10ml de NaCl isotónico (10mM ó 0.9%) frío.
5. Centrifugar como en el paso 3. Decantar y resuspender en 15ml de CaCl₂ 30 mM frío.
6. Incubar en hielo 20min. Centrifugar a 4°C 5k 10min (el botón debe ser anular)
7. Decantar y resuspender en 3ml de CaCl₂ 30mM frío. Para transformar se pasan 200 μl a tubo de vidrio estéril.
8. Agregar el DNA y mezclar.
9. Agitar en hielo suavemente 1hr. Aplicar un choque térmico a $42^{\circ}\text{C}/70\text{seg}$ y pasar a hielo 5min.
10. Agregar 3ml de medio Luria y dejar recuperando a $37^{\circ}\text{C}/\text{1hr}$ con agitación (300rpm).
11. Platear en cajas con Luria y antibiótico.

XI. Reacción de Secuenciación. (Kit THERMOSequenase)

Se preparó suficiente reacción para tres secuencias :

1. Escoger la mezcla maestra apropiada (dGTP o dITP) para la secuencia. En este caso dGTP.
2. Preparar las cuatro mezclas de terminación empleando 2.0 μl de la mezcla maestra y 0.5 μl de cada uno de los cuatro ddNTP marcados.

5. Resuspender en 20ml de glicerol 10 % frío. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar sobrenadante.
6. Resuspender las células (de 11 de cultivo) en un volumen final de 3ml de glicerol 10% frío. Estas células electrocompetentes pueden usarse frescas o ser congeladas hasta por dos años.
7. Para congelar las células electrocompetentes preparar alicuotas y colocarlas en hielo seco hasta que la suspensión se congele. Guardar a -70°C .

IX. Electrotransformación.

1. Descongelar en hielo una alicuota de células electrocompetentes y agregarles 1-5 μl de DNA resuspendido en amortiguador de bajo stress iónico (TE) o agua. Mezclar bien y dejar en hielo 1min.
2. Transferir la mezcla de células y DNA a una celda de electroporación de 0.2cm fría y aplicar un pulso de 2,500v. Este debe producir una constante de tiempo de 4-5mseg que indica una alta eficiencia de electroporación.
3. Remover la celda de la cámara e inmediatamente agregar 1ml de medio YENB, YT 2x ó SOC.
4. Resuspender las células y transferir la suspensión a tubo de vidrio estéril. Incubar con agitación (300rpm) a $37^{\circ}\text{C}/1\text{hr}$.
5. Platear las células en cajas con medio selectivo YENB, YT 2x ó SOC con antibiótico e incubar a 37°C durante la noche.

X. Preparación y Transformación de Células Competentes por Método Químico.

1. Crecer un cultivo durante la noche en 3ml de medio Luria.
2. Agregar 0.2 - 1.0ml de este cultivo a 30ml de medio Luria y crecer hasta 40 kletts.
3. Centrifugar a 4°C 10k 5min.
4. Decantar y resuspender en 10ml de NaCl isotónico (10mM ó 0.9%) frío.
5. Centrifugar como en el paso 3. Decantar y resuspender en 15ml de CaCl₂ 30 mM frío.
6. Incubar en hielo 20min. Centrifugar a 4°C 5k 10min (el botón debe ser anular)
7. Decantar y resuspender en 3ml de CaCl₂ 30mM frío. Para transformar se pasan 200 μl a tubo de vidrio estéril.
8. Agregar el DNA y mezclar.
9. Agitar en hielo suavemente 1hr. Aplicar un choque térmico a $42^{\circ}\text{C}/70\text{seg}$ y pasar a hielo 5min.
10. Agregar 3ml de medio Luria y dejar recuperando a $37^{\circ}\text{C}/1\text{hr}$ con agitación (300rpm).
11. Platear en cajas con Luria y antibiótico.

XI. Reacción de Secuenciación. (Kit THERMOSequenase)

Se preparó suficiente reacción para tres secuencias :

1. Escoger la mezcla maestra apropiada (dGTP o dITP) para la secuencia. En este caso dGTP.
2. Preparar las cuatro mezclas de terminación empleando 2.0 μl de la mezcla maestra y 0.5 μl de cada uno de los cuatro ddNTP marcados.

| Vol en μ l | una secuencia | | | | dos secuencias | | | |
|---|---------------|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|
| | G | A | T | C | G | A | T | C |
| Mezcla maestra de terminación dGTP o dITP | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| (α -33P) ddGTP | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - | - | - |
| (α -33P) ddATP | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - | - |
| (α -33P) ddTTP | - | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - |
| (α -33P) ddCTP | - | - | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 |
| Total | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

3. Agregar 2.5 μ l de las respectivas mezclas de terminación a cada uno de cuatro tubos marcados (G,A,T,C).
4. Preparar la mezcla de la reacción y mezclar bien :

| Vol en μ l | 1x | 2x |
|----------------------------------|----|----|
| Amortiguador de reacción | 2 | 4 |
| Plásmido pTrc99A+udhA | 1 | 2 |
| Oligo ptrc152 | 1 | 2 |
| Agua | 14 | 28 |
| Termosecuensasa (DNA polimerasa) | 2 | 4 |

5. Reacción de terminación por PCR : Transferir 4.5 μ l de la mezcla de templado y polimerasa del paso 4, a cada tubo G,A,T,C del paso 3. Mezclar bien y si es necesario, añadir 10-20 μ l de aceite mineral. Cerrar y colocar los tubos en el termociclo.
6. Programar uno de los siguientes ciclos sesenta veces :

| dGTP | dITP |
|-------------|-------------|
| 95°C, 30seg | 95°C, 30seg |
| 55°C, 30seg | 50°C, 30seg |
| 72°C, 1min | 60°C, 1min |

Una vez concluido el programa, detener las reacciones agregando 4 μ l de solución stop y centrifugar brevemente para separar el aceite de la fase acuosa (si es el caso).

7. Antes de cargar el gel de secuencia calentar las muestras a 70°C por 10-20min. Evitar agregar aceite.

XIII. Corrimiento de Gel para Secuencia.

Se realizaron tres corridas en gel.

1. Enjuagar los cristales del gel con agua bidestilada, colocar el peine y las gomas. Montar en la cámara y ajustar con presión.

| Vol en μ l | una secuencia | | | | dos secuencias | | | |
|---|---------------|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|
| | G | A | T | C | G | A | T | C |
| Mezcla maestra de terminación dGTP o dTTP | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| (α -33P) ddGTP | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - | - | - |
| (α -33P) ddATP | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - | - |
| (α -33P) ddTTP | - | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 | - |
| (α -33P) ddCTP | - | - | - | 0.5 | - | - | - | 1.0 |
| Total | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

3. Agregar 2.5 μ l de las respectivas mezclas de terminación a cada uno de cuatro tubos marcados (G,A,T,C).
4. Preparar la mezcla de la reacción y mezclar bien :

| Vol en μ l | 1x | 2x |
|----------------------------------|----|----|
| Amortiguador de reacción | 2 | 4 |
| Plásmido pTrc99A+udhA | 1 | 2 |
| Oligo ptrc152 | 1 | 2 |
| Agua | 14 | 28 |
| Termosecuensasa (DNA polimerasa) | 2 | 4 |

5. Reacción de terminación por PCR : Transferir 4.5 μ l de la mezcla de templado y polimerasa del paso 4, a cada tubo G,A,T,C del paso 3. Mezclar bien y si es necesario, añadir 10-20 μ l de aceite mineral. Cerrar y colocar los tubos en el termociclo.
6. Programar uno de los siguientes ciclos sesenta veces :

| dGTP | dTTP |
|-------------|-------------|
| 95°C, 30seg | 95°C, 30seg |
| 55°C, 30seg | 50°C, 30seg |
| 72°C, 1min | 60°C, 1min |

Una vez concluido el programa, detener las reacciones agregando 4 μ l de solución stop y centrifugar brevemente para separar el aceite de la fase acuosa (si es el caso).

7. Antes de cargar el gel de secuencia calentar las muestras a 70°C por 10-20min. Evitar agregar aceite.

XIII. Corrimiento de Gel para Secuencia.

Se realizaron tres corridas en gel.

1. Enjuagar los cristales del gel con agua bidestilada, colocar el peine y las gomas. Montar en la cámara y ajustar con presión.

2. Agregar amortiguador TBE 1x y dejar corriendo solo a 300Watts continuos 30min.
3. Justo antes de cargar las muestras, agregarles solución stop y calentar a 70°C/10-20min. Lavar los pozos con el amortiguador para desplazar urea y agregar en cada uno 7µl de cada dNTP. Proceder de la misma manera para cada corrida dejando un espacio de 30min entre cada una. Tener cuidado de no contaminar los pozos con distintos dNTP.
4. Dejar el gel corriendo a 300Watts/2hrs.
5. Remover el amortiguador y desmontar los cristales. Separar los cristales con una espátula procurando que el gel quede adherido solo a uno de ellos.
6. Cubrir el gel con papel filtro evitando burbujas y una vez adherido al papel, despegarlo del cristal.
7. Cubrir el gel con plástico adherente evitando burbujas y plegar los bordes.
8. Colocar el gel en la cámara de secado con el lado del papel hacia abajo y secar al vacío con calor 2hrs.
9. Para obtener la secuencia, colocar el gel en el cassette de fosforimager con el lado del mismo hacia arriba y registrar coordenadas. Conservar el tiempo requerido según la vida media de la marca.

XIII. Inducción de udhA en el vector pTrc99A con IPTG.

1. Crecer por separado las cepas W3110 transformadas con los plásmidos pTrc99A+udhA y pTrc99A (testigo) en 30ml de Luria con Ampicilina 200µg/ml, incubar a 37°C durante la noche con agitación (300rpm).
2. Realizar pase en el mismo medio con antibiótico e incubar en las mismas condiciones hasta obtener OD₆₀₀=2.
3. Agregar ampicilina de nuevo a una concentración final de 100µg/ml con la finalidad de conservar la actividad del antibiótico e IPTG a una concentración final de 1mM.
4. Continuar incubando en las mismas condiciones 3hrs mas.

XIV. Extracción de Proteína Soluble.

Se realizó de la manera descrita por French, *et. al.* (16)

1. Centrifugar a 4°C 10k 5min, remover sobrenadante y resuspender con vórtex en 2ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 con DTT 2mM frío.
2. Pasar 1.5ml de cada muestra a tubo eppendorf y sonicar en baño de hielo con veinticinco pulsos de 5seg al máximo y pausas de 30seg para permitir que la suspensión se mantenga fría.
3. Centrifugar el sonicado a 4°C 14k 10min, recuperar sobrenadante y medir actividad o guardar a 4°C.

XV. Medición de Actividad de Transhidrogenasa Soluble para UDHA.

1. Preparar al momento β-NADPH 10mM y tNAD' 10mM. Mantener en hielo al igual que los extractos.
2. Calibrar con el amortiguador Tris-HCl y colocar la reacción enzimática variando las siguientes especies :

2. Agregar amortiguador TBE 1x y dejar corriendo solo a 300Watts continuos 30min.
3. Justo antes de cargar las muestras, agregarles solución stop y calentar a 70°C/10-20min. Lavar los pozos con el amortiguador para desplazar urea y agregar en cada uno 7µl de cada dNTP. Proceder de la misma manera para cada corrida dejando un espacio de 30min entre cada una. Tener cuidado de no contaminar los pozos con distintos dNTP.
4. Dejar el gel corriendo a 300Watts/2hrs.
5. Remover el amortiguador y desmontar los cristales. Separar los cristales con una espátula procurando que el gel quede adherido solo a uno de ellos.
6. Cubrir el gel con papel filtro evitando burbujas y una vez adherido al papel, despegarlo del cristal.
7. Cubrir el gel con plástico adherente evitando burbujas y plegar los bordes.
8. Colocar el gel en la cámara de secado con el lado del papel hacia abajo y secar al vacío con calor 2hrs.
9. Para obtener la secuencia, colocar el gel en el cassette de fosforimager con el lado del mismo hacia arriba y registrar coordenadas. Conservar el tiempo requerido según la vida media de la marca.

XIII. Inducción de udhA en el vector pTrc99A con IPTG.

1. Crecer por separado las cepas W3110 transformadas con los plásmidos pTrc99A+udhA y pTrc99A (testigo) en 30ml de Luria con Ampicilina 200µg/ml, incubar a 37°C durante la noche con agitación (300rpm).
2. Realizar pase en el mismo medio con antibiótico e incubar en las mismas condiciones hasta obtener OD₆₀₀=2.
3. Agregar ampicilina de nuevo a una concentración final de 100µg/ml con la finalidad de conservar la actividad del antibiótico e IPTG a una concentración final de 1mM.
4. Continuar incubando en las mismas condiciones 3hrs mas.

XIV. Extracción de Proteína Soluble.

Se realizó de la manera descrita por French, et. al. (16)

1. Centrifugar a 4°C 10k 5min, remover sobrenadante y resuspender con vórtex en 2ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 con DTT 2mM frío.
2. Pasar 1.5ml de cada muestra a tubo eppendorf y sonicar en baño de hielo con veinticinco pulsos de 5seg al máximo y pausas de 30seg para permitir que la suspensión se mantenga fría.
3. Centrifugar el sonicado a 4°C 14k 10min, recuperar sobrenadante y medir actividad o guardar a 4°C.

XV. Medición de Actividad de Transhidrogenasa Soluble para UDHA.

1. Preparar al momento β-NADPH 10mM y tNAD' 10mM. Mantener en hielo al igual que los extractos.
2. Calibrar con el amortiguador Tris-HCl y colocar la reacción enzimática variando las siguientes especies :

2. Agregar amortiguador TBE 1x y dejar corriendo solo a 300Watts continuos 30min.
3. Justo antes de cargar las muestras, agregarles solución stop y calentar a 70°C/10-20min. Lavar los pozos con el amortiguador para desplazar urea y agregar en cada uno 7µl de cada dNTP. Proceder de la misma manera para cada corrida dejando un espacio de 30min entre cada una. Tener cuidado de no contaminar los pozos con distintos dNTP.
4. Dejar el gel corriendo a 300Watts/2hrs.
5. Remover el amortiguador y desmontar los cristales. Separar los cristales con una espátula procurando que el gel quede adherido solo a uno de ellos.
6. Cubrir el gel con papel filtro evitando burbujas y una vez adherido al papel, despegarlo del cristal.
7. Cubrir el gel con plástico adherente evitando burbujas y plegar los bordes.
8. Colocar el gel en la cámara de secado con el lado del papel hacia abajo y secar al vacío con calor 2hrs.
9. Para obtener la secuencia, colocar el gel en el cassette de fosforimager con el lado del mismo hacia arriba y registrar coordenadas. Conservar el tiempo requerido según la vida media de la marca.

XIII. Inducción de udhA en el vector pTrc99A con IPTG.

1. Crecer por separado las cepas W3110 transformadas con los plásmidos pTrc99A+udhA y pTrc99A (testigo) en 30ml de Luria con Ampicilina 200µg/ml, incubar a 37°C durante la noche con agitación (300rpm).
2. Realizar pase en el mismo medio con antibiótico e incubar en las mismas condiciones hasta obtener OD₆₀₀=2.
3. Agregar ampicilina de nuevo a una concentración final de 100µg/ml con la finalidad de conservar la actividad del antibiótico e IPTG a una concentración final de 1mM.
4. Continuar incubando en las mismas condiciones 3hrs mas.

XIV. Extracción de Proteína Soluble.

Se realizó de la manera descrita por French, *et. al.* (16)

1. Centrifugar a 4°C 10k 5min, remover sobrenadante y resuspender con vórtex en 2ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 con DTT 2mM frío.
2. Pasar 1.5ml de cada muestra a tubo eppendorf y sonicar en baño de hielo con veinticinco pulsos de 5seg al máximo y pausas de 30seg para permitir que la suspensión se mantenga fría.
3. Centrifugar el sonicado a 4°C 14k 10min, recuperar sobrenadante y medir actividad o guardar a 4°C.

