



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA INTRODUCCIÓN DE UN GEN DE UNA
PIRUVATO CINASA DE *Vibrio cholerae* ES TÓXICA
PARA *E. coli*.**

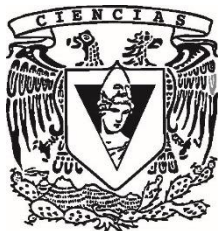
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ZOE ALBA MARTÍNEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



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.

I. Datos del Alumno

Alba
Martínez
Zoe
55470149
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
107000341

II. Datos del Tutor

Dra.
Gloria
Hernández
Alcántara

III. Datos del Sinodal 1

Dra.
Itzhel
García
Torres

IV. Datos del Sinodal 2

Dra.
Leticia Haydeé
Ramírez
Silva

V. Datos del Sinodal 3

Dr.
Sergio
Enríquez
Flores

VI. Datos del Sinodal 4

Dr.
Gabriel
López
Velázquez

VII. Datos del trabajo escrito

La introducción de un gen de una piruvato cinasa de *Vibrio cholerae* es tóxica para *E.coli*.

77 p.

2018

A mi madre, padre y hermana, gracias por tanto.

Por ser y estar.

Al laboratorio de Péptidos y Proteínas del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se realizó esta tesis bajo la dirección de la Dra. Gloria Hernández Alcántara. Durante la realización de la tesis “La introducción de un gen de una piruvato cinasa de *Vibrio cholerae* es tóxica para *E.coli*” recibí financiamiento y beca de Tesis de Licenciatura, del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con número de proyecto IA204816.

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme todas las herramientas necesarias para formarme académica y humanamente durante estos años.

Al laboratorio de Péptidos y Proteínas de la Facultad de Medicina, en especial a la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva por brindarme la oportunidad de integrarme a su proyecto de investigación, por todas sus enseñanzas, consejos y apoyo durante mi estadía en el laboratorio.

A la mejor tutora que pude haber tenido, la Dra. Gloria Hernández Alcántara por acobijarme como su estudiante, brindarme su paciencia para explicarme una y otra vez cada que lo necesitaba, por toda la confianza y el tiempo que depositó para transmitirme su conocimiento y amor por la ciencia, así como el creer en mi para realizar este proyecto. Por compartir una taza de café mientras nos plantéabamos nuevos experimentos para resolver las preguntas que seguían surgiendo. Gracias por cada una de las herramientas que me brindó llenas de calidez humana para sobrevivir en este arduo mundo de la ciencia, el apoyo dentro y fuera del laboratorio, así como su amistad y su enorme corazón. Gracias por ese último voto de confianza para incluirme en futuros proyectos. Finalmente podemos decir ¡Lo logramos!

A cada uno de los miembros del laboratorio de Péptidos y Proteínas por hacer de mi vida dentro del laboratorio un hogar, gracias al Dr. Carlos Guerrero por brindarme su ayuda y enseñanza.

A mi honorable jurado: la Dra. Itzhel García Torres, Dr. Sergio Enríquez Flores y el Dr. Gabriel López Velázquez por sus valiosas observaciones y comentarios realizados en mejora de este trabajo.

A cada uno de mis profesores de la Facultad de Ciencias por reafirmar mi amor por la ciencia, por mostrarme que hay un mundo más allá del laboratorio y hacer mi estadía en campo completamente grata y disfrutable, pero también por brindarme la oportunidad de enamorarme completamente de mi vida en el laboratorio.

Agradecimientos Personales

A mi madre Cristina por ser esa heroína y el ser más fuerte que conozco, sin ti nada de esto habría sido posible. Gracias por apoyar cada una de mis decisiones, aunque no siempre hayan sido las mejores de cada una aprendí. Por entender cada una de mis facetas de estrés, tristeza y enojo que era por todo y nada a la vez, pero también por estar a mi lado y darme la mano en los días buenos. Por crecer, aprender y disfrutar a mi lado de las maravillas de la vida. Gracias por amarme tanto, por estar tan orgullosa de mí y creer en cada paso que doy. Y agradezco a mi abuela Amparito que desde el cielo nos sigue guiando y cuidando. Mamá definitivamente ¡De grande quiero ser como tú!

A mi padre Alejandro por creer en cada uno de mis sueños y dejarme tomar decisiones erróneas para crecer. Gracias por seguir aprendiendo a mi lado y darme la mano en los días buenos y en los que no lo son tanto. Y sobre todo por aún llevarme sobre tus hombros, aunque ya no sea una niña.

A mi hermana Dione, mi otra mitad y mi mejor amiga. Por ser muchas veces más madura que yo, por salvarme del estrés, la frustración y el enojo de los días en los que todo se ve negro, pero también por compartir cada uno de los matices de mis días buenos. Por darle luz a mi vida desde el primer día que te vi –siendo una tiny potato-. Gracias por todo tu apoyo y amor incondicional, por que la vida es más bonita a tu lado.

A mi pequeño amigo de cuatro patas, el señor poof, por todas esas madrugadas que compartiste conmigo mientras todos dormían, porque el amor de un gato, también es incondicional.

A cada una de mis personas favoritas de la ENP2 (ustedes saben quienes son), hicieron de mi estancia allí el mejor viaje posible, especialmente a Alexia y Nayeli, que 7 años después seguimos juntas, sin importar la distancia y el tiempo, siempre seremos incondicionales.

A todas las personitas hermosas que conocí tanto dentro, como fuera de la Facultad de Ciencias que me acompañaron a lo largo de la licenciatura, que, por temor a olvidar a alguno, prefiero no enlistar. Gracias por volverse mi segunda familia, el camino a recorrer cada vez es menor.

A mi chiquita Yadira, gracias por tanto en tan pocos años. Gracias por ser y estar.

A mi #TeamNutria por enseñarme que siempre se puede un poco más y permitirme olvidar del mundo entero cuando estoy con ustedes.

Y finalmente a todos los que en algún momento se cruzaron en mi vida, ya sea un instante o para siempre, me han hecho una mejor persona. ¡Gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Clasificación de biotipos en <i>Vibrio cholerae</i>	12
1.2 Genoma de <i>Vibrio cholerae</i>	13
1.3 Origen y función del cromosoma II de <i>Vibrio cholerae</i>	17
1.4 Patogenicidad.....	19
1.4a Toxina colérica (TC).....	19
1.5 Transporte y metabolismo energético.....	22
1.6 La piruvato cinasa.....	25
1.7 Antecedentes de la piruvato cinasa.....	26
1.8 Distribución y abundancia de las piruvato cinasas dependientes e independientes de K^+	27
1.9 Las piruvato cinasas de <i>Vibrio cholerae</i>	30
2. JUSTIFICACIÓN	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo general.....	33
3.2 Objetivos particulares.....	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Obtención de células competentes.....	34
4.2 Extracción de ADN.....	34
4.3 Cuantificación.....	36
4.4 Secuenciación.....	36
4.5 Transformación.....	36
4.6 Selección de clonas para la expresión de la proteína.....	39
4.7 Curvas de Crecimiento.....	39
4.8 Expresión de la proteína recombinante.....	40
4.8a Geles de poliacrilamida.....	40
4.8b Digestiones.....	41
4.8c PCR.....	41
4.8d Gel agarosa 1x.....	42

4.9	Expresión y Purificación de la proteína en la cepa BL21-AI.....	42
4.10	Ensayo de la actividad enzimática.....	43
4.11	Cuantificación de la proteína.....	43
4.12	Almacenamiento.....	44
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
5.1	El gen <i>vcIIIpk</i> no produce transformantes en algunas cepas del sistema BL21.....	46
5.2	El gen <i>vcIIIpk</i> produce transformantes con tasas de crecimiento celular reducidas en algunas cepas del sistema BL21.....	48
5.3	El gen <i>vcIIIpk</i> produce transformantes con tasas normales de crecimiento celular en una cepa del sistema BL21.....	50
5.4	Comparación del crecimiento y expresión de las tres PKs.....	51
5.4a	Cepa BL21(DE3)pLysS.....	52
5.4b	Cepa OrigamiB(DE3)pLysS.....	55
5.4c	Cepa BL21-AI.....	56
5.5	Estabilidad del plásmido en la cepa BL21(DE3)pLysS.....	58
5.6	Expresión y purificación de la proteína en la cepa BL21-AI.....	63
6.	CONCLUSIONES.....	68
7.	ANEXO.....	69
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	pb	Pares de bases
ADP	Adenosin difosfato	PK	Piruvato cinasa
ATP	Adenosín trifosfato	PKM1	Piruvato cinasa de músculo de conejo
D.O _(600nm)	Densidad óptica a 600 nm	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
Fru-1,6BP	Fructosa 1, 6 Bifosfato	PEP	Fosfoenolpiruvato
LDH	Lactato deshidrogenasa	PSA	Persulfato de amonio
IPTG	Isopropil-β-D tiogalactopiranósido	Rib-5P	Ribosa, 5 fosfato
K ⁺	Catión monovalente, potasio	V	Volts
KCl	Cloruro de potasio	<i>vcIpk</i>	Gen de PK de <i>Vibrio cholerae</i>
kDa	Kilodaltones	<i>vcIIpk</i>	Gen de PK de <i>Vibrio cholerae</i>
LB	Medio Luria Bertani	<i>vcIIIpk</i>	Gen de PK de <i>Vibrio cholerae</i>
MgCl ₂	Cloruro de magnesio	<i>VcIPK</i>	Proteína PK de <i>Vibrio cholerae</i>
MgSO ₄	Sulfato de magnesio	<i>VcIIPK</i>	Proteína PK de <i>Vibrio cholerae</i>
NaCl	Cloruro de sodio	<i>VcIIIPK</i>	Proteína PK de <i>Vibrio cholerae</i>
NADH	Dinucléotido de nicotinamina y adenina reducido		

RESUMEN

La piruvato cinasa, es la enzima que cataliza el último paso de la vía glucolítica, transfiriendo un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al adenosín difosfato, para formar piruvato y adenosín trifosfato en presencia de dos cationes divalentes (Mg^{2+}) y un catión monovalente (K^+). Esta enzima se encuentra presente en todos los organismos y se ha estudiado por muchos años. Fue en la piruvato cinasa de músculo de conejo donde se descubrió que era absolutamente dependiente del catión monovalente. Con este descubrimiento se pensó que esta característica era universal en todas las piruvato cinasas, pero con la caracterización de más enzimas se encontró que muchas eran independientes del catión monovalente. En la mayoría de los organismos sólo se encuentra presente un tipo de piruvato cinasa ya sea dependiente o independiente de K^+ , no obstante, existen algunas γ -proteobacterias que presentan ambos tipos. Tal es el caso de *Vibrio cholerae* que pertenece a este grupo, su genoma posee tres genes parálogos que codifican para piruvato cinasa, dos de ellos para piruvato cinasa independiente de K^+ (pykA-1 o VcIIPK y pykA-2 o VcIIIPK) y uno para una piruvato cinasa dependiente del catión (pyk-F o VcIPK). El alineamiento de secuencias de aminoácidos muestra un porcentaje de identidad entre VcIPK y VcIIPK del 36.81%, VcIPK y VcIIIPK del 35.96%, mientras que entre VcIIPK y VcIIIPK es del 50%. Lo que indica que las dos proteínas independientes de K^+ son las más parecidas entre ellas.

Recientemente se clonaron, expresaron, purificaron y caracterizaron bioquímicamente dos de las tres proteínas de piruvato cinasa presentes en *Vibrio cholerae* bajo el sistema de sobreexpresión de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Sin embargo, VcIIIPK no fue posible estudiarla junto con las otras dos piruvato cinasas, debido a que se tuvieron problemas en el proceso de transformación de la cepa de sobreexpresión con el gen *vcIIIPK*. De este resultado surge la idea de encontrar una cepa de sobreexpresión del sistema BL21 que permita obtener la proteína recombinante pura y poder comparar sus propiedades cinéticas y estructurales entre las tres piruvato cinasas.

En el presente trabajo las tres construcciones de *vcIPK*, *vcIIPK* y *vcIIIPK* fueron transformadas en seis diferentes cepas del sistema de sobreexpresión de BL21. La ausencia de transformantes bajo el gen de *vcIIIPK* en las cepas de BL21(DE3), BL21Gold(DE3)pLysS y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL nos sugiere que es tóxico para estas cepas. La reducción en las tasas de crecimiento observada en las cepas de BL21(DE3)pLysS y OrigamiB(DE3)pLysS, indicó una mediana toxicidad del gen. En contraste la alta eficiencia de transformación en la cepa BL21-AI, indicó que el gen no es tóxico para esta cepa. Por lo tanto, a partir de la cepa BL21-AI se purificó VcIIIPK, sin embargo, los resultados mostraron que la proteína con el paso del tiempo se iba autoproteolizando por lo que se

decidió establecer un método de purificación y condiciones de almacenamiento para conservar la integridad de la proteína.

1. INTRODUCCIÓN

Se reconocen 78 especies de *Vibrio* distribuidas en cinco grupos; *vibrio*, *photobacterium*, *salinivibrio*, *enterovibrio* y *grimontia* (Thompson *et al.*, 2004). El género *Vibrio* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, de forma recta o curva, no producen esporas, presentan un diámetro entre 0.5 a 0.8 μm y entre 1.4 a 2.4 μm de largo. La mayoría de los patógenos son móviles por medio de su único flagelo polar (Baumann *et al.*, 1984). *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los patógenos más importantes.

Las especies de *Vibrio* representan una porción significativa de bacterias heterotróficas cultivables de océanos, aguas litorales y estuarios (Colwell, 1996). Estudios ambientales muestran que estas bacterias influyen fuertemente en el ciclo de los nutrientes de ambientes marinos.

V. cholerae es causante de la enfermedad del cólera, la cual es una enfermedad infecciosa aguda. Su transmisión se produce predominantemente a través de agua o alimentos contaminados con materia fecal (Bennish, 1994). El cuadro clásico de cólera se caracteriza por desarrollar bruscamente una intensa diarrea acuosa, habitualmente indolora y con vómitos. Son heces muy líquidas, con presencia de mucosidad sin sangre, adquiriendo un aspecto característico que comúnmente se les denomina “*heces de agua de arroz*”, lo cual produce una disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica, agotamiento del potasio y, en último término, puede provocar colapso vascular y la muerte (Sears y Kaper, 1996).

Sus requerimientos nutrimentales son simples, en cultivo puro son fototrópicos (su crecimiento en medio contiene una fuente de nitrógeno inorgánico, un carbohidrato utilizable y los minerales apropiados). Son halofílicas facultativas (crecen bien en presencia del ion sodio, pero también pueden crecer en ausencia de él), proliferan bien en una salinidad de 4 a 17 g de NaCl por litro de agua. Si bien alcanzan mayor densidad poblacional cuando crecen con aeración vigorosa, también pueden crecer anaeróbicamente. En general las especies de *Vibrio* son sensibles a pHs bajos y mueren rápidamente en soluciones con un pH por debajo de 6; no obstante son bastantes tolerantes a condiciones de alcalosis.

1.1 Clasificación de biotipos en *Vibrio cholerae*

Dentro de la especie, existen muchas diferencias entre las cepas tanto en potencial patogénico como epidémico. La diferencia entre las cepas patógenas y no patógenas radica en su contenido de genes de virulencia, en los genes que recibe y transfiere para toxinas, factores de colonización, resistencia a antibióticos, polisacáridos capsulares que proveen resistencia a cloro, así como antígenos de

superficie en los que se encuentra el lipopolisacárido O139 y la cápsula del antígeno O. La transferencia horizontal de estos genes de virulencia por fagos, islas de patogenicidad y otros elementos genéticos accesorios proporcionan información del surgimiento de nuevos patógenos bacterianos y su evolución para convertirse en nuevas cepas (Heidelberg *et al.*, 2000).

En base a las diferencias en la composición de su pared celular (antígeno somático tipo O (lipopolisacárido termoestable) de su membrana externa), a mediados de la década de 1930 se determinó que todas las cepas pandémicas eran aglutinadas con un único antisuero designado O1 (Winn y Koneman, 2008). A partir del antisuero O1 se describieron dos biotipos: “el Clásico” y “El Tor”. El biotipo clásico fue asociado con las primeras seis pandemias. La séptima pandemia es representada por el biotipo O1 El Tor, el cual comenzó a ser dominante desde 1961. Además se reconocen tres serotipos dentro de cada uno de los dos biotipos mencionados. Los serotipos se diferencian entre sí por los antígenos somáticos específicos que contengan. El serotipo Inaba posee los antígenos A y C; el Ogawa tiene los antígenos A y B y el Hikojima tiene los tres: A, B y C (Mata, 1992).

Las cepas no-O1, son aquellas que no aglutinan con el antisuero polivalente anti-O1, también se les denomina “NAG” y no sintetizan la toxina colérica, pero algunas cepas producen una enterotoxina termoestable de 17 aminoácidos (conocida como NAG-ST), muy parecida a la enterotoxina de *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica* (Honda *et al.*, 1985). Las cepas NAG-ST suelen aislarse de fuentes ambientales y pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extraintestinales.

1.2 Genoma de *Vibrio cholerae*

La secuencia genómica completa de *V. cholerae* El Tor N16961 (O1 biovar El Tor str. N16961) contiene un total de 4, 033, 460 pares de bases (pb). El genoma consiste en dos cromosomas circulares de 2, 961,146 pb (cromosoma I NC_002505.1) y 1,072, 314 pb (cromosoma II NC_00256.1); con un promedio en el contenido de G+C del 46.9% y 47.7% respectivamente. Hay un total de 3, 885 marcos abiertos de lectura (ORFs) y 792 terminadores independientes de rho o simples (presentan una estructura secundaria en forma de horquilla y una serie de ~6 residuos uracilo en el extremo 3' del ARN) (figura 1). La mayoría de los genes que codifican la replicación y reparación del ADN, transcripción, traducción, biosíntesis de la pared, una gran variedad de vías centrales de catabolismo y biosíntesis se localizan en el cromosoma I. En cambio, el cromosoma II contiene genes con la información necesaria para la patogenicidad bacteriana (la toxina colérica, el pilus co-regulado con toxina, los lipopolisacáridos y la maquinaria de secreción de proteínas

extracelulares). Además, el cromosoma II contiene una mayor fracción (59%) de genes hipotéticos y genes con función desconocida, comparado con el cromosoma I (42%). Esta partición de proteínas hipotéticas en el cromosoma II está altamente localizada en la isla de integrones. El cromosoma II también lleva la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, un gen aparentemente adquirido de una arquea (Heidelberg *et al.*, 2000).

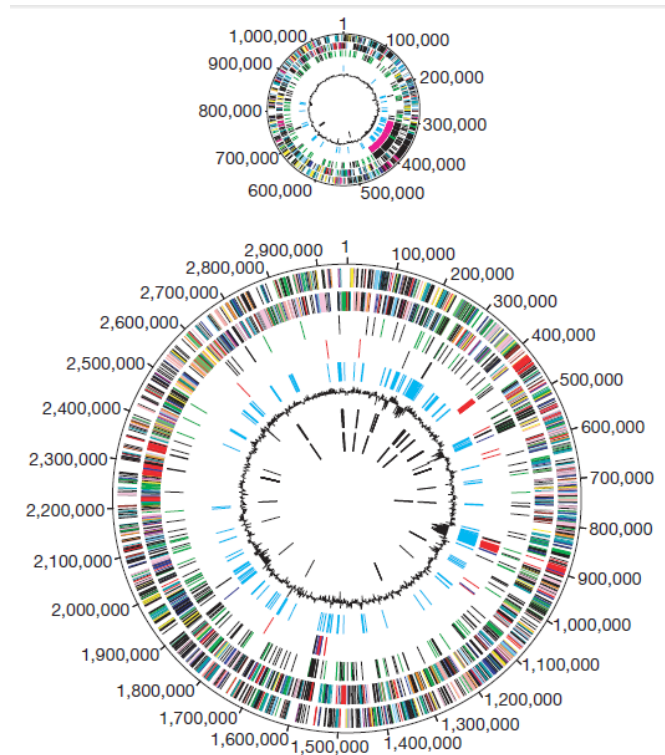


Figura. 1 Representación circular del genoma de *V. cholerae*. Se muestran el cromosoma I y II. Del exterior hacia el interior: el primero y segundo círculo muestran las regiones codificadoras de proteínas (las proteínas desconocidas e hipotéticas están en negro). El tercer círculo muestra genes recientemente duplicados en el mismo cromosoma (negro) y en diferentes cromosomas (verde). El cuarto círculo muestra los genes relacionados con transposón (negro), fago relacionados (azul), VCRs (secuencia de repetición de *V. cholerae*) (rosa) y patogénesis (rojo). El quinto círculo muestra regiones con valores χ^2 significantes para la composición de trinucleótidos en una ventana de 2.000 pb. El sexto círculo muestra el porcentaje G + C en relación con la media G + C para el cromosoma. El séptimo y octavo círculos son tRNAs y rRNAs, respectivamente (Heidelberg *et al.*, 2000).

Dentro del genoma de *V. cholerae* existe una larga isla de integrones (sistema de captura de genes) localizada en el cromosoma II (125.3 kbp). Esta contiene todas las copias de la secuencia de repetición de *V. cholerae* (VCR) y 216 ORFs. Entre los genes reconocidos se encuentran tres que codifican productos génicos que pueden estar implicados en la resistencia a fármacos (cloranfenicol acetiltransferasa, proteína de resistencia a fosfomicina y glutatión transferasa), varias enzimas del metabolismo del ADN (MutT, transposasa y una integrasa), genes potencialmente virulentos

(hemaglutinina y lipoproteínas) y tres genes que codifican productos génicos similares a las proteínas de "host addiction" (higA, higB y doc), que son utilizadas por los plásmidos para seleccionar su conservación por las células huésped (Heidelberg *et al.*, 2000).

La mayoría de los genes de *V. cholerae* son muy similares a los de *E. coli* (1,454 ORFs), pero 499 (12.8%) de los ORFs muestran una mayor similitud con otros genes de *V. cholerae*, lo que sugiere una reciente duplicación. Muchas de estas duplicaciones de ORFs codifican productos implicados en funciones regulatorias, quimiotaxis, transporte y unión, transposición, patogenicidad o codifican funciones desconocidas para la conservación de proteínas hipotéticas (Colwell, 1996).

