



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INGENIERÍA DE PEROXIDASAS POR
RECOMBINACIÓN *in vivo* DE HOMÓLOGOS
DISTANTES DE LA CLOROPEROXIDASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

EDGAR ABRAHAM TREJO MEDÉCIGO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARÍA BRENDA VALDERRAMA BLANCO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Trejo
Medécigo
Edgar Abraham
57 81 93 42
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
405057393

2. Datos del tutor

Dr
María Brenda
Valderrama
Blanco

3. Datos del sinodal 1

M en C
Miguel Ángel
Meneses
Pérez

4. Datos del sinodal 2

Dr
Ernesto
Ortiz
Suri

5. Datos del sinodal 3

Quím
Viviana
Escobar
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dr
Odón
Vite
Vallejo

Quisiera agradecer profundamente y dedicar esta Tesis a mi Madre y a mi Padre cuyo cariño, apoyo y guía han resultado invaluable en mi desarrollo personal. Quisiera agradecer también a mi familia por los tantos momentos agradables que me han hecho pasar y por su apoyo. Quisiera agradecer a todos los miembros del laboratorio por aceptarme y por su compañerismo, pero especialmente quiero agradecerle a mi tutora la Dra. Brenda Valderrama Blanco por compartir conmigo su tiempo y esfuerzo, por permitirme aprender de ella, por tenerme tanta paciencia aun cuando mis acciones no necesariamente ameritaban dicha comprensión; quiero agradecerle también por ser el mejor Gurú de la ciencia que jamás podré tener, ya que ella me permitió apreciar su inteligencia, su integridad, su excelencia y su enorme pasión por el quehacer científico, siendo una influencia positiva, decisiva y determinante en todo lo que respecta a mi vida profesional presente (por muy corta que ésta sea en este momento) y futura. También quiero agradecer a Marta Rocío Servin Vences por ser y haber sido parte importante de mi vida en todo el tiempo que se desarrollo este proyecto y con quien definitivamente comparto este pequeño triunfo profesional. Quiero compartir este trabajo también con mis amigos Play, Iván y Villegas sin los cuales la rutina sería intolerable y con los cuales comparto un profundo sentimiento de hermandad.

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Agradezco el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM) PAPIIT IN213010 y la asistencia técnica de Guadalupe Paredes. Agradezco también el apoyo del Dr. Jorge Luis Folch Mallol y de la Dra. Claudia Martínez Anaya.

INDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| <i>Tipos de Recombinación</i> | <i>3</i> |
| <i>Recombinación homóloga en levadura</i> | <i>8</i> |
| <i>Barajeo de secuencias</i> | <i>11</i> |
| <i>Antecedentes</i> | <i>16</i> |
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 19 |
| HIPOTESIS | 22 |
| OBJETIVO GENERAL | 22 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 22 |
| MATERIAL Y METODOS. | 23 |
| <i>Cepas y Plasmidos</i> | <i>23</i> |
| <i>Medios de Cultivo y Soluciones de antibioticos y aminoácidos</i> | <i>25</i> |
| <i>Amortiguadores y Reactivos</i> | <i>28</i> |
| <i>Reacciones de amplificación</i> | <i>28</i> |
| <i>Síntesis lineal de ADN</i> | <i>29</i> |
| <i>Electroforesis de ADN en geles de Agarosa y Acrilamida</i> | <i>29</i> |
| <i>Purificaciones de productos de PCR</i> | <i>30</i> |
| <i>Cuantificación de ADN en espectrofotómetro</i> | <i>30</i> |
| <i>Remoción de sales del ADN para la electroporación</i> | <i>30</i> |
| <i>Preparación de células electrocompetentes DH5α.</i> | <i>31</i> |
| <i>Electroporación</i> | <i>31</i> |
| <i>Ligaciones</i> | <i>32</i> |
| <i>Digestiones</i> | <i>32</i> |
| <i>Cromatografía de exclusión molecular</i> | <i>32</i> |
| <i>Transformación de levadura</i> | <i>33</i> |
| <i>Obtención de sobrenadante y filtración</i> | <i>36</i> |
| <i>Ensayo de actividad enzimática</i> | <i>37</i> |
| <i>Oligonucleótidos</i> | <i>37</i> |
| RESULTADOS | 41 |
| <i>Recuperación de genes potenciales de peroxidasas</i> | <i>41</i> |
| <i>Síntesis de construcciones recombinantes</i> | <i>43</i> |
| <i>Amplificación de construcciones recombinantes y preparación de vector</i> | <i>48</i> |
| <i>Transformación de levadura</i> | <i>49</i> |
| <i>Determinación de actividad enzimática</i> | <i>55</i> |
| DISCUSION | 60 |
| PERSPECTIVAS | 72 |
| CONCLUSIONES | 74 |

BIBLIOGRAFIA 75

RESUMEN

El barajeo o “shuffling” es una técnica de gran utilidad para la generación de variabilidad de secuencias nucleotídicas y por lo tanto de las proteínas que codifica. La generación de variabilidad es de gran importancia para la optimización de proteínas novedosas de interés biotecnológico. Esta técnica se basa en la capacidad de recombinación entre secuencias similares y puede ser llevado a cabo *in vitro* mediante la función de enzimas específicas ó *in vivo* al explotar la maquinaria celular de recombinación.

El propósito de este trabajo fue articular un sistema experimental para llevar a cabo la ingeniería de homólogos distantes de peroxidasas utilizando el barajeo como fuente de variabilidad, así como diseñar las diferentes secuencias que son necesarias para llevar a cabo esta técnica.

Se eligió al organismo *Saccharomyces cerevisiae* para desarrollar el sistema de recombinación *in vivo* por su gran capacidad de recombinación y su relativamente fácil manipulación. Se diseñaron una serie de oligonucleótidos que nos permitieron crear construcciones recombinantes a partir de un grupo de genes potenciales de peroxidasas homólogos a la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* utilizando el plásmido PYEX-S1 como vector de expresión y molde para la recombinación.

Se probaron diferentes protocolos de transformación y una vez que se determinó que la electroporación era el método más efectivo para nuestro sistema experimental se analizaron algunas de las clonas obtenidas. Encontramos que el sobrenadante de nuestros cultivos oxidaba al compuesto TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina), y aunque se encontró oxidación residual independiente de peróxido de hidrógeno a niveles bajos, se logró cuantificar una actividad de oxidación dependiente de peróxido de hidrógeno, indicando que ésta era resultado de una actividad enzimática específica.

Los resultados indican que el sistema de recombinación *in vivo* diseñado en este trabajo es funcional y por lo tanto puede ser utilizado para generar combinaciones de secuencias que podrían codificar enzimas novedosas.

INTRODUCCIÓN

El genoma de todos los seres vivos está sujeto a cambios y es posible que sufra modificaciones a nivel de secuencia de ADN. En una población, esta variabilidad genética resulta muy importante pues genera la diversidad que se necesita para permitir a los organismos cambiar, adaptarse y eventualmente evolucionar para sobrevivir en un entorno cambiante. En el ambiente celular las moléculas de ADN no son totalmente estables, cada uno de los pares de bases que conforman la doble hélice tiene una cierta probabilidad de cambiar, sin embargo, la célula no es capaz de tolerar un número muy alto de cambios en un periodo temporal muy corto, ya que esto inevitablemente llevaría a la degeneración del contenido informacional del ADN y por lo tanto a la muerte celular. Es por esto que la célula ha desarrollado mecanismos de reparación de ADN que, aunque no logran evitar en su totalidad la ocurrencia de cambios, sí logran impedir su acumulación excesiva y por ende evitar la degeneración del genoma. Podemos afirmar entonces que las variaciones genéticas que observamos cotidianamente en la naturaleza son resultado del equilibrio entre ambos fenómenos: el que genera cambios en la secuencia de nucleótidos del genoma de las células y el que repara o revierte esos cambios.

Los cambios en el ADN pueden surgir por efecto de diferentes mecanismos: el principal de ellos es la mutación, que es considerada como la mayor fuente de variabilidad al estar asociada con una gran cantidad de fenómenos de muy diferentes matices. Por otro lado la recombinación es otro mecanismo con enorme capacidad de generar variabilidad. Resulta muy interesante contrastar estos mecanismos, ya que son de un origen muy diferente y además, son fenómenos regulados de manera totalmente diferente.

El núcleo de las células es el lugar donde se alberga la información suficiente y necesaria para el correcto funcionamiento de las mismas. Dado que ésta es de gran importancia para la supervivencia de la célula, es lógico esperar que se encuentre protegida contra daños. Más allá de las barreras físicas que la célula haya desarrollado para proteger dicha información, se encuentran estrategias mucho más complejas e interesantes, en las que el material codificante en el ADN es reparado o mantenido mediante el intercambio continuo de información entre dos o más moléculas. Esta estrategia, sin embargo, ha

resultado ser tan efectiva que su utilización se ha diversificado, de manera que ahora, ese intercambio de información también es parte importante de otro proceso, uno que se encarga de generar variabilidad. Esta estrategia se conoce como Recombinación y se basa en el intercambio de información entre dos moléculas de ADN. La recombinación tiene diferentes consecuencias en la célula, entre las principales están el reparar moléculas de ADN dañadas y también el de combinar la información entre ellas para construir moléculas con un nuevo arreglo de información y así generar variabilidad. El mecanismo de reparación por recombinación es esencial para cualquier célula eucariótica en proliferación y permite reparar la secuencia después de cada ciclo de replicación puesto que el ADN está sujeto a daño debido a los accidentes o fallas que pueden surgir en el proceso, y que de hecho, son inherentes al ciclo replicativo.

Tipos de Recombinación

Una primera distinción de los diferentes tipos de recombinación existentes surge al contrastar el grado de similitud entre las moléculas de ADN participantes. Esta clasificación genera dos tipos de recombinación: La homóloga y la no homóloga. En la recombinación homóloga dos moléculas muy similares de ADN y por ende homólogas, son capaces de ser recombinadas explotando su identidad, aunque ésta no esté conservada en toda la extensión de las moléculas participantes. La recombinación no homóloga permite que dos moléculas que no tienen similitud, y que por lo tanto no son homólogas puedan ser recombinadas entre sí. (Alberts et al. 2007, Suzuki et al. 1985)

Dentro de la recombinación homóloga podemos encontrar a la recombinación general y a la recombinación sitio específica. Dentro de la no homóloga podemos encontrar la unión de extremos no homólogos o con una región de microhomología y la transposición. Además existe otro tipo de recombinación que solo sucede en virus de RNA llamada “copy-choice” (Nagi y Simon 1997)

La recombinación homóloga general intercambia información entre moléculas que comparten una región de nucleótidos complementaria, desde 25 hasta miles de pares de

bases, la cual funciona como punto de anclaje para que las dobles hélices de ADN interaccionen y para que posteriormente se dé el intercambio de información. (Alberts et al. 2007)

La recombinación homóloga general sucede durante la meiosis en organismos eucariontes reproduciéndose sexualmente y durante la mitosis en organismos eucariontes con genomas duplicados. Durante la meiosis la recombinación funciona como un mecanismo para la generación de nuevas combinaciones de alelos en los cromosomas. De esta forma la recombinación homóloga agrega diversidad genética adicional, creando nuevas combinaciones que no podrían surgir sólo por acción de la segregación independiente de cromosomas. El intercambio genético por recombinación no solo ocurre en animales y plantas sino que también ocurre en procariontes y virus. (Alberts Bruce., 2007)

Las características centrales de la recombinación homóloga parecen ser las mismas en todos los organismos, de forma que se infiere que están conservadas en prácticamente todos los grupos de seres vivos. En la Figura 1 podemos observar dos moléculas homólogas de ADN que provienen de un par de cromosomas. La recombinación permite el intercambio de cadenas complementarias entre estas dos moléculas iniciada por una doble ruptura, y utilizando la información contenida en una de ellas para reparar el daño en la otra (Figura1).

Después de sufrir la ruptura de doble cadena, los extremos resultantes de dicha molécula de ADN son modificados por la acción de una exonucleasa con dirección 5' a 3', creando un par de segmentos de cadena sencilla. Estos extremos, con ayuda de algunas proteínas, son capaces de invadir a la molécula homóloga de ADN al aparearse con sus cadenas complementarias, gracias a la identidad en secuencia que comparten.

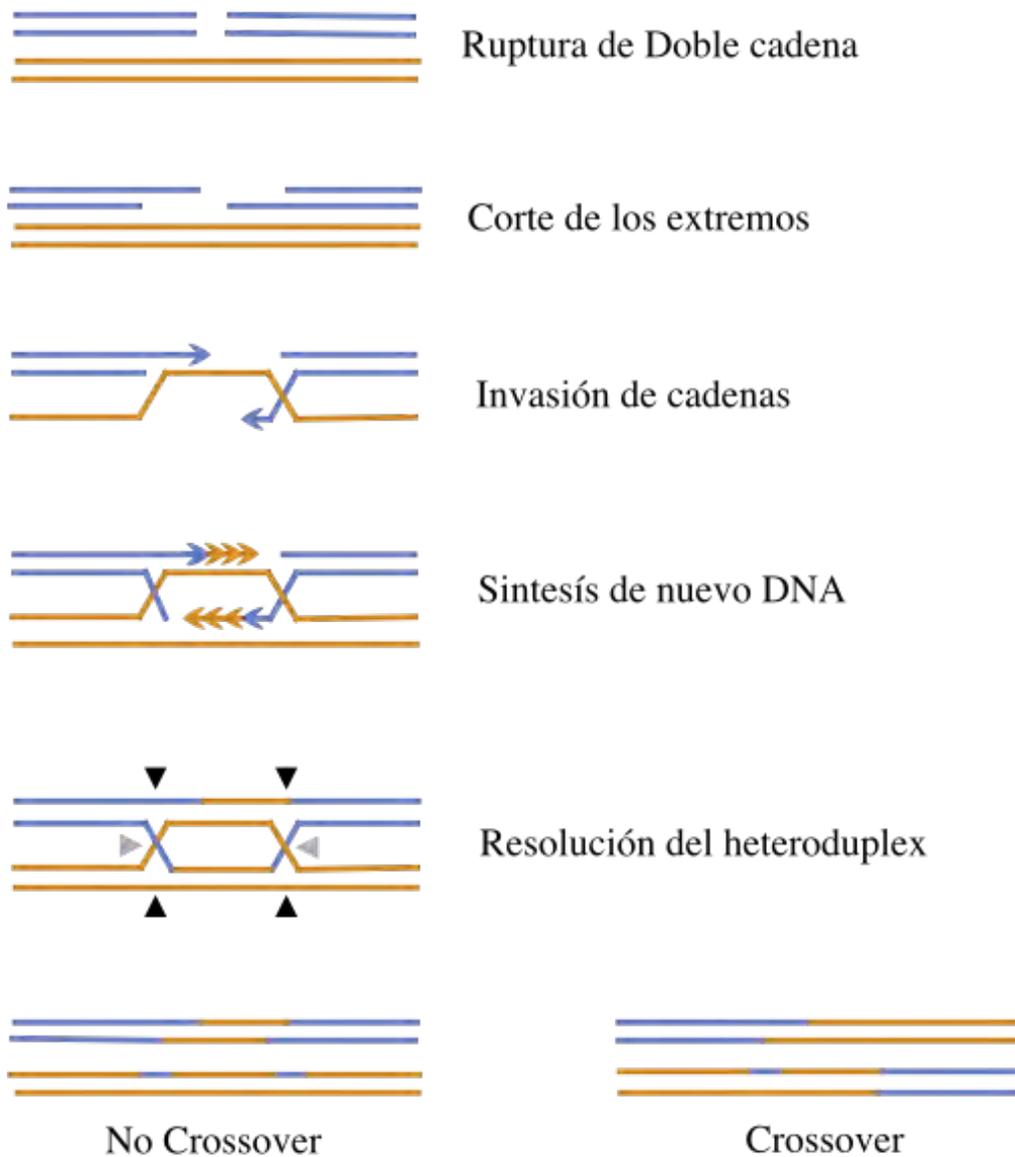


Fig 1. Esquema general de la recombinación homóloga. Una doble ruptura de una doble hélice de ADN induce la acción de una exonucleasa creando segmentos de cadena sencilla, éstos se aparean con su cadena complementaria en una doble hélice y así se sintetiza nuevo ADN para reestablecer la continuidad de las moléculas. Finalmente las uniones se resuelven y se obtienen dos dobles hélices intactas. Crossover: Entrecruzamiento. No Crossover: Sin Entrecruzamiento. Modificado de Alberts y otros 2007.

De esta forma se crea una unión heteroduplex a partir de la cual se prosigue con la síntesis de nuevo ADN para restaurar la continuidad de la secuencia perdida, ya sea por la

ruptura inicial de la molécula como por la actividad de exonucleasa. Una vez que las moléculas han sido reparadas se prosigue con la resolución de la unión heteroduplex. Para lograrlo se necesita hacer un corte justo en el punto de unión de las moléculas y posteriormente ligar los fragmentos resultantes para restaurar la continuidad de la hebra. Cabe resaltar que los cortes en los puntos de unión entre moléculas pueden tener diferente orientación, y por lo tanto, las moléculas resultantes pueden variar en composición. Al terminar el proceso se obtendrán dos dobles hélices intactas, cada una compuesta por dos cadenas complementarias cuya composición varía dependiendo de la manera en que se resuelva la unión entre ellas.

Las dos formas de resolución son: a) la que no produce un entrecruzamiento y b) la que sí genera un entrecruzamiento. En la figura 2 es posible observar un esquema de las dos formas más comunes de resolución, en el inciso a y b de esta figura es posible observar un punto de vista de la unión heteroduplex más cercano a lo que pasa físicamente con el ADN durante el proceso, en el inciso c se muestran los dos posibles cortes con los que se puede resolver la unión. El primero de ellos, con orientación horizontal, no produce un entrecruzamiento, ya que las moléculas resultantes solo contienen un pequeño fragmento de ADN nuevo ó correspondiente a la doble hélice complementaria. El segundo corte, con orientación vertical, si produce un entrecruzamiento ya que hay un intercambio entre las dobles hélices que participan en la unión, de manera que cada una de las moléculas resultantes es una combinación de las dos dobles hélices homólogas originales.

En la recombinación homóloga el sitio de intercambio entre cadenas complementarias puede ocurrir en cualquier parte de la secuencia de nucleótidos entre las dos moléculas de ADN participantes. Además, ninguna parte de la secuencia de nucleótidos es alterada durante la reacción, ya que el corte y unión de las moléculas es tan precisa que ni un solo nucleótido es ganado o perdido al final de la reacción. Esta precisión es fundamental para preservar el contenido informacional de la molécula. Sin embargo, la unión heteroduplex puede tolerar un pequeño número de bases mal apareadas, e incluso dos moléculas de ADN que se encuentren en la unión pueden no ser exactamente iguales en cada lado de la misma.

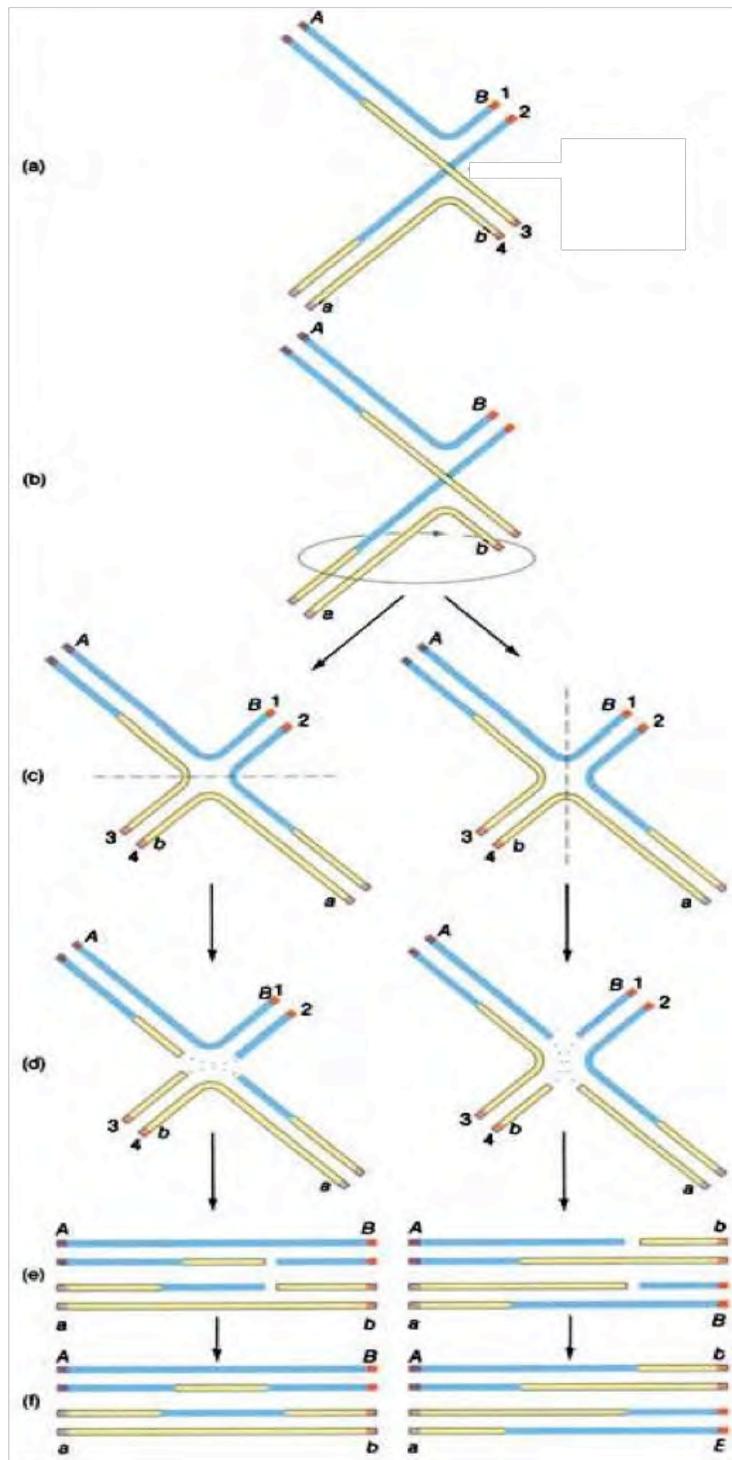


Figura 2. Esquema de la resolución de un heteroduplex. La unión heteroduplex forma una estructura Xi, ésta es reconocida por un grupo de enzimas que cortan y ligan las cadenas para resolver la estructura. Dependiendo de la orientación del corte se produce un entrecruzamiento (derecha) o no (izquierda). Modificado de Suzuki y otros 1985.

