



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

“Construcción y caracterización de un sistema
para la expresión cromosomal de genes en
Escherichia coli”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

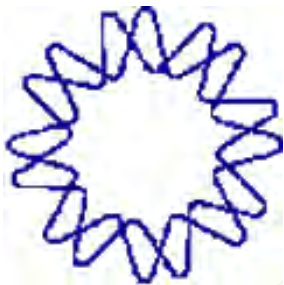
**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

PRESENTA:

Biol. ANDREA SABIDO RAMOS

TUTOR:

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA





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.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS


BIOL. ANDREA SABIDO RAMOS
P r e s e n t e.

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Presidente	Dr.	Baltazar Becerril Luján
Secretario	Dr.	Humberto Flores Soto
Vocal	Dr.	Miguel Ángel Cevallos Gaos
Suplente	Dr.	Victor Bustamante Santillan
Suplente	Dr.	José Luis Puente García

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor a 14 de octubre de 2009


Dr. Enrique Rudiño Piñera
Coordinador de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto D43243.

Andrea Sabido Ramos fue financiada económicamente para realizar sus estudios de posgrado con la beca del CONACyT.

*A mi mamá, Olga, Emilio y César, porque son mi fortaleza y felicidad, mis ganas
de seguir luchando y amando.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Gosset por brindarme de nuevo la oportunidad de seguir trabajando en su grupo, su asesoría como siempre ha sido invaluable.

A los miembros del jurado: Dr. Baltazar Becerril, Dr. Humberto Flores, Dr. Víctor Bustamante y Dr. Miguel Ángel Cevallos, por sus sugerencias y apreciables comentarios para la corrección de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Enrique Merino y Dr. José Luis Puente, por sus aportaciones tan valiosas y enriquecedoras al proyecto.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio Bolívar-Gosset, porque su apoyo nos permite realizar nuestro trabajo en el menor tiempo posible.

A mis compañeros de laboratorio, porque cada uno me ha enseñado de alguna u otra forma a realizar mi trabajo de la mejor manera y con armonía en la convivencia diaria.

A Eugenio, Ofelia, Ana Joyce, Betito, Aldo, Araceli, Karina, Mariana y Hanna, por su amistad, ayuda y buenos momentos fuera y dentro del laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi máxima casa de estudios y por todas las satisfacciones y apoyos que me otorgó para la realización de mis estudios durante la carrera.

ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Antecedentes.....	4
3.1. Mecanismos de recombinación del DNA.....	4
3.1.1. <u>Recombinación homóloga</u>	4
3.1.1.1. <i>Sistema Red del fago λ</i>	6
3.1.2. <u>Recombinación sitio-específica</u>	6
3.1.2.1. <i>Sistema loxP/Cre del fago P1</i>	7
3.1.2.2. <i>Sistema FRT/Flp de Saccharomyces cerevisiae</i>	8
4. Sistemas de integración.....	9
4.1. <u>Familia pBRINT-Ts</u>	9
4.2. <u>Inactivación cromosomal por productos de PCR</u>	11
4.3. <u>Familia pLox1</u>	12
5. Regulación de la expresión genética.....	12
IV. Justificación.....	15
V. Hipótesis.....	16
VI. Objetivos.....	16
6.1. Objetivo general.....	16
6.2. Objetivos particulares.....	16
VII. Metodología.....	17
7.1. Cepas y plásmidos.....	17
7.2. Técnicas genéticas y de DNA recombinante.....	18
7.2.1 Transformación de DNA.....	18

7.2.2 Purificación de DNA.....	18
7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
7.2.4. Generación de productos de PCR e integración cromosomal.....	20
7.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	20
7.3.1. Medios de cultivo.....	20
7.3.2. Condiciones de los cultivos de crecimiento.....	21
7.3.3. Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de melanina.....	21
VIII. Resultados y discusión.....	24
8.1. Construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc.....	24
8.2. Construcción del plásmido pLoxGentrc <i>mela</i>	29
8.3. Integración del gene heterólogo <i>mela</i> en el gene cromosomal <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	32
8.4. Efecto de la expresión del gene heterólogo <i>mela</i> en el cromosoma de la cepa silvestre W3110 de <i>E. coli</i> sobre su capacidad de sintetizar melanina.....	35
IX. Conclusiones.....	38
X. Perspectivas.....	39
XI. Bibliografía.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de recombinación homóloga mediada por una ruptura de doble cadena.....	5
Figura 2. Proteínas de <i>E. coli</i> involucradas en la migración de las cadenas y la resolución de las estructuras de Holliday.....	5
Figura 3. Mecanismo de integración y escisión por recombinación sitio-específica.....	7
Figura 4. Secuencia nucleotídica de un sitio <i>loxP</i>	7
Figura 5. Recombinación entre dos sitios <i>loxP</i>	8
Figura 6. Secuencia nucleotídica de los 3 sitios <i>frt</i>	8
Figura 7. Comparación de los sitios de recombinación de las enzimas Cre y Flp.....	9
Figura 8. Familia pBRINT-Ts.....	10
Figura 9. Estrategia de integración cromosomal utilizando el plásmido pBRINT-Ts en el gene <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	10
Figura 10 Estrategia de interrupción de genes cromosomales utilizando productos de PCR.....	11
Figura 11 Familia pLox1	12
Figura 12. Representación esquemática de los elementos necesarios para la expresión de un gene.....	14
Figura 13. Construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc.....	22

Figura 14. Construcción del plásmido templado pLoxGentrc <i>melA</i>	22
Figura 15. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de <i>E. coli</i>	23
Figura 16. Esquema del pTrc99A e imagen del gel analítico que muestra el producto de PCR <i>lacI</i> -T2.....	24
Figura 17. Esquema del pLoxGen4.....	25
Figura 18. Patrón de restricción del pLoxGen4 Δ <i>HindIII</i> e imagen del gel analítico que muestra el producto de PCR del MCS-L	25
Figura 19. Comprobación de la pérdida del sitio <i>HindIII</i> mediante alineamiento local.....	26
Figura 20. Esquema del plásmido de expresión pLoxGentrc.....	26
Figura 21. Geles que muestran el patrón de restricción de clonas con pLoxGentrc y el producto de PCR del P _{trc} hasta el casete loxP- <i>aacCI</i> -loxP.....	27
Figura 22. Comprobación de la integridad del fragmento <i>lacI</i> -T2 mediante alineamiento local.....	28
Figura 23. Digestiones del pLoxGentrc, pTrc <i>melA</i> y producción de melanina.....	29
Figura 24. Alineamiento local de la secuencia del gene silvestre <i>melA</i> contra la del pLoxGentrc <i>melA</i> de la clona 8.....	31
Figura 25. Verificación mediante PCR de la integración cromosomal en el gene <i>lacZ</i>	33
Figura 26. Caracterización del crecimiento y producción de melanina en las cepas W3110/pLoxGentrc <i>melA</i> y W3110/ <i>lacZ</i> :: <i>trc</i> <i>melA</i> , loxP- <i>aacCI</i> -loxP.....	36

ÍNDICE DE TABLAS**TABLA A**Secuencias promotoras de los diferentes factores sigma de *E. coli*.....13**TABLA B.**

Cepas y plásmidos utilizados y construidos.....17

TABLA C.

Secuencia de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este estudio.....19

TABLA D.Cuantificación de las transformantes de la cepa
W3110 con el producto de PCR $P_{trc}melA$, loxP-*aacCI*-loxP.....32**TABLA E.**

Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas generadas.....37

I. Resumen

Con la llegada de la tecnología del DNA recombinante, un gran número de genes se ha aislado, caracterizado y expresado en diferentes células hospedero. Generalmente, los plásmidos han sido las herramientas moleculares utilizadas por excelencia para expresar genes heterólogos, de manera extracromosomal en microorganismos como *Escherichia coli*. No obstante, se han desarrollado nuevas metodologías que permiten integrar y modificar genes a nivel del cromosoma bacteriano, estos sistemas conocidos como de integración y delección (inactivación), permiten de manera sencilla y rápida la inserción de genes en un determinado locus del cromosoma bacteriano (Le Borgne *et al.*, 1998; Datsenko & Wanner, 2000; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Fukiya *et al.*, 2004).

El presente trabajo de investigación, se centra en el desarrollo de una herramienta molecular que combina características tanto de plásmidos como de sistemas de integración cromosomal. Este proyecto surgió como una alternativa a los problemas asociados con la presencia de plásmidos multicopia (Glick, 1995) y también a los genes de resistencia a antibióticos que permanecen en el genoma de las cepas recombinantes. Este hecho, además de que implica la dificultad para seleccionar modificaciones adicionales que se requieran incorporar a un microorganismo previamente modificado, dado que la disponibilidad de marcadores de selección es limitada, también dificulta la aceptación de estas cepas en procesos de producción, debido a la posibilidad de que se lleve a cabo la dispersión y transferencia horizontal de estos genes.

El sistema generado en este proyecto, permite insertar y expresar genes directamente en el cromosoma de *E. coli*, a través del uso de productos de PCR, sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas modificadas. Este sistema se basa en el uso del promotor fuerte *trc*, así como de la recombinasa Cre del bacteriófago P1 y sus secuencias blanco o sitios de recombinación *loxP*. Para llevar a cabo lo anterior, se partió de un plásmido derivado de la familia pLox1, el cual presenta un casete de resistencia a gentamicina escindible por el sistema Cre/*loxP* (Palmeros *et al.*, 2000), al cual se le insertó un fragmento proveniente del plásmido pTrc99A para la correcta expresión del gene de interés (Amann *et al.*, 1988). De esta manera, se generó el plásmido de expresión pLoxGentrc. Este sistema genético se caracterizó y se validó utilizando como ejemplo al gene heterólogo *mela* de *Rhizobium etli* CFN42. Posteriormente, se evaluó el efecto de la expresión de dicho gene sobre la síntesis de melanina a nivel multicopia, así como al ser insertado en el gene cromosomal *lacZ* de la cepa silvestre W3110 de *E. coli*. Las cepas generadas W3110/pLoxGentrc*mela* y W3110/*lacZ::trcmela*, loxP-*aacCI-loxP* respectivamente, presentan rendimientos del 50 y 75% de melanina a partir de tirosina comparadas con el máximo teórico, respectivamente. Esto demostró que la expresión de genes cromosomales utilizando el sistema molecular aquí desarrollado, en particular *mela* para el caso de este trabajo, resultó ser la estrategia más adecuada para incrementar la producción y el rendimiento de la síntesis de melanina.

II. Introducción

Mediante el desarrollo de tecnologías como la del DNA recombinante ha sido posible la generación de microorganismos con la capacidad de sobreproducir compuestos de interés industrial (Nielsen, 2001). La bacteria *Escherichia coli* se ha sido utilizado en procesos biotecnológicos, como cepa hospedero para la expresión de genes propios, así como heterólogos con el objetivo de producir proteínas y metabolitos específicos. Generalmente, es necesario un nivel de expresión alto de los genes de interés para producir grandes cantidades de la proteína requerida, para lo cual se hace uso de plásmidos en los que se introduce el DNA foráneo. Una vez expresado el gene de interés en la célula, la proteína resultante provee al hospedero de nuevas capacidades metabólicas, como son la habilidad de producir nuevos metabolitos o bien sobreproducir compuestos nativos.

Los plásmidos usualmente son moléculas circulares de DNA, que se replican de manera autónoma al DNA cromosomal bacteriano. Generalmente, se encuentran en múltiples copias dentro de la célula hospedero y a pesar de su versatilidad y utilidad como vectores de clonación, es sabido que la presencia de múltiples copias de un plásmido y la expresión del DNA que contiene, representan una “carga metabólica” al organismo hospedero, que frecuentemente ocasiona cambios adversos en su metabolismo. La carga metabólica se refiere a los recursos de la bacteria, ya sea en la forma de energía o de moléculas precursoras, que se requieren para mantener y expresar el DNA de interés en la célula. Uno de los cambios más comúnmente observados, es una disminución en la tasa específica de crecimiento (μ) de la bacteria (Glick, 1995). Ahora bien, si el interés es obtener una gran cantidad de una proteína en particular, entonces resulta ideal el uso de vectores de expresión en multicopia, sin dejar de lado otros aspectos a considerar sobre los plásmidos como son: la inestabilidad segregacional, la cual se refiere a la pérdida del plásmido, lo cual puede evitarse hasta cierto grado si se emplea algún tipo de presión selectiva como lo sería la adición de antibióticos cuya resistencia se encuentre codificada por un gene presente en el plásmido. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es deseable el empleo de antibióticos, ya que es necesario removerlos del medio de cultivo en procesos industriales.

En nuestro laboratorio se han construido un conjunto de vectores, muchos de ellos derivados de pBR322, que permiten introducir en la bacteria el DNA clonado y estabilizarlo de forma extracromosómica (Bolívar *et al.*, 1977). Entre estos derivados, destacan una familia de tres plásmidos (pBRINT-Ts) que además permiten integrar

material genético en el locus cromosomal *lacZ* de *E. coli*, reduciendo de esta manera el problema de la carga metabólica en la célula (debida al mantenimiento del número de copias del plásmido y a la expresión del gene de interés), así como la inestabilidad segregacional (Le Borgne *et al.*, 1998 y 2001). Otro de estos derivados, es el plásmido pLox1, el cual se desarrolló con el objetivo de eliminar los genes de resistencia a antibióticos del cromosoma bacteriano, lo cual permite incrementar el repertorio de marcadores de selección disponibles para su uso en *E. coli* y otras bacterias (Palmeros *et al.*, 2000). Por otra parte, existen métodos actuales de reemplazo alélico que permiten, a través del uso de productos de PCR, insertar genes en cualquier locus del cromosoma bacteriano (Datsenko & Wanner, 2000; Kolisnychenko *et al.*, 2002; Fukiya *et al.*, 2004). En estos sistemas, la integración génica ya no está restringida a un determinado sitio en el cromosoma. Sin embargo, estas metodologías están diseñadas únicamente para llevar a cabo la inactivación de genes en el cromosoma de *E. coli*. Por esta razón, sería ideal generar nuevas herramientas moleculares, basadas tanto en el uso de plásmidos como de sistemas actuales de integración, que permitan no sólo inactivar sino también expresar genes a nivel cromosomal y que sean estables, es decir, que logren contender con la pérdida de genes y con el efecto de carga metabólica, ambos factores impuestos tanto por la segregación como por el efecto multicopia de los plásmidos respectivamente. Por otra parte, el diseño de dichas herramientas podrá permitir que la expresión cromosomal del gene de interés, pueda ser regulable o bien constitutiva, eliminando en este último caso la necesidad de un inductor. Asimismo, estas metodologías prescindirían del uso de antibióticos.

Considerando la importancia que tienen estas herramientas moleculares en la generación de cepas con nuevas capacidades metabólicas, en este proyecto se diseñó y caracterizó un método para la integración y la expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*, basado en el uso de un plásmido de expresión como templado para la generación de un producto de PCR. Para poder validar este sistema, se utilizó al gene heterólogo de *Rhizobium etli* CFN42, el cual codifica para una tirosinasa dependiente de cobre, involucrada en la síntesis de melanina. Se estudió el efecto de expresar dicho gene en el crecimiento y la producción del pigmento mencionado, comparativamente entre las cepas que expresan *melA* en multicopia, así como una vez integrado en el cromosoma, es decir en monocopia.

III. Antecedentes

Ante la creciente demanda de compuestos de interés comercial, los avances en la ingeniería genética han permitido desarrollar cepas modificadas genéticamente con características favorables para la síntesis de dichos productos. La estrategia más deseable para la generación de cepas de producción estables, consiste en lograr la expresión cromosomal de los genes de interés, lo cual se puede lograr mediante mecanismos de integración que involucran recombinación homóloga mediada por la enzima RecA, así como recombinación sitio específica mediada por enzimas recombinasas sitio específicas (Balbás y Gosset, 2001).

3. 1. Mecanismos de recombinación del DNA

3. 1. 1. Recombinación homóloga

Este tipo de recombinación ocurre entre secuencias muy similares o idénticas de al menos 500 pares de bases, y puede llevarse a cabo en cualquier punto a lo largo del cromosoma. La recombinación homóloga es conservativa, es decir, no hay pérdida o ganancia de bases (Nelson y Cox, 2000).

El modelo de la ruptura de doble cadena (Fig. 1), se ha utilizado para describir el mecanismo de recombinación homóloga en eucariontes, aunque también describe el de procariontes. En este modelo, la recombinación inicia con un corte de doble cadena en una de las moléculas de DNA, esta ruptura es alargada por acción de una exonucleasa 5'→3', la cual deja extremos 3' de cadena sencilla libres. El extremo 3' de una de las cadenas invade a la molécula homóloga de DNA, y es elongado por acción de la DNA polimerasa utilizando como templado a la cadena complementaria. Por otro lado, el extremo 3' de la otra cadena que sufrió ruptura, también es elongado utilizando la otra cadena complementaria del dúplex homólogo. Posteriormente, los extremos de cada una de las cadenas elongadas son ligados. Este intercambio de segmentos entre ambas moléculas de DNA, tiene como resultado la generación de dos heterodúplex con dos sitios de entrecruzamiento conocidos como estructuras de Holliday. La resolución de estas estructuras, es decir, la generación de moléculas individuales de DNA de doble cadena, se da a través de la introducción de segundos cortes. Lo anterior, ocurre de dos maneras, generando en uno de estos eventos un par de dúplex en los cuales ocurrió recombinación recíproca (Lodish *et al.*, 2000).

En *E. coli*, la recombinación homóloga sigue de manera general el modelo de la ruptura de doble cadena. Sin embargo, se limita a la presencia de un único extremo 3' de cadena sencilla, necesario para invadir una molécula de DNA. En este caso, el complejo enzimático RecBCD reconoce la ruptura y se une al dúplex de DNA. Posteriormente RecBCD se mueve a lo largo del DNA mientras su actividad helicasa desenrolla el dúplex. De manera similar al modelo de la ruptura de doble cadena, el complejo enzimático degrada tanto con su actividad exonucleasa 5'→3' como con la 3'→5', el DNA de cadena sencilla de ambas hebras. Sin embargo, cuando RecBCD reconoce sitios de alta recombinación llamados CHI, su actividad 3'→5' disminuye mientras que la 5'→3' incrementa. De esta manera, se genera un extremo 3' de cadena sencilla, el cual es reconocido por múltiples enzimas de unión a DNA llamadas RecA. En presencia de ATP, RecA cubre el extremo 3' generando

un filamento nucleoproteico, el cual invade un dúplex de DNA homólogo. Una vez que RecA lleva a cabo la inserción del DNA de cadena sencilla, una de las hebras del dúplex homólogo es desplazada, formándose un heterodúplex con estructura de Holliday.