V. cholerae posee 105 duplicaciones con al menos uno de cada ORF en cada uno de sus cromosomas indicando un reciente "crossover" (entrecruzamiento) entre los cromosomas. Existen varios ORFs con funciones aparentemente idénticas en ambos cromosomas que probablemente fueron adquiridos por transferencia horizontal de genes (Heidelberg *et al.*, 2000).

Además, el genoma de *V. cholerae* podría albergar una o múltiples repeticiones autónomas no esenciales de plásmidos circulares. A pesar de que ambos cromosomas son esenciales para la supervivencia, su contenido genómico puede cambiar a través del tiempo, guiado constantemente por la evolución de *V. cholerae*. Varios procesos incluyen transferencia horizontal de genes adquiriendo materiales genéticos como son plásmidos, fagos, transposones, elementos integrativos o conjugativos (ICEs) e islas genómicas que codifican diversas funciones y contribuyen significativamente a la patogenicidad, resistencia antimicrobiana y la capacidad de replicarse en ambientes específicos (figura 2).

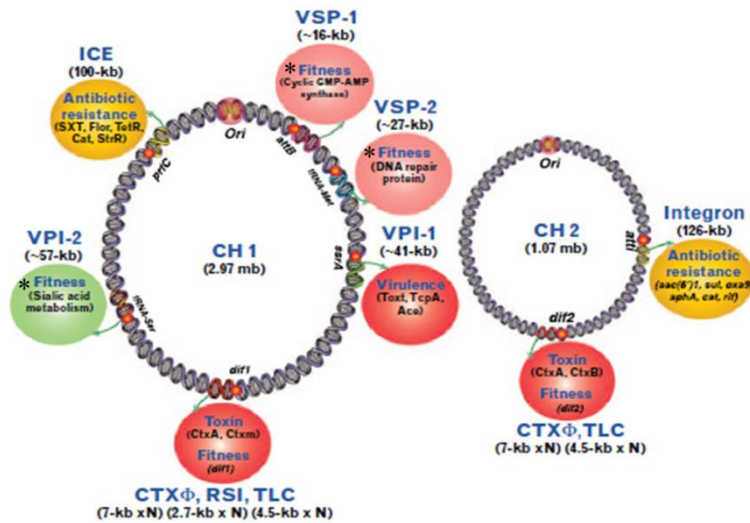


Figura. 2 Principales elementos genéticos móviles reportados en el genoma de *V. cholerae* epidémico. Cromosoma (CH); elementos integrativos o conjugativos (ICE); elemento críptico ligado a la toxina (TLC); isla de patogenicidad (VPI); isla de la séptima pandemia (VSP)). *Fitness bacterial: capacidad de ajustar el metabolismo para adaptarse a las condiciones ambientales, con el fin de sobrevivir y crecer y es un determinante fisiológico importante (Das B1 *et al.*, 2016).

Como se muestra en la tabla 1, muchas otras bacterias patógenas reportadas a la fecha adquieren sus genes que producen toxinas de una variedad de elementos móviles genéticos.

ADN portador	Organismo	Toxina	Enfermedad
Profago	<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina colérica	Cólera
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Leucocidina	Neumonía necrotizante
		Enterotoxina A	Intoxicación alimentaria
		Exfoliatina A	Síndrome de la piel escaldada
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Toxina Shiga	Disentería
	<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina botulínica	Botulismo
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Enterotoxina A	Fiebre escarlatina
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cryptic	Meningitis	

Profago-β	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina diftérica	Difteria
Plásmido	<i>Bacillus anthracis</i>	Toxina ántrax	Ántrax
	<i>Clostridium tetani</i>	Toxina tetánica	Tétanos
	<i>Escherichia coli</i>	Enterotoxina termolábil	Diarrea
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterotoxina D	Intoxicación alimentaria
		Exfoliatina B	Síndrome de la piel escaldada
Isla de patogenicidad	<i>Clostridium difficile</i>	Enterotoxina	Enterocolitis
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sistema de secreción tipo seis	Síndrome de shock tóxico
	<i>Salmonella enterica Typhi</i>	Enterotoxina B,C	Intoxicación alimentaria
		Toxina B de distensión citoletálica y toxina AB de tipo Pertussis	Tifoidea

(Das B1 *et al.*, 2016)

1.3 Origen y función del cromosoma II de *Vibrio cholerae*

Se sugiere que el cromosoma II fue originalmente un megaplásmido capturado por una especie ancestral de *Vibrio*. En general los genes del cromosoma II con una copia de funcionamiento aparentemente idéntica en el cromosoma I, parecen menos similares a los ortólogos presentes en otras especies de γ -proteobacterias. El cromosoma I contiene todos los operones del RNA ribosómico y al menos una copia de todos los RNA de transferencia (cuatro tRNAs se localizan en el cromosoma II, pero existen duplicados en el cromosoma I). Además, el cromosoma II transporta la región del integrón, un elemento usualmente localizado en plásmidos (Mazel *et al.*, 1998).

Aparentemente la captura del megaplásmido provocó que la composición del contenido de codones y el porcentaje de G+C, entre los dos cromosomas sea similar (excepto para elementos como la isla de integrón, genomas bacteriófagos, transposones, etc.). La estructura de los dos cromosomas también está presente en otras especies de *Vibrio* (Yamaichi *et al.*, 1999) sugiriendo que el contenido de genes del megaplásmido continúa proporcionando a *Vibrio* una ventaja evolutiva, tal

vez dentro del ecosistema acuático en donde las especies de *Vibrio* son los microorganismos frecuentemente dominantes (Colwell, 1996).

No está claro porque el cromosoma II no está integrado en el cromosoma I. Sin embargo, algunos autores proponen que tal vez el cromosoma II desempeñe una función especializada que proporciona la presión evolutiva selectiva para suprimir eventos de integración cuando esta ocurre. Por ejemplo, si bajo alguna condición ambiental existe una diferencia en el número de copias entre los cromosomas, entonces el cromosoma II puede tener genes acumulados que se expresan mejor a un número de copias mayor o menor que los genes en el cromosoma I. Una segunda posibilidad es que, en respuesta a señales ambientales, un cromosoma pueda dividirse en células hijas en ausencia del otro cromosoma (segregación aberrante). Dichas células que contienen un solo cromosoma estarían defectuosas en la replicación, pero todavía mantendrían la actividad metabólica (células "drones") y; por lo tanto, son una fuente potencial de células "viables pero no cultivables" (VBNC) (Roszak y Colwell, 1987).

Por otra parte, los dos cromosomas no sólo tienen diferente tamaño, sino que además tienen diferentes moléculas iniciadoras que controlan la replicación de manera independiente.

El ciclo celular de las bacterias de crecimiento lento se divide en tres periodos de tiempo con respecto a la replicación del ADN cromosómico: B es el periodo que abarca desde el nacimiento de la célula hasta el inicio de la replicación cromosomal, C es el periodo desde el inicio hasta la terminación de la replicación cromosomal y D es el periodo entre la terminación y la división celular. Por lo tanto, las células en el periodo B son pequeñas y contienen un equivalente genómico de ADN, en el periodo C las células son de un tamaño intermedio y contienen entre uno y dos equivalentes genómicos de ADN y las células en el periodo D son grandes y contienen dos equivalentes genómicos de ADN (Rasmussen, Jensen y Skovgaard, 2007). De esta forma se ha demostrado que el cromosoma II comienza su replicación tardíamente en el periodo C del ciclo celular, cuando la mayor parte del cromosoma I ya se ha replicado. Debido a la demora en el inicio del cromosoma II, los dos cromosomas terminan la replicación aproximadamente al mismo tiempo y el promedio de orígenes de replicación por célula es mayor para el cromosoma I que para el cromosoma II. La división del genoma y el retardo en la replicación del cromosoma II puede reducir la carga metabólica y la complejidad de la replicación del cromosoma posponiendo la síntesis de ADN hasta la última parte del ciclo celular (Rasmussen, Jensen y Skovgaard, 2007).

Los cromosomas de *V. cholerae* muestran que cada uno es controlado bajo su propia molécula iniciadora: la replicación del cromosoma I es controlada por la proteína DnaA, de forma similar al

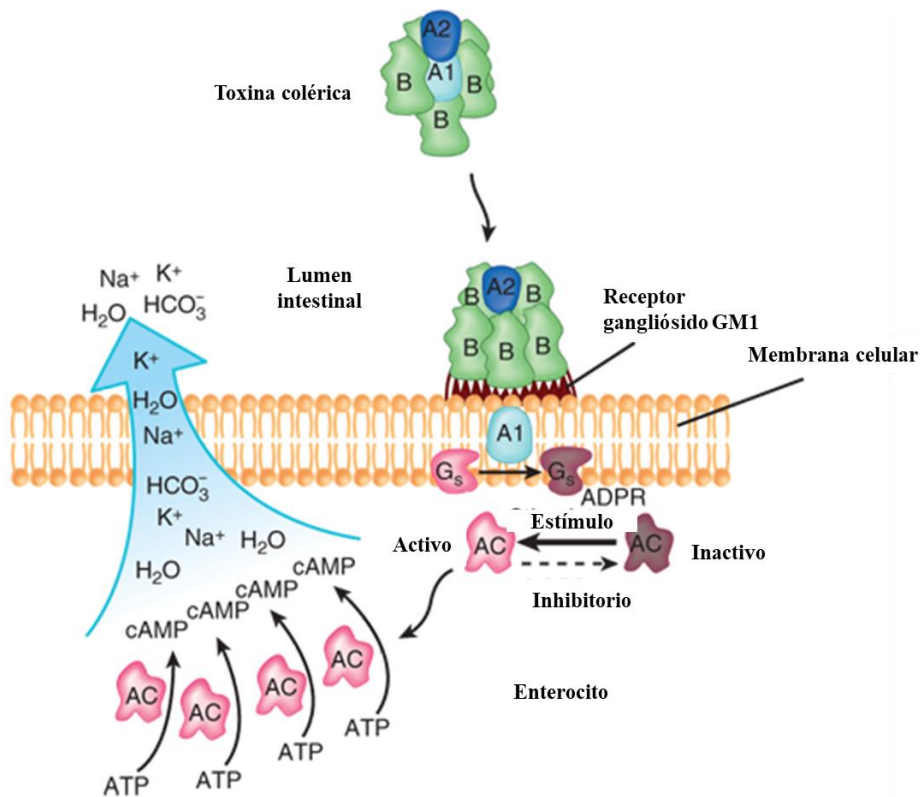
control de la replicación cromosómica en *E. coli* (Egan y Waldor, 2003). El incremento en la expresión de la proteína DnaA estimula la iniciación del cromosoma I pero no del cromosoma II. El cromosoma II tiene un origen tipo plasmídico, su replicación es controlada por la proteína RctB y requiere de la proteína DnaA.

El rol de la proteína DnaA es la apertura de la hebra. La proteína RctB es autoregulada y su actividad se controla por los sitios de titulación *rctA*. La inducción de la proteína RctB estimula la iniciación del cromosoma II pero no del cromosoma I. Se ha descrito (Rasmussen, 2007) un modelo llamado de "sincronización de terminación", donde el cromosoma II se inicia cuando el tamaño de la parte no replicada del cromosoma I es más o menos equivalente al tamaño del cromosoma II. La replicación de ambos cromosomas procede hasta que las horquillas de replicación lleguen a la terminal, aproximadamente al mismo tiempo en ambos cromosomas. De acuerdo con el modelo de sincronización de terminación, el número de *terI* será igual el número de *terII*, mientras que el número de *oriCI* será más alto que el número de *oriCII*. La tasa de acumulación de ADN será más alta en el período C cuando ambos cromosomas se están replicando.

1.4 Patogenicidad

1.4a Toxina colérica (TC)

La infección debido a *V. cholerae* inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados; después de superar la barrera ácida del estómago, la bacteria coloniza el epitelio del intestino delgado, principalmente por medio del pili corregulado por la toxina conocida como TCP, la adhesina más importante. La toxina colérica producida por los *Vibrios* adheridos se secreta, a través de la membrana externa bacteriana, al ambiente extracelular y se introduce a la célula a través de la unión de la subunidad B pentamérica con el gangliósido receptor GM₁. Una vez dentro de la célula, la subunidad A, compuesta por dos dominios estructurales denominados péptidos A₁ y A₂, sufre un procesamiento proteolítico. El péptido A₁ es la subunidad que posee una actividad enzimática específica, actúa intracelularmente, incrementando los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), cambiando la tendencia de absorción del intestino delgado por secreción. La subsecuente pérdida de agua y electrolitos conduce a la diarrea severa característica del cólera (esquema del Mecanismo de acción de la Toxina colérica) (Castañón-Sanchez, 2012).



Esquema del Mecanismo de acción de la Toxina colérica. (Ryan *et al.*, 2010).

La toxina colérica (TC), está formada por dos subunidades: la subunidad A (240 aminoácidos, PM 28 kDa) que está localizada en el centro, mientras que cinco subunidades B (103 aminoácidos, PM 11 kDa cada una; dando un PM de aproximadamente 56 kDa) se encuentran localizadas en la periferia. La subunidad A cuenta con una secuencia de identidad de más del 82% con la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*, mientras que las subunidades B presentan el 83% de identidad con esta última (Dallas y Falkow, 1980).

La subunidad A consiste en dos dominios (A₁ y A₂). En ambas toxinas, el dominio superior A₁ de la subunidad A en forma de cuña se mantiene por encima del plano de las subunidades B pentaméricas en forma de dona atadas por el dominio A₂, el cuál es una hélice alfa para casi toda su longitud. El carboxi-terminal de A₂ pasa a través de la abertura creada por la disposición de dona de las subunidades B. Los cuatro residuos carboxi-terminales de la cadena A₂ son Lys-Asp-Glu-Leu (K-D-E-L).

La TC en función de ser una toxina clásica tipo A-B (en la que la porción B de la toxina se une a su receptor en la célula hospedera y se separa de la porción A, que media la actividad enzimática responsable de la toxicidad) conduce a la ribosilación-ADP de la proteína G y la activación

constitutiva de AC, dando un aumento en los niveles de AMP cíclico dentro de la célula hospedera (Bharati y Ganguly, 2011), provocando una alteración en el transporte activo de los electrolitos a través de la membrana celular, lo cual impide la adsorción de líquido y conduce a su secreción en el intestino delgado.

La TC está codificada por los genes *ctx*. El gen *ctxA* codifica la subunidad A de la toxina, y el gen *ctxB* codifica la subunidad B. Los genes son parte del mismo operón *ctxAB*. El transcrito (ARNm) del operón *ctx* tiene dos sitios de unión a ribosoma (RBS), uno en el gen A y otro en el gen B. Este último es, por lo menos, siete veces más fuerte que el sitio de la región A. De esta forma el organismo es capaz de traducir más proteínas B que A, lo cual se requiere para ensamblar la toxina en la proporción apropiada (1A:5B). Los componentes son ensamblados en el periplasma después de la traducción. Cualquier subunidad B extra puede ser excretada por la célula, pero la subunidad A debe estar adherida a 5 subunidades B, para poder salir de la célula.

La subunidad A intacta no es activa enzimáticamente, y se debe fraccionar en los fragmentos A₁ y A₂, los cuales están unidos por un puente disulfuro (Kaper, Morris y Levine, 1995).

La secuencia genómica de *V. cholerae* El Tor N16961 revela una sola copia de los genes de la TC, *ctxAB* localizado en el cromosoma I dentro del genoma integrado de CTX ϕ , un fago filamentoso. El receptor para la entrada de CTX ϕ dentro de las células es el pilus co-regulado con toxina (TCP) y el grupo de genes de TCP, también reside en el cromosoma I. Como los genes estructurales para TC y TCP, el gen regulador *toxR*, que controla su expresión *in vivo*, es también localizado en el cromosoma I (Lee, Waldor y Camilli, 1999).

Por otro lado, el fago CTX ϕ tiene una región que codifica para una toxina RTX (*rtxA*), su activador (*rtxC*) y sus transportadores (*rtxBD*).

También, están presentes genes que codifican numerosas toxinas potenciales, incluyendo varias hemolisinas, proteasas y lipasas. Estas incluyen *hap*, la proteasa de hemaglutinina, una metaloproteasa secretada que parece atacar proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de las uniones estrechas de células epiteliales, e *hlyA*, que codifica una hemolisina secretada que muestra actividad enterotóxica (Alm, Stroehrer y Manning, 1988). En contraste con CTX, RTX y todos los factores de colonización intestinal conocidos, los factores de virulencia de los genes *hap* y *hlyA* residen en el cromosoma II.

1.5 Transporte y metabolismo energético

V. cholerae tiene un hábitat natural diverso que incluye la asociación con el zooplancton en una etapa sésil, un estado planctónico en columnas de agua y la capacidad de actuar como un patógeno dentro del tracto gastrointestinal humano. Por lo tanto, no es de extrañar que este organismo mantenga un amplio repertorio de proteínas de transporte con una amplia especificidad de sustrato y las vías catabólicas correspondientes para que pueda responder eficientemente a estos diferentes ecosistemas y en constante cambio. Muchos de los sistemas transportadores de azúcares y sus correspondientes enzimas catabólicas están localizadas en un solo cromosoma (es decir, el transporte de ribosa, lactato y sus enzimas de degradación están contenidas en el cromosoma II, mientras que los sistemas de trehalosa residen en el cromosoma I). Sin embargo, muchas de las otras vías del metabolismo energético están divididas (glucólisis, etc.) entre los dos cromosomas (figura 3).

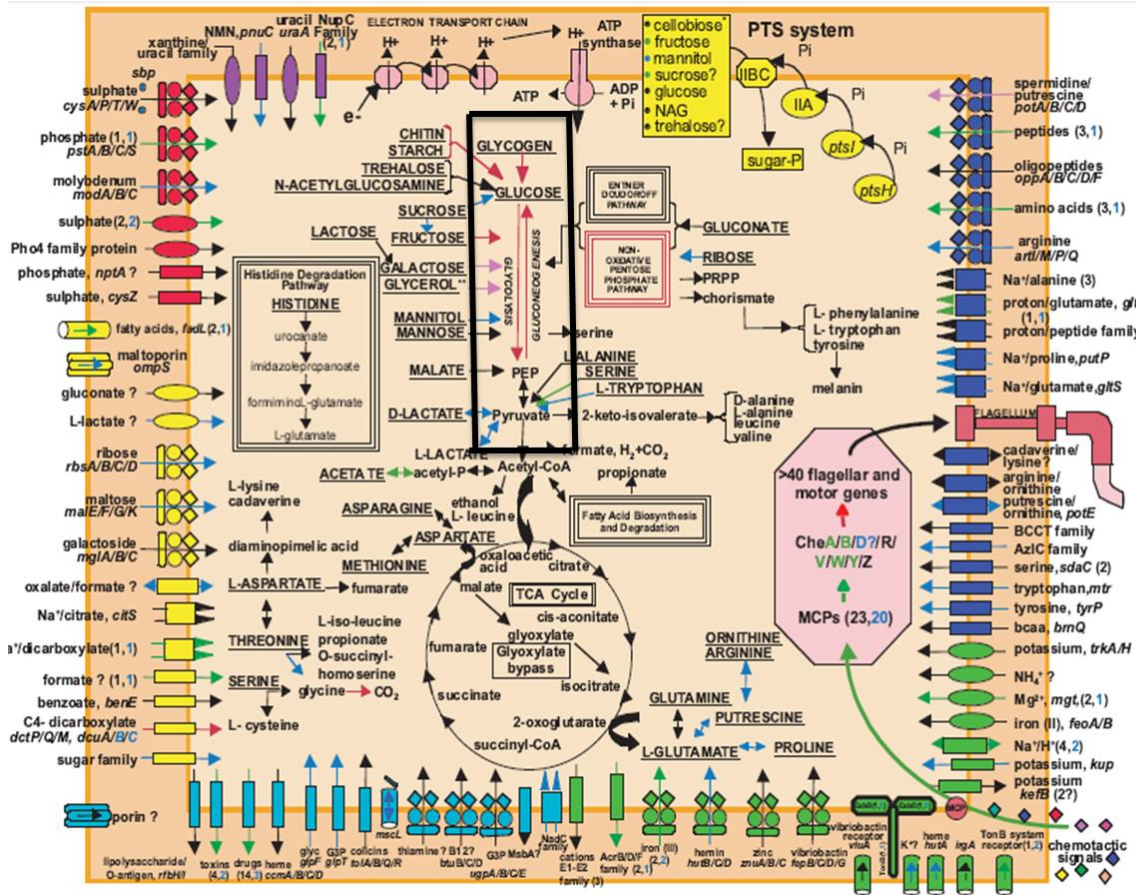


Figura 3. Descripción general del metabolismo y transporte de *V. cholerae*. Se muestran las rutas de producción de energía y los compuestos del metabolismo orgánico, ácidos y aldehídos. Los transportadores están agrupados por especificidad de sustratos: cationes, aniones, carbohidratos, nucleósidos, purinas y pirimidinas, aminoácidos/péptidos/aminas y otros. La exportación o importación de solutos se designa por la dirección de la flecha a través del transportador. La ubicación de los genes en los dos cromosomas para ambos transportadores y pasos metabólicos, se indican por el color de la flecha: todos los genes ubicados en el cromosoma I (negro); todos los genes ubicados en el cromosoma II (azul); todos los genes necesarios para la vía completa en un cromosoma, pero con una copia duplicada de uno o más genes en el otro cromosoma (púrpura); genes requeridos en ambos cromosomas (rojo); completar la vía en ambos cromosomas (verde). (Rutas completas, excepto glicerol, se encuentran en el cromosoma I). Los números de genes en los dos cromosomas están entre paréntesis y siguen el esquema de colores para la ubicación del gen. Los sustratos subrayados y con mayúscula se pueden utilizar como fuentes de energía. PRPP (fosforribosil pirofosfato); PEP (fosfoenolpiruvato); PTS (sistema de fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato); ATP (adenosín trifosfato); ADP (adenosín difosfato); MCP (proteína quimiotáctica que acepta grupos metilo); NAG (N-acetilglucosamina); G3P (glicerol-3-fosfato); gly (glicerol); NMN (Nicotinamida mononucleótido). En el recuadro negro se enmarca la ruta de interés que corresponde a la glucólisis (Heidelberg et al., 2000)

En ambientes acuáticos, *V. cholerae* utiliza principalmente la quitina como fuente de carbono y nitrógeno. Esta fuente de energía es importante ya que está asociada con el zooplancton que presenta un exoesqueleto quitinoso (Colwell, 1996).