El mecanismo de la recombinación homóloga asegura que dos dobles hélices de ADN sufran un intercambio de información sólo cuando contienen regiones que evidencian homología. La extensión que deben tener estas regiones para que la recombinación ocurra exitosamente es variable. Algunos autores reportan eventos de recombinación en regiones de homología de una extensión no mayor a diez pares de bases, mientras que algunos otros reportan una extensión óptima de por lo menos cincuenta pares de bases (Alberts et al. 2007, Haber y Paques 1999, Suzuki et al. 1985). Lo que es un hecho es que entre más extensa sea la región homóloga hay más probabilidades de que la recombinación ocurra exitosamente. Estas probabilidades se reflejan sólidamente en las frecuencias de recombinación reportadas, en donde regiones homólogas cortas arrojan frecuencias bajas de recombinación, y regiones homólogas extensas arrojan frecuencias mucho más altas.

La extensión y composición relativa de la región homóloga es muy relevante pues gracias a ella es que se puede dar la formación de una unión heteroduplex, cuyo fundamento es la complementariedad entre una cadena de una doble hélice y la cadena complementaria de la segunda molécula en cuestión. Cabe mencionar que esta unión y la estructura que forma sirven como anclaje para muchas de las proteínas involucradas en la recombinación, de ahí su relevancia, pues una vez que se forma este complejo es casi un hecho que la recombinación sucederá exitosamente.

Recombinación homóloga en levadura

Todos los organismos cuentan con estrategias para reparar el daño que es causado al ADN que poseen y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no es la excepción. Este organismo se apoya en diversos mecanismos de reparación así como en la recombinación para hacer frente a los daños que sufre cotidianamente el ADN. La levadura utiliza ambos tipos de recombinación, sin embargo, la recombinación homóloga es predominante en términos de frecuencia y cabe resaltar que cada tipo de recombinación es utilizado en diferentes circunstancias, dependiendo de la fase del ciclo celular en el que se encuentre la levadura, así como del tipo y cantidad de daño que haya sufrido el ADN.

La recombinación homóloga en levadura está presente prácticamente durante todo el ciclo celular correspondiente a la mitosis, ya que durante todo este tiempo la levadura utiliza este mecanismo para corregir daños en el ADN. La levadura incluso puede retrasar el ciclo celular o detenerlo en la fase G2 si logra detectar alguna molécula de ADN que tenga una doble ruptura, otorgando así un poco más de tiempo a los mecanismos de reparación, para que puedan restaurar la integridad de la célula antes de continuar su crecimiento y división.(Haber James E, 1999)

En cuanto a la meiosis, se sabe que la recombinación homóloga sucede durante la profase de la meiosis I, afectando todo el genoma y generando una gran cantidad de entrecruzamiento. La recombinación meiótica difiere de la mitótica en varios aspectos. Durante la meiosis, la recombinación sucede en el contexto de una estructura proteica llamada complejo sinaptonémico, además está asociada a la creación de un vínculo físico entre cromosomas homólogos, comúnmente denominado quiasma, que favorece la segregación adecuada de los mismos. Por otra parte hay una diferencia considerable entre las proteínas que participan en la recombinación homóloga mitótica y las proteínas que participan en la recombinación meiótica, ya que aunque ambas comparten algunas de las moléculas involucradas, hay ciertas proteínas que son específicas.

Hasta la fecha se conocen algunas de las proteínas involucradas en ambos procesos, así como su función. En la recombinación mitótica participan dos familias de proteínas agrupadas por su función bioquímica. En la primera de ellas se encuentran las proteínas Rad51p, Rad52p, Rad54p, Rad55p, y Rad57p que participan en la reacción de transferencia de cadenas, en la segunda se encuentran Mre11p, Rad50p, y Xrs2p que tienen actividad de nucleasas.(Haber James E, 1999)

Existen varios mecanismos por los cuales una ruptura de doble cadena puede ser reparada en una levadura con un ciclo replicativo mitótico:

a) Conversión génica - Se puede definir como la transferencia no recíproca de información genética de una molécula a su homóloga. Esto generalmente sucede entre alelos pero también puede suceder entre secciones más extensas de un cromosoma. Este mecanismo está asociado frecuentemente a

eventos de entrecruzamiento tanto en mitosis como en meiosis y sucede siguiendo el mecanismo general de recombinación homóloga.

b) Replicación inducida por corte - Este tipo de recombinación se caracteriza por la participación de regiones extensas de ADN, generalmente de varias decenas de kilobases, en el proceso de recombinación. Los mecanismos propuestos incluyen la invasión de una cadena sencilla en la molécula homóloga, ésta funciona como primer para la síntesis de ADN y puede extenderse por varias decenas de kilobases para posteriormente ser utilizada como templado para la síntesis de su propia cadena complementaria. (Fig. 3)

c) Alineación de cadena sencilla - Cuando un corte de doble cadena está flanqueado por dos regiones homólogas, la actividad de las exonucleasas permite que los segmentos de cadena sencilla homólogos entre sí se alineen de nuevo, y que después del corte de los fragmentos sobrantes así como del religado de las hélices, se restablezca la continuidad de la molécula. (Fig. 4)

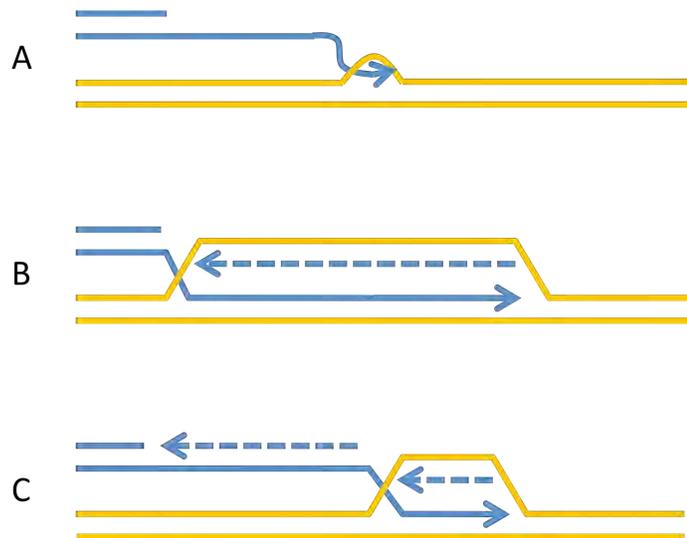


Figura 3. Tres propuestas de cómo puede suceder la replicación inducida por corte. En este tipo de recombinación participan regiones muy extensas de ADN. Una cadena sencilla invade a una doble hélice y una vez extendida ésta sirve de templado para la síntesis de nuevo ADN. Cada inciso sugiere una sutil diferencia en la forma en que se mueve la horquilla de replicación y en el momento en el que se da la síntesis de la cadena secundaria. Modificada de Haber y Paques 1999.

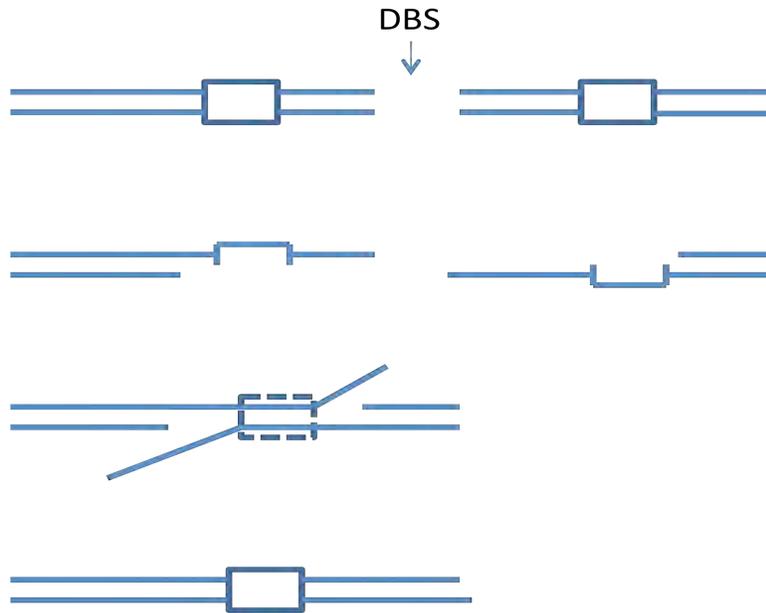


Figura 4. Recombinación homóloga por el mecanismo de alineación de cadena sencilla. DBS: Ruptura de una doble cadena por sus siglas en inglés. Un par de regiones homólogas flanqueando un corte de doble cadena pueden alinearse y servir como molde para restaurar la continuidad de la molécula de ADN. Modificada de Haber y Paques 1999. DBS: Ruptura de la cadena doble.

Barajeo de secuencias

En los últimos 15 años, la idea de imitar el concepto de selección natural darwiniana, utilizando protocolos experimentales en un laboratorio con el propósito de mejorar e inclusive crear funciones novedosas y complejas en estructuras proteicas, ha abierto las puertas a un territorio nuevo e inexplorado. Como resultado de este nuevo enfoque se desarrolló la evolución *in vitro*, la cual consiste en la generación de diversidad de manera artificial acoplada con poderosas técnicas de selección. Esta nueva técnica representa un atajo en la modificación y creación de nuevas enzimas, sin embargo, el proceso se ve limitado por diferentes factores, como la necesidad de idear técnicas de selección masiva aun más eficientes, o por el hecho de que la generación de diversidad esta intrínsecamente limitada por la naturaleza del código genético. El potencial de ésta técnica ha logrado captar el interés de una gran cantidad de investigadores, los cuales han logrado

implementar aproximaciones semi-rationales, así como métodos computacionales con los propósitos de diseñar proteínas de nueva generación, y también de aumentar la efectividad del proceso. Sin embargo nos tenemos que enfrentar al hecho de que la evolución natural es un proceso de ingeniería sumamente sofisticado y cuya eficacia está muy lejos de nuestro alcance actual. (Alcalde et al. 2008, Arnold et al. 2003)

Existen básicamente dos formas de generar diversidad, el acercamiento asexual mediante síntesis mutagénica *in vitro* y el acercamiento sexual mediante la recombinación del ADN *in vivo*. El primero de ellos se ve seriamente limitado por el hecho de que las polimerasas utilizadas para este propósito tienen un espectro mutagénico reducido y predecible, el cual responde a la naturaleza intrínseca de la misma polimerasa. El segundo de ellos solo puede ser limitado por la capacidad recombinante del organismo en el cual se pretenda generar dicha diversidad. (Alcalde Miguel, 2008)

El barajeo o “shuffling” es una técnica que permite la generación de variabilidad para la exploración de un espacio de secuencia determinado. El propósito de esta técnica es crear vastas bibliotecas con un gran número de variantes de una o varias secuencias combinadas que permitan alcanzar el objetivo de la evolución *in vitro* en la creación o modificación acelerada y dirigida de una proteína. Esto se logra generalmente mediante la introducción de mutaciones a un gen particular o mediante el intercambio de fragmentos entre diferentes secuencias elegidas. (Cusano et al. 2009)

La técnica puede ser llevada a cabo siguiendo diferentes protocolos y es tan flexible que se puede profundizar en ella en distintos niveles. Además, puede ser explotada a discreción del investigador, de manera que es posible definir de antemano el tamaño de la biblioteca, así como el grado de variabilidad de la misma. (Pompon y Alan 1989)

Existen dos tipos generales de barajeo que se clasifican según el sistema que se utilice para llevarlos a cabo:

a) *In vitro*: En este método se siguen generalmente dos pasos. El primero consiste en la mutagénesis de un gen mediante el uso de polimerasas con un bajo nivel de fidelidad y en la selección de genes mutantes específicos. El segundo consiste en la fragmentación de dichos genes con el uso de DNAsas y la subsecuente recombinación *in vitro* mediante el

uso de la reacción de amplificación en cadena. De esta forma se puede seleccionar algún recombinante que tenga las características buscadas. (Braman, 2002)

b) *In vivo*: Este método toma ventaja de la maquinaria de los sistemas vivos para llevar a cabo la recombinación entre secuencias similares. Este tipo de barajeo utiliza la capacidad de la recombinación *in vivo* para generar variabilidad de modo que el paso de mutagénesis de la secuencia a explorar previo a la recombinación resulta opcional. Se pueden utilizar diferentes tipos de organismos para llevar a cabo la recombinación, aunque por lo general se utilizan levaduras debido a la flexibilidad y eficiencia con la que llevan a cabo este proceso, también es posible utilizar bacterias, o incluso seres vivos multicelulares.

El barajeo *in vivo* se caracteriza por explotar los mecanismos utilizados por seres vivos para llevar a cabo la recombinación, tanto homóloga como no homóloga, para reparar el daño causado al ADN. Gracias al conocimiento que se tiene de este fenómeno biológico, es posible aislar o diseñar diversas moléculas de ADN que puedan recombinar entre sí, e introducirlas en la célula para aprovechar la extraordinaria maquinaria que ésta posee y así obtener un gran número de combinaciones de las secuencias. (Wittrup Dane, 2004)

Dada la naturaleza exógena del ADN que se introduce en la célula, es necesario diseñar el mismo en función del ADN blanco con el cual se desea que ocurra la recombinación. Gracias al conocimiento que se tiene de la recombinación homóloga es posible diseñar un gran número de aproximaciones en este punto conceptual de la técnica.

El ADN blanco con el cual ocurrirá la recombinación puede estar codificado en los cromosomas del organismo huésped o puede estar codificado en un plásmido del mismo. Las ventajas de seleccionar un plásmido como ADN blanco resaltan inmediatamente ya que facilita en gran proporción tanto la recuperación de las secuencias obtenidas como el método de selección de clonas, además de que evita una posible pérdida de viabilidad del organismo si la recombinación llegara a desactivar algún gen esencial para el desarrollo del mismo.

En segunda instancia es necesario decidir cómo se pretende que se lleve a cabo la recombinación entre nuestro material genético exógeno y el plásmido, así como determinar si se pretende que la secuencia a introducir recombine directamente con el plásmido en el

sitio de inserción, lo cual es poco común, o si se pretende que recombine con el plásmido a través de uno o más adaptadores, los cuales están compuestos de secuencias adicionales homólogas al plásmido que se unen en uno o ambos extremos de las secuencias que se pretenden recombinar.

Es necesario entonces introducir en nuestro organismo huésped la secuencia o las secuencias que se pretenda recombinar junto con el plásmido de selección en su forma lineal, de esta manera la célula percibe dicha linearidad como una ruptura de doble cadena y utiliza las secuencias recombinables para reparar el daño, promoviendo así la recombinación entre ellas y el plásmido. El resultado es un plásmido circular que se mantiene de forma estable en la célula y le confiere una característica determinada a la clona, por ejemplo, la capacidad para crecer en un medio carente de uno o varios aminoácidos e incluso resistencia a algún antibiótico facilitando la selección de las clonas.

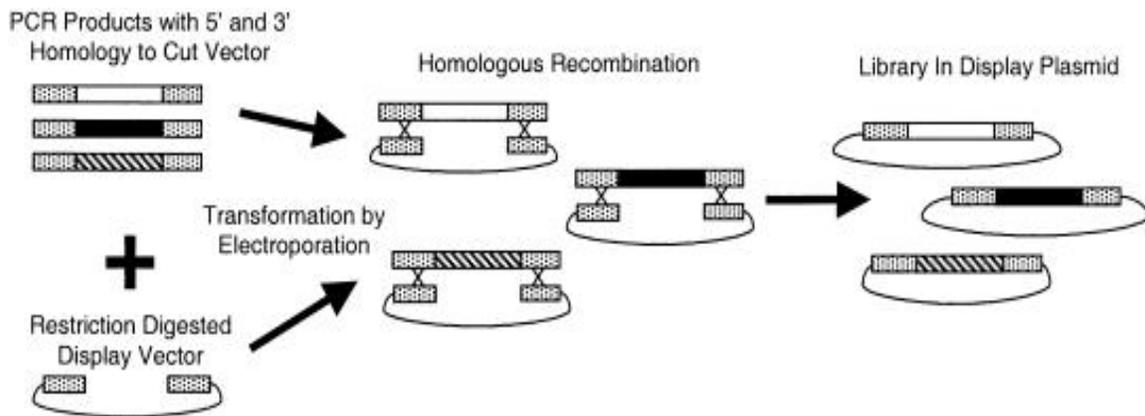


Figura 5. Representación grafica del concepto general con el cual se trabaja el barajeo *in vivo*. Los adaptadores unidos a la secuencia elegida resultan de gran utilidad para generar un plásmido circular y así es posible generar una biblioteca bien representada de las diferentes secuencias introducidas. Tomada de Wittrup y otros 2004.

Los adaptadores unidos a la secuencia elegida resultan de gran utilidad para el proceso de barajeo. Gracias a estos adaptadores la secuencia elegida puede recombinar con el vector, dando como resultado un plásmido circular que es capaz de estabilizarse en la

célula como un replicón independiente (Figura 5). Esta aproximación permite obtener una biblioteca bien representada de las diferentes secuencias introducidas, sin embargo, cabe resaltar que la recombinación entre las secuencias elegidas no es obligatoria para que éstos permitan al vector recuperar su conformación circular. Es por esto último que existen otras alternativas donde cada secuencia elegida tiene sólo un adaptador homólogo al vector en alguno de sus extremos (Figura 6 A y B). Esta aproximación tiene el propósito de forzar la recombinación entre las secuencias escogidas antes de que se lleve a cabo la recombinación entre éstas y el vector linealizado, obteniéndose el máximo provecho de la maquinaria de recombinación del organismo huésped y un mayor número de clonas recombinantes positivas.

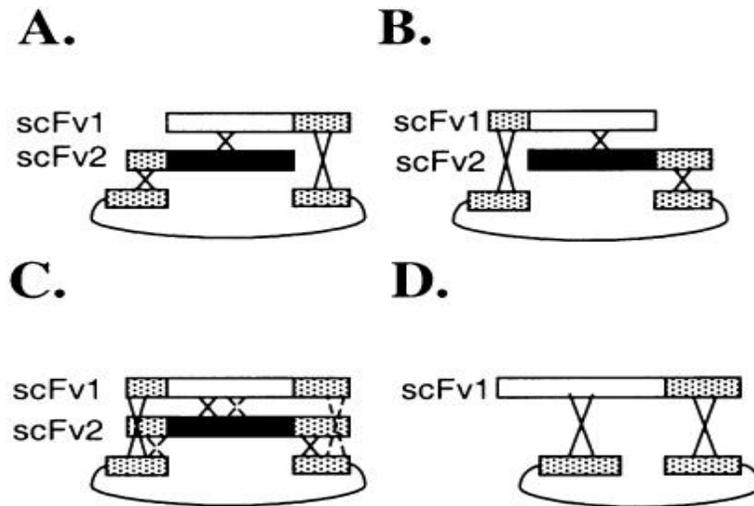


Figura 6. Algunas de las variantes derivadas de la aproximación general del barajeo *in vivo*. A y B: Al unir un solo adaptador a cada secuencia que se pretenda recombinar se vuelve obligatoria la recombinación entre éstas para poder generar un plásmido circular. Tomada de Wittrup y otros 2004.