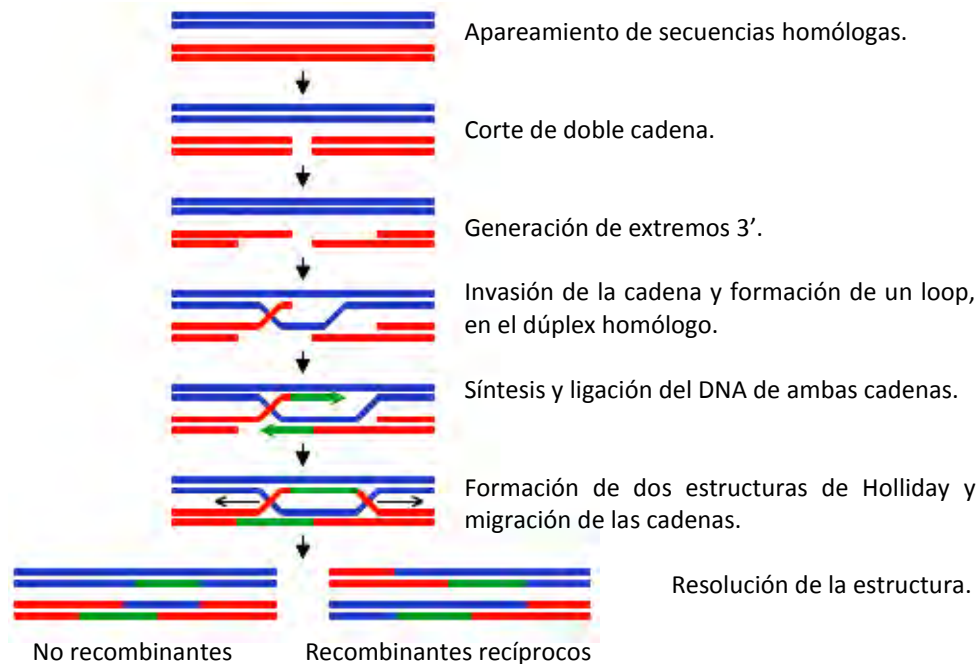


Figura 1. Modelo de recombinación homóloga mediada por una ruptura de doble cadena (modificado de Nelson y Cox, 2000).

Esta estructura es reconocida por la enzima RuvA, que desenrolla dicho punto de entrecruzamiento dejando cada una de las cuatro cadenas separadas en forma de cruz. De esta manera, se induce la unión de dos proteínas hexaméricas llamadas RuvB, cada una de las cuales forma un canal a través del cual pasa el DNA (Fig. 2a). El complejo formado por RuvA y RuvB en presencia de ATP, lleva a cabo la migración de las cadenas (branch migration), es decir, el desplazamiento unidireccional de la estructura de Holliday a lo largo del dúplex. Finalmente, dos endonucleasas de nombre RuvC se unen al complejo RuvA/B, y resuelven la estructura de Holliday a través de un corte en dos sitios separados por 180° (Fig. 2b). Posteriormente, los extremos generados se ligan y se generan moléculas recombinantes (o no recombinantes) conteniendo una región heterodúplex (Fig. 2c) (Lodish *et al.*, 2000).

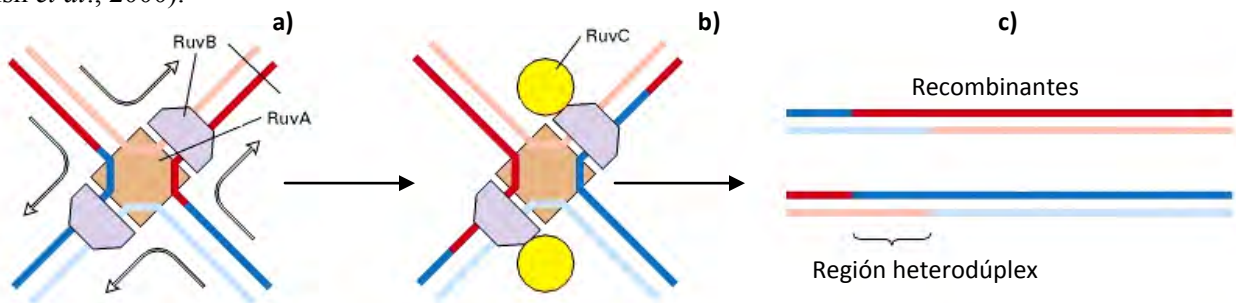


Figura 2. Proteínas de *E. coli* involucradas en la migración de las cadenas y la resolución de las estructuras de Holliday (modificado de Lodish *et al.*, 2000).

La ventaja principal de utilizar el mecanismo de recombinación homóloga en sistemas de modificación genética, radica en que se conoce el sitio donde se realiza la inserción de la modificación deseada (Palmeros, 2001).

3. 1. 1. 1. Sistema Red del fago λ

El sistema que lleva a cabo el evento de recombinación en el fago λ , previo al empaquetamiento del DNA en las cápsides del fago, es el de la recombinasa Red. Este sistema, está formada por los productos de los genes γ , β y *exo*, localizados en el operón pL de este fago. El mecanismo de recombinación inicia debido a la presencia de rupturas de doble cadena, en sitios específicos *cos* (cohesive end site), por la enzima terminasa. Esta enzima se une al extremo derecho del sitio *cos*, linearizando el cromosoma del fago λ . Este extremo queda desprotegido por la terminasa, de tal manera que es sujeto a degradación por la proteína Exo. Esta enzima, permanece unida a una de las cadenas del dúplex de DNA, mientras que con su actividad de exonucleasa degrada la hebra complementaria en dirección 5' \rightarrow 3'. Esto resulta en un extremo 3' libre al cual se une el otro componente de este sistema, la proteína Beta (Sawitzke *et al.*, 2007).

La acción conjunta de Beta y la proteína RecA, media la invasión de la cadena sencilla en un dúplex de DNA homólogo, promoviendo el alineamiento y el intercambio entre las cadenas complementarias. Una vez que se forma el heterodúplex, el complejo RuvAB se encarga de la migración de las cadenas, mientras que la estructura de Holliday es resuelta por RuvC (Poteete, 2001).

Las moléculas de DNA lineal, generalmente son degradadas por el sistema RecBCD de la bacteria. Sin embargo, la proteína Gama del sistema Red, inhibe la actividad exonucleasa de dicho complejo en la célula hospedero. Debido a esto, el sistema Red del fago λ es ampliamente utilizado para promover la recombinación homóloga entre fragmentos pequeños de DNA lineal y el cromosoma de organismos hospederos. Este sistema se ha utilizado principalmente para inactivar genes en el cromosoma de *E. coli* (Murphy, 1998), ya que a diferencia de la recombinación homóloga mediada por RecBCD, las proteínas del sistema Red reconocen secuencias homólogas de aproximadamente 50 pares de bases entre las moléculas de DNA involucradas en el evento de recombinación, haciendo más sencilla la manipulación de este sistema *in vitro*.

3. 1. 2. Recombinación sitio-específica

Este tipo de recombinación, a diferencia de la recombinación homóloga, ocurre en sitios muy específicos entre las moléculas de DNA los cuales, a diferencia de la recombinación homóloga, tienen una región pequeña de secuencia idéntica. En este tipo de recombinación no participa RecA, sino proteínas específicas para cada sistema llamadas recombinasas sitio-específicas, las cuales llevan a cabo el intercambio genético y la unión de las hebras por una ruptura precisa en los sitios blanco. Como resultado se genera un cointegrado, el cual está flanqueado por dos sitios nuevos de inserción, que son reconocidos por la misma enzima para llevar a cabo la escisión del DNA (Fig. 3). Sólo algunos sistemas de recombinación sitio-específica se utilizan extensamente en la modificación del genoma de diversos organismos (incluyendo bacterias, plantas, moscas y mamíferos), la

familia λ integrasa está formada por dos de ellos: el sistema *loxP*/Cre del fago P1 y el sistema *flr*/Flp de *Saccharomyces cerevisiae*.

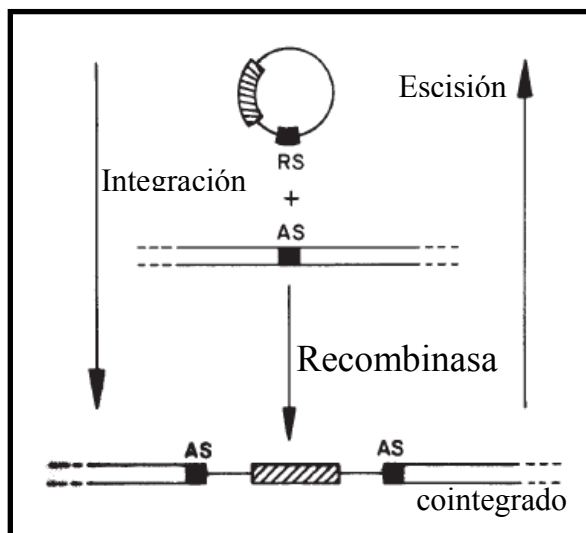


Figura 3. Mecanismo de integración y escisión por recombinación sitio-específica. Abreviaciones: sitio de reconocimiento: RS, sitio de inserción: AS (Balbás & Gosset, 2000).

3. 1. 2. 1. Sistema *loxP*/Cre del fago P1

Durante el ciclo de replicación de este fago, la recombinasa Cre es la responsable de resolver los dímeros que se forman durante la duplicación de su genoma; además de esta enzima, el sistema está conformado por dos sitios de recombinación llamados *loxP*, cada uno de los cuales consiste de una secuencia de 34 pares de bases, compuesta por 2 secuencias invertidas repetidas de 13 pares de bases separadas por una región de 8 nucleótidos (Fig. 4).

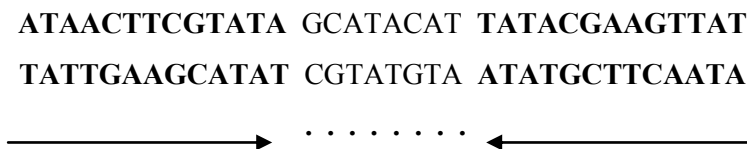


Figura 4. Secuencia nucleotídica de un sitio *loxP*. Se señala la región de entrecruzamiento (•••).

Después de que un dímero de Cre se une a un sitio *loxP*, otro dímero localiza y se une a un segundo sitio *loxP*, la recombinasa corta el DNA en la región espaciadora y después de llevar a cabo el intercambio de las hebras, vuelve a unir el DNA. La recombinación entre dos sitios *loxP* dispuestos en la misma dirección, provoca que el fragmento de DNA entre ellos se escinda como molécula circular (Fig. 5); los productos de esta recombinación llevan un sitio *loxP* completo cada uno. En cambio, el evento de recombinación entre dos sitios *loxP* dispuestos en orientación contraria provoca que el fragmento de DNA entre ellos se invierta (Sternberg y Hamilton, 1981).

Este mecanismo de recombinación sitio-específica, permite eliminar marcadores de resistencia del cromosoma, mientras estén flanqueados por sitios *loxP* (Palmeros *et al.*, 2000).

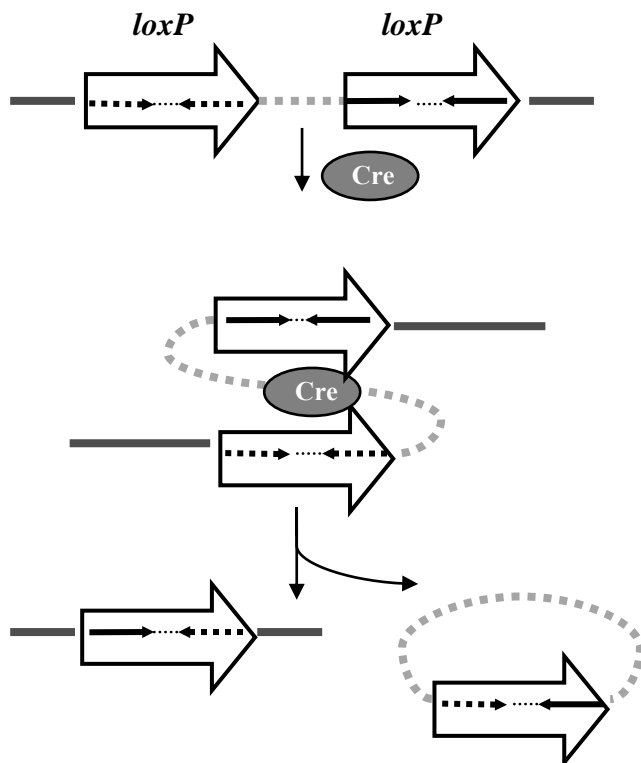


Figura 5. Recombinación entre dos sitios *loxP* orientados en la misma dirección.

3. 1. 2. 2. Sistema *frt*/Flp de *Saccharomyces cerevisiae*

La enzima Flp está codificada por el plásmido 2 μ m de levadura, y es responsable del mantenimiento del número de copias de dicho vector. El DNA blanco de esta enzima, son los sitios de recombinación *frt* (Flp Recognition Target), y a diferencia del sistema *Cre/loxP*, existen 3 sitios de unión, sin embargo, se ha visto que uno no es esencial (Fig. 6). Así mismo, la longitud de la región espaciadora (donde ocurre el entrecruzamiento) puede variar de 7-9 pbs, lo cual no repercute en la eficiencia de la recombinación (Chen y Rice, 2003).

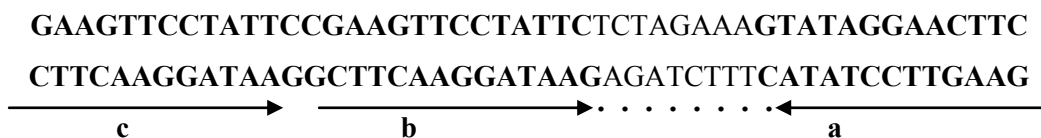


Figura 6. Secuencia nucleotídica de los 3 sitios *frt*. El sitio marcado con **c** no es necesario para la recombinación. Se señala la región de entrecruzamiento (•••).

Al igual que Cre, la enzima Flp no requiere de componentes accesorios para llevar a cabo su reacción, además de que comparten más de la mitad en sus sitios de recombinación (Fig. 7). A pesar de sus diferencias en especificidad y en afinidad durante el reconocimiento de sus secuencias nucleotídicas (ya que ninguna de estas recombinasas parece reconocer el sustrato de la otra). Ambas enzimas presentan un mecanismo de unión

conservado, lo cual se observa en el uso de dos dominios enzimáticos, que reconocen y se unen a sus sitios respectivos (Buchholz *et al.*, 1996, Chen y Rice, 2003 y Swalla *et al.*, 2003).

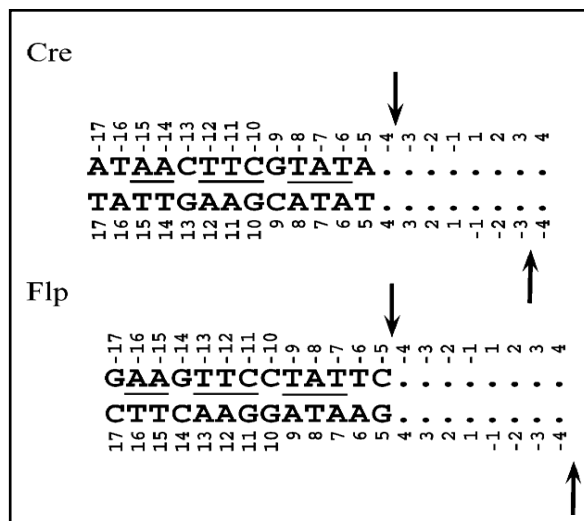


Figura 7. Comparación de los sitios de recombinación de las enzimas Cre y Flp. La numeración inicia en la mitad de la región espaciadora. Región de entrecruzamiento (•••), posición de corte de las enzimas (↓↑), secuencias compartidas por los dos sitios (—).

A pesar de que los sitios y las recombinasas no son intercambiables, las similitudes mencionadas sugieren una relación evolutiva entre estos dos sistemas de recombinación sitio-específica (Hoess y Abremski, 1984).

Por otro lado, la temperatura a la cual se crece la célula hospedero, impone una condición sobre la recombinasa empleada, ya que FLP es más eficiente a 23-30°C, y pierde su actividad a temperaturas mayores. Mientras que Cre funciona más eficientemente a y arriba de 37°C, por lo que es deseable para ser usada en organismos que crezcan en este rango de temperaturas. Estudios realizados en mamíferos, recomiendan el uso de Cre para aplicaciones que requieran una recombinación eficiente, por ejemplo, tejido-específico o knock-outs inducibles en ratones (Buchholz *et al.*, 1996). Mientras que Flp puede ser utilizada en estudios que requieran una fuerte regulación, más que una dependencia en eficiencia, por ejemplo, en líneas celulares (Buchholz *et al.*, 1996).

4. Sistemas de integración

En nuestro laboratorio, se ha diseñado un sistema derivado del plásmido pBR322, que además de permitir clonar DNA foráneo en la bacteria de *E. coli* (Bolívar *et al.*, 1977), posibilita la integración de material genético en su cromosoma.

4.1. Familia pBRINT-Ts

Esta familia está formada por tres vectores que permiten la integración de DNA en el gene *lacZ* del cromosoma de *E. coli* (Fig. 8). Cada uno de ellos posee: 1) un sitio múltiple de clonación (MCS), flanqueado por un gene que confieren resistencia a un antibiótico, 2) regiones de identidad con el gene *lacZ* y 3) un origen de replicación termosensible (T_s) derivado del plásmido pSC101. Este plásmido puede replicarse a una temperatura de 30°C, pero conforme ésta incrementa por arriba de los 37°C, la replicación se detiene.