De acuerdo a la figura 3 mostrada con anterioridad y un análisis de la base de datos realizado en programa KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se observa que *V. cholerae* tiene la

vía glucolítica completa, así como algunas duplicaciones de sus genes que se muestran en la siguiente tabla (tabla 2) en conjunto con su posición dentro de los cromosomas:

Tabla 2. Análisis de la vía glucolítica de *V. cholerae*

Enzima	Cromosoma		Posición
	I	II	
Glucosa-6-fosfato isomerasa	1		389886..391538
Fosfofructoquinasa-1	1		2856783..2857778
Fructosa-1,6-bisfosfatasa	1		2724901..2725911
	1		2855699..2856706
Fructosa bisfosfato aldolasa, clase II	1		509405..510481
Triosa fosfato isomerasa (TIM)	1		2837230..2838027
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	1	1	1136296..1137297 (cromosoma I)
	1		2152265..2153260 (cromosoma I)
			785728..787257 (cromosoma II)
Fosfoglicerato quinasa	1		508071..509249
Fosfoglicerato mutasa, 2,3-bisfosfoglicerato independiente	1		354684..356216
Enolasa (Fosfopiruvato hidratasa)	1		2626616..2627917
Piruvato cinasa	1	1	514732..516144 (cromosoma I)
	1		2160989..2162434 (cromosoma I)
			651241..652701 (cromosoma II)

De este análisis se puede observar, que de todos los genes de la vía glucolítica solamente el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y de la piruvato cinasa se encuentran duplicados en el

cromosoma II y además ambos genes se encuentran dentro del cromosoma I. Acerca de las enzimas del metabolismo energético, requerimientos energéticos y caracterización de enzimas de las vías metabólicas de *V. cholerae* no existe mucha información en la literatura.

A este respecto, es interesante para nuestra investigación la caracterización funcional de una de las enzimas de la vía glucolítica de *V. cholerae* que tiene triplicado en su genoma el gen que codifica para la enzima piruvato cinasa. El resto de la vía contiene todos sus genes el cromosoma I con una sola copia (tabla 2).

1.6 La piruvato cinasa

La PK (ATP-piruvato 2-O fosfotransferasa, EC 2.7.1.40) es la enzima que cataliza el último paso de la vía glucolítica. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al adenosín difosfato (ADP) para producir adenosín trifosfato (ATP) y piruvato en presencia de dos iones Mg^{2+} y un ión K^+ (figura 4).

Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas; en la primera ocurre la transferencia reversible del grupo fosfato del PEP al complejo Mg-ADP, dando como producto Mg-ATP y piruvato en su forma enólica inestable; en la segunda etapa que es irreversible, el piruvato enólico es estabilizado por un protón, llevándolo a su conformación ceto estable. El protón que estabiliza al piruvato es donado por un ión hidronio. La reacción se lleva a cabo en presencia de dos equivalentes de un catión metálico divalente (Mg^{2+}) y un catión monovalente (K^+). La PK de músculo de conejo fue la primera enzima en que se reportó un aumento significativo de su actividad cuando el K^+ estaba presente (Boyer, Lardy y Phillips, 1942).

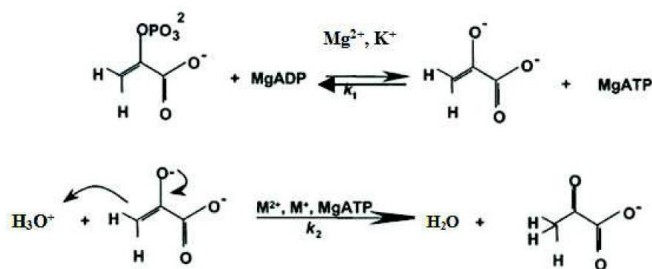


Figura. 4 Reacción que cataliza la piruvato cinasa

Esta fosforilación a nivel de sustrato representa el último paso de cosecha energética de la glucólisis y como es una reacción altamente exergónica es irreversible bajo condiciones fisiológicas (Nowak,

1978). Además de la síntesis de ATP, la PK también produce piruvato, que es un intermediario importante para un numeroso grupo de procesos metabólicos.

La PK existe en la naturaleza como un homotetrámero con subunidades de 50-60 kDa aproximadamente, cada una de ellas compuesta por cuatro dominios: el dominio amino terminal (se encuentra presente solo en eucarias) es un motivo hélice-giro-hélice, el dominio A es un barril α/β , el dominio B es un barril β , y el dominio C está formado por 5 hélices y 5 hojas β (figura 5b).

El sitio activo está localizado entre el dominio A y B; aunque la mayoría de las PKs se activan por un efector alostérico localizado en el dominio C. El dominio B ó tapa del sitio activo, se localiza al final del barril α/β del dominio A y modula el acceso del sitio activo, (figura 5b) (Morgan *et al.*, 2014).

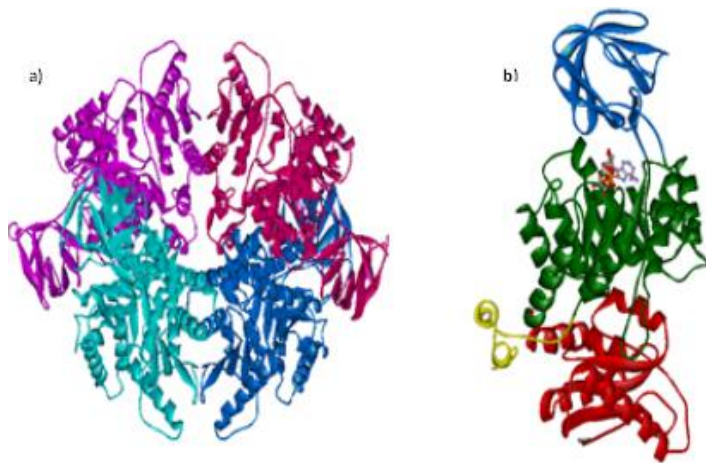


Figura. 5 a) Estructura de la PK de músculo de conejo (RMPK) (PDB; 1PKN), b) En un monómero en amarillo se muestra el dominio amino-terminal, en azul se marca el dominio B (tapa), en verde el dominio A (barril α/β) y el dominio C (alostérico) en color rojo.

1.7 Antecedentes de la piruvato cinasa

Por mucho tiempo se pensó que la dependencia del catión monovalente (K^+) era una característica universal para todas las PKs pero conforme fueron estudiadas y caracterizadas, se dieron cuenta que en algunos organismos, estas enzimas no requerían de K^+ . A este respecto Laughlin y Reed en 1997, compararon las secuencias de aminoácidos de la piruvato cinasa de músculo de conejo (PKM1) contra dos PK de bacteria (*E. coli* y *C. glutamicum*) que no requieren de K^+ para expresar actividad catalítica (figura 6).

Encontraron que el único cambio significativo en la vecindad del sitio activo entre estas enzimas era la sustitución del glutámico 117 en la enzima de músculo por una lisina en las enzimas

independientes de K^+ . El glutámico 117 se encuentra en la cercanía del sitio de unión del K^+ , a una distancia de 4.5 Å del catión monovalente. La proximidad de la cadena lateral del residuo 117 al sitio de unión del K^+ sugirió que en las enzimas independientes de catión, el grupo amino protonado de la lisina podría proveer la carga interna que se requiere para catalizar.

```

C. glutamicum      L A D L Q G P K I R L
E. coli            L G D L Q G P K I R V
PKM1                110 A L D T K G P E I R T 120

```

Figura. 6 Alineamiento y comparación de las secuencias de las piruvato cinasas tipo II de *E. coli*, *C. glutamicum* y músculo de conejo. La región del alineamiento es del residuo 110 al 120 y la numeración es con respecto a la secuencia de la piruvato cinasa de músculo de conejo (PKM1). Los residuos de la posición 117 se encuentran en color rojo.

Con el objeto de probar si la lisina podía sustituir al K^+ , construyeron la mutante E117K de la PK de músculo de conejo (PK-E117K). Encontraron que la mutante presenta una actividad independiente de K^+ de alrededor de 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (>200 veces más activa que la PK de músculo en ausencia de K^+) y no era activable por catión monovalente. Los autores propusieron que la carga positiva de la lisina provee la carga interna que evita la necesidad de tener K^+ .

1.8 Distribución y abundancia de las piruvato cinasas dependientes e independientes de K^+

Como se mencionó anteriormente una característica común que comparten estas enzimas que tienen actividad independiente de K^+ es el hecho de que poseen lisina en la posición 117, en lugar del glutámico presente en las enzimas dependientes de K^+ . Esta observación fue hecha por el grupo de Laughlin y Reed en 1997, quienes demostraron que la sustitución del glutámico 117 por lisina en la enzima de músculo de conejo fue suficiente para convertir esta enzima en independiente de K^+ .

Para conocer más sobre la abundancia de las PKs dependientes e independientes de K^+ en la naturaleza, se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de las secuencias reportadas para esta familia de enzimas (Oria-Hernández *et al.*, 2006). En este estudio se compararon entre sí 234 secuencias que, al ser analizadas, mostraron un árbol dicotómico que divide a la PK en dos grandes grupos (figuras 7 y 8). De estas 234 secuencias 68 pertenecían a Eucariontes distribuidas en: 27 animales, 10 protistas, 18 hongos y 13 plantas; 150 Bacterias y 16 Arqueas.

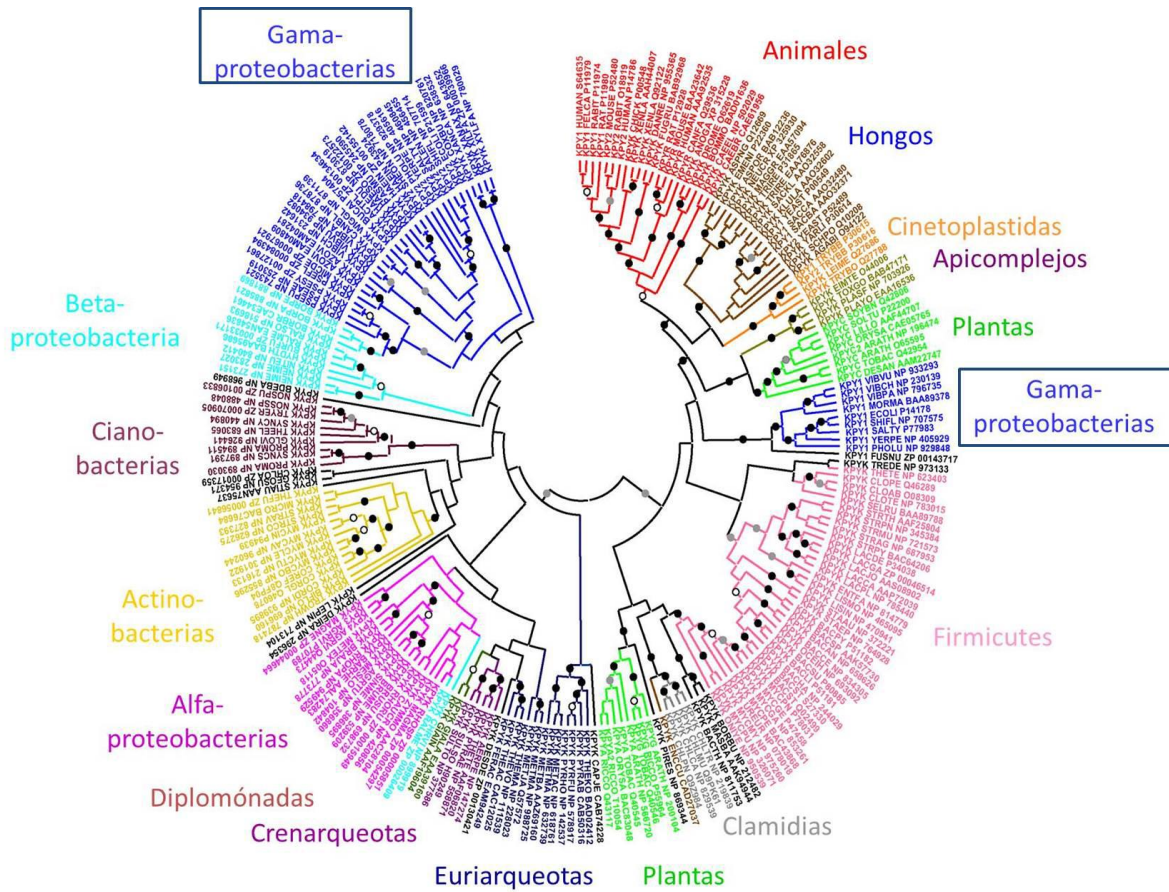


Figura. 7 **Árbol filogenético de la piruvato cinasa.** Cada una de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético se identifica por el número de acceso de la secuencia en el NCBI y por el nombre común o una breve descripción del organismo (primeras letras de la especie y las subespecies; ej. CRONIL, *Crocodylus niloticus*). Los nombres indicados en negro corresponden a grupos taxonómicos menores pertenecientes a bacterias. El análisis filogenético se realizó utilizando los métodos de máxima parsimonia, mínima evolución, vecino más próximo y UPGMA. Resultados cualitativamente similares se obtuvieron con los cuatro métodos, pero solo se muestra un árbol generado por máxima parsimonia (Oria-Hernandez *et al.*, 2006).

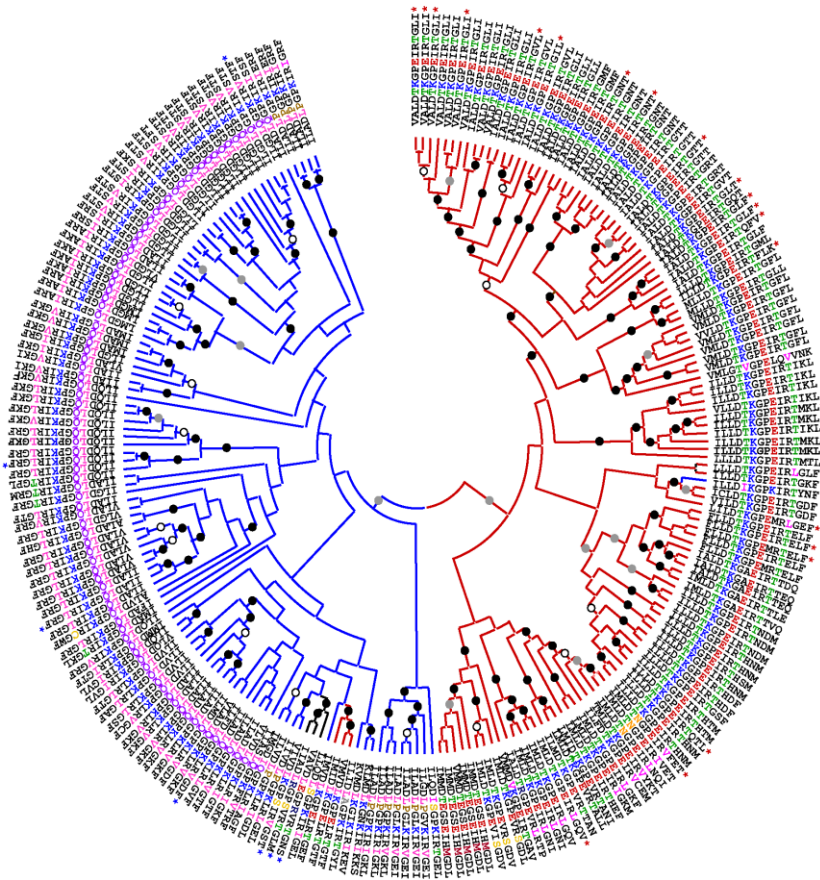


Figura 8. Correlación entre la dependencia del K^+ de la piruvato cinasa y la topología dicotómica del árbol filogenético. Este árbol muestra la secuencia entre los residuos 110 y 124. En la rama roja se encuentran las enzimas dependientes de K^+ y con Glu 117, las que están marcadas con asterisco están caracterizadas como dependientes de K^+ . En la rama azul se encuentran las piruvato cinasas con Lys 117 y con asterisco las caracterizadas como independientes de catión monovalente. Los residuos en las posiciones 113, 114, 117 y 120 están resaltados en colores.

Como se observa en las figuras 7 y 8 el árbol presenta una topología dicotómica, con dos ramas claramente separadas, en donde el 54% se compone por PKs dependientes y el 46% por independientes de catión; lo que indica que ambas características son igualmente frecuentes. Por otro lado se puede observar que solo el grupo de las γ -proteobacterias se localizan en ambas ramas del árbol, dentro de ellas se encuentra *V. cholerae*.

Adicionalmente se encontró que existe una covariación conservada de algunos residuos vecinos con respecto al residuo en la posición 117. Cuando el Glu está en la posición 117, en el 80% de los casos el residuo en la posición 113 es Thr, en el 114 Lys y en el 120 Thr. Del mismo modo, cuando la Lys está en la posición 117, en el 77% de los casos la posición 113 está ocupada por Leu, la 114 por Gln y la 120 por un residuo hidrofóbico (Ile, Leu o Val) (figura 9) (Oria- Hernández *et al.*,

2006). En el laboratorio se está estudiando la covariación de los residuos por medio de mutagénesis sitio dirigida.

1.9 Las piruvato cinasas de *V. cholerae*

Dentro del grupo de γ -proteobacterias distribuidas en ambas ramas del árbol filogenético de PK se encuentre *V. cholerae*. Como se mencionó anteriormente en el análisis del KEGG de *V. cholerae*, se encuentran 3 genes parálogos que codifican para PK. Los resultados del árbol filogenético muestran que, de las tres PKs de *V. cholerae*, dos se encuentran en la rama de las independientes y una en la rama de las dependientes de K^+ . En la figura 9 se muestra un acercamiento a la región de la posición 117 que da la dependencia por el catión monovalente, y además se describe que el gen *pyk-F* o *vcIpk* codifica para la proteína *VcIPK* que es dependiente de K^+ . Los genes *pykA-1* o *vcIIpk* y *pykA-2* o *vcIIIpk* codifican para *VcIIPK* y *VcIIIPK*, respectivamente, ambas independientes de K^+ . De estos tres genes, *vcIIIpk* se encuentra en el cromosoma II y los otros dos genes en el cromosoma I (tabla 2). El porcentaje de identidad entre los tres genes es de: entre *vcIpk* y *vcIIpk* de 48%; entre *vcIpk* y *vcIIIpk* de 47.8% y entre *vcIIpk* y *vcIIIpk* del 57.8%.

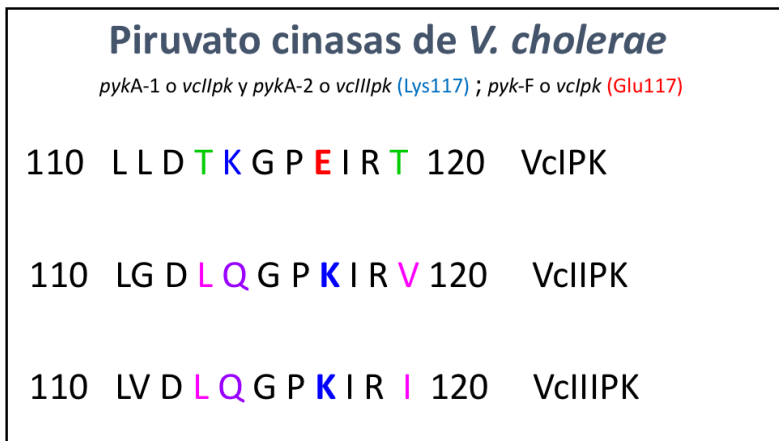


Figura. 9 Genes de *V. cholerae* que codifican para piruvato cinasa. Se muestra que la posición 117 da la dependencia o independencia por el catión potasio.

El porcentaje de identidad entre las tres isoformas se muestra en la tabla 3 en un alineamiento de secuencias de aminoácidos. Se puede observar que el porcentaje de identidad entre *VcIPK* y *VcIIPK* es del 36.81%, entre *VcIPK* y *VcIIIPK* es del 35.96%, mientras que entre *VcIIPK* y *VcIIIPK* es del 50%. Lo que indica que las dos proteínas independientes de K^+ son las más parecidas entre ellas.

Tabla 3. Resumen del alineamiento de secuencias de las tres isoformas de PK de *V. cholerae*

	Residuos idénticos	Residuos similares	Porcentaje de identidad	Porcentaje de similitud
VC I (1-470) vs VC II (1-481)	180	93	36.81	55.83
VC I (1-470) vs VC III (1-486)	178	98	35.96	55.76
VC II (1-481) vs VC III (1-486)	246	78	50	65.85

* Determinados por SMSB(Sequence Manipulation Suites)

De los tres genes de PK, recientemente en el laboratorio se clonaron, expresaron, purificaron y caracterizaron dos de ellos: *vcIpk* (codifica para *VcIPK*) y *vcIIpk* (codifica para *VcIIPK*); los resultados encontrados por Guerrero-Mendiola *et al.*, 2017 mostraron que *VcIPK* y *VcIIPK* son K^+ dependiente e independiente de K^+ , respectivamente. Las isoenzimas se modulan por diferentes efectores alostéricos, *VcIPK* se regula por Fru 1,6-BP, que funciona principalmente como sistema “tipo K” y solo actúa sobre el PEP, mientras que *VcIIPK* presenta una activación esencial por Rib 5-P comportándose como un sistema “tipo mixto” y tiene efecto sobre todos los sustratos (PEP, ADP-Mg y Mg^{2+} libre). Es decir, mientras que *VcIPK* expresa con altas actividades en ausencia de Fru 1,6-BP, *VcIIPK* depende completamente de Rib 5-P para expresar altas actividades. Sin embargo, el efecto de la Rib 5-P sobre *VcIIPK* desaparece cuando la enzima está en presencia de Mn^{2+} . Cabe mencionar que en presencia de sus respectivos activadores, las 2 PKs son capaces de presentar eficiencias catalíticas iguales.

Debido a que se encontró que *VcIPK* y *VcIIPK* se coexpresan en *V. cholerae*, y la concentración de sus respectivos reguladores alostéricos es suficiente para expresar su máxima actividad, se puede concluir que al menos estas dos enzimas contribuyen para llevar a cabo la función de piruvato cinasa en esta bacteria. De cualquier forma, no se puede descartar que la expresión de estas PKs varíe dependiendo de las condiciones de crecimiento y requerimientos metabólicos particulares.