Antecedentes

La búsqueda de proteínas con actividades novedosas que presenten características específicas ha sido siempre de gran interés biotecnológico por lo que se han desarrollado diferentes proyectos para su expresión heteróloga. En esta búsqueda, De Necochea desarrolló un proyecto donde se intentó expresar de forma heteróloga la Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* en el hongo *Aspergillus nidulans* (De Necochea, 2007). Paralelamente, se utilizó la secuencia de aminoácidos de esta proteína para buscar en las base de datos del NCBI algunas otras secuencias que fueran, si no homólogas, por lo menos muy parecidas; y se intentó también la expresión heteróloga de las secuencias obtenidas en el hongo *Aspergillus nidulans*. Esto con el propósito de explorar en las secuencias obtenidas una posible actividad similar a la de la Cloroperoxidasa. Para obtener las secuencias se hizo uso de la herramienta BLAST (Altschul S F, 1997) disponible gratuitamente en la red, utilizando como molde la secuencia del péptido maduro de la Cloroperoxidasa y buscando secuencias similares que por lo menos tuvieran pequeños segmentos con alta identidad entre ellas.(Tabla 1)

Al analizar estas secuencias se encontró que la similitud de todas éstas con la de la Cloroperoxidasa estaba restringida a zonas de gran importancia para la actividad de la enzima, en concreto, el índice de similitud aumenta muchísimo en las zonas que codifican para los residuos catalíticos, así como en las zonas que codifican para los residuos que se encargan de estructurar el sitio activo de la proteína. Sin embargo, la similitud total entre las proteínas era baja, debido a que había una gran disparidad entre los aminoácidos de las regiones que no estaban directamente relacionadas con el sitio activo y que, como es lógico suponer, constituyen la mayoría de la secuencia (Tabla 2). Este hecho, una ligera diferencia en la longitud de las secuencias provocó que el alineamiento de las mismas se complicara hasta llegar al punto en el que fue necesario incluir otra característica de las secuencias en su alineamiento. La característica que se eligió fue la estructura secundaria predicha mediante el método SOPMA (Geourjon C, 1995), de manera que se realizó la predicción de la estructura secundaria de cada una de las secuencias y posteriormente esta información se comparó con la estructura tridimensional de la Cloroperoxidasa (Figura 7), permitiendo así,

obtener más datos que resultaron ser de gran utilidad para poder realizar el alineamiento.(De Necochea, 2007)

Tabla 1. Secuencias identificadas mediante BLAST con una similitud importante a la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Se incluyen los números de identificación (gi) de la base de datos Genebank (NCBI)

| Organismo | Secuencia | Gi | Autores |
|--------------------------------|-----------|----------|---------------------|
| <i>Magnaporthe grisea</i> | MG07 | 38107074 | No publicado |
| <i>Neurospora crassa</i> | CAD7 | 28950378 | No publicado |
| <i>Phytophthora infenstans</i> | MY25 | 23394456 | Torto et al. 2003 |
| <i>Phytophthora infenstans</i> | MY19 | 23394446 | Torto et al. 2003 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | BAE6 | 83771273 | Machida et al. 2005 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | EAQ8 | 88178817 | No publicado |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | StcC | 2498968 | Brown et al. 1996 |

Al analizar el alineamiento realizado se pudo observar una gran similitud entre las regiones críticas de la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y las regiones equivalentes en las secuencias obtenidas.

Al cotejar el alineamiento con la estructura tridimensional de la Cloroperoxidasa se pudieron definir 3 regiones críticas involucradas en la conformación del sitio activo de la proteína las cuales determinan su actividad (Tabla 3). Estas regiones son: 1) El área de

ligando proximal donde se encuentra una cisteína que coordina al átomo de hierro del grupo hemo; 2) La zona de interacción con los propionatos del grupo hemo; y 3) El residuo catalítico, un ácido glutámico, que es posicionado por una histidina.

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y otras enzimas identificadas con una alta similitud en las áreas importantes para el sitio activo.

| Enzima | Identidad global con CPO | Identidad entre sitios activos |
|--------|--------------------------|--------------------------------|
| StcC | 27% | 65% |
| MY19 | 23% | 65% |
| MY25 | 28% | 75% |

Tabla 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos en las regiones importantes para el sitio activo para algunas de las secuencias obtenidas.

| Enzima | 1) Ligando Proximal (Cys29) | 2) Interacción con propionatos (Glu104 a Ser110) | 3) Residuo Catalítico (Glu183) |
|--------|-----------------------------|--|--------------------------------|
| CPO | R A P C P A L N A L A N | E H D H S F S | E |
| StcC | R C G C P A M N S L A N | E H D A S L T | E |
| My19 | R S P C P A L N V L A N | D H D A S L V | Q |
| My25 | R S P C P G L N A L A N | E H D A S L V | E |

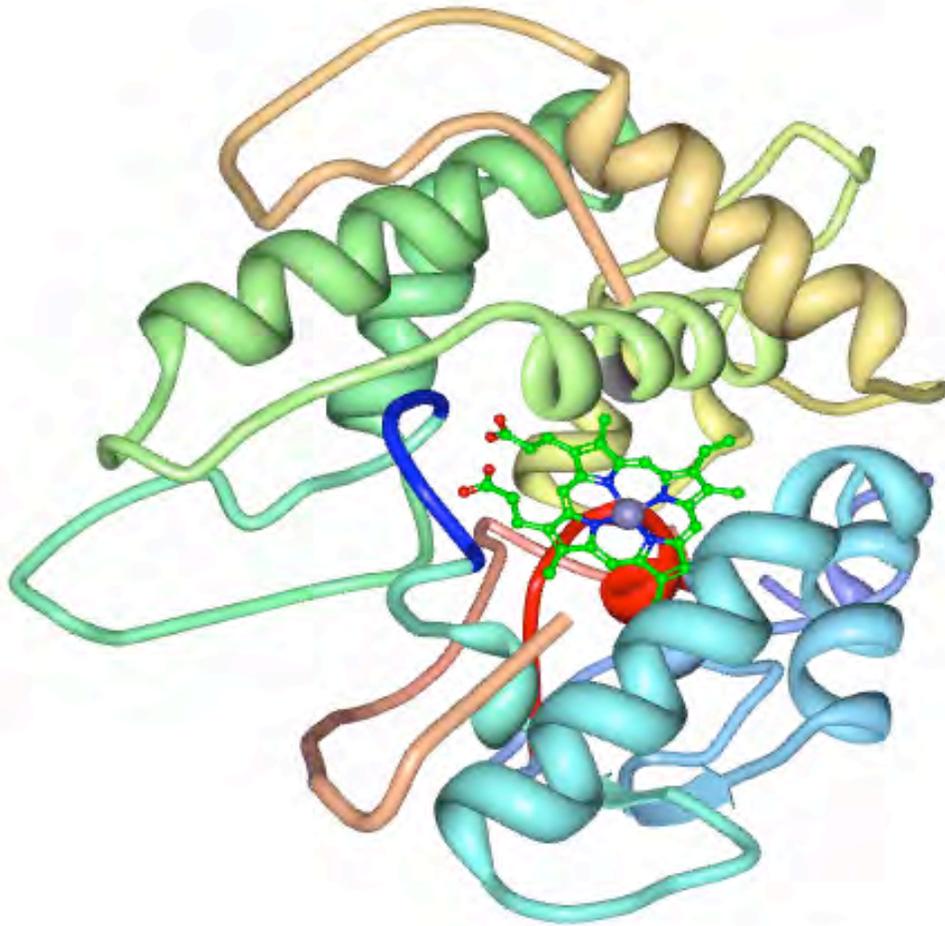


Figura 7. Estructura tridimensional de la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. La región del ligando proximal se encuentra en color rojo, la región que interactúa con los propionatos se encuentra en color azul fuerte y el residuo catalítico se encuentra en color gris. PDB: 2J5M, Visualizador: Jmol.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el sistema de recombinación *in vivo* basado en la técnica de “shuffling” se eligieron un total de 3 genes potenciales de peroxidases. Estas se seleccionaron, en última instancia, al corroborar la secuencia de las mismas utilizando como materia prima los plásmidos de expresión generados por De Necochea en 2007. El organismo seleccionado

para llevar a cabo la recombinación fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo ha sido estudiado a través de los años y ha servido como modelo de estudio para muchos y muy variados procesos biológicos, por lo que se ha generado una gran cantidad de información acerca del mismo, en especial, se ha utilizado como modelo para estudiar los diferentes mecanismos de la recombinación gracias a que posee una maquinaria de recombinación muy eficiente y por ende una gran capacidad recombinatoria. Por otra parte, el genoma de este organismo ya ha sido secuenciado, con lo cual podemos constatar que carece de peroxidases, característica de gran utilidad pues evita la interferencia de proteínas endógenas al momento del escrutinio. Por último, este organismo unicelular tiene un ciclo de vida corto y su manipulación en el laboratorio es sencilla, lo cual lo hace una excelente opción para llevar a cabo este sistema de recombinación *in vivo*.

En general, el protocolo empleado en este trabajo podría considerarse una modificación del utilizado por Wittrup et al. en 2004. Se decidió utilizar un par de adaptadores con una longitud de 50 pares de bases cada uno, siendo estos completamente homólogos al vector de expresión en ambos extremos del sitio de inserción del mismo. La secuencia de cada uno de los adaptadores se diseñó para flanquear uno de los extremos de las secuencias elegidas. Se decidió también utilizar dos versiones de cada uno de los genes potenciales de peroxidases: la primera contaba con su propio péptido líder, la segunda constituía al gen potencial de peroxidasa sin su péptido líder. Se generaron tres construcciones de cada una de las versiones de las diferentes secuencias: la primera tenía ambos adaptadores unidos a cada extremo de los genes de peroxidases potenciales, la segunda solo tenía unido un adaptador en uno de los extremos de la secuencia y la última tenía unido un adaptador en el extremo opuesto de la secuencia. De esta forma se generaron un total de dieciocho construcciones para el “shuffling”.

El plásmido de expresión para levaduras fue el PYEX-S1. Las características relevantes por las cuales se eligió este plásmido son las siguientes: tiene un origen de replicación para bacterias así como un origen de replicación para levadura, también posee un gen de resistencia a ampicilina, el gen URA3 y LEU-2D que permite el crecimiento de las levaduras en un medio carente de uracilo y/o leucina para una fácil selección y además posee una secuencia líder justo antes del sitio de inserción, en el sitio de corte único Sac1,

que promueve que el polipéptido generado por el gen potencial se dirija hacia la vía de secreción de la levadura.

HIPOTESIS

El montaje de un sistema de recombinación *in vivo* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permitirá la identificación de la actividad enzimática de los genes potenciales de peroxidasa así como de las quimeras resultantes de su recombinación.

OBJETIVO GENERAL

Detectar y seleccionar actividad enzimática de peroxidasa a partir del barajeo de secuencias homólogas distantes de la Cloroperoxidasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar los oligonucleótidos para la secuenciación, amplificación y síntesis de construcciones recombinantes para cada uno de los genes potenciales de peroxidasa con y sin péptido señal.
2. Diseñar los oligonucleótidos para la síntesis de los adaptadores.
3. Generar las diferentes construcciones recombinantes para ser usadas en el barajeo de secuencias.
4. Evaluar diferentes métodos de transformación de *S. cerevisiae*.
5. Identificar y cuantificar las clonas recombinantes.
6. Analizar las clonas resultantes y evaluar su actividad enzimática.

MATERIAL Y METODOS.

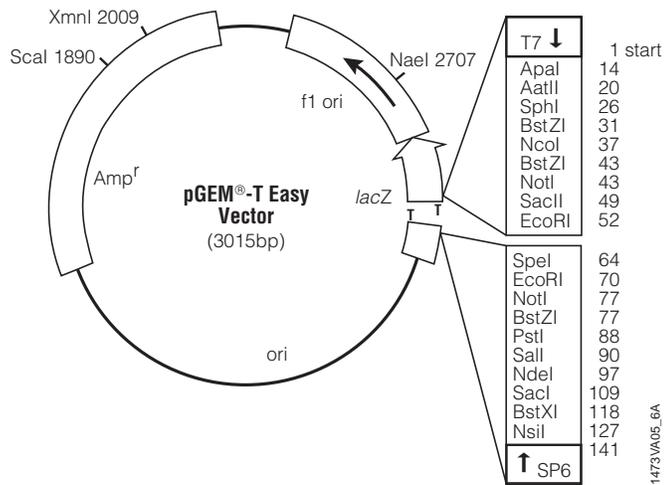
Cepas y Plasmidos

La cepa bacteriana utilizada para la electroporación de plásmidos fue la de *Escherichia coli* DH5 α (ϕ 80dlacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*).

La cepa de levadura utilizada para la transformación de plásmidos y para el análisis de actividad fue la de *Saccharomyces cerevisiae* W3031A (*MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1*).

El plásmido en el cual se clonaron las construcciones recombinantes para su preservación en bacteria fue el pGEM-T Vector de la marca Promega (Figura 8).

El plásmido para clonar y expresar en levadura, y sobre el cual se diseñaron los adaptadores para el barejeo fue el pYEX-S1 de la marca Clonetech (Figura 9).



pGEM[®]-T Easy Vector sequence reference points:

| | |
|--|--------------------|
| T7 RNA polymerase transcription initiation site | 1 |
| multiple cloning region | 10-128 |
| SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3) | 139-158 |
| SP6 RNA polymerase transcription initiation site | 141 |
| pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site | 176-197 |
| <i>lacZ</i> start codon | 180 |
| <i>lac</i> operator | 200-216 |
| β-lactamase coding region | 1337-2197 |
| phage f1 region | 2380-2835 |
| <i>lac</i> operon sequences | 2836-2996, 166-395 |
| pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site | 2949-2972 |
| T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3) | 2999-3 |

Figura 8. Mapa del Plásmido pGEM-T Vector proporcionado por el fabricante. Este mapa muestra los puntos de referencia más importantes del vector así como el sitio de inserción de la secuencia de ADN blanco.

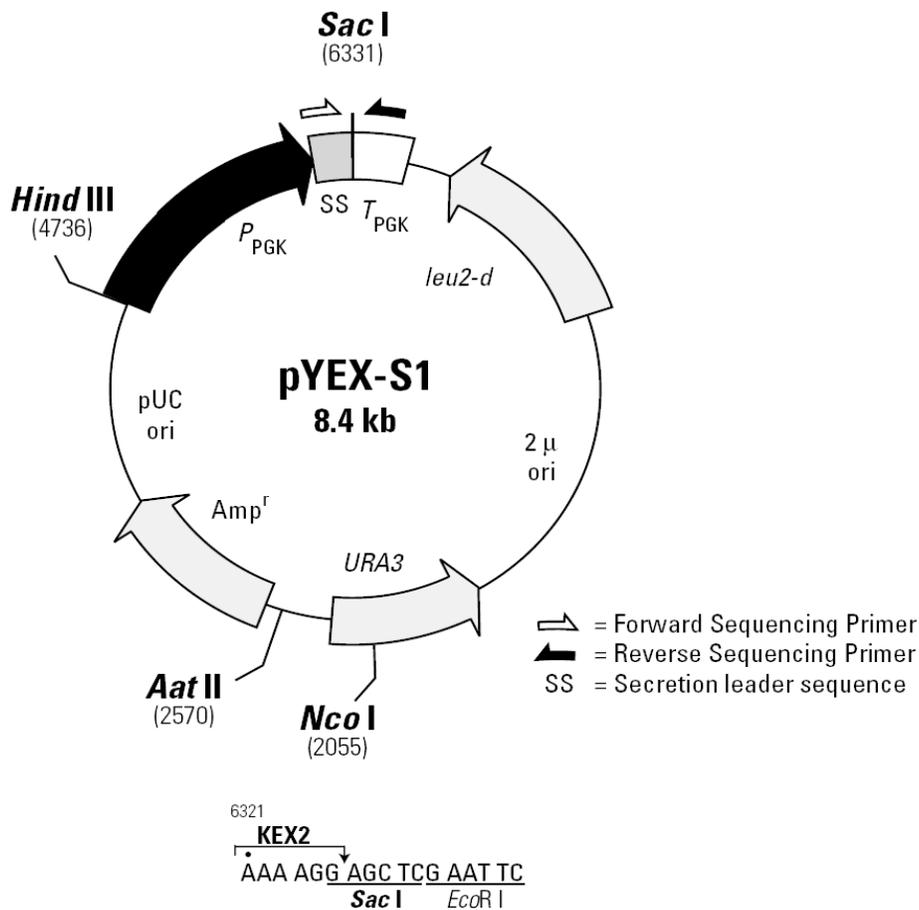


Figura 9. Mapa del plásmido PYEX-S1 proporcionado por el fabricante. El mapa muestra los diferentes sitios de corte únicos del mismo, los componentes para los cuales codifica, el sitio de inserción de la secuencia blanco y la fase de la secuencia del péptido líder que precede a este sitio de inserción.

Medios de Cultivo y Soluciones de antibioticos y aminoácidos

Medio LB líquido: Mezclar 5g de extracto de levadura, 10g de triptona y 10g de cloruro de sodio en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Medio LB sólido: Mezclar 5g de extracto de levadura, 10g de triptona, 10g de cloruro de sodio y 15g de agar en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a

121°C durante 30 minutos. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4°C.

Medio LB-Ampicilina líquido: Mezclar 5g de extracto de levadura, 10g de triptona, y 10g de cloruro de sodio en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos, una vez frío agregar 1µl del stock de ampicilina 200mg/ml por cada 1ml de medio.

Medio LB-Ampicilina sólido: Mezclar 5g de extracto de levadura, 10g de triptona, 10g de cloruro de sodio y 15g de agar en 1000ml de agua destilada, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos, esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50°C (cuando se pueda tomar con la mano soportablemente) y agregar 1µl del stock de ampicilina 200mg/ml por cada 1ml de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4°C.

Medio LB IPTG X-Gal sólido: Mezclar 5g de extracto de levadura, 10g de triptona, 10g de cloruro de sodio y 15g de agar en 1000ml de agua destilada, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos, esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50°C (cuando se pueda tomar con la mano soportablemente) y agregar 1µl del stock de ampicilina 200mg/ml por cada 1ml de medio, 350µl de IPTG por cada 250mL de medio y 750µl del stock de X-Gal por cada 250mL de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4°C.

Medio YPD líquido: Mezclar 10g de extracto de levadura, 20g de peptona y 20g de dextrosa en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Medio YPD sólido: : Mezclar 10g de extracto de levadura, 20g de peptona, 20g de dextrosa y 20g de agar en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4°C.

Medio SD sólido: Mezclar 0.67g de YNB, 2g de dextrosa y 2g de agar en 100ml de agua destilada. Esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos. Esperar a que el medio alcance una temperatura de entre 40 y 50°C (cuando se pueda tomar con la mano

soportablemente) y agregar 1ml de aminoácido por cada 100ml de medio. Repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar la solidificación y almacenar las cajas a 4°C.

Ampicilina 200mg/ml: Diluir ampicilina sólida en agua Milli-Q estéril, se esteriliza por filtración mediante un filtro con tamaño de poro de 0,2 µm y se almacena a -20°C en volúmenes pequeños.

IPTG 1M: Disolver 238mg de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside en 1ml de agua destilada esteril y se almacenar a -20°C.

X-Gal 20 mg/ml: Pesar 20mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosido (X-Gal) por cada ml de N,N'-dimetil-formamida, disolver y se almacenar a -20°C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

Adenina 40mg/l (100X): Pesar 200mg de hemisulfato de adenina, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos y aforar a 50ml agregando agua estéril.

Histidina 20mg/l (100X): 100mg de L- Histidina, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos y aforar a 50ml agregando agua estéril.

Triptófano 20mg/l (100X): Pesar 100mg de L- Triptófano, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos y aforar a 50ml agregando agua estéril.

Leucina 90mg/l (100X): Pesar 450mg de L- Leucina, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos y aforar a 50ml agregando agua estéril.

Uracilo 20mg/l (100X): Pesar 100mg de uracilo, disolver en 30ml de agua, esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos y aforar a 50ml agregando agua estéril.

Amortiguadores y Reactivos

Buffer TAE 50X (Tris-acetato-EDTA): Mezclar 242g de Tris Base, 57.1ml de ácido acético glacial y 100ml de EDTA 0.5M pH8 (ácido etilenediaminetetraacético), posteriormente aforar esta mezcla a 1L con agua destilada y esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Buffer Tris:EDTA 10:1 pH8 (10mM Tris Base, 1mM EDTA): Mezclar 1.21g de Tris Base y 0.37g de EDTA en 1L de agua destilada.

Buffer TBE 5X (Tris/Borato/EDTA): Mezclar 53g de Tris Base, 27.5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0.5M a pH8 en 1L de agua destilada.

APS 10% (Persulfato de Amonio): Mezclar 10g de Persulfato de amonio por cada 100ml de agua destilada y mezclar.

TEMED 0.1% v/v (Tetrametilendiamida): Mezclar 0.1ml de TEMED en 100ml de agua.