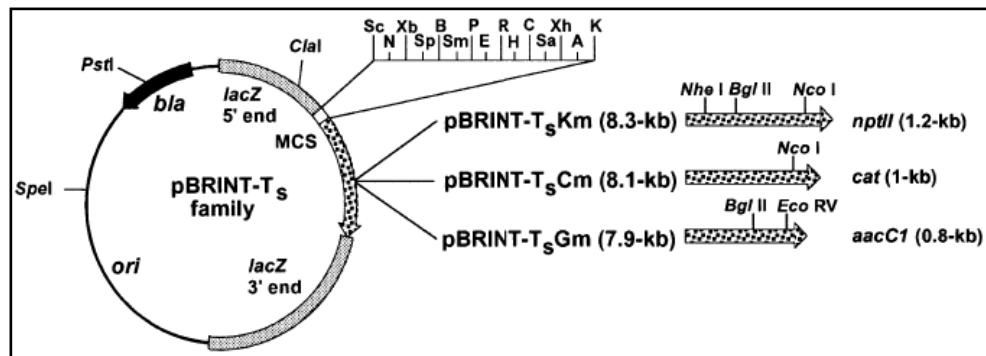


Figura 8. Familia pBRINT-Ts, formada por tres diferentes plásmidos de acuerdo a su resistencia: kanamicina (Km), cloramfenicol (Cm) y gentamicina (Gm). Tomado de Le Borgne *et al.*, 1998.

Se ha reportado que plásmidos que no se replican de manera extracromosomal en una cepa hospedero, pueden recombinar de manera eficiente en su cromosoma, siempre y cuando presenten regiones de identidad (Hamilton *et al.*, 1989). Por lo que la presencia de la secuencia trunca de *lacZ*, y el origen de replicación de los plásmidos de la familia pBRINT-Ts, permiten la selección directa de los eventos que llevan a la integración cromosomal. En el primer evento de recombinación entre el plásmido y el cromosoma bacteriano, a la temperatura no-permisiva de 44°C (Fig. 9a), se genera un cointegrado, el cual está formado por la fusión entre las dos moléculas de DNA (Fig. 9b). Posteriormente, al disminuir la temperatura a 30°C (temperatura permisiva en la que el plásmido se replica), el cointegrado pasa por un segundo evento de recombinación (Fig. 9c).

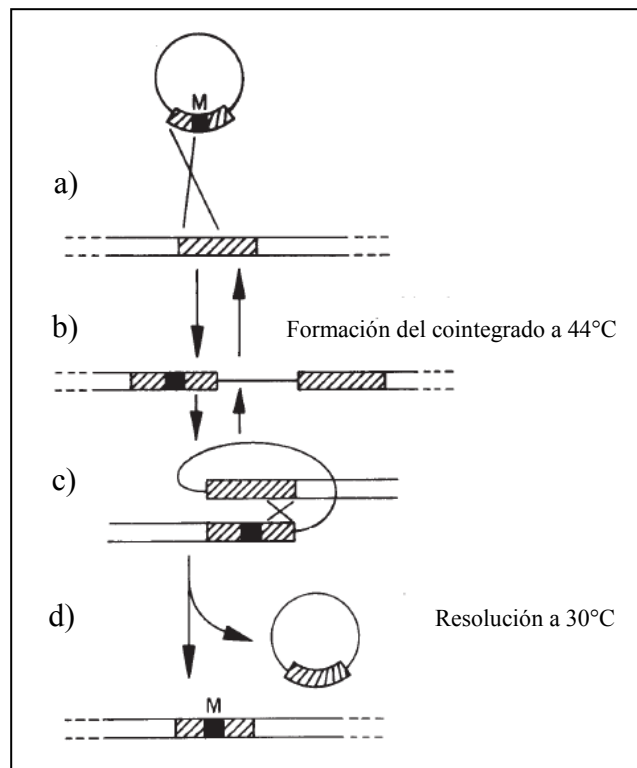



Figura 9. Estrategia general para el método de integración cromosomal, utilizando el plásmido pBRINT-Ts en el gene *lacZ* de *E. coli* (modificado de Balbás y Gosset, 2001). Gene que confiere resistencia a algún antibiótico, M; regiones de identidad, .

Como resultado, se obtienen dos moléculas en las cuales ocurrió intercambio de alelos, es decir, cada una de ellas contiene la secuencia original de la otra molécula. En este segundo entrecruzamiento, el gene que confiere resistencia a alguno de los antibióticos, y el cual está flanqueado por regiones de identidad con el gene *lacZ*, se inserta directamente en alelo *lacZ* del cromosoma de *E. coli*, mientras que el plásmido se regenera (Fig. 9d). Éste último puede ser eliminado de la célula al aumentar la temperatura del cultivo a 44°C (Hamilton *et al.*, 1989).

4. 2. Inactivación cromosomal por productos de PCR

A pesar de que existen numerosos métodos de reemplazo alélico para integrar genes en el cromosoma bacteriano, todos requieren que la modificación deseada se genere *in vitro* en el vector antes de que recombine en el cromosoma, restringiendo de esta manera la integración génica a un determinado locus. Un sistema alternativo para evitar lo anterior, es a través de la amplificación por PCR de genes de resistencia (Fig. 10). La estrategia básica consiste en reemplazar una secuencia cromosomal con un gene selectivo de resistencia a un antibiótico, el cual se genera por PCR flanqueado por secuencias que llevan en su extremo 5' de 36 a 50 nucleótidos de identidad con el gene a interrumpir (H1 y H2), y 20 pb en su extremo 3' idénticas con el plásmido templado (P1 y P2) que expresa el gene selectivo. La recombinasa Red del fago λ lleva a cabo la doble recombinación entre las secuencias H1 y H2 del producto de PCR con las del gene a interrumpir.

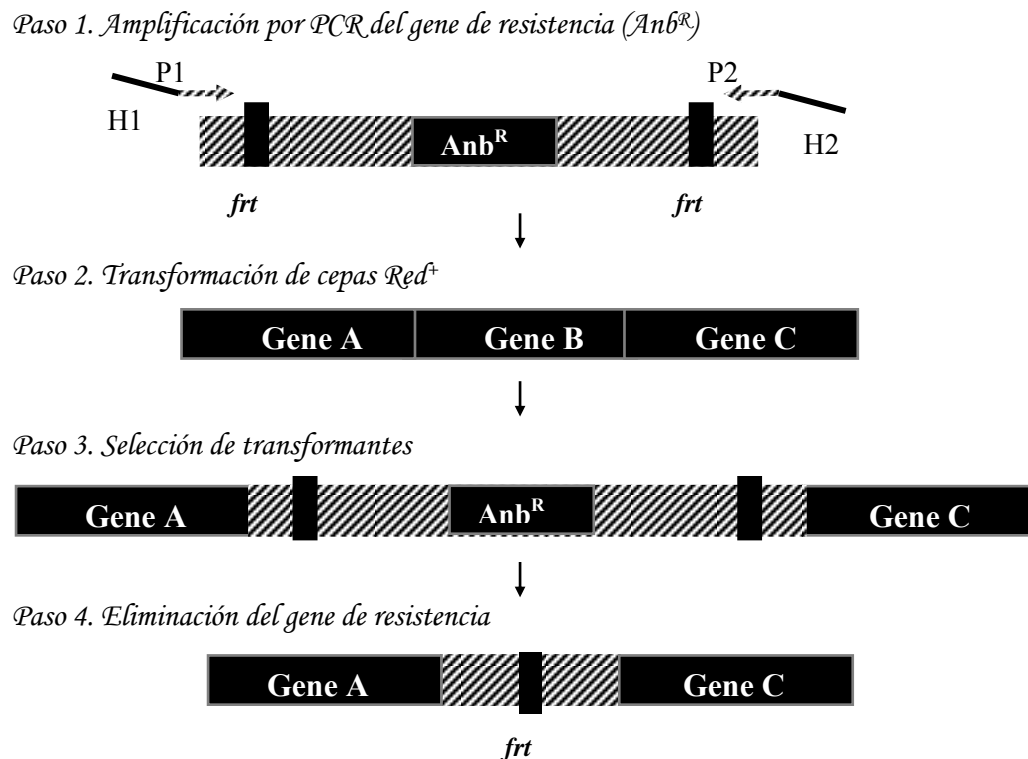


Figura 10. Estrategia de interrupción de genes cromosomales. H1 y H2 se refieren a las secuencias homólogas con el gene B. P1 y P2 representan las secuencias de identidad con el plásmido templado (Datsenko y Wanner, 2000).

Una vez interrumpido el gene blanco y después de la selección, el casete de resistencia puede ser escindido del cromosoma usando un plásmido que expresa la recombinasa FLP, la cual lleva a cabo la recombinación sitio-específica entre los sitios *frt* que flanquean el gene de resistencia que se insertó. Los plásmidos que expresan las recombinasas Red y FLP, poseen orígenes de replicación termosensible que fácilmente pueden ser diluidos si las células se crecen a 37°C (Datsenko y Wanner, 2000).

4.3. Familia pLox1

A pesar de no tratarse de un sistema de integración, la importancia de esta familia de plásmidos radica en la eliminación de los marcadores de resistencia a antibióticos del cromosoma. Esta serie de plásmidos derivados del vector pLox1, se utilizan para modificar cualquier gene que confiera resistencia a un antibiótico, mediante la adición a ambos lados de sitios *loxP* y sitios múltiples de clonación (Fig. 11). A través de este procedimiento el marcador de selección además de ser más versátil por los sitios de restricción adicionados, es escindible por la presencia de los sitios *loxP* que lo delimitan y sobre los cuales actúa la recombinasa Cre.

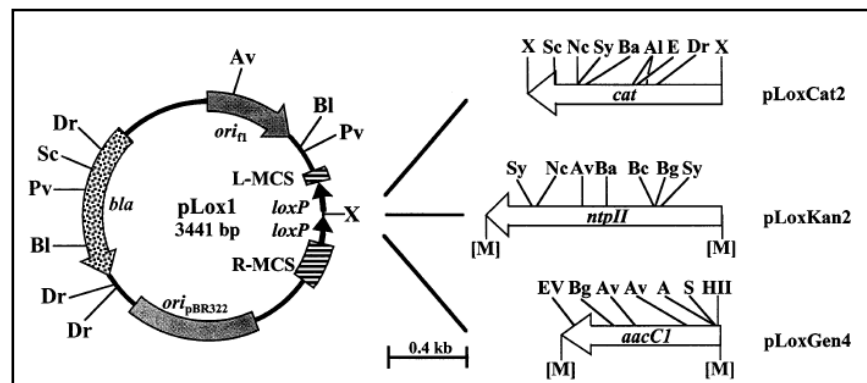


Figura 11. Familia pLox1. Estos plásmidos poseen dos sitios de recombinación *loxP* flanqueados por MCS. Cada uno de ellos codifica para un gene que confiere resistencia a un antibiótico, el cual se inserta entre estos sitios.

Esta nueva herramienta molecular, se implementó para generar una segunda generación de plásmidos de la familia pBRINT-Ts, en los cuales ya es posible eliminar los marcadores de resistencia a antibióticos del cromosoma (Le Borgne *et al.*, 2001).

5. Regulación de la expresión genética

Para poder expresar eficientemente cualquier gene *de E. coli*, es necesario colocarlo bajo el control de las señales que reconoce la maquinaria de transcripción y de traducción del organismo huésped. El diseño y la construcción de un sistema genético debe incluir al menos las siguientes señales: 1) región codificadora o gene estructural de la proteína de interés, 2) regiones reguladoras ubicadas en el extremo 5': promotor, secuencia Shine-Dalgarno (SD) y el codón de inicio de la traducción, y 3) regiones reguladoras ubicadas en el extremo 3' para la terminación de la transcripción y el codón de término de la traducción (Lewin, 2004).

El promotor es la secuencia que reconoce la RNA polimerasa como señal de inicio de la transcripción. La secuencia de nucleótidos de los promotores varía considerablemente, influyendo en la afinidad de unión de la

RNA polimerasa. Esta variación es debida en gran parte, a diferencias en la secuencia del promotor. De tal manera, que la fuerza de un promotor está relacionada con la similitud que tenga con respecto a la secuencia consenso (Nelson y Cox, 2001). En *E. coli*, la subunidad sigma (σ) del holoenzima de la RNA polimerasa, es un factor de especificidad que interviene en el reconocimiento y la unión del promotor. Los procariontes tiene múltiples factores sigma; un factor σ primario, necesario para la expresión de los genes constitutivos (housekeeping) durante el crecimiento exponencial, y factores σ alternos que se utilizan bajo ciertas condiciones de crecimiento o estrés (Tabla A). El factor primario en *E. coli* es σ^{70} , el cual reconoce promotores que presentan secuencias consenso ubicadas alrededor de: 35 (TTGACA) y 10 (TATAAT) pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Barnard-Hook y Hinton, 2007). Ambas secuencias se encuentran separadas entre ellas de 16 a 18 pares de bases (Fig. 12).

Factor sigma		Región -35	Región espaciadora	Región -10
σ^{70}	General	TTGACA	16-18	TATAAT
σ^{38}	Fase estacionaria y respuesta a estrés	---	---	CTACACT
σ^{32}	Heat shock	CNCNCTTGAAA	12-16	CCCCATNT
σ^{28}	Sistema flagelar	CTAAA	15	GCCGATAA
σ^{19}	Transporte de Fe	GAAAAT	15	TGTCCT
σ^{24}	Heat shock	GGAACCTT	16	TCNAA
σ^{54}	Metabolismo de Nitrógeno	CTGGCAC A/G	4	TTGCAT

Tabla A. Secuencias promotoras de los diferentes factores sigma de *E. coli*.

De acuerdo a su regulación los promotores pueden ser: a) **constitutivos**: los que siempre permiten la transcripción del (os) gene (s) bajo su control y b) **regulados**: los que únicamente permiten la expresión genética en condiciones ambientales y metabólicas específicas. La regulación de la transcripción a partir de los promotores del tipo b), se lleva a cabo por la interacción entre proteínas de unión específicas y secuencias determinadas localizadas en o próximas al promotor, dichas moléculas actúan como activadores (regulación positiva) o represores (regulación negativa).

Algunos promotores inducibles como P_{lac} y P_{lacUV5} , están controlados negativamente por la proteína represora LacI y positivamente por la proteína receptora de AMP-cíclico (AMPc) o CRP. En ausencia de glucosa, el complejo CRP-AMPc se une al DNA en el sitio CRP, estimulando la interacción de la RNA polimerasa con el promotor y activando la transcripción de los genes localizados corriente abajo. En contraste, el represor LacI se une al operador, el cual está contiguo al sitio del inicio de la transcripción. Esta unión bloquea a la RNAPol, impidiendo que se transcriba el gene de interés. La inducción de la transcripción a partir de estos promotores, se lleva a cabo en presencia de alolactosa (inductor natural) o de compuestos químicos de bajo peso molecular como el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o IPTG (inductor gratuito). Estos inductores se unen al represor y cambian su conformación, impidiendo que éste interactúe con la región del operador. Por lo tanto, la RNAPol es libre de unirse al promotor y de iniciar la transcripción.

Debido a que la transcripción del gene *lacI* ocurre sólo una o dos veces por generación, produciendo alrededor de 10 moléculas represoras por célula. Se cree que la débil transcripción de este represor se debe a que la caja -35 GCGCAA del promotor *lacI*, se desvía de la secuencia consenso TTGACA. Por otra parte, de las 50 pares de bases que conforman a este promotor, 28 de ellas son G:C, observándose principalmente entre la caja -10 y el sitio del inicio de la transcripción. De tal manera, que el acceso al sitio activo de la RNA polimerasa por el DNA templado se ve afectado, ya que el desenrollamiento del DNA se da justamente en la región de -11 a +3, la cual en el promotor P_{lacI} presenta mayoritariamente enlaces triples entre G y C. Debido a estas características, es que se atribuye una unión débil de la RNA polimerasa al promotor silvestre *lacI*, siendo así la transcripción de este gene tan baja. Sin embargo, la mutación denominada I^q genera un cambio de una C por una T en la caja -35 del promotor *lacI*, resultando en la secuencia: GTGCAA. De esta manera, se incrementa la similitud con el resto de los promotores, así como la afinidad de la RNA polimerasa por dicho promotor (Calos, 1978). Esta mutación en la secuencia -35 del promotor *lacI*, genera un incremento de 100 moléculas de represor por célula.

Por otro lado, el promotor P_{lacUV5} se obtuvo por mutagénesis del promotor P_{lac} cambiando la secuencia de la caja -10 del promotor silvestre TATGTT, a la secuencia consenso TATAAT, con lo que se incrementó la fuerza de este promotor. Por su parte, el promotor sintético híbrido P_{tac} se construyó con las secuencias de las cajas -35 del promotor P_{trp} y -10 del promotor P_{lacUV5} , separadas por 16 pares de bases. Su regulación es similar a la que tienen los promotores que le dieron origen, puesto que se reprime por el producto del gene *lacI*, por lo que se induce con lactosa o IPTG, y como carece del sitio de unión para CRP-cAMP es insensible a represión catabólica.

Un promotor híbrido derivado del anterior, es el promotor P_{trc} , el cual a diferencia del promotor P_{tac} tiene las cajas -35 y -10 separadas por 17 pares de bases (Fig. 12), sin embargo, las actividades transcripcionales de ambos promotores son similares (Amann *et al.*, 1988).

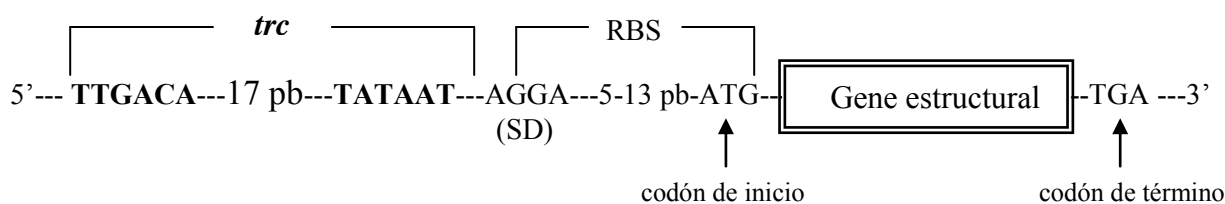


Figura 12. Representación esquemática de los elementos necesarios para la expresión de un gene. Se utiliza como ejemplo el promotor híbrido *trc*, dependiente de σ^{70} .

En el caso del promotor del operón de triptofano, P_{trp} , éste se regula negativamente por el represor TrpR unido a L-triptofano. Para mantener este promotor activo, se utiliza ácido indol-acrílico (IAA), el cual inactiva al represor al impedir su unión con el triptófano.

Existen diferentes promotores que regulan de manera eficiente el inicio de la transcripción, por lo que se emplean para expresar genes. De esta manera, para la construcción y la funcionalidad de sistemas de expresión, es necesario seleccionar los elementos necesarios para cubrir cada caso.