XV. Medición de Actividad de Transhidrogenasa Soluble para UDHA.

1. Preparar al momento β-NADPH 10mM y tNAD' 10mM. Mantener en hielo al igual que los extractos.
2. Calibrar con el amortiguador Tris-HCl y colocar la reacción enzimática variando las siguientes especies :

2. Agregar amortiguador TBE 1x y dejar corriendo solo a 300Watts continuos 30min.
3. Justo antes de cargar las muestras, agregarles solución stop y calentar a 70°C/10-20min. Lavar los pozos con el amortiguador para desplazar urea y agregar en cada uno 7µl de cada dNTP. Proceder de la misma manera para cada corrida dejando un espacio de 30min entre cada una. Tener cuidado de no contaminar los pozos con distintos dNTP.
4. Dejar el gel corriendo a 300Watts/2hrs.
5. Remover el amortiguador y desmontar los cristales. Separar los cristales con una espátula procurando que el gel quede adherido solo a uno de ellos.
6. Cubrir el gel con papel filtro evitando burbujas y una vez adherido al papel, despegarlo del cristal.
7. Cubrir el gel con plástico adherente evitando burbujas y plegar los bordes.
8. Colocar el gel en la cámara de secado con el lado del papel hacia abajo y secar al vacío con calor 2hrs.
9. Para obtener la secuencia, colocar el gel en el cassette de fosforimager con el lado del mismo hacia arriba y registrar coordenadas. Conservar el tiempo requerido según la vida media de la marca.

XIII. Inducción de udhA en el vector pTrc99A con IPTG.

1. Crecer por separado las cepas W3110 transformadas con los plásmidos pTrc99A+udhA y pTrc99A (testigo) en 30ml de Luria con Ampicilina 200µg/ml, incubar a 37°C durante la noche con agitación (300rpm).
2. Realizar pase en el mismo medio con antibiótico e incubar en las mismas condiciones hasta obtener OD₆₀₀=2.
3. Agregar ampicilina de nuevo a una concentración final de 100µg/ml con la finalidad de conservar la actividad del antibiótico e IPTG a una concentración final de 1mM.
4. Continuar incubando en las mismas condiciones 3hrs mas.

XIV. Extracción de Proteína Soluble.

Se realizó de la manera descrita por French, et. al. (16)

1. Centrifugar a 4°C 10k 5min, remover sobrenadante y resuspender con vórtex en 2ml de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 con DTT 2mM frío.
2. Pasar 1.5ml de cada muestra a tubo eppendorf y sonicar en baño de hielo con veinticinco pulsos de 5seg al máximo y pausas de 30seg para permitir que la suspensión se mantenga fría.
3. Centrifugar el sonicado a 4°C 14k 10min, recuperar sobrenadante y medir actividad o guardar a 4°C.

XV. Medición de Actividad de Transhidrogenasa Soluble para UDHA.

1. Preparar al momento β-NADPH 10mM y tNAD' 10mM. Mantener en hielo al igual que los extractos.
2. Calibrar con el amortiguador Tris-HCl y colocar la reacción enzimática variando las siguientes especies :

| | |
|-----------|--|
| X μ l | Amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 a 37°C |
| X μ l | tNAD' 10mM |
| X μ l | β -NADPH 10mM |
| X μ l | Extracto |

3. Leer inmediatamente a 400nm para registrar actividad. En este caso en periodos de 10seg durante 2min.

XVI. Determinación de la Concentración de Proteína Soluble. (Kit BioRad)

Este procedimiento se basa en el método de Bradford (8).

Para reconstituir a la gama-globulina bovina (IGG) y albúmina de suero bovino (BSA) liofilizadas agregar 20ml de agua desionizada y mezclar hasta disolver por completo. Guardar a -20°C.

1. Se prepara la solución de tinción diluyendo una parte de reactivo de tinción concentrado en cuatro partes de agua desionizada, filtrar con Whatman No. 1 o equivalente para remover partículas.
2. Preparar diluciones de la proteína de referencia (IGG o BSA) con la que se va a comparar la proteína experimental. El rango lineal de BSA es 0.2-0.9mg/ml y de IGG es 0.2-1.5mg/ml.
3. Transferir por separado 100 μ l de proteína de referencia y experimental a tubo de ensayo seco y limpio.
4. Agregar 5ml de solución de tinción a cada tubo y mezclar con vórtex.
5. Incubar a temperatura ambiente 5min. Debido a que la absorbancia se incrementa con el tiempo no incubar por mas de 1hr.
6. Medir absorbancia a 595nm.

XVII. Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA en *E. coli*.

Para determinar la concentración total de proteína primero se preparan las muestras a correr en gel de proteínas al 12% :

Concentrar un botón muy pequeño de la cepa transformada e inducida y remover el medio restante con papel absorbente. A cada botón agregar 10 μ l de agua y 10 μ l de amortiguador de lisis 1x, sonicar al máximo 15seg.

El gel de proteínas al 12% se prepara de la siguiente manera :

Gel separador (Inferior)

- 4.10ml de agua destilada
- 4.50ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 2.25ml de Tris 2M pH 8.8
- 56.00 μ l de SDS 10%
- 150.00 μ l de persulfato de amonio 10%
- 7.50 μ l de TEMED

| | |
|-----------|--|
| X μ l | Amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 a 37°C |
| X μ l | tNAD' 10mM |
| X μ l | β -NADPH 10mM |
| X μ l | Extracto |

3. Leer inmediatamente a 400nm para registrar actividad. En este caso en periodos de 10seg durante 2min.

XVI. Determinación de la Concentración de Proteína Soluble. (Kit BioRad)

Este procedimiento se basa en el método de Bradford (8).

Para reconstituir a la gama-globulina bovina (IGG) y albúmina de suero bovino (BSA) liofilizadas agregar 20ml de agua desionizada y mezclar hasta disolver por completo. Guardar a -20°C.

1. Se prepara la solución de tinción diluyendo una parte de reactivo de tinción concentrado en cuatro partes de agua desionizada, filtrar con Whatman No. 1 o equivalente para remover partículas.
2. Preparar diluciones de la proteína de referencia (IGG o BSA) con la que se va a comparar la proteína experimental. El rango lineal de BSA es 0.2-0.9mg/ml y de IGG es 0.2-1.5mg/ml.
3. Transferir por separado 100 μ l de proteína de referencia y experimental a tubo de ensayo seco y limpio.
4. Agregar 5ml de solución de tinción a cada tubo y mezclar con vórtex.
5. Incubar a temperatura ambiente 5min. Debido a que la absorbancia se incrementa con el tiempo no incubar por mas de 1hr.
6. Medir absorbancia a 595nm.

XVII. Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA en *E. coli*.

Para determinar la concentración total de proteína primero se preparan las muestras a correr en gel de proteínas al 12% :

Concentrar un botón muy pequeño de la cepa transformada e inducida y remover el medio restante con papel absorbente. A cada botón agregar 10 μ l de agua y 10 μ l de amortiguador de lisis 1x, sonicar al máximo 15seg.

El gel de proteínas al 12% se prepara de la siguiente manera :

Gel separador (Inferior)

- 4.10ml de agua destilada
- 4.50ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 2.25ml de Tris 2M pH 8.8
- 56.00 μ l de SDS 10%
- 150.00 μ l de persulfato de amonio 10%
- 7.50 μ l de TEMED

| | |
|-----------|--|
| X μ l | Amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.0 a 37°C |
| X μ l | tNAD ⁺ 10mM |
| X μ l | β -NADPH 10mM |
| X μ l | Extracto |

3. Leer inmediatamente a 400nm para registrar actividad. En este caso en periodos de 10seg durante 2min.

XVI. Determinación de la Concentración de Proteína Soluble. (Kit BioRad)

Este procedimiento se basa en el método de Bradford (8).

Para reconstituir a la gama-globulina bovina (IGG) y albúmina de suero bovino (BSA) liofilizadas agregar 20ml de agua desionizada y mezclar hasta disolver por completo. Guardar a -20°C.

1. Se prepara la solución de tinción diluyendo una parte de reactivo de tinción concentrado en cuatro partes de agua desionizada, filtrar con Whatman No. 1 o equivalente para remover partículas.
2. Preparar diluciones de la proteína de referencia (IGG o BSA) con la que se va a comparar la proteína experimental. El rango lineal de BSA es 0.2-0.9mg/ml y de IGG es 0.2-1.5mg/ml.
3. Transferir por separado 100 μ l de proteína de referencia y experimental a tubo de ensayo seco y limpio.
4. Agregar 5ml de solución de tinción a cada tubo y mezclar con vórtex.
5. Incubar a temperatura ambiente 5min. Debido a que la absorbancia se incrementa con el tiempo no incubar por mas de 1hr.
6. Medir absorbancia a 595nm.

XVII. Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA en *E. coli*.

Para determinar la concentración total de proteína primero se preparan las muestras a correr en gel de proteínas al 12% :

Concentrar un botón muy pequeño de la cepa transformada e inducida y remover el medio restante con papel absorbente. A cada botón agregar 10 μ l de agua y 10 μ l de amortiguador de lisis 1x, sonicar al máximo 15seg.

El gel de proteínas al 12% se prepara de la siguiente manera :

Gel separador (Inferior)

- 4.10ml de agua destilada
- 4.50ml de Bis-Acrilamida 30:08
- 2.25ml de Tris 2M pH 8.8
- 56.00 μ l de SDS 10%
- 150.00 μ l de persulfato de amonio 10%
- 7.50 μ l de TEMED

Gel concentrador (Superior)

2.87ml de agua destilada
0.87ml de Bis-Acrilamida 30:08
165.00µl de Tris 2M pH 6.8
25.00µl de SDS 10%
50.00µl de persulfato de amonio 10%
2.50µl de TEMED

1. Limpiar los cristales con SDS 10%, ensamblarlos y sellar los bordes con agarosa.
2. Agregar a la cámara $\frac{1}{4}$ partes de gel separador e inmediatamente después llenar con agua para aplanar la superficie de éste.
3. Una vez polimerizado el gel separador, remover el agua utilizando un papel absorbente. Agregar gel concentrador.
4. Colocar el peine inclinándolo para evitar burbujas y cuando el gel haya polimerizado, retirarlo de las esquinas primero. Limpiar los pozos con papel filtro para remover burbujas y residuos de acrilamida.
5. Montar los cristales en la cámara y llenar con amortiguador de corrida Tris-glicina.
6. Cargar las muestras e iniciar corriendo a 80v hasta que alcancen el gel separador, entonces correr a 200v.
7. Para teñir al gel, colocarlo en solución caliente de azul de Coomassie R-250 y dejar 30min con agitación.
8. Remover colorante y enjuagar al gel con agua corriente varias veces. Dejar destiñiendo con una esponja en solución de ácido acético al 10%.

Para el análisis de densitometría se empleó un transiluminador de luz visible, un procesador de imágenes (Stratagene, USA) y se realizó de la siguiente manera: Primero se determinó la absorbancia de todas las bandas en un carril del gel y por separado, la absorbancia de la banda de interés en el mismo carril. Se calculó el porcentaje de absorbancia que representa la banda de interés, con respecto a la de todas las bandas en conjunto.

Resultados

I. Aislamiento del Gene *udhA* por PCR.

Una vez que se obtuvo el producto *udhA* de 1.5kb amplificado por PCR, se ligó en el vector pCR-Blunt y con esta ligación se electrotransformó a la cepa MM294. Las células transformadas se platearon en cajas con medio Luria-agar+Km(30µg/ml). Después de 24hrs a 37°C aparecieron colonias, algunas de ellas se crecieron en medio Luria+Km(30µg/ml) y se purificó DNA de plásmido. Se verificó la orientación del inserto en la construcción pCR-Blunt+*udhA* digiriendo con *BamH* I (Fig. 8).

Se purificó de un gel de agarosa al 1% la banda de 1.5kb correspondiente a *udhA* y la banda del vector pTrc99A de 4.1kb, ambos digeridos con *Nco* I y *BamH* I (Fig. 9).

Se ligaron las bandas de *udhA* y el vector pTrc99A, con dicha ligación se electrotransformó la cepa XL1-Blue MRF'. Las células transformadas se platearon en cajas con medio Luria-agar+Ap(200µg/ml). Después de 24hrs a 37°C aparecieron colonias, algunas de ellas se crecieron en medio Luria+Ap(200µg/ml) y se purificó DNA de plásmido. El nuevo plásmido pTrc99A+*udhA* se analizó por digestión múltiple con enzimas de restricción para asegurarse que estuviera correcto y con la orientación esperada del inserto (Fig. 10)

Previo a la secuenciación de *udhA*, se analizó una vez mas por digestión múltiple el templado *udhA*(ptrc152-*BamH* I) de 1.6kb, amplificado por PCR del plásmido pTrc99A+*udhA*. El análisis indica que el inserto y su orientación son correctos (Fig. 11)

II. Determinación de la Secuencia Nucleotídica de la Región 5' de *udhA*.

Se utilizó el cebador ptrc152 para amplificar por PCR el templado a secuenciar del plásmido pTrc99A+*udhA*. Dicho cebador hibrida 20bp anteriores al promotor del vector pTrc99A. Con la lectura de las tres corridas fue posible determinar la secuencia de las primeras 145 bases que componen *udhA* (Fig. 12).

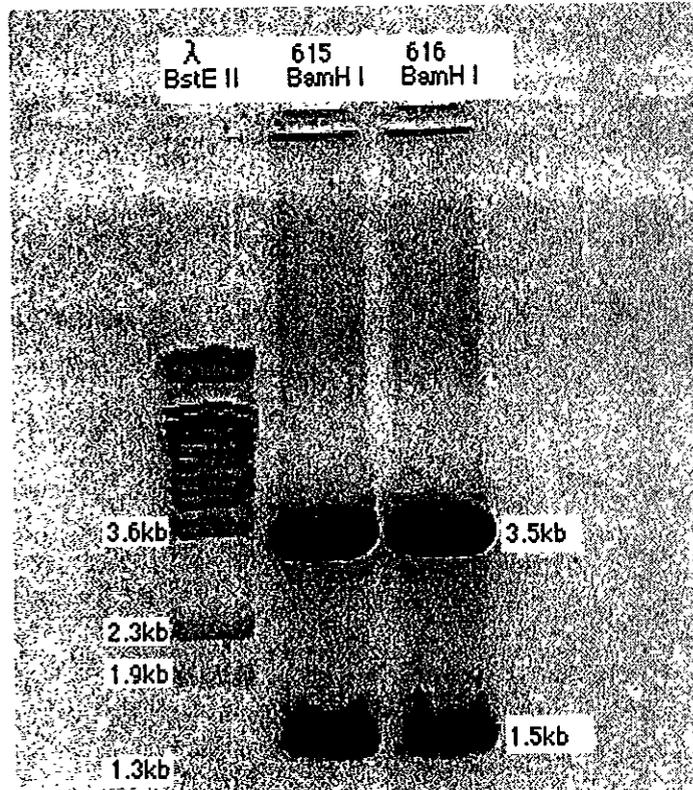


Figura 8. Análisis en gel de agarosa al 1% del tamaño del inserto (1.5kb) en el vector pCR-Blunt (3.5kb) y su orientación en dos clones (615 y 616).

| | | |
|---------|---------|--------|
| pTrc99A | λ | udhA |
| Nco I | BstE II | Nco I |
| BamH I | | BamH I |

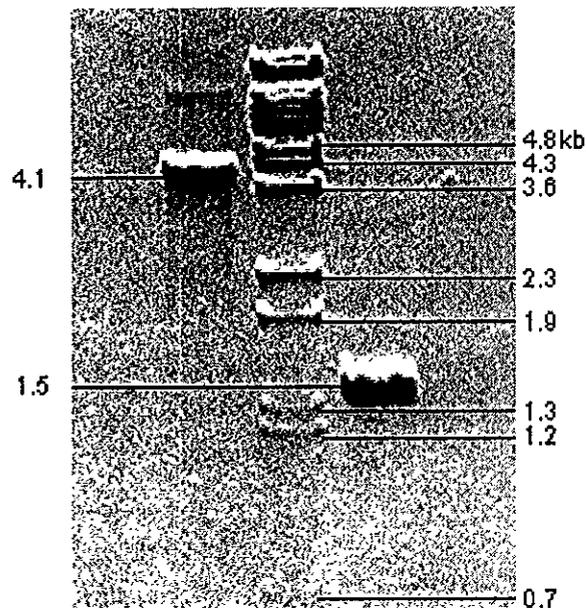


Figura 9. Bandas en gel de agarosa al 1% del gene udhA(1.5Kb) y el vector pTrc99A(4.1Kb) digendos con BamH I y Nco I.