Sorbitol 1M: Pesar 18.2g de D-Sorbitol, disolver en 100ml de agua y esterilizar en una autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Reacciones de amplificación

Para las reacciones de amplificación en cadena (PCR) se utilizó un termociclador convencional de tapa caliente y se utilizó la TaqDNA polimerasa de Altaenzymes (Alberta, Ca.) a 5U/μl. La mezcla de reacción que se utilizó fue: 10μl de buffer de TaqDNA Polimerasa concentrado 10 veces, 5.6μl de MgCl₂ 50mM, 8μl de dNTPs 2.5mM c/u, 5μl de Oligo Fwd y 5μl de Oligo Rvs cada uno a una concentración de 10pmolas/μl, 8μl de BSA 10mg/ml, 5μl de ADN como templado, 51.4μl de Agua tetradestilada y 2μl de TaqDNA Polimerasa. Esta mezcla puede adaptarse a cualquier volumen final conservando la proporción de los reactivos enlistados. El programa de ciclado que se utilizó para amplificar productos de alrededor de 1000 pares de bases fue: 5 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de amplificación 55 seg a 95° C, 55 seg a 55° C, 55 seg a 72°C, seguido de 10 min a

72°C.. El programa de ciclado para amplificar productos de alrededor de 50 pares de bases fue: 5 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de amplificación 35 seg a 95° C, 35 seg a 55° C, 35 seg a 72°C, seguido de 10 min a 72°C.

Síntesis lineal de ADN

Para la síntesis lineal se utilizo la enzima Klenow de New England Biolabs a una concentración de 5000U/ml. El volumen total de la reacción fue de 50µl y contenía los siguientes reactivos: 22µl de oligonucleotido crudo Fwd (PYEX R1), 22µl de oligonucleotido crudo Rvs (PYEX R2), 5µl de buffer para la enzima Klenow concentrado 10 veces y 0.5µl de la polimerasa Klenow.

El procedimiento fue el siguiente:

- 1.- Calentar la mezcla sin Klenow a 95°C por 5 minutos.
- 2.- Enfriar a 37°C lentamente, en una rampa de aproximadamente 10 minutos.
- 3.- Añadir 0.5µl de enzima Klenow (New England Biolabs 5000U/ml).
- 4.- Incubar 15 minutos a 37°C.
- 5.- Purificar directo de la mezcla con ayuda del Kit de Purificación de ADN Qiagen Gel Extraction Kit (50).

Electroforesis de ADN en geles de Agarosa y Acrilamida

Para visualizar fragmentos de ADN de >200 pares de bases se utilizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio, este tipo de gel se corrió a 110 volts durante 20 minutos, voltaje constante. Para visualizar fragmentos de <200 pares de bases se utilizaron geles de poliacrilamida al 20% en buffer TBE teñidos en bromuro de etidio, este tipo de gel se corre a 24 miliamperes, corriente constante, durante 2 o 3 horas aproximadamente o hasta que la muestra alcance el lado opuesto del gel.

El gel de agarosa se preparó pesando 1 gramo de agarosa y disolviéndolo en 100ml de buffer TAE con ayuda de un microondas hasta alcanzar una mezcla homogénea.

El gel de poliacrilamida al 20% se preparó mezclando 10ml de acrilamida al 30%, 1.5ml de buffer TBE concentrado 10 veces (10X) y 3.5ml de Agua destilada, a esto se le agrega 0.1ml de APS al 10% y 0.1ml de Temed para iniciar la polimerización.

Purificaciones de productos de PCR

La purificación de los productos obtenidos de las reacciones de amplificación por PCR se realizó utilizando el paquete comercial Qiagen Gel Extraction Kit (50) y siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante.

Cuantificación de ADN en espectrofotómetro

La cuantificación se hizo diluyendo 1000 veces la purificación de ADN en un volumen total de 1ml, posteriormente se mide la absorbencia a una longitud de onda de 260nm y se calcula la concentración de ADN a partir de la siguiente constante $1\text{Abs a } 260\text{nm} = 50\text{ng}/\mu\text{l}$ y multiplicando por el factor de dilución.

Remoción de sales del ADN para la electroporación

- 1.- Agregar 500 μl de butanol a la muestra y mezclar vigorosamente.
- 2.- Centrifugar a 13000rpm durante 5 minutos y remover el liquido sin perturbar la pastilla.
- 3.- Agregar 500 μl de Etanol al 100% y mezclar vigorosamente.
- 4.- Centrifugar a 13000rpm durante 5 minutos y remover el liquido sin perturbar la pastilla.
- 5.- Agregar 500 μl de Etanol al 70% y mezclar vigorosamente.
- 6.- Centrifugar a 13000rpm durante 5 minutos y remover el liquido sin perturbar la pastilla. Esperar a que el etanol residual se evapore.
- 7.- Resuspender en 10 μl de agua estéril.

Preparación de células electrocompetentes DH5 α

1.- Tomar una colonia aislada e inocular 5 ml de medio líquido LB con ácido nalidíxico 25 μ g/ml e incubar toda la noche a 37°C y 250rpm

2.- Tomar el pre-inóculo (5 ml) e inocular 1 L de medio LB-nal 25 μ g/ml.

3.- Incubar el matraz a 37°C y 250rpm hasta que las células lleguen a una D.O. de 0.4 a 0.6 a 600nm.

4.- Pasar las células a contenedores estériles y colocarlas en hielo durante 30 minutos (se puede quedar el matraz en hielo una vez alcanzada la D.O. antes de verter en los contenedores).

5.- Centrifugar a 4°C, 10 minutos a 14 000 rpm.

6.- Colocar las células en hielo y decantar el sobrenadante en condiciones estériles, dejando unos mililitros para resuspender las células suavemente.

7.- Lavar con la mitad del volumen original de glicerol al 10% (Los lavados son en condiciones estériles y mantener las células siempre a 4°C).

8.- Repetir los pasos 6 y 7.

9.- Decantar totalmente y agregar 2 ml de glicerol al 10% en un solo contenedor, disolver completamente y suavemente, pasarlo a un segundo contenedor para resuspender todas las células en los 2ml de glicerol

10.- Tomar alícuotas de 40 μ l del concentrado final y colocarlas en tubos de 500 μ l estériles.

11.- Congelar en hielo seco con acetona (o Etanol) y guardar a -70°C.

Electroporación

Colocar una celda de electroporación de 2 cm en hielo y descongelar las células electrocompetentes DH5 α en hielo. Agregar el ADN transformante a las células, mezclar y transferir a la cubeta de electroporación. Dar un pulso a 1800 Volts 25 Ohms y 125

Faraday. Agregar 1 ml de medio LB líquido. Transferir a un tubo estéril e incubar por una hora a 37°C y 200rpm. Centrifugar por un minuto a 13000rpm, retirar 90% del medio de cultivo y resuspender en el medio de cultivo restante. Plaquear en cajas con el medio de selección adecuado, para nuestro caso cajas de LB sólido con Ampicilina, IPTG y X-Gal.

Ligaciones

Las ligaciones se efectuaron con ligasa T4 (400,000U/ml) de la marca New England Biolabs, en un baño a 16°C durante toda la noche y agregando cantidades equimolares de ADN a ligar, cada uno a una concentración de 20pmol totales. Esto se efectuó en una reacción con un volumen total de 20µl, de manera que, a 17µl de agua tetradestilada se le agregó 1µl de Ligasa T4, 1µl de ADN a 20pmol/µl y 1µl del segundo ADN a ligar.

Digestiones

Las digestiones se efectuaron en un volumen de 50µl por cada µg de ADN a digerir, utilizando el buffer específico para cada enzima suministrado por el fabricante y agregando 5 Unidades de enzima por cada microgramo de ADN aproximadamente. La mezcla se realizó con 5µl de buffer correspondiente a la enzima concentrado 10 veces, 1µl de enzima a una concentración de 5U/µl, 1µg de ADN y agua tetradestilada suficiente para llevar la reacción a 50µl. Las diferentes reacciones con las enzimas BamHI y HindIII se incubaron a 37°C durante un mínimo de 2 horas y un máximo de 12 horas. Posteriormente las digestiones se inactivaron mediante la incubación de la reacción a 80°C durante 20 minutos.

Cromatografía de exclusión molecular

- 1.- Desactivar la digestión a alta temperatura (80°C por 20 minutos).
- 2.- Colocar la columna en un tubo Eppendorff de 1.5ml.
- 3.- Agregar 40mg de Sephadex G-50 a la columna de exclusión.

- 4.- Agregar Buffer TRIS-EDTA 10.1 pH8 hasta llenar la columna.
- 5.- Centrifugar a 2500rpm durante 30 segundos.
- 6.- Repetir pasos 4 y 5 un par de veces más.
- 7.- Transferir la columna equilibrada a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml.
- 8.- Cargar la digestión desactivada en la columna y centrifugar a 2500rpm por 30 segundos.

Transformación de levadura

(I) Protocolo Agatep et al. 1998

- 1.- Inocular la levadura W303 1-A en 5 ml de medio YPD líquido e incubar a 30°C y 200rpm durante todo el día o toda la noche.
- 2.- Determinar la densidad óptica del cultivo a 600nm.
- 3.- Inocular 50ml de medio YPD líquido con aproximadamente 50µl de cultivo e incubar a 30°C y 200rpm monitoreando la densidad óptica hasta que alcance un valor de alrededor 0.6 DO.
- 4.- Centrifugar las células en un tubo falcón estéril de 50ml a 3000Xg por 5 minutos a 15°C y remover el sobrenadante.
- 5.- Resuspender las células en medio volumen original de agua bidestilada estéril para lavar las células y centrifugar de nuevo.
- 6.- Resuspender las células en 0.9ml de agua bidestilada estéril y transferirlas a un tubo eppendorf de 1.5ml.
- 7.- Centrifugar a 13000rpm por un minuto, remover el sobrenadante y resuspender en 1ml de LiAc 100mM. Incubar a 30°C por 10 minutos.

8.- Para cada reacción de transformación, alicuotar 100µl de la suspensión en un nuevo tubo. Remover el sobrenadante y agregar la siguiente mezcla de transformación: 240µl de PEG 3350 al 50%, 36µl de LiAc 1M, 100µg de ss-ADN, 1µg de ADN transformante y suficiente agua tetradestilada para alcanzar un volumen total de 360µl.

9.- Vortexear las células hasta que queden totalmente resuspendidas en la mezcla de transformación.

10.- Incubar la mezcla a 30°C por 30 minutos.

11.- Dar choque térmico a las células en un baño a 42°C por 30 minutos.

12.- Centrifugar las células a velocidad máxima por un minuto y remover la mezcla de transformación por completo.

13.- Resuspender las células en 1ml de agua bidestilada estéril con un pipeteo suave y plaquear las células en el medio SD complementado adecuadamente.

14.- Incubar a 30°C por 2 a 4 días o hasta que las colonias sean visibles.

(II) Protocolo Gietz, Schiestl 2007

1.- Inocular la levadura W303 1-A en 5 ml de medio YPD líquido e incubar a 30°C y 200rpm durante todo el día o toda la noche.

2.- Determinar la densidad óptica del cultivo a 600nm.

3.- Inocular 50ml de medio YPD líquido con aproximadamente 50µl de cultivo e incubar a 30°C y 200rpm monitoreando la densidad óptica hasta que alcance un valor de alrededor 0.6DO.

4.- Preparar la siguiente mezcla de transformación por cada reacción y mantener fría en hielo: 240µl de PEG 3350 al 50%, 36µl de LiAc 1M, 100µg de ss-ADN, 1µg de ADN transformante y suficiente agua tetradestilada para alcanzar un volumen total de 360µl.

5.- Centrifugar las células en un tubo falcón estéril de 50ml a 3000Xg por 5 minutos a 15°C y remover el sobrenadante.

6.- Resuspender las células en un medio del volumen original de agua bidestilada estéril para lavar las células y centrifugar de nuevo.

7.- Retirar el sobrenadante y resuspender en 1.5 ml de agua bidestilada. Transferir las células a un tubo eppendorf de 1.5ml.

8.- Centrifugar a 3000Xg por 5 minutos y retirar el sobrenadante.

9.- Agregar la mezcla de transformación y vortexear hasta lograr una suspensión homogénea.

10.- Incubar a 42°C por 50 minutos. Mezclar el contenido del tubo cada 5 minutos por inversión para asegurar un equilibrio de temperatura rápido.

11.- Centrifugar a 3000Xg por 5 minutos y retirar la mezcla transformante por completo.

12.- Resuspender las células en 1ml de agua bidestilada con un pipeteo suave y plaquear las células en el medio SD complementado adecuadamente.

13.- Incubar a 30°C por 2 a 4 días o hasta que las colonias sean visibles.

(III) Protocolo de Electroporación de Levaduras

1.- Inocular 5ml de medio YPD líquido con la cepa de levadura a transformar e incubar a 30°C y 200rpm toda la noche.

2.- Inocular 0.5ml del pre-inoculo en 50ml de medio fresco YPD e incubar a 30°C y 200rpm.

3.- Monitorear la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600nm. Cuando ésta alcance un valor de entre 1.3 – 1.5, centrifugar a 3000rpm por 5 min y decantar el sobrenadante.

4.- Lavar las células con agua fría en un volumen del medio original y centrifugar a 3000rpm por 5 min.

5.- Lavar las células con agua fría agregando un medio del volumen original, centrifugar con las mismas condiciones y remover el sobrenadante.

6.- Resuspender las células en 4 ml de solución sorbitol 1M fría, centrifugar con las mismas condiciones y remover el sobrenadante.

7.- Resuspender las células en 90 μ l de sorbitol 1M.

8.- Tomar 80 μ l de células, agregar 1- 20 μ g de ADN, mezclar y transferir a una celda de electroporación de 0.2cm.

9.- Incubar la celda que contiene la mezcla en hielo por 5 minutos.

10.- Electroporar a 1500V y 25 ohms por 5mseg e inmediatamente agregar 1ml de sorbitol 1M a temperatura ambiente.

11.-Plaquear las células transformadas en medio SD complementado adecuadamente.

12.- Incubar a 30°C por 2 a 4 días o hasta que las colonias sean visibles.

Obtención de sobrenadante y filtración

Se incubaron las células a 30°C y 200rpm en 100ml de medio YPD durante 5 días, posteriormente se centrifugó 1 ml, a 3000rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se utilizó para un primer ensayo de actividad. La concentración de este sobrenadante se hizo al centrifugar en un Microcon con membrana de 10KDa de poro a 4000rpm durante 20 minutos a 10°C. Posteriormente se utilizaron 50ml del cultivo inicial para su concentración, el sobrenadante obtenido fue centrifugado en un Amicon (50ml) a 4000rpm durante 20 minutos a 10°C, que poseía una membrana con tamaño de poro de 10KDa.

Ensayo de actividad enzimática

El sustrato 3,3'-5,5' Tetrametil bencidina (TMB) se utilizó a una concentración final de 2mM y el peróxido de hidrógeno a una concentración final de 5mM en un volumen

final de 1ml. Se preparó inicialmente un stock de TMB disuelto en agua a 200mM pesando 63mg y agregándolo a 1ml de agua destilada. El peróxido se prepara utilizando un stock inicial a una concentración 11M, éste se diluyó a 500mM en un volumen de 100µl y se preparaba un stock nuevo cada día. Las pruebas con Guayacol y ABTS también se realizaron utilizando estos reactivos a una concentración final de 2mM, junto con una concentración final de 5mM de peróxido en un volumen final de 1ml.

El ensayo cuantitativo de actividad se hizo evaluando el aumento de absorbencia a una longitud de onda de 652nm tomando una lectura inicial al momento de agregar el peróxido (tiempo 0) y otra cada determinando tiempo utilizando intervalos de 10 minutos en un principio y reduciéndolo a 1 minuto en las pruebas finales. La concentración final de TMB y de peróxido de hidrógeno fueron 2mM y 5mM respectivamente. Para todos los ensayos enzimáticos se utilizaron 200µl de cada uno de los sobrenadantes probados.

Oligonucleótidos

Se mandaron sintetizar diferentes oligonucleótidos cuyo propósito era el de recuperar y preparar las diferentes secuencias de genes potenciales de peroxidasas para el “shuffling” en levadura.

Tabla 4. Oligonucleótidos sintetizados.

| Clave | Secuencia (5'->3') |
|---------|---|
| PYEXF1 | TCA AGG TTT GGA GCA TAC TCA TCG AAG AGG CTC CTT A |
| PYEX-F2 | TGG ATC CCG AGC TCC TTT TGA CTA A |

| | |
|---------|--|
| PYEXR1 | CCA AAG AAG CAC CAC CAC CAG TAG AGA CAT GGG AGA TC |
| PYEXR2 | TGG AAG CTT GAG CTC GAA TTC CGA TCT CCC ATG TCT C |
| End-gdp | GGC GGG GTT GAC AAG GTC GTT GCG TC |
| FGCT | TTG GAT CCG AGC CTG GCT CCG GCA TTG |
| FSGCT | TTG GAT CCA TGT TCT CCA AGG TCC TTC CC |
| FGST | TTG GAT CCG AGC TGG ACT TTG AAC AGT GGC |
| FGMY19 | TTG GAT CCC GCA TCC TCG ACC CCA ACA AGC |
| FGMY25 | TTG GAT CCG GAT CGG TCG ACA TAG GGA AG |
| RGCT | TGG AAG CTT CTC GTA GAT GCG CTT AAA GG |
| RGMY19 | TGG AAG CTT CCT ACA TCG CCT CGG CGA CC |
| RGMY25 | TGG AAG CTT CTT AAG CGA ACT TTA GCA GC |
| RGST | TGG AAG CTT CTC AGA AAG ATA GAT GTC TAT |

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de diferentes productos.

| Par de oligonucleótidos | Producto obtenido |
|-------------------------|-------------------|
| PYEXF1 y PYEX-F2 | Adaptador Fwd |
| PYEXR1 y PYEXR2 | Adaptador Rvs |

| | |
|------------------|---|
| End-gdp y RGMY19 | Gen MY19 con su propio péptido líder |
| FGMY19 y RGMY19 | Gen MY19 sin su propio péptido líder |
| End-gdp y RGMY25 | Gen MY25 con su propio péptido líder |
| FGMY25 y RGMY25 | Gen MY25 sin su propio péptido líder |
| FGCT y RGCT | Gen GCT con su propio péptido líder |
| FSGCT y RGCT | Gen GCT sin su propio péptido líder |
| End-gdp y RGST | Gen StcC con su propio péptido líder |
| FGST y RGST | Gen StcC sin su propio péptido líder |
| PYEXF1 y RGMY19 | Gen MY19 unido al adaptador PYEXFwd, ambas versiones, con y sin su propio péptido líder |
| End.gdp y PYEXR2 | Gen MY19 con su propio péptido líder unido al adaptador PYEXRvs |
| FGMY19 y PYEXR2 | Gen MY19 sin su propio péptido líder unido al adaptador PYEXRvs |
| PYEXF1 y RGCT | Gen GCT unido al adaptador PYEXFwd, ambas versiones, con y sin su propio péptido líder |
| FGCT y PYEXR2 | Gen GCT con su propio péptido líder unido al adaptador PYEXRvs |
| FSGCT y PYEXR2 | Gen GCT sin su propio péptido líder unido al adaptador PYEXRvs |
| PYEXF1 y RGST | Gen StcC unido al adaptador PYEXFwd, ambas versiones, con y sin su propio péptido líder |
| End-gdp y PYEXR2 | Gen StcC con su propio péptido líder unido al |

| | |
|-----------------|--|
| | adaptador PYEXRvs |
| FGST y PYEXR2 | Gen StcC sin su propio péptido líder unido al adaptador PYEXRvs |
| PYEXF1 y PYEXR2 | Todas las construcciones recombinantes que consistían del gen unido a ambos adaptadores (PYEXFwd y PYEXRvs), ambas versiones con y sin su propio péptido líder |

RESULTADOS

Recuperación de genes potenciales de peroxidasas

Éste proyecto comenzó con la transformación de bacterias *E. coli* cepa DH5 α utilizando los diferentes plásmidos que contenían a los genes potenciales de peroxidasas producto de la tesis de DeNecochea (Figura 10). Una vez transformados todos los plásmidos se realizó una extracción de los mismos y se mandaron secuenciar utilizando un oligonucleótido común, tomando ventaja de un elemento compartido en todas las construcciones que se utilizaron: el elemento GDP que se encontraba en el extremo 3' de cada gen, el cual se extiende por dos mil pares de bases en esa misma dirección

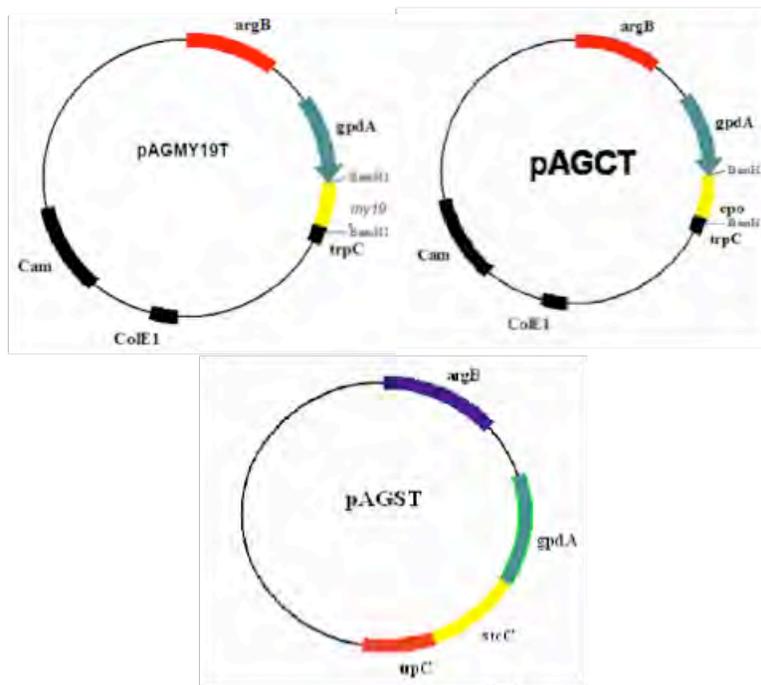


Figura 10. Esquema de los plásmidos creados por De Necochea en 2007 y a partir de los cuales se amplificaron los genes potenciales de peroxidasas para su uso en el sistema de barajeo.