Por otro lado *VcIIPK* no fue posible estudiarla junto con las otras dos PKs, debido a que se tuvieron problemas en el proceso de transformación del gen en la cepa de sobreexpresión. *VcIPK* y *VcIIPK* se transformaron y sobreexpresaron fácilmente en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

2. JUSTIFICACIÓN

Se tiene información suficiente en la que se demuestra que existen dos tipos de PKs, las dependientes y las independientes de K^+ y que las PKs independientes de K^+ se encuentran distribuidas a lo largo de los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eucaria) mientras que las PKs dependientes de K^+ sólo se encuentran en Bacteria y Eucaria (Oria-Hernández *et al.*, 2006; De la Vega-Ruíz, 2015). Y como dato interesante algunas γ -proteobacterias presentan ambas enzimas. Sin embargo, *V. cholerae* presenta tres genes que codifican para la PK, de entre ellos dos independientes y uno dependiente de K^+ .

Recientemente se caracterizaron bioquímicamente dos de las tres piruvato cinasa presentes en *V. cholerae* (Guerrero-Mendiola, 2017). Sin embargo, es interés del laboratorio conocer la función de las tres proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que surgen preguntas como: ¿por qué esta bacteria posee tres enzimas que llevan a cabo la misma reacción?, ¿por qué en el gen que codifica para *vcIIIpk* no fue factible la presencia de clonas en la cepa de sobreexpresión BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, mientras que en los otros dos genes si? y ¿qué características tendrá este gen para presentar este comportamiento?

Los resultados previos en el procesos de transformación de *vcIIIpk*, parecían indicar que este gen es tóxico para la bacteria BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. De este resultado surge la idea de encontrar una cepa de sobreexpresión del sistema BL21 que permita obtener la proteína recombinante y poder comparar los resultados entre las tres piruvato cinasas. Para cumplir con el resultado en este trabajo nos propusimos el siguiente objetivo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

1.-Identificación de cepas de *Escherichia coli* BL21 estables al gen *vcIIIpk*, para la sobreexpresión de la proteína recombinante VcIIPK.

3.2 Objetivos particulares

1.1 Transformar en las cepas de sobreexpresión: BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, BL21(DE3)pLysS, BL21-Gold(DE3)pLysS, Origami B(DE3)pLysS y BL21-AI; la construcción *vcIIIpk* y como controles las construcciones *vcIpk* y *vcIIpk*.

1.2 Transformar en la cepa huésped XL10-Gold.

1.3 Realizar curvas de sobreexpresión para VcIIPK.

1.4 Purificación de la proteína recombinante VcIIPK mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de células competentes.

Las células que son aptas para recibir ADN exógeno se dice que son competentes. Tales bacterias son capaces de *transformarse naturalmente*. Por el contrario otras bacterias no se hacen competentes bajo las condiciones ordinarias de cultivo, pero pueden hacerse competentes mediante una serie de tratamientos químicos o artificiales, tales como la exposición a elevadas concentraciones de cationes divalentes. Tales sistemas de transformación se denominan *transformación artificial* (Roger *et al.*, 1992).

En el presente trabajo las células competentes se prepararon mediante un precultivo de 10 ml en medio LB (Luria Bertani) que se incubó a 37°C, 180 rpm, toda la noche. Posteriormente en un matraz con 50 ml de medio LB, se inoculó hasta alcanzar una densidad óptica ($D.O_{(600nm)}$) de 0.1, enseguida se mantuvieron en agitación a 180 rpm durante 2- 3 horas a 37°C, hasta alcanzar una $D.O_{(600nm)}$ de 0.5. Posteriormente el cultivo celular se centrifugó 10 min a 4600 rpm durante 10 min. Subsecuentemente el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio 2xYT-CC (NaCl 0.1 M, PEG-8000 10%, glicerol 10%, DMSO 5%, $MgCl_2$ 100 mM, $MgSO_4$ 100 mM), incubándose en hielo durante 1 hr; transcurrido el tiempo se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 min y se resuspendieron con 3 ml de medio 2xYT-CC. Finalmente se hicieron alícuotas de 70 μ l y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.2 Extracción de ADN.

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula.

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa de hidratación alrededor de la molécula. Sin embargo, en presencia de etanol, se rompe la capa de hidratación y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN se precipite (Sambrook *et al.*, 1989).

En general, los protocolos consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

La primera parte de la extracción de ADN corresponde al protocolo del kit The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, posterior a la precipitación del ADN plasmídico se siguió el protocolo de extracción por el método fenol-cloroformo.

The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega consiste en la lisis alcalina de células bacterianas, seguido de la unión de ADN en una matriz de sílice en presencia de altas concentraciones de sal, un posterior lavado y elución.

A partir de las construcciones *vcIpk/pET3a*; *vcIIpk/pET3a* (Guerrero-Mendiola, 2017) y *vcIIIpk/pET3a* (previamente clonada en el laboratorio, en proceso de publicación) transformadas en la cepa XL10-Gold se extrajo ADN por el método fenol-cloroformo.

Se inoculó una colonia de cada una de las construcciones en la cepa XL10-Gold en 50 ml de medio LB, incubándolo toda la noche en agitación 180 rpm, 37°C. Se centrifugaron los cultivos 20 min a 4,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 250 µl de amortiguador de resuspensión que contiene RNAsa; se agregaron 250 µl de amortiguador de lisis con el cual se desnaturaliza el ADN cromosómico, las proteínas y la liberación del plásmido, esto se mezcló 4 veces por inversión. Posteriormente se le agregó 10 µl de solución de proteasa alcalina para inactivar endonucleasas y otras proteínas, esto se mezcló por inversión 4 veces más y se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente.

Finalmente se adicionaron 350 µl de solución neutralizadora para la precipitación de proteínas, ADN cromosómico, se mezcló por inversión 4 veces y los agregados insolubles de proteína y de ADN cromosómico se separan por centrifugación 10 min a 13, 000 rpm a temperatura ambiente, quedando el ADN plasmídico en el sobrenadante. Se precipitó el ADN plasmídico en 40 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 600 µl de isopropanol frío, dejándose incubar a temperatura ambiente 15 min. Subsecuentemente se centrifugó 10 min a 14, 000 rpm. La fase superior se eliminó por inversión sin tocar la interfase, el precipitado se lavó con 1ml de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó 10 min a 14, 000 rpm; la fase superior se desechó por inversión y el precipitado se secó. A cada tubo se le adicionó 100 µl de agua estéril, se limpió con RNAsa (100µ/ml) 90 min a 37°C, se centrifugó 5 min a 13, 000 rpm. Posteriormente se lavó con 2.5 ml de alcohol isoamílico-cloroformo 2 veces y entre cada lavado se centrifugó 5 min a 13, 000 rpm. Se adicionó 1/10 parte de acetato de sodio 3M, pH 5.2; se agregó 1 ml de etanol absoluto, dejando 1 hr a -20°C.

Finalizando el tiempo de incubación, se centrifugó 20 min a 10,000 rpm, 4°C, el sobrenadante se desechó. El botón formado se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó 5 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. El botón se secó a temperatura ambiente con ayuda del Speed vac para resuspenderlo en 200 µl de agua miliQ.

4.3 Cuantificación de ADN.

El ADN obtenido de cada una de las construcciones se cuantificó en un NanoDrop™ a 260 nm, obteniendo los siguientes valores:

	<i>vcIpk</i>	<i>vcIIpk</i>	<i>vcIIIpk</i>
Concentrado[µg/µl]	6.92	8.61	6.073
Concentración total [µg]	1 340	1 722	1 214

Partiendo del ADN concentrado se realizó una dilución que fue cuantificada y se calculó el volumen para 500 ng.

4.4 Secuenciación.

Para confirmar las construcciones en los ADN purificados, se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, utilizando el primer universal T7 promoter y T7 terminador.

4.5 Transformación.

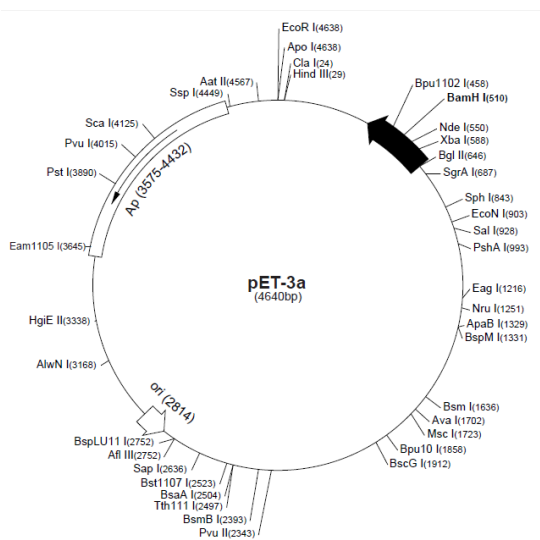
La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de un replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga (Sinha, 2012).

El proceso de transformación genética consta de cuatro etapas que son comunes para todas las bacterias y necesarias para la detección exitosa de las transformantes. Estas etapas son: (I) el desarrollo de un estado de competencia en la célula, (II) la unión de la molécula de ADN a la superficie celular, (III) su entrada y procesamiento y, (IV) la expresión fenotípica del nuevo genotipo resultante (Baur *et al.*, 1996).

Para las transformaciones se utilizaron las siguientes cepas de sobreexpresión:

- *BL21(DE3)*
- *BL21-CodonPlus(DE3)-RIL*
- *BL21(DE3)pLysS*
- *BL21-Gold(DE3)pLysS*
- *BL21-AI*
- *Origami B(DE3)pLysS*
- *XL10-Gold* (cepa control y de replicación)

El sistema de expresión utilizado (pET System Novagen) ha sido desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El gen *vcIIIpk* se clonó en el vector pET, en este caso se utilizó un pET3a-HisTEVP modificado. Este vector contiene las secuencias de reconocimiento para la proteasa del virus del tabaco (TEVp) y una etiqueta de seis residuos de histidina (His-tag) en el extremo 5' del gen insertado (amino terminal) (figura 10) (Enríquez-Flores, 2011), este se transformó en las diversas cepas previamente mencionadas, se utilizó como control la línea celular XL10-Gold. Como controles genéticos (de transformación) se utilizaron los genes *vcIpk* y *vcIIpk*



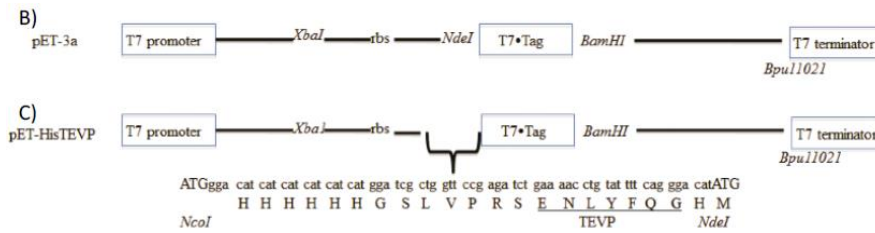


Fig. 10 a) Sistema de expresión pET-3a, b) Secuencia original que codifica en la región pET3a, c) secuencia modificada de pET3a (pET3a-HisTEVP), el sitio de la inserción y la secuencia de la región que contiene las (His)6-tag y el sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (TEVP).

Las transformaciones se realizaron por triplicados en *vcIpk*, *vcIIpk* y *vcIIIpk* con 500 ng de ADN, adicionalmente se utilizaron dos concentraciones para *vcIIIpk*: 250 ng (0.883 µl) y 1000 ng (3.532 µl).

Las células competentes se almacenaron a -70°C en alícuotas de aproximadamente 70 µl, para las transformaciones se juntaron varias alícuotas (aprox 1.5 ml) y se le añadió 1.5 mL de solución KCM (KCl 100mM, CaCl₂ 30mM, MgCl₂ 50mM). Este volumen se repartió en alícuotas de aproximadamente 200 µl por vial y se les agregaron las concentraciones de cada uno de los genes. La mezcla se incubó en hielo durante 1 hora y finalizado el tiempo se aplicó un choque térmico a 37°C por 10 min, se regresaron al hielo por 15 min; transcurrido este tiempo se le agregó a cada vial 500 µl LB y se dejaron incubar 1 hr en agitación a 180 rpm, a 37°C. Después se centrifugaron 5 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 100 µl de medio LB para plaquear en cajas Petri con agar con los antibióticos correspondientes a cada cepa. Se incubaron a 37°C por toda la noche o el tiempo necesario para observar colonias. Las colonias obtenidas se analizaron y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UFC} = \frac{\text{\#colonias}}{\mu\text{g de ADN}} \times \text{dilución} \quad (\text{Sambrook } et \text{ al.}, 1989)$$

Donde:

#colonias: es el número de colonias contadas en la placa

µg de ADN: es la cantidad de ADN transformada expresada en µg

Dilución: es el total de diluciones realizadas del ADN antes de plaquear.

4.6 Selección de clonas para la expresión de la proteína.

Se tomaron cajas al azar de las transformaciones de *vcIpk*, *vcIIpk* y *vcIIIpk*. Para el caso de *vcIpk* y *vcIIpk* se picó una clona al azar que fue resembrada y aislada en una caja Petri, ésta se dejó incubando a 37°C toda la noche y se seleccionó una clona al azar para sembrar en parche.

En el caso de *vcIIIpk*, se picaron tres clonas al azar que fueron resembradas y aisladas en cajas Petri individuales que se incubaron a 37°C toda la noche. Después se seleccionó una sola clona de cada una de las cajas y se sembraron en parche.

4.7 Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado. Se hicieron precultivos de medio LB de 50 ml para *vcIpk* y *vcIIpk* y 100 ml para *vcIIIpk*, estos se incubaron a 37°C, 180 rpm, toda la noche con los antibióticos mencionados en la tabla 4. Cabe mencionar que los precultivos de *vcIIIpk* fueron del doble de volumen debido al poco crecimiento bacteriano que se obtiene.

Tabla 4. Antibióticos

<i>E. coli</i> (cepa)	Antibiótico	Concentración
<i>BL21(DE3)pLysS</i>	Ampicilina(Amp) y Cloranfenicol (Cam)	100µg/mL y 34µg/mL
<i>BL21-AI</i>	Ampicilina (Amp)	100µg/mL
<i>Origami B(DE3)pLysS</i>	Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Cam), Kanamicina (Kan) y Tetraciclina (Tet).	100µg/mL Amp, 34µg/mL Cam, 50 µg/mL Kan y 25 µg/mL de Tet.

Para las curvas de crecimiento se utilizaron matraces con 100 ml de medio LB para *vcIpk* y *vcIIpk* y 200 ml para *vcIIIpk*; se inocularon hasta alcanzar una $D.O_{(600nm)}$ 0.1, se fueron monitoreando cada media hora hasta llegar a una $D.O_{(600nm)}$ 0.6 donde se tomaron alícuotas de 1ml antes de agregar el inductor y posterior a esto se agregó la concentración de inductor establecida para cada una de las cepas (tabla 5), se incubaron a 180 rpm, siguiendo la temperatura establecida (tabla 5), se

monitorearon cada hora y tomaron alícuotas cada 3 hrs en un transcurso de 9 hrs, finalizando este periodo se dejaron el resto de la noche. Al día siguiente se cosecharon y congelaron a -70°C.

Tabla 5. Condiciones de expresión de las diferentes cepas utilizadas

<i>E. coli</i> (cepas)	Temperatura de inducción	Inductores
<i>BL21 (DE3) pLysS</i>	15°C y 37°C	IPTG 0.12 mM y 0.6 mM
<i>BL21-AI</i>	15°C y 37°C	IPTG (1.2mM) y L-arabinosa (0.25%)
<i>OrigamiB (DE3)pLysS</i>	25°C	IPTG (0.6mM)

4.8 Expresión de la proteína recombinante

4.8a Geles de poliacrilamida

La expresión de VcHHPK en las diferentes cepas, así como el proceso de purificación se determinaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Los geles se corrieron con un amortiguador de corrida Von Jagow. La composición de los geles se muestra en la tabla 6. El amortiguador de corrida utilizado se compone de Trizma base 0.024 M, glicina 0.187 M, SDS 2% a pH 8.3.

Los geles se corrieron a 80 V 20 min / 150 V 2.5 h; se tiñeron con azul de Coomassie R-250 0.5 g/L, en ácido acético 25%, isopropanol 25% toda la noche y se destiñeron con una solución de Metanol 40% y ácido acético 10% en agitación.

En caso de teñir y desteñir en microondas es: 20s, 3 veces (tinción) y cubrir con agua el gel 2 min, 3 veces (desteñir).

Tabla 6. Concentraciones para preparar un gel Von Jagow al 14.5%

	Gel separador (14.5%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida-Bis (29:1)	2.9 mL	250µl
Amortiguador (Tris 3M, pH 8.45. SDS 0.3%)	2 mL	500µl
Glicerol (80%)	0.5 mL	----
H ₂ O	0.6 mL	1.25 mL
PSA (10%)	30µl	40µl
TEMED	6µl	5µl

4.8b Digestiones del ADN

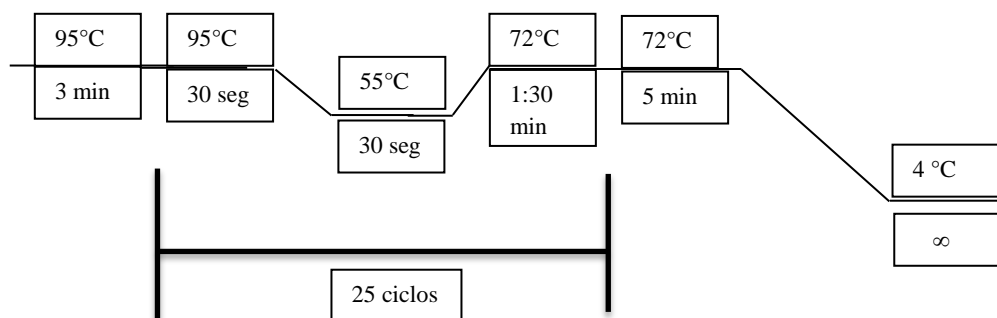
Para confirmar la presencia de las construcciones *vcIpk*, *vcIIpk* y *vcIIIpk* durante el tiempo de crecimiento y expresión, se extrajo ADN de los cultivos bacterianos. Para *vcIpk*, *vcIIpk* se colectaron 10 ml del precultivo y 10 ml después de transcurridas 15 hrs. Posterior a la inducción, el ADN se extrajo utilizando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit. Para el caso de *vcIIIpk* en BL21(DE3)pLysS se colectaron 10 ml del precultivo, antes de inducir (D.O_(600nm) 0.6), 3, 6, 9 y 15 hrs después de la inducción. En las cepas restantes en *vcIIIpk* solo se colectaron 10 ml de precultivo y 10 ml después de transcurridas 15 hrs, para extraer ADN.

La digestión se realizó con las enzimas de restricción NdeI/BamHI que flanquean los extremos 5´y 3´ de los genes, respectivamente. La digestión se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando 500 ng de ADN. Las digestiones se incubaron durante 2 horas a 37°C.

4.8c PCR

Otro método para confirmar la presencia de las construcciones *vcIpk*, *vcIIpk* y *vcIIIpk* durante el tiempo de crecimiento y expresión fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). La PCR se realizó utilizando los primers universales para el sistema pET, el T7 promoter y T7 terminator o en su defecto los primers específicos para *vcIIIpk*. La técnica se realizó utilizando el kit, PCR Master Mix (2X) de Thermo Fisher Scientific, en un termociclador MJ Research Minicycler PTC-150. Para la reacción de PCR

se agregaron 100 ng de ADN, 12.5 µl del Master Mix (2X) y se aforó a 25 µl; la reacción se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones:



4.8d Geles de agarosa

Los ADN purificados, las digestiones y las PCR's se corrieron en geles de agarosa al 1% (preparado con TopVision Agarose Tablets de Thermo Fisher Scientific), disolviendo una pastilla en amortiguador TBE 1x (Trizma base 44.5 M, Ácido bórico 0.44 M, EDTA 0.5 M pH= 8.0, corresponde a TBE 5X y 5 µg/mL de bromuro de etidio). Las muestras correspondientes a los ADN's purificados se cargaron en el gel con 0.25% de azul de bromofenol y las digestiones y PCR's con 0.25% de Xilencianol.

La electroforesis se llevó a cabo entre 100 y 120 voltios durante 20 minutos, observando el corrimiento con los colorantes agregados al amortiguador de carga (TBE 1x). Una vez llevada a cabo la electroforesis, se observan las bandas en un transiluminador de luz UV.

4.9 Expresión y Purificación de la proteína en la cepa BL21-AI

Para la sobreexpresión de la proteína VcIIPK en las células BL21-AI, se realizaron cuatro precultivos de 50 ml con medio LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina, dejándolo incubar toda la noche a 37°C, 180 rpm. Posteriormente con estos precultivos se inocularon 4 litros de medio LB adicionados con 100 µg/mL y se dejaron crecer hasta que alcanzara una D.O_(600 nm) de 0.6 y se inició la inducción agregando IPTG 1.2 mM y L-arabinosa 0.25%, a 15°C, 180 rpm, toda la noche. Las células se cosecharon por centrifugación 10 min a 6,000 rpm (BIOBASE GL21, rotor N°12), subsecuentemente se lavó el botón celular formado con 350 mL de agua bidestilada y centrifugó por 10 min a 8,000 rpm y el botón se almacenó a -70°C para su posterior uso.