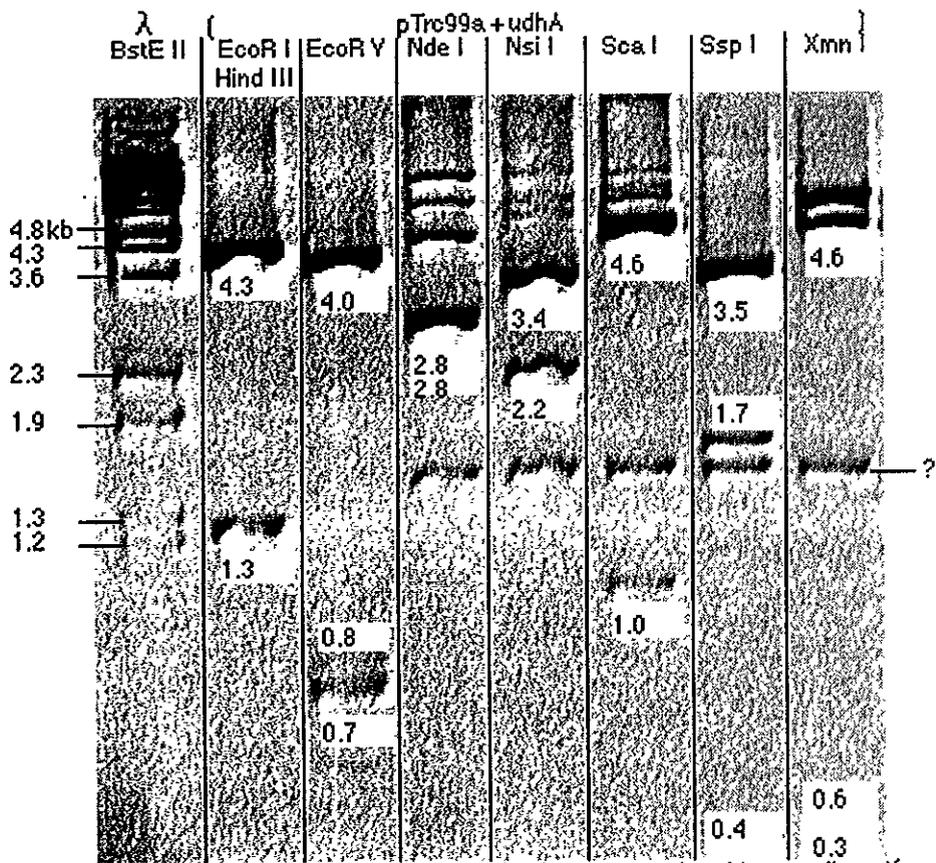


Figura 10. Análisis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos obtenidos por digestión múltiple del plásmido pTrc99A+udhA. (?) indica la presencia de un artefacto.

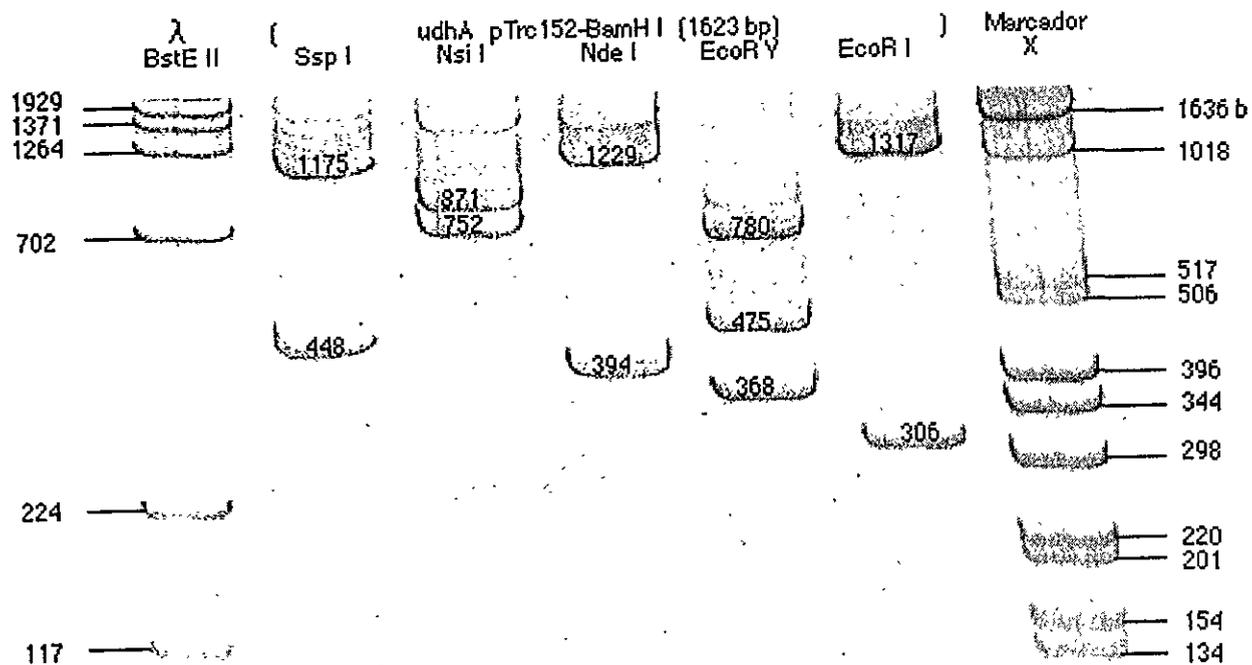


Figura 11. Análisis en gel de acrilamida al 7.5% de las bandas obtenidas por digestión múltiple del templado udhA (ptre152-BamH I) de 1.6kb.

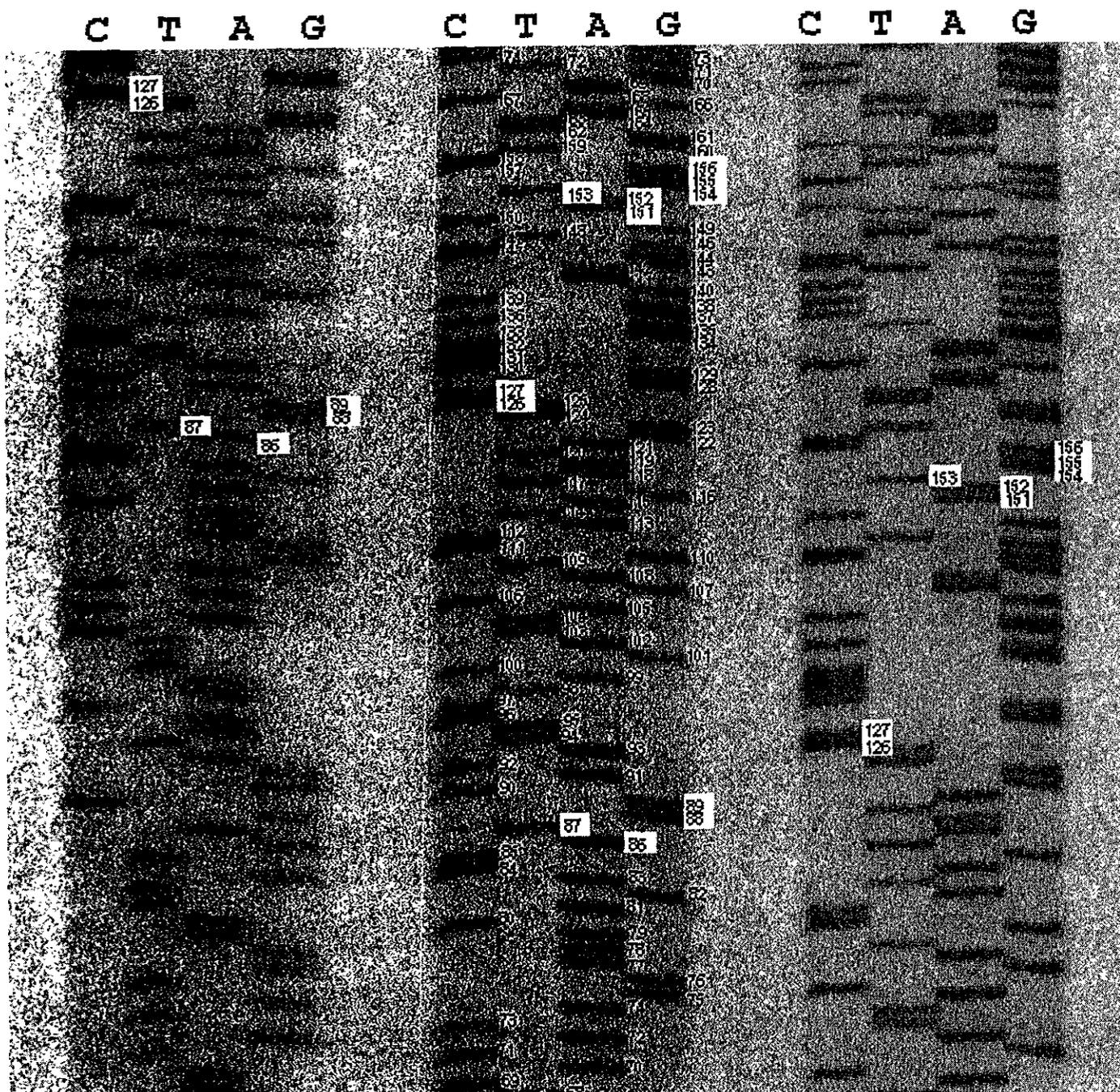


Figura 12. Las tres corridas en gel de secuencia muestran algunas bases del gene *udhA* numeradas.

III. Análisis de la Secuencia Nucleotídica de *udhA* y de la Proteína para la que Codifica.

Lo primero que detectamos al analizar detalladamente la secuencia nucleotídica de *udhA* fue un error en la secuencia reportada debido a la adición de una citosina en la posición 43 (6). Esta adición se localiza 25 bases anteriores del que era considerado el codón de inicio y 43 bases posteriores del inicio correcto localizado en la posición 1 (Fig. 13). Como consecuencia de esta adición, el inicio de la traducción fue propuesto 68 bases posteriores del correcto, excluyendo a 22 residuos muy importantes, de los cuales 15 forman parte del primer sitio de unión a nucleótidos en la proteína (Fig. 13).

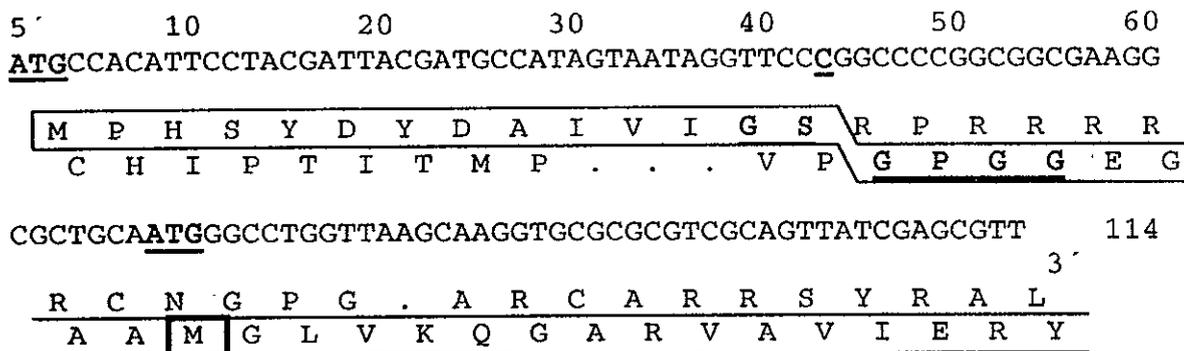


Figura 13. Secuencia nucleotídica incorrecta reportada para *udhA* (6). En la traducción de esta se indica en un cuadro al residuo de metionina propuesto como el inicio de la proteína, posterior a la secuencia GSGPGG de unión a grupos fosfato en el sitio que enlaza a nucleótidos. Ambos codones ATG, la adición que causa el corrimiento del marco de lectura y la secuencia de unión a grupos fosfato aparecen en negrita y subrayados.

La secuencia de las primeras 145 bases de *udhA* revela que en la posición 128 (Fig. 14), 43 bases posteriores del inicio de la traducción correcto localizado en la posición 86; en realidad existe una guanina precedida por dos citosinas solamente y no por tres, como fue reportado (6).

5' 10 20 30 40 50
 GAAATGAGCT GTTGACAATT AATCATCCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT
 GTGAGCGGAT AACAATTTCA CACAGGAAAC AGACCATGGC ACATTCCTAC 100
 GATTACGATG CCATAGTAAT AGGTTCCGGC CCCGGCGGCG AAGGCGCTGC 150
 AATGGCCTG GTTAAGCAAG GTGCGCGCGT CGCAGTTATC GAGCGTTATC 200
 AAAATGTTGG CGGCGGTTGC ACCCACTGGG 230
 3'

Figura 14. La secuencia obtenida del plásmido pTrc99A+udhA comprende 230 bases, de las cuales 85 abarcan la región del promotor en el vector y las primeras 145 del gene. Nótese a las regiones -35 y -10 del promotor trc, al codón de inicio y la guanina en la posición 128 en negrita y subrayados. Las bases correspondientes al vector se muestran encerradas.

La traducción para esta secuencia muestra que el primer sitio de unión a nucleótidos ya forma parte de la proteína completa (Fig. 15), aumentando así la similitud con otras flavoproteínas disulfuro-oxidoreductasas y especialmente con la transhidrogenasa soluble STH de *P. fluorescens*.

5' 10 20 30 40 50 60
 ATGCCACATTCCTACGATTACGATGCCATAGTAATAGGTTCCGGCCCCGGCGGCGAAGGC
 M P H S Y D Y D A I V I **G S G P G G** E G
 GCTGCAATGGGCCTGGTTAAGCAAGGTGCGCGCGTTCGAGTTATCGAGCGTTA 114
 A A M G L V K Q G A R V A V I E R Y

Figura 15. Secuencia nucleotídica y de la estructura primaria para la región amino-terminal de UDHA. Esta ya incluye 15 residuos esenciales (negrita) para poder formar por completo al primer sitio de unión a nucleótidos que además contiene la secuencia de unión a grupos fosfato subrayada.

IV. Localización y Análisis Detallado de *udhA* en el Cromosoma de *E. coli*.

udhA se compone en su secuencia codificante por 1,401 bases que representan un total de 467 codones, contiene al codón de inicio ATG y al codón de término TAA. Está localizado entre las bases 4,156,969 y 4,158,370 del cromosoma de la cepa MG1655 derivada de *E. coli* K12, a 89.6 centisomas (6). Forma parte del replicoro 1, es decir, la parte dividida por el origen y final de replicación que se sintetiza en dirección de las manecillas del reloj (7). Está flanqueado por dos genes en dirección

opuesta en la hebra complementaria (Fig. 16a): *oxyR*, con el que se sobrelapan 18 pares de bases en el extremo 3' de la región codificante para ambos (Fig. 16b) y *yijC(o234)*, con el que se encuentra separado por 277 pares de bases en la región 5' de ambos. *oxyR* codifica para una proteína reguladora que induce genes de defensa contra el stress oxidativo en respuesta a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (9). De *yijC(o234)* solo se sabe que junto con *o119*, codifican para una proteína hipotética de 26.6kDa en la región intergénica de *udhA* y *trmA*, que codifica para una metiltransferasa (6).

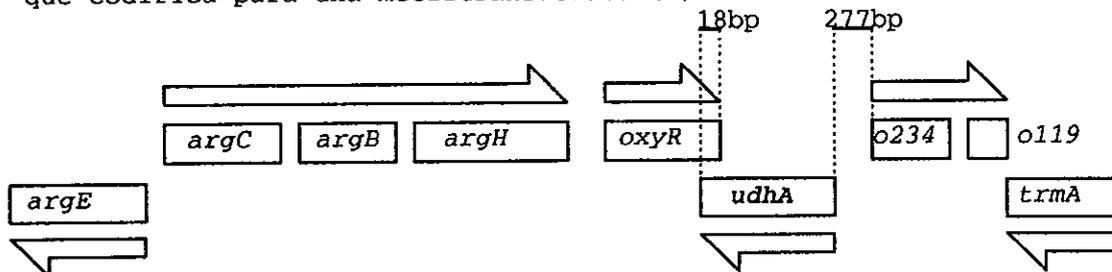


Figura 16a. Representación gráfica de la sección en el genoma de *E. coli* K12 que comprende a *udhA* y su posición con respecto a otros genes (6). La orientación de los genes y su transcripción están indicadas por flechas.

udhA 5'-AGCTGCGTTAAACGGTTTAAACCGCCTGTTTTAAAACTTTATCGAAATGG-3'
oxyR 3'-TCGACGCAATTTGCCAAATTTGGCGGACAAAATTTTGAATAGCTTTACC-5'

Figura 16b. Región del sobrelapamiento de 18bp (negritas) en el extremo 3' de los genes *udhA* y *oxyR*, indicada sobre la secuencia de DNA en *E. coli* K12. Ambos codones de término se encuentran subrayados.