Una vez corroboradas las secuencias, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificación conteniendo sitios de corte para las enzimas HindIII en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'. Un aspecto crítico en este momento fue identificar en cada una de las secuencias el marco de lectura abierto con la finalidad de que nuestros vectores de expresión en levadura dejaran en fase al gene respecto a la secuencia líder codificada en el vector pYEX-S1. En algunas de las construcciones iniciales el sitio de corte BamHI introducido anteriormente mantiene la fase adecuada para ser ligado al vector justo en el sitio de corte SacI, por lo cual, para esas construcciones, se utilizó dicho sitio para generar más adelante las construcciones recombinantes que se transformarían en la levadura. Después de definir en cuales de las secuencias se podía aprovechar esta característica, se eligieron los oligonucleótidos con los cuales se efectuaría la síntesis de las secuencias de interés, la cual se efectuó mediante una reacción de amplificación en cadena.

Tabla 6. Genes potenciales de peroxidasas y oligonucleótidos utilizados para su amplificación. El oligonucleótido Fwd1 se utilizó para la amplificación del gen con su propio péptido líder y el Fwd2 para la amplificación del gen sin su péptido líder.

| Gen Potencial | Oligo Fwd 1 | Oligo Fwd 2 | Oligo Rvs |
|---------------|-------------|-------------|-----------|
| MY19 | End-gdp | FGMY19 | RGMY19 |
| STC | End-gdp | FGST | RGST |
| GCT | FGCT | FSGCT | RGCT |

Se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos diferentes con el propósito de amplificar las secuencias con y sin su propia secuencia líder. Se realizó una predicción de péptido señal para cada gen potencial de peroxidasa con ayuda del programa SignalP 3.0 (Jannick Dyrlov Bendtsen, 2004) que está disponible gratuitamente en Internet. Basados en los resultados que se obtuvieron, se diseñaron los oligonucleótidos Fwd2, que iniciaban la amplificación justo donde termina la secuencia líder hipotética, y que también incluían un sitio de corte BamHI en su extremo 3' (Tabla 6). Estos oligonucleótidos dieron origen a las secuencias de los genes potenciales de peroxidasas sin su propio péptido líder y se

diseñaron puntualmente para que los productos resultantes también estuvieran en fase con la secuencia líder integrada en el vector de expresión. Una vez amplificadas, las secuencias de ADN se corroboraron por tamaño en un gel de agarosa al 1% y se purificaron (Figura 11).



Figura 11. Gel de agarosa donde se corrieron los genes putativos amplificados con y sin secuencia líder hipotética. [19-1, GST-1 y GCT-1]: Genes potenciales de peroxidasa con su propio péptido líder [19-2, GST-2 Y GCT-2]: Genes potenciales de peroxidasa sin su propio péptido líder predicho.

Síntesis de construcciones recombinantes

Las construcciones recombinantes se diseñaron tomando en cuenta el principio de la técnica de barajeo. Los genes o secuencias a transformar, en este caso los genes potenciales de peroxidasa, deben de estar flanqueados por secuencias homólogas al vector en ambos extremos (adaptadores). Se utilizaron secuencias homólogas de alrededor de 50 pares de bases, tomando como punto medio el sitio de corte único (SacI) en el vector pYEX-S1, que corresponde al sitio de inserción de la secuencia que se desea integrar. Para crear los adaptadores se siguieron dos diferentes estrategias, síntesis lineal y reacción de amplificación convencional (Figura12).

El adaptador PYEXFwd fue diseñado con un sitio de corte BamHI en su extremo 5', justo donde el sitio de corte SacI comienza originalmente. El adaptador PYEXRvs fue

creado con un sitio de corte HindIII en su extremo 3', justo donde el sitio de corte SacI finaliza originalmente. La síntesis correcta de ambos fragmentos fue corroborada mediante un gel de acrilamida adicionado con bromuro de etidio y revelado en un transiluminador con luz UV.

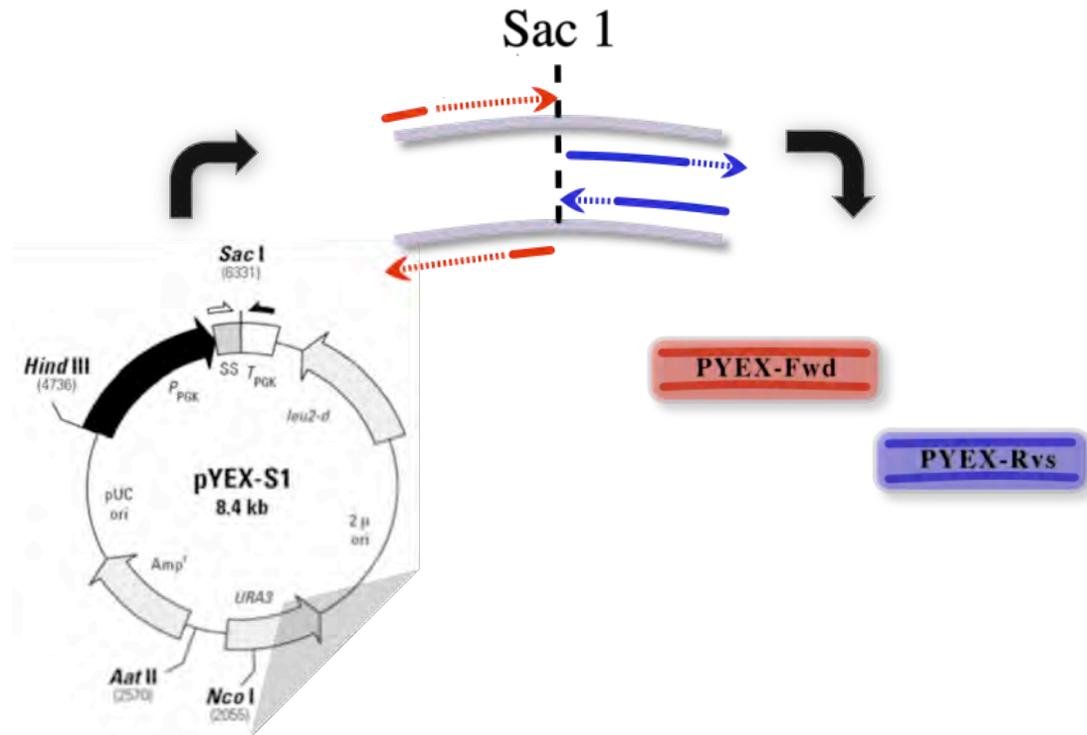


Figura 12. Esquema de la construcción de los adaptadores de 50 pares de bases homólogos al vector. El adaptador PYEX-Fwd se construyó con ayuda de una reacción de amplificación en cadena extendiéndose 50 pares de bases en dirección 3' del sitio de corte único SacI. El adaptador PYEX-Rvs se construyó mediante síntesis lineal de ADN y se extiende 50 pares de bases en dirección 5' del sitio de corte único SacI.

Se sintetizaron tres tipos de construcciones recombinantes diferentes. La primera, construcción recombinante “FwdGen”, consistía del gen potencial de peroxidasa unido a el adaptador PYEXFwd en el extremo 3' del gen. La segunda, construcción recombinante “GenRvs”, consistía del gen potencial de peroxidasa unido al adaptador PYEXRvs en el extremo 5' del gen. La tercera, construcción recombinante “FwdGenRvs”, consistía del gen potencial de peroxidasa unido a ambos adaptadores, tanto Fwd como Rvs, uno en cada extremo del gen. Se sintetizaron exitosamente un total de 18 construcciones, resultado de

generar las tres versiones recombinantes ya mencionadas, para cada una de las 6 secuencias amplificadas.

El protocolo para construir las construcciones recombinantes consistió en varios pasos. Lo primero que se realizó, fue la amplificación de los genes potenciales de peroxidasas utilizando los oligonucleótidos ya especificados seguida de su purificación. El siguiente paso fue una digestión de éstos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII de manera independiente. Posteriormente las digestiones fueron desactivadas y se purificaron los fragmentos digeridos por medio de una cromatografía de exclusión molecular, la cual tuvo el propósito de separar el producto digerido de las cuatro pares de bases liberadas por la digestión.

Los adaptadores, que consistían de un fragmento de ADN de 50 pares de bases homólogo al vector, fueron sometidos a un proceso similar al de los genes potenciales de peroxidasas. Estos se digirieron con la enzima correspondiente (BamHI para el adaptador PYEX-Fwd y HindIII para el adaptador PYEX-Rvrs) y se purificaron igualmente con una cromatografía de exclusión molecular.

Una vez purificados, los genes potenciales de peroxidasa y los adaptadores fueron cuantificados en el espectrofotómetro. Se realizó un estimado del peso molecular de cada construcción, con la ayuda del programa OligoAnalyzer 3.1 (DNATechnologies., 2010) que se encuentra disponible gratuitamente en Internet. Esto con la finalidad de calcular la molaridad en que se habían recuperado los fragmentos, para así poder agregar cantidades equimolares (20 μ M) de adaptador y de gen potencial de peroxidasa en una reacción de ligación convencional con ligasa T4, tomando ventaja de los extremos pegajosos resultantes de las digestiones sitio específicas (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Concentración del ADN recuperado después de la digestión con BamHI

| Genes y Fragmento Fwd Digeridos con BamHI | | | |
|---|----------------|---------------------|-----------------------------|
| ADN recuperado | Peso Molecular | Concentración (g/L) | Molaridad (μM) |
| MY19-Fwd1 | 470443 | 25.443 | 54 |
| MY19-Fwd2 | 470443 | 42.356 | 90 |
| GCT-Fwd1 | 704121.8 | 40.746 | 57.8 |
| GCT-Fwd2 | 704121.8 | 28.376 | 40.2 |
| GST- Fwd1 | 620127.4 | 31.520 | 50.8 |
| GST-Fwd2 | 620127.4 | 26.649 | 43 |
| PYEXFwd | 18203.8 | 30.367 | 100 |

Tabla 8. Concentración del ADN recuperado después de la digestión con HindIII

| Genes y Fragmento Rvs Digeridos con HindIII | | | |
|---|----------------|---------------------|-----------------------------|
| ADN recuperado | Peso Molecular | Concentración (g/L) | Molaridad (μM) |
| MY19-Fwd1 | 470443 | 53.611 | 114 |
| MY19-Fwd2 | 470443 | 25.272 | 53 |
| GCT-Fwd1 | 704121.8 | 25.391 | 36 |
| GCT-Fwd2 | 704121.8 | 45.653 | 64.8 |
| GST- Fwd1 | 620127.4 | 60.534 | 97.61 |

| | | | |
|----------|----------|---------|-------|
| GST-Fwd2 | 620127.4 | 35.524 | 57.28 |
| PYEXRvs | 18474 | 150.739 | 90 |

Una vez que se obtuvieron estos datos se procedió a estandarizar la concentración de todas las muestras recuperadas haciendo alícuotas de cada uno de los elementos a ligar a una concentración única: 20 μM en 50 μL de volumen. Finalmente se realizaron las ligaciones necesarias para crear los tres tipos de construcciones recombinantes anteriormente descritas. (Figura 13)

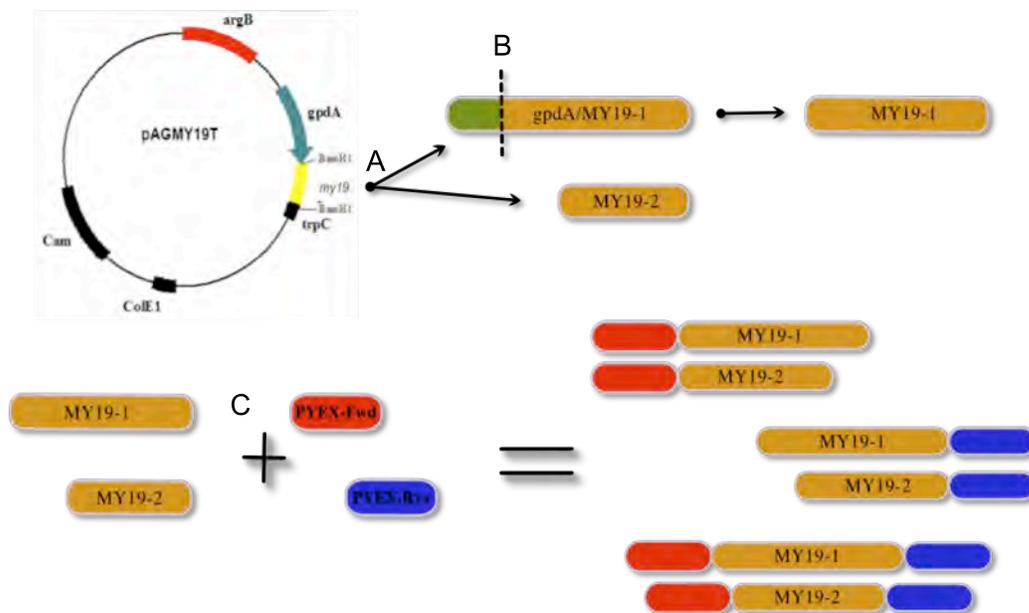


Figura 13. Esquema de la síntesis de las construcciones recombinantes. A) Amplificación de las dos versiones de cada uno de los genes potenciales de peroxidasa. B) Digestión del productos amplificado con su propio péptido líder para remover el promotor *gpdA* y así obtener los genes con su propio péptido líder. C) Ligación de las diferentes versiones de cada gen potencial de peroxidasa con uno o ambos adaptadores en cada uno de sus extremos, generando tres tipos de reconstrucciones recombinantes para cada una de las dos versiones de los tres genes elegidos.

Amplificación de construcciones recombinantes y preparación de vector

Se decidió utilizar solo un pequeño conjunto de construcciones recombinantes para verificar el diseño del sistema de recombinación *in vivo*. Estas construcciones fueron las correspondientes al gen potencial de peroxidasa MY19 con y sin su péptido líder.

La construcción recombinante FwdMY19 consta del gen potencial de peroxidasa encontrado en la secuencia MY19 de *Phytophthora infestans* con su péptido líder y el adaptador PYEXF-wd. La construcción recombinante MY19Rvs consta del gen potencial de peroxidasa encontrado en la secuencia MY19 de *Phytophthora infestans* con su péptido líder y el adaptador PYEX-Rvs. La construcción recombinante FwdMY19Rvs consta del gen potencial de peroxidasa encontrado en la secuencia MY19 de *Phytophthora infestans* con su péptido líder y ambos adaptadores PYEX-Fwd y PYEX-Rvs. La construcción recombinante FwdMY19SPL consta del gen potencial de peroxidasa encontrado en la secuencia MY19 de *Phytophthora infestans* sin su péptido líder y el adaptador PYEXF-wd. La construcción recombinante MY19Rvs consta del gen potencial de peroxidasa encontrado en la secuencia MY19 de *Phytophthora infestans* sin su péptido líder y el adaptador PYEX-Rvs. Para la amplificación de cada uno de ellos se utilizó un set de oligonucleótidos específico (Tabla 9), utilizando para todos ellos el mismo protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Una vez amplificadas, las construcciones recombinantes fueron ligadas al vector pGEM-T y posteriormente el vector fue transformado en células *E. coli* DH5 α mediante electroporación, para así poder recuperar fácilmente las construcciones recombinantes en el futuro. El plásmido pYEX-S1 fue introducido en la bacteria *E. coli* DH5 α mediante electroporación, posteriormente fue purificado, cuantificado y finalmente digerido con la enzima SacI, siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Ya linearizado, el plásmido fue purificado de la reacción mediante la remoción de sales descrita en materiales y métodos.

Tabla 9. Construcciones recombinantes utilizadas para los experimentos de transformación, de determinación de actividad y oligonucleotidos utilizados para su amplificación.

| Construcción | Oligo Fwd | Oligo Rvs |
|--------------|-----------|-----------|
| FwdMY19 | PYEXF1 | RGMY19 |
| MY19Rvs | End-gdp | PYEXR1 |
| FwdMY19Rvs | PYEXF1 | PYEXR1 |
| FwdMY19sPL | PYEXF1 | RGMY19 |
| MY19sPLRvs | FGMY19 | PYEXR1 |

Transformación de levadura

Inicialmente se compararon dos protocolos de transformación con el propósito de evaluar las eficiencias de transformación que cada uno de ellos podría alcanzar. Los protocolos comparados fueron: PA (Agatep et al. 1998) y PB (Gietz y Schiestl 2007), ambos descritos detalladamente en Materiales y Métodos. El experimento consistió en la transformación de dos plásmidos diferentes, el PYEX-S1 y el Psa3, en cantidades iguales (1µg), en donde cada plásmido fue transformado dos veces, utilizando en cada transformación un protocolo distinto. Los medios que se utilizaron para seleccionar fueron el 5A: Medio SD complementado con los cinco aminoácidos para los cuales la cepa es auxótrofa leucina, histidina, triptófano, adenina y uracilo como control positivo; el 3A: Medio SD complementado con histidina, triptófano y adenina como control negativo; Leu-: Medio SD complementado con histidina, triptófano, adenina y uracilo para corroborar la capacidad del plásmido para complementar la auxotrofia de la cepa; y Ura-: Medio SD complementado con leucina, histidina, triptófano y adenina para corroborar la capacidad del plásmido para complementar la auxotrofia de la cepa (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de la transformación comparativa de los protocolos Agatep et al. 1998 (PA) y Gietz, Schiestl 2007 (PB) Los símbolos denotan crecimiento de manera relativa. Un mayor número de cruces indica mayor crecimiento. Los guiones indican la ausencia de crecimiento. (n): En esta única caja el medio de cultivo se secó demasiado rápido y no dio oportunidad al crecimiento de la levadura. 5A: Medio SD complementado con leucina, histidina, triptófano, adenina y uracilo. 3A: Medio SD complementado con histidina, triptófano y adenina. Ura-: Medio SD complementado con leucina, histidina, triptófano y adenina. Leu-: Medio SD complementado con histidina, triptófano, adenina y uracilo

| Medio | Plásmido | PA Psa13 | PA S1 | PB Psa13 | PB S1 |
|-------|----------|----------|-------|----------|-------|
| | 5A | ++ | ++ | +++ | +++ |
| | 3A | - | - | - | - |
| | Ura- | -(n) | ++ | +++ | +++ |
| | Leu- | - | - | - | - |

En experimentos posteriores se realizaron pruebas de eficiencia siguiendo el protocolo de electroporación (Simon y McEntee 1989) y basados en los resultados, que demostraron una mayor eficiencia de transformación, se optó por utilizar el protocolo de electroporación para todas las transformaciones posteriores. La siguiente transformación consistió en la introducción del plásmido linearizado pues de esta forma podríamos establecer cuál es el porcentaje de colonias que nos dan un fenotipo positivo de complementación, sin serlo realmente, y utilizar estos datos para estimar el número de transformantes reales que podríamos obtener.