IV. Justificación

Entre los objetivos de nuestro laboratorio, se encuentra el desarrollo, la caracterización y el refinamiento de herramientas moleculares para ser utilizadas en el aislamiento y la manipulación del material genético. Por lo que con la información obtenida de los sistemas generados por nuestro grupo (Bolívar *et al.*, 1977; Le Borgne *et al.*, 1998 y 2001; Palmeros *et al.*, 2000), y basándonos en una metodología similar a la desarrollada por Datsenko y Wanner (2000), en este proyecto planteamos el desarrollo de un sistema molecular que permite integrar y expresar genes en el cromosoma de *E. coli*, de manera regulable y sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas modificadas. Al integrar genes en el cromosoma, se puede lograr contener con la pérdida de éstos como consecuencia de la segregación de los plásmidos. Además, el empleo del sistema propuesto puede ser de utilidad en cepas de producción, donde la expresión en multicopia de diversos genes involucrados en la síntesis del compuesto de interés, repercute de manera negativa sobre el crecimiento. Por lo que al integrar genes en el cromosoma, evitando el efecto multicopia, se puede mejorar la viabilidad en algunas de las cepas modificadas, ya que se reduciría la carga metabólica impuesta por el mantenimiento de las múltiples copias del plásmido(s) en cuestión, y la demanda en precursores y energía ocasionada por la expresión de algunos de los genes presentes en el plásmido.

Por lo tanto, tomando en cuenta lo anterior, una de las aportaciones del sistema generado en este proyecto, radica en la posibilidad de generación de cepas de producción más estables y robustas que aquellas que expresan genes presentes en plásmidos.

V. Hipótesis

La construcción de un plásmido que permita generar un templado, el cual pueda ser amplificado mediante la técnica de PCR, conteniendo a un gene específico regulado por un promotor fuerte y flanqueado por un gene que confiera resistencia a un antibiótico, permitirá su integración y expresión en el cromosoma de *Escherichia coli*.

VI. Objetivos

6.1. Objetivo general:

Construir y caracterizar un sistema para la expresión cromosomal de genes en *Escherichia coli*.

6.2. Objetivos particulares:

- Construir el plásmido pLoxGentrc, el cual nos permitirá controlar la expresión de cualquier gene de interés bajo el control del promotor fuerte *trc*.
- Clonar el gene heterólogo *mela* de *Rhizobium etli* CFN42 en el plásmido de expresión pLoxGentrc.
- Obtener un producto de PCR a partir del plásmido templado pLoxGentrc*mela*, el cual contenga el gene *mela* regulado por el promotor fuerte *trc*, y el gene *aacCI* que confiere resistencia a gentamicina flanqueado por sitios loxP.
- Integrar el producto de PCR en el gene estructural *lacZ* de la cepa *E. coli* W3110 y determinar la eficiencia de inserción.
- Evaluar los parámetros cinéticos (μ , q_p y $Y_{p/s}$) de las cepas W3110/pLoxGentrc*mela* y W3110/*lacZ::trcmela*, loxP-*aacCI*-loxP, durante la producción de melanina en medio mínimo suplementado con glucosa y L-tirosina.

VII. Metodología

7.1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *E. coli*, los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la tabla B. La cepa XL1-Blue de *E. coli* se utilizó para la propagación y la amplificación de vectores del tipo pBR322 y derivados termo-sensibles del pSC101, así como en los experimentos de clonación y construcción de los plásmidos. La cepa W3110 se utilizó como hospedera para la integración del gene *melA* en el cromosoma bacteriano.

Tabla B. Cepas y plásmidos utilizados y construidos

Cepas	Características	Referencia
XL1-Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> (NaI ^R), <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac- F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^R)]. Cepa transformable a eficiencias altas y deficiente en los sistemas de recombinación homóloga. El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal.	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
W3110 Trp ⁺	F', λ, INV (<i>rnnD-rnnE</i>)1, RecA ⁺ , Lac ⁺ , Trp ⁺ por transducción generalizada con el fago P1.	Colección del laboratorio.
W3110/pTrcmelA	W3110 Trp ⁺ transformada con el plásmido pTrc99A, que expresa el gene <i>melA</i> bajo regulación del P _{trc} .	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
W3110/pLoxGentrc	W3110 Trp ⁺ transformada con un derivado del pLoxGen4, en el cual es posible clonar cualquier gene, cuya expresión queda bajo regulación del P _{trc} .	Este trabajo
W3110/pLoxGentrcmelA	W3110/pLoxGentrc, expresa el gene <i>melA</i> bajo regulación del P _{trc} .	Este trabajo
W3110/ <i>lacZ::P_{trc}melA</i> , <i>loxP-aacCI-loxP</i>	W3110 Gm ^R , interrumpida en el gene cromosomal <i>lacZ</i> por la integración del producto de PCR: P _{trc} <i>melA</i> , <i>loxP-aacCI-loxP</i> .	Este trabajo
W3110/ <i>lacZ::P_{trc}melA</i> , <i>loxP</i>	W3110/ <i>lacZ::P_{trc}melA</i> , pero con un sitio <i>loxP</i> remanente después de la escisión del casete de gentamicina.	Este trabajo
Plásmidos	Características	Referencia
pJW168	Amp ^R , porta el gene <i>cre</i> bajo regulación de P _{lacUV5} y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101. Las cepas transformadas con este plásmido se deben crecer a 30°C (temperatura a la cual se lleva a cabo la replicación de este plásmido).	Palmeros <i>et al.</i> , 2000
pKD46	Amp ^R , porta los genes γ, β y <i>exo</i> de la recombinasa Red del fago λ bajo regulación de P _{araB} y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101.	Datsenko y Wanner, 2000
pTrc99A	Amp ^R , presenta el promotor híbrido <i>trc</i> formado por la secuencias de la caja -35 de P _{trp} y -10 de P _{lacUV5} , el sitio de unión a ribosoma de <i>lacZ</i> , un MCS de pUC18 y los terminadores ribosomales <i>rnnB</i> . Reprimido por el producto del gene <i>lacI^f</i> e inducible por IPTG.	Amann <i>et al.</i> , 1988
pTrcmelA	Derivado del pTrc99A, el gene <i>melA</i> silvestre se insertó en el MCS.	Cabrera <i>et al.</i> , 2006
pLoxGen4	Amp ^R y Gm ^R , derivado del vector pLox1 (20 copias por célula) que lleva clonado el gene <i>aacCI</i> (Gm ^R) entre las secuencias <i>loxP</i> .	Palmeros <i>et al.</i> , 2000

pLoxGentrc	Derivado de pLoxGen4 con la inserción de un fragmento proveniente de pTrc99A, el cual lleva el gene que codifica para el represor <i>lacI</i> , la secuencia de P_{trc} , el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores <i>rrnB</i> .	Este trabajo
ploxGentrc <i>melA</i>	Derivado de pLoxGentrc y además tiene clonado el gene <i>melA</i> que codifica para la tirosinasa de <i>Rhizobium etli</i> .	Este trabajo

7. 2 Técnicas genéticas y de DNA recombinante

7. 2. 1. Transformación bacteriana

El DNA se incorporó a *E. coli* por el método de electroporación utilizando un electroporador marca Eppendorf modelo 2510 a 2, 500 volts. Posteriormente, las células se recuperaron en medio SOC a 37°C por 3 horas aproximadamente.

7. 2. 2. Purificación de DNA

Para el análisis de las clonas recombinantes, el DNA plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 2005). Por su parte, los vectores utilizados para transformar, se purificaron mediante el kit Miniprep System de GIBCOBRL como lo describen los fabricantes. El DNA cromosomal, se extrajo usando el kit marca MO BIO para aislamiento de DNA microbiano. Finalmente, para purificar productos de PCR, se utilizó el kit PCR purification marca Marligen BioScience, Inc.

7. 2. 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de PCR, se utilizó la “elongase enzyme mix” (Invitrogen, Inc.), en un volumen final de reacción de 50 μ L. Las condiciones se describen en la siguiente tabla.

Componente	Volumen por reacción de 50 μ L	Concentración final
DNA templado	Variable (50-100 ng)	---
2 mM dNTP's	5 μ L	0.2 mM
Primer 5'	1 μ L	50 pmol/ μ L
Primer 3'	1 μ L	50 pmol/ μ L
5X Buffer B [Mg^{2+}]	10 μ L	2 mM
Elongase Enzyme Mix	1 μ L	---
Agua	hasta 50 μ L	---

Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en un RoboCycler Gradient 96 marca Stratagene en 3 etapas:

1. Un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C por 3 minutos.
2. 30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización (94°C por 30 segundos), alineamiento (56°C por 1 minuto) y polimerización (68°C 1min/Kb).
3. Un ciclo de extensión final a 68°C de 7-10 minutos.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR el DNA cromosomal, plasmídico, así como para realizar las comprobaciones de integraciones en cromosoma, se describen en la tabla C.

Tabla C. Secuencia de los diferentes oligonucleótidos utilizados en este estudio.

<u>Oligonucleótido</u>	<u>Secuencia nucleotídica</u>
Clonación <i>lacI-T2</i>	
Ptcrep	5' CTGATGCCGCATAGTTAAGCCA 3'
Ptcredown *	5' ATAAGAATGCGGCCGC GGGTTATTGTCTCATGAGCGG3' NotI
Secuenciación	
MCSup	5' GGCGCCATTCGCCATTCAGG 3'
MCSdown	5' GCAAGCAGATTACGGTGACG 3'
pLoxGentcrep	5' TGTGCTGCAAGGCGATTAAG 3'
pLoxGentcredown	5' GTATGGCTGTGCAGGTCGTA 3'
MtyrA3	5' CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCC 3'
MtyrA5	5' GTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC 3'
Integración cromosomal	
tremelA/lacZfwd **	5'GAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAAC gcttatcatcgactgcacgg3' H1 P1
tremelA/lacZrvs **	5'GACATGGCCTGCCCGGTTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACT gcacagatgcgtaaggagaa3' H2 P2
Comprobación de la integración cromosomal	
LacZ::tremelAfwd	5' GTGGAAGCTGCCTGCACTAA 3'
LacZ::tremelArvs	5' GTGGCGAACGATGAGCCAAT 3'
SEC3melA	5' ATTGTCCTTGCCGTCGGGCG 3'
SEC4melA	5' ATCGGTGGCTGGATGCCGGA 3'

* Se indica el sitio de restricción de la enzima *NotI*.

** H representa la región de identidad con el gene cromosomal *lacZ*, mientras que P con el plásmido templado pLoxGent*tremelA*.

7. 2. 4. Generación de productos de PCR e integración cromosomal

Mediante una estrategia metodológica similar al sistema de inactivación cromosomal de genes de Datsenko y Wanner (2000), se utilizó como templado el plásmido pLoxGentrcmela para obtener un producto de PCR de 3,761 pb, que contiene el gene *melA* bajo control de P_{trc} y el gene que codifica para el casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* (Fig. 13), este producto está flanqueado en su extremo 3' por 20 pb idénticas al pLoxGentrcmela, las cuales hibridan de la posición 493 a la 512, es decir, 182 pb corriente arriba del inicio del MCS; y de la 4,235 a la 4, 254, que corresponden a las 10 últimas pb corriente arriba del último codón del promotor *trc* y 10 pb corriente abajo del mismo respectivamente. Por su parte, en el extremo 5' dicho DNA lineal presenta 45 pb idénticas al gene cromosomal *lacZ* (oligos **trcmela/lacZ fwd** y **trcmela/lacZ rvs**) que se desea inactivar. Las condiciones así como los componentes para la amplificación se detallan en la sección anterior. El producto de PCR resultante se digirió con la enzima *DraI*, cuyos sitios de restricción se localizan en el plásmido pLoxGentrcmela, fuera de la región a amplificar, esto con el objetivo de eliminar DNA plasmídico. Posteriormente, el producto de PCR se purificó de gel de agarosa al 0.8%, utilizando el kit Rapid Gel Extraction System marca Marligen BioScience, Inc. Finalmente la cepa W3110 de *E. coli* que expresaba previamente el plásmido pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000), se transformó con 4 μ L del producto de PCR, dejándose recuperar en medio SOC por aproximadamente 4 horas a 30°C y 300 rpm, y posteriormente a temperatura ambiente sin agitación durante una noche, para luego sembrar la transformación en cajas de LB sólido con gentamicina a 37°C por 18 horas aproximadamente. Las colonias con la integración deseada se obtuvieron en su totalidad de la recuperación a temperatura ambiente.

7. 3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

7. 3. 1. Medios de cultivo

A continuación se describen los medios de cultivo empleados:

- Medio Luria-Bertani (LB): 10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5g/L de NaCl.
- Medio mineral M9: 6g/L de Na_2HPO_4 , 0.5g/L de NaCl, 3g/L de KH_2HPO_4 , 1g/L de NH_4Cl , 246.5mg/L de MgSO_4 , 14.7mg/L de CaCl_2 , 10 μ g/mL de vitamina B1 y 2 g/L de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- Medio bajo en sales YENB: 7.5g/L de extracto de levadura y 8g/L de caldo nutritivo.
- Medio SOC: 20g/L de bacto-triptona, 5g/L de extracto de levadura, 2.5g/L de MgSO_4 , 2g/L de MgCl_2 , 0.58g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl.

7.3.2. Condiciones de los cultivos de crecimiento

Las cepas utilizadas en este trabajo se mantienen y crecen rutinariamente en medio Luria-Bertani líquido o solidificado. Para seleccionar las construcciones deseadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli*, se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos: ampicilina/carbenicilina, 200/100 µg/ml y gentamicina (*aacCI*), 10 µg/ml, para seleccionar las cepas con los genes de resistencia a antibiótico en multicopia; mientras que en el caso de las clonas con el gene de resistencia a gentamicina en una sola copia, se utilizaron concentraciones de 5 µg/ml. Todas las cepas se crecieron a 37°C, excepto cuando se transformaron con plásmidos que tienen orígenes de replicación termo-sensibles, donde los crecimientos se hacen a 30°C.

Para seleccionar las clonas con el gene *lacZ* interrumpido en el cromosoma, además de verificar la resistencia al antibiótico dada por el casete escindible (*loxP-Gm-loxP*) que se utilizó durante las interrupciones *in vitro*, se determinaron los fenotipos β-Gal en placas de LB sólido con 33 µg/ml de Xgal + IPTG 100 µM.

Para determinar los parámetros cinéticos de la producción de melanina, se realizaron medios de cultivo de 50 mL en matraces bafleados de 250 mL con medio mineral M9 suplementado con 0.1 mM IPTG, 40 µg/ml CuSO₄, 2 g/l glucosa y 0.4 g/l L-tirosina en polvo, gentamicina 10 µg/ml (según se indique), a 30°C, 300 rpm y pH=7.

7.3.3. Determinación del crecimiento bacteriano y la síntesis de melanina

El crecimiento bacteriano se cuantificó en función de la turbidez, midiendo la absorbencia de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70. Sin embargo, la melanina interfiere con la absorbencia de las células a 600nm, por lo que el crecimiento se obtuvo a partir de la resta de la DO_{600nm} del medio de cultivo con células, de la DO_{600nm} del sobrenadante libre de células (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006). La absorbencia resultante se convirtió a peso seco mediante la siguiente relación $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.37 \text{ gDCW/L}$ (DCW = peso seco de células; Hernández-Montalvo *et al.*, 2001).

Para cuantificar la melanina, se midió la DO_{400nm} en el sobrenadante y se convirtió a peso seco utilizando la siguiente relación $1 \text{ DO}_{400\text{nm}} = 0.0676 \text{ g/L eumelanina}$. Este último valor es el inverso del coeficiente de extinción ($14.8 \text{ cm}^{-1} \text{ g/L}^{-1}$) de la eumelanina procesada en el trabajo de Lagunas-Muñoz y colaboradores en el 2006.

Figura 13. Construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc.

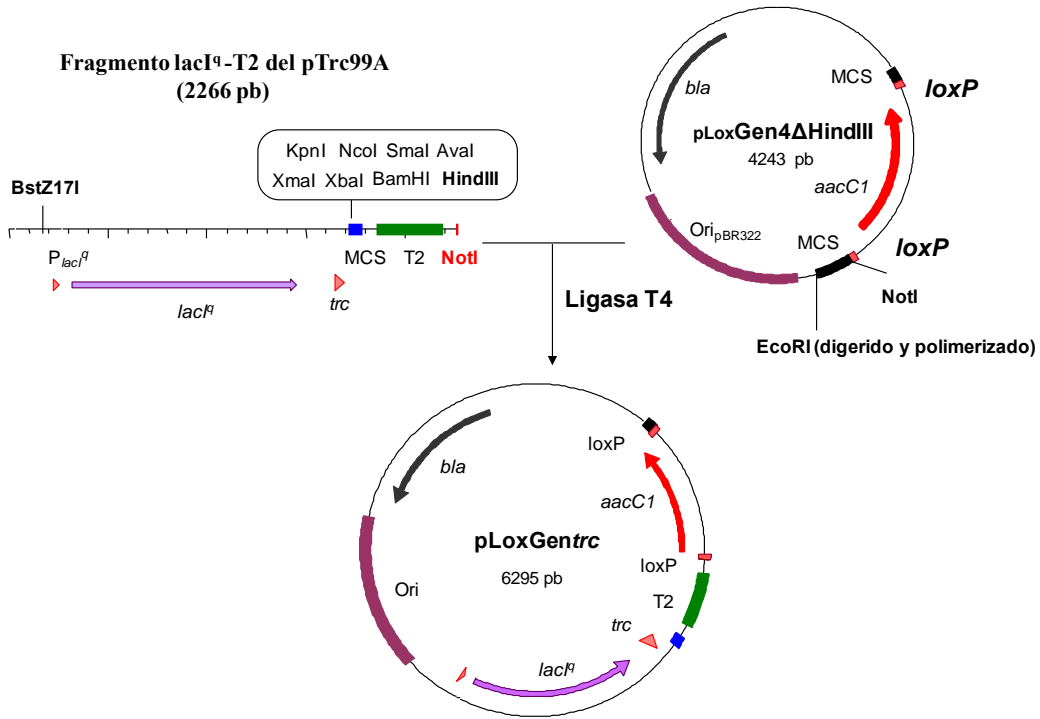
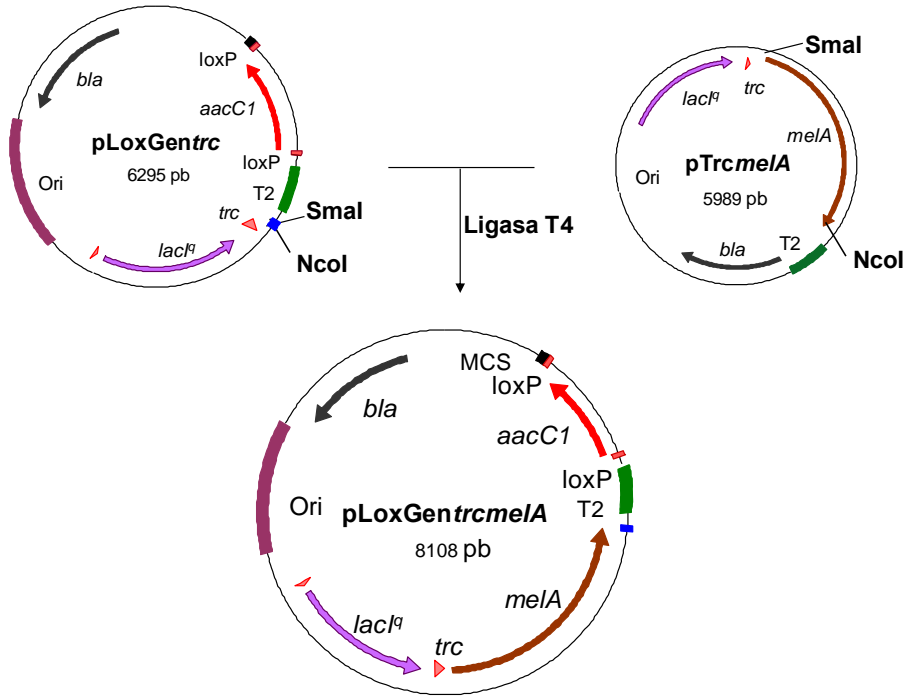


Figura 14. Construcción del plásmido templado pLoxGentrcmelA.