Mediante un análisis con el programa EDITSEQ del paquete DNASTAR, se determinó que *udhA* presenta 51.82% en contenido de GC. Se calculó el índice de adaptación de codones (CAI) para *udhA* por el método de Sharp y Li (41) con un valor de 0.3928. La estadística para la composición de bases para *udhA* obtenida con el programa EDITSEQ de DNASTAR se muestran en la tabla I :

Tabla I. Análisis de la composición nucleotídica para la secuencia de *udhA* (6).

| | |
|-----------------------------|-------|
| Número total de bases=1,401 | |
| %A = 25.34 | = 355 |
| %G = 25.55 | = 358 |
| %T = 22.84 | = 320 |
| %C = 26.27 | = 368 |
| %A+T = 48.18 = 675 | |
| %C+G = 51.82 = 726 | |

codificante de *udhA*, a 1,102 bases del codón de inicio, con una longitud de 51 nucleótidos de los cuales 20 aparean (Fig. 18).

5'-GCAATGAAAGTGCCATATGAAGTGGGCCGCGCCAGTTTAAACATCTGCGA-3'

Figura 18. Secuencia de un primer posible terminador en la parte codificante de *udhA*. En negrita y subrayadas aparecen las bases que aparean.

El análisis estadístico de cien pares de bases anteriores a este posible terminador indica la siguiente composición: G (22%), A (31%), T (17%) y C (30%).

Otro más en la región 3', a 77 bases del codón de término, con una longitud de 51 nucleótidos de los cuales 14 muestran apareamiento (Fig. 19).

5'-CAGGACGATAAACCAGGCCAATAGTGCGGCGTGGTTCCGGCTTAATGCACG-3'

Figura 19. Secuencia de un segundo posible terminador en la región 3' de *udhA*. Las bases que aparean se muestran en negritas y subrayadas.

El análisis estadístico de cien pares de bases posteriores al codón de término indica la siguiente composición: G (29%), A (21%), T (21%) y C (29%).

VI. Análisis de la Estructura Primaria y Secundaria en la Proteína UDHA de *E. coli*.

UDHA es una proteína que se compone de 466 aminoácidos. La composición de residuos y algunos parámetros calculados para UDHA empleando el programa PROTEAN de DNASTAR se muestran en la tabla II.

Tabla II. Algunos parámetros importantes derivados del análisis en la composición de residuos de UDHA (6).

| Peso Molecular | | 51,567.00 Dalton | |
|--------------------------------|----------|-------------------------|------------------|
| 1µg | | 19.392 pMoles | |
| Coeficiente de extinción molar | | 39220 ⁺ / 5% | |
| Punto isoeléctrico | | 6.36 | |
| Carga a pH 7.0 | | -6.79 | |
| Aminoácidos | Cantidad | % por peso | % por frecuencia |
| Cargados (RKHYCDE) | 146 | 38.53 | 31.33 |
| Acidos (DE) | 53 | 12.59 | 11.37 |
| Básicos (KR) | 43 | 12.10 | 9.23 |
| Polares (NCQSTY) | 120 | 26.96 | 25.75 |
| Hidrofóbicos (AILEFWV) | 159 | 32.09 | 34.12 |
| A Ala | 40 | 5.52 | 8.58 |
| C Cys | 8 | 1.60 | 1.72 |
| D Asp | 25 | 5.58 | 5.36 |
| E Glu | 28 | 7.01 | 6.01 |
| F Phe | 15 | 4.28 | 3.22 |
| G Gly | 43 | 4.76 | 9.23 |
| H His | 21 | 5.59 | 4.51 |
| I Ile | 36 | 7.90 | 7.73 |
| K Lys | 17 | 4.23 | 3.65 |
| L Leu | 36 | 7.90 | 7.73 |
| M Met | 12 | 3.05 | 2.58 |
| N Asn | 21 | 4.65 | 4.51 |
| P Pro | 15 | 2.82 | 3.22 |
| Q Gln | 20 | 4.97 | 4.29 |
| R Arg | 26 | 7.88 | 5.58 |
| S Ser | 26 | 4.39 | 5.58 |
| T Thr | 24 | 4.71 | 5.15 |
| V Val | 30 | 5.77 | 6.44 |
| W Trp | 2 | 0.72 | 0.43 |
| Y Tyr | 21 | 6.65 | 4.51 |

UDHA presenta dos sitios de unión a nucleótidos que en su conjunto forman el pliegue Rossmann de unión a dinucleótidos. El primero de estos sitios inicia en el residuo 8 y finaliza en el residuo 55 de la región amino-terminal, está compuesto por 48 aminoácidos formando una estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta$ muy similar a la descrita por Fjellstrom, et. al. (14), presenta la secuencia G S G P G G de unión a fosfato (Fig. 20).

VII. Comparación de UDHA de *E. coli* con otras Disulfuro-oxidorreductasas.

Empleando los programas NETBLAST del paquete GCG y ψ BLAST (49) se comparó UDHA de *E. coli* contra las bases de datos GENBANK, SWISSPROT y OWL para encontrar las proteínas mas semejantes a esta y establecer la relación que guardan entre sí. Posteriormente, utilizando el programa GAP de GCG se determinó la similitud e identidad que guarda UDHA de *E. coli* con las quince proteínas mas semejantes obtenidas (Tabla III).

Tabla III. Semejanzas existentes a nivel de estructura primaria entre UDHA de *E. coli* y las quince proteínas mas parecidas a ésta, obtenidas de las tres distintas bases de datos analizadas.

| Proteína especie | % SIMILITUD | % IDENTIDAD |
|--|-------------|-------------|
| 1. Deshidrogenasa desconocida <i>Erwinia carotovora</i> (parcial 149aa) | 98.0 | 94.0 |
| 2. Deshidrogenasa desconocida <i>Vibrio Cholerae</i> (parcial 46aa) | 95.6 | 93.4 |
| 3. Transhidrogenasa soluble <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 69.6 | 59.6 |
| 4. Deshidrogenasa desconocida <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 54.4 | 43.1 |
| 5. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Clostridium magnum</i> | 43.0 | 30.6 |
| 6. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Aquifex aeolicus</i> | 42.1 | 30.9 |
| 7. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Pseudomonas putida</i> | 41.3 | 33.0 |
| 8. Reductasa mercúrica <i>Bacillus cereus</i> | 40.9 | 30.4 |
| 9. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Tripanosoma Brucei Brucei</i> | 39.8 | 30.5 |
| 10. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Pisum sativum</i> | 39.3 | 28.5 |
| 11. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Haemophilus influenzae</i> | 39.0 | 27.3 |
| 12. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Tripanosoma cruzi</i> | 38.9 | 29.2 |
| 13. Dihidrolipoamida deshidrogenasa <i>Bacillus subtilis</i> | 38.8 | 29.3 |
| 14. Reductasa de lehegmoglobina férrica <i>Glycine max</i> | 38.7 | 27.9 |
| 15. Glutación reductasa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 38.5 | 28.9 |

Después de encontrarse una mayor semejanza consigo misma (UDHA incompleta), se observa que la similitud e identidad mas altas corresponden a dos fragmentos en la región carboxilo-terminal de dos deshidrogenasas desconocidas e incompletas, pertenecientes a *E. carotovora*, 149 residuos con similitud de 98% e identidad de 94% y de *V. cholerae*, 46 residuos con similitud de 95.6% e identidad de 93.4%. La proteína completa que mostró la similitud e identidad mas altas de 69.6% y 59.6% respectivamente, fué la transhidrogenasa soluble STH de *P. fluorescens*. En segundo lugar se encuentra una deshidrogenasa desconocida

(UDHA) completa de *M. tuberculosis* con una similitud de 54.4% e identidad de 43.1% (Tabla III).

En el alineamiento múltiple (Fig. 22) se observa que todas estas proteínas presentan dos sitios de unión a nucleótidos que forman el pliegue Rossmann, uno en la región amino-terminal y otro en la parte central. Entre la distintas proteínas existe substitución de residuos en dichos sitios, aún así todas cumplen con los criterios propuestos por Fjellstrom, et. al. (14) para poder formar una estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta\beta$ en la región amino-terminal y algunas cumplen con los criterios de Wierenga, et. al. (48) para formar la estructura núcleo $\beta\alpha\beta$ en la parte central. Se observa que en estas proteínas la secuencia consenso GXGXXG de unión a grupos fosfato se encuentra dos veces presente.

De los dos residuos de cisteína altamente conservados en esta familia, el primero se encuentra en la totalidad de las proteínas analizadas. El segundo, que está localizado cinco residuos posteriores al primero, experimenta la misma substitución por treonina solo en UDHA de *E. coli*, en STH de *P. fluorescens* y en UDHA(Rv2713) de *M. tuberculosis* (Fig. 22)

| | | | | | | |
|---------------|------------|-----------|------------|------------|------------|----|
| | 1 | | | | | 50 |
| Ecarotovora | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Vcholerae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Ecoli | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Pfluorescens | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Mtuberculosis | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Paeruginosa | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Bcereus | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~MKKYRVDVQ | GMTCTGCEEH | |
| Bsubtilis | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Cmagnum | MAKIVVMPKL | GLTMTEGLV | TWKKAEGDQV | KVGEILFEVS | TDKLTNEVES | |
| Gmax | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Psativum | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| TBrucei | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Tcruzi | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Pputida | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Hinfluenzae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Aeolicus | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |

| | | | | | | |
|---------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 51 | | | | | 100 |
| Ecarotovora | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Vcholerae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Ecoli | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Pfluorescens | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Mtuberculosis | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Paeruginosa | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Bcereus | VVALENMGA | TGIEVDFRRG | EAVFELPNAL | GVETAKKAIS | DAKYQPGKAE | |
| Bsubtilis | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Cmagnum | SDEGIVRKL | VNEGDDVECL | NPVAIIGSAD | EDISSLLNGS | SEGSQSAEQS | |
| Gmax | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~MA | MANLARRKGY | AVVLSRSSSL |
| Psativum | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~MA | MANLARRKGY | SLLSSETLRY |
| TBrucei | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Tcruzi | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Pputida | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Hinfluenzae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Aeolicus | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |

| | | | | | | | | | | |
|---------------|-------|------------------|---------|-------|----------------|----------|--------|---------|-------|-----|
| | 101 | | β | GX | GYXG | α | | β | | 150 |
| Ecarotovora | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Vcholerae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Ecoli | ~~~~~ | MPHSYDY | DAIVI | GS | GPGGEGAAMGLVKQ | GA | RVAVIE | RYQ | .N | |
| Pfluorescens | ~~~~~ | MAVNY | DVVVL | GS | GPAGEGAAMNAAKA | GR | KVAVVD | SRR | .Q | |
| Mtuberculosis | ~~~~~ | MREY | DIVVI | GS | GPGGQKAAIASAKL | GK | SVAIVE | RGR | .M | |
| Paeruginosa | ~~~~~ | MSPDF | DLFVI | GA | GSGGVRAARFAAGF | GA | RVAVAE | .S | RY | |
| Bcereus | ~~~~~ | EVQSQEMVQLGNEGDY | DYIII | GS | GGAAFSSAIEAVKY | GA | KVAVIE | .R | GT | |
| Bsubtilis | ~~~~~ | M | TLAII | GG | GPAGYAAAVSAAQQ | GR | NVLLID | K. | GK | |
| Cmagnum | ~~~~~ | DTKAPKKEVEAVKGGD | NLVVI | GG | GPGGYVAAIRAAQL | GA | KVTLIE | K. | ES | |
| Gmax | ~~~~~ | CLT.RWRGFASGSDEN | DVVVI | GG | GPGGYVAAIKAAQL | GL | KTTTIE | KR | GT | |
| Psativum | ~~~~~ | SFSLRSRAFASGSDEN | DVVVI | GG | GPGGYVAAIKAAQL | GF | KTTTIE | KR | GA | |
| TBrucei | ~~~~~ | MFRRCFPIFNPY | DVVVV | GG | GPGGYVAAIKAAQL | GL | KTACVE | KR | GA | |
| Tcruzi | ~~~~~ | MFRRCAVKLNPY | DVVVI | GG | GPGGYVASIKAAQL | GM | KTACVE | KR | GA | |
| Pputida | ~~~~~ | MKSY | DVVII | GG | GPGGYNAAIRAGQL | GL | TVACVE | GR | ST | |
| Hinfluenzae | ~~~~~ | MSKEIKT | QVVVL | GA | GPAGYSAAFRCADL | GL | ETVIVE | RY | ST | |
| Aeolicus | ~~~~~ | MEF | DLIIV | GA | GSGGYEAGLYAFRR | GM | KVAFVE | SP | ET | |

| | | | | | | | |
|---------------|----------|----------|-------|---------------------------|-----------------------|----------|-----|
| | 151 | α | C | C | β | | 200 |
| Ecarotovora | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Vcholerae | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | ~~~~~ | |
| Ecoli | VGGGCTHW | GT | IPSKA | LRHAVSRIIEFNQNP | .YSDHSRLL | RSSFADIL | |
| Pfluorescens | VGGNCTHI | GT | IPSKA | LRHSVRQIMQFNTNPM | .FRAIGEPR | WFSFPDVL | |
| Mtuberculosis | LGGVCVNI | GT | IPSKT | LREAVLYLTGMNQREL | .YGASYRVKDRITPADLL | | |
| Paeruginosa | LGGTVCNV | GC | VPKKI | LVYGAHFSDFEQARAYGWSAGEA | .QFDWATLI | | |
| Bcereus | IGGTVCNI | GC | VPSKT | LLRAGEINHLAKNNPFVGLHTSAG | .EVDLAPLI | | |
| Bsubtilis | LGGTCLNF | GC | IPTKS | LLESANVLDKIKHADSFGIELPAGA | .ISVDWSKMQ | | |
| Cmagnum | LGGTCLNV | GC | IPTKV | LLHSSQLLTEMKEGDKLGIDI | .EGS.IVVNWKHIQ | | |
| Gmax | LGGTCLNV | GC | IPSKA | LLHSSHMYHEAKHA | .FANHGVK.FSSVEVALPAMM | | |
| Psativum | LGGTCLNV | GC | IPSKA | LLHSSHMYHEAKHS | .FANHGVK.VSNVEIDLAMM | | |
| TBrucei | LGGTCLNV | GC | IPSKA | LLHATHMYHDAHAN | .FERYGLMGGAGVTMDVAKMQ | | |
| Tcruzi | LGGTCLNV | GC | IPSKA | LLHATHVYHDAHAN | .FARYGLMGGEGVTMDSAKMQ | | |
| Pputida | LGGTCLNV | GC | MPSKA | LLHASELYEAASGDEFAHLGIE | .VKPTLNLAQMM | | |
| Hinfluenzae | LGGVCLNV | GC | IPSKA | LLHVAKVIEEAKH | .ANKNGIYFSEPRIELDEV | | |
| Aeolicus | VGGNCLNF | GC | IPSKY | MRHGAYLLDKFQKMEQYGI | .ISKGYDIEYKCLK | | |