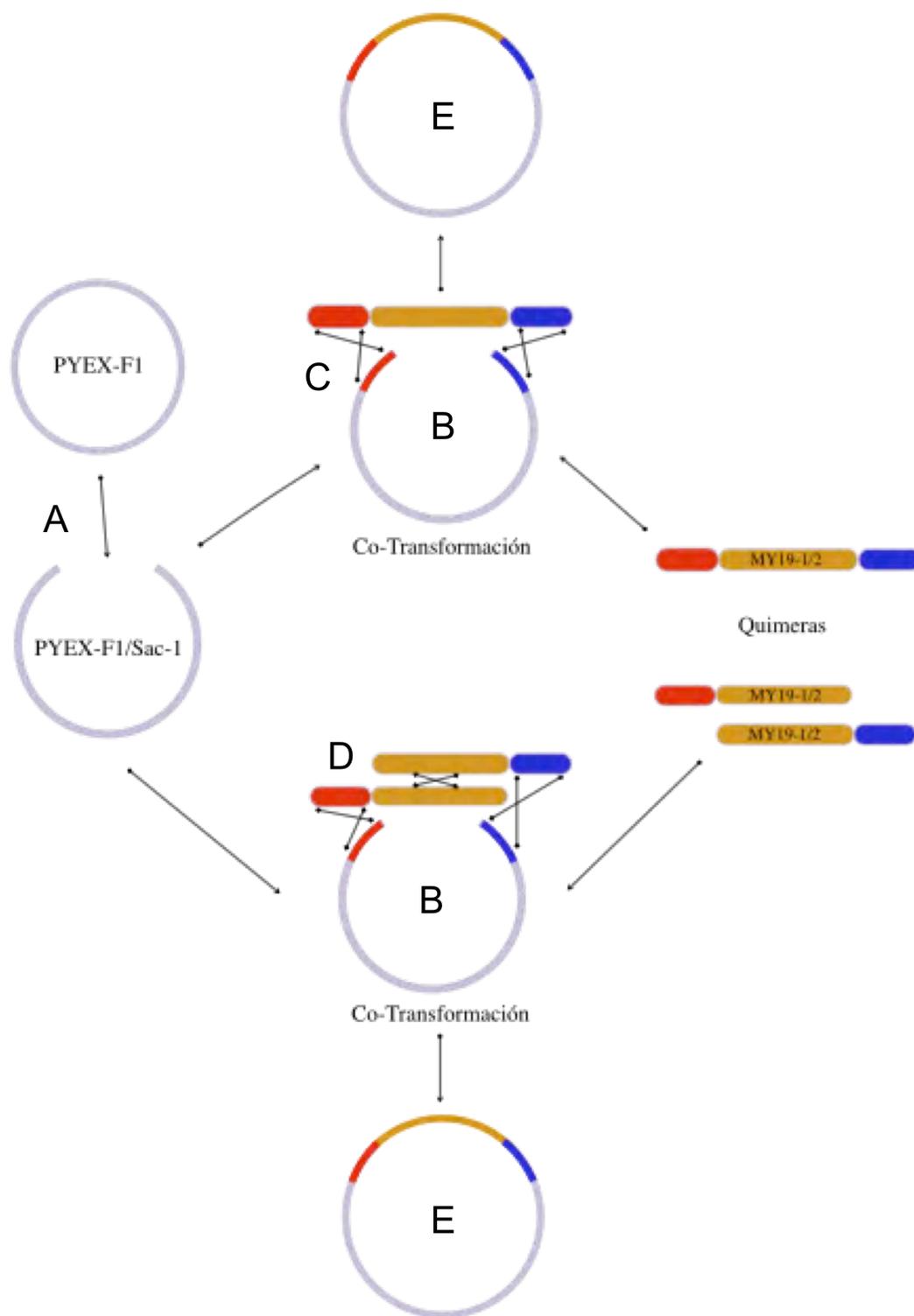
En primera instancia se realizó un pequeño número de transformaciones con el propósito de determinar el porcentaje de clonas recuperadas que podrían ser resultado de la transformación de un vector no digerido o del religado del vector por parte de la célula que, en última instancia, resultaría en un falso positivo en el conteo de colonias totales. Para este experimento se electroporó un número casi idéntico de células, con 1 µg de vector circular

o con 1 μ g de vector linearizado. El experimento se repitió 3 veces por separado y los resultados obtenidos fueron de 1.33%, 2.63% y 3.45% ($x = 2.47\% \pm 1.06$) de falsos positivos en cada uno de los casos.

Posteriormente se realizaron un total de 5 tipos diferentes de electroporaciones para identificar y cuantificar el número de clonas recombinantes:

1. La electroporación del vector circular.
2. La electroporación del vector linearizado.
3. La electroporación del vector linearizado junto con la construcción recombinante FwdMY19Rvs, la cual tenía un adaptador en cada uno de sus extremos y que conservaba su propia secuencia líder.
4. La electroporación del vector linearizado junto con dos construcciones recombinantes del gen MY19, la FwdMY19 y la MY19Rvs, cada una con un adaptador homólogo al vector en cada extremo y que conservaban su propia secuencia líder.
5. La electroporación del vector linearizado junto con dos construcciones recombinantes del gen MY19, la FwdMY19SPL y la MY19SPSRvs cada una con un adaptador homólogo al vector en cada extremo y que carecía de su propia secuencia líder. (Figura 14).

Figura 14. Esquema general de las transformaciones efectuadas, así como de la recombinación necesaria para la recircularización del plásmido. A) Digestión del plasmido para linearizarlo. B) Co-Trasfortmación del plásmido linearizado y las diferentes construcciones recombinantes con y sin su propio péptido líder. C) Recombinación de la construcción recombinante FwdMY19Rvs con el plásmido a través de los adaptadores en sus extremos, el primer evento de recombinación sucede en trans y el segundo en cis. D) Recombinación de las construcciones recombinantes con solo un adaptador en cada extremo, entre ellas y con el plásmido. Bajo este esquema la recombinación entre construcciones es estrictamente necesaria para poder generar un plásmido circular, en este caso las dos primeras recombinaciones son en trans y la ultima en cis. E) Recircularización del plásmido, lo cual le permite mantenerse de forma estable en la levadura.



Se elaboraron cuatro diferentes experimentos de transformación (T1, T2, T3 Y T4), cada uno de ellos consistía de tres electroporaciones, cada una de ellas con una combinación particular de ADN: A)Vector circular, la cual consistía de 1 μ g del vector circular; B)FwdMY19Rvs, la cual consistía de 1 μ g de vector linearizado y 1 μ g de la construcción FwdMY19Rvs y C)FwdMY19 + MY19Rvs, la cual consistía de 1 μ g de vector linearizado, 1 μ g de la construcción FwdMY19 y 1 μ g de la construcción MY19Rvs (Figura 16). Se realizó también una electroporación independiente, en la cual se introdujo en la levadura de 1 μ g de vector linearizado, 1 μ g de la construcción FwdMY19sPL y 1 μ g de la construcción MY19sPLRvs.

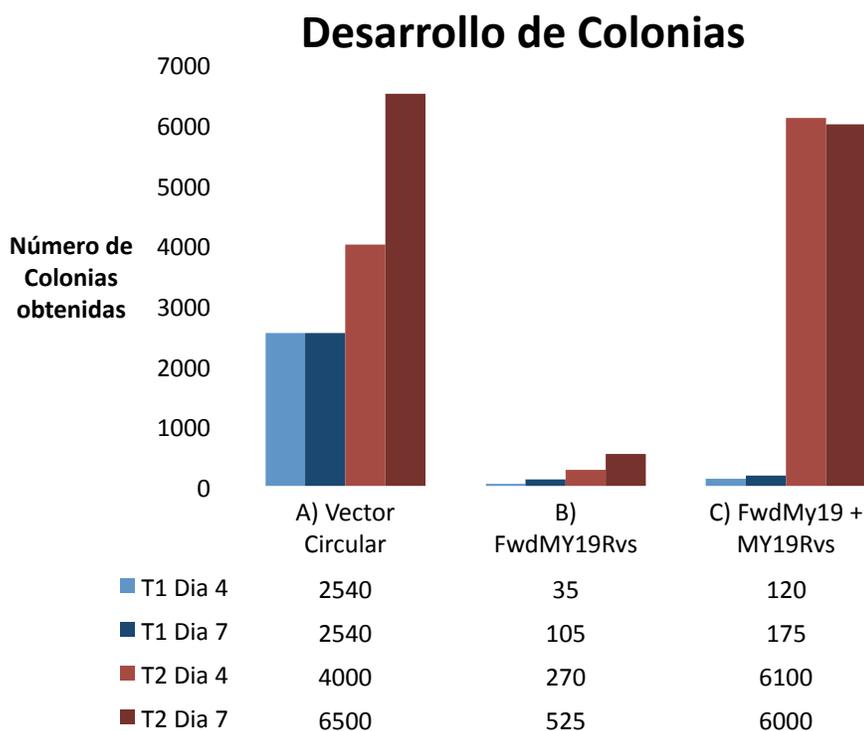


Figura 15. Número de colonias obtenidas en los experimentos de transformación T1 y T2 después de cuatro y siete días de la electroporación. Cada uno de los experimentos de consistió de tres electroporaciones diferentes: A)Vector circular, 1 μ g del vector circular pYEX-S1; B)FwdMY19Rvs, la cual consistía de 1 μ g de vector linearizado y 1 μ g de la construcción FwdMY19Rvs y C)FwdMY19 + MY19Rvs, la cual consistía de 1 μ g de vector linearizado, 1 μ g de la construcción FwdMY19 y 1 μ g de la construcción MY19Rvs .

Los primeros dos experimentos de transformación se siguieron por siete días posteriores a la electroporación para observar la recuperación y el desarrollo de las colonias obtenidas durante ese periodo. Con esto se puede determinar que para el séptimo día ya se había obtenido prácticamente el total de clonas positivas, por ende se decidió que el conteo de clonas obtenidas para los próximos eventos se realizaría al séptimo día después de la electroporación. (Figura 15).

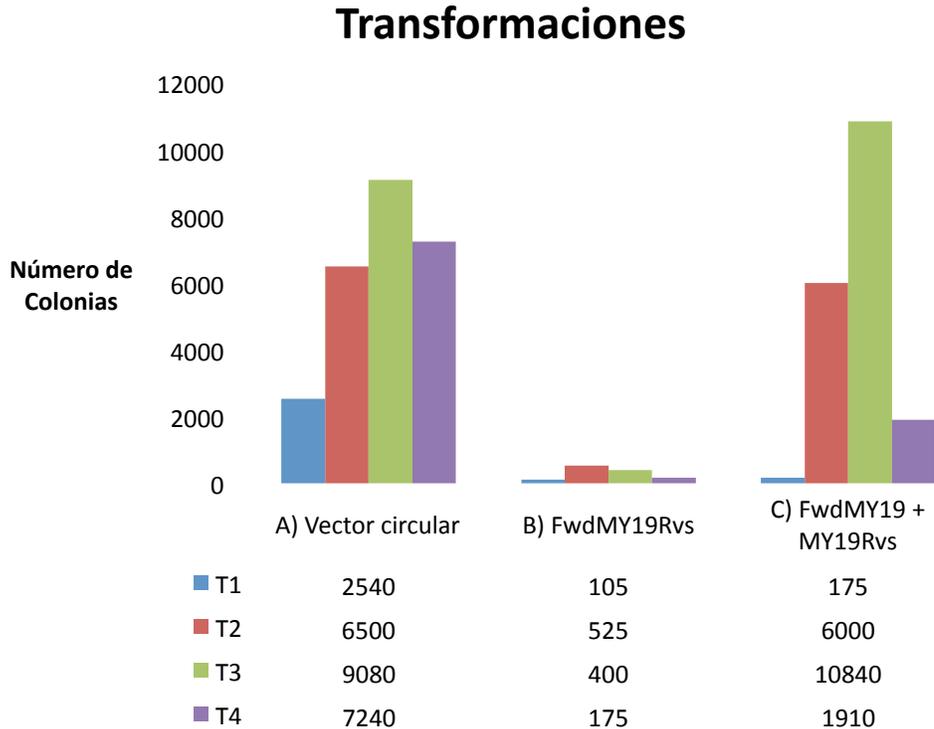


Figura 16. Número de colonias obtenido de las cuatro transformaciones realizadas, T1, T2, T3 y T4, expresados en número total de colonias obtenidas. Cada experimento de transformación consistió de tres electroporaciones diferentes: A) Vector circular, 1 µg del vector circular pYEX-S1; B) FwdMY19Rvs, la cual consistía de 1 µg de vector linealizado y 1 µg de la construcción FwdMY19Rvs y C) FwdMY19 + MY19Rvs, la cual consistía de 1 µg de vector linealizado, 1 µg de la construcción FwdMY19 y 1 µg de la construcción MY19Rvs.

De las colonias recuperadas se eligieron 7 totalmente al azar para analizar la posible expresión heteróloga de la enzima codificada por nuestro gen potencial de peroxidasa: una de ellas contenía sólo el plásmido PYEX-S1 sin inserto la cual se llamo S1C, se eligieron también tres clonas resultantes de la electroporación de el vector linearizado y la construcción FwdMY19Rvs que en teoría deberían haber integrado el gen MY19 con su propia secuencia líder, las cuales se llamaron MY19(1), MY19(2) y MY19(3), y se seleccionaron tres clonas más resultantes de la electroporación del vector linearizado y las construcciones FwdMY19sPL y MY19sPLRvs que deberían haber integrado la versión del gen MY19 que carece de su propia secuencia líder predicha, las cuales se nombraron MY19sPL(1), MY19sPL(2) y MY19sPL(3).

Determinación de actividad enzimática

El vector con el que se transformaron las células tiene integrada la secuencia de un péptido líder que favorece que la proteína transformada se dirija hacia la vía de secreción de la célula, por ende analizamos el sobrenadante de los cultivos para la detección de actividad. Se realizó un ensayo cualitativo preliminar de la actividad de peroxidada utilizando TMB (3,3',5,5'-Tetrametil bencidina) como sustrato de oxidación dependiente de peróxido de hidrogeno. Para nuestra sorpresa, observamos actividad en todas las clonas. Para corroborar esta observación se utilizaron Guayacol y ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolina-6-acido sulfónico) como sustratos alternativos, sin embargo no detectamos actividad con ninguno de los dos (Figura 17).

Dado que todas las clonas presentaban actividad, incluso aquella que solo contenía al plásmido sin inserto alguno, se optó por determinar si la oxidación del TMB, era resultado de una interacción puramente química con moléculas pequeñas del sobrenadante. Para lograr esto, se utilizó una membrana de 10kDa para separar las macromoléculas del resto del sobrenadante. Se realizó de nuevo un ensayo cualitativo a las dos alícuotas resultantes para determinar cuál de ellas conservaba la actividad. El resultado de los ensayos nos mostró que la actividad sólo se encontraba en las alícuotas que contenían macromoléculas de más de 10kDa de peso (Figura 18). Posteriormente nos preguntamos si la oxidación del sustrato era dependiente de peróxido o no, para esto se realizaron un par de

pruebas en donde se modificó la mezcla de reacción. En una de ellas sólo se agregó sustrato y peróxido y en la otra sólo se agregó el sobrenadante con moléculas de más de 10kDa y el sustrato. Los resultados de este experimento aportaron dos observaciones importantes. Por un lado se determinó que el peróxido por sí solo era capaz de oxidar al TMB. Por otro lado, que el sobrenadante, por sí mismo, no era capaz de oxidar al sustrato. Estos experimentos nos permitieron determinar que la oxidación del sustrato está asociada a una macromolécula que se encuentra en el sobrenadante de los cultivos y que además, es dependiente de peróxido.

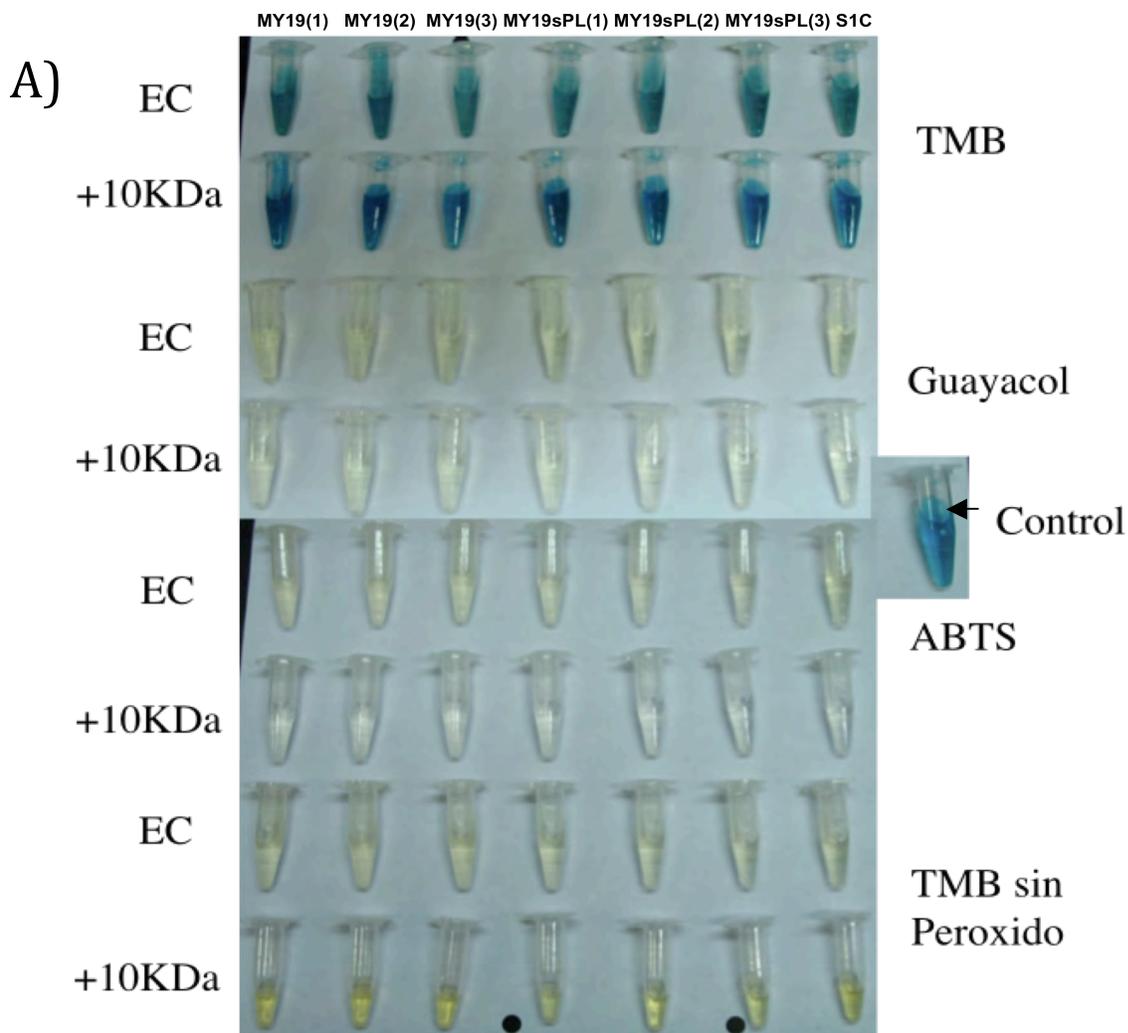




Figura 18. A) Ensayos cualitativos de actividad enzimática de las clonas seleccionadas. EC: Sobrenadante sin restos celulares. +10KDa: Fracción del extracto que solo contiene moléculas de más de 10KDa. Control: Agua, peróxido y TMB sin extracto. B) Ensayo de la fracción del extracto con moléculas de menos de 10KDa, TMB y peróxido.

El siguiente paso fue determinar la actividad enzimática de la enzima o enzimas involucradas en la oxidación del TMB, de modo que realizó una cinética con los extractos obtenidos de cada una de las clonas. En este ensayo preliminar se evaluó el aumento de absorbencia a una longitud de onda de 652nm tomando una lectura inicial al momento de agregar el peróxido (tiempo 0) y varias lecturas posteriores en intervalos de 10 minutos.

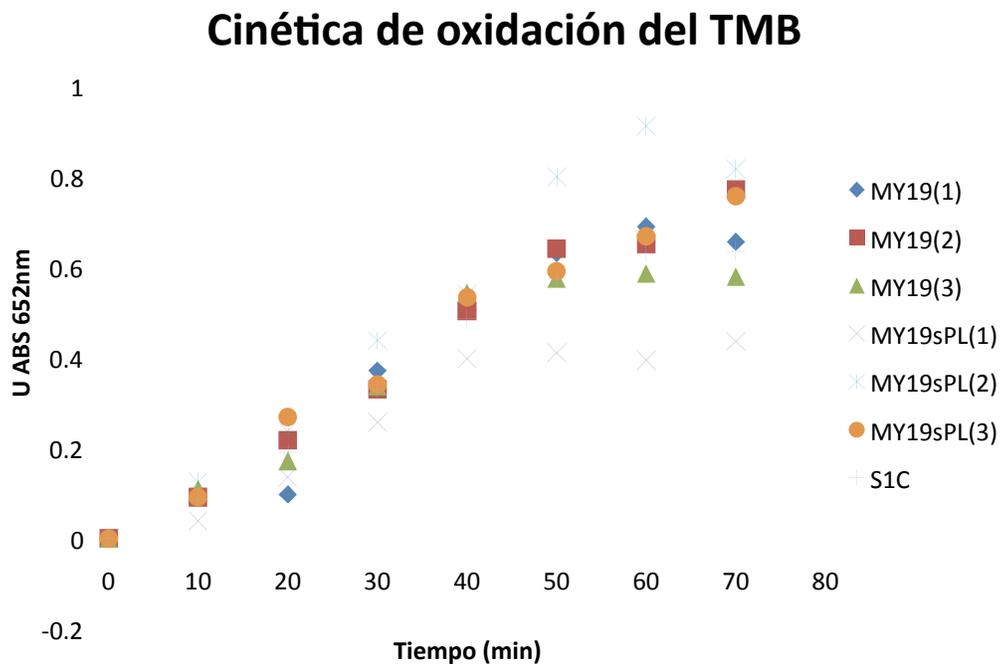


Figura 17. Absorbencia a 652nm del extracto proteico de las clonas en una reacción convencional con TMB y peróxido durante 70 minutos. Clonas SS19(1-3): resultantes de la transformación del gen MY19 con su propia secuencia líder. Clonas LV19(1-3): resultantes de la

transformación del gen MY19 carente de su propia secuencia líder. Clona S1C: resultante de la transformación del vector PYEXS1 circular sin inserto alguno.