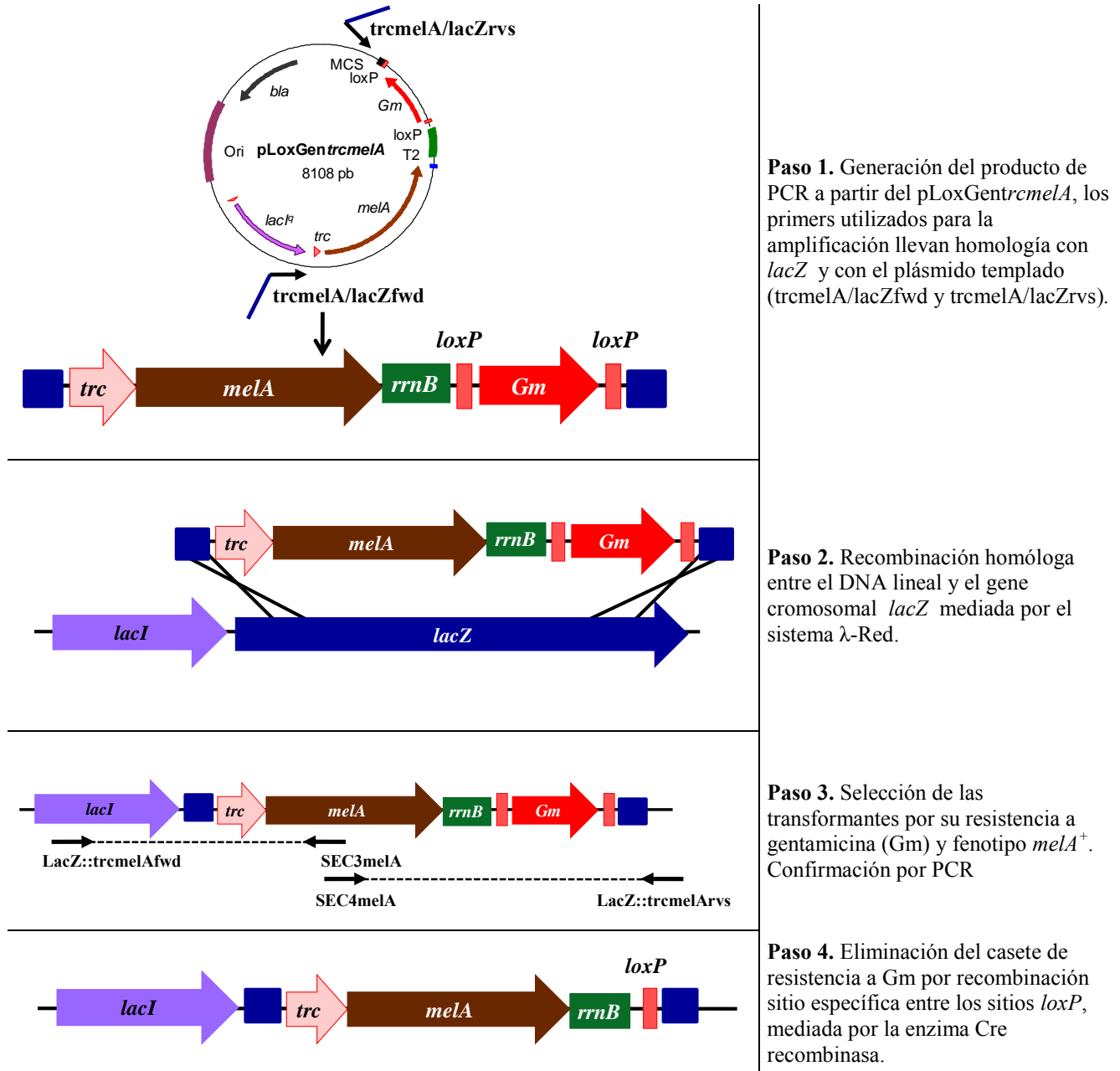


Figura 15. Esquema de la estrategia para llevar a cabo la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. La figura muestra el protocolo general utilizado para el gene *melA* como ejemplo.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8. 1. Construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc.

El método desarrollado en este proyecto para la expresión de genes cromosomales, es similar al generado por Datsenko y Wanner, con la diferencia de que este último sistema no es de expresión, sino que se diseñó para inactivar genes en el cromosoma de *E. coli*.

El primer elemento para desarrollar nuestro sistema, fue la construcción del plásmido de expresión pLoxGentrc (Fig. 13). Para la generación de este vector se insertó el fragmento *lacI-T2* del plásmido pTrc99A (Fig. 16a) en el plásmido pLoxGen4 (Palmeros *et al.*, 2000), dicho fragmento lleva el gene que codifica para el represor *lacI* bajo el control del promotor *lacI^q*, la secuencia del promotor fuerte *trc* (P_{trc}), el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores *rrnB* (T1 y T2). Por otro lado, se decidió trabajar con el plásmido pLoxGen4, ya que a diferencia de los otros dos vectores que conforman a la familia pLox1 (Palmeros *et al.*, 2000), sólo el pLoxGen4 carece del sitio *NcoI*, el cual en los plásmidos pLoxCat2 y pLoxKan2 de dicha familia, se localiza en el casete de resistencia a antibiótico (Fig. 11). Por lo que con el objetivo de evitar la redundancia de dicho sitio (uno presente en el MCS del fragmento *lacI-T2*, y el otro en cualquiera de los dos plásmidos de la familia pLox1), se decidió trabajar con el pLoxGen4.

Para la amplificación del fragmento *lacI-T2*, se utilizaron los oligos **Ptrcup** y **Ptrcdown** (Tabla C), obteniéndose un producto de PCR de ~2.3 Kb (Fig. 16b); posteriormente este fragmento se digirió con las enzimas *BstZ17I* y *NotI* para ser ligado al plásmido pLoxGen4.

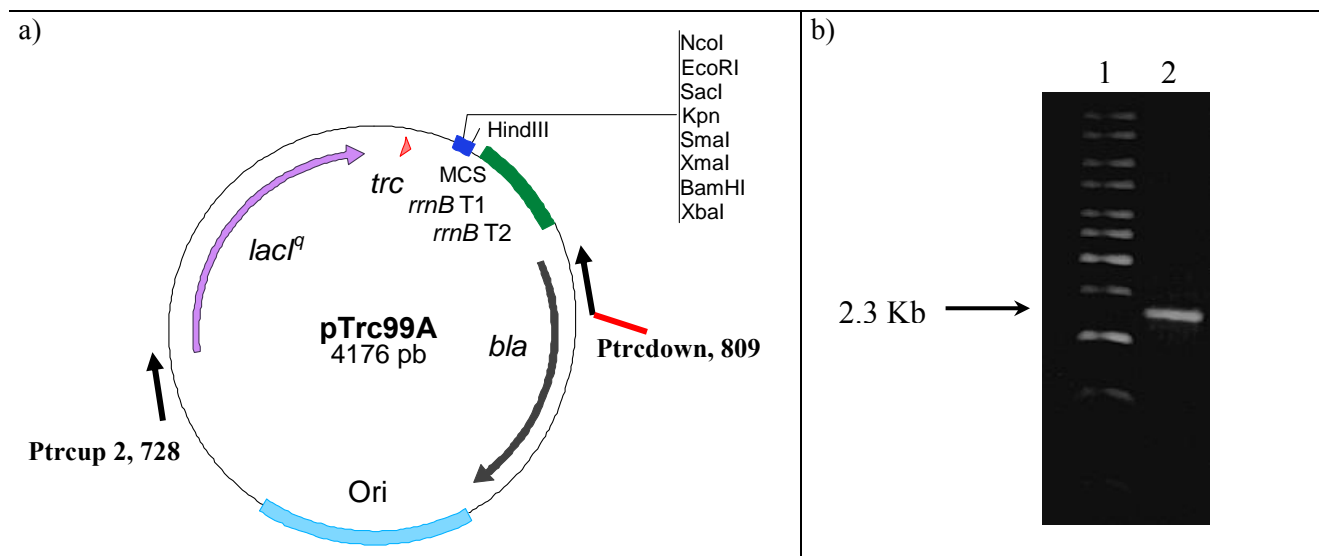


Figura 16. a) Esquema del pTrc99A, se indican las posiciones de los oligos que amplifican el fragmento *lacI-T2* y algunos sitios únicos de restricción del MCS (Amann *et al.*, 1988).

b) imagen del gel analítico que muestra el producto de PCR *lacI-T2*. Carril 1: marcador 1 Kb plus, 2: producto de PCR que contiene al fragmento *lacI-T2*.

Por su parte, al plásmido pLoxGen4 (Fig. 17) se le eliminó el sitio que reconoce la enzima *HindIII* (ya que este mismo sitio se encuentra en el MCS del fragmento *lacI-T2*) para lo cual, se digirió al plásmido y posteriormente los extremos resultantes se polimerizaron.

Finalmente, el plásmido se recircularizó utilizando la T4 DNA ligasa (Fermentas) por 1 hora a 22°C, para posteriormente transformar la cepa XLI-Blue con el plásmido resultante pLoxGen4Δ*HindIII*, obteniéndose 25 transformantes, de las cuales se extrajo plásmido mediante lisis alcalina (Rodríguez y Tait, 1983) y se realizó un tamizado utilizando a la enzima *HindIII*, 3 de ellas perdieron el sitio de restricción de dicha enzima, ya que como puede observarse en el gel analítico el plásmido no es digerido cuando se utiliza *HindIII* (Fig. 18a). Se eligió la clona 18 para continuar con el diseño del plásmido pLoxGen*trc*.

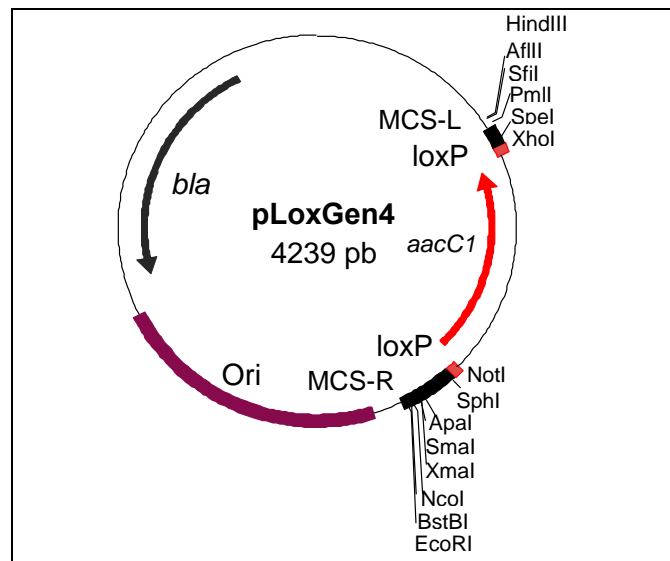


Figura 17. Esquema del pLoxGen4, se muestran algunos sitios únicos de restricción.

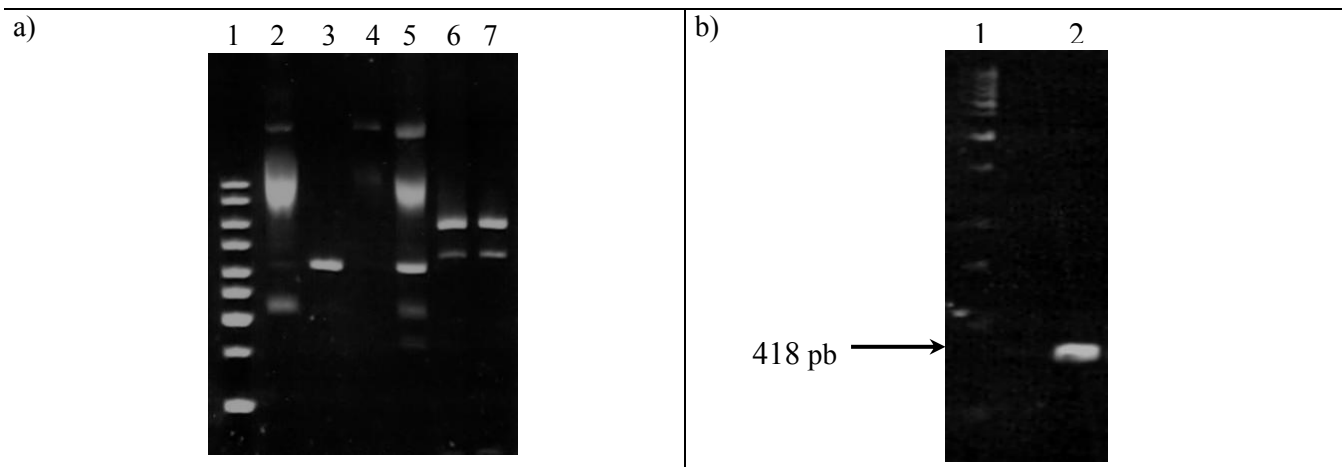


Figura 18. a) Patrón de restricción del pLoxGen4Δ*HindIII*. Carril 1: Marcador 1 Kb plus, 2: pLoxGen4, 3: pLoxGen4 digerido con *HindIII*, 4: pLoxGen4Δ*HindIII* digerido con *HindIII*, 5: pLoxGen4 digerido con *NheI*, 6 y 7: pLoxGen4Δ*HindIII* digerido con *NheI*.

b) imagen del gel analítico que muestra el producto de PCR del MCS-L del pLoxGen4Δ*HindIII*. Carril 1: marcador 1 Kb plus, 2: producto de PCR.

Para verificar la pérdida de *HindIII*, se amplificó el MCS-L del plásmido de la clona 18 utilizando los oligos **MCSup** y **MCSdown** (tabla B), el producto de PCR resultante, con un tamaño de ~418 pb (Fig. 18b), se secuenció (Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología) y se realizó un alineamiento local tomando como referencia la secuencia del pLoxGen4 obtenida de la base de datos del NCBI (GenBank: AJ401048.1). Se observa que como resultado de la re-ligación entre los extremos polimerizados, se pierde el sitio de reconocimiento de *HindIII* (**AAG CTT**) y en su lugar se genera el de la enzima *NheI* (**GCT AGC**) (Fig. 19). Así mismo, al utilizar esta última enzima se observa cómo el plásmido pLoxGen4 Δ *Hind* se digiere (Fig. 18a.)

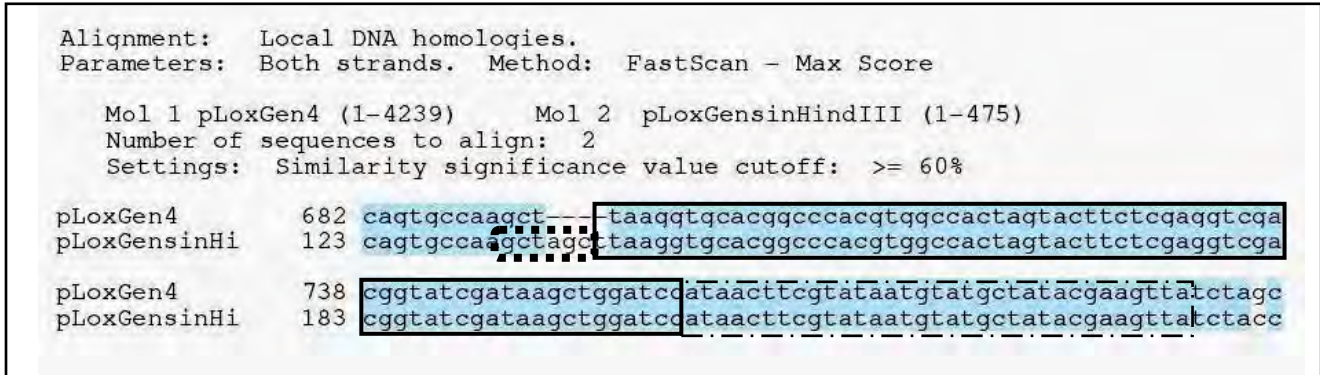


Figura 19. Comprobación de la pérdida del sitio *HindIII*, mediante alineamiento local de la secuencia del pLoxGen4 (tomada de la base de datos del NCBI) contra la secuencia de ~418 pb. En sombreado se muestran las regiones homólogas; las líneas punteadas dentro del alineamiento representa ausencia de bases; enmarcados se señalan el nuevo sitio *NheI* ----, el MCS-L — y uno de los sitios de recombinación *loxP* - - - -.

Posteriormente, el pLoxGen4 Δ *HindIII* se digirió con *EcoRI*, se polimerizó y finalmente se digirió con *NotI*, esto con la finalidad de generar un extremo romo y otro cohesivo respectivamente, compatibles con los extremos del fragmento *lacI*-T2. Por último, se procedió a ligar ambos productos con la T4 DNA ligasa (BioLabs, New England) por 2 horas a temperatura ambiente.