Para la purificación las células se resuspendieron en Hepes 200 mM, pH 7.0 (250 mL para 150 g de células). Se adicionó EDTA 1mM y se diluyó 1:1 con Hepes 200 mM pH 8.0+ 1 M de sacarosa. Se

añadió lisozima (0.6 mg/g cel.), se dejó agitando a temperatura ambiente 20 min. Se produjo un choque osmótico con un volumen igual de agua bidestilada y se agitó 20 min a 4°C. Los esferoplastos formados se centrifugaron 20 min, a 8000 rpm (BIOBASE GL21, rotor N°12). Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió y homogenizó con amortiguador A (KH₂PO₄ 50 mM, pH 8.0, KCl 300 mM, Imidazol 10mM) en un volumen de 30 mL, se le adicionó media tableta del inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitors de Roche), y DNAsa (20 mg/mL). El homogenado se sonicó con un sonicador Sonifier 450 (Branson) por 20 ciclos de 15 seg por 45 seg de enfriamiento a una potencia de 30 Watss. La suspensión sonicada se centrifugó 20 min a 15, 000 rpm (BIOBASE GL21, rotor N°15) colectando el sobrenadante. El sobrenadante se colocó en 5 mL de una resina de Niquel (Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged de BIO-RAD) durante 30 min en batch. Cabe mencionar que esta resina fue previamente lavada con agua bidestilada y equilibrada con amortiguador A. Transcurridos los 30 min se hicieron 5 lavados con amortiguador A y la proteína se eluyó con 2 volúmenes de amortiguador B (KH₂PO₄ 50 Mm, pH 8.0, KCl 300 mM, imidazol 250mM). Se midió la actividad de la elución y se concentró en un amicon (Ultracel-30 K DE MILLIPORE), y posteriormente se desaló en una columna HiTrap Deasalting en HEPES 50 mM pH 7.4. La proteína pura obtenida se cargó en un gel de poliacrilamida para corroborar su masa molecular y el grado de pureza, de igual manera se cargaron todos los pasos seguidos en la purificación (se hicieron alícuotas de cada paso de 200 µl).

Después de seguir este proceso de purificación observamos que la proteína se proteolizaba con el tiempo por lo que montamos otro proceso de purificación donde los amortiguadores A y B contenían 10% de glicerol, así como el amortiguador HEPES 50 mM pH 7.4 con 10% de glicerol.

4.10 Ensayo de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó a 25°C en un ensayo acoplado a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), siguiendo en un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8453) la oxidación del NADH a 340 nm. La mezcla de reacción utilizada contenía concentraciones de sustratos saturantes, esto es PEP 5 mM y ADP 3mM en Hepes 50 mM, MgCl₂ 3 mM y NADH 0.2 mM.

4.11 Cuantificación de la proteína

El ácido bicinonónico (BCA), en la forma de su sal de sodio soluble en agua, es un reactivo altamente sensible y específico para el ión Cu⁺. Se ha reportado que la estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color con BCA (Wiechelman, Braun y

Fitzpatrick, 1988). Este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad y detección selectiva colorimétrica del catión cuproso (Cu^{+1}). El producto color púrpura de la reacción es formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso, es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm.

Para la cuantificación de la proteína durante el proceso de purificación se utilizó el kit de Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay. Utilizando como curva patrón la seroalbumina bovina (BSA). Se realizaron duplicados de las curvas de BSA y de las muestras.

La proteína pura se cuantificó a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar ($\epsilon\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de 17960 (Pace y Cols, 1995)

4.12 Almacenamiento

La proteína pura se almacenó en HEPES 50 mM pH 7.5 en ausencia y presencia de glicerol 20%. La proteína sin glicerol se almacenó a 4°C y con glicerol se probaron tres temperaturas: 4°C, -20°C y -70°C. Las muestras fueron monitoreadas diariamente durante una semana, mediante actividad enzimática y en geles de poliacrilamida.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. cholerae tiene presente en su genoma tres marcos de lectura abiertos para piruvato cinasa, los cuales codifican para los genes *pyk-F*, *pykA-1* y *pykA-2*. Los productos de estos tres genes son referidos en la literatura como *VcIPK*, *VcIIPK* y *VcIIIPK*, respectivamente (Guerrero-Mendiola, 2017).

Las construcciones *vcIpk* (*pyk-F*) y *vcIIPk* (*pykA-1*) fueron clonadas en el plásmido pET3a y transformadas en el sistema de expresión BL21-CodonPlus(DE3)-RIL obteniendo alta eficiencia de transformación y expresión de las dos proteínas. Sin embargo, la construcción *vcIIIPk* (*pykA-2*) no se pudo transformar en la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL como se realizó para *vcIpk* y *vcIIPk*. Con base en estos resultados se decidió estudiar la eficiencia de transformación y sobreexpresión de *VcIIIPK* en diferentes cepas del sistemas de expresión *E. coli* BL21 y establecer el protocolo de purificación.

El sistema pET (Invitrogene), es un plásmido desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E.coli*. Los genes que se clonan en este plásmido quedan bajo el control del promotor del bacteriófago T7 que es reconocido por la T7 RNA polimerasa. Tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa induce la expresión de la proteína que se encuentra clonada en el vector.

A partir del ADN genómico de la cepa VCD103 de *V. cholerae* se obtuvo el gen *vcIIIPk*, éste se clonó en el plásmido pET3a-HisTEV obteniendo la construcción *vcIIIPk/pET3a-HisTEV*. Esta construcción junto con las construcciones *vcIpk/pMCSG7* y *vcIIPk/pMCSG7* se secuenciaron con el primer universal T7 promoter para corroborar la fidelidad de cada gen. Las construcciones fueron transformadas en diferentes cepas del sistema de expresión bacteriano BL21. La transformación de los genes de *vcIpk* y *vcIIPk* en el sistema BL21 sirvió como control para comparar la eficiencia de transformación con el gen de *vcIIIPk*.

El sistema bacteriano BL21 es adecuado para la expresión de genes heterólogos no tóxicos, es deficiente en las proteasas OmpT (proteasa extracelular) y Lon (proteasa intracelular), las cuales se encuentran involucradas en la degradación de proteínas recombinantes. Adicionalmente, contiene una copia cromosómica del gen de la T7 RNA polimerasa del fago λ DE3 para la simple y eficiente expresión de genes bajo el control del promotor T7; su expresión es dependiente del promotor lacUV5 y del represor LacI^q (Agilent Technologies, 2015).

En el presente trabajo se evaluó la expresión del gen *vcIIIpk* en seis cepas del sistema BL21 con diferentes características: *BL21(DE3)*, *BL21(DE3)pLysS*, *BL21-CodonPlus(DE3)-RIL*, *BL21-Gold(DE3)pLysS*, *Origami B(DE3)pLysS* y *BL21-AI*. De estas seis cepas cinco contienen el sistema DE3, mientras que BL21-AI se encuentra bajo el control del operón de arabinosa (*araBAD* promotor).

5.1 El gen *vcIIIpk* no produce transformantes en algunas cepas del sistema BL21

Las tres construcciones (*vcIpk*, *vcIIpk*, *vcIIIpk*) fueron transformadas en las cepas: *BL21(DE3)*, *BL21-CodonPlus(DE3)-RIL* y *BL21-Gold(DE3)pLysS* usando el método de transformación de células competentes por cloruro de calcio. El resultado mostró que en estas tres cepas no se obtuvieron colonias con el gen *vcIIIpk*, mientras que para los genes control *vcIpk* y *vcIIpk* si se obtuvieron colonias (figura 11).

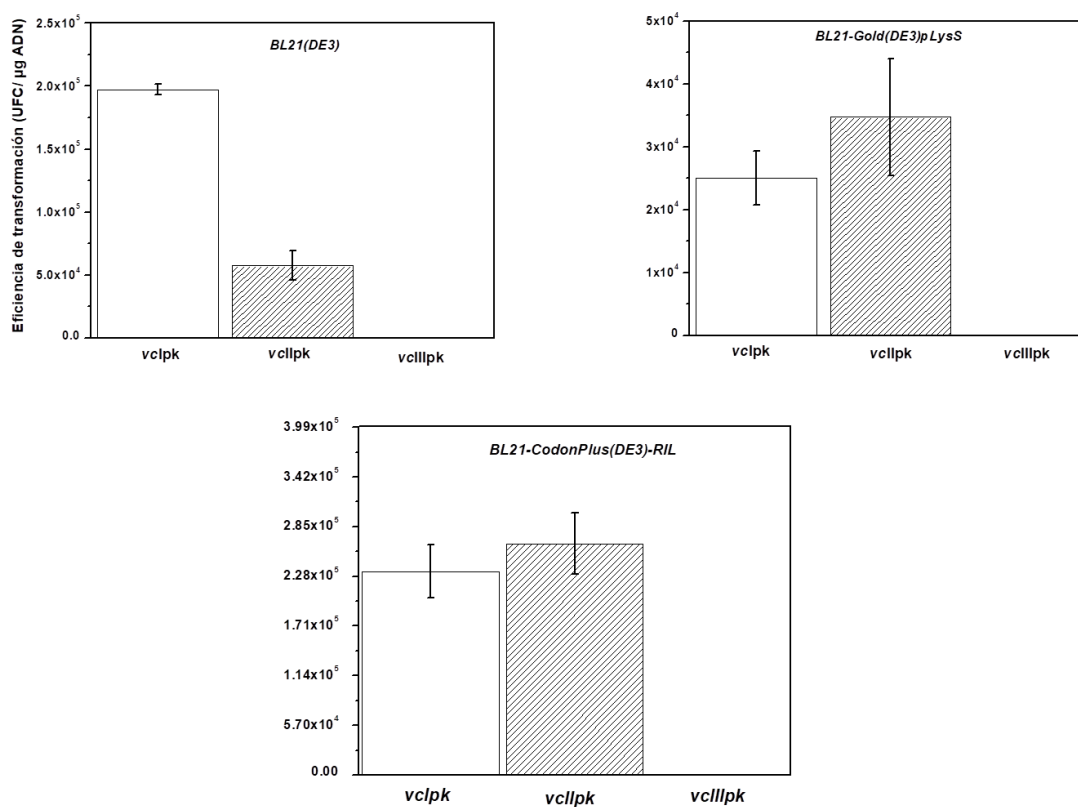


Figura 11. Eficiencia de transformación de las tres construcciones (*vcIpk*; *vcIIpk* y *vcIIIpk*). Se observa que no hubo crecimiento de colonias con el gen *vcIIIpk*, mientras que para los genes de *vcIpk* y *vcIIpk* se tuvo un resultado exitoso.

La construcción de *vcIIIpk* también fue probada con diferentes concentraciones de ADN (250 ng y 1000 ng) para transformar dichas cepas bacterianas y además se utilizó el método de transformación por electroporación (aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana causado por un campo eléctrico aplicado externamente, permitiendo la formación de poros (Tortora, Funke y Case, 2007)) sin éxito alguno en el crecimiento de colonias transformantes.

Para tratar de entender este resultado se realizó una búsqueda en los manuales del sistema BL21 y como resultado podemos resumir las siguientes consideraciones:

Consideraciones para determinar a un gen tóxico en el sistema de sobreexpresión BL21

- 1.- No se obtienen colonias transformantes
- 2.- Se obtiene una combinación de colonias pequeñas, grandes e irregulares.
- 3.- El cultivo inicial no crece.
- 4.- El crecimiento del cultivo tarda mas de 5 horas.
- 5.- Las células se lisan después de la inducción con IPTG.

Para probar la inestabilidad de la construcción de *vcIIIpk*, los tres genes fueron transformados en la cepa XL10-GOLD, comúnmente utilizada para la propagación y manipulación del ADN recombinante con una alta eficiencia (presenta el genotipo Hte el cual incrementa la eficiencia de transformación) y como resultado los tres genes fueron eficientemente transformados (figura 12).

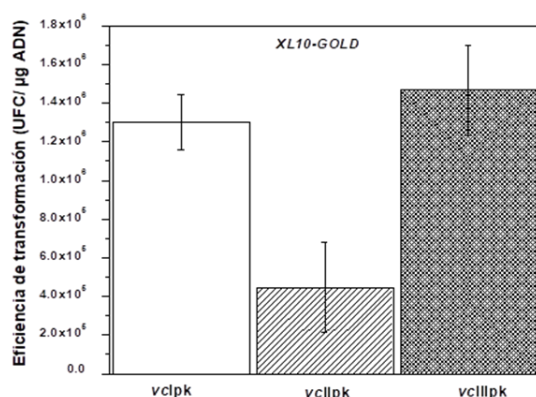


Figura 12. Eficiencia de transformación de las tres construcciones en la cepa XL10-GOLD.

Samuelson, 2011 menciona que la ausencia de transformantes podría explicarse debido a la pérdida del plásmido o porque el producto del gen es tóxico, debido a la carga metabólica que este produce en la bacteria (ver anexo).

Así mismo, para entender porqué en estas tres cepas del sistema BL21 no se obtuvieron transformantes, se describirán algunas características de ellas: La cepa BL21(DE3) es adecuada para la expresión de genes heterólogos no tóxicos, es deficiente en las proteasas OmpT (proteasa extracelular) y Lon (proteasa intracelular), las cuales se encuentran involucradas en la degradación de proteínas recombinantes. Adicionalmente, contiene una copia cromosómica del gen de la T7 RNA polimerasa del fago λDE3 para la simple y eficiente expresión de genes bajo el control del promotor T7; su expresión es dependiente del promotor lacUV5 y del represor LacI^q (Agilent Technologies, 2015).

La cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL en un principio fue usada para transformar el gen de *vcIIIpk* porque previamente se tenía reportado que los genes de *vcIpk* y *vcIIpk* eran transformados y expresados en esta cepa (Guerrero-Mendiola, 2017). Esta cepa contiene copias extras de genes que codifican para tRNAs que frecuentemente limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E.coli*, debido a que se consideran codones raros para ésta. Las copias extras de estos tres genes para tRNAs son: Arginina; *argU* (AGA y AGG), isoleucina; *ileY* (AUA), y leucina; *leuW* (CUA) (Agilent Technologies, 2015). Sin embargo, un análisis del contenido de codones del gen *vcIIIpk*, mostró no tener estos tres codones raros para *E. coli* (datos no mostrados).

La cepa BL21-Gold(DE3)pLysS carece de la endonucleasa I (endA I), que degrada rápidamente el DNA plasmídico, y presenta el fenotipo Hte que incrementa la eficiencia de la transformación, así como el pLysS que codifica para la lisozima del fago T7, la cual es un inhibidor de la RNA polimerasa del mismo fago, por lo que puede haber una expresión controlada del gen que está clonado en el pET3 (no permite fuga de expresión antes de agregar el inductor), esta característica permite recomendar a la cepa para expresar genes tóxicos. Además, la producción de lisozima por parte de la cepa, permite que la pared celular sea digerida por esta y sea mucho más sencillo lisar las bacterias (Agilent Technologies, 2015).

5.2 El gen *vcIIIpk* produce transformantes con tasas de crecimiento celular reducidas en algunas cepas del sistema BL21

Cuando la construcción *vcIIIpk* fue transformada en la cepa BL21(DE3)pLysS se observaron colonias transformadas pero presentaron diferentes tamaños en diferentes periodos de tiempo de

incubación, las colonias crecieron en un intervalo de 20 a 24 hrs aproximadamente. En contraste, estos efectos no fueron observados cuando se transformaron los genes de *vcIpk* y *vcIIpk* en el mismo sistema bacteriano (figura 13). Además, observamos que las transformantes que contenían el gen de *vcIIIpk* crecían más lentamente cuando se sembraban en una caja con medio LB. Esta cepa contiene el plásmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7, que como ya se mencionó es un inhibidor de la RNA polimerasa del mismo fago, por lo que puede haber una expresión controlada del gen que está clonado en el plásmido pET3a, por lo que esta cepa es altamente recomendada para expresar genes tóxicos.

Otra cepa estudiada fue la cepa OrigamiB(DE3)pLysS. Los resultados mostraron que la eficiencia de transformación de los tres genes fue baja en comparación con el resto de las otras cepas estudiadas, en las transformantes de las construcciones *vcIpk* y *vcIIpk* hubo crecimiento de colonias durante toda la noche, mientras que las colonias transformantes de *vcIIIpk* tardaron aproximadamente 72 hrs en crecer. Después de ese tiempo el tamaño y la forma de las colonias eran similares a las obtenidas con los genes de *vcIpk* o *vcIIpk*. Estas transformantes presentaban inicialmente un crecimiento lento, pero al ser sembradas, su crecimiento fue normal (figura 13). La cepa OrigamiB(DE3)pLysS presenta mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y la glutatión reductasa (*gor*), lo cual provee un ambiente más oxidante, mejorando ampliamente la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. Algunos estudios muestran que la producción de la expresión de la proteína en Origami(DE3) es 10 veces más activa que en otros hospederos (Prinz *et al.*, 1997).

Estos resultados nos permiten sugerir que el gen *vcIIIpk* al reducir la tasa de crecimiento celular en las cepas BL21(DE3)pLysS y OrigamiB(DE3)pLysS muestra que es medianamente tóxico para ambas cepas.

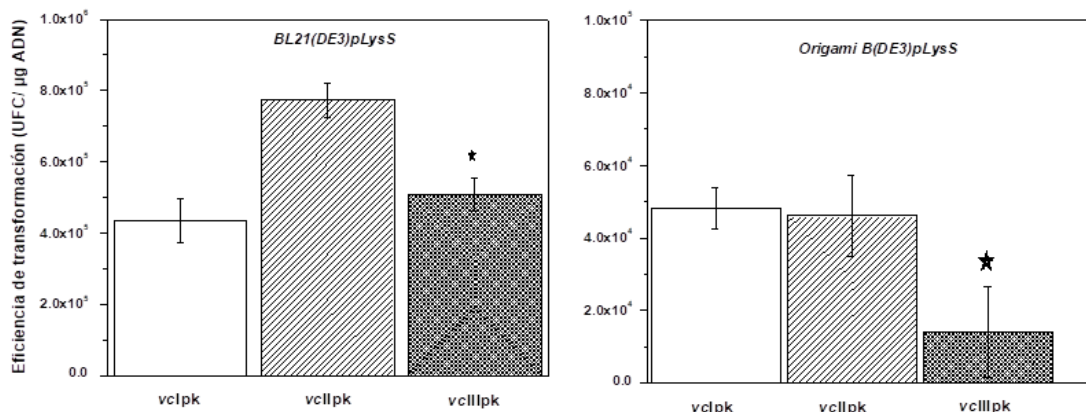


Figura 13. Eficiencia de transformación en la cepa BL21(DE3)pLysS y OrigamiB(DE3)pLysS. El asterisco en la cepa BL21(DE3)pLysS del gen *vcIIIpk* se refiere a que se produjeron colonias de diferentes tamaños y el crecimiento fue en un mayor intervalo de tiempo (20 a 24 hrs aproximadamente) y esas diferencias no se observaron en las transformantes de *vcIpk* o *vcIIpk*. En la cepa OrigamiB(DE3)pLysS, el asterisco en *vcIIIpk* significa que se presentó crecimiento de colonias alrededor de las 72 hrs, pero el tamaño y la forma de las colonias era similar al presentado en los dos genes restantes

5.3 El gen *vcIIIpk* produce transformantes con tasas normales de crecimiento celular en una cepa del sistema BL21

La transformación de la construcción *vcIIIpk* en la cepa BL21-AI produjo altos niveles de colonias transformadas incluso hasta con mayor eficiencia que para las transformantes *vcIpk* y *vcIIpk*. Después de incubarse toda la noche a 37°C el tamaño y crecimiento observados fueron homogéneos en los tres genes (figura 14). Estos resultados mostraron que en esta cepa el gen *vcIIIpk* no es tóxico para la célula. La cepa BL21-AI presenta una inserción cromosómica de un cassette que contiene el gen de la T7 RNA polimerasa en el locus *araB*, permitiendo la expresión de la T7 RNA polimerasa para ser regulada por el promotor *araBAD*. El gen *araB* está deletado en esta cepa (Invitrogen, 2010).

Este sistema ofrece un mejor control del promotor *lac* ya que muestra mayores niveles de expresión de las proteínas de interés y menores niveles de expresión basal en comparación con otras cepas de BL21; por tanto, tiene un estricto control de la expresión de proteínas que pueden ser tóxicas para la célula (Invitrogen, 2010). Además BL21-AI es capaz de sobreexpresar proteínas que no lo hacen o lo hacen en muy bajos niveles en otras cepas sin que necesariamente sean tóxicas para éstas (Stefan *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha reportado con anterioridad que en sistemas basados en el promotor T7 hay mayor expresión de proteínas recombinantes en forma soluble cuando la temperatura es baja

(15-25°C) y hay mayor tendencia a la formación de agregados a 37°C (Muntari *et al.*, 2012) sin embargo, en el presente trabajo, la sobreexpresión de *VcIII*PK resulto favorable tanto a 15°C como a 37°C. También es adecuada para expresar altos niveles de proteína recombinante desde vectores de expresión que no están basados en el T7 promoter. Esta cepa al estar bajo el control del operon de *araBAD* permite que el gen de *vcIIIpk* no sea tóxico en comparación con las otras cepas que están bajo el control del promotor T7.

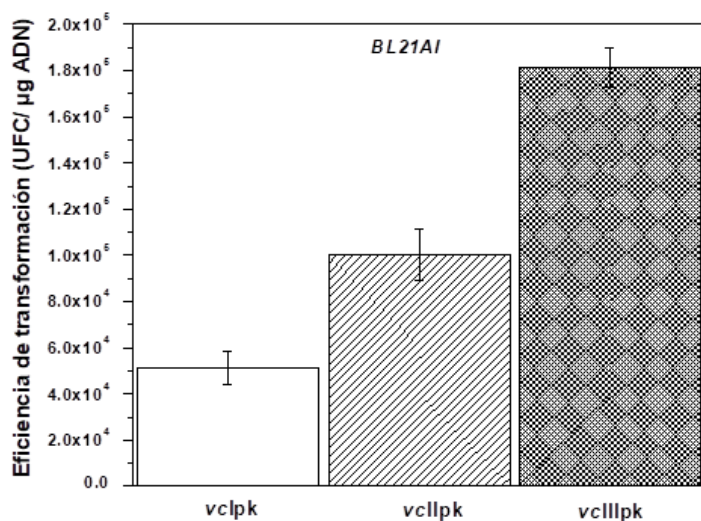


Figura 14. La cepa BL21-AI, presentó mayor eficiencia de transformación, el tamaño y crecimiento fue homogéneo en los tres genes de pK, pero donde hubo mayor número de colonias al transformar fue en el gen *vcIIIpk* en comparación con los genes de *vcIpk* y *vcIIpk*.

Los resultados con estas seis cepas de expresión del sistema BL21 indicaron que la transformación del gen *vcIIIpk* puede ser tóxica, medianamente tóxica y no tóxica para este sistema de expresión.