Los datos obtenidos mostraron en todos los casos un aumento en la absorbencia directamente proporcional al tiempo de incubación, sin embargo, la absorbencia mostró llegar a un máximo y después de alcanzar este punto descender lentamente. Debido a la distribución de los datos no fue posible establecer una causa concluyente respecto a la naturaleza de la oxidación del TMB. Por esta razón se determinó aumentar la concentración proteica del sobrenadante para las cinéticas posteriores, de manera que se tomaron 50 ml de 3 de los 6 cultivos originales y se concentraron a 3 o 4 ml con ayuda de un Amicon, el cual tenía una membrana con tamaño de poro de 10KDa. Se determinó también la concentración proteica en los concentrados obtenidos mediante el método Bradford (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de extractos proteicos obtenidos mediante la técnica de Bradford. MY19(1): Clona con el gen MY19; MY19sPL(2):Clona con el gen MY19 sin su propio péptido líder predicho; S1C: Clona con el plásmido pYEX-S1 sin inserto.

| Concentrado | Concentración de proteína total ($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------|--|
| MY19(1) | 116 |
| MY19sPL(2) | 129 |
| S1C | 84 |

Al realizar el segundo ensayo se observó un fenómeno peculiar, al combinar el complejo enzimático (en este caso el sobrenadante, el sustrato disuelto y el peróxido) la precipitación irreversible de alguno de sus componentes generaba una gran dispersión en los datos, la cual dificultó hasta cierto punto la determinación de la actividad proteica en la muestra.

Una serie de ensayos determinó que la formación del precipitado requería únicamente de la interacción del sobrenadante concentrado y el TMB disuelto en agua lo cual representaba un obstáculo considerable en el experimento. Después de diversos intentos fallidos que procuraban impedir la formación de dicho precipitado se optó por hacer un registro detallado del momento en el que se formaba el precipitado, tiempo que resulto ser de 20 minutos posteriores al inicio de la reacción. Una vez determinado el dato anterior, se decidió realizar un nuevo grupo de cinéticas, de las cuales se decidió utilizar solo los datos obtenidos de los primeros 10 minutos del ensayo y estos fueron los resultados:

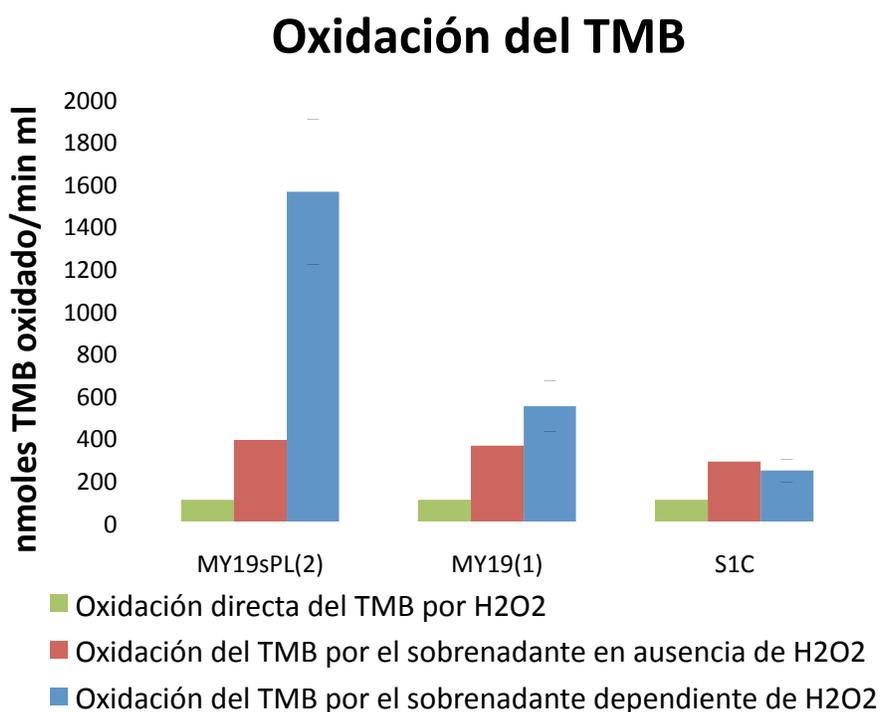


Figura 18. Oxidación del TMB en los primeros diez minutos de reacción a una longitud de onda de 652nm. MY19(1): Clona con el gen MY19; MY19sPL(2):Clona con el gen MY19 sin su propio péptido líder predicho; S1C: Clona con el plásmido pYEX-S1 sin inserto

Al analizar los resultados obtenidos se decidió que la manera más práctica, y hasta cierto punto más confiable, de calcular la actividad real del extracto proteico sería al utilizar la pendiente resultante de la sustracción de las dos pendientes más significativas: la

pendiente de la oxidación del TMB por el sobrenadante dependiente de peróxido de hidrógeno y la pendiente de la oxidación del TMB por el sobrenadante en ausencia de peróxido de hidrógeno. Apoyándonos en las concentraciones proteicas obtenidas para cada uno de los sobrenadantes, fue posible calcular la actividad específica de cada una de las reacciones. El sobrenadante MY19(1) tuvo una actividad específica de $1.583 \text{ nmoles min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína al restarle la actividad obtenida de la reacción de fondo, en ausencia de peróxido de hidrógeno. El sobrenadante MY19sPL(2) tuvo una actividad específica de $9.076 \text{ nmoles min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína al restarle la actividad obtenida de la reacción de fondo. Por último, el sobrenadante S1C tuvo una actividad específica de $0.61 \text{ nmoles min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína al restarle la actividad obtenida de la reacción de fondo.

DISCUSION

El objetivo del presente trabajo fue la implementación de un sistema de recombinación en levadura que nos permitiera generar variantes activas partiendo de una colección de peroxidasas de distinto origen. La recuperación de estos genes potenciales de peroxidasas fue un procedimiento sencillo, gracias a que todos ellos ya se encontraban clonados en plásmidos bien definidos como producto de una tesis realizada en el laboratorio (De Necochea, 2007). En el proceso de recuperación la secuenciación de los mismos fue determinante para confirmar su identidad, además nos fue de gran utilidad para diseñar los oligonucleótidos adecuados para la amplificación de cada uno de ellos al permitirnos identificar su marco de lectura. Cabe resaltar que las tres secuencias con las cuales se trabajó (MY19, GCT y GST), fueron elegidas de un total de cuatro prospectos, ya que uno de ellos (MY25) no pudo ser identificada por métodos de secuenciación común y por lo tanto se descartó para cualquier experimento posterior.

Respecto a la elaboración de las construcciones recombinantes se decidió que los adaptadores tuvieran una longitud de 50 pares de bases cada uno basados en los experimentos realizados por Wittrup y otros en el 2004, en donde reportan que esa longitud era suficiente para obtener una tasa de recombinación óptima. Se siguieron dos vías de síntesis diferentes para cada uno de los extremos debido a un ligero problema de diseño

inicial: el oligonucleótido “PYEXF2” formaba homodímeros consigo mismo, por ende no fue posible utilizarlo para una síntesis lineal del adaptador PYEXFwd tal como se hizo con el otro adaptador. Por lo tanto se optó por sintetizar un nuevo oligonucleótido “PYEX-F2”, este oligonucleótido era más pequeño y por lo tanto no se alineaba con el oligonucleótido PYEXF1, de modo que se realizó una reacción de amplificación cotidiana utilizando como molde el vector para sintetizar el adaptador PYEXFwd.

Las peroxidasas en hongos son en su gran mayoría extracelulares de forma que resulta indispensable la existencia de una secuencia líder para su correcto procesamiento y exportación. Por esa razón se decidió poner especial énfasis en el diseño de las secuencias de exportación apropiadas para cada una de nuestras construcciones recombinantes considerando dos estrategias alternativas: una de ellas fue utilizar la secuencia líder natural para cada gen potencial, mientras que la otra consistió en utilizar la secuencia líder codificada por el vector, facilitando la inserción de los genes potenciales de peroxidasas - una vez removida la secuencia líder natural- en fase con el marco de lectura del mismo vector. Al generar ambas versiones se podría evaluar cuál de las dos construcciones resultaría más efectiva en términos de síntesis y producción de proteína.

Mientras se realizaban los experimentos para determinar la eficiencia de transformación de los diferentes protocolos escogidos, fue posible observar un fenómeno por demás inquietante: el plásmido PYEX-S1 no era capaz de complementar la auxotrofia a Leucina de nuestra cepa. Este fenómeno no parecía coherente con las características del plásmido, ya que como podemos observar en el mapa proporcionado por el fabricante, este plásmido en particular contiene el gene *leu2-d*, suficiente para la complementación de dicha auxotrofia. Se decidió entonces cotejar el tipo particular de auxotrofia de nuestra cepa de levadura con el tipo específico de auxotrofia que debería complementar nuestro plásmido, encontrándolos compatibles. Sin embargo, a pesar de no encontrar ninguna irregularidad aparente, el plásmido fue incapaz de complementar a la cepa. Afortunadamente el plásmido sí es capaz de complementar la auxotrofia por uracilo, por lo que en todos los experimentos realizados se utilizó este marcador de selección.

Para que cualquier procedimiento de generación de variabilidad resulte exitoso se necesita generar y evaluar grandes números de variantes. En nuestro caso particular, el

mecanismo encargado de la generación de variabilidad es la recombinación celular, un mecanismo inherente a la célula, por lo tanto es imposible de manipular, sin embargo, mientras más clonas o moléculas transformantes se generen y analicen mayor será la probabilidad de encontrar la recombinante deseada. Por lo tanto, uno de los parámetros claves para cualquier sistema de recombinación *in vivo* es la eficiencia de transformación. Después de cuantificar las eficiencias de transformación de los diferentes protocolos evaluados, llegamos a la conclusión de que el más adecuado para nuestro sistema era el de la electroporación. Esto se debió principalmente a dos factores: una mayor eficiencia de transformación, así como a la facilidad y reproducibilidad para preparar las células competentes. Mientras que la transformación química depende en gran medida de la calidad del ADN acarreador (Becker, 2001), la electroporación depende principalmente de la cantidad de ADN que se pretende electroporar, así como de la concentración de sales en el mismo (Becker, 2001).

Los resultados respecto a la eficiencia de transformación de las construcciones recombinantes por electroporación siguieron dos tendencias principalmente: 1) el número de colonias obtenido al electroporar el vector circular (electroporación A) es más alto que el número de colonias obtenidas al electroporar el vector linearizado junto con la construcción FwdMY19Rvs (electroporación B), y más alto también que el número de colonias obtenido al electroporar el vector linearizado junto con las construcciones recombinantes complementarias (electroporación C) (Figura 20A). La otra tendencia observada fue que el número de colonias obtenidas al electroporar las construcciones recombinantes complementarias (electroporación C) es mayor a la de las otras dos condiciones (Figura 20B).

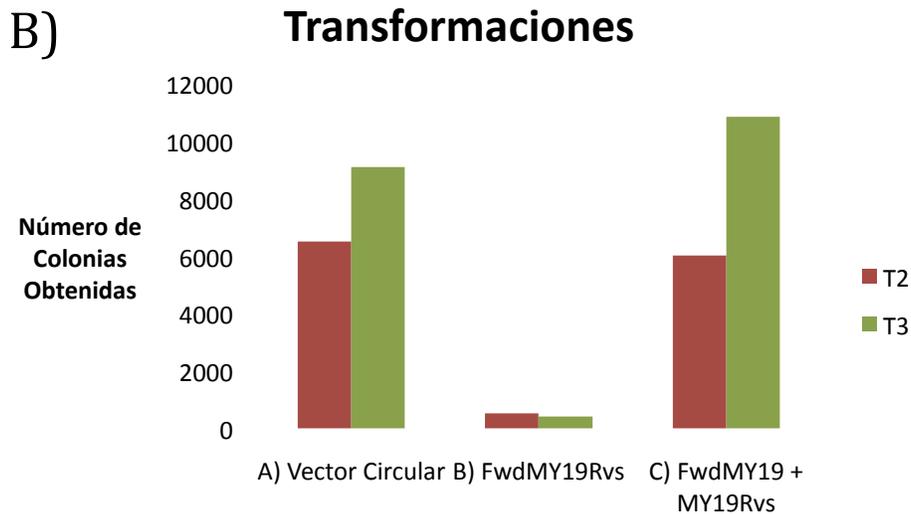
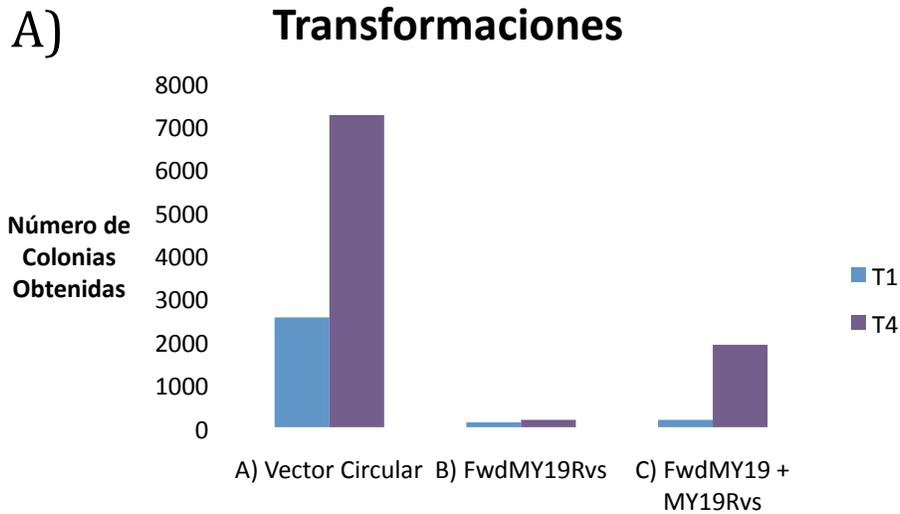


Figura 20. Gráficas representativas de las dos tendencias observadas respecto a la eficiencia de transformación de una cierta mezcla de ADN respecto a las otras. 1) El número de colonias obtenido al electroporar el vector circular (electroporación A) es más alto que en las otras dos electroporaciones (electroporación B y C) y 2) El número de colonias obtenido al electroporar el vector linealizado junto con las construcciones recombinantes complementarias (electroporación C) es más alto que en las otras dos electroporaciones (electroporación A y B).

Basados en nuestros conocimientos previos de recombinación, se esperaba que el número de clonas en cada experimento siguiera un patrón consistente en donde el número de clonas obtenidas al electroporar el vector circular fuera mayor que el número de clonas

obtenido de la electroporación de la construcción recombinante FwdMY19Rvs junto con el vector linearizado, y que éste a su vez, fuera mayor que el número de clonas obtenido de la electroporación de las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs junto con el vector linearizado. Se esperaban estos resultados por el simple hecho de que una recombinación doble (el caso de la construcción recombinante FwdMY19Rvs) debería suceder con mayor frecuencia que una recombinación triple (el caso de las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs).

Para tratar de explicar este fenómeno se debe tener presente que los resultados dependen de un par de factores ligados directamente al experimento: la eficiencia de transformación en cada experimento y del mecanismo de recombinación de la levadura.

Los resultados aquí mostrados denotan claramente que la eficiencia de transformación fluctuó entre experimentos. Respecto a la calidad y cantidad de ADN utilizado para cada experimento, se puede asegurar que las variaciones fueron mínimas: la producción, extracción, purificación, verificación, cuantificación y lavado se llevaron a cabo con los mismos reactivos y equipos, bajo las mismas condiciones cada una de las veces que se tuvo que preparar ADN para electroporar. Por lo anterior, las únicas diferencias en la calidad del ADN serían resultado de las minúsculas peculiaridades inherentes a cada proceso de preparación y al tiempo de congelación previo a su uso. En cuanto a la cantidad de ADN incluida en cada uno de los experimentos, cuando se utiliza vector circular se transforma un total de 1 microgramo de ADN, para la transformación de la construcción recombinante FwdMY19Rvs se utilizó un total de 2 microgramos de ADN, y para la transformación de las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs se utilizó un total de 3 microgramos de ADN.

Es un hecho que la eficiencia de electroporación depende en cierta medida de la cantidad de ADN que se introduzca así como de la cantidad y de la fase de crecimiento en el que se encuentran las células electrocompetentes (Ishiguro Junpei, 1995). En cada uno de los experimentos se utilizaron células cosechadas a una densidad óptica de entre 0.9 y 1.2, que en términos de crecimiento no representan una diferencia significativa pues en ese intervalo las células se encuentran aun en la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo,

los resultados obtenidos parecen indicar que la mayor eficiencia se alcanza cuando las células se cosechan cuando se encuentran lo más cerca posible a una densidad óptica de 1.

Basados en estas observaciones, los resultados del experimento de transformación T1 donde prácticamente no se obtuvieron recombinantes, podrían deberse a la falta de pericia inicial. Los resultados de los experimentos de transformación T2 y T3, similares entre ellos, podrían explicarse argumentando que la tendencia de obtener un mayor número de clonas en los experimentos con las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs se debe a una mayor cantidad total de ADN electroporado comparado con las otras dos condiciones, así como a la pericia desarrollada durante cada experimento subsecuente, lo cual aumentaría la eficiencia indirectamente. Por otro parte, el bajo número de clonas obtenidas en el experimento de transformación T4 se puede deber a la degradación sufrida por el ADN transformante al estar conservado de manera lineal por un periodo de tiempo suficientemente largo.

Aunque esta serie de hipótesis pudiera ser suficiente para explicar el número de clonas obtenidas, no parece de ninguna manera satisfactoria para explicar el hecho aparente de que un evento de recombinación triple sucede con una frecuencia de órdenes de magnitud mayor a un evento de recombinación doble.

Para poder explicar este fenómeno es necesario recurrir a las bases mismas de la recombinación. Independientemente de los mecanismos que sean capaces de circularizar el vector, ya sea que recombine consigo mismo o que sea el blanco de una unión de cadena sencilla, sabemos que el fondo de las transformaciones está en un intervalo menor al 5% del total de clonas obtenidas, por ende las tendencias observadas deben de ser resultado de la interacción de las construcciones recombinantes con el vector linearizado (Haber James E, 1999).

Para que pueda ocurrir la recombinación entre la construcción recombinante FwdMY19Rvs y el vector linearizado, es necesario que uno o ambos extremos de cada una de las moléculas sufran cortes tipo exonucleasa, de esta forma se obtienen extremos de cadena sencilla que son capaces de invadir a una doble cadena de secuencia similar o de alinearse con una cadena complementaria. Ya que ambas moléculas se introducen en la levadura en estado lineal, es de esperar que sus extremos sean reconocidos por la célula

como un corte de doble cadena en el ADN. Estos extremos, en el caso particular de la construcción recombinante FwdMY19Rvs solo pueden invadir o complementarse con los extremos del vector linearizado, por ende es necesario que ambos extremos del par de moléculas sufran una recombinación para poder obtener un vector circular.

El caso de las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs es ligeramente diferente, ya que cada una de ellas solo tiene un extremo homólogo al vector, por lo que la actividad de exonucleasa en uno o ambos extremos de cualquiera de las dos construcciones recombinantes deja libre un extremo de cadena sencilla que corresponde a la secuencia del gen. Este extremo entonces es capaz de invadir o alinearse con otra molécula de una secuencia idéntica o similar; la recombinación de estas dos moléculas tiene como resultado una nueva molécula de ADN que en estructura sería exactamente igual a una construcción recombinante FwdMY19Rvs. A partir de entonces la nueva molécula tiene la misma probabilidad de recombinar con un vector linearizado para generar un plásmido con inserto circular, que la que posee una construcción recombinante FwdMY19Rvs.

Es un hecho conocido que la probabilidad de recombinación entre un par de moléculas de ADN depende tanto de la similitud en sus secuencias como de la extensión de las mismas; entre más pares de bases contenga la región de alta similitud, el evento de recombinación sucederá con mayor frecuencia (Alberts et al. 2007, Suzuki et al. 1985). Las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs contienen una secuencia idéntica entre ellas de 900-1000 pares de bases y un extremo de 50 pares de bases complementario al vector. Por otro lado, la construcción recombinante FwdMY19Rvs solo comparte las últimas 50 pares de bases con el vector en sus dos extremos. Por lo que esperábamos que la integración de las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs al vector linearizado, que involucra necesariamente tres eventos de recombinación, dos independientes y uno facilitado, sucediera con una frecuencia considerablemente más baja a la de la integración de la construcción recombinante FwdMY19Rvs, la cual implica solo dos eventos de recombinación, uno independiente y otro facilitado.