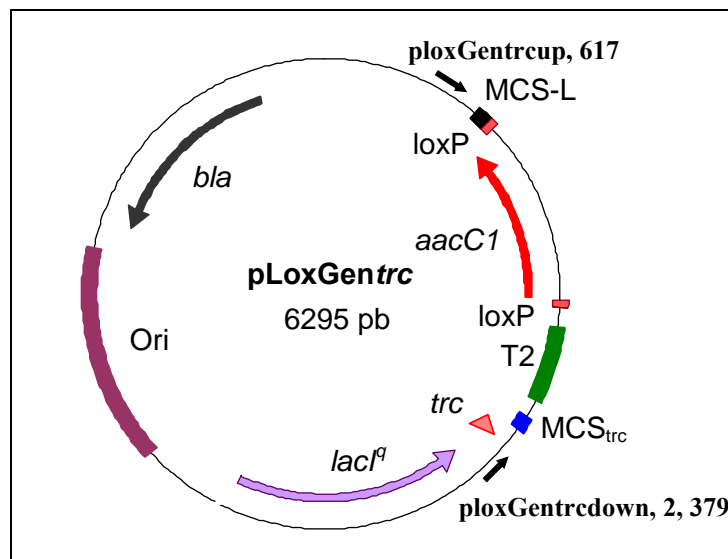


Figura 20. Esquema del plásmido de expresión pLoxGentrc. Se indican las posiciones de los oligos que amplifican corriente arriba del MCS-L hasta el promotor P_{trc}.

Una vez generado el plásmido al que se llamó pLoxGentrc (Fig. 20), se transformó a la cepa XL1-Blue y se obtuvieron 50 transformantes, a las cuales mediante lisis alcalina se les extrajo plásmido, seleccionándose las clonas 21 y 35 de acuerdo a la diferencia en tamaño de su DNA plasmídico con respecto al del pLoxGen4, ya que como se observa en la figura 21a, este último se desplaza más rápido a través del gel debido a que es de menor tamaño que el pLoxGentrc.

Así mismo, se realizó un tamizado de estas dos clonas utilizando la enzima *NcoI* y como se observa en el gel analítico, la digestión del pLoxGentrc con esta enzima, generó un fragmento esperado de 6.3 Kb, el cual corresponde con el tamaño del plásmido generado (Fig. 21a).

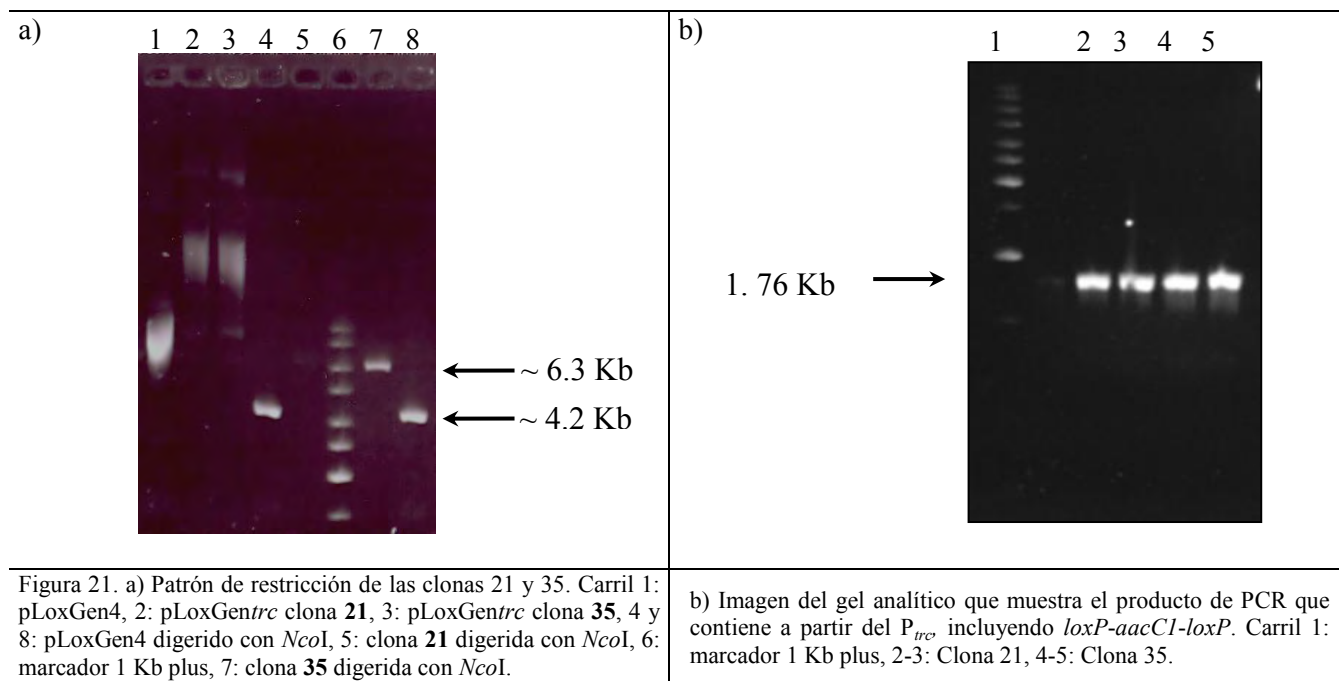


Figura 21. a) Patrón de restricción de las clonas 21 y 35. Carril 1: pLoxGen4, 2: pLoxGentrc clona 21, 3: pLoxGentrc clona 35, 4 y 8: pLoxGen4 digerido con *NcoI*, 5: clona 21 digerida con *NcoI*, 6: marcador 1 Kb plus, 7: clona 35 digerida con *NcoI*.

b) Imagen del gel analítico que muestra el producto de PCR que contiene a partir del P_{trc} , incluyendo *loxP-aacCI-loxP*. Carril 1: marcador 1 Kb plus, 2-3: Clona 21, 4-5: Clona 35.

Por otro lado, con la finalidad de verificar tanto la integridad del fragmento *lacI-T2*, el cual se obtuvo por amplificación mediante PCR utilizando a la enzima elongasa, así como el correcto marco de lectura del casete *loxP-aacCI-loxP*, se diseñaron los oligos **pLoxGentrcup** y **pLoxGentrcdown** (tabla B) que hibridan a partir de la posición 617 corriente arriba del MCS-L y 2379 corriente abajo del promotor P_{trc} , del plásmido pLoxGentrc respectivamente (Fig. 20). A partir de los productos de PCR resultantes de las clonas 21 y 35 (Fig. 21b), se decidió secuenciar el DNA de ambas clonas para posteriormente realizar un alineamiento local, tomando como referencia la secuencia del pLoxGentrc generada *in silico* en el programa Clone Manager versión 6.00, Sci Ed Central. Como se observa en la figura 22, no se encontraron cambios en dicho fragmento, comprobándose de esta manera su integridad, particularmente de las cajas -10 y -35 del promotor P_{trc} , a partir del cual se expresará nuestro gene de interés. Por su parte, el marco de lectura del casete *loxP-aacCI-loxP* se encontraba en fase.

Alignment: Local DNA homologies.
Parameters: Both strands. Method: FastScan - Max Score

Mol 1 pLoxGen418trc (1-6295) Mol 2 producto PCR (1-1766)
Number of sequences to align: 2
Settings: Similarity significance value cutoff: >= 60%

pLoxGen418tr	1694	aaaaagagttttagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttg
producto PCR	1081	aaaaagagttttagaaacgcaaaaaggccatccgtcaggatggccttctgcttaatttg
pLoxGen418tr	1754	atgcttggcagtttatggcgggcgctcctgccgccaccctccgggcccgttgcttcgcaac
producto PCR	1141	atgcttggcagtttatggcgggcgctcctgccgccaccctccgggcccgttgcttcgcaac
pLoxGen418tr	1814	gttcaaatccgctcccggcgattttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaaca
producto PCR	1201	gttcaaatccgctcccggcgattttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaaca
pLoxGen418tr	1874	gataaaacgaaaggccagctctttcgactgagcctttcgttttatttgatgctggcagt
producto PCR	1261	gataaaacgaaaggccagctctttcgactgagcctttcgttttatttgatgctggcagt
pLoxGen418tr	1934	tccctactctcgcacatggggagaccccacactaccatcggcgctacggcgtttcacttctg
producto PCR	1321	tccctactctcgcacatggggagaccccacactaccatcggcgctacggcgtttcacttctg
pLoxGen418tr	1994	agtccgcatggggtcaggtgggaccaccgcgctactgccgccaggcaaatctggttta
producto PCR	1381	agtccgcatggggtcaggtgggaccaccgcgctactgccgccaggcaaatctggttta
pLoxGen418tr	2054	tcagaccgcttctgcgttctgatttaactctgtatcaggctgaaaatcttctctcatccgc
producto PCR	1441	tcagaccgcttctgcgttctgatttaactctgtatcaggctgaaaatcttctctcatccgc
pLoxGen418tr	2114	caaaacagccaagcttgcacgctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagct
producto PCR	1501	caaaacagccaagcttgcacgctgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagct
pLoxGen418tr	2174	cgaattccatggctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattat
producto PCR	1561	cgaattccatggctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattat
pLoxGen418tr	2234	acgagccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatatttgccagaaccggtatga
producto PCR	1621	acgagccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatatttgccagaaccggtatga
pLoxGen418tr	2294	tgtcggcgcaaaaaacattatccagaacgggagtgcgcttgagcgacacgaattatgca
producto PCR	1681	tgtcggcgcaaaaaacattatccagaacgggagtgcgcttgagcgacacgaattatgca

Figura 22. Comprobación de la integridad del fragmento *lacI*-T2, mediante alineamiento local de la secuencia del pLoxGen trc contra la del producto de PCR de 1766 pb. Se muestran en orden descendente sólo las regiones que corresponden a los terminadores *rrnB* 2 y 1 — —, el MCS trc —, y las cajas -10 y -35 del P trc — — — —.

El plásmido pLoxGen trc (Fig. 20), es un vector de alrededor 20 copias por célula, posee un tamaño de 6, 295 pb y un origen de replicación proveniente del pBR322. Además, presenta un fragmento correspondiente al pTrc99A que permite la clonación y la expresión de cualquier gene de interés bajo el control del promotor fuerte P trc . Este vector posee un sitio de unión a ribosoma para la traducción eficiente del gene que se quiere expresar. Es importante señalar que la presencia del sitio único *NcoI* (CCA TGG) corriente abajo del P trc , permite la expresión directa de cualquier gene que porte dicho sitio de restricción en su codón de inicio (Amann *et al.*, 1988).

Por otra parte, la presencia de dos sitios múltiples de clonación, uno corriente arriba del casete *loxP*-*aacCI*-*loxP* y el segundo proveniente del plásmido pTrc99A (MCS trc), permiten el uso de varias enzimas de restricción para la inserción de secuencias de DNA adicionales.

Por su parte, la presencia del gene que codifica para el represor LacI en este plásmido, permite la regulación del promotor P trc . Por lo tanto, el plásmido pLoxGen trc puede utilizarse en cepas *lacI*⁻.

8. 2. Construcción del plásmido pLoxGentrcmela.

Como parte del segundo objetivo y para validar la funcionalidad del vector generado, el gene *mela* de *Rhizobium etli* CFN42 se insertó en el MCS_{trc} del plásmido de expresión pLoxGentrc. Dicho gene se obtuvo mediante digestión del plásmido pTrcmela (Cabrera *et al.*, 2006). Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas *Nco*I y *Sma*I, liberando un fragmento en el caso del pLoxGentrc y dos fragmentos para pTrcmela (Fig. 23a); en este último caso, se purificó de gel de agarosa la banda correspondiente al gene *mela* (1, 836 pb). Ambos fragmentos se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

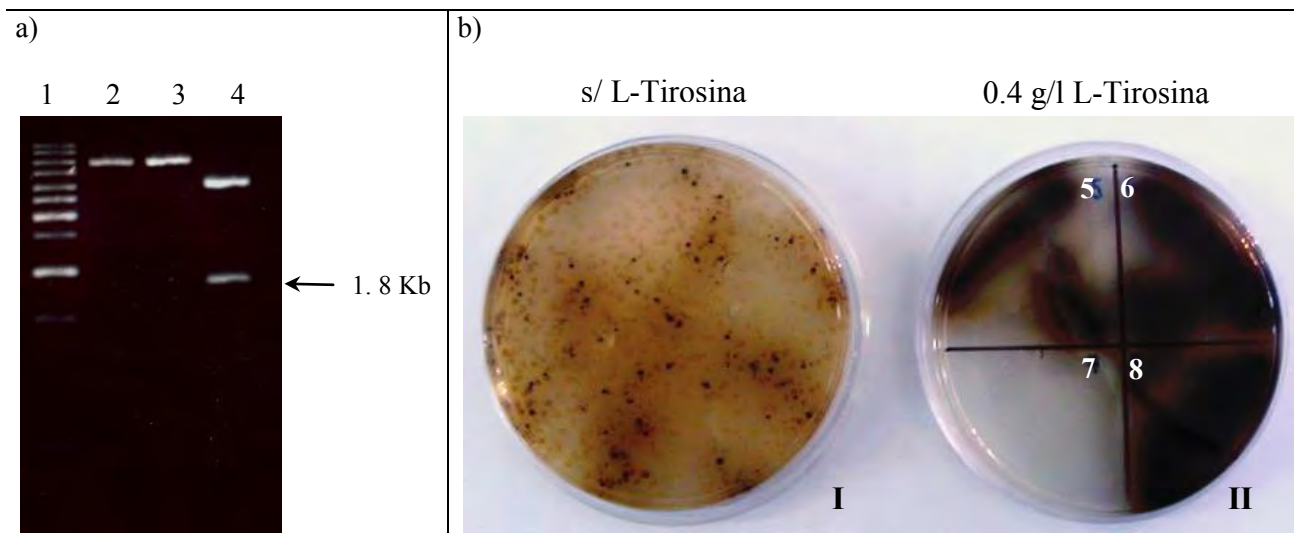


Figura 23. a) Digestiones de los plásmidos pLoxGentrc y pTrcmela. Carril 1: Marcador 1 Kb plus, 2: pLoxGentrc digerido con *Sma*I, 3: pLoxGentrc digerido con *Sma*I y *Nco*I, 4: pTrcmela digerido con *Sma*I y *Nco*I.

b) Producción de melanina por la cepa de *E. coli* W3110/pLoxGentrcmela. (I) Transformantes de la ligación pLoxGentrc + *mela*; (II) Clonas seleccionadas de I: 5, 6 y 8, candidatas que expresan el pLoxGentrcmela ; 7, control negativo. Cajas de LB suplementadas con Gm¹⁰Cb¹⁰⁰, 0.1 mM IPTG y 40 µg/ml CuSO₄, por 48h a 30°C.

El plásmido generado tiene un tamaño de 8.1 Kb y se nombró pLoxGentrcmela (Fig. 14). Finalmente, la ligación se transformó en la cepa W3110 de *E. coli* y se obtuvieron 756 transformantes, de las cuales 68 presentaban una coloración café [Fig. 23b (I)], con lo cual se corroboró la ligación del gene heterólogo *mela* al plásmido de expresión pLoxGentrc. La coloración observada, se debe a la síntesis del polímero café-negro llamado eumelanina (o mejor conocido como melanina) en presencia de tirosina y cobre. Con el objetivo de verificar la integridad del gene *mela*, se enviaron a secuenciar las clonas productoras de melanina 5, 6 y 8 ([Fig. 23b (II)]). Para ello, se utilizaron los oligos **MtyrA3** y **MtyrA5** (cortesía Chávez-Béjar, datos no publicados) que hibridan respectivamente en la posición 4048 y 2082 del plásmido pLoxGentrcmela, es decir, 17 codones corriente arriba del codón de inicio de *mela* y 27 codones corriente abajo del fin del mismo. Los productos de PCR resultantes de las 3 clonas respectivas, se enviaron a la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología. Posteriormente, se realizó un alineamiento local tomando como referencia la secuencia del gene *mela* de *Rhizobium etli* CFN42, tomada de la base de datos del NCBI (GenBank: U80928. 5). Como resultado

del alineamiento, se observa que no existen cambios a lo largo de la secuencia nucleotídica del gene *mela* (Fig. 24), por lo tanto, se decidió utilizar el plásmido pLoxGentrc*mela* de la clona 8 como templado para la generación del producto de PCR correspondiente.