5.4 Comparación del crecimiento y expresión de las tres PKs

Los resultados de transformación mostraron que el gen *vcIIIpk* puede causar toxicidad en algunas cepas del sistema BL21 produciendo tres niveles: tóxico, medianamente tóxico y no tóxico. De tal forma que sólo se obtuvieron colonias en tres cepas de expresión en donde el comportamiento fue medianamente tóxico y no tóxico. En estas tres cepas se decidió estudiar la velocidad de crecimiento y la expresión de la proteína; de esta forma las cepas BL21(DE3)pLysS, OrigamiB(DE3)pLysS y BL21-AI que contenían por separado las tres construcciones se monitorearon sus curvas de crecimiento de la siguiente manera:

5.4a Cepa BL21(DE3)pLysS

Para la cepa BL21(DE3)pLysS los experimentos se realizaron en dos condiciones para las tres construcciones para ver el efecto de la concentración y el tiempo en el cuál se debe agregar el IPTG al cultivo. En la primera condición, las tres construcciones se crecieron en medio LB a 37°C hasta alcanzar una $DO_{(600nm)}$ 0.6, la proteína se indujo con IPTG 0.6 mM. En la segunda condición las células se crecieron a 37°C pero se agregó el inductor desde el inicio del crecimiento a una concentración final de 0.6 mM y sólo para *VcIIPK* se probó IPTG 0.12 mM.

Para la primer condición, las curvas de crecimiento fueron similares para *VcIPK* y *VcIIPK*, en el caso de *VcIIPK*, su curva presenta un crecimiento más lento en la fase Lag de aproximadamente 2 horas (periodo de latencia, no hay aumento significativo de la densidad celular, el crecimiento es asincrónico) y la fase exponencial (comienzan la división celular, la reproducción celular alcanza una actividad máxima y hay mayor actividad metabólica), después de la inducción la curva de crecimiento fue similar a la de las otras dos (figura 15a). Geles SDS-PAGE mostraron que las proteínas no se expresaron en esta condición, es decir, la banda de sobreexpresión esperada de 52.1kDa no está presente en ausencia de inductor (carril 2, figuras 15 b, c y d) o en presencia del inductor a distintos tiempos (carriles 3 al 6, figuras 15 b, c y d). Como estándares de peso molecular se cargaron en el gel *VcIPK* (50.4 kDa) y *VcIIPK* (50.7 kDa), previamente purificadas.

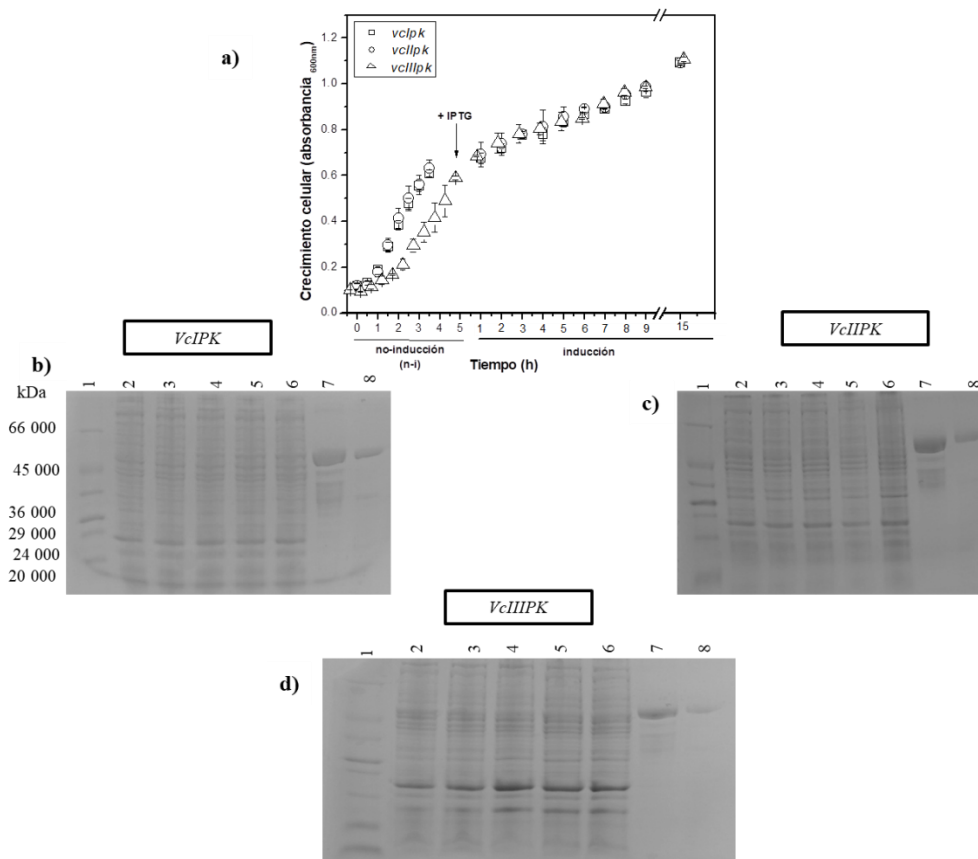


Figura 15. Expresión de la proteína en la cepa BL21(DE3)pLysS. a) Curva de crecimiento en la cepa BL21(DE3)pLysS de las tres construcciones. En b, c y d se muestra la expresión de *VcIPK*, *VcIIPK* y *VcIIIPK* en geles SDS-PAGE, respectivamente. Para los tres casos el orden es el siguiente 1.- SigmaMarker (low range); 2.- antes de inducir; 3.- 3 hrs de inducción (0.6mM IPTG); 4.-6 hrs de inducción; 5.- 9 hrs de inducción; 6.- 15 hrs de inducción; 7.- Proteína *VcIPK* pura control; 8.- Proteína *VcIIPK* pura control.

En la segunda condición, las construcciones se crecieron en medio LB a 37°C en presencia de IPTG desde el inicio, *VcIPK* y *VcIIPK* con 0.6 mM y *VcIIIPK* con 0.12 mM y 0.6 mM. El crecimiento en las curvas de *VcIPK* y *VcIIPK* con IPTG 0.6 mM (figuras 16a y c) fue similar con y sin IPTG; mientras que en el caso de *VcIIIPK* con las tres concentraciones de IPTG se observa el retraso de 2 hrs aproximadamente en la fase Lag. En la fase exponencial el medio que contenía IPTG 0.12 mM desde el inicio acelera su crecimiento ligeramente, seguido del medio con IPTG 0.6 mM y finalmente la condición en la que se induce hasta alcanzar $D.O_{(600nm)} 0.6$ (figura 17a). Los resultados en SDS-PAGE muestran que *VcIPK* se expresa significativamente bajo la condición de IPTG 0.6 mM desde un inicio (figura 16b), mientras que *VcIIPK* y *VcIIIPK* no se expresaron bajo ninguna condición (figuras 16 d y 17 b, c).

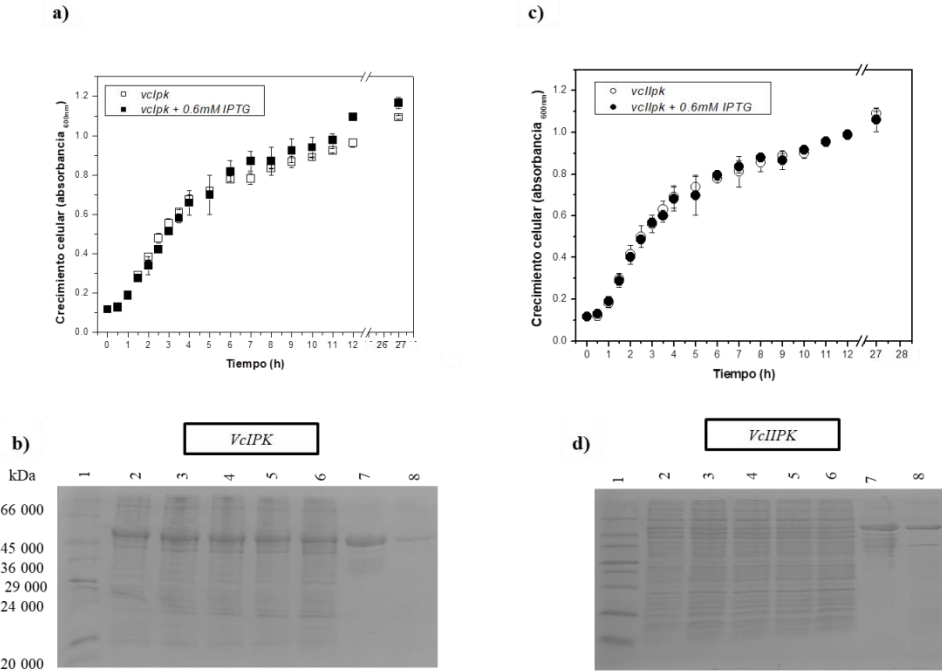


Figura 16. Expresión de la proteína en la cepa BL21(DE3)pLysS bajo dos condiciones. a y c muestran las curvas de crecimiento de *VcIpk* y *VcIIPk*. En b y d se muestra la expresión de *VcIPK*, y *VcIIPK* en geles SDS-PAGE, respectivamente. Para los dos casos el orden es el siguiente: 1.- SigmaMarker (low range); 2.- + 0.6mM IPTG; 3.- + 0.6 mM IPTG 3 hrs de inducción; 4.-+ 0.6 mM IPTG 6 hrs de inducción; 5.- + 0.6 mM IPTG 9 hrs de inducción; 6.- + 0.6 mM IPTG 15 hrs de inducción; 7.-Proteína *VcIPK* pura control; 8.- Proteína *VcIIPK* pura control.

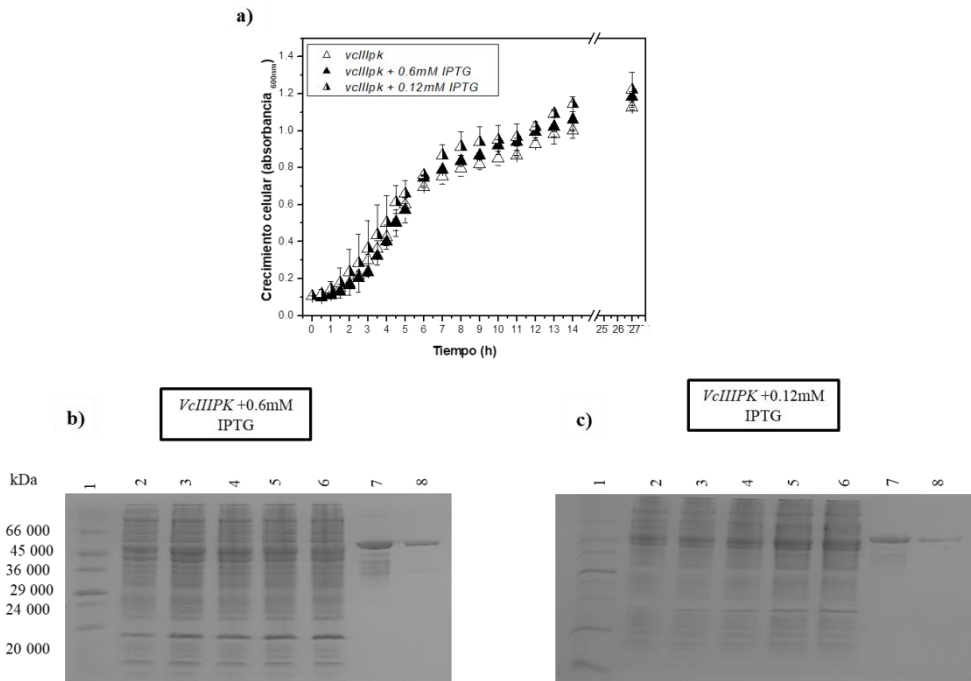


Figura 17. Expresión de la proteína en la cepa BL21(DE3)pLysS bajo dos condiciones. a) Curva de crecimiento de *VcIIPK*. En b y c se muestra la expresión de *VcIIPK*, en gels SDS-PAGE, respectivamente. Para los dos casos el orden es el siguiente: 1.- SigmaMarker (low range); 2.-IPTG D.O_(600nm) 0.6; 3.-IPTG 3 hrs de inducción; 4.-IPTG 6 hrs de inducción; 5.-IPTG 9 hrs de inducción; 6.-IPTG 15 hrs de inducción; 7.-Proteína *VcIPK* pura control; 8.- Proteína *VcIIPK* pura control.

Como se mostró en la figura 15a, la disminución de la velocidad de crecimiento sólo se presentó en *VcIIPK*. Esto podría ser causado por la carga metabólica impuesta por las células debido a la expresión de genes heterólogos con mediana toxicidad o por la inestabilidad del plásmido. La carga metabólica puede causar efectos perjudiciales en la estabilidad y calidad del plásmido reduciendo el número de copias (Silva, 2011).

Con el objetivo de encontrar una condición de expresión de *VcIIPK* en BL21(DE3)pLysS se probaron tres temperaturas de inducción (15°C, 25°C y 37°C). Sin embargo, no se obtuvo expresión en ningún caso (datos no mostrados).

5.4b Cepa OrigamiB(DE3)pLysS

Para la expresión en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS, las tres construcciones se crecieron a 37°C y al alcanzar una D.O_(600nm) 0.6 se agregó 0.6 mM de IPTG y la proteína se expresó a 25°C. La curva de crecimiento muestra que los niveles de crecimiento de los cultivos no inducidos e inducidos de las tres PKs es similar a 25°C y el crecimiento celular aumenta linealmente durante las primeras 5 horas y posterior a este periodo, en la fase estacionaria observamos que *VcIPK* y *VcIIPK* presentan

un crecimiento ligeramente más rápido que *VcIIIPK* (figura 18a). Los resultados en SDS-PAGE muestran que las tres PKs presentan niveles similares de expresión de proteína (figuras 18 b, c y d).

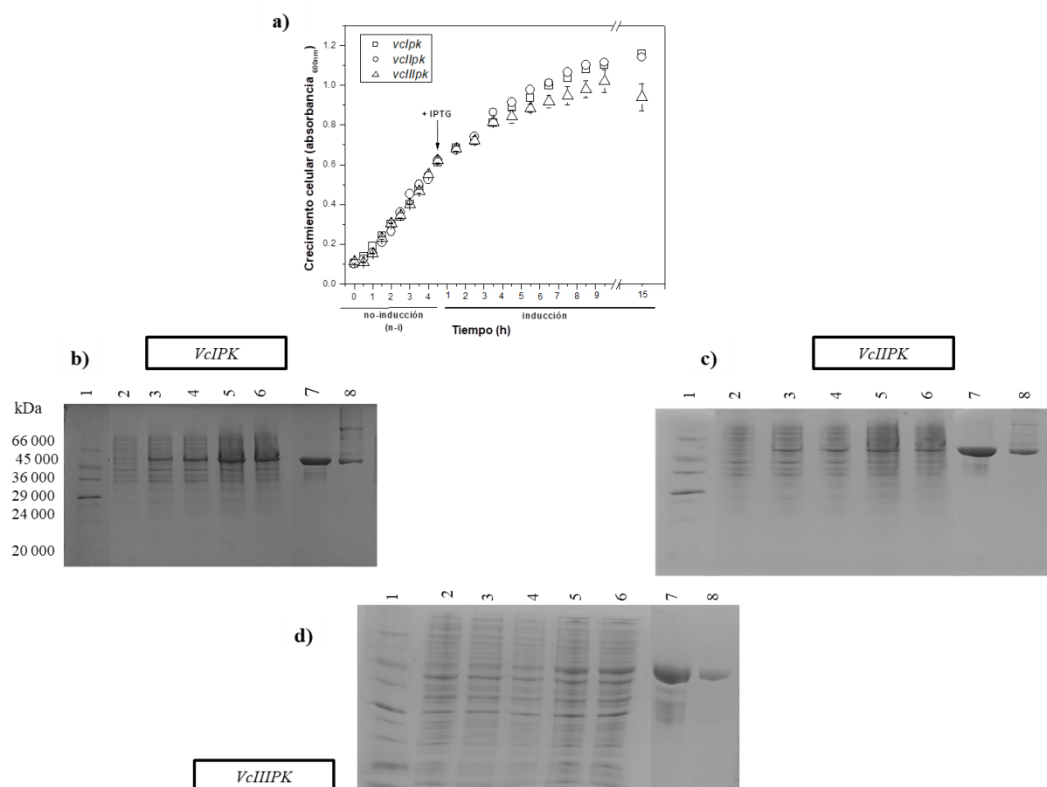


Figura 18. Expresión de la proteína en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS. a) Curva de crecimiento en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS de las tres construcciones. En b, c y d se muestra la expresión de *VcIPK*, *VcIIPK* y *VcIIIPK* en geles SDS-PAGE respectivamente. Para los tres casos el orden es el siguiente 1.- SigmaMarker (low range); 2.- antes de inducir; 3.- 3 hrs de inducción (1mM IPTG); 4.-6 hrs de inducción; 5.- 9 hrs de inducción; 6.- 15 hrs de inducción; 7.- Proteína *VcIPK* pura control; 8.- Proteína *VcIIPK* pura control.

5.4c Cepa BL21-AI

La curva de crecimiento a 37°C de BL21-AI, muestra que a las dos horas de crecimiento el cultivo alcanzó una $D.O_{(600nm)}$ 0.6 en comparación con OrigamiB(DE3)pLysS y BL21(DE3)pLysS, que tardan alrededor de 5 horas en alcanzar esta $D.O_{(600nm)}$. Además se observa que los tiempos de crecimiento para las tres PKs son similares (figura 19 a). La inducción de la proteína se realizó a 15 y 37°C con IPTG 1.2 mM y L-arabinosa 0.25%. Hubo expresión de las tres proteínas recombinantes. El nivel de expresión fue mejor en BL21-AI que en OrigamiB(DE3)pLysS y BL21(DE3)pLysS. Esto se puede observar en los geles SDS-PAGE, donde a partir de las 3 horas después de la inducción se expresan las 3 proteína (figuras 19b y c).

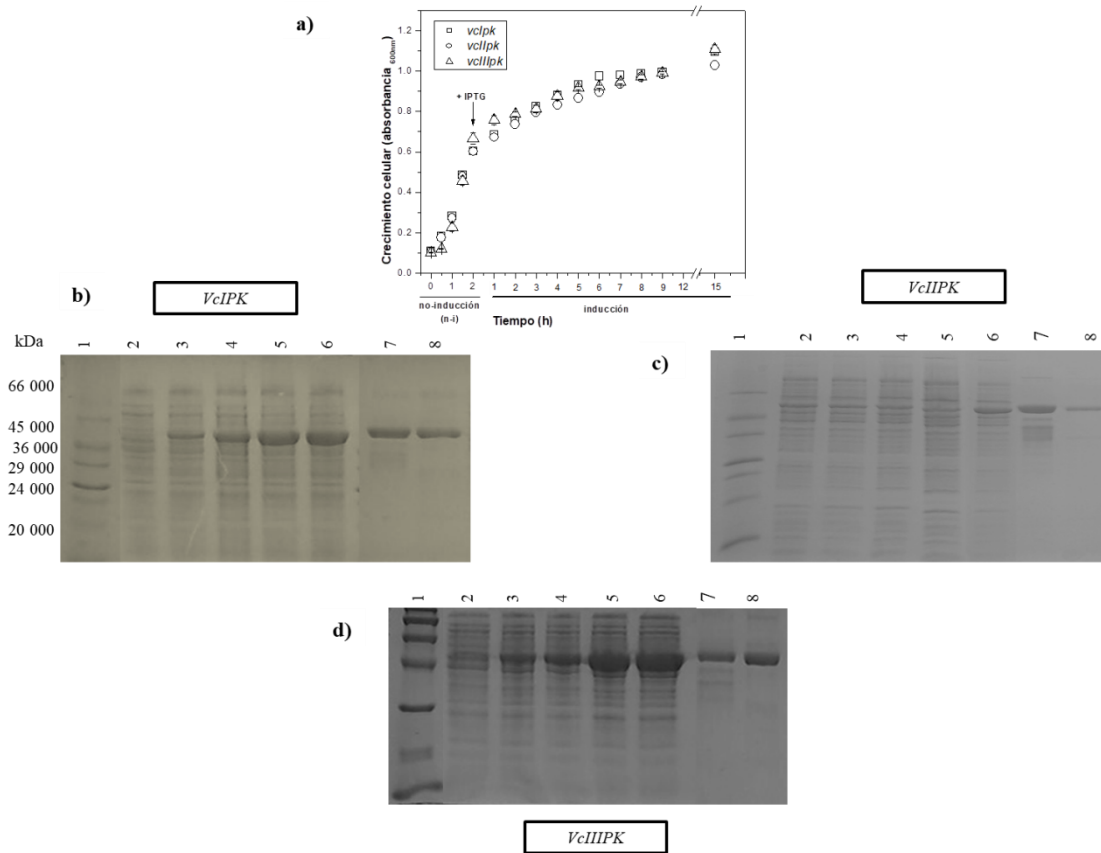


Figura 19. Expresión de la proteína en la cepa BL21-AI. a) Curva de crecimiento en la cepa BL21-AI de las tres construcciones. En b, c y d se muestra la expresión de $VcIPK$, $VcIIPK$ y $VcIIIPK$ en geles SDS-PAGE, respectivamente. Para los tres casos el orden es el siguiente 1.- SigmaMarker (low range); 2.- antes de inducir; 3.- 3 hrs de inducción (1mM IPTG); 4.-6 hrs de inducción; 5.- 9 hrs de inducción; 6.- 15 hrs de inducción; 7.-Proteína $VcIPK$ pura control; 8.- Proteína $VcIIPK$ pura control.

Se sabe que la eficiencia de represión es crucial para la producción de proteínas tóxicas que modifican la expresión, provocando un daño a las células y reduciendo totalmente la producción. Por lo tanto, este sistema es adecuado para controlar la fuerte expresión de proteínas tóxicas.

En conclusión las cepas de OrigamiB(DE3)pLysS y BL21-AI permitieron la expresión de un gen aparentemente tóxico. Por otra parte, los experimentos mostraron que la expresión en una sola cepa de sobreexpresión es incapaz de realizar todas las condiciones necesarias para sobreexpresar tres genes parálogos de PK.

5.5 Estabilidad del plásmido en la cepa BL21(DE3)pLysS

Para corroborar la presencia de la construcción en las transformantes de cada cepa, se extrajo ADN antes y después de la inducción de acuerdo a las condiciones establecidas en los experimentos de expresión de las cepas BL21(DE3)pLysS.