Es factible que el mayor número de clonas obtenidas al electroporar las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs en los experimentos de transformación T2 y T3 sea resultado de los eventos de recombinación que suceden en estas

construcciones recombinantes, favorecidos por la extensión de identidad, aunados a una posible mejor eficiencia de transformación debido a la cantidad de ADN utilizado en cada electroporación. Al electroporar un microgramo de ADN lineal correspondiente a la construcción recombinante FwdMY19Rvs, junto con un microgramo de ADN correspondiente al vector linearizado, se transforma un determinado número de moléculas de cada uno de los componentes. Como resultado de la transformación un cierto porcentaje de las moléculas totales puede llegar hasta el citoplasma de las células, y para el caso particular de la construcción recombinante FwdMY19Rvs, éste número de moléculas permanece constante una vez dentro de la célula. Por lo tanto un cierto número de moléculas de la construcción recombinante FwdMY19Rvs estarán disponibles para recombinar con un cierto número de moléculas de vector linear dentro de la célula. De igual forma al electroporar un microgramo de la construcción recombinante FwdMY19, junto con un microgramo de la construcción recombinante MY19Rvs y un microgramo más del vector linearizado, un cierto porcentaje del total de las moléculas será capaz de llegar hasta el citoplasma de la célula, sin embargo, si este porcentaje de moléculas transformadas aumenta drásticamente debido a una mayor eficiencia de transformación o simplemente debido a una mayor cantidad de ADN electroporado, el número total de construcciones recombinantes FwdMY19Rvs disponibles (resultantes de los diferentes tipos de recombinaciones que pueden ocurrir entre las construcciones recombinantes FwdMY19 y MY19Rvs), será mucho mayor que el número el de las construcciones recombinantes disponibles al electroporar la construcción recombinante FwdMY19Rvs únicamente. Por lo tanto, en este segundo experimento, el número total de construcción recombinantes del tipo FwdMY19Rvs disponibles para recombinar con el vector linearizado será mayor que el de las construcciones recombinantes disponibles resultantes de la electroporación de la construcción recombinante FwdMY19Rvs únicamente.

Al aumentar la eficiencia de transformación se incrementa directamente el número de clonas obtenidas producto de una mayor cantidad de ADN que es capaz de introducirse en la célula. Al aumentar la cantidad de ADN introducido en célula aumenta la probabilidad de recombinación entre las diferentes construcciones recombinantes y al aumentar la probabilidad de recombinación, se incrementa el número total de plásmidos circularizados. Existe evidencia suficiente para creer que estos fenómenos ocurren.

Diversos estudios acerca de transformación de levadura demuestran que el ADN lineal es electroporado más eficientemente que el ADN circular (Ishiguro Junpei, 1995), además también se demostró que el número total de transformantes en la electroporación es una función de la cantidad de ADN electroporado (Delorme 1989, Hill 1989, Rech et al. 1989), e incluso hay literatura que afirma que el simple estímulo de la transformación, ya sea química o por electroporación, es capaz de inducir y aumentar la tasa recombinación en levadura (Higgins y Strathern 1991, Mezard y Nicolas 1993, Larinov et al. 1994, Priebe et al. 1994).

Es posible, entonces, que la tendencia observada en los experimentos de transformación T2 y T3 sea un resultado sinérgico de una mayor eficiencia de transformación provocada por la electroporación de una mayor cantidad de ADN y una alta tasa de recombinación entre construcciones recombinantes, que en última instancia genera una gran cantidad de construcciones recombinantes tipo FwdMY19Rvs que están disponibles para recombinar con el vector. Mientras que es posible explicar la ausencia de esta tendencia en los experimentos de transformación T1 y T4 debido a la falta de pericia para realizar la electroporación en el primer caso y a la posible degradación del ADN que se utilizó para realizar la electroporación en el segundo.

Una vez obtenidas las clonas, el ensayo de actividad preliminar nos arrojó resultados inesperados. En primera instancia, el hecho de que la clona control sin inserto presentara la coloración indicativa de la oxidación del TMB resultó desconcertante, así que se realizaron una serie de ensayos y experimentos con el propósito de definir la fuente de dicha oxidación. El tubo de ensayo marcado como control contenía únicamente TMB disuelto en agua junto con peróxido, y aunque en primera instancia pareciera que tiene la misma actividad que los sobrenadantes que se probaron, hay una gran diferencia en el tiempo de incubación que éstos requieren para alcanzar un color azul de la intensidad mostrada: mientras que los 7 tubos que contenían el sobrenadante de algún cultivo celular alcanzaban el tono azul intenso entre las 2 y 3 horas de incubación, el tubo control alcanzó el mismo tono después de unas 6 o 7 horas de incubación. Por lo tanto, es factible descartar esta oxidación residual como la responsable de la coloración del TMB en cualquiera de los 7 ensayos que contenían con el sobrenadante concentrado de alguna de las clonas elegidas.

En el ensayo cualitativo se probaron también diferentes sustratos con el propósito de identificar posibles blancos de oxidación de nuestra proteína hipotética sin éxito. El hecho de que el TMB fuera el único sustrato utilizado podría deberse a un sinnúmero de factores, entre ellos, la especificidad de la proteína codificada por nuestro gen potencial de peroxidasa o las características inherentes a cada sustrato, así como su reactividad y la posibilidad que tienen de interactuar con alguna proteína de las varias que se encuentran en el sobrenadante.

En trabajo realizado por De Necochea en 2007 se logró determinar que existe la posibilidad de que, dentro de las moléculas presentes en el sobrenadante de un cultivo celular, una o varias de ellas fueran capaces de oxidar al sustrato, generando falsos positivos. Basándonos en este trabajo se ideó el segundo control, en el que se decidió fraccionar el sobrenadante filtrándolo a través de una membrana de 10KDa. Los resultados obtenidos muestran claramente que la actividad de oxidación de TMB se conserva únicamente en la fracción que corresponde a macromoléculas de más de 10KDa de peso y que la fracción de micromoléculas sólo conserva un grado de oxidación residual, que en términos cualitativos era idéntico al grado de oxidación observado en el tubo control que sólo contenía agua, TMB y peróxido. Esta oxidación residual podría ser fácilmente explicada por una reacción de Fenton (Fenton, 1984) o una reacción tipo Haber-Weiss (Haber F, 1932), provocada por las trazas de metal que son extremadamente difíciles de eliminar en el agua y que probablemente también se encuentran en el sobrenadante debido al medio de cultivo utilizado, además de que el TMB es susceptible de autooxidación al disolverse en agua (Liem HH, 1979). Independientemente del origen químico de la oxidación residual, ésta no tiene la velocidad, ni el potencial suficiente para explicar la coloración de ninguno de nuestros sobrenadantes en presencia del TMB y peróxido.

Los primeros ensayos de actividad realizados en el espectrofotómetro nos arrojaron una idea preliminar de las actividades de cada uno de los sobrenadantes, sin embargo, estos datos se vieron afectados por la formación de un precipitado en la mezcla de reacción. En primera instancia se observó que el precipitado no se formaba inmediatamente al mezclar los componentes de la reacción sino que requería de un cierto tiempo de incubación de alrededor de unos 20 minutos. Una vez que se comenzaba a formar el precipitado, éste aumentaba rápidamente, al parecer producto de una aceleración en el proceso de formación,

y una vez alcanzado cierto nivel máximo de producto o de saturación, el proceso disminuía gradualmente hasta el punto en que ya no se formaba nuevo precipitado. Este fenómeno seguía también un patrón particular en la forma en la que alteraba las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro, ya que durante la fase de formación de precipitado se podía observar un aumento considerable en las lecturas obtenidas, la cual disminuía posteriormente al bajar la tasa de formación del precipitado, creando un patrón de campana en los datos obtenidos.

Se siguieron diferentes estrategias para tratar de eliminar el precipitado, en primera instancia se intentó cambiar el disolvente con el propósito de tener un mejor control de nuestros ensayos, así que intentamos sustituir el agua, que hasta ese momento era el disolvente en el cual se habían llevado a cabo todos los ensayos, por buffer de fosfatos pH6.1, sin embargo, la solubilidad del TMB en este buffer era prácticamente nula por lo que resultaba imposible obtener dato alguno de dicha mezcla. Posteriormente intentamos centrifugar la reacción al momento de la formación del precipitado y justo antes de tomar la lectura pero sin éxito. El siguiente paso consistió en identificar cual de los componentes presentes (o combinación de ellos) en la mezcla de reacción era el responsable de formar el precipitado y al realizar todas las combinaciones posibles descubrimos que sólo se necesitaba la interacción del sobrenadante con el TMB para la formación del precipitado.

Estas observaciones indican claramente que hay un elemento del sobrenadante que es capaz de interactuar con el TMB, modificándolo y provocando turbidez. La precipitación puede ser resultado de varios factores; es posible que la reacción que oxida al TMB propicie o provoque la polimerización de este compuesto o de algún otro producto de la reacción, también es posible que la reacción misma cambie el pH de la mezcla y que por lo tanto, alguno de sus componentes, ya sea al TMB o alguna proteína del sobrenadante. Es por esto que se decidió utilizar únicamente los datos obtenidos de los primeros diez minutos de reacción, explotando el tiempo de incubación requerido (20 minutos aproximadamente) para el inicio de la formación del precipitado.

Los resultados de actividad volumétrica obtenidos de las cinéticas realizadas confirman nuestras observaciones en los ensayos cualitativos. Estos resultados nos permitieron determinar la magnitud de las dos reacciones de fondo observadas y que son responsables de un cierto porcentaje de la oxidación del TMB observada. La oxidación

directa del TMB en presencia de peróxido, considerada como una oxidación puramente química, puede explicarse fácilmente como la suma de la autooxidación del TMB disuelto en agua y del efecto de una reacción de Fenton o Haber-Weiss. Para explicar la oxidación del TMB por el sobrenadante en ausencia de peróxido es necesario considerar ciertas características inherentes a este compuesto. La síntesis del TMB tuvo el propósito original de crear un sustituto para la bencidina, compuesto utilizado ampliamente hace veinte años para el análisis de la hemoglobina, el cual tenía la enorme desventaja de ser un cancerígeno poderoso. El TMB surgió como una alternativa eficaz y no cancerígena para la detección de hemoglobina, es por esto que el TMB puede ser oxidado con relativa facilidad por el grupo hemo de diversas proteínas (Garner et al. 1976, Lijana y Williams 1979, Piller-Loriette et al. 1983, Saluze et al. 1984). Por lo tanto, esta oxidación puede ser explicada por la presencia de alguna proteína hémica o alguna porfirina en el sobrenadante, idea que resulta factible considerando el hecho de que se desconoce la gran mayoría de las proteínas que la levadura pudiera secretar y que pudieran estar presentes en el sobrenadante, aunado al hecho de que hay una gran probabilidad de que un número desconocido de las células se lisaran durante la incubación del cultivo o durante el proceso de extracción y preparación del sobrenadante.

La oxidación del TMB en presencia del sobrenadante dependiente de peróxido cuenta con valores superiores a los observados para las dos reacciones de fondo antes mencionadas. Esta diferencia es un indicio muy fuerte de que hay una actividad enzimática que depende del gen insertado en el vector. La diferencia en los valores de actividad específica entre clonas puede ser explicada por la forma en que se insertó el gen en cada una de ellas; la clona S1C es la clona control, sólo contiene al plásmido sin inserto alguno, por lo que podemos inferir que la actividad observada es resultado de las reacciones de fondo que provocan una oxidación residual del TMB. La clona MY19(1) consta del plásmido y del gen potencial MY19 insertado en fase, esta construcción cuenta con dos secuencias líder: la secuencia líder que se encuentra codificada en el vector y la secuencia líder propia del gen. La clona MY19sPL(2) consta del plásmido y del gen potencial MY19 insertado en fase, esta construcción solo cuenta con una secuencia líder, la que se encuentra codificada en el vector. De esta forma los resultados obtenidos indican que es muy probable que el gen potencial insertado se esté expresando adecuadamente pero que la eficiencia de

la exportación del producto es mayor cuando se encuentra asociado a la secuencia líder codificada por el vector.

PERSPECTIVAS

Este sistema podría tener un sinnúmero de usos potenciales, principalmente enfocado en el monitoreo de librerías creadas a través del barajeo de secuencias. El siguiente paso lógico a seguir es probar nuestro sistema barajando los diferentes homólogos distantes de la colección mediante su transformación simultánea con el propósito de generar variantes completamente nuevas.

Otro dato muy interesante que pudimos obtener de las secuencias estudiadas es una similitud entre éstas y una peroxidasa descrita recientemente. El grupo de Hofrichter y Ullrich realizó la descripción de una perooxigenasa que fue encontrada en el hongo *Agrocybe aegerita* (Hofrichter et al. 2009). Al comparar las diferentes actividades de esta enzima con las actividades de la cloroperoxidasa se pudo observar características únicas correspondientes a cada enzima (Beitlich et al. 2007, Hofrichter et al. 2004, Hofrichter y Ullrich 2005) (Tabla 12). Lo que cabe resaltar de este suceso es que las secuencias obtenidas en el proyecto ya mencionado comparten una similitud, a nivel de secuencia, con esta nueva perooxigenasa al mismo tiempo que comparten una cierta similitud, de nuevo a nivel de secuencia, con la cloroperoxidasa (Hofrichter M, 2009). Este descubrimiento resulta muy interesante y de cierta manera también resulta prometedor, pues puede que alguna de estas proteínas comparta alguna actividad enzimática, ya sea con la perooxigenasa o con la cloroperoxidasa, y puede incluso que sean un híbrido entre ellas, ya sea a nivel de actividad enzimática, o a nivel evolutivo, siendo un intermediario entre las mismas. Sin embargo, estas posibilidades caen en el campo de lo hipotético y es necesario realizar una gran cantidad de estudios para poder afirmar o rechazar alguna de estas hipótesis.

Tabla 12. Comparación de las propiedades generales de la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y la Perooxigenasa de *Agrocybe aegerita*.

| | Cloroperoxidasa | Haloperoxidasa |
|--------------------------|---------------------------------------|---|
| Aktividad | Oxidación Catalasa Halogenación | Halogenación Oxidación Catalasa Peroxigenasa |
| Organismo de procedencia | <i>Caldariomyces fumago</i> | <i>Agrocybe aegerita</i> |
| Expresión Heteróloga | <i>Aspergillus niger</i> | -- |
| pH óptimo | 3-6 | 6-7 |

CONCLUSIONES

La técnica de “shuffling” o barajeo es una herramienta muy poderosa en la exploración del espacio de secuencia de cualquier gen o grupo de genes. El propósito de este trabajo fue establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo exitosamente la ingeniería de homólogos distantes utilizando el barajeo como fuente de variabilidad, así como el diseño de las diferentes secuencias que son necesarias para llevar a cabo esta técnica. El vector elegido, así como el diseño y la construcción de las diferentes construcciones recombinantes que se utilizaron en este trabajo probaron ser elecciones acertadas en el desarrollo de este sistema de recombinación, generando un total de 18 construcciones recombinantes. Estos y otros elementos fueron determinantes en el éxito del sistema, y los diferentes ensayos realizados nos permitieron evaluar y optimizar su eficiencia.

Las diferentes transformaciones realizadas nos permitieron determinar que la electroporación es el método más efectivo y reproducible de los diferentes protocolos de transformación química probados. Los resultados obtenidos nos permiten asegurar que el diseño del sistema fue exitoso. Las construcciones recombinantes generadas y el vector funcionan de manera apropiada y por ende se logró la expresión heteróloga de uno de nuestros genes potenciales de peroxidasas en levadura gracias al sistema de recombinación *in vivo* diseñado y montado en este organismo. Por lo que se logró alcanzar el principal objetivo de este trabajo. Adicionalmente, es la primera demostración que el producto del gene MY19 de *Phytophthora infestans* codifique para una enzima.

BIBLIOGRAFIA

Agatep R, Kirkpatrick D, Parchaliuk L, Woods A, and Gietz D. "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol." 1998.

Alberts Bruce., Jhonson Alexander., Lewis Julian., Raff Martin., Roberts Keith., Walter Peter. *Molecular Biology of the Cell. Fifth Edition*. London: Taylor & Francis, Inc., 2007.

Alcalde Miguel, Zumárraga Miren, Camarero Susana, Shleev Sergey, Martínez-Arias Arturo, Ballesteros Antonio, Plou Francisco J. "Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra." (*Proteins*) 71 (2008).

Alcalde, Miguel, et al. "In Vitro Evolution of a Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Solvents." (*Chemistry & Biology*) 14 (2007).

Altschul S F, Gish W, Miller E W, Lipman D J. *Basic Local Alignment Search Tool*. 1997. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Arnold Frances H, Bulter Thomas, Alcalde Miguel, Sieber Volker, Meinhold Peter, Schlachtbauer Christian. "Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution." (*Applied and Environmental Microbiology*) 69 (2003).

Becker, Daniel M. "Introduction of DNA into Yeast Cells." In *Current Protocols in Molecular Biology*.

Beitlich T, Kuhnel K, Schulze-Briese C, Shoeman RL, Shlichting I. "Cryoradiolytic reduction of crystalline heme proteins: Analysis by Uv-Vis Spectroscopy and X-Ray crystallography." *Journal of Synchrotron Radiation*, 2007.

Braman, John. *In Vitro Mutagenesis Protocols. Second Edition*. Human Press Vol.2, 2002.

Cusano Angela M, Mekmouche Yasmina, Meglec Emese, Tron Thierry. "Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast." *FEBS Journal*, 2009.

De Necochea, Rosalia. *Estudios hacia la expresión de cloroperoxidasas en Aspergillus Nidulans*. Cuernavaca, Morelos.: UNAM. Tesis de Maestria en ciencias bioquímicas., 2007.

Delorme, Evelyne. "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Electroporation." *Applied and environmental microbiology*, 1989.

DNATechnologies., Integrated. 2010.
<http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/>.

Fenton, H J H. "Oxidation of tartaric acid in presence of iron." *J. Chem. Soc.*, 1984.

Garner D D, Cano K M, Peimer R S, Yeshion T E. "An evaluation of Tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood." 1976.

Geourjon C, Deléage G. *SOPMA Secondary Structure Prediction Method*. 1995.
http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html.

Gietz RD, Schiestl RH. "Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." *Nature Protocols*, 2007.

Haber F, Weiss J. "On the catalysis of hydroperoxide." *Naturwissenschaften*, 1932.

Haber James E, Paques Frederic. "Multiple Pathways fo Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." (*Microbiology and Molecular Biology reviews*) 63, no. 2 (1999).

Higgins DR, Strathern JN. "Electroporation-stimulated recombination in yeast." 1991.

Hill, David E. "Integrative transformation of yeast using electroporation." 1989.

Hofrichter M, Kluge MG, Ullrich R, Scheibner K. "Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase." *Applied Environmental Microbiology*, 2007: 1473-8.

Hofrichter M, Pecyna MJ, Ullrich R, Bittner B, Clemens A, Scheibner K, Schubert R. "Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*." *Applied Microbiology Biotechnology*, 2009.

Hofrichter M, Ullrich R, Nüske J, Scheibner K, Spantze JI. “Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes.” *Applied Environmental Microbiology*, 2004: 4575-81.

Hofrichter M, Ullrich R. “The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene.” *FEBS Letters*, 2005: 6247-50.

Ishiguro Junpei, Kobayashi Wataru. “A practical method for fission yeast transformation by electroporation.” (*Jpn. J. Genet.*) 70 (1995).

Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne, Søren Brunak. *Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.* 2004. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

Larinov V, Kouprina N, Eldarov M, Perkins E, Porter G, Resnick MA. “Transformation-associated recombination between diverged and homologous DNA repeats is induced by strand breaks.” 1994.

Liem HH, Cardenas F, Tavassoli M, Poh-Fitzpatrick MB, Muller-Eberhard U. “Quantitative determination of hemoglobine and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Dihydrochloride, a safe substitute for benzidine.” 1979.

Lijana R C, Williams M C. “Tetramethylbenzidine a substitute for benzidine in hemoglobin analysis.” 1979.

Mezard Christine, Nicolas Alain. “Homologous, Homeologous, and Illegitimate Repair of Double-Strand Breaks during Transformation of a Wild-Type Strain and a rad52 Mutant Strain of *Saccharomyces cerevisiae*.” 1993.

Nagi Peter D, Simon Anne E. “New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination.” (*Virology*) 1997.

Piller-Loriette C, Wingerter P, Gerota J, Schenmetzler C, Reviron J, Aymard P. “Determination of plasma hemoglobin in fresh plasma for therapeutic use by the Tetramethylbenzidine method.” 1983.

Pompon Denis, Alan Nicolas. "Protein Engineering by recombination in yeasts: shuffling of mammalian cytochrome P-450 functions." (*Gene*, Elsevier) 83, no. 03144 (1989).

Priebe Scott D, Westmoreland James, Nilsson-Tillgreen Torsten, Resnick Michael A. "Induction of Recombination between Homologous and Diverged DNAs by Double-Strand Gaps and Breaks and Role of Mismatch Repair." 1994.

Rech EL, Dobson MJ, Davey MR, Mulligan BJ. "Introduction of a yeast artificial chromosome vector into *Saccharomyces cerevisiae* cells by electroporation." 1989.

Salauze D, Laine G, Lacroix C, Gouille JP. "Manual method for assaying plasma hemoglobine by Tetramethylbenzidine and deferoxamine." 1984.

Simon John R, McEntee Kevin. "A rapid an efficient procedure for transformation of intact *saccharomyces cervisiae* by electroporation ." 1989.

Standefer JC, Vanderjagt D. "Use of Tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay." 1977.

Suzuki David T, Miller Jeffrey, Lewontin Richard C, Griffiths Antony J. *Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman Company, 1985.

Wittrup Dane, Swers Jeffrey S, Kellogg Brenda A. "Shuffled antibody libraries created by in vivo homologous recombination and yeast surface display." (*Nucleic Acids Research*) 32 (2004).