Alignment: Local DNA homologies.		
Parameters: Both strands. Method: FastScan - Max Score		
Mol 1 <i>mela</i> NCBI (1-1837)		Mol 2 <i>mela</i> clona 8 I (1-1148)
Number of sequences to align: 2		
Settings: Similarity significance value cutoff: >= 60%		
<i>mela</i> NCBI	2	catggcgtggctggctcggcaagccgctcgctcgaacgatcatggaatgcgataactaagttt
<i>mela</i> clona 8	22	catggcgtggctggctcggcaagccgctcgctcgaacgatcatggaatgcgataactaagttt
		↔
<i>mela</i> NCBI	62	tccqqaatctgqattccaactgqaatqcaqqaatcagatcggtagtagcgtttttagctc
<i>mela</i> clona 8	82	tccggaatctggattccaactggaatgcaggaatcagatcggtagtagcgtttttagctc
<i>mela</i> NCBI	122	gcattttacgctgcattttcgagtggcacgctcgcttgcttcatttctcgtgccgcgatt
<i>mela</i> clona 8	142	gcattttacgctgcattttcgagtggcacgctcgcttgcttcatttctcgtgccgcgatt
<i>mela</i> NCBI	182	caccgaaactcagaaagagccaacgcaagctctatgggtggcggaattgccactgctcc
<i>mela</i> clona 8	202	caccgaaactcagaaagagccaacgcaagctctatgggtggcggaattgccactgctcc
<i>mela</i> NCBI	242	cgcqcccagacqgcqccqqaaccggcctaaaagcggcattaatcttggcgaaggacaattc
<i>mela</i> clona 8	262	cgcgcccagacggcgcgggaaccggcctaaaagcggcattaatcttggcgaaggacaattc
<i>mela</i> NCBI	302	aaatccaagggagagtaagatgagcatcacacgcagacatgtcatcgttcagggtggcgt
<i>mela</i> clona 8	322	aaatccaagggagagtaagatgagcatcacacgcagacatgtcatcgttcagggtggcgt
<i>mela</i> NCBI	362	cattgcagcaggcctgctcgccagcggcctaccggggacaaaagccttcgcgagataacc
<i>mela</i> clona 8	382	cattgcagcaggcctgctcgccagcggcctaccggggacaaaagccttcgcgagataacc
<i>mela</i> NCBI	422	gtcaatcccttggcggcgtcactgcagggttggcctggaacgaccgatcatcgagac
<i>mela</i> clona 8	442	gtcaatcccttggcggcgtcactgcagggttggcctggaacgaccgatcatcgagac
<i>mela</i> NCBI	482	ctatcgcgacgcagtgcgcttctcaacgcccttcccgccagcgcacaaattcaactgggt
<i>mela</i> clona 8	502	ctatcgcgacgcagtgcgcttctcaacgcccttcccgccagcgcacaaattcaactgggt
<i>mela</i> NCBI	542	caacctctcgaaaattcacggcagcggtgacgtcgtaaatactgcccgcgatggcaactg
<i>mela</i> clona 8	562	caacctctcgaaaattcacggcagcggtgacgtcgtaaatactgcccgcgatggcaactg
<i>mela</i> NCBI	602	gtatttcctgccgtggcacaggcctatacggctatgtacgagcgcacatcgttcggcacgt
<i>mela</i> clona 8	622	gtatttcctgccgtggcacaggcctatacggctatgtacgagcgcacatcgttcggcacgt
<i>mela</i> NCBI	662	gaccaagaacaacgatttcgctatgccgttctgggactggaccgacaatccgtaacctgcc
<i>mela</i> clona 8	682	gaccaagaacaacgatttcgctatgccgttctgggactggaccgacaatccgtaacctgcc

mela NCBI	722	cgaagtgttcacaatgcaaaagacgcccgcaggcaaggacaatccactttatgtttcgtc
mela clona 8	742	cgaagtgttcacaatgcaaaagacgcccgcaggcaaggacaatccactttatgtttcgtc
mela NCBI	782	gcqcacctggccaatcacgcagccgatgccggacaatatagttggggccacaggttctcaa
mela clona 8	802	gcqcacctggccaatcacgcagccgatgccggacaatatagttggggccacaggttctcaa
mela NCBI	842	caccatcctaacggcgaagccatacagaggtcttcggcaccaccgccccgagggacagaa
mela clona 8	862	caccatcctaacggcgaagccatacagaggtcttcggcaccaccgccccgagggacagaa
mela NCBI	865	acgaqgtcttcggcaccaccgccccgagggacagaactcactcgatccttctctgggtca
mela clona 8	1026	acgaqgtcttcggcaccaccgccccgagggacagaactcactcgatccttctctgggtca
mela NCBI	925	ccaccagcagcggcacgcagggggcgctggaatacacaccgcacaatcaggtgcacaaca
mela clona 8	966	ccaccagcagcggcacgcagggggcgctggaatacacaccgcacaatcaggtgcacaaca
mela NCBI	985	atatecgttggctggatgccggaatgtcgtcgccccgcgatccgatcttctctcatgcate
mela clona 8	906	atatecgttggctggatgccggaatgtcgtcgccccgcgatccgatcttctctcatgcate
mela NCBI	1045	attgcaacatcgaccgatctgggcgacctggaatttgcgcaacgccaacagcagcggatc
mela clona 8	846	attgcaacatcgaccgatctgggcgacctggaatttgcgcaacgccaacagcagcggatc
mela NCBI	1105	gactctgggcccagacatgccgttcaccgacaatttctacgatgtcgacggcaacttctggt
mela clona 8	786	gactctgggcccagacatgccgttcaccgacaatttctacgatgtcgacggcaacttctggt
mela NCBI	1165	ccccgaaggtctctgacctttatgttccagaggaactcggatacaattatggtttccgga
mela clona 8	726	ccccgaaggtctctgacctttatgttccagaggaactcggatacaattatggtttccgga
mela NCBI	1225	cctacttcaaggtcgcggcggcagcgcacaaaacgctggccctgaacgataaaactcacgt
mela clona 8	666	cctacttcaaggtcgcggcggcagcgcacaaaacgctggccctgaacgataaaactcacgt
mela NCBI	1285	ccgtgatcgcggcagcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg
mela clona 8	606	ccgtgatcgcggcagcggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg
mela NCBI	1345	acaacagcaaggcggcaacggaaaaacgtgccgcttctcgtgcccgatcaagatcccgggcg
mela clona 8	546	acaacagcaaggcggcaacggaaaaacgtgccgcttctcgtgcccgatcaagatcccgggcg
mela NCBI	1405	gcqcatcgcaggaatcgtccgccaaccgcccctcgcgatccggcatggatacaatggatt
mela clona 8	486	gcqcatcgcaggaatcgtccgccaaccgcccctcgcgatccggcatggatacaatggatt
mela NCBI	1465	tgggcgggcaacaggagcagggcggcctccgctcctcgtgtgctggcattcctgcgggatg
mela clona 8	426	tgggcgggcaacaggagcagggcggcctccgctcctcgtgtgctggcattcctgcgggatg
mela NCBI	1525	tcgagatcaccagtgccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
mela clona 8	366	tcgagatcaccagtgccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
mela NCBI	1585	aggccgatcgcggcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
mela clona 8	306	aggccgatcgcggcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
mela NCBI	1645	acggcgaccatcatcgcaaacatccttcgtcctcgatctgacggacgcgatccagcggg
mela clona 8	246	acggcgaccatcatcgcaaacatccttcgtcctcgatctgacggacgcgatccagcggg
mela NCBI	1705	tttacggcggaagggggcagacggatggcgaggccatcgacctgcagctcattcctgtcg
mela clona 8	186	tttacggcggaagggggcagacggatggcgaggccatcgacctgcagctcattcctgtcg
mela NCBI	1765	gatcgggagcgggcaaacccggcggcgtagagcccgaagctagaatagccatagtgt
mela clona 8	126	gatcgggagcgggcaaacccggcggcgtagagcccgaagctagaatagccatagtgt
mela NCBI	1825	ccgcctaacacc
mela clona 8	66	ccgcctaacacc

Figura 24. Alineamiento local de la secuencia del gen silvestre *mela* contra la de la clona 8. Se indica el codón de inicio (↔).

8. 3. Integración del gene heterólogo *melA* en el gene cromosomal *lacZ* de *E. coli*.

Como ya se ha mencionado, utilizando una metodología similar a la de Datsenko y Wanner (2000), el plásmido pLoxGentrc*melA* se utilizó como templado para la generación de un producto de PCR, empleando primers de 65 nucleótidos (nt), que incluyen 45 nt de identidad con el gene a inactivar y 20 nt que hibridan con el plásmido templado. El tamaño del producto de PCR fue de 3, 761 pb, y contiene el gene que codifica para el casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y el gene *melA* bajo control de P_{trc} . Dicho DNA lineal se introdujo en la cepa W3110. Para validar nuestro sistema se decidió interrumpir el gene *lacZ*, debido a que la enzima codificada por este gene confiere un fenotipo característico y fácilmente reconocible a las cepas que lo expresan. Además, su eliminación no compromete la sobrevivencia de la bacteria en un medio con glucosa. Por su parte, el genotipo *lacZ*⁻ se puede seleccionar fácilmente en placas conteniendo XGal e IPTG, en la cual las mutantes en dicho gene muestran colonias color blanco, en tanto que las no mutantes presentan colonias color azul. De las transformantes de la cepa W3110 de *E. coli* con el producto de PCR mencionado, se seleccionaron colonias “blancas” y resistentes al antibiótico gentamicina. Posteriormente, a estas colonias se les verificó resistencia a carbenicilina (Cb), ya que la posible integración del pLoxGentrc*melA* (el cual presenta resistencia a Cb y Gm) en cromosoma, resultaría en colonias falsas positivas de fenotipo “blanco” pero Cb^R Gm^R, mientras que por su parte colonias “blancas” con fenotipo Cb^S Gm^R; resultarían ser transformantes en las cuales ocurrió el evento de doble recombinación homóloga entre el gene cromosomal *lacZ* y el DNA lineal. Los resultados muestran que no se obtuvieron colonias falsas positivas, mientras que como consecuencia de la sustitución del gene *lacZ* por el producto de PCR, se obtuvieron 2 colonias con el último fenotipo descrito (Tabla C). Así mismo, se observaron colonias con fenotipo azul y Cb^R Gm^R, por lo que a 3 de un total de 14 de dichas colonias, se les extrajo DNA y como era de esperarse se obtuvo DNA plasmídico, el cual al utilizarse como templado para una reacción de amplificación por PCR, mostró un patrón de bandas idéntico al del plásmido pLoxGentrc*melA*, confirmando de nuevo la presencia de este plásmido a pesar de que el producto de PCR fue sometido a un proceso de purificación (Fig. 25c, carriles 3 y 6, 9 y 12).

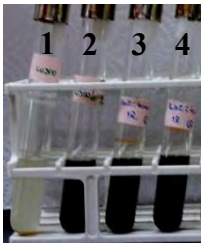
Clonas	Colonias totales	No. de colonias	Fenotipo				
			Anb ^R	<i>lacZ</i> ⁻	<i>melA</i> ⁺	PCR	
W3110/ <i>lacZ::trcmelA</i> , <i>loxP-aacCI-loxP</i>	16	14	Cb ^R Gm ^R	-	√		wt
		2	Cb ^S Gm ^R	√	√		√

Tabla D. Cuantificación de las transformantes de la cepa W3110 con el producto de PCR que expresa el casete de resistencia a gentamicina (*aacCI*) flanqueado por sitios *loxP* y el gene *melA* bajo control de P_{trc} . El recuadro sombreado muestra el número de colonias en las que ocurrió la sustitución del gene cromosomal *lacZ* por el producto de PCR. 1-4: Producción de melanina. 1: W3110, 2: W3110/pLoxGentrc*melA*, 3: W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP* 12 y 4: W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP* 18. wt: wild type.

Continuando con la validación de nuestro sistema, la expresión de genes heterólogos en el cromosoma de la bacteria, se demostró usando el gene *melA* que codifica para la enzima tirosinasa de *R. etli* CFN42. La producción del pigmento melanina por esta enzima, cuando se añade al medio el sustrato L-tirosina, genera una coloración café en las bacterias, por lo que se verificó que las 2 colonias, previamente identificadas como blancas y $Cb^S Gm^R$, expresaran el gene *melA* y como consecuencia fueran capaces de producir melanina, por lo que fueron cultivadas en medio líquido LB suplementado con L-tirosina, IPTG y $CuSO_4$ a $30^\circ C$ por 72 horas. Ambas mutantes (clonas 12 y 18) producen melanina ya que después del tiempo de incubación, el medio de cultivo cambió su coloración a café (Tabla C).

Finalmente, la integración del casete de resistencia a gentamicina (*aacC1*) flanqueado por sitios *loxP* y del gene *melA* bajo control de P_{trc} , se confirmó mediante amplificación por PCR a partir del DNA aislado de las colonias con los fenotipos previamente identificados. Con dicho fin se utilizaron los siguientes dos pares de oligos: 1) **trcmelA/lacZrvs - SEC4melA** que hibridan en las posiciones 6, 316 y 2, 794 respectivamente, y 2) **trcmelA/lacZfwd - SEC3melA** que hibridan en las posiciones 558 y 2, 647 respectivamente. El análisis del PCR de las candidatas donde se llevó a cabo el evento de intercambio alélico, resultó como se esperaba en fragmentos de aproximadamente 2 Kb y 3. 5 Kb que corresponden con la interrupción *lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP* (Figura 25). Las colonias derivadas de W3110 con la integración cromosomal verificada se nombraron W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacC1-loxP*.

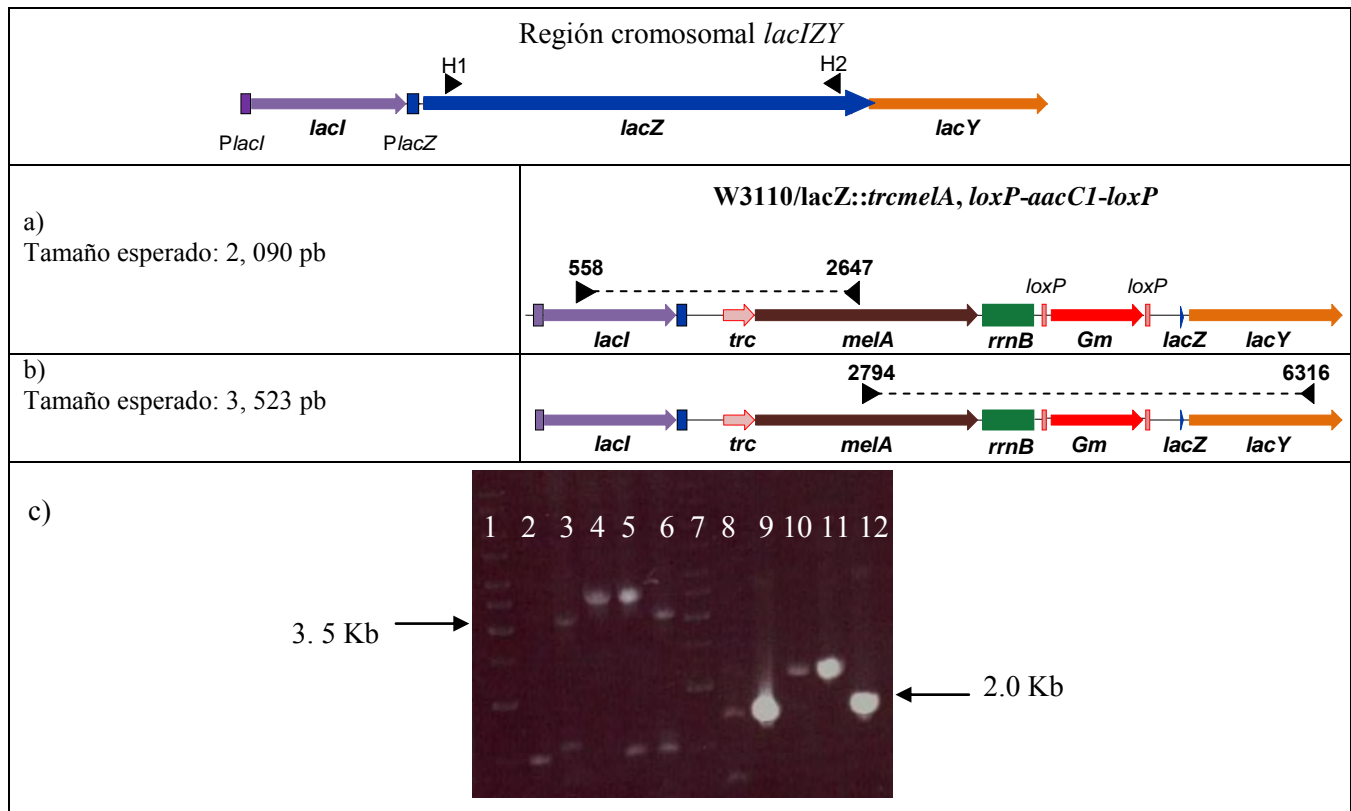


Figura 25. Verificación mediante PCR de la integración cromosomal en el gene *lacZ* de *E. coli*. La línea superior muestra parte de la región del operon *lac* silvestre, H1-H2 representan las 45 pb de identidad donde ocurrió la doble recombinación. (a-b) muestran la estructura de la integración del casete de resistencia a gentamicina flanqueado por sitios *loxP* y del gene *melA* bajo control de P_{trc} en el cromosoma de *E. coli*. Los números representan la posición en la que hibridan los oligos de comprobación de la integración cromosomal. Se indica el tamaño de los productos de PCR generados. c) Gel analítico donde se muestra las comprobaciones por PCR de las integraciones en el gene *lacZ*. **1**-Marcador 1Kb plus; con oligos **trcmelA/lacZrvs** - **SEC4melA**: **2**-W3110, **3**-pLoxGentrcmelA, **4**-W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* candidata 12, **5**-W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* candidata 18, **6**-clona "azul" Cb^RGm^R, **7**- Marcador 1Kb plus; con oligos **trcmelA/lacZfwd** - **SEC3melA**: **8**-W3110, **9**- pLoxGentrcmelA, **10**-W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* candidata 12, **11**-W3110/*lacZ::trcmelA, loxP-aacC1-loxP* candidata 18, **12**- clona "azul" Cb^RGm^R.

En los experimentos realizados, encontramos una mayoría de transformantes resistentes a antibiótico sin la integración deseada, algunas de ellas presentaban plásmido que al parecer había escapado de la digestión con *DraI* (lo cual se hizo para eliminar el DNA plasmídico). Aparentemente, estos resultados se deben al uso del plásmido pLoxGentrcmelA como templado, el cual no se trata de un plásmido suicida ni termosensible, por lo que sería necesario utilizar otro tipo de enzimas como *DpnI*, para eliminar el DNA metilado (no-amplificado), o bien obtener el fragmento de interés a partir de la digestión del pLoxGentrcmelA, y una vez liberado el DNA lineal utilizarlo como templado para la reacción de PCR.

A pesar de que existe un sistema de inactivación de genes cromosomales ya reportado, el cual utiliza a la recombinasa Flp y los sitios de reconocimiento *frt* (Datsenko & Wanner, 2000), en nuestro sistema al tiempo que se lleva a cabo la inactivación, es posible la expresión de genes en cromosoma, además creemos que el sistema Cre/*loxP* aquí utilizado posee la ventaja de que *E. coli* es un huésped natural de dichos elementos (Hoess y Abremski, 1984; Palmeros et al., 2000). Por otra parte, según el objetivo planteado, no se excluye la posibilidad de trabajar con ambos sistemas, siendo una de las ventajas el alternar el uso de las recombinasas Cre y Flp, ya que de esta manera se disminuye la recombinación sitio-específica entre los sitios *loxP* que se vayan acumulando en el cromosoma de la bacteria, pudiendo con ello ocasionar deleciones de grandes segmentos de DNA cromosomal.

8. 4. Efecto de la expresión del gene heterólogo *melA* en el cromosoma de la cepa silvestre W3110 de *E. coli* sobre su capacidad de sintetizar melanina.

Una vez construido y validado nuestro sistema de integración y de expresión, se llevó a cabo la caracterización de la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP*, la cual expresa, a nivel monocopia, el gene *melA*, bajo el control del promotor fuerte P_{trc} . La presencia del gene silvestre *lacI* en el cromosoma de *E. coli*, regula de manera negativa a *trc* y por lo tanto la expresión de *melA*, por lo que es necesaria la adición al medio de cultivo del inductor gratuito IPTG. Así mismo, se caracterizó la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, la cual expresa el gene *melA* en multicopia, en este caso el plásmido posee la versión mutante del represor LacI, así como la versión cromosomal silvestre de LacI, lo que hace la expresión del gene de interés igualmente regulable.