Para confirmar la presencia de las tres construcciones durante el tiempo de expresión de la proteína se monitoreó la presencia del ADN plasmídico mediante un análisis de corte con enzimas de restricción, usando los sitios de corte para NdeI/BamHI. Este método de monitoreo de la estabilidad del plásmido se llevó a cabo durante el tiempo de expresión de la proteína en relación al tiempo. En la cepa de BL21(DE3)pLysS las enzimas de restricción confirmaron la presencia de las construcciones de *vcIpk* mostrando una banda de un peso de 1629 pb y para *vcIIpk* una banda de 1662 pb, tanto antes de agregar el inductor (D.O_(600nm) 0.6), como después de agregar IPTG 0.6 mM y 15 hrs después. En el caso de la construcción de *vcIIIpk*, la banda del peso esperado es de 1681 pb, esta construcción se encontraba presente antes de agregar el inductor (D.O_(600nm) 0.6), pero 15 hrs después había desaparecido (figura 20).

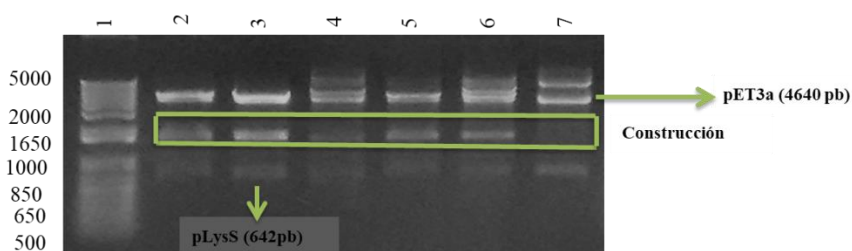


Figura 20. Estabilidad de las construcciones en la cepa BL21(DE3)pLysS. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción NdeI/BamHI. Electroforesis en gel de agarosa 1x siguiendo el orden: 1.- 1 Kb Plus DNA Ladder; 2.- *vcIpk* antes de inducir; 3.-*vcIIpk* antes de inducir; 4.-*vcIIIpk* antes de inducir; 5.- *vcIpk* 15 hrs después de la inducción; 6.- *vcIIpk* 15 hrs después de la inducción; 7.-*vcIIIpk* 15 hrs después de la inducción. En el recuadro verde se muestran las bandas correspondientes a las tres construcciones.

Por otra parte para el caso de *vcIIIpk* este fenómeno se evaluó bajo dos condiciones más, agregando desde un inicio IPTG 0.6 y 0.12 mM (figura 17a) y agregando IPTG 0.6 mM después de llegar a una D.O_(600nm) 0.6 (figura 15a). Los cultivos se monitorearon durante 9 horas después de que en las tres condiciones se llegara a una D.O_(600nm) 0.6, cada tres horas fueron tomadas alícuotas de 1ml y finalmente se tomaron a las 15 horas después de la inducción. Como se muestra en la figura 21a, correspondiente a *vcIIIpk* con la adición del inductor (0.6mM) al alcanzar una D.O_(600nm) 0.6, se

observa la banda correspondiente a la construcción (1681 pb). Esta construcción se mantiene antes de agregar el inductor ($D.O_{(600nm)} 0.6$), a las 3 hrs de inducción y a partir de las 6 hrs de inducción se va perdiendo y a las 15hrs ya no se observa la construcción.

En el caso de las condiciones con IPTG 0.12 mM y 0.6 mM desde un inicio (figuras 21 b y c), en la condición de IPTG 0.12 mM la construcción aún está presente a las 3 horas de inducción y a partir de las 6 horas se pierde completamente, pero bajo la condición de IPTG 0.6 mM la construcción desaparece a partir de las 3 horas de inducción. Esto parece indicar que la concentración de IPTG 0.12mM está ayudando a mantener por más tiempo la construcción.

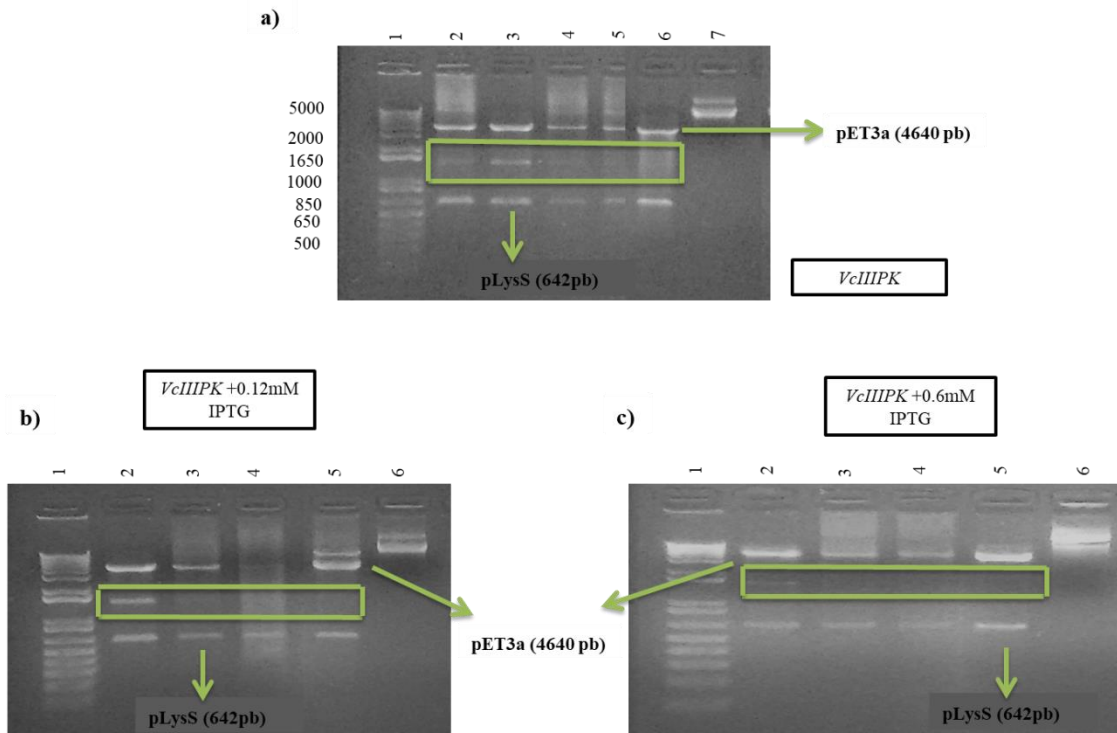


Figura 21. Estabilidad de la construcción de *vcIIIpk* en la cepa BL21(DE3)pLysS. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción NdeI/BamHI. Los incisos **a**, **b** y **c** muestran la electroforesis en gel de agarosa 1x siguiendo el orden: 1.- 1 Kb Plus DNA Ladder; 2.- sin inducir; 3.- $D.O_{(600nm)} 0.6$; 4.- 3 hrs de inducción; 5.- 6 hrs de inducción; 6.- 15 hrs; 7.-*vcIIIpk* sin digerir (control). Para las dos condiciones restantes, se recorre la numeración porque se partió del mismo precultivo. En el recuadro verde se muestran la banda correspondiente a las construcciones en los diferentes intervalos de tiempo.

De acuerdo a los resultados previos, decidimos corroborar la presencia de las tres construcciones (*vcIpk*, *vcIIpk* y *vcIIIpk*) en las cepas de OrigamiB(DE3)pLysS y BL21-AI, mediante análisis de restricción con las enzimas NdeI/BamHI en los precultivos y a las 15 horas después de la inducción.

Para OrigamiB(DE3)pLysS en la figura 22 a y b, se observan las bandas correspondientes a las tres construcciones después de 15 horas de inducción, se probaron varias clonas de la construcción de *vcIIIpk*. En el caso de la cepa BL21-AI (figuras 23a y b), podemos ver las bandas correspondientes a las tres construcciones tanto en los precultivos como a las 15 horas después de la inducción. Aunque se observan bandas en el peso esperado, el patrón de bandas observado es un poco confuso, por lo que posteriormente se realizaron otros experimentos para corroborar el resultado (ver más adelante). Los resultados de los precultivos de la cepa OrigamiB(DE3)pLysS (datos no mostrados) muestran la presencia de las tres construcciones.

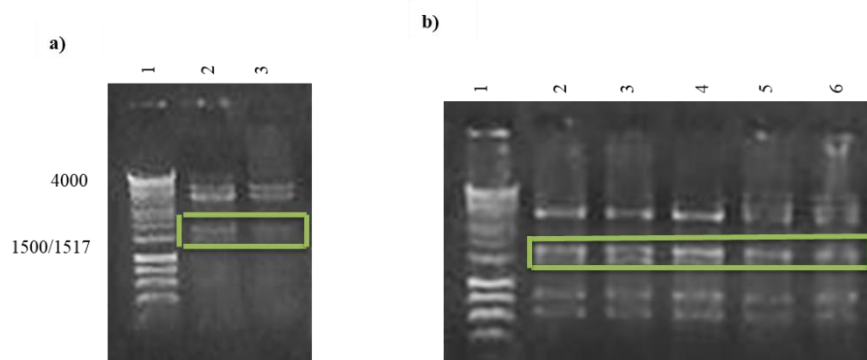


Figura 22. Estabilidad de las tres construcciones en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción NdeI/BamHI. Los incisos **a**, **b** muestran la electroforesis en gel de agarosa 1x siguiendo el orden: 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIpk* 15 hrs después de la inducción.; 3.-*vcIIpk* 15 hrs después de la inducción; **b**)1Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIIIpk* C1.1 15 hrs después de la inducción.; 3.- *vcIIIpk* C1.2 15 hrs después de la inducción.; 4.-*vcIIIpk* C1.3 15 hrs después de la inducción.; 5.-*vcIIIpk* C3.1 15 hrs después de la inducción.; 6.-*vcIIIpk* C3.2 15 hrs después de la inducción. En el recuadro verde se muestran la banda correspondiente a las tres construcciones.

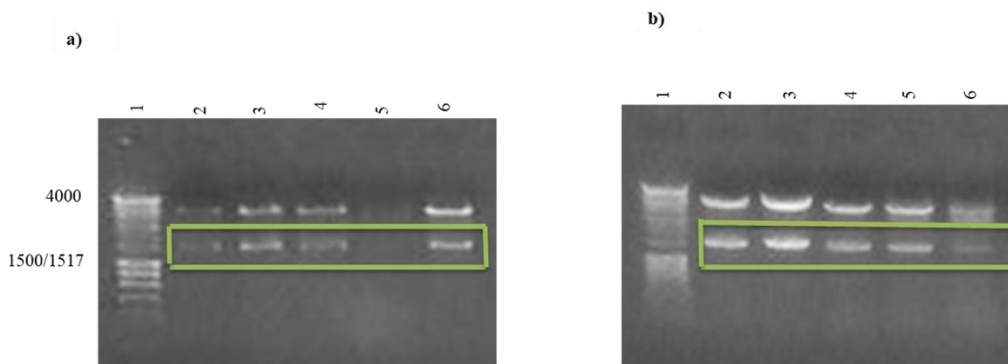


Figura 23. Estabilidad de las tres construcciones en la cepa BL21A-I. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción NdeI/BamHI. Los incisos **a** y **b** muestran la electroforesis en gel de agarosa 1x. **a)** 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIpk* sin inducir; 3.- *vcIIpk* sin inducir; 4.- *vcIIIpk* 1B sin inducir; 5.- *vcIIIpk* 2C sin inducir; 6.- *vcIIIpk* 3B sin inducir. **b)** 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIpk* 15 hrs después de la inducción; 3.- *vcIIpk* 15 hrs después de la inducción; 4.- *vcIIIpk* 1B 15 hrs después de la inducción; 5.- *vcIIIpk* 2C 15 hrs después de la inducción; 6.- *vcIIIpk* 3B 15 hrs después de la inducción.

Debido a que las digestiones en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS mostraban un patrón de bandas no esperado, se realizó una PCR para las tres construcciones. Para amplificar los fragmentos de interés se utilizaron los primers universales T7 promoter y T7 terminator, cabe destacar que sólo se amplificaron las construcciones pertenecientes a las 15 horas después de la inducción en la cepa de OrigamiB(DE3)pLysS (figura 24a).

En el caso de la cepa de OrigamiB(DE3)pLysS tuvimos muchas colonias que resultaron ser falsos positivos (datos no mostrados), por lo que se decidió amplificar además con los primers específicos de *vcIIIpk* (Fw pkVCII-2 y Rv pk VCII-2). En la figura 24a podemos observar que las tres construcciones se encuentran presentes y se comprobó que efectivamente se estaba trabajando con la construcción de *vcIIIpk* en cada una de las clonas probadas (figura 24b).

Para el caso de la cepa de BL21-A1 podemos observar que las tres construcciones se encuentran presentes en el cultivo 15 horas después de la inducción (figura 25).

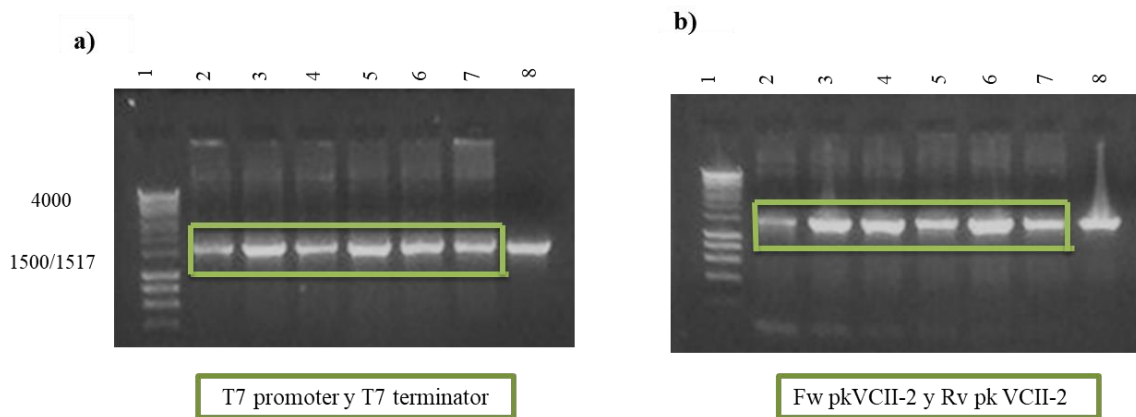


Figura 24. Amplificación de las construcciones mediante PCR en la cepa OrigamiB(DE3)pLysS a) 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIpk* 3.- *vcIIpk* ;4.-*vcIIIpk* C1.1; 5.-*vcIIIpk* C3.1; 6.-*vcIIIpk* C3.2; 7.- *vcIIIpk* C3.3 y 8.-*vcIIIpk* X10L-GOLD (control). b) Amplificación exclusiva de la construcción de *vcIIIpk*. 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIIIpk* C1.1; 3.- *vcIIIpk* C1.2; 4.-*vcIIIpk* C1.3; 5.-*vcIIIpk* C3.1; 6.-*vcIIIpk* C3.2; 7.- *vcIIIpk* C3.3; 8.-*vcIIIpk* X10L-GOLD (control).

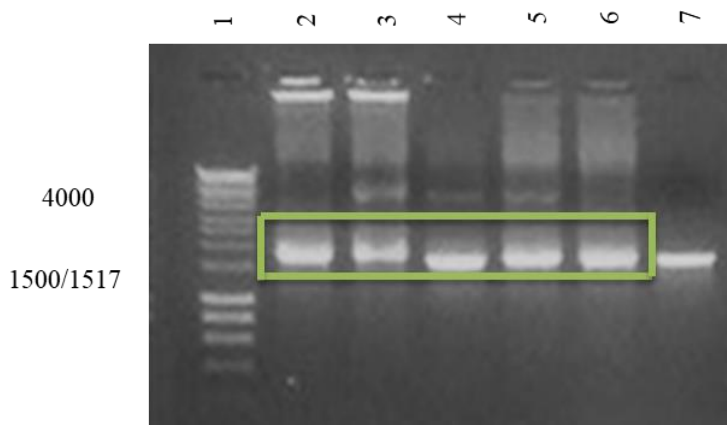


Figura 25. Amplificación de las tres construcciones mediante PCR en la cepa BL21-AI. 1.- Hyper Ladder (Bioline); 2.- *vcIpk*; 3.- *vcIIpk*; 4.-*vcIIIpk* 1B; 5.-*vcIIIpk* 2C; 6.-*vcIIIpk* 3B; 7.-*vcIIIpk* X10L-GOLD (control).

Como conclusión podemos ver que en las cepas donde hubo expresión de la proteína fue porque el inserto se encontraba presente después de la inducción, tal es el caso de las cepas de OrigamiB(DE3)pLysS y BL21-AI, en comparación con la cepa BL21(DE)pLysS, donde el inserto se va perdiendo conforme avanza el tiempo después de ser inducido, pero este fenómeno solamente ocurre para el caso de la construcción de *vcIIIpk*.

5.6 Expresión y purificación de la proteína en la cepa BL21-AI

En base a los resultados anteriores, el sistema BL21 bajo el cual se decidió expresar y purificar la proteína *VcIIPK* fue en la cepa BL21-AI, esto debido a un mejor rendimiento de expresión. Esta fue expresada a 37°C con L-arabinosa 0.25% e IPTG 1.2 mM por 15 horas. Posterior a esto, se cosecharon las bacterias y se siguió el proceso de purificación descrito con anterioridad en el apartado de Materiales y Métodos. La proteína fue purificada mediante una resina de Niquel (Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged de BIO-RAD) y posteriormente se pasó por una columna de desalado y finalmente fue precipitada en sulfato de amonio al 80% y almacenada a 4°C, como se almacenan *VcIPK* y *VcIIPK* (Guerrero-Mendiola, 2017). Después de la purificación se hizo una curva de porteiña por el método de ácido bicinconónico (BCA) para monitorear la concentración de proteína en cada uno de los pasos de la purificación y con la concentración determinada (20 µg/µl) se corrió un gel SDS-PAGE para ver la pureza de nuestra proteína de interés. Los resultados mostraron una actividad específica de 30 ± 1.4 µmol/min/mg y 2.80 mg totales de proteína *VcIIPK*. Cabe mencionar que estas actividades se obtuvieron dos días posteriores a la purificación. En cuanto a la pureza, se puede apreciar una sola banda de un peso aproximado de 52.1 kDa en un gel SDS-PAGE (figura 26).

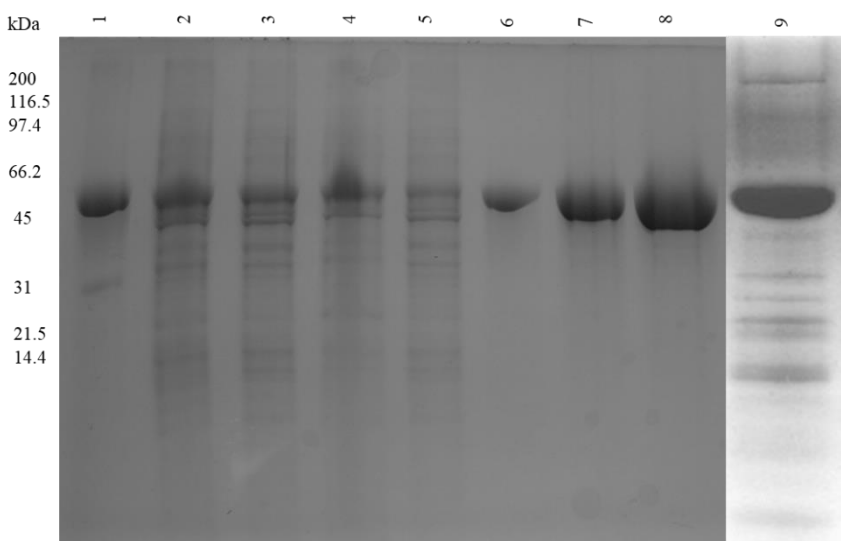


Figura 26. Pasos de la purificación en la cepa BL21-AI. 1.- PK control; 2.- Extracto crudo; 3.- Sobrenadante; 4.- Pellet; 5.- No se pegó a la columna de Niquel; 6.- Proteína pura 5µg; 7.- Proteína pura 10 µg; 8.- Proteína pura 20 µg; 9.- Proteína pura 10µg posterior a un par de semanas.

Posterior a un par de semanas, la proteína de *VcIIPK* fue desalada por una columna de desalado HiTrap; se midió la actividad, observando que la enzima en el transcurso del tiempo iba perdiendo su actividad y cuando se corrió un gel SDS-PAGE, pudimos observar la formación de un patrón de

bandas dependiendo del tiempo de almacenamiento. Con base a esto, concluimos que la proteína se estaba autoproteolizando (figura 26, carril 9).

Para prevenir este fenómeno, se buscaron condiciones de purificación y almacenamiento. De tal forma que durante la purificación la proteína se purificó sin y con 10% de glicerol (tabla 4). Posterior a la purificación la proteína sin glicerol se almacenó a 4°C en amortiguador HEPES 50 mM, pH 7.4, y la proteína purificada con glicerol al 10% se almacenó con 20% de glicerol a tres temperaturas (4°C, -20°C y -70°C). Estas proteínas se monitorearon durante una semana mediante actividad enzimática y en geles SDS-PAGE, para evaluar bajo que condición se mantenía estable la proteína. Para homogenizar el proceso de monitoreo en geles SDS-PAGE, la proteína fue cuantificada y se cargaron diariamente 10 µg/µml de la proteína en las diferentes condiciones de almacenamiento.

Tabla 4. Valores obtenidos en cada uno de los pasos de la purificación.

	Pasos de la purificación	Actividad total µmol/min	Proteína total Mg	Actividad específica µmol/min/mg
Sin glicerol	Extracto crudo	42116.47	420.66	100.12
	SN	44229.92	275.25	160.69
	Pellet	2179.12	257.58	8.46
	Proteína pura	2568.26	14.58	176.15
Con Glicerol	Extracto crudo	55273.75	483.12	114.41
	SN	46320.10	272.76	169.82
	Pellet	2966.06	274.89	10.79
	Proteína pura	1807.16	9.76	185.16

En el día 0 de la purificación, VcIIPK fue purificada sin glicerol presentaba una actividad de 176.15 ± 28.7 µmol/min/mg y VcIIPK con glicerol, presentaba una actividad de 185.16 ± 22.6 µmol/min/mg. En la figura 27 se muestra el porcentaje de actividad de VcIIPK bajo las diferentes condiciones de almacenamiento en el transcurso del tiempo.