| | | | | | | | |
|-----|---------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| 401 | Ecarotovora | ----- | ----- | ----- | ----- | ~SLASAAVDQ | 450 |
| | Vcholerae | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| | Ecoli | SLALQNIQLE | TDSRGQLKVN | SMYQTAQPHV | YAVGDVIGY. | PSLASAAVDQ | |
| | Pfluorescens | KLGMENIGVK | VNSRGQIEVD | ENYRVCVTNI | YGAGDVIGW. | PSLASAAHDQ | |
| | Mtuberculosis | HLDLHNAQLE | VQGRGRIFVD | DRFQTKVDHI | YAVGDVIGF. | PALAATSMEQ | |
| | Paeruginosa | DLGLENTAVK | LTDKGFIAVD | EHYQTSEPSI | LALGDVIGRV | QLTPVALAEG | |
| | Bcereus | TLNLRAAGVE | IGSRGEIID | DYSRTTNTRI | YAAGDVTLGP | QFVYVAAVQG | |
| | Bsubtilis | GLQLEQAGVD | FSPKG.IPVN | GHMQTNVPHI | YACGDAIG.G | IQLAAHAFHE | |
| | Cmagnum | GLDVEKIGVK | TEGGS.IIVN | DKMETNVEGI | YAIGDCTG.K | IMLAHVASDQ | |
| | Gmax | GLNLDKIGVE | TDKLGRIQVN | ERFSTNVSGV | YAIGDVI.PG | PMLAHKAEED | |
| | Psativum | GLNLDKIGVE | TDKLGRIQVN | ERFSTNVSGV | YAIGDVI.PG | PMLAHKAEED | |
| | TBrucei | GLGLEKNNVS | LNERGFVKIG | SHFETNVAGV | YAIGDVVDKG | PMLAHKAEDE | |
| | Tcruzi | GLGLDKINVA | KNERGFVKIG | DHPETSIPDV | YAIGDVVDKG | PMLAHKAEDE | |
| | Pputida | GLNLESVLE | TDKRG.MLAQ | RTPPTSVPGV | WVIGDVTS.G | PMLAHKAEDE | |
| | Hinfluenzae | LIQAGKAGVE | VDRGFQIHVD | QMRNTNVPHI | YAIGDIVGQ. | PMLAHKGVHE | |
| | Aaeolicus | GIGLEELGIE | MDERGFVKTN | EYAQTNPINI | YACGDITSP. | LMLAHKSMYE | |
| 451 | Ecarotovora | GRLLAAQAIK | GDASAHLIED | IPTGIYTIPE | ISSVGKTEQE | LTAMKVPYEV | 500 |
| | Vcholerae | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| | Ecoli | GRILAAQALVK | GEATAHLIED | IPTGIYTIPE | ISSVGKTEQQ | LTAMKVPYEV | |
| | Pfluorescens | GRSAAGSIV. | DNGSWRYVND | VPTGIYTIPE | ISSIGKNEHE | LTAKKVPYEV | |
| | Mtuberculosis | GRLLAAYHAF. | GEPTDGITEL | QPIGIIYSIPE | VSYVGATEVE | LTSSSIPYEV | |
| | Paeruginosa | MAVARRLEFKP | EYRYPVDYKL | IPTAVFSLPN | IGTVGLTEEE | ALSAGHKVKI | |
| | Bcereus | GVAAAPNAIGG | LN.KKLNLEV | VPGVTFPTAPA | IATVGLTEEQ | AKENGYEVKT | |
| | Bsubtilis | GIIAASHASG | .RDVKINEKH | VPRCIYTSPE | IACIGMTERQ | ARSIYGDVVKI | |
| | Cmagnum | GVVAENIMG | .QNKMDYKT | VPACVYTKPE | LASVGLTEEQ | AKEKGDYKV | |
| | Gmax | GVACVEYLTG | .KVGHVVDYK | VPGVVYTNPE | VASVGKTEEQ | VKETGVEYRV | |
| | Psativum | GVACVEYLAG | .KVGHVVDYK | VPGVVYTNPE | VASVGKTEEQ | VKETGVEYRV | |
| | TBrucei | GVACAEILAG | .RPGHVNYDV | IPGVIYTMPE | VASVGKTEEE | LKKAGVAYKV | |
| | Tcruzi | GVACAEILAG | .KPGHVNYGV | IPAVIYTMPE | VASVGKSEEE | LKKEGVAYKV | |
| | Pputida | AVACTERIAQ | .KPHEVNYNL | IPGVIYTRPE | LATVGKTEEQ | LKAEGRAYKV | |
| | Hinfluenzae | GHVAAEVJAG | .QKHVFDPKV | IPSLAYTEPE | VAVVGKTEKE | CKQEGLNYEV | |
| | Aaeolicus | GKIAVSHILG | ERDWKKNERI | IPKIIYSALE | VASVGLTEEQ | AEDEDIEVRV | |
| 501 | Ecarotovora | GRAQFKHLAR | AQIVGMNVGS | LKILFHRETQ | QILGIHCFGE | RAAEIIHIGQ | 550 |
| | Vcholerae | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| | Ecoli | GRAQFKHLAR | AQIVGMNVGT | LKILFHRETQ | EILGIHCFGE | RAAEIIHIGQ | |
| | Pfluorescens | GKAFFKSMAR | AQIAGEPQGM | LKILFHRETL | EVLGVHCFGY | QASEIVHIGQ | |
| | Mtuberculosis | GVARYRELAR | QQIAGDSYGM | LKLLVSTEDL | KLLGVHIFGT | SATEMVIHIGQ | |
| | Paeruginosa | FESRFRPMKL | TLTDDQEKTL | MKLVVDAHDD | RVLGCHMVGA | EAGEILQGIA | |
| | Bcereus | SVLPLDAVPR | ALVNRETTGV | FKLVADSKTM | KVLGAHVVAE | NAGDVIYAAT | |
| | Bsubtilis | GEFSSFANGK | ALIKQQAEGK | VKIMAEPEPG | EIVGVSIMIGP | DVTELIQQA | |
| | Cmagnum | GKFLAANGK | SLIMNETGGV | IKIITDKKYE | EILGVHILGP | RATDLITFAA | |
| | Gmax | GKFPFLANSR | AKAIDNAEGL | VKIIAEKETD | KILGVHIMAP | NAGELIHEAA | |
| | Psativum | GKFPFMANSR | AKAIDNAEGL | VKIIAEKETD | KILGVHIMAP | NAGELIHEAA | |
| | TBrucei | GKFPFNANSR | AKAVATEDGF | VKVLTDKATD | RILGVHIVCS | AAGELIAGAL | |
| | Tcruzi | GKFPFNANSR | AKAVSTEDGF | VKVLVDKATD | RILGVHIVCT | TAGELIGEAC | |
| | Pputida | GKFPFTANSR | AKINHETEGF | AKVIADAETD | EVLGVHLVGP | SVSEMIGEFC | |
| | Hinfluenzae | AKFPWAASGR | AIASECSEGM | TKLIFDKDTH | RVLGGAIVGS | NGGELLGEIG | |
| | Aaeolicus | GVASFVSNPK | AMDDGENEGF | VRIVADDETQ | EILGCHIVGP | HAGELIHQVV | |
| 551 | Ecarotovora | AIMEQKGEEN | TIEYFVNTTF | NYPTMAEAYR | VAALNGLNRL | F~~~~~ | 600 |
| | Vcholerae | AIMEQKGEAN | TIEYFVNTTF | NYPTMAEAFR | VAALNGLNRL | F~~~~~ | |
| | Ecoli | AIMEQKGGGN | TIEYFVNTTF | NYPTMAEAYR | VAALNGLNRL | F~~~~~ | |
| | Pfluorescens | AIMNQPGEQN | TLKYFVNTTF | NYPTMAEAYR | VAAVDGLNRL | F~~~~~ | |
| | Mtuberculosis | AVM...GCGG | SVEYLVDAVF | NYPTFSEAYK | NAALDVMNKM | RALNQFRR~ | |
| | Paeruginosa | VAMKA...GA | TQOAFDETIG | IHPTAAEEFV | TLRTPTR | ~~~~~ | |
| | Bcereus | LAVKF...GL | TVDDIRETLA | PYLTMAEGLK | LAALTFDKDI | SKLSCCAG~ | |
| | Bsubtilis | ATMNG...EM | TADMAEHFIA | AHPTLSETLH | EALSTIGLA | VHA~~~~~ | |
| | Cmagnum | LALRL...EA | TLEEIITTVH | AHPTVGEAMK | EALAVNNQA | IHMNKK~ | |
| | Gmax | IALQY...DA | SSEDIARVCH | AHPTMSEAVK | EAAMATYDKP | HSHLKSLLLL | |
| | Psativum | IALQY...DA | SSEDIARVCH | AHPTMSEAIK | EAAMATYDKP | HSHLKSLLLL | |
| | TBrucei | LAMEY...GA | SSEDVGRVCH | AHPTMSEAVK | EACMACFAKT | INF~~~~~ | |
| | Tcruzi | LAMEY...GA | SSEDVGRVCH | AHPTMSEALK | EACMALVAKT | INF~~~~~ | |
| | Pputida | VAMEF...SA | SAEDIALTCH | PHPTRSEALR | QAAMNVDGMA | MQI~~~~~ | |
| | Hinfluenzae | LATEM...GC | DAEDIALTH | AHPTLHESVG | LAAEVFEGSI | TDLPNAKAKE | |
| | Aaeolicus | HMIKD...GK | TVEFASKTMY | SHPSLSENIQ | IASSEVYYGP | ISWVKRR~ | |

| 601 | 621 |
|---------------|-------------------------|
| Ecarotovora | ----- |
| Vcholerae | ----- |
| Ecoli | ----- |
| Pfluorescens | ----- |
| Mtuberculosis | ----- |
| Paeruginosa | ----- |
| Bcereus | ----- |
| Bsubtilis | ----- |
| Cmagnum | ----- |
| Gmax | SSLVFIFVQE FTMTWR~~~~ |
| Psativum | SSLVFIFVQG FTLTWRRYFV C |
| TBrucei | ----- |
| Tcruzi | ----- |
| Pputida | ----- |
| Hinfluenzae | KIISI----- |
| Aaeolicus | ----- |

Alineamiento múltiple de la estructura primaria de quince disulfuro-oxidorreductasas que presentan la mayor semejanza con UDHA (PILEUP de GCG). Los residuos que forman la estructura supersecundaria $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ del primer sitio de unión a nucleótidos y la región núcleo $\beta\alpha\beta$ del segundo se muestran en cajas. La secuencia consenso **G**X**G**X**X**G**** de unión a grupos fosfato, al igual que las cisteínas del enlace disulfuro activo-reductor en la región amino-terminal, aparecen en negritas. La cajas indicadas Fj y Wi señalan que en el segundo sitio de unión a nucleótidos, algunas proteínas cumplen con ambos criterios para formar la segunda conformación β de acuerdo con Fjellstrom, et. al. (14) y Wierenga, et. al. (48) respectivamente.

Una vez generado un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW, se utilizó el programa PROTPARS de PHYLIP que emplea el método de parsimonia en secuencia de proteínas para elaborar un dendrograma (Fig. 23). La prueba estadística "bootstrap" de remuestreo realizada a cien grupos con el programa SEQBOOT de PHYLIP, indica que UDHA de *E. coli* y STH de *P. fluorescens*, al igual que la deshidrogenasa desconocida UDHA(Rv2713) de *M. tuberculosis*; se agrupan en una misma subfamilia (Fig. 23), en este caso de las transhidrogenasas solubles. El resto de las proteínas se encuentran agrupadas en otras subfamilias distintas, en su mayoría dihidrolipoamida deshidrogenasas.

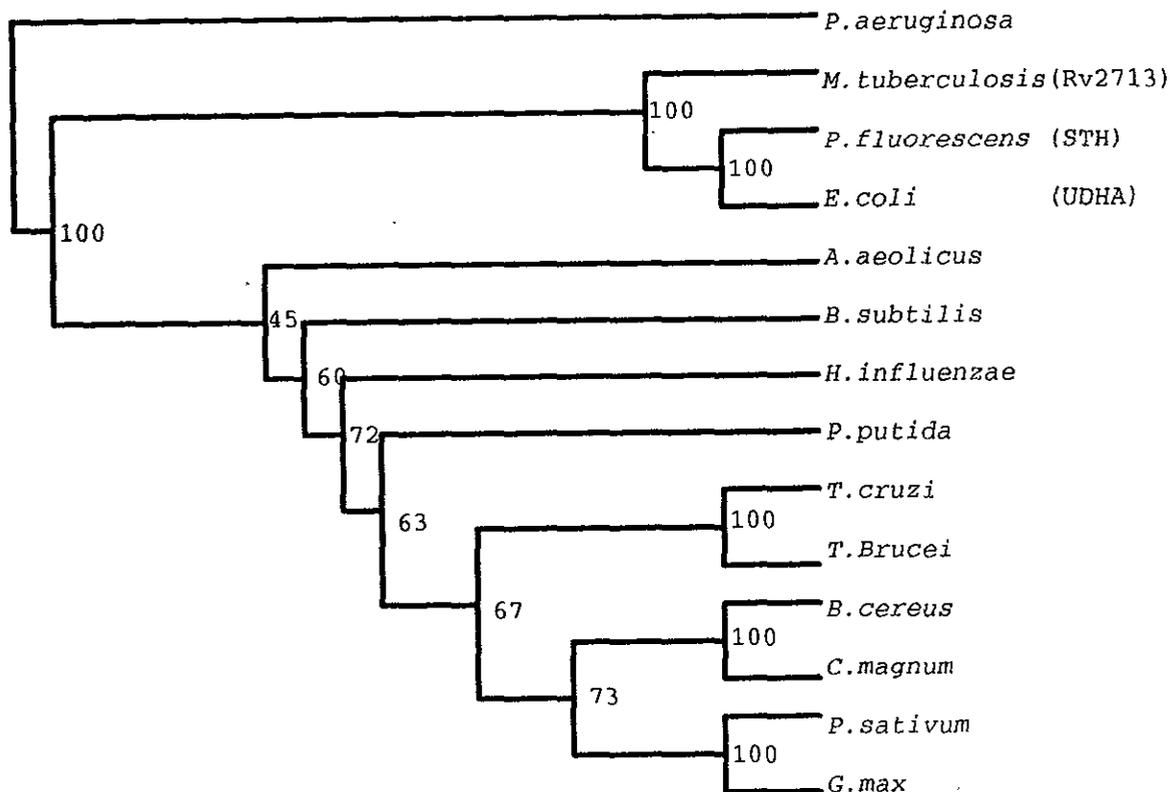


Figura 23. Dendrograma indicando la relación existente entre las catorce distintas oxidorreductasas completas, analizadas y comparadas en su estructura primaria. Los valores indican la frecuencia con la que se asocian estas proteínas analizadas en conjunto cien veces.

VIII. Determinación de Actividad para la Transhidrogenasa Soluble UDHA de *E. coli*.

Se realizaron dos experimentos independientes para determinar actividad de transhidrogenasa soluble en extractos de *E. coli* transformada con los plásmidos pTrc99A+udhA y pTrc99A solo (testigo) inducidas con IPTG.

En el primer experimento se trabajó con extracto de *E. coli* almacenado a 4°C/24hrs. Los resultados obtenidos variando las distintas especies se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Actividad enzimática de UDHA 24hrs posteriores a su extracción.

| Extracto (μl) | tNAD 10mM (μl) | NADPH 10mM (μl) | OD/s | OD/min | mol/min | *U/mg |
|---------------|----------------|-----------------|----------|--------|------------|-------------------------|
| 1 UDHA | 10 | 10 | 0.000155 | 0.0093 | 8.2276E-09 | 0.12280025 |
| 5 UDHA | 50 | 50 | 0.001632 | 0.0979 | 8.6629E-08 | 0.25859357 ¹ |
| 10 UDHA | 50 | 50 | 0.002267 | 0.1360 | 1.2036E-08 | 0.17963923 |
| 10 UDHA | 0 | 10 | 0.000161 | 0.0096 | 8.5461E-10 | 0.01275538 ² |
| 0.1 UDHA | 10 | 10 | 0.000198 | 0.0118 | 1.0525E-09 | 0.01570938 |
| 10 UDHA | 10 | 10 | 0.001591 | 0.0954 | 8.4453E-09 | 0.12604852 |
| 5 UDHA | 10 | 10 | 0.001080 | 0.0648 | 5.7328E-09 | 0.17112810 |
| 10 UDHA | 10 | 10 | 0.001804 | 0.1082 | 9.5759E-09 | 0.14292365 |
| 10 pTrc | 10 | 10 | 0.000145 | 0.0087 | 7.7000E-10 | 0.01148777 |
| 10 UDHA | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Negritas = Testigo

* 1 unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de actividad que reduce 1μmol de tNAD⁺ por minuto bajo las condiciones experimentales descritas.

Concentración de proteína = 6.7 mg/ml

¹Actividad enzimática experimental mas alta = 0.25859357 U/mg

²Actividad de testigo mas alta = 0.01275538 U/mg

Actividad enzimática total = 0.24583819 U/mg

En el segundo experimento se trabajó con extracto fresco de *E. coli*. Los resultados obtenidos variando las distintas especies se muestran en la tabla V.

Tabla V. Actividad enzimática de UDHA al momento de su extracción.

| Extracto (µl) | tNAD 10mM (µl) | NADPH 10mM (µl) | OD/s | OD/min | mol/min | *U/mg |
|---------------|----------------|-----------------|----------|--------|------------|-------------------------|
| 10 UDHA | 100 | 100 | 0.013280 | 0.7968 | 7.0500E-08 | 1.00702999 |
| 5 UDHA | 100 | 100 | 0.014490 | 0.8694 | 7.6900E-08 | 2.19756996 ¹ |
| 10 UDHA | 50 | 50 | 0.011305 | 0.6783 | 6.0000E-08 | 0.85726461 |
| 10 pTrc | 50 | 50 | 0.000595 | 0.0357 | 3.1600E-09 | 0.04511919 ² |
| 5 UDHA | 50 | 50 | 0.008040 | 0.4842 | 4.2700E-08 | 1.21935559 |
| 5 UDHA | 50 | 50 | 0.006405 | 0.3843 | 3.4000E-08 | 0.97138962 |
| 5 UDHA | 50 | 50 | 0.110900 | 0.6654 | 5.8867E-08 | 1.68192207 |
| 5 pTrc | 50 | 50 | 0.000150 | 0.0090 | 7.9600E-10 | 0.02274917 |
| 1 UDHA | 50 | 50 | 0.002680 | 0.1608 | 1.4200E-08 | 2.03225931 |
| 5 UDHA | 50 | 0 | 5.60E-05 | 0.0033 | 2.9700E-10 | 0.00849302 |
| 5 UDHA | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Negritas = Testigo

* 1 unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de actividad que reduce 1µmol de tNAD' por minuto bajo las condiciones experimentales descritas.

Concentración de proteína = 7.0 mg/ml

¹Actividad enzimática experimental mas alta = 2.19756996 U/mg

²Actividad de testigo mas alta = 0.04511919 U/mg

Actividad enzimática total = 2.15245077 U/mg

IX. Determinación de la Concentración de Proteína Recombinante UDHA para *E. coli* Transformada con el plásmido pTrc99A+udhA e Inducida con IPTG.

En los dos experimentos realizados para la detección de actividad enzimática en UDHA, se contó con diferentes pero muy similares concentraciones de proteína soluble calculadas por el método de Bradford (8). En el primero se determinó una concentración de 6.7mg/ml y en el segundo de 7.0mg/ml.

De acuerdo a los cálculos por densitometría realizados al gel de proteínas con sonicados provenientes de la cepa experimental y testigo, inducidas con IPTG en el segundo experimento (Tabla V), se observa que la banda densa localizada entre los marcadores de 45kDa y 66kDa (Fig. 24) parece ser UDHA de 51.5kDa. Esta banda representa aproximadamente el 2% de la concentración total de proteína en la célula (Tabla VI).

Tabla VI. Concentración de UDHA recombinante, determinada por la comparación entre la absorbancia de las bandas de distintas proteínas.

| | Testigo W3110/pTrc99A inducida con IPTG | Experimental W3110/pTrc99A+udhA inducida con IPTG |
|--|---|---|
| Absorbancia para todas las bandas (Total de proteínas) | 437,266 | 479,042 |
| Absorbancia para posible banda UDHA | 27,208 | 39,020 |
| Densitometría (%) | 6.2 | 8.1 |
| Concentración de UDHA (%) | $8.1 - 6.2 = 1.9$ | |

W3110
pTrc99A
Testigo

W3110
pTrc99A+udhA

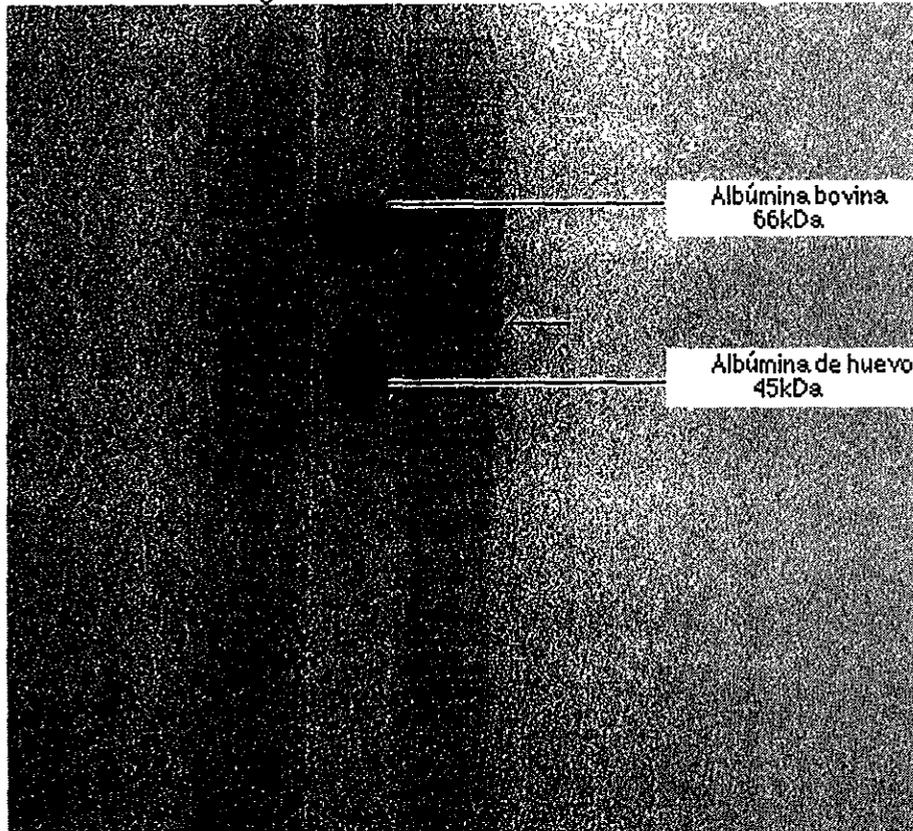


Figura 24. Análisis en gel para proteínas donde aparece una banda con un peso molecular de aproximadamente 51.5kDa (flecha) proveniente de la cepa transformada con el plásmido pTrc99A+udhA e inducida con IPTG.

Discusión

Con la amplificación y secuenciación en la región 5' del gene *udhA*, fue posible determinar la composición correcta de las 145 primeras 1,401 bases que lo componen (Fig. 12 y 14), así como el marco de lectura indicado en la región amino-terminal (Fig. 15) para su producto proteínico de 466 aminoácidos, que resultó tener actividad de transhidrogenasa soluble.

En el cromosoma de *E. coli*, *udhA* no parece guardar relación alguna con los genes adyacentes (Fig. 16a), salvo un sobrelapamiento de 18bp con *oxyR* (Fig. 16b), por lo que parece no formar parte de algún operón evidente. Aún no se han determinado las condiciones naturales bajo las que este gene se expresa *in vivo*. Además, la naturaleza en el metabolismo de esta bacteria requiere la actividad de la transhidrogenasa dependiente de energía. A la fecha no había sido reportado un organismo que presente ambos tipos de transhidrogenasas codificadas en su genoma, como ocurre en *E. coli*.

El contenido de GC en la composición de *udhA* es de 51.82%. Este valor se aproxima al contenido promedio de 50.8% que presentan los genes de *E. coli* (7,30). El índice de adaptación de codones (CAI) calculado para *udhA* de 0.3928, sitúa a este gene con una tasa de expresión entre un nivel medio y alto, dicho valor se encuentra en el rango que presentan una gran cantidad de genes en *E. coli* (Fig. 25a y 25b).

Número
de
genes

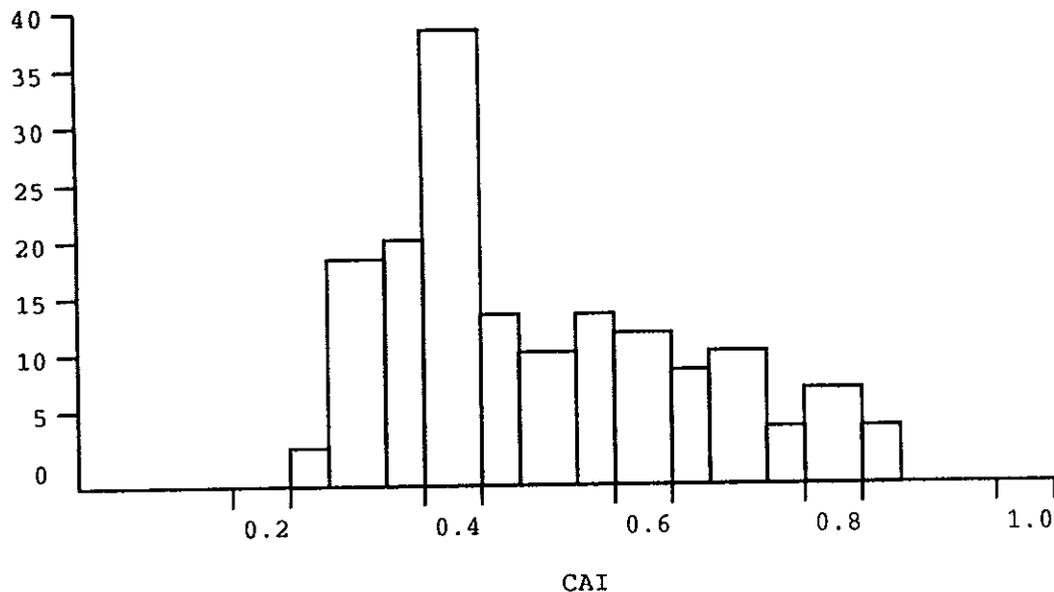


Figura 25a. Distribución de los valores del índice de adaptación de codones (CAI) calculado para 165 genes de *E. coli* (41).

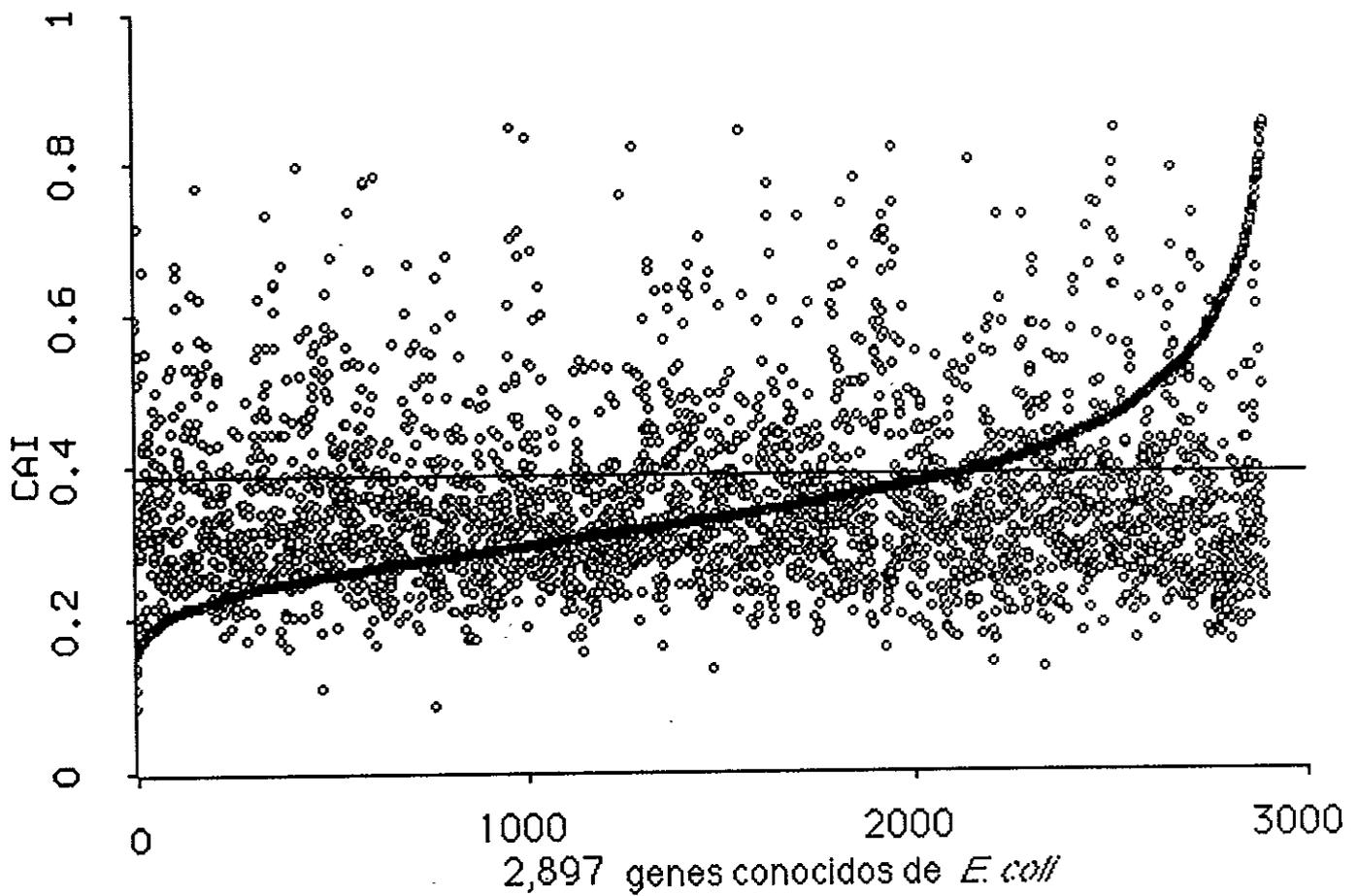


Figura 25b. Distribución de los valores de CAI para 2,897 genes conocidos en *E. coli*. La curva sigmoideal representa todos estos valores ordenados en forma ascendente. La línea que parte la gráfica a la mitad representa el valor de CAI 0.3928 para el gene *udhA* (A. Medrano, Departamento de Biología Computacional, CIFI-UNAM. Comunicación personal, 1998).

El análisis sobre la región 5' de *udhA* reveló la presencia de un posible promotor. Dicho promotor se comparó con la secuencia consenso.

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|
| | -35 | | | | | | -10 | | | | | | |
| <i>udhA</i> | T | T | G | G | C | T | 17 bp | T | A | C | C | A | T |
| | + | + | + | - | + | - | | + | + | - | - | + | + |
| consenso | T | T | G | A | C | A | 17 bp | T | A | T | A | A | T |
| % ocurrencia | 82 | 84 | 78 | 65 | 54 | 45 | | 80 | 95 | 45 | 60 | 50 | 96 |

Se observa que sus regiones -35 y -10 difieren cada una en dos bases del hexámero en la secuencia consenso para ambas. Es importante señalar que estas bases son las menos conservadas en los promotores estudiados (20,24,25,39). Existe una separación de 17 pares de bases entre ambas regiones, esta distancia ha sido reportada como la óptima para la actividad de promotores en *E. coli* (12,20,24,25,39).

El promotor propuesto para *udhA* presenta en su caja Pribnow la región TGN y aproximadamente un 57% de A+T en la región flanqueada por las posiciones -40 y -60, estas dos características sugieren que podría tratarse de un promotor reconocible por σ^{70} (12). Además, este promotor está comprendido entre las primeras 250 pares de bases anteriores al codón de inicio, que es la región a donde típicamente se encuentran los promotores de *E. coli* (7).

Si tomamos como referencia la distancia promedio (7bp) que existe entre el promotor y el inicio de la transcripción reportada para la mayoría de los genes en *E. coli* (25,39), se sugiere que el inicio de la transcripción (+1) mediada por el promotor propuesto para *udhA* se encontraría aproximadamente a 32bp anteriores del codón de inicio. Dicha distancia está comprendida en el rango (20-40bp) en el que se encuentran una gran mayoría de promotores en *E. coli* (51). Los genes de *E. coli* que también presentan sus promotores localizados a 32bp del codón de inicio son : *amn*, *carA*, *clpB*, *cysK*, *glnL*, *ilvG*, *ilvL*, *serB* y *tyrB* (51).

El análisis del promotor con el valor mas alto (56.0) propuesto para *udhA*, indica que presenta una fuerza relativamente débil, es decir, en teoría muestra una tasa baja para iniciar la síntesis de RNA a partir del mismo (29). Aún así, cumple con los dos criterios señalados por Mulligan, et. al. (29) para ser considerado el promotor indicado en la región 5' de *udhA* : 1) presenta un valor alto en promedio (mayor a 45.0) y 2) es el que muestra el valor mas alto de la región bajo estudio. Dicho valor está comprendido entre el rango que presentan los siguientes tres promotores :

1. Promotor para el gene *tnaA* del operón de triptofanasa en *E. coli*, el cual presenta regulación transcripcional por represión catabólica y atenuación (49). Valor=55.0
2. Promotor para el gene *tnpA* de la transposasa para Tn4652, que pertenece a la familia Tn3 de transposones de *E. coli* (49). Valor=55.0
3. Promotor para el gene que codifica el represor del fago 434 de *E. coli* (49). Valor=56.5

El hecho de que un promotor presente un valor bajo, no quiere decir que no sea funcional, ya que muchos de ellos requieren de activadores para incrementar su fuerza (29).

El análisis realizado sobre la región 5' para proponer un sitio de unión al ribosoma se basa en tres características: 1) un análisis estadístico (Fig. 26), 2) la determinación de una secuencia rica en purinas que sea complementaria al palíndromo C C U C C, localizado en el extremo 3' del rRNA en la subunidad 16S del ribosoma (Fig. 2) y 3) una separación de entre 8-12 pares de bases con respecto al codón de inicio (20,24,27,39).

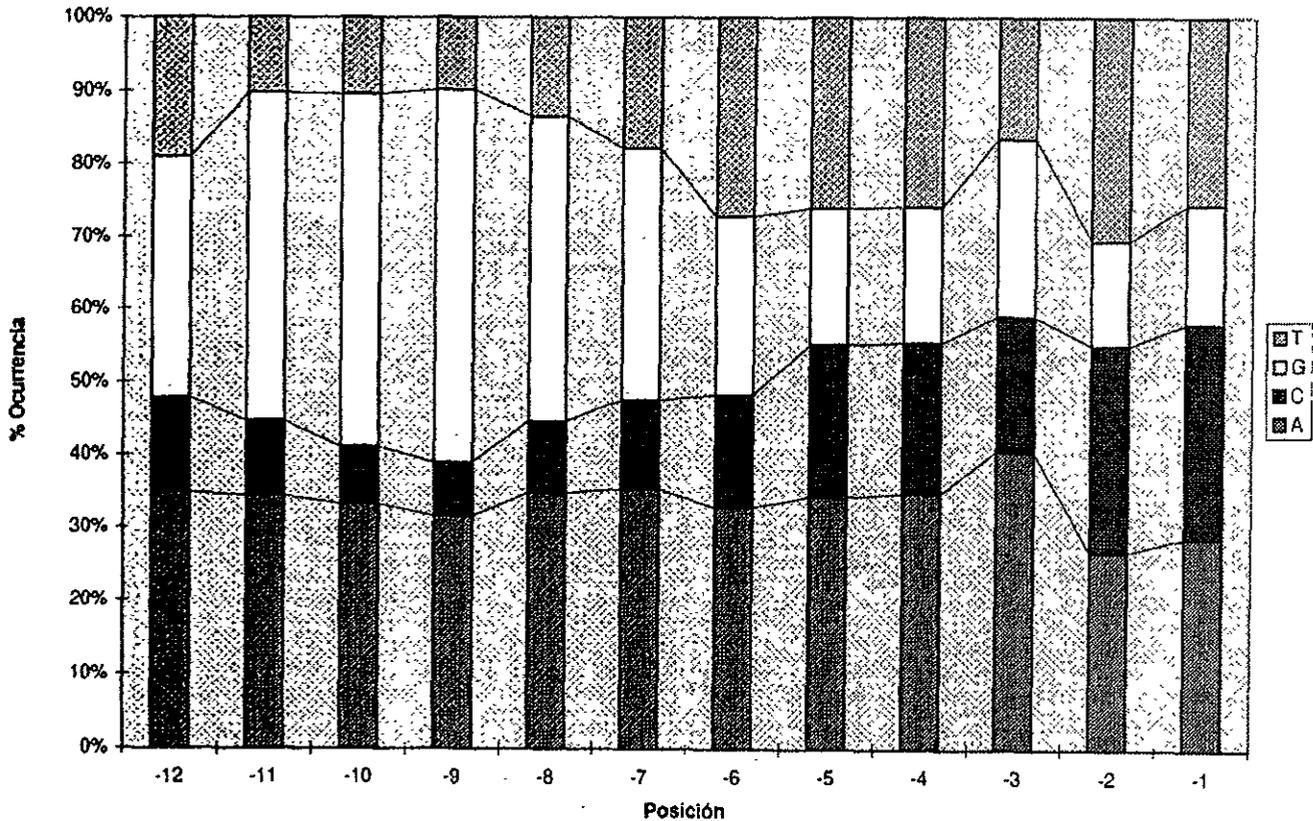


Figura 26. Análisis estadístico de la composición de las bases anteriores al codón de inicio que forman el sitio de unión al ribosoma en 1,055 genes de *E. coli* (4).

El sitio de unión al ribosoma propuesto para *udhA* se analizó alineándolo con la secuencia rica en pirimidinas presente en el extremo 3' de la subunidad 16S en los ribosomas.

| | | | | | | | |
|------------------------|---|---|---|---|---|--------|-----------------|
| (3' rRNA 16S) | C | C | U | C | C | 8-12bp | Codón de inicio |
| | + | - | + | - | + | | |
| (5' mRNA <i>udhA</i>) | G | U | A | A | G | 7bp | ATG |

El análisis de la secuencia propuesta como SD en el extremo 5' del *udhA* reveló que se trata del pentámero que muestra una mejor hibridación con el palíndromo C C U C C, solo tres de las cinco bases que lo componen son complementarias al mismo. También, es el que presenta una composición rica en purinas.

El análisis computacional de *udhA* reveló la presencia de dos posibles terminadores, uno en la parte codificante del gene y otro en el extremo 3'. La composición de bases en ambos difiere mucho con la que caracteriza a los dos tipos de terminadores descritos en otros genes. En el templado no se aprecia alguna secuencia palindrómica que pudiera corresponder a una estructura secundaria significativa en el transcrito de mRNA y no muestran un continuo de adeninas al final de la secuencia. Tampoco muestran una secuencia de reconocimiento para ρ (rho) rica en citosinas y pobre en guaninas. Por lo anterior, es poco probable que ambos terminadores sean funcionales.

No se encontraron otras posibles secuencias de regulación transcripcional.

UDHA se compone de 466 aminoácidos, dos mas que STH de *P. fluorescens* con la que guarda la mayor similitud (69.6%) y dos menos que UDHA(Rv2713) de *M. tuberculosis*, la segunda proteína mas parecida a UDHA (54.4%).

Al igual que la mayoría de las deshidrogenasas, UDHA presenta dos sitios de unión a nucleótidos, uno en la región amino-terminal y otro en la parte central; ambos se unen para formar al dominio del pliegue Rossmann de unión a dinucleótidos (Fig. 3a y 3b). El sitio de unión a nucleótidos en la región amino-terminal de las proteínas analizadas incluyendo UDHA, se encuentra altamente conservado con respecto a los aminoácidos que lo componen, de acuerdo a lo descrito por Fjellstrom, et. al. (14). En el sitio similar de la parte central, solo es posible establecer la composición de una región núcleo (Fig. 4), cuya separación entre la primera hélice α y segunda conformación β (Fig. 22) cumple algunos criterios propuestos tanto por Fjellstrom, et. al. (14) como por Wierenga, et. al. (48). También, se ha visto que en algunas deshidrogenasas la segunda hélice α es substituida por una porción no helicoidal de proteína en el sitio de unión a nucleótidos (38,43), este podría ser el caso para el segundo de estos sitios en UDHA.

En base al análisis de su estructura primaria, se determinó que UDHA pertenece a la familia de las flavoproteínas disulfuro-oxidoreductasas, las cuales presentan dos residuos de cisteína altamente conservados en la región amino-terminal para formar un enlace disulfuro activo-reductor. Una substitución en el segundo residuo de cisteína por uno de treonina, tanto en UDHA de *E. coli*, en STH de *P. fluorescens* como en UDHA(Rv2713) de *M. tuberculosis*; hace de estas una excepción al compararlas con otras proteínas similares (Fig. 22). Se ha visto en otras enzimas que la

reducción de dos residuos de cisteína genera un cambio conformacional, formando un sitio activo que promueve la unión al sustrato (13). Otras mas, presentan un centro reductor inusual formado por un solo residuo de cisteína (37), este podría ser el caso para STH y UDHA de *E. coli*. Además, se sabe que los residuos de cisteína contribuyen a la estabilización de la estructura proteínica (35).

Aún considerando que la similitud entre *udhA* y *sth* a nivel de secuencia nucleotídica y proteínica es de 62.4% y 69.6% respectivamente, no es posible establecer con precisión si se trata de genes ortólogos o parálogos, aunque se ha propuesto que los genes que muestren entre si la mayor identidad y que guarden al menos 60% de similitud en secuencia nucleotídica, se consideran ortólogos (22).

Tampoco se puede afirmar con exactitud que se trata de una transferencia horizontal. Para poder determinarlo se recurrió al análisis conjunto de dos parámetros : 1) la composición de GC (23,30) y 2) el valor de CAI (41). Si estos parámetros son muy similares entre genes, entonces se puede establecer el origen de un gene, producto de una transferencia horizontal. Como ya se indicó, el valor en la composición de GC en *udhA* (51.82%) se aproxima mas al promedio en genes de *E. coli* (50.8%) que al de genes en *P. fluorescens* con valor de 60% (30). También, existe la posibilidad de que un gene proveniente de otro organismo esté sujeto a los mismos procesos mutacionales del organismo receptor, reflejando con el tiempo una misma composición de los genes en este último (23). Como se mencionó, el valor de CAI calculado para *udhA* (0.3928) se encuentra en el rango que presenta una gran parte de los genes en *E. coli* (41). Estos datos en conjunto permiten proponer que es poco probable que el gene *udhA* provenga de una transferencia horizontal reciente de *P. fluorescens*.

La comparación a nivel de estructura primaria entre las proteínas analizadas en el dendrograma (Fig. 23 9, muestra que *udhA* de *E. coli* y STH forman una misma subfamilia, lo cual concuerda con la actividad de transhidrogenasa soluble para ambas. Sería interesante determinar si UDHA (Rv2713) de *M. tuberculosis*, que también se agrupa en esta misma subfamilia, presenta actividad de transhidrogenasa soluble.

Los dos experimentos independientes realizados para determinar actividad de transhidrogenasa soluble para UDHA resultaron positivos y arrojaron resultados distintos. Se observó que la variación en estas mediciones está dada por el tiempo y temperatura de almacenamiento del extracto celular (Tablas IV y V). La actividad enzimática de UDHA es aproximadamente nueve veces mayor al momento de su extracción, que posterior a su almacenamiento a 4°C durante 24hrs, esto hace suponer que se trata de una enzima lábil que pierde su actividad rápidamente.

Se detectó que al preparar la reacción en una proporción enzima-sustrato de 1 : 40 y 1 : 100 (Tabla V), es decir, con la mayor cantidad de sustrato, la actividad se mantuvo por un tiempo mas prolongado. Lo anterior muestra que la enzima presenta una actividad relativamente veloz y que no se inhibe a altas concentraciones de sustrato.

La actividad de transhidrogenasa soluble obtenida con el extracto fresco de *E. coli* se comparó con la reportada para STH de *P. fluorescens* bajo condiciones distintas (Tabla VII)

Tabla VII. Diferencias existentes entre la actividad de transhidrogenasa soluble registrada para UDHA de *E. coli* y STH de *P. fluorescens* (16).

| | Concentración de proteína (%) | Promotor | IPTG (mM) | Actividad (U/mg) |
|--|-------------------------------|------------|-----------|------------------|
| Extracto UDHA <i>E. coli</i> | 1.9 | <i>trc</i> | 1 | 2.15 |
| Extracto STH <i>P. fluorescens</i> | 1.0 | - | - | 0.19 |
| Extracto STH recombinante <i>E. coli</i> | 1.0 | <i>lac</i> | - | 4.10 |
| Extracto STH recombinante <i>E. coli</i> | 6.0 | <i>lac</i> | 0.4 | 22.0 |

Si bien UDHA recombinante muestra una actividad específica once veces mayor a la reportada para STH extraída de *P. fluorescens*, se observa que esta última se encuentra en una concentración dos veces menor a UDHA. También, se observa que la actividad específica para STH recombinante en *E. coli* es mayor a la de UDHA recombinante en la misma bacteria, aún utilizando al promotor *lac* que es relativamente menos fuerte que *trc* y con dos y medio veces menor concentración del inductor gratuito IPTG.

STH recombinante expresada a partir del promotor *lac* muestra, a tres veces la concentración calculada para la posible proteína UDHA recombinante; diez veces mayor actividad que esta última. Al extrapolar estos datos es de suponer que a la concentración más alta obtenida para STH recombinante (6%), UDHA mostraría aproximadamente tres veces menor actividad con respecto a STH.

Los cálculos por densitometría (Tabla VI) indican que una banda de aproximadamente 51.5kDa, que es el peso molecular calculado para UDHA; representa el 1.9% de la concentración total de proteína en la cepa experimental bajo condiciones de inducción. Una banda similar con menor intensidad se observa en la muestra del cultivo inducido con el vector pTrc99A solo.

Existen dos interpretaciones para estos resultados :

I. La banda observada corresponde a una proteína codificada en el cromosoma de la cepa empleada o el vector pTrc99A y por alguna causa su nivel de expresión aumenta al inducir *udhA* con IPTG.

II. Existe una proteína codificada por el cromosoma de la bacteria o el vector pTrc99A con un peso molecular cercano a 51.5kDa y al inducirse la producción de UDHA en la cepa con el plásmido pTrc99A+*udhA*, la banda que corresponde a esta enzima sobrelapa a la de la proteína cromosomal.

La primera interpretación es un caso poco probable, ya que para que ocurriera, UDHA debería tener un papel regulador que provocara la inducción de otra(s) proteína(s). Los análisis de secuencia realizados en este estudio indican que UDHA solo tiene una función catalítica, similar a STH. Por lo tanto, se considera que la segunda interpretación es la más probable, aunque para corroborarlo será necesario demostrar la identidad de la banda observada.

Mediante el uso de anticuerpos específicos para UDHA sería posible demostrar que la banda que aparece después de la inducción es realmente la enzima codificada en el plásmido pTrc99A+udhA.

Conclusiones

Las herramientas empleadas en este trabajo hicieron posible la identificación y asignación de la función para un gene de *E. coli* sin caracterizar : *udhA* = Uncharacterized dehydrogenase A (6).

Se analizó y corrigió la secuencia nucleotídica reportada para el gene *udhA* en las primeras 145 bases.

Se clonó y expresó este gene a partir del promotor *trc* y se determinó actividad de transhidrogenasa soluble para el producto proteínico.

Se identificaron sobre la estructura primaria de UDHA los dos sitios de unión a nucleótidos que en conjunto forman el pliegue Rossmann de unión al cofactor.

Se detectó la presencia de un posible promotor y un sitio de unión al ribosoma en el extremo 5' del gene *udhA*.

UDHA experimenta una substitución por treonina en una de las cisteínas que forman el enlace disulfuro activo-reductor característico de las disulfuro-oxidorreductasas.

La actividad de transhidrogenasa soluble para el extracto de *E. coli* inducida muestra una considerable disminución en función del tiempo y la temperatura a la que permanece almacenado, por lo que se considera una enzima lábil.

Mediante análisis por electroforesis, se detectó una banda que corresponde al 1.9% de la proteína total, la cual pudiera corresponder a la enzima UDHA.

La diferencia en la actividad enzimática para STH y UDHA es muy marcada, a pesar de que existe una similitud relativamente alta en la composición de ambas.

Con la realización de este trabajo se demuestra que *E. coli* es el primer organismo del que se sabe presenta ambos tipos de transhidrogenasa codificados en su genoma por los genes *pntAB* y *udhA*.

Perspectivas

Las perspectivas que se plantean en este trabajo son dos : 1) determinar bajo que condiciones naturales se expresa la transhidrogenasa soluble UDHA en *E. coli* y 2) proponer una posible utilidad de esta enzima en algún proceso biotecnológico.

Por una parte, una forma de determinar la expresión de *udhA* bajo condiciones naturales *in vivo*, sería crecer a *E. coli* con fuentes de carbono cuyo metabolismo genere una mayor proporción de NADPH que NADH. Otra estrategia consiste en generar mutantes en las cuales los flujos de carbono se dirijan a vías metabólicas generadoras de NADPH.

Una estrategia experimental consistiría en emplear una cepa de *E. coli* (*pgi*) mutante para la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI), dicha cepa ha sido utilizada previamente para esclarecer algunos aspectos del metabolismo en la utilización de glucosa por la bacteria (42).

La primera reacción de la glicólisis consiste en la obtención de glucosa-6-fosfato con la fosforilación de la glucosa, mediada por el sistema PTS (24,43). Con la cepa *pgi* se obstaculizaría la segunda reacción de la glicólisis que convierte a la glucosa-6-fosfato en fructuosa-6-fosfato, impidiendo así que continúe esta vía glicolítica (18) generadora de NADH y se fuerza a la bacteria a oxidar glucosa empleando alternativamente la vía de las pentosas, generando así principalmente NADPH (24,34,43).

Durante las tres primeras reacciones oxidativas y por cada molécula de glucosa-6-fosfato oxidada, en la vía de las pentosas se generan dos moléculas de NADPH y a diferencia de la glicólisis, ninguna de NADH y ATP (24,43). Estas condiciones disminuyen la carga de ATP y poder reductor NADH en el metabolismo de la bacteria, lo cual plantearía la posibilidad de inducción para *udhA* y síntesis de la transhidrogenasa soluble con la finalidad de transferir los equivalentes reductores necesarios de NADPH a NAD'.

Por otra parte, la obtención de compuestos de interés industrial por biotransformación representa muchas ventajas sobre las transformaciones por métodos químicos. En el caso de la biotransformación, las reacciones catalizadas por enzimas muestran una especificidad muy alta, mientras que en una transformación química esto no sucede y por lo tanto es necesaria la protección de ciertos grupos funcionales lábiles (15).

Algunos compuestos semisintéticos de interés farmacéutico como la hidromorfona, un analgésico siete veces mas potente que la morfina y la hidrocodona, un antitusivo, son derivados de los alcaloides de origen natural morfina, codeina y tebaina. Estos alcaloides, al igual que muchos otros compuestos bioactivos, al ser procesados mediante transformaciones químicas con la utilización de compuestos tóxicos en condiciones extremas, requieren la protección de algunos de sus grupos funcionales además, este tipo de procesos son muy costosos y proporcionan un rendimiento bajo. En contraste, las transformaciones enzimáticas se llevan a cabo en un medio acuoso no tóxico con presiones y temperaturas bajas (15).

Para establecer un sistema de biotransformación se requiere la identificación y aislamiento de aquellas enzimas cuya actividad sea la requerida. Una vez identificado y caracterizado a los genes que codifican

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

para dichas enzimas, es posible manipularlos en vehiculos de clonación y expresión.

Las enzimas recombinantes morfina deshidrogenasa y morfinón-reductasa provenientes de *P. putida* y codificadas por los genes *morA* y *morB* respectivamente, ya han sido sobreproducidas en *E. coli* y empleadas en la biotransformación de morfina y codeína (15)

A continuación se describen concretamente las condiciones para la biotransformación de morfina y codeína requeridas con la finalidad de optimizar el rendimiento en la obtención de hidromorfona e hidrocodona :

Primeramente es necesario incrementar la reducción de morfinona a hidromorfona e impedir la reducción de esta última a dihidromorfina (Fig. 27).

La solución consiste en aumentar la proporción de actividad de la morfinón-reductasa en comparación con la de la morfina deshidrogenasa, para lo cual existen dos alternativas (15) :

I. Alterar la especificidad de la enzima morfina deshidrogenasa por el cofactor NAD^+ en lugar de $NADP^+$, lo cual incrementaría significativamente la proporción de $NADH$ a ser empleado por la morfinón-reductasa. Esta estrategia ya ha sido implementada para una glutatió-n-reductasa (33).

II. Emplear una transhidrogenasa soluble encargada de transferir los equivalentes reductores de $NADPH$ a NAD^+ y poder generar mas $NADH$ que pueda ser utilizado por la morfinón-reductasa.

Las transhidrogenasas solubles *STH* de *P. fluorescens* y *UDHA* de *E. coli* podrían ser empleadas en esta segunda alternativa una vez sobreproducidas y purificadas como proteínas recombinantes.

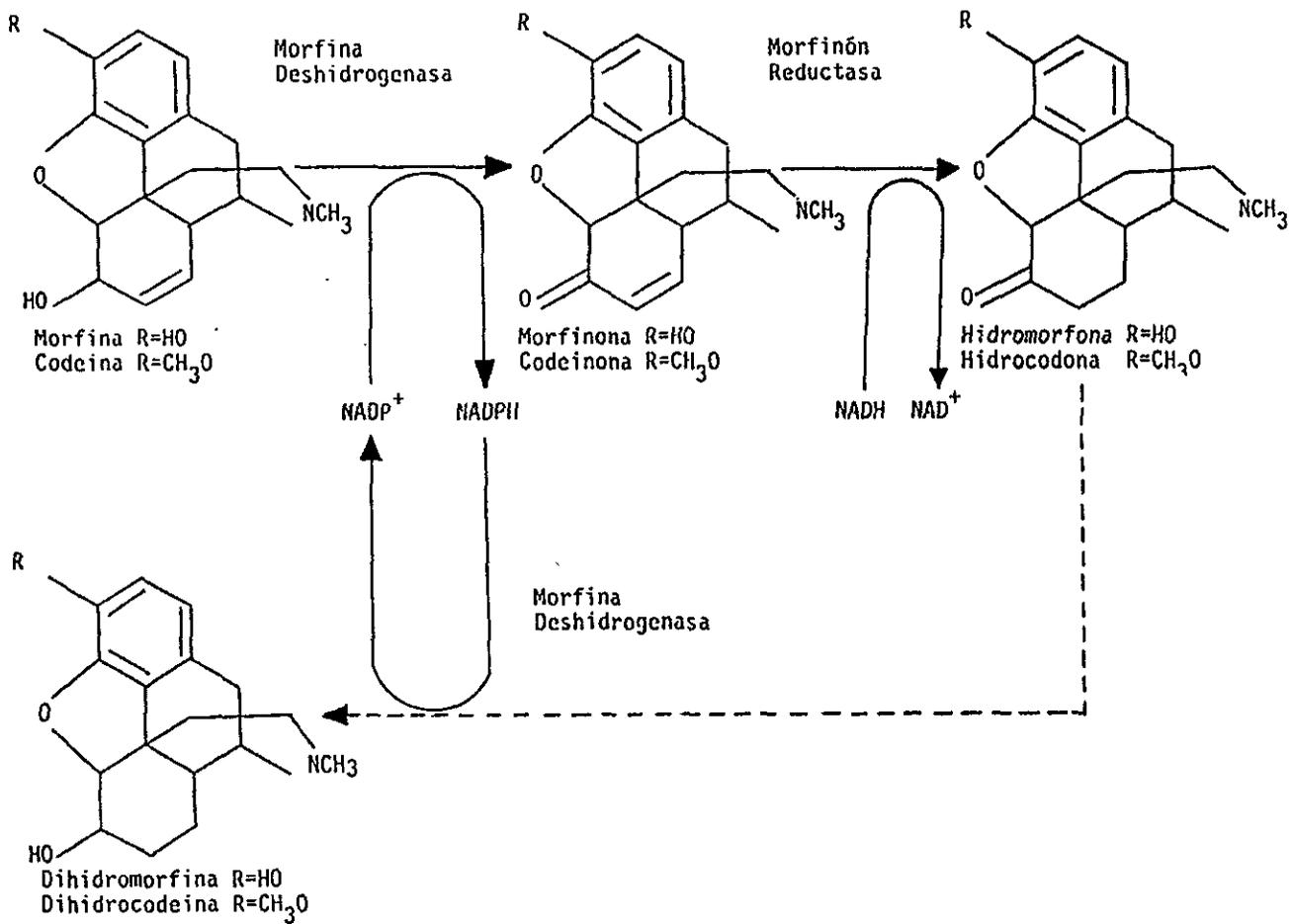


Figura 27. Biotransformación de morfina y codeína por la acción de morfina deshidrogenasa y morfinón-reductasa (15).

Bibliografia

1. Ambartsoumian, G., D'Ari, R., Lin, R.T., and Newman, E.B. Altered amino acid metabolism in *lrp* mutants of *Escherichia coli* K12 and their derivatives. *Microbiology* 140 : 1737-1744, 1994.
2. Amann, E., Ochs, B., and Abel, K.-J. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69 : 301-315, 1988.
3. Baker, P.J., Britton, K.L., Rice, D.W., Rob, A., and Stillman, T.J. Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide specificity. *J. Mol. Biol.* 228 : 662-671, 1992.
4. Barrik, D., Villanueva, K., Childs, J., Kalil, R., Schneider, T.D., Lawrence, C.E., Gold, L., and Stormo, G.D. Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 22(7) : 1287-1295, 1994.
5. Bellamancina, C.R. The nicotinamide dinucleotide binding motif : a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* 10 : 1257-1269, 1996.
6. Blattner, F.R., Burland, V., Plunkett III, G., Sofia, H.J., and Daniels, D.L. Analysis of *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. *Nucleic Acids Res.* 21(23) : 5408-5417, 1993.
7. Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 60(3) : 512-538, 1997.
8. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254, 1976.
9. Christman, M.F., Storz, G., and Ames, B.N. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 3484-3488, 1989.
10. Clarke, D.M., Loo, T.W., Gillam, S., and Bragg, P.D. Nucleotide sequence of the *pntA* and *pntB* genes encoding the pyridine nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 158 : 647-653, 1986.
11. D'Ari, R., Lin, R.T., and Newman, E.B. The leucine responsive regulatory protein : more than a regulator ? *Trends Biochem. Sci.* 18 : 260-263, 1993.
12. DeHaseth, P.L., Zupancic, M.L., and Record, M.T. Jr. RNA polymerase-promoter interactions : the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 180(12) : 3019-3025, 1998.
13. Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Rengstrom, K., Sjoberg, B., and Eklund, H. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1 : reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* 5(8) : 1077-1092, 1997.
14. Fjellstrom, O., Olausson, T., Hu, X., Kallebring, B., Ahmad, S., Bragg, P.D., and Rydstrom, J. Three-dimensional structure prediction of the NAD binding site of proton-pumping transhydrogenase from *Escherichia coli*. *Proteins* 21 : 91-104, 1995.

15. French, C.E., Hailes, A.M., Rathbone, D.A., Long, M.T., Willey, D.L., and Bruce, N.C. Biological production of semisynthetic opiates using genetically engineered bacteria. *Biotechnology* 13 : 674-676, 1995.
16. French, C.E., Boonstra, B., Bufton, K.A., and Bruce, N.C. Cloning, sequence and properties of the soluble pyridine nucleotide transhydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 179(8) : 2761-2765, 1997.
17. Frieden, C. Slow transitions and hysteretic behavior in enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48 : 471-489, 1979.
18. Gamo, F.J., Portillo, F., and Gancedo, C. Characterization of mutations that overcome the toxic effect of glucose on phosphoglucose isomerase less strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106(3) : 233-237, 1993.
19. Gerolimatos, B., and Hanson, R.L. Repression of *Escherichia coli* pyridine nucleotide transhydrogenase by leucine. *J. Bacteriol.* 134(2) : 394-400, 1978.
20. Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M. An Introduction to Genetic Analysis. 6th ed. W.H. Freeman and Co., USA. (1996)
21. Hojeberg, B.; Brodelius, P., Rydstrom, J., and Mosbach, K. Affinity chromatography and binding studies on immobilized adenosine 5'-monophosphate and adenosine 2',5'-biphosphate of nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 66 : 467-475, 1976.
22. Huynen, M.J., and Bork, P. Measuring genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 5849-5856, 1998.
23. Lawrence, J.G., and Ochman, H. Amelioration of bacterial genomes : rates of change and exchange. *J. Mol. Evol.* 44 : 383-397, 1997.
24. Lehninger, A.N., Nelson, D.L., and Cox, M.M. Principles of Biochemistry. 2nd ed. Worth Publishers, USA. (1993)
25. Lewin, B. Genes VI. Oxford University Press, USA. (1997)
26. Liu, Z., Sun, W., Rose, J., Chung, Y., Hsiao, C., Chang, W., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., and Wang, B. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4(4) : 317-326, 1997.
27. Makrides, S. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60(3) : 512-538, 1996.
28. McKie, J.H., and Douglas, K.T. Evidence for gene duplication forming similar binding folds for NAD(P)H and FAD in pyridine nucleotide-dependent flavoenzymes. *FEBS Lett.* 279(1) : 5-8, 1991.
29. Mulligan, M.E., Hawley, D.K., Entriken, R., and McClure, W.R. *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res.* 12(1) : 789-800, 1984.
30. Muto, A., and Osawa, S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 166-169, 1987.
31. Neidhardt, F.C., Curtis III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. ASM Press, USA. (1996)
32. Newman, E.B. Leucine-responsive regulatory protein : A global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 : 747-775, 1995.
33. Perham, R.N., Scrutton, N.S., and Berry, A. New enzymes for old : Redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase. *Bioessays* 13(10) : 515-525, 1991.

34. Ponce, E., Martinez, A., Bolivar, F., and Valle, F. Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes. *Biotech. Bioeng.* 58 : 292-295, 1998.
35. Ren, B., Tibbelin, G., de Pascale, D., Rossi, M., Bartolucci, S., and Ladenstein, R. A protein disulfide oxidoreductase from the archeon *Pyrococcus furiosus* contains two thioredoxin fold units. *Nat. Struct. Biol.* 5(7) : 602-611, 1998.
36. Rodriguez, R.L., and Tait, R.C. *Recombinant DNA Techniques : An Introduction.* Addison and Wesley, USA. (1983)
37. Ross, R.P., and Claiborne, A. Cloning, sequence and overexpression of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. Structural relationship with the flavoprotein disulfide reductases. *J. Mol. Biol.* 221 : 857-871, 1991.
38. Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250 : 194-199, 1974.
39. Russell, P.J. *Genetics.* 4thed. Harper Collins, USA. (1996)
40. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* 2nded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. (1989)
41. Sharp, P.M., and Li, W. The codon adaptation index- a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 15(3) : 1281-1295, 1987.
42. Vinopal, R.T., Hillman, J.D., Schulman, H., and Reznikoff, W.S. New phosphoglucose isomerase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 122(3) : 1172-1174, 1975.
43. Voet, D., and Voet, J.G. *Biochemistry.* 2nded. John Wiley and Sons, USA. (1995)
44. Voordouw, G., Van Der Vies, S., Eweg, J.K., Veeger, C., Van Breemen, J.F.L., and Van Bruggen, E.F.J. Pyridine nucleotide transhydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* 111 : 347-355, 1980.
45. Voordouw, G., Van Der Vies, S., Themmen, A.P.N. Why are two different types of pyridine nucleotide transhydrogenase found in living organisms ?. *Eur. J. Biochem.* 131 : 527-533, 1983.
46. Widmer, F., and Kaplan, N.O. *Pseudomonas aeruginosa* transhydrogenase : Affinity of substrates for the regulatory site and possible hysteretic behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 : 1287-1292, 1977.
47. Wierenga, R.K., De Maeyer, M.C.H., and Hol, W.G.J. Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* 24 : 1346-1357, 1985.
48. Wierenga, R.K., Terpstra, P., and Hol, W.G.J. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187 : 101-107, 1986.
49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
50. <http://www.sanger.ac.uk>
51. http://www.cifn.unam.mx/Computational_Biology/regulondb