Como se observa en la gráfica de crecimiento (Fig. 26), cuando la cepa silvestre W3110 se transforma con el plásmido pLoxGentrc, la tasa de crecimiento (μ) disminuye considerablemente en un 41% con respecto a la cepa W3110. Lo anterior es resultado de un efecto de carga metabólica impuesta por la replicación y la expresión de genes en el plásmido. Por su parte, como consecuencia de la expresión del gene *melA* en dicho plásmido, la μ de la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* disminuyó aún más, de 0.27 a 0.13 h⁻¹, es decir un 52% con respecto a la cepa W3110 (tabla E). Sin importar que tan negativo sea el efecto del número de copias o el tamaño de un plásmido en la tasa de crecimiento, éste es mayor cuando se expresan determinados genes en el vector, como se observa en la μ de la cepa que expresa *melA* en multicopia. En este caso no sólo incrementa el tamaño del plásmido (8.0 Kb), sino que ahora se expresan dos genes, el que confiere resistencia a gentamicina y el gene *melA*. Si bien la expresión de este último es regulable por la adición de IPTG, el promotor híbrido P_{trc} a partir del cual se transcribe *melA* es tan fuerte que existe una expresión basal incluso en ausencia del inductor. Debido a lo anterior, es lógico pensar que la carga metabólica en la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* sea mayor con respecto a la cepa W3110/pLoxGentrc.

Por otro lado, cuando el gene *melA* se integra en el cromosoma de la cepa W3110 junto con el casete *loxP-aacCI-loxP*, la μ de esta cepa se recupera en un 96% con respecto a la de la silvestre; mientras que comparada con la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, la integración en cromosoma de dicho gene ocasionó un incremento del doble en la μ de la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP*.

En cuanto a la producción de melanina, la enzima MelA se produce intracelularmente durante la fase exponencial, no tiene acceso a la tirosina, probablemente por un impedimento físico que evita que las permeasas AroP y TyrP permitan la entrada de ésta, por lo que es durante la fase estacionaria temprana que dicho sustrato ingresa a la célula, los precursores de melanina se forman y son excretados al medio donde la polimerización de la misma ocurre (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006).

Para el caso de la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, se consume un 1% de la tirosina inicial durante la fase estacionaria temprana (16h), es decir 0.004 g/L de melanina se producen a partir de 0.4 g/L de tirosina añadida al medio de cultivo.

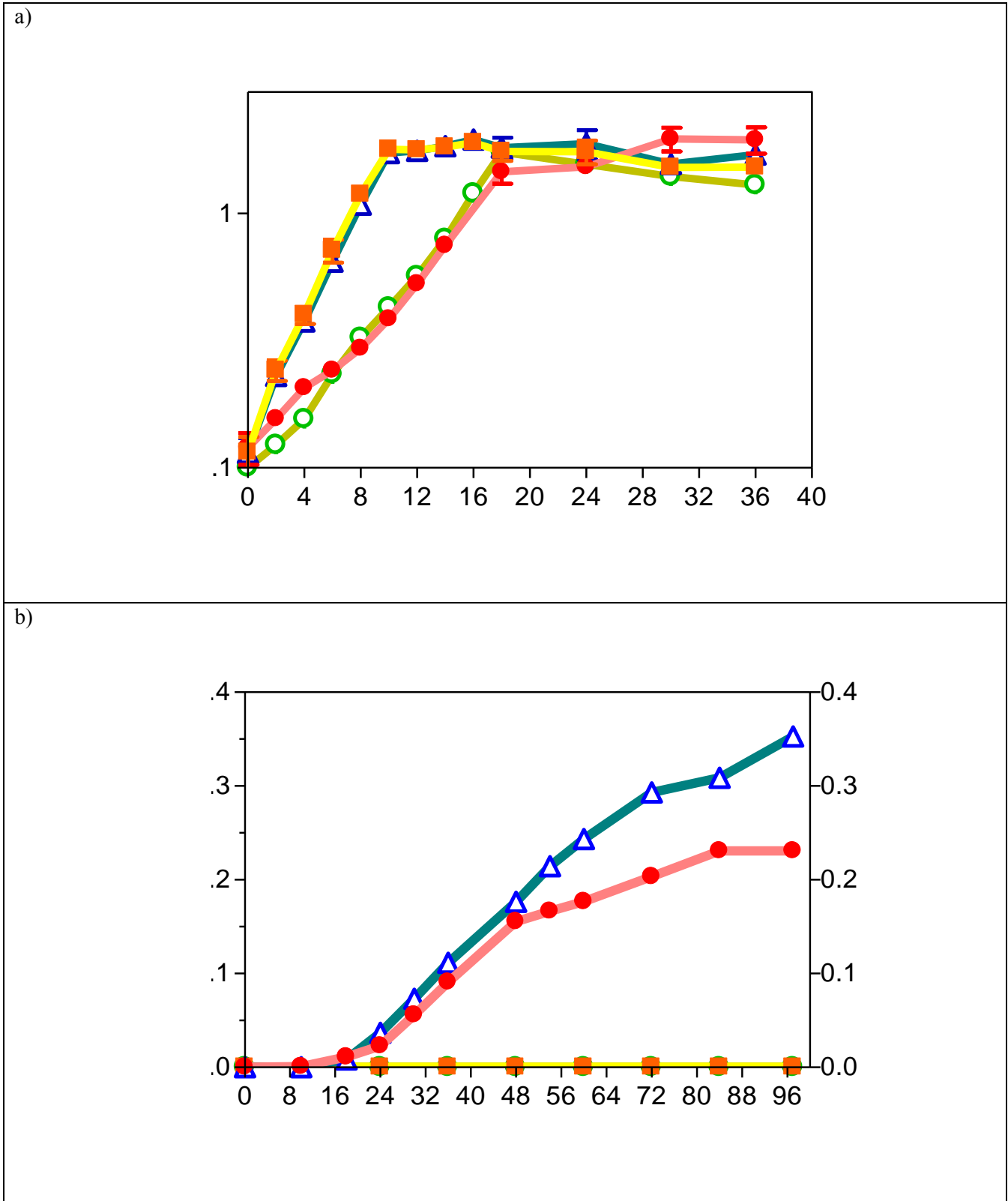


Figura 26. Caracterización del a) crecimiento y b) producción de melanina en las cepas que expresan el gene heterólogo *melA* bajo control del promotor P_{trc} a nivel multicopia ● W3110/pLoxGentrc*melA*, y monocopia ▲ W3110/*lacZ::trcmeLA, loxP-aacCI-loxP*. También se muestran las cepas controles ■ W3110 y ○ W3110/pLoxGentrc. Experimentos hechos por duplicado en medio mineral M9 suplementado con 2 g/L de glucosa, 0.4 g/L de L-tirosina, 0.1 mM IPTG y 40 μ g/ml CuSO_4 .

Por su parte, la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP*, entra a fase estacionaria alrededor de la hora 12, es decir 4 horas antes que la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, y para la hora 16 ha consumido aproximadamente un 2% de la tirosina inicial generando 0.008 g/L de melanina en ese tiempo, llegando a acumular 0.35 g/L de melanina al final del cultivo (97h), lo cual corresponde a un incremento del 52% comparado con la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*. Como consecuencia, la velocidad específica de producción de melanina (q_{Mel}) en la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP*, incrementa en un 67% con respecto a la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* (tabla E).

Es importante mencionar, que como resultado de la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula de tirosina, por la actividad cresolasa de la tirosinasa, se obtiene un rendimiento teórico de 460 mg de melanina a partir de 400 mg de L-tirosina ($1.15 \text{ g}_{Mel} \text{ g}_{Tir}^{-1}$). Por lo que los valores de rendimiento ($Y_{Mel/Tir}$) obtenidos en este trabajo, se presentan como porcentajes de éste máximo. En el caso de la cepa W3110/pLoxGentrc*melA*, el título alcanzado de melanina fue de 0.23 g/L, el cual corresponde con un $Y_{Mel/Tir}$ del 49% comparado con el máximo teórico, mientras que para la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP* el título alcanzado incrementó a 0.35 g/L de melanina, logrando un $Y_{Mel/Tir}$ del 75% respecto al máximo teórico (tabla E). Al parecer, la integración a cromosoma de una copia del gene heterólogo *melA* resultó ser la mejor estrategia para incrementar la producción de melanina en la cepa W3110 bajo las condiciones utilizadas en este estudio, ya que se elimina la carga metabólica impuesta por la expresión de *melA* en multicopia a partir del plásmido pLoxGentrc, restableciéndose de esta manera la μ de la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP* con respecto a la de la silvestre. Por su parte, la inserción de *melA* en el plásmido pLoxGentrc, ocasiona una disminución en la μ de la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* de 0.16 a 0.13 h^{-1} , sin embargo en términos de biomasa máxima (datos no mostrados), alcanza valores similares después de las 16 horas comparada con la cepa W3110/*lacZ::trcmelA*, *loxP-aacCI-loxP*, probablemente la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* canaliza una mayor cantidad de energía para el mantenimiento de la célula debido a la presencia del plásmido pLoxGentrc*melA*, y esto repercute negativamente en la producción de melanina., pues la cepa W3110/pLoxGentrc*melA* a pesar de expresar el gene *melA* a nivel multicopia, acumula un 34% menos de melanina que lo alcanzado por la cepa que lo expresa en cromosoma.

El sistema de integración y expresión, diseñado y caracterizado en este trabajo, contribuyó a mejorar la cepa productora de melanina, al eliminar la necesidad del antibiótico. Así mismo, este sistema puede ser modificado para realizar una integración en el gene *lacI*, y así también lograr la eliminación del uso del inductor IPTG.

		W3110	W3110/pLoxGentrc	W3110/pLoxGentrc <i>melA</i>	W3110/ <i>lacZ::trcmelA</i> , <i>loxP-aacCI-loxP</i>
Fase exponencial	μ (h ⁻¹)	0.27 ± 0.0057	0.16 ± 0.0024	0.13 ± 0.0057	0.26 ± 0.0073
Fase estacionaria	Melanina acumulada (g/L)	----	----	0.23 ± 0.0162	0.35 ± 0.0121
	q_{Mel} (mg Mel/g DW x h)	----	----	3.73 ± 0.1082	6.23 ± 0.2353
	$Y_{Mel/Tir}$ (%)	----	----	49	75

Tabla E. Comparación de parámetros cinéticos entre las diferentes cepas generadas en este estudio. DW: peso seco.

IX. Conclusiones

- Se construyó el plásmido de expresión pLoxGentrc, el cual permite la clonación y expresión regulada de genes bajo el control transcripcional del promotor fuerte P_{trc} .
- El plásmido pLoxGentrc también fue diseñado para funcionar como templado de PCR, el cual puede usarse para lograr la integración y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. Esto se llevó a cabo mediante 4 pasos: 1) Generación del producto de PCR a partir del plásmido de expresión pLoxGentrc, el cual previamente expresa el gene de interés bajo control del promotor fuerte P_{trc} , 2) Transformación de la cepa hospedero y recombinación homóloga mediada por el sistema λ -Red, entre el producto de PCR y el gene blanco a inactivar en el cromosoma, 3) Selección de las transformantes por su resistencia a gentamicina y 4) Opcionalmente la eliminación del casete de resistencia, en caso de que se deseen realizar modificaciones genéticas posteriores en la cepa.
- El uso del plásmido pLoxGentrc, permitió expresar el gene *mela* tanto a nivel multicopia como en monocopia, generando cepas productoras de melanina con la capacidad de crecer y sintetizar este metabolito, siendo ambas características más eficientes en la cepa que expresa *mela* en cromosoma que en multicopia.
- La presencia del gene *mela* en el cromosoma de la cepa W3110, ocasionó que su μ se incrementara en un 50% comparada con la cepa W3110/pLoxGentrc*mela*, al reducirse el efecto de carga metabólica impuesta por la replicación y expresión de los genes en el plásmido. Así mismo, se eliminó la necesidad de utilizar antibiótico en la cepa que expresa el gene *mela* en el cromosoma.
- La integración a cromosoma de una copia del gene heterólogo *mela* bajo el control del promotor P_{trc} , resultó ser la mejor estrategia para la producción de melanina, lográndose un título 52% mayor que el alcanzado en la cepa W3110/pLoxGentrc*mela*. Como consecuencia la q_{Mel} en la cepa W3110/*lacZ::trcmela*, *loxP-aacCI-loxP*, incrementó un 67% comparada con la cepa que expresa *mela* en multicopia, para alcanzar finalmente un $Y_{Mel/Tir}$ del 75% con respecto al máximo teórico.

X. Perspectivas

- El sistema en 4 pasos desarrollado en este trabajo, permite la inactivación y expresión de genes cromosomales de manera regulable, por lo que es necesaria la adición del inductor gratuito IPTG, sin embargo, también sería importante la generación de un sistema constitutivo, el cual eliminaría la necesidad del uso del inductor, como lo sería integrando el producto de PCR en el gene que codifica para el represor LacI del cromosoma de *E. coli*.
- Con la finalidad de incrementar la productividad y el rendimiento en las cepas W3110/pLoxGentrcmela y W3110/lacZ::trcmela, loxP-aacCI-loxP, evaluar a nivel fermentador la síntesis de melanina, bajo condiciones reguladas de oxígeno así como de pH (cambiando de 7 a 7.5 durante la fase de producción).
- Con el objetivo de eliminar la adición del sustrato L-tirosina al medio de cultivo y así reducir los costos de producción de melanina, se podría integrar en cromosoma utilizando el sistema desarrollado, el producto de PCR P_{trcmela}, loxP-aacCI-loxP en cepas generadas en nuestro laboratorio que son productoras del compuesto fenólico catecol (datos no publicados), el cual es oxidado por la tirosinasa MelA y posteriormente convertido en una melanina sintética de color durazno (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006).

XI. Bibliografía

Amann E, Ochs B, Abel KJ. (1988). **Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*.** Gene 69: 301-315.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Smith J, Seidman J, Struhl K. (2005). **Minipreps of plasmid DNA.** En *Current Protocols in Molecular Biology*. Editado por: John Wiley & Sons. Inc. EUA. Vol. 1. 1.6.1-1.6.2.

Balbás P, Gosset G. (2001). **Chromosomal editing in *Escherichia coli*.** Molecular Biotechnology 19 (1): 1-12.

Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. (1977). **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.** Gene 2: 95-113.

Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart A. (1996). **Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination.** Nucleic Acids research 24 (21): 4256-4262

Cabrera N, Martínez A, Piñero S, Lagunas V, Tinoco R, de Anda R, Vázquez R, Bolívar F, Gosset G. (2006). **Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase.** Enzyme and Microbial Technology 38: 772-779.

Calos M. (1978). **DNA sequence for a low-level promoter of the *lac* repressor gene and an “up” promoter mutation.** Nature 274: 762-765.

Chávez-Béjar M, Lara A, López H, Hernández-Chávez G, Martínez A, Ramírez O, Bolívar F, Gosset G. (2008). **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the Chorismate mutase domain of the native Chorismate mutase prephenate dehydratase and a Cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*.** Applied and Environmental Microbiology 74 (10): 3284-3290.

Chen Y, Rice P. (2003). **New insight into site-specific recombination from FLP recombinase-DNA structures.** Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures 32: 135-159.

Datsenko K, Wanner B. (2000). **One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** Proceedings of the National Academy of Sciences 97 (12): 6640-6645.

- Díaz-Ricci J, Hernández M. (2000). **Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism.** Critical Reviews in Biotechnology 20 (2): 79-108.
- Glick B. (1995). **Metabolic load and heterologous gene expression.** Biotechnology Advances 13 (2): 247-261.
- Hamilton C, Aldea M, Washburn B, Babitzke P, Kushner S. (1989). **New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology 171 (9): 4617-4622.
- Hoess R, Abremski K. (1984). **Interaction of bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site *loxP*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 1026-1029.
- Hook-Barnard I, Hinton D. (2007). **Transcription initiation by mix and match elements: flexibility for polymerase binding to bacterial promoters.** Gene Regulations and Systems Biology 1: 275-293.
- Kolisnychenko V, Plunkett G, Herring C, Fehér T, Pósfai J, Blattner F, Pósfai G. (2002). **Engineering a reduced *Escherichia coli* genome.** Genome Research 12 (4): 640-647.
- Lagunas-Muñoz V, Cabrera-Valladares N, Bolívar F, Gosset G, Martínez A. (2006). **Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*.** Journal of Applied Microbiology 101: 1002-1008.
- Le Borgne S, Palmeros B, Valle F, Bolívar F, Gosset G. (1998). **pBRINT-T_s: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*.** Gene 223: 213-219.
- Le Borgne S, Palmeros B, Valle F, Bolívar F, Gosset G. (2001). **Improvement of the pBRINT-Ts plasmid family to obtain marker-free chromosomal insertion of cloned DNA in *E. coli*.** BioTechniques 30: 252-256.
- Lewin B. (2004). **Transcription.** En *Genes VIII*. Editado por: Pearson. Prentice Hall, EUA. 241-256.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. (2000). **Recombination between homologous DNA sites.** En: *Molecular Cell Biology*. Editado por: W. H. freeman and Company, EUA. 4^{ta} edición: 482-491.
- Meynial I, Cervin M, Soucaille P. (2005). **New tool for metabolic pathway engineering in *Escherichia coli*: one-step method to modulate expression of chromosomal genes.** Applied and Environmental Microbiology 71: 2140-2144.

- Murphy KC. (1998). **Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology 180 (80): 2063-2071.
- Nelson D, Cox M. (2001). **Regulación de la expresión génica.** En *Lehninger Principios de Bioquímica*. Editado por: Omega, España. 3^{era} edición: 1072-1076.
- Nielsen J. (2001). **Metabolic engineering.** Applied Microbiology and Biotechnology 55: 263-283.
- Palmeros B, Wild J, Szybalski W, Le Borgne S, Hernández G, Gosset G, Valle F, Bolívar F. (2000). **A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria.** Gene 247: 255-264.
- Plonka P, Grabacka M. (2006). **Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects.** Acta Biochimica Polonica 53 (3): 429-443.
- Poteete A. (2001). **What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function.** FEMS Microbiology Letters 201: 9-14.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sawitzke J, Thomason L, Constantino N, Bubunenko M, Datta S, Court D. (2007). **Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enteric*, and beyond.** Methods in Enzymology 421: 171-198.
- Sternberg N, Hamilton D. (1981). **Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites.** Journal of Molecular Biology. 150: 467-486.
- Swalla B, Gumport R, Gardner J. (2003). **Conservation of structure and function among tyrosine recombinases: homology-based modeling of the lambda integrase core-binding domain.** Nucleic Acids Research 31 (3): 805-818.