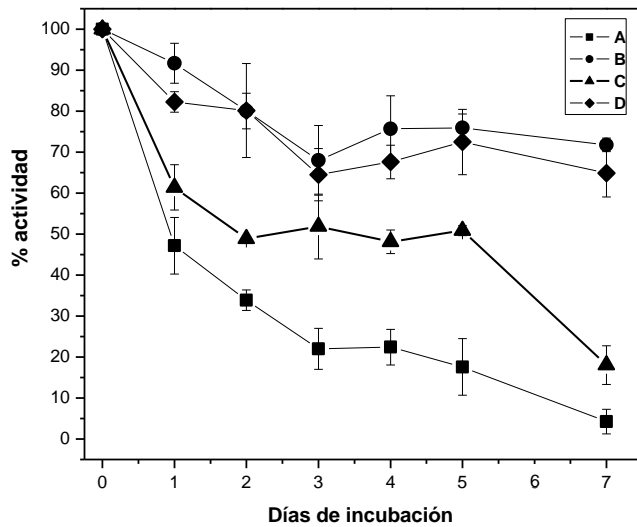


Figura 27. Porcentaje de actividad de VcIIPK bajo diferentes condiciones de almacenamiento. A.-proteína sin glicerol almacenada a 4°C; B.-proteína con glicerol al 20% a 4°C; C.-proteína con glicerol al 20% a -20°C y D.-proteína con glicerol 20% a -70°C.

En el día 1 vemos que la proteína sin glicerol perdió un poco más del 50% de su actividad, mientras que las que fueron almacenada con glicerol al 20% mantienen entre el 80-90% de su actividad. Con el paso de los días vemos que la proteína sin glicerol va perdiendo completamente su actividad, pero las que se encuentran almacenadas con glicerol y a 4°C y -70°C mantienen entre el 70-80% de su actividad, mientras que la que está a -20°C para la finalización de la semana mantiene el 18% de su actividad.

Contrastando estos datos con los geles SDS-PAGE (figura 28) podemos observar que en el día cero de purificación obtuvimos la proteína completamente pura para ambas condiciones de purificación (sin glicerol y con glicerol). Para el día 1 observamos que la banda que corresponde a VcIIPK a 4°C sin glicerol se va perdiendo, mientras que las que se encuentran en glicerol a 4°C, -20°C y -70°C se mantiene (figura 29).

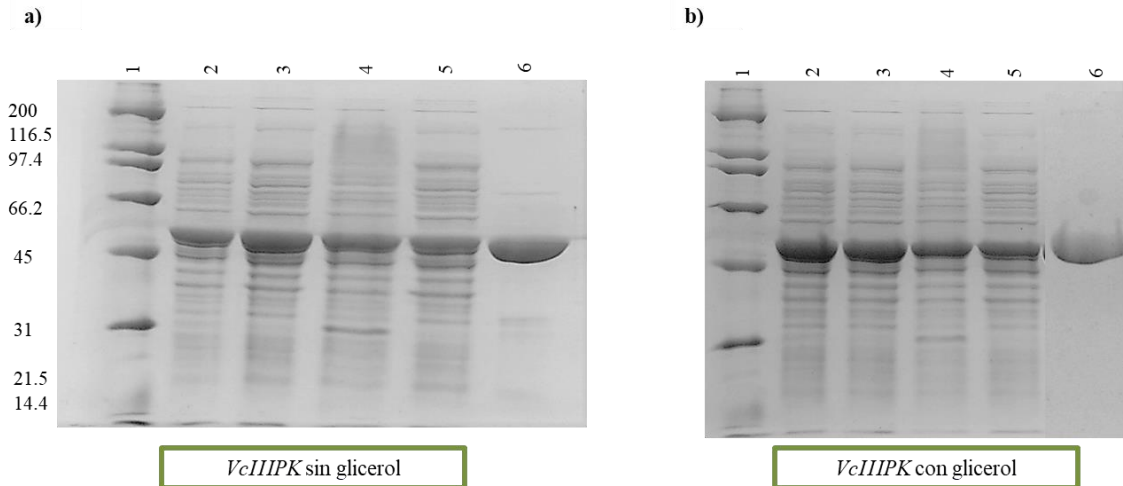


Figura 28. Pasos de la purificación en la cepa BL21-AI. Día 0 en **a** y **b** el orden es el siguiente: 1.- SDS-PAGE Molecular Weight Standars, Broad Range; 2.- Lisado; 3.- Sobrenadante; 4.- Pellet; 5.- No se pegó; 6.- Proteína pura

Para el día 2, podemos ver que la banda de *VcIIPK* a 4°C va desapareciendo y aparecen bandas en la parte inferior, que con el paso de los días van desapareciendo en conjunto con la banda referente a la proteína. Para el caso de *VcIIPK* que se encuentra almacenada con glicerol a 4°C vemos la formación de agregados en la parte superior, que con el transcurso de los días se va intensificando, este patrón también se hace presente en *VcIIPK* almacenada a -20°C, aunque la banda de la proteína se mantiene un poco mas estable. Bajo la condición de glicerol al 20% a -70°C encontramos que es la forma más estable sin la formación de agregados y manteniendo al rededor del 70% de su actividad.

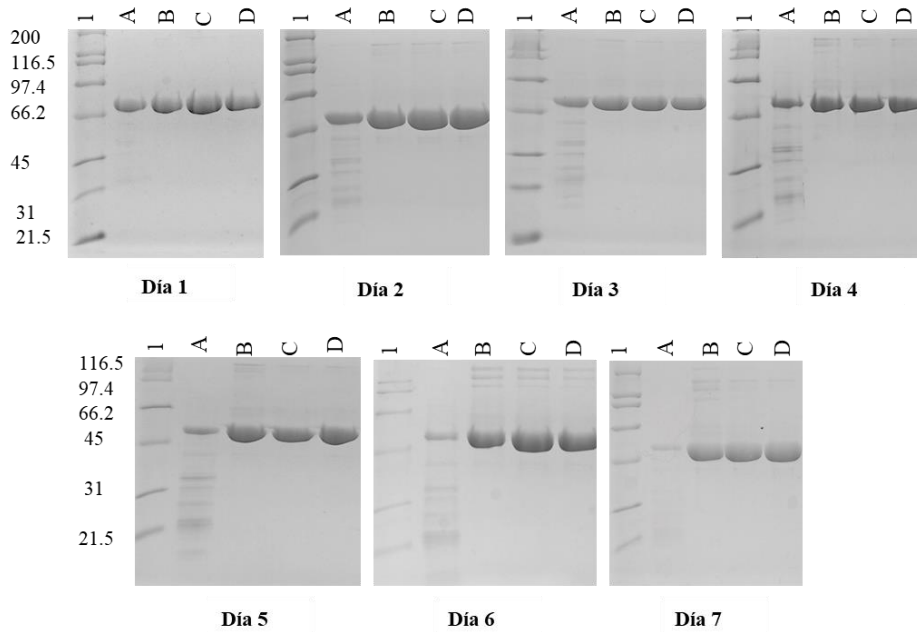


Figura 29. Estabilidad de la proteína de VcIIPK bajo las diferentes condiciones de almacenamiento. El orden es el siguiente: 1.- SDS-PAGE Molecular Weight Standars, Broad Range; A.- VcIIPK sin glicerol (4°C); B.- VcIIPK con glicerol (4°C); C.-VcIIPK con glicerol (-20°C); D.-VcIIPK con glicerol (-70°C).

6. CONCLUSIONES

Los genes de PK de *V. cholerae* son un buen ejemplo de como tres genes parálogos no pueden ser expresados en el mismo sistema bacteriano. Mientras que *vcIpk* y *vcIIpk* pueden ser transformados en seis cepas del sistema BL21; *vcIIIpk* resulta tóxico para BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL y BL21-Gold(DE3)pLysS, medianamente tóxico para BL21(DE3)pLysS y Origami B(DE3)pLysS y no tóxica para BL21-AI.

También, se encontró que el rendimiento de expresión de cada gen es diferente de una cepa a otra. De acuerdo con Chen (2017), el nivel de toxicidad puede variar de proteína a proteína dependiendo de sus características fisicoquímicas. En este aspecto, los porcentajes de identidad que presentan en su secuencia de nucleótidos son: *vcIpk* y *vcIIpk* 48%, *vcIpk* y *vcIIIpk* 47.8% y *vcIIpk* con *vcIIIpk* 57.8% y a pesar de que *VcIIPK* y *VcIIIPK* se relacionan filogenéticamente y exhiben una identidad del 50% en su secuencia de aminoácidos, su estabilidad proteica es drásticamente diferente; mientras que uno es estable durante la purificación y el almacenamiento, la otra se auto-digiere en menos de una semana.

7. ANEXO

Entre los parámetros más importantes que se han descrito en la producción exitosa de proteínas recombinantes en *E. coli* se encuentran: la eficiencia en el proceso de transcripción y traducción, la estabilidad del vector de expresión y de los ácidos ribonucleicos (ARN) transcritos, la estabilidad de las moléculas ante el ambiente proteolítico del hospedero y la localización y plegamiento de la proteína. A continuación se describen algunos puntos importantes de estos parámetros.

Efectos de la presencia del plásmido en *E. coli*

El mantenimiento y la replicación del ADN plasmídico puede inducir una carga metabólica en *E. coli*. El término carga metabólica se define como la cantidad de recursos (materia prima y energía) que se extraen del metabolismo de la célula huésped para el mantenimiento y la replicación del ADN foráneo (Bentley y Kompala, 1990). La respuesta de las células en condiciones limitantes de energía, como resultado de esta carga metabólica, es muy compleja e incluye la activación de vías alternas para la generación de energía (Sorensen y Mortensen, 2005), lo que resulta en alteraciones del crecimiento celular y puede provocar varias respuestas de estrés que, a su vez, pueden dar como resultado menores rendimientos de ADN plasmídico debido a los efectos nocivos de estas alteraciones en el crecimiento.

Estabilidad del plásmido

La transformación de un vector plasmídico que contiene genes exógenos en *E. coli* siempre conlleva a una serie de cargas fisiológicas que afectan la estabilidad del plásmido (Yu *et al.*, 2003). La inestabilidad generalmente se origina a partir de la inestabilidad estructural causada por cambios en el propio plásmido, tales como, mutaciones puntuales, eliminación, inserción o reordenamiento en el ADN del plásmido o inestabilidad segregacional durante la división celular (Kumar *et al.*, 1991). Algunos estudios han demostrado que la estabilidad del plásmido está determinada por muchos factores tales como la carga del plásmido, el número de copias del plásmido, los patrones de replicación, el tipo de sustrato, la composición del medio (Summers, 1991), las condiciones de cultivo y temperatura del cultivo (Silva *et al.*, 2009).

Efecto de la sobreexpresión de proteínas recombinantes sobre el metabolismo celular

La sobreexpresión de una proteína recombinante generalmente aumenta la carga metabólica en el huésped de expresión, debido a la desviación de energía y metabolitos tales como aminoácidos, ribosomas y otros precursores hacia el proceso de síntesis. Las células experimentan numerosos

cambios metabólicos para adaptarse, esto incluye una disminución de la tasa de crecimiento específico, reajuste de las vías de producción de energía, reprogramación del flujo de carbono, la regulación de proteínas implicadas en el proceso de traducción celular y la formación de respuestas a estrés.

Efecto en la tasa de crecimiento específica

La carga metabólica sobre las células productoras de proteínas recombinantes se puede ver reflejada disminuyendo la tasa de crecimiento, especialmente después de la inducción. La inhibición de la tasa de crecimiento se atribuye al agotamiento de precursores y a las mayores demandas de energía que se deben cumplir a costa de la síntesis de biomasa. En cambio, la energía requerida para la expresión de la proteína recombinante y el mantenimiento del plásmido en las células contribuye poco a la demanda global de energía de las células productoras de proteínas. La cinética y el grado de retraso del crecimiento varían en las diferentes proteínas recombinantes, esto puede estar relacionado con la composición de aminoácidos, la tasa de síntesis de proteínas, la solubilidad y la localización subcelular de proteínas (Vaiphei, Pandey y Mukherjee, 2009). La actividad biológica de la proteína recombinante también puede influir en la tasa de crecimiento específico al interferir con la fisiología celular (Binopal, Ranjan y Rajagopal). Además, la tasa de crecimiento también depende de las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y el medio de cultivo. El uso de medios complejos para el cultivo de células puede soportar una tasa de crecimiento específico de células relativamente más alta en comparación con los medios mínimos debido a la disponibilidad de muchos aminoácidos y otros precursores que a su vez reducen considerablemente la carga metabólica (Ruiz *et al.*, 2013).

Por otra parte, otros factores que se ha encontrado que influyen en la inducción de la proteína recombinante son la inestabilidad transitoria del plásmido y la caída en la tasa máxima de crecimiento. Si bien la disminución en la tasa máxima de crecimiento específico podría ser una consecuencia del aumento de la carga metabólica en la célula, la pérdida de plásmido puede, de alguna manera, contribuir al aumento en el coeficiente de mantenimiento.

Además de la síntesis de proteínas en el huésped, otros factores como el recambio de ARN, el recambio proteico y los procesos de desequilibrio energético como el transporte de nutrientes también pueden contribuir a los altos requisitos de mantenimiento tras la inducción. El recambio de ARN se asocia en gran parte con su degradación. La contribución más significativa al recambio proteico es la degradación proteolítica (Summers, 1991).

Por otra parte el problema de la toxicidad proteica puede surgir cuando la proteína recombinante desempeña una función innecesaria y perjudicial en la célula huésped. Esta función interfiere con la proliferación normal y la homeostasis del microorganismo y el resultado visible es una tasa de crecimiento más lenta, baja densidad celular final y muerte (Doherty *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1995).

8. BIBLIOGRAFIA

Alm, R. A., Stroecher, U. H. & Manning, P. A. Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) for the haemolysin of the haemolytic El Tor strain 017 and characterization of the *hlyA* mutation in the non- haemolytic classical strain 569B. *Mol. Microbiol.* 2,481-488 (1988).

Baumann P, Furniss AL, Lee JV. *Vibrio*. In: Krieg nr, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1984. p. 518-38.

Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 3673-3678.

Bennish ML. Cholera: Pathophysiology, clinical features, and treatment. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsnik O, editors. *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspective*. Washington, D.C.: ASM Press; 1994. p. 229-55.

Bentley WE, Kompala DS. Optimal induction of protein synthesis in recombinant bacterial cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1990;589:121–38.

Bharati, K., & Ganguly, N. K. (2011). Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. *The Indian Journal of Medical Research*, 133(2), 179–187.

Boyer PD, Lardy HA, Phillips PH. THE RÔLE OF POTASSIUM IN MUSCLE PHOSPHORYLATIONS *J. Biol. Chem.* 1942 146: 673-682.

Campos J., Martinez E., Marrero K. Production for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 185, 7231-7240, 2003.

Castañón-Sanchez, C. Toxina VCC de *Vibrio cholerae*: de la vacuolización a la muerte celular. *Evid Med Invest Salud* 2012; 5 (4): 114-119.

Colwell, R. R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274, 2025-2031(1996).

Dallas WS, Falkow S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature.* 1980;288:499–501

Das B. Mechanistic insights into filamentous phage integration in *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol* 2014; 5:650.

Doherty AJ, Connolly BA, Worrall AF. Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*. 1993;136:337–340.

Dubey, A.K., Mollet, B. and Roberts, R.J. (1992) *Nucl Acids Res* 20, 1579-1585.

Egan ES, Waldor MK (2003) Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell* 114: 521–530

Eisen, J. A. & Hanawalt, P. C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.* 435, 171-213 (1999).

Fraser, C.M. et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586 (1997).

Galen JE, Ketley JM, Fasano A, Richardson SH, Wasserman SS, Kaper JB. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infect Immun.* 1992.Feb;60(2):406-15.

G. Binopal, R.K., Ranjan, K. Rajagopal, Expression of synthetic human tumornecrosis factor is toxic to *Escherichia coli*, *Gene*. 493 (n.d.) 155–160. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.

Gerdes, K., S. K. Christensen & A. Lobner-Olesen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 3: 371-382

Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2003 Oct;50(1):101-4.

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2000 Aug 3;406(6795):477-83.

Higgins DA, Pomianek ME, Kraml CM, Taylor RK, Semmelhack MF, Bassler BL. The major *Vibrio cholerae* auto-inducer and its role in virulence factor production. *Nature.*2007 Dec 6;450(7171):883-6.

Honda T, Arita M, Takeda T, Yoh M, Miwatani T. Non-01 *Vibrio cholerae* produces two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin and *E. coli* heat-stable enterotoxin. *Lancet* 1985;2:163-4

<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230130.pdf>

<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf>

<https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshot_bl21ai_man.pdf

Invitrogen. (2010). BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent E. coli: User Manual. Recuperadodesde: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshot_bl21ai_man.pdf

J. Guzman, L.M. Belin, D. Carson, M.J. Beckwith, Tight regulation, modulation, and high level expression by vector containing the arabanisePBAD promoter, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 4121–4130.

Jobling MG, Holmes RK. Characterization of hapR, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene hap, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi* luxR gene. *Mol Microbiol.* 1997 Dec;26(5):1023-34.

J. Ruiz, A. Fernández-Castané, C. de Mas, G. González, J. López-Santín, From laboratory to pilot plant *E. coli* fed-batch cultures: optimizing the cellular environment for protein maximization, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40(2013) 335–343, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-012-1226-6>.

Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. *Clinical microbiology reviews.* 1995 Jan;8(1):48-86.

Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3134-9.

Klug, S; Cummings, R; Spencer, A y Palladino, A. (2013). *Conceptos de Genética*. Madrid: Pearson.

Kumar PKR, Maschke HE, Friehs K, Schugerl K. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends Biotechnol* 1991;9: 279–84.

Lee, S. H., Hava, D. L., Waldor, M. K. & Camilli, A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* 99, 625-634 (1999).

Mandel, S.J. (1960) *Biotechnol. Rev.* 24, 289-291.

Marvin D.A. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 150-158, 1998.

Mata, L. (1992). El cólera: historia, prevención y control. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica : Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A. & Davies, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280, 605-608 (1998).

Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*. 2002 Aug 9;110(3):303-14.

Morgan, H. P., Zhong W., McNae, I. W., Michels, P. A. M., Fothergill-Gilmore, L. A. and Walkinshaw, M. D. (2014). Structures of pyruvate kinase display evolutionarily divergent allosteric strategies. *Royal Society Open SCIENCE*.

Muntari, B., Amid, A., Mel, M., Jami, M. S., & Salleh, H. M. (2012). Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB Express*, 2, 12. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-2-12>

Nowak T. Structural changes at the active site of pyruvate kinase during activation and catalysis. *J Biol Chem*. 1978;253(6):1998-2004.

Oria-Hernandez, J., Riveros-Rosas, H., and Ramirez-Silva, L. (2006). Dichotomic Phylogenetic Tree of the Pyruvate Kinase Family. K⁺-Dependent and -Independent Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 30717-30724

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 15661–15667.

Rasmussen, T., Jensen, R. B., & Skovgaard, O. (2007). The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *The EMBO Journal*, 26(13), 3124–3131. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601747>

Roszak, D. B. & Colwell, R. R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379 (1987).

Roger Y Stanier; Julio R Villanueva; Ricardo Guerrero; et al. (1992). *Microbiología*. Barcelona: Reverté: 276.

Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.

Samuelson J.C. (2011) *Recent Developments in Difficult Protein Expression: A Guide to E. coli*

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev.* 1996 Mar; 60(1):167-215.

Silva F, Passarinha L, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *J Microbiol Biotechnol* 2009b;19:1408–14.

Silva F, Queiroz J.A, Domingues F.C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechno adv* 2012; 30(3):691-708.

Sinha S, Redfield R J. Natural DNA Uptake by *Escherichia coli*. *P LoS ONE.* 2012; 7:1- 6.

Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005;115:113–28.

Stefan, A., Alfarano, P., Merulla, D., Mattana, P., Rolli, E., Mangino, P., ... Hochkoeppler, A. (2009). The regulatory elements of *araBAD* operon, contrary to *lac* -based expression systems, afford hypersynthesis of murine, and human interferons in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 25(6), NA-NA. <http://doi.org/10.1002/btpr.270>

Stouthamer, A.H. and van Verseveld, H.W. (1987) *Trends Biotechnol* 5, 149-155.

Strains, Promoters, and Relevant Host Mutations. In: Evans, Jr. T., Xu MQ. (eds) *Heterologous Gene Expression in E.coli. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 705. Humana Press

S.T. Vaiphei, G. Pandey, K.J. Mukherjee, Kinetic studies of recombinanthuman interferon-gamma expression in continuous cultures of *E. coli*, *J. Ind.Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009) 1453–1458, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-009-0632-x>.

Summers, D.K. (1991) *Trends Biotechnol* 9, 273-278.

Tamay de Dios y cols. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. [versión electrónica]. *Investigación en discapacidad.* Vol 2(2), 70-78.

Tilson DL. *Vibrio*. In: Murrain PR BE, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, editor. *Manual of Clinical Microbiology* 7th ed. Washington, D.C.: American Society for microbiology 1999. p. 497-506.

Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Mol Biol Rev Microbiol.* 2004; 68(3):403–31.

Tortora, G; Funke, B; Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:132-53.

Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996 Jun 28;272(5270):1910-4

Watnick, P. I. & Kolter, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 34, 586-595 (1999).

Wiechelman, K; Braun, R y Fitzpatrick, J. *Anal. Biochem,* 175, 231-237 (1988).

Winn, C; Koneman, W. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color.* Buenos Aires: Médica Panamericana.

Yamai S, Okitsu T, Shimada T, Katsube Y. [Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups]. *Kansenshogaku zasshi.* 1997 Oct;71(10):1037-45.

Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K. S., Yamamoto, K. & Honda, T. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* 31, 1513-1521 (1999).

Yildiz, F. H. & Schoolnik, G. K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 180, 773-784 (1998).

Yu H, Shi Y, Sun X, Luo H, Shen Z. Effect of poly(beta-hydroxybutyrate) accumulation on the stability of a recombinant plasmid in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 2003;96:179